

依达拉奉对大鼠实验性自身免疫性脑脊髓炎的保护作用

汤 熠 魏 伟 魏麓云[△]

(南华大学附属第二临床医院神经内科 湖南 衡阳 421001)

摘要 目的:研究依达拉奉对实验性自身免疫性脑脊髓炎(Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, EAE)的影响。**方法:**72 只健康成年雌性 Wistar 大鼠随机分为:正常对照组、EAE 组、EAE+ 小剂量依达拉奉组、EAE+ 大剂量依达拉奉组(n=18)。正常对照组注射生理盐水,其它组采用自制完全抗原诱导 EAE 模型。EAE 组建模后不做任何处理,EAE+ 小剂量依达拉奉组、EAE+ 大剂量依达拉奉组分别在建模后给予依达拉奉 4 mg/kg·d、10 mg/kg·d。比较各组发病率并行神经功能评分,取脊髓组织行 HE 染色、iNOS、OPN 免疫组织化学染色观察。**结果:**依达拉奉干预组大鼠较 EAE 组发病率、神经功能缺损评分均明显降低(P<0.05)。HE 结果显示依达拉奉干预组较 EAE 组炎症反应减少,损伤程度减轻。依达拉奉组 iNOS、OPN 表达均明显小于 EAE 组(P<0.05)。大剂量依达拉奉 iNOS、OPN 表达均低于小剂量依达拉奉组(P<0.05)。**结论:**依达拉奉对 EAE 具有保护作用,可能与抑制小神经胶质细胞活化,减轻炎症反应,降低 iNOS 和 OPN 表达有关。

关键词:实验性自身免疫性脑脊髓炎;依达拉奉;诱导型一氧化氮合酶;骨桥蛋白;大鼠

中图分类号:Q95-3, R744.5+1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2011)04-680-04

Protective Effect of Edaravone on Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Rats

TANG Yi, WEI Wei, WEI Lu-Yun[△]

(Department of Neurology, the Second Affiliated Hospital of Nanhua Medical College, 21001, Hengyang, China)

ABSTRACT Objective: To study the effect of edaravone on experimental autoimmune encephalomyelitis(EAE) in rats. **Methods:** 72 adult healthy female Wistar rats were randomly divided into 4 groups: normal control group, EAE group, EAE group plus low dose edaravone group, EAE group plus large dose of edaravone group(n = 18). Normal group were subcutaneously injected saline water. The EAE model were established with self-made complete antigen, then the small (4mg/kg o d) and large(10mg/kg o d) doses of edaravone were given according the experimental protocol. The incidence and the scores of neurologic impairment were recorded,also the HE staining, the inducible nitro oxide synthase(iNOS) and Osteopontin(OPN) immunohistochemistry staining were performed and analyzed. **Results:** After the treatment of edaravon, the incidence and scores of neurologic impairment were significantly decreased (P<0.05). HE staining showed that the edaravone group with alleviation of inflammatory reaction and degree of injury. Either low or large -dose edaravone group, the expression of iNOS, OPN was significantly less than the EAE group (P<0.05). In large-dose edaravone group, the expression of iNOS and OPN was significantly lower than low-dose edaravone group (P<0.05). **Conclusion:** The results suggested that Edaravone have protective role on EAE, which maybe related to the inhibition of microgliaocyte activation, alleviation of inflammatory reaction and reduction of iNOS and OPN expression.

