

黄芩苷对自身免疫性脑脊髓炎大鼠 细胞凋亡的影响

徐俊¹ 黄榕¹ 杨于嘉¹ 金世杰² 张金凤³

(1. 中南大学湘雅医院儿科, 湖南 长沙 410008; 2. 湖南省儿童医院, 湖南 长沙 410008;
3. 广东省佛山市顺德区妇幼保健院, 广东 佛山 528000)

[摘要] **目的** 观察黄芩苷(BAC)对自身免疫性脑脊髓炎(EAE)大鼠的疗效及其对脊髓炎症细胞凋亡的影响。**方法** 44只Wistar大鼠随机分为正常对照组(NC, $n=10$)、EAE组($n=12$)、地塞米松治疗组(DXM, $n=12$)、BAC治疗组($n=10$)。DXM组和BAC组在抗原免疫后1周分别予以DXM(1 mg/kg)和BAC(200 mg/kg)治疗7 d;观察各组动物脊髓病理变化及髓鞘碱性蛋白(MBP)表达的情况和脊髓炎症细胞凋亡情况。**结果** EAE组、DXM组和BAC组较NC组体重均下降, BAC组体重较EAE组及DXM组明显上升($P<0.05$)。DXM组和BAC组大鼠神经功能评分明显优于EAE组($P<0.05$);DXM组和BAC组脊髓MBP阳性数均较EAE组显著增多($P<0.05$)。DXM组和BAC组脊髓炎症细胞凋亡数均较EAE组显著增多($P<0.05$)。**结论** BAC对EAE大鼠有治疗作用,并且能促进大鼠脊髓炎症细胞凋亡。 [中国当代儿科杂志, 2011, 13(8):665-668]

[关键词] 实验性自身免疫性脑脊髓炎; 细胞凋亡; 地塞米松; 黄芩苷; 大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2011)08-0665-04

Effects of baicalin on apoptosis in rats with autoimmune encephalomyelitis

XU Jun, HUANG Rong, YANG Yu-Jia, JIN Shi-Jie, ZHANG Jing-Feng. Department of Pediatrics, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China (Huang R, Email: hrongxy@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective To study the therapeutic efficacy of baicalin and its effect on apoptosis of inflammatory cells in spinal cords in Wistar rats with autoimmune encephalomyelitis (EAE). **Methods** Forty-four rats were randomly divided into four groups: normal control group (control, $n=10$), EAE group ($n=12$), and two intervention groups with dexamethasone (DXM) or baicalin. Seven days after immunization, the two intervention groups were injected intraperitoneally with DXM (1 mg/kg) and baicalin (200 mg/kg) for 1 week, respectively. The spinal cords were removed 14 days after immunization, and stained with hematoxylin and eosin. MBP expression in spinal cords was detected by immunohistochemistry. The apoptosis of inflammatory cells in spinal cords was detected by TUNEL. **Results** The weight gain rate in the untreated EAE and the DXM or baicalin intervention groups were significantly lower than that in the control group ($P<0.05$). The weight gain rate in the baicalin intervention group was significantly higher than that in the untreated EAE and the DXM intervention groups ($P<0.05$). The scores of neurological function in the two intervention groups were significantly higher than that in the untreated EAE group ($P<0.05$). DXM or baicalin treatment significantly increased the MBP expression compared with the untreated EAE group ($P<0.05$). The apoptosis of inflammatory cells increased more in the DXM and the baicalin intervention groups compared with the untreated EAE groups ($P<0.05$). **Conclusions** Baicalin has protective effects against EAE in rats. It can promote the apoptosis of inflammatory cells in spinal cords. [Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13(8):665-668]

Key words: Autoimmune encephalomyelitis; Apoptosis; Dexamethasone; Baicalin; Rats

急性播散性脑脊髓膜炎是中枢神经系统(CNS)脱髓鞘的自身免疫性疾病,实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)是理想的中枢神经系统脱髓鞘疾病的研究模型。近年

