

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.17.001

文章编号: 1005-8982 (2019) 17-0001-05

基础研究·论著

PKA 干预淫羊藿苷治疗实验性自身免疫性 脑脊髓炎对中枢神经 CREB 表达的影响*

危智盛, 张凤, 吴建良, 黄叶青, 刁胜朋, 洪铭范

(广东药科大学附属第一医院 神经内科, 广东 广州 510080)

摘要: **目的** 研究淫羊藿苷 (ICA) 治疗实验性自身免疫性脑脊髓炎 (EAE) 对环磷腺苷效应元件结合蛋白 (CREB) 的影响, 并探讨 ICA 治疗的作用机制。 **方法** 复制 C57BL/6 小鼠 EAE 模型, 并将其分为 3 组, 每组 6 只。模型对照组: 予生理盐水 3 ml/d 灌胃; ICA 组: 予以 ICA 300 mg/(kg·d) 灌胃; ICA+H89 组: 予以 ICA 300 mg/(kg·d) 灌胃并予以蛋白激酶 A (PKA) 特异性阻断剂 H89 5 mg/(kg·d) 腹腔注射; 另取 6 只未经模型复制的 C57BL/6 小鼠同等条件下饲养作为正常对照组, 予生理盐水 3 ml/d 灌胃。EAE 小鼠在发病达高峰时开始给药, 1 次/d, 连续给药 5 d。每日进行神经损害评分, 至给药结束后次日。给药结束后次日进行神经损害评分后处死小鼠, 立即采集脊髓颈膨大部分进行 Western blotting 检测, 检测 CREB 的表达。 **结果** ICA 组小鼠神经损害表现明显改善, 与治疗前比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而 ICA+H89 组小鼠及模型对照组小鼠神经损害评分均无改善, 治疗前后比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。模型对照组脊髓组织中 CREB 的表达较正常对照组降低 ($P < 0.05$)。ICA 组治疗后 CREB 的表达与模型对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), ICA 组 CREB 的表达升高。但同时给予 ICA 与 H89 治疗的小鼠并不能提高脊髓组织中 CREB 的表达, 与模型组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。 **结论** ICA 可能是通过 PKA 途径提高中枢神经系统中 CREB 的表达, 从而发挥对 EAE 的治疗作用。

关键词: 实验性自身免疫性脑脊髓炎 / 脑脊髓炎; 多发性硬化; 淫羊藿苷; 环磷腺苷效应元件结合蛋白; 蛋白激酶 A

中图分类号: R744.51

文献标识码: A

Therapeutic effect of Icaritin on experimental autoimmune encephalomyelitis in mice*

Zhi-sheng Wei, Feng Zhang, Jian-liang Wu, Ye-qing Huang, Sheng-peng Diao, Ming-fan Hong
(Department of Neurology, School of Clinical Medicine, The First Affiliated Hospital of Guangdong
Pharmaceutical University, Guangzhou, Guangdong 510080, China)

Abstract: Objective To study the expression of cAMP-response element binding protein (CREB) in the treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) by Icaritin (ICA), and explore the possible therapeutic mechanisms of ICA. **Methods** EAE was established successfully on C57BL/6 EAE mice. Mice were divided randomly into three groups ($n = 6$): model control group (saline 3 ml/d gavage), ICA group (ICA 300 mg/(kg·d) gavage), and ICA plus H89 group [ICA: 300 mg/(kg·d) gavage, H89: 5 mg/(kg·d), intraperitoneal injection]. H89 is a specific blocker of protein kinase A (PKA). Six normal mice were set up as normal control group and

收稿日期: 2019-03-09

* 基金项目: 广东省中医药局面上科研项目 (No: 20171157); 广东省教育厅“创新强校工程”科研项目 (No: 2016KTSCX063); 广东省科技厅科技计划项目 (No: 2017ZC0198); 广东省科技厅科技发展专项资金 (No: 2017A020215165)

[通信作者] 洪铭范, E-mail: hmf9001@163.com

received saline 3 ml/d gavage. Treatment was started when EAE mice was presented with severe clinical symptoms. Meanwhile, the neurological signs were evaluated on daily basis. Mice were treated once a day for five days and were sacrificed at the sixth day after treatment. The cervical enlargement of the spinal cords was separated and used to investigate the expressions of CREB by western blotting. **Results** The mean clinical scores were significantly reduced by the treatment of ICA ($P < 0.05$) when compared with model control group, which was abolished by H89 treatment ($P < 0.05$). Western blotting results revealed that the expression of CREB in the central nervous system decreased in model control group compared with normal control group ($P < 0.05$). Treatment with ICA promoted the expressions of CREB when compared with model control group ($P < 0.05$), which was reversed by H89 ($P < 0.05$). **Conclusions** Icariin ameliorates neurological symptoms of EAE potentially due to promotion of CREB expressions in the central nervous system through PKA pathway.