Key words: Experimental autoimmune encephalomyelitis; Edaravone; Inducible nitro oxide synthase; Osteopontin; Rat

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R744.5+1 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)04-680-04

多发性硬化(Multiple Sclerosis, MS)是常见的慢性中枢神经系统脱髓鞘疾病,其发病机制尚不明确^[1]。近年来越来越多研究表明自由基损伤与 MS 发病可能密切相关^[2]。依达拉奉(Edaravone)是一种新型的自由基清除剂,通过抑制脂质、脑细胞过氧化而发挥脑保护作用,同样对其他脏器也有保护作用^[3,4]。但依达拉奉对于 MS 是否具有保护作用尚缺乏相关研究。实验

性自身免疫性脑脊髓炎(Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, EAE)具有与人类 MS 极为相似的临床、生化、免疫及病理特征,是研究人类 MS 理想的动物模型^[5]。本研究采用大鼠 EAE 模型,通过神经功能评分、HE 染色、诱导型一氧化氮合酶(Inducible nitro oxide synthase, iNOS)和骨桥蛋白(Osteopontin, OPN)免疫组化等,观察依达拉奉治疗对其影响。

1 材料与方法

1.1 材料

6-8 周龄雌性 Wistar 大鼠,体重 180-200 g(南华大学实验动物中心,许可证号:SYXK-012);自备豚鼠脊髓匀浆(Guinea

作者简介:汤熠(1983-),女,硕士研究生,医师,研究方向:神经病学的基础与临床研究,

Tel: 15173440729, E-mail: mimiyeu@gmail.com

[△]通讯作者:魏麓云, E-mail: nanhua9988@163.com

(收稿日期:2010-11-05 接受日期:2010-11-30)

Pig Spinal Cord Homogenate, GPSCH); 自备完全弗式佐剂 (Freud's Complete Adjuvant, CFA); 卡介苗 60 mg/ml(上海生物制品研究所); 百日咳杆菌 2×10^{10} /ml(上海生物制品研究所); 多克隆兔抗大鼠 iNOS 抗体、多克隆兔抗大鼠 OPN 抗体(武汉博士德生物工程有限公司); 依达拉奉(南京先声药业东元制药有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 自制完全抗原的制备 将豚鼠用水合氯醛(350 mg/kg)麻醉后,置于冰上迅速取其脊髓,剥除脊膜,称重后使用手动匀浆器按 1 g 脊髓:1 ml 生理盐水制成 GPSCH。将等量的 GPSCH 和含有 5 mg/ml 的 CFA 充分混合至油包水乳剂,制成完全抗原。

1.2.2 动物分组与模型 将大鼠随机分为 4 组: 正常对照组、EAE 组、EAE+ 小剂量依达拉奉组、EAE+ 大剂量依达拉奉组(n=18)。正常对照组大鼠在四个足垫及背部皮下各注射 0.1 ml 生理盐水,其余三组用自制完全抗原,按 0.5 ml/ 只分别于大鼠四个足垫及背部皮下注射, 百日咳杆菌原液 0.2 ml 足背注射,建立 EAE 动物模型。EAE 组建模后不做任何处理。小、大剂量依达拉奉组在建模后第 1 天开始分别腹腔给予依达拉奉 4 mg/kgod、10 mg/kgod,每日一次,连续 15-18 天。对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》的有关规定^[6]。

1.2.3 神经功能缺损评分 模型建立后,每天上下午对动物每天体重改变、精神状态及活动情况进行观察,并采用 Hooper 标准^[7]进行神经功能缺损评分:0 分:正常,1 分:被毛不光整+尾部无力,2 分尾部瘫痪,3 分:尾部瘫痪+后肢无力,4 分:尾部瘫痪+后肢部分瘫痪,5 分后肢完全瘫痪,6 分:四肢瘫痪,7

分:濒死状态或者死亡。症状介于两者之间者以 ± 0.5 。
1.2.4 标本取材、染色及观察 于免疫诱导后第 15 天,将各组动物发病级别在 4 级以上(包括 4 级)的动物处死,其余的在第 18 天处死。使用水合氯醛麻醉后,经左心室主动脉插管后先用生理盐水冲洗血液,再用 4 %多聚甲醛缓冲液约 300 ml 灌注固定,然后取腰膨大脊髓固定于 4 %多聚甲醛缓冲液中后固定 24 小时。常规石蜡包埋,组织切片机取 4 μ m 厚度连续切片,并每间隔 100 μ m 取 1 张,每个脊髓组织取 3 张切片做常规 HE 染色及 iNOS 和 OPN 免疫组织化学染色。常规 HE 染色后,在光学显微镜下进行观察,了解组织中血管周围炎症细胞浸润情况。免疫组织化学按照说明书进行,经 DAB 显色后苏木素复染细胞核,中性树胶封片。切片在显微镜下观察,计数每张切片脊髓内随机 5 个高倍视野下阳性细胞个数。