来研究表明,凋亡与自身免疫性疾病的发生、发展和预后密切相关^[1]。国外学者曾发现EAE的CNS中浸润的T淋巴细胞、巨噬细胞的凋亡与疾病的恢复密切相关,并发现地塞米松(dexamethasone,

[收稿日期]2010-12-02; [修回日期]2011-03-28

[作者简介]徐俊,女,硕士。现工作单位:湖南省人民医院儿科,邮编410002。

[通信作者]黄榕,教授。

DXM)能促进 CNS 浸润的炎症细胞的凋亡^[2]。糖皮质激素被公认为对中枢神经脱髓鞘疾病有治疗作用,但这类药有抑制正常免疫、水钠潴留及抑制蛋白质合成、促进蛋白质分解的不良反应。黄芩苷(baicalin, BAC) 是中药黄芩中提取的黄酮类化合物,具有抑菌抗炎、抗变态反应,清除超氧阴离子等作用。目前大量研究证实 BAC 对细胞凋亡有调控功能,它能促进肿瘤细胞^[3,4]及炎症细胞的凋亡^[5],从而促进疾病的恢复。本研究旨在观察 BAC 对 EAE 大鼠 CNS 中浸润的炎症细胞凋亡的影响,并对它的作用机制进行探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组 健康 6~8 周龄雌性 Wistar 大鼠 44 只由湖南农业大学动物部提供,体重 160±20 g, 随机分为正常对照组(NC 组)10 只、EAE 模型组(EAE 组)12 只、地塞米松治疗组(DXM 组)12 只和黄芩苷治疗组(BAC 组)10 只。

1.1.2 主要试剂 兔抗鼠髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein, MBP)单克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司; SP-9001 免疫组化染色试剂盒为 ZYMED 公司进口分装; TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒为美国罗氏公司产品; DAB 显色试剂盒为上海长岛生物技术有限公司产品; 佐剂用卡介苗购自北京生物制品研究所; BAC 粉剂由湘雅医院药剂科提供,纯度 > 95%, 使用时以生理盐水溶解,调节 pH 值至 7.0,浓度为 2.0%; DXM 注射液为福建古田药业有限公司生产。

1.2 实验方法

1.2.1 EAE 模型制作 参照曹翠丽等^[6]的方法稍作修改,将含 0.5 g/mL 的豚鼠脊髓匀浆与完全弗氏佐剂(含卡介苗 6 mg/mL)等体积混合成油包水乳剂,分别向 EAE 组、BAC 组和 DXM 组大鼠的 4 个足垫皮内注射,每只大鼠共注射 0.4 mL 乳剂 1 次。NC 组大鼠不做任何处理。

1.2.2 给药方法 抗原免疫后 1 周,DXM 组予以 DXM 1 mg/kg 腹腔注射,每日 1 次共 7 d; BAC 组予以 BAC 溶液 200 mg/kg 腹腔注射,每日 1 次共 7 d; EAE 组和 NC 组每日以同容积的生理盐水腹腔注射,每日 1 次共 7 d。

1.2.3 观察项目 动物免疫后常规饲养,采取双盲法,每日对各组大鼠进行神经功能评分^[7]。0 分:正常;1 分:尾部无力;2 分:步态笨拙或轻度的共济

失调;3 分:后肢无力;4 分:后肢严重瘫痪伴大小便失禁;5 分:四肢瘫痪,濒死状态或死亡。≥1 分为发病;观察各组发病的潜伏期、发病率,称量每只动物入组时及处死时的体重,并计算体重比(处死时/入组时×100%)。

1.2.4 标本制备 动物免疫后 14 d 时麻醉后处死,取脊髓腰膨大处,用 4% 多聚甲醛固定 24 h,石蜡包埋,苏木精-伊红染色。

1.2.5 MBP 检测及评分 取上述各组石蜡块切片按 SP 免疫组化步骤操作。髓鞘呈棕黄色或棕褐色者为 MBP 阳性。染色强度分与百分比的积即为 MBP 阳性数。400 倍显微镜下每张脊髓腰膨大处切片计数 5 个视野的 MBP 阳性数。

1.2.6 细胞凋亡检测 取上述各组石蜡块切片按 TUNEL 法检测。400 倍光镜下计数 5 个视野 100 个细胞中阳性细胞数,计算凋亡细胞数。

1.3 统计学分析

应用 SPSS 11.0 统计学软件,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多样本均数比较采用方差分析,计数资料比较采用卡方检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组发病情况的比较