Keywords: experimental autoimmune encephalomyelitis/ encephalomyelitis; multiple sclerosis; Icariin; cAMP-response element binding protein; protein kinase A

多发性硬化 (multiple sclerosis, MS) 是一种以中枢神经系统白质炎症性脱髓鞘为主要病理变化的自身免疫性疾病。目前, 针对该病仍缺乏有效的治疗方法, 对于急性或复发加重的治疗, 较公认的观点仍是以大剂量糖皮质激素 (Glucocorticoid, GC) 冲击治疗为主^[1]。然而, 大剂量 GC 可导致某些严重的副作用, 如消化道出血、高血糖、骨质疏松等。因此, 研究人员尝试开发某些新的具有治疗潜力的分子或药物, 以求减少 GC 使用剂量甚至替代 GC。

本研究前期初步发现, 具有植物雌激素活性的中药单体淫羊藿苷 (Icariin, ICA) 对 MS 的动物模型实验性自身免疫性脑脊髓炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) 有治疗作用。ICA 主要通过雌激素受体 β 发挥雌激素效应, 从而改善 EAE 病情^[2]。ICA 还可通过调节 HPA 轴、抗细胞凋亡等途径与甲泼尼龙达到协同治疗 EAE 的作用^[3], 表明 ICA 具有减少 GC 使用剂量的潜力, 并具有良好的治疗 MS 的前景。然而, ICA 的具体作用机制仍不十分清楚。为此本文在前期研究的基础上, 以信号通路的终止与交汇点环磷腺苷效应元件结合蛋白 (cAMP-response element binding protein, CREB) 作为切入点, 进一步深入探讨 ICA 的作用机制, 以期明确并验证 ICA 对这一关键靶点的作用及机制, 为开发新的治疗 MS 药物提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与试剂

C57BL/6 小鼠, 无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级, 雌性, 6 ~ 8 周龄, 体重 15 ~ 20 g, 购自广东省医学实验动物中心 (许可证号: SCXK 粤 2013-0002)。MOG₃₅₋₅₅ (2568) 购自美国 Tocris Bioscience 公司,

ICA (I1286) 及 H89 (B1427) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司, BCA 蛋白浓度定量分析试剂盒 (NCI3225CH) 购自美国 Thermo 公司, GAPDH 小鼠一抗 (AF0006)、辣根酶标记羊抗小鼠 IgG (A0216) 购自上海碧云天生物技术有限公司, CREB 兔一抗 (9197S) 购自美国 CST 公司, 辣根酶标记羊抗兔 IgG (ab6721) 购自英国 Abcam 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 EAE 模型复制及评估 采用 C57BL/6 小鼠复制 EAE 模型。用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 将 MOG₃₅₋₅₅ 稀释成 300 μ g/ml, 然后将稀释液与等量的完全弗氏佐剂 (complete Freund's adjuvant, CFA) (结核杆菌的终浓度为 4 mg/ml) 混合, 用玻璃注射器抽打至油包水状态, 制备成诱导 EAE 的抗原乳剂。乳化后皮下注射于小鼠双侧侧腹壁 (分 4 点, 每个部位 50 μ l), 免疫后 7 d 加强免疫 1 次 (等剂量 MOG/CFA)。在免疫后第 0 及 48 小时腹腔内注射 500 ng 百日咳毒素。免疫接种后每日观察小鼠反应、进食、体重、行动等情况, 并依据 Becher 的标准^[4] 对神经损害表现进行评分。0 分: 正常或无任何神经缺损症状; 0.5 分: 尾巴远端无力; 1 分: 尾巴完全无力; 1.5 分: 尾巴无力并后肢无力; 2 分: 单侧后肢部分瘫痪; 2.5 分: 双侧后肢部分瘫痪; 3 分: 双侧后肢完全瘫痪; 3.5 分: 双后肢完全瘫痪并一侧前肢瘫痪; 4 分: 四肢瘫痪; 5 分: 濒临死亡状态或死亡。评分 ≥ 1 为临床发病。