1.3 统计学分析

计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{X}\pm S$)表示,组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),其中两两比较采用 SNK-q 检验。计数资料采用 χ^2 检验。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义,使用 SPSS 15.0 统计软件完成数据分析。

2 结果

2.1 实验动物发病率及神经功能缺损评分

免疫当天麻醉醒后无大鼠死亡。正常组无大鼠发病。动物发病主要表现为尾部肌张力降低,双后肢无力、瘫痪,可伴有大小便失禁,严重者出现四肢瘫痪甚至死亡。依达拉奉干预组大鼠较 EAE 组发病率、神经功能缺损评分均明显降低($P<0.05$)。大剂量依达拉奉组与小剂量依达拉奉组之间有差异($P<0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠的发病情况及神经功能缺损评分($\bar{X}\pm S$, n = 18)
Table 1 The incidence and scores of neurologic impairment in different group($\bar{X}\pm S$, n = 18)

Group	Number of incidence	Incidence	Scores of neurologic impairment
Normal group	0	0	0
EAE group	15	83.33	5.14 $\pm$ 0.73
EAE + low dose edaravone group	10	55.56*	3.66 $\pm$ 0.69*
EAE+ large dose of edaravone group	6	33.33**	0.78 $\pm$ 1.98**

Note: * $P<0.05$ compared with EAE group, # $P<0.05$ compared with low does of edaravone group

3.2 组织病理学表现

正常组的大鼠未见异常。依达拉奉干预组大鼠中枢神经系统内的组织病理改变与 EAE 组比较病理变化的形式相同,但均有不同程度减轻,如病灶的炎症浸润细胞数、"血管套",依达拉奉干预组明显小于 EAE 组($P<0.05$),两干预组中大剂量依达拉奉组与小剂量依达拉奉组之间比较有差异($P<0.05$)。见图 1 表 2。

3.3 脊髓组织中 iNOS、OPN 的表达

除正常组表达为阴性外其他三组在发病高峰期可见阳性表达细胞,其胞浆呈棕黄色或棕色颗粒。与 EAE 组比较,依达拉奉干预组大鼠脊髓组织中 iNOS、OPN 阳性细胞数明显减少($P<0.05$);大剂量依达拉奉 iNOS、OPN 表达均低于小剂量依达拉奉组($P<0.05$),见图 2、3。

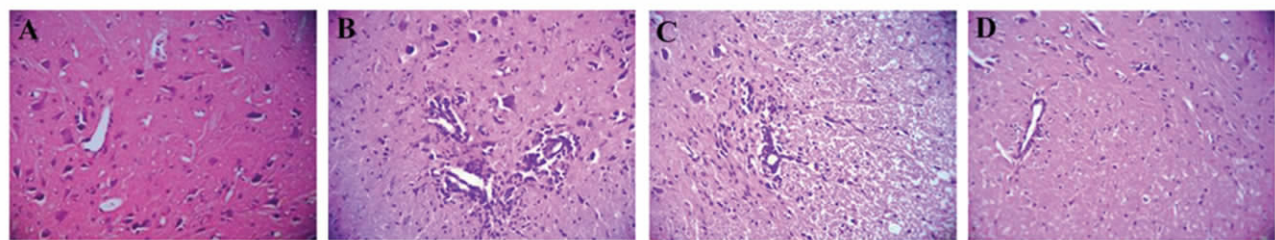


图 1 各组脊髓 HE 染色(× 400)
注:A 正常组,B EAE 组,C EAE+ 小剂量依达拉奉组,D EAE+ 大剂量依达拉奉组
Fig.1 HE staining in spinal cord in different group(× 400)