EAE 组大鼠于免疫后第 8 天开始发病,表现为精神萎靡、体重下降,尾部张力消失、后肢或四肢瘫痪,大小便失禁,严重者濒临死亡。发病潜伏期 EAE 组为 9.6±0.5 d, BAC 组为 9.9±0.7 d,差异无统计学意义($P > 0.05$); DXM 组的潜伏期(11.0±0.9 d)较 EAE 组及 BAC 组均延长,差异有统计学意义($P < 0.05$)。DXM 组、BAC 组的体重下降、神经功能评分较 EAE 组明显改善(均 $P < 0.05$)。DXM 组的发病潜伏期较 EAE 组延长($P < 0.05$), BAC 组发病率、发病潜伏期与 EAE 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。BAC 组的体重比较 DXM 组和 EAE 组增加($P < 0.05$); BAC 组发病率与 DXM 组差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠发病情况比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	潜伏期(d)	发病率(%)	神经功能评分(分)	体重比(%)
NC	10	-	0	0	114±7
EAE	12	9.6±0.5	75.0	2.6±0.8	99±4 ^b
DXM	12	11.0±0.9 ^a	66.7	1.6±0.5 ^a	93±6 ^a
BAC	10	9.9±0.7 ^c	80.0	1.9±0.6 ^a	105±4 ^{a,c}

a: 与 EAE 组比较, $P < 0.05$; b: 与 NC 组比较, $P < 0.05$; c: 与 DXM 组比较, $P < 0.05$

2.2 各组脊髓病灶数的比较

NC 组未见病灶。与 EAE 组比较,DXM 组病灶数明显减少($P < 0.05$);BAC 组病灶数与 EAE 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

2.3 各组 MBP 表达

NC 组脊髓腰膨大 MBP 着色呈深棕色。与 NC 组比较,EAE 组、DXM 组、BAC 组 MBP 着色减轻,MBP 阳性细胞数减少,差异有统计学意义($P < 0.05$);DXM 组和 BAC 组 MBP 阳性细胞数明显高于 EAE 组($P < 0.05$);DXM 组 MBP 阳性细胞数和 BAC 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

2.4 各组大鼠脊髓 TUNEL 检测结果

NC 组大鼠脊髓组织未见或偶见 TUNEL 阳性细胞表达。与 NC 组比较,EAE 组、DXM 组、BAC 组均可见较多的 TUNEL 阳性细胞,差异有统计学意义

($P < 0.05$);DXM 组和 BAC 组的 TUNEL 阳性细胞较 EAE 组增多($P < 0.05$);DXM 组的 TUNEL 阳性细胞与 BAC 组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 2、图 1。与同一蜡块相邻切片苏木精-伊红染色对照,从形态学推断上述阳性细胞为浸润的炎症细胞。

表 2 各组大鼠脊髓腰膨大病灶数、MBP 阳性数和凋亡细胞数的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	病灶数	MBP 阳性数	TUNEL 阳性细胞数
NC	10	0	14.8 ± 1.0	1.0 ± 0.9
EAE	12	4.6 ± 2.6	8.0 ± 2.2 ^b	44.2 ± 4.1 ^b
DXM	12	2.1 ± 1.3 ^a	10.3 ± 1.6 ^{a,b}	63.3 ± 4.6 ^{a,b}
BAC	10	3.8 ± 1.9	10.1 ± 1.5 ^{a,b}	57.2 ± 3.4 ^{a,b}