1.2.2 病理学检查 EAE 发病后, 随机取 3 只小鼠进行苏木精-伊红 (HE) 染色, 且髓鞘染色验证模型是否符合病理标准。小鼠以 4% 多聚甲醛心脏灌注后, 取脊髓颈膨大组织进行冷冻切片, 再行 HE 染色及劳克坚牢蓝 (luxol fast blue, LFB) 髓鞘染色, 光学显微镜下观察组织形态学变化。

1.2.3 实验分组及给药 EAE 发病小鼠按评分相当原则随机取 18 只入组, 分成 3 组, 每组 6 只。模型对照组: 予生理盐水 3 ml/d 灌胃; ICA 组: 予 ICA 300 mg/(kg·d) 灌胃; ICA+H89 组: 予 ICA 300 mg/(kg·d) 灌胃并予蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 特异性阻断剂 H89 5 mg/(kg·d) 腹腔注射; 另取 6 只未经模型复制的 C57BL/6 小鼠同等条件下饲养作为正常对照组, 予生理盐水 3 ml/d 灌胃。小鼠发病后, 约 3 ~ 5 d 发病达高峰时开始给药, 1 次/d, 连续给药 5 d。每日进行神经损害评分, 至给药结束后次日。给药结束后次日进行神经损害评分后处死小鼠, 立即采集脊髓颈膨大部分进行 Western blotting 检测。

1.2.4 Western blotting 检测脊髓中 CREB 的表达 分离小鼠脊髓颈膨大, 将所取组织加入 RIPA 裂解缓冲液制备成匀浆, 置入 -80℃ 冷冻保存。采用 BCA 蛋白浓度定量分析试剂盒检测总蛋白浓度。配平后行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电泳结束后转膜。PVDF 膜封闭液内封闭 1 h, 加入 CREB 及 GAPDH 一抗, 4℃ 过夜。次日 TBST 缓冲液洗膜后, 再加入辣根过氧化物酶标记二抗, 室温孵育 1 h, TBST 缓冲液洗膜, 然后以 ECL 进行显影曝光成像。将显影后的胶片扫描至计算机内, 采用 Quantity One 凝胶图像分析系统对蛋白条带灰度值进行分析, 以 CREB/GAPDH 灰度值分别表示 CREB 的表达水平。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件。首先对数据做正态性检验及方差齐性检验, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 治疗前后小鼠神经损害评分采用 Wilcoxon 秩和检验, 多组间 CREB/GAPDH 灰度值比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EAE 小鼠发病情况

免疫诱导后, 小鼠于第 13 和 14 天先后发病, 表现为体重进行性下降、尾巴张力减退, 继之尾巴无力, 并发展为后肢或四肢无力、麻痹、大小便失禁, 约 3 ~ 5 d 发病达高峰。EAE 小鼠脊髓组织 HE 染色, 光学显微镜下可见小血管充血, 管壁增厚, 内皮细胞有破坏, 血管周围大量炎症细胞浸润, 以淋巴细胞为主, 并在小血管周围形成典型的袖套样改变 (见图 1A)。LFB 髓鞘染色, 光学显微镜下可见髓鞘呈蓝色, EAE

小鼠脊髓组织可见髓鞘有不同程度脱失 (见图 1B)。

2.2 EAE 小鼠治疗前后神经损害评分的比较

ICA 组小鼠神经损害表现有明显改善, 与治疗前比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而 ICA+H89 组小鼠及模型对照组小鼠, 神经损害评分均无改善, 治疗前后比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1 和图 2。

2.3 ICA 治疗对 CREB 表达的影响

Western blotting 灰度值结果示, 模型对照组 (1.000 ± 0.151), 正常对照组 (1.703 ± 0.182), ICA 组 (2.204 ± 0.247), ICA+H89 组 (1.243 ± 0.194)。4 组比较, 差异有统计学意义 ($F = 45.212, P = 0.000$)。模型对照组脊髓组织中 CREB 的表达较正常对照组降低 ($P < 0.05$)。治疗后 ICA 组与模型对照组比较, CREB 的表达升高

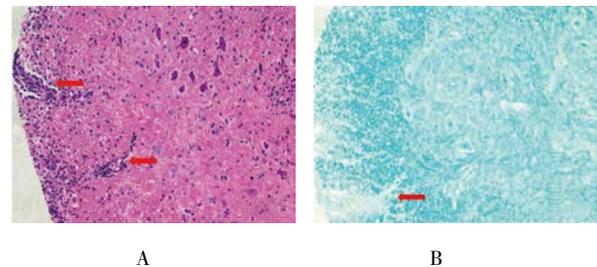


图 1 EAE 模型组小鼠脊髓颈膨大染色结果 (×100)
A: HE 染色, 箭头所指为血管周围形成袖套样改变; B: LFB 染色, 箭头所指为髓鞘脱失表现。