Note: A normal group, B EAE group, C EAE plus low dose edaravone group, D EAE plus large dose of edaravone group

表 2 各组大鼠脊髓组织中血管周围炎性浸润细胞数($\bar{X} \pm S$, n = 18)
Table 2 Number of inflammatory infiltration cell around blood vessel in different group($\bar{X} \pm S$, n = 18)

Group	Number of inflammatory infiltration cell around blood vessel
Normal group	0
EAE group	48.7± 9.6 8
EAE+ low dose edaravone group	31.2± 7.4 *
EAE+ large dose of edaravone group	13.66± 8.96*#

Note: * P<0.05 compared with EAE group,# P<0.05 compared with low does of edaravone group

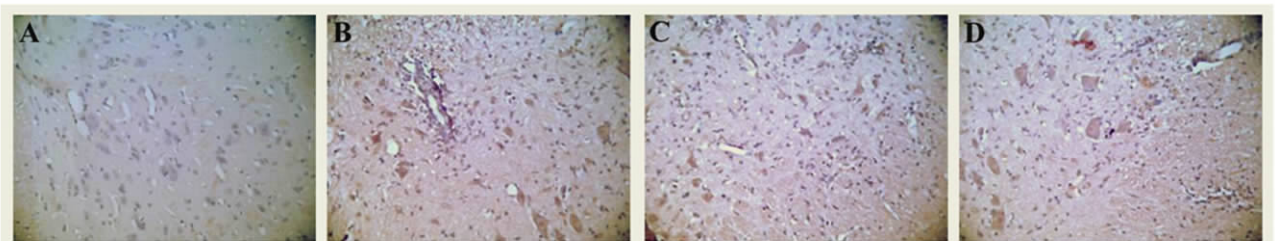


图 2 各组脊髓 iNOS 免疫组织化学(× 400)
注:A 正常组,B EAE 组,C EAE+ 小剂量依达拉奉组,D EAE+ 大剂量依达拉奉组
Fig. 2 Immunohistochemistry staining of iNOS in spinal cord in different group(× 400)

Note: A normal group, B EAE group, C EAE plus low dose edaravone group, D EAE plus large dose of edaravone group

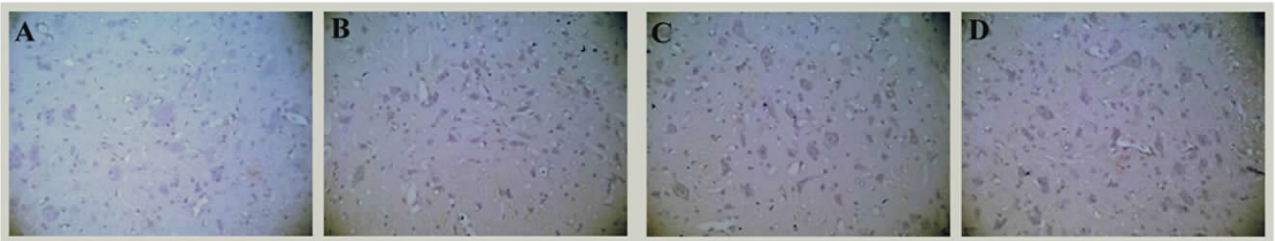


图 3 各组脊髓 OPN 免疫组织化学(× 400)
注:A 正常组,B EAE 组,C EAE+ 小剂量依达拉奉组,D EAE+ 大剂量依达拉奉组
Fig. 2 Immunohistochemistry staining of OPN in spinal cord in different group(× 400)

Note: A normal group, B EAE group, C EAE plus low dose edaravone group, D EAE plus large dose of edaravone group