a:与 EAE 组比较 $P < 0.05$; b:与 NC 组比较 $P < 0.05$

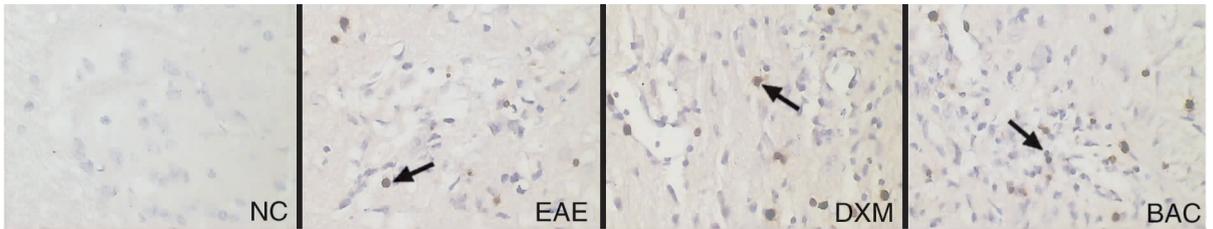


图 1 各组大鼠脊髓 TUNEL 检测(DAB, ×400) NC 组脊髓未见 TUNEL 阳性细胞;EAE 组脊髓可见散在的棕色阳性细胞;DXM 组脊髓可见较多阳性细胞;BAC 组脊髓可见较多阳性细胞。箭头示 TUNEL 阳性细胞。

3 讨论

EAE 的发生是由于 T 淋巴细胞和巨噬细胞侵入 CNS,导致 CNS 脱髓鞘。目前大量研究已证实浸润到 CNS 的炎症细胞凋亡在 EAE 恢复和耐受形成中起重要作用。2004 年陈慧芳等^[8]研究发现 EAE 病程中 CNS 浸润的炎症细胞在发病高峰期达最高水平,进入恢复期后,炎症细胞出现凋亡而数量递减。这种单峰曲线的变化规律提示,炎症细胞凋亡与 EAE 病情恢复存在密切联系。

DXM 具有免疫抑制作用,不仅可以减少 EAE 周围 T 淋巴细胞的活化,还能增加 CNS 浸润 T 淋巴细胞的凋亡,从而终止自身反应性 T 淋巴细胞对神经系统的免疫攻击^[9],这也是其治疗的重要机制。BAC 具有抑菌抗炎、抗变态反应的功效。目前大量研究证实 BAC 对细胞凋亡具有调控功能,BAC 预处理能够有效地减轻新生大鼠缺氧缺血后脑组织损伤,减少神经元凋亡^[10]。同时,BAC 又能促进肿瘤

细胞和炎症细胞的凋亡,从而起到抗肿瘤的作用。BAC 还可通过抑制淋巴细胞功能及抑制炎症介质产生而发挥抗炎作用,它能通过介导急性胰腺炎大鼠模型的炎症细胞凋亡,从而减少大鼠的肾损伤^[11]。

本研究发现对于 EAE 大鼠,BAC 治疗组临床症状有明显缓解作用,并且 BAC 治疗组大鼠 CNS 浸润的炎性细胞的凋亡率明显增高,同时对比了 DXM 治疗组对 CNS 浸润的炎性细胞的凋亡作用,发现两者促凋亡程度相当,提示 BAC 对 EAE 大鼠的治疗作用可能与促进其 CNS 浸润细胞的凋亡有关。CNS 浸润的炎性细胞凋亡增多,从而部分终止了自身反应性 T 淋巴细胞对神经系统的免疫攻击,减少了髓鞘的脱失,临床症状缓解。本研究中 BAC 组病灶数较 EAE 组有所减轻,但差异不明显,考虑在 BAC 给药时 EAE 模型中的免疫系统已经启动,炎性细胞也已浸润到 CNS。BAC 的治疗意义在于它促进浸润细胞的凋亡,从而改善症状。而 DXM 不仅能促进 CNS 浸润炎症细胞的凋亡,还能减少外周 T 淋巴细

胞的增殖与活化,因而使得 CNS 浸润的炎症细胞明显减少。

本研究仅观察了 BAC 治疗 EAE 大鼠发病早期和高峰期的疗效和高峰期 CNS 炎症细胞凋亡率的情况,关于 BAC 对 EAE 恢复期的影响,以及它是通过何种途径来调控 EAE 大鼠 CNS 炎症细胞凋亡还有待于进一步研究,这将可能更好地解释 BAC 的治疗机制。

[参 考 文 献]

[1] Bauer J, Wekerle H, Lassmann H. Apoptosis in brain-specific autoimmune disease[J]. *Curr Opin Immunol*, 1995, 7(6): 839-843.