表 1 EAE 小鼠给药前后神经损害评分比较
($n = 6, \bar{x} \pm s$)

组别	给药前 1 天 (治疗前)	给药第 6 天 (治疗后)	Z 值	P 值
模型对照组	1.832 ± 0.407	1.752 ± 0.419	-1.577	0.115
ICA 组	2.083 ± 0.576	1.423 ± 0.583	-2.201	0.028
ICA+H89 组	1.932 ± 0.417	1.903 ± 0.556	-0.105	0.917

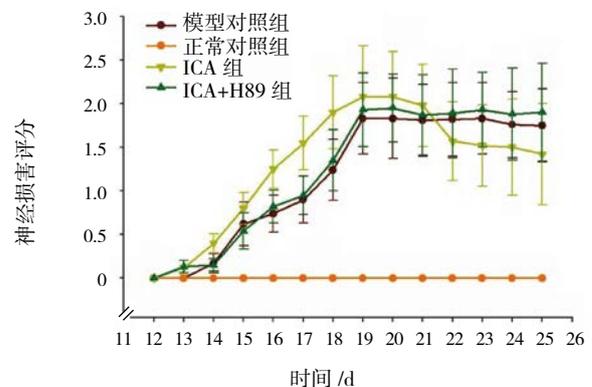
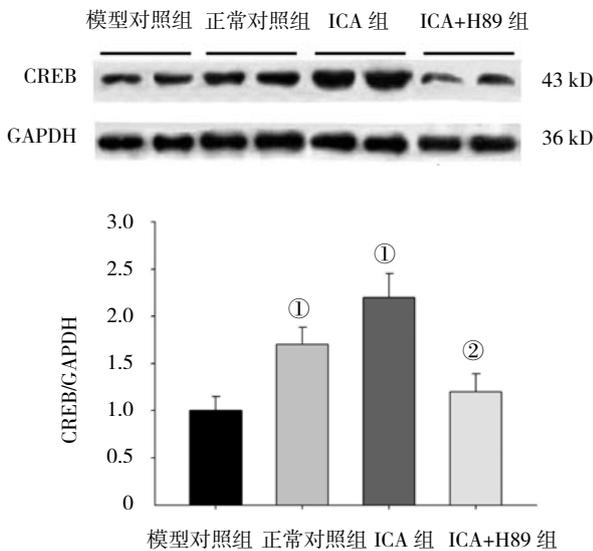


图 2 各组小鼠给药前后神经损害评分的变化趋势
($n = 6, \bar{x} \pm s$)

($P < 0.05$)。但 ICA+H89 组小鼠脊髓组织中 CREB 的表达与模型对照组比较,并未升高($P > 0.05$)。见图 3。



①与模型对照组比较, $P < 0.05$; ②与 ICA 组比较, $P < 0.05$ 。

图 3 ICA 治疗对 CREB 表达的影响

3 讨论

淫羊藿是一种富含植物雌激素的补肾中药,是 MS 中医辨证治疗中常用的中药之一。而 ICA 作为淫羊藿的活性单体,是其发挥雌激素活性的主要物质。近年来,ICA 的药理作用已成为多学科领域所关注的热点。有研究发现,ICA 具有神经保护作用、改善心脑血管系统功能、抗炎、增强免疫、调节内分泌等作用^[5-6]。本研究前期也发现 ICA 对 EAE 有治疗作用,然而,ICA 对 EAE 治疗的具体机制尚不明确,ICA 是如何介导 EAE 的神经保护、参与免疫调节、抗炎等作用,亟待进一步研究解答。

近年来,核转录因子 CREB 在神经系统疾病中的发挥的作用越来越被关注。研究表明,其在参与神经保护、免疫调节、抗炎等方面发挥着重要作用^[7-8]。CREB 是一种真核生物细胞核内调控因子,在神经系统中通常作为许多信号通路的终止与交汇点,包括 G 蛋白偶联受体激活的 cAMP/PKA 通路、电压敏感型钙离子通道(voltage-sensitive calcium channel, VSCC)或激活钙离子/钙离子结合蛋白依赖性蛋白激酶(calcium/calmodulin-dependent protein kinase, CaMK)通路、生长因子/受体酪氨酸激酶(Ras/Erk/RSK2)通路、应激或炎症相关的细胞因子通路,如丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)、PI3K/