3 讨论

近年来大量研究证明自由基在 MS 或 EAE 最终效应阶段起着关键作用^[89]。在 EAE 和 MS 的炎症部位,巨噬细胞和小胶质细胞吞噬髓鞘的过程中产生大量活性氧 (Reactive Oxygen Species,ROS) 及一氧化氮(Nitric Oxide,NO),引发脂质过氧化,破坏髓鞘,并引起血脑屏障的损伤及代谢功能障碍,最终导

致轴突的结构和功能损伤,引起永久神经功能丧失。依达拉奉易通过血脑屏障,可以抑制星形胶质细胞 iNOS 的表达和减少小胶质细胞 NO 的产生^[10],并且可直接清除羟基,有效抑制脂质自由基的生成,并有效抑制自由基介导的蛋白质、核酸不可逆的破坏作用^[11]。

EAE 急性期最早的变化之一就是血脑屏障的通透性异常增加,并伴有免疫细胞在血管周围形成 "袖套" 样改变以及向

组织中浸润^[12]。已证实在 EAE 及 MS,增生的星形细胞可产生的高水平 NO 导致血脑屏障的通透性增加,引起水肿并促进炎症细胞浸入实质^[13]。NO 浓度过高则具有细胞毒性作用和脱髓鞘轴突发生逆传导阻断的可能致病因子。体内 NO 的含量及生物学作用全依赖于 NO 合酶(NOS)的活性,而 iNOS 是 NO 产生的主要责任酶。EAE 病变活跃区浸润的巨噬细胞产生大量

NO 及活化的胶质细胞体外表达 iNOS 也催化产生大量 NO,均对少突胶质细胞具有细胞毒作用, 续而引起 EAE 脊髓的髓鞘破坏。本研究结果表明,依达拉奉干预后血管 " 袖套 " 改变、炎症反应、脱髓鞘减轻,iNOS 阳性表达减少,推测可能是通过减少巨噬细胞和抑制小胶质细胞的活化,减轻星形细胞的增生,减少 NO 生产,使得 iNOS 的表达减少。

表 3 各组大鼠脊髓组织中 iNOS、OPN 阳性细胞数($\bar{X} \pm S$, n = 18)

Table 3 Number of iNOS and OPN immuno-positive cell in spinal cord in different group($\bar{X} \pm S$, n = 18)

Group	Number of Inos immuno-positive cell	Number of OPN immuno-positive cell
Normal group	0	0
EAE group	48.62± 7.34	34.54± 5.68
EAE + low dose edaravone group	27.37± 6.35*	21.65± 3.67*
EAE+ large dose of edaravone group	15.41± 5.61*#	10.32± 3.12**

Note: * P<0.05 compared with EAE group,# P<0.05 compared with low does of edaravone group

OPN 是一种广泛表达的多效性细胞因子,在炎症发生时 会提高表达水平,能够被 NO 直接诱导产生并受其调控^[14],NO 释放增加也能够增强 OPN 的表达。OPN 基因是 MS 的一种易感基因,在 MS 及 EAE 大鼠脊髓组织中激活的星形胶质细胞和小胶质细胞 OPN 表达水平均明显上调^[15,16],可致脑脊髓组织中炎性细胞的浸润增加,通过调节细胞免疫中巨噬细胞的聚集影响病情进程及严重程度^[17]。本研究结果表明 EAE 发病前依达拉奉干预对 OPN 的表达有明显抑制作用,推测可能是通过减少巨噬细胞浸润,并抑制小胶质细胞活性和炎症反应,以减轻 OPN,并且通过减少 NO 的产生,进一步减少 OPN。

总之,本研究结果显示依达拉奉干预在 EAE 发病前有预防发病作用、发病后有一定治疗效果,其对 EAE/MS 的保护作用机制可能是通过减少巨噬细胞浸润和抑制小胶质细胞活性,抑制炎症,减轻星形细胞的增生,使得 NO 产生减少,减轻对髓鞘破坏作用。详细机制尚需更深的研究。