[2] Nguyen KB, McCombe PA, Pender MP. Increase apoptosis of T lymphocytes and macrophages in the central and peripheral nervous systems of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis treated with dexamethasone [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1997, 56(1): 58-69.

[3] Chao JI, Su WC, Liu HF. Baicalein induces cancer cell death and proliferation retardation by the inhibition of CDC2 kinase and survivin associated with opposite role of p38 mitogen-activated protein kinase and AKT Mol [J]. *Cancer Ther*, 2007, 6(11): 3039-3048.

[4] 匡菊香,雷沛鸿,石江. 黄芩苷对人黑色素瘤 A375 细胞增殖的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2008, 26(11): 2510-2512.

[5] Zhang XP, Tian H, Lai YH, Chen L, Zhang L, Cheng QH, et al. Protective effects and mechanisms of Baicalin and octreotide on renal injury of rats with severe acute pancreatitis [J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(38): 5079-5089.

[6] 曹翠丽,王惠,马常升,杨天祝. 实验性变态反应性脑脊髓炎大鼠模型的建立[J]. *解剖学杂志*, 2001, 24(1): 77-80.

[7] Maccioni M, Riera CM, Rivero VE. Peritoneal antigen-presenting cells pulsed in vivo with myelin basic protein induce the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in Wistar rats [J]. *J Neuroimmunol*, 1999, 96(1): 46-56.

[8] 陈慧芳,吕佩源,陈竞清,林嘉友. EAE 大鼠中枢神经系统与外周免疫器官细胞凋亡的研究[J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2004, 11(5): 280-283.

[9] McCombe PA, Nickson I, Tabi Z, Pender MP. Corticosteroid treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis in the Lewis rat results in loss of V beta 8.2⁺ and myelin basic protein-reactive cells from the spinal cord, with increased total T-cell apoptosis but reduced apoptosis of V beta 8.2⁺ cells [J]. *J Neuroimmunol*, 1996, 70(2): 93-101.

[10] 林小娟,杨于嘉,祁伯祥,王霞,宋健辉. 黄芩苷预处理对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤的保护作用[J]. *中国当代儿科杂志*, 2006, 8(3): 221-224.

[11] 朱伟,孙红光,朱迅. 黄芩苷元对炎症反应的影响[J]. *中国药理学通报*, 2009, 25(2): 194-197.

(本文编辑:俞 燕)

· 消息 ·

第二届全国、全军儿科疾病细胞治疗学习班暨高峰论坛通知

由海军总医院儿科主办,北京儿科学分会、全军儿科学会、中国神经修复学会筹办委员会、中国医药生物技术协会再生医学专业委员会协办的全国暨全军儿科疾病细胞治疗高峰论坛将于 2011 年 10 月 14 - 16 日在北京举行。

近年来干细胞及其相关临床前研究和临床研究发展迅速,经典的造血干细胞移植方兴未艾,传统的细胞免疫疗法日新月异,胚胎干细胞、iPS 细胞、各种成体干细胞的基础与临床研究突飞猛进,国际上有关干细胞的临床试验逐年增加,我国《国家中长期科技发展纲要》(2006 ~ 2020 年)将干细胞技术列为重点支持项目,国家高技术研究发展计划(863 计划)、973 计划、国家自然科学基金每年投入大量资金支持干细胞相关研究。本届论坛将邀请国内外知名院士和专家讲授细胞疗法的基础和临床研究最新进展,涉及血液肿瘤,自身免疫及免疫缺陷病,围产期脑损伤,难治性神经肌肉系统疾病,遗传代谢,消化,内分泌等系统疾病,欢迎您的参加! 本次论坛将授予国家、军队继续教育学分。

联系方式:

联系人:霍玉婧 电话:010 - 88511150 - 812;13146504773 传真:010 - 88511150 - 826

电子信箱:huoyujing.2008@163.com