AKT 等^[9]。胞内外信号分子可通过不同的通路作用于 CREB,从而激活相关信号分子及其靶基因的转录。其调控的上下游信号分子及其靶基因和 CREB 一起参与神经干细胞增殖、细胞周期调控、神经元诱导分化、学习记忆等正常生理活动。CREB 可以介导神经元对各种神经营养因子包括脑源性神经营养因子、神经生长因子、胶质源性神经营养因子等的反应,从而调控神经再生、细胞修复及突触可塑性等功能^[10-11]。因此,CREB 可能在 MS 或 EAE 的神经保护、修复等环节上发挥着关键性作用。

本研究通过动物体内实验,验证 ICA 具有提高 EAE 小鼠脊髓组织中 CREB 表达的作用,且 CREB 表达的升高与 EAE 小鼠神经损害评分的改善密切相关,提示 CREB 参与 ICA 对 EAE 的治疗过程,而这一治疗作用可被 PKA 特异性阻断剂 H89 所阻断,表明 ICA 可能是通过 PKA 途径增加中枢神经系统中 CREB 的表达,从而发挥对 EAE 的治疗作用。近年来,也有类似的研究发现,ICA 可通过活化 cAMP/PKA/CREB 途径促进骨细胞的生成^[12],表明 ICA 对 PKA/CREB 这一信号通路的调控,是其发挥神经保护、细胞增殖等治疗作用的重要机制之一。本研究初步阐明 ICA 对信号通路的终止与交汇点 CREB,这一关键靶点的作用,今后还有待进一步从分子层面、体外实验等角度验证 CREB 在 ICA 治疗过程中的客观必要性,为揭示 ICA 的作用机制,探索开发新的治疗 MS 药物提供实验依据。

参考文献:

- [1] KAMM C P, UITDEHAAG B M, POLMAN C H. Multiple sclerosis: current knowledge and future outlook[J]. *European Neurology*, 2014, 72(3/4): 132-141.
- [2] WEI Z, WANG M, HONG M, et al. Icaritin exerts estrogen-like activity in ameliorating EAE via mediating estrogen receptor beta, modulating HPA function and glucocorticoid receptor expression[J]. *American Journal of Translational Research*, 2016, 8(4): 1910-1918.
- [3] WEI Z, DENG X, HONG M, et al. Icaritin has synergistic effects with methylprednisolone to ameliorate EAE via modulating HPA function, promoting anti-inflammatory and anti-apoptotic effects[J]. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 2015, 8(11): 20188-20197.
- [4] BECHER B, DURELL B G, NOELLE R J. Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of interleukin-12[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2002, 110(4): 493-497.

- [5] SCHLUESENER J K, SCHLUESENER H. Plant polyphenols in the treatment of age-associated diseases: revealing the pleiotropic effects of icariin by network analysis[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2014, 58(1): 49-60.
- [6] KONG L, LIANG X, LIU A, et al. Icariin inhibits inflammation via immunomodulation of the cutaneous hypothalamus-pituitary-adrenal axis in vitro[J]. *Clinical and Experimental Dermatology*, 2018, Doi: 10.1111/ced.13735.
- [7] LI C, CHEN T, ZHOU H, et al. BHDPC Is a novel neuroprotectant that provides anti-neuroinflammatory and neuroprotective Effects by Inactivating NF-kappa B and activating PKA/CREB[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2018, 9: 614.
- [8] AZIZ M, HOLODICK N E, ROTHSTEIN T L, et al. B-1a cells protect mice from sepsis: critical role of CREB[J]. *Journal of Immunology (Baltimore, Md: 1950)*, 2017, 199(2): 750-760.
- [9] NAQIB F, SOSSIN W S, FARAH C A. Molecular determinants of the spacing effect[J]. *Neural Plasticity*, 2012, 2012: 581291.
- [10] LEE D. Global and local missions of cAMP signaling in neural plasticity, learning, and memory[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2015, 6: 161.
- [11] MOOSAVI F, HOSSEINI R, SASO L, et al. Modulation of neurotrophic signaling pathways by polyphenols[J]. *Drug Design, Development and Therapy*, 2016, 10: 23-42.
- [12] SHI W, GAO Y, WANG Y, et al. The flavonol glycoside icariin promotes bone formation in growing rats by activating the cAMP signaling pathway in primary cilia of osteoblasts[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2017, 292(51): 20883-20896.

(张西倩 编辑)