参 考 文 献(References)

[1] O'Connor KC, Roy SM, Becker CH, et al. Comprehensive phenotyping in multiple sclerosis: discovery based proteomics and the current understanding of putative biomarkers [J]. Disease Marker, 2006,22(4): 213-225

[2] Levine S M, ChakrabartyA. The role of iron in the pathogenesis of experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis [J].Ann NY Acad Sci, 2004,1012:252-266

[3] Takayasu Y, Nakaki J, Kawasaki T, et al. Edaravone, a radical scavenger, inhibits mitochondrial permeability transition pore in rat brain [J]. J Pharmacol Sci, 2007,103(4):434-437

[4] Kotani Y, Ishino K, Osaki S, et al. Efficacy of MCI-186, a free-radical scavenger and antioxidant, for resuscitation of nonbeating donor hearts[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2007, 133(6):1626-1632

[5] Mancardi G, Hart BA, Capello E, et al. Restricted immune responses lead to CNS demyelination and axonal damage [J]. J Neuroimmunol, 2000,107(2):178-183

[6] Zhang JF, Stephen H, Sinclair, et al. The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory [J] Animals, 2006, 22 (11):

2701-2708

[7] Banno M, Mizuno T, Kato H,et al. The radical scavenger edaravone prevents oxidative neurotoxicity induced by peroxynitrite and activatedmicroglia[J]. Neuropharmacology, 2005,48 (2) :283-290

[8] Sergei V, Gwen S, Tatiana M, et al. Comparison of uric acid and ascorbic acid in protection against EAE [J]. Free Radic Biol Med, 2002,33(10):1363-1371

[9] Hooper DC, Scott GS, Zborek A, et al. Uric acid, a peroxynitrite scavenger, inhibits CNS inflammation, blood-CNS barrier permeability changes, and tissue damage in a mouse model of multiple sclerosis [J]. FASEB-J, 2000,14(5):691-698

[10] Zhang N, Komine-Kobayashi M, Tanaka R, et al. Edaravone reduces early accumulation of oxidative products and sequential inflammatory responses after transient focal ischemia in mice brain [J]. Stroke, 2005,36 (10):2220-2225

[11] Edaravone Acute Infarction Study Group. Effect of a novel free radical scavenger, Edaravone (MCI-186),on acute brain infarction [J]. Cerebrovasc Dis, 2003,15(3):222-229

[12] Gonsette R E. Oxidative stress and excitotoxicity:a therapeutic issue in multiple sclerosis? [J]. Mult Scler, 2008,14(1):22-34

[13] Tran EH, Hardin-Pouzet H,Verge G, et al.Astrocytes and microglia express inducible nitric oxide synthase in mice with experimental allergic encephalomyelitis[J]. J Neuroimmunol, 1997,74(1-2):121-129

[14] Takahashi F, Takahashi K, Maeda K, et al. Osteopontin is induced by nitric oxide in RAW264.7 cells[J]. IUBMB Life, 2000,49(3):217-221

[15] Sinclair C, MirakhurM, Kirk J, et al. Up-regulation of osteopontin and alphaBeta-crystallin in the normal-appearing white matter ofmultiple sclerosis: an immunohistochemical study utilizing tissue microarrays [J]. Neuropathol Appl Neurobiol, 2005, 31 (3): 292-303

[16] ChowdhuryA, Lin J, Sadiq A. Specificity and correlation with disease activity of cerebrospinal fluid osteopontin levels in patients withmultiple sclerosis [J]. ArchNeurol, 2008, 65(2): 232-235

[17] Chiocchetti A, Comi C, IndelicatoM, et al. Osteopontin gene haplotypes correlate with multiple sclerosis development and progression [J]. J Neuroimmunol, 2005, 163 (1-2):172-178