

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2023.14.007
文章编号: 1005-8982 (2023) 14-0039-06

实验研究·论著

竹节香附素A对实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠炎症的影响及其调控机制研究

杨滢¹, 李作孝², 李晓红¹

(西南医科大学附属医院 1. 健康管理中心, 2. 神经内科, 四川 泸州 646000)

摘要: **目的** 探讨竹节香附素A (RA) 对实验性自身免疫性脑脊髓炎 (EAE) 小鼠炎症的影响及其调控机制。**方法** 将60只C57BL/6小鼠随机分为对照组、EAE模型组、RA低剂量组、RA中剂量组、RA高剂量组, 其中EAE模型组、RA低剂量组、RA中剂量组、RA高剂量组使用MOG35-55多肽复制EAE模型, RA低剂量组、RA中剂量组、RA高剂量组进行药物干预, 持续至发病高峰期。观察各组小鼠的临床症状、神经功能缺损评分, HE染色检测脊髓组织炎症细胞浸润情况, Western blotting检测脊髓组织p-NF- κ B蛋白表达, 酶联免疫吸附试验检测脊髓组织白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-17表达水平, 实时荧光定量聚合酶链反应检测脊髓组织IL-1 β 和IL-17 mRNA表达。**结果** 高剂量组发病潜伏期较RA低剂量组、RA中剂量组、EAE模型组长 ($P < 0.05$), RA中剂量组较RA低剂量组、EAE模型组长 ($P < 0.05$), RA低剂量组较模型组长 ($P < 0.05$)。高剂量组疾病进展期较RA低剂量组、RA中剂量组、EAE模型组短 ($P < 0.05$), RA中剂量组较RA低剂量组、EAE模型组短 ($P < 0.05$), RA低剂量组较EAE模型组短 ($P < 0.05$)。高剂量组神经功能缺损评分较RA低剂量组、RA中剂量组、EAE模型组低 ($P < 0.05$), RA中剂量组较RA低剂量组、EAE模型组低 ($P < 0.05$), RA低剂量组较EAE模型组低 ($P < 0.05$)。RA高剂量组HE染色评分较RA低剂量组、RA中剂量组和EAE模型组低 ($P < 0.05$), RA中剂量组较RA低剂量组、EAE模型组低 ($P < 0.05$), RA低剂量组较EAE模型组低 ($P < 0.05$)。对照组脊髓组织IL-1 β 和IL-17 mRNA相对表达量低于RA低剂量组、RA中剂量组、RA高剂量组、EAE模型组 ($P < 0.05$), RA高剂量组低于RA低剂量组、RA中剂量组、EAE模型组 ($P < 0.05$), RA中剂量组低于RA低剂量组、EAE模型组 ($P < 0.05$), RA低剂量组低于模型组 ($P < 0.05$)。对照组脊髓组织IL-1 β 、IL-17相对表达量低于RA低剂量组、RA中剂量组、RA高剂量组、EAE模型组 ($P < 0.05$), RA高剂量组低于RA低剂量组、RA中剂量组、EAE模型组 ($P < 0.05$), RA中剂量组低于RA低剂量组、EAE模型组 ($P < 0.05$), RA低剂量组低于EAE模型组 ($P < 0.05$)。对照组脊髓组织NF- κ B蛋白磷酸化水平低于RA低剂量组、RA中剂量组、RA高剂量组、EAE模型组 ($P < 0.05$), RA高剂量组低于RA低剂量组、RA中剂量组和EAE模型组 ($P < 0.05$), RA中剂量组低于RA低剂量组和EAE模型组 ($P < 0.05$); RA低剂量组低于EAE模型组 ($P < 0.05$)。**结论** RA能改善EAE小鼠发病情况及脊髓组织炎症, 其机制可能与通过调节NF- κ B, 减少炎症因子分泌有关。

关键词: 脑脊髓炎; 竹节香附素A; 炎症因子; 小鼠

中图分类号: R512.3

文献标识码: A

Effects of Raddeanin A on inflammation and the underlying mechanisms in EAE mice

Yang Ying¹, Li Zuo-xiao², Li Xiao-hong¹

(1. Health Management Center, 2. Department of Neurology, The Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of Raddeanin A (RA) on inflammation in experimental

收稿日期: 2022-12-16

[通信作者] 李晓红, E-mail: 1848922774@qq.com

autoimmune encephalomyelitis (EAE) mice and to explore the underlying mechanisms. **Methods** Sixty C57BL/6 mice were randomly divided into the control group, EAE model group and low-dose, medium-dose and high-dose RA groups. Among them, mice in the EAE model group and low-dose, medium-dose and high-dose RA groups were treated with MOG35-55 polypeptide to establish EAE models, while those in the low-dose, medium-dose and high-dose RA groups were continuously subject to drug intervention until the acme of the disease. The clinical symptoms, neurological severity scores, and inflammatory cell infiltration in the spinal cord detected via HE staining were observed. The protein expression of p-NF- κ B in the spinal cord was detected via Western blotting, the levels of interleukin (IL)-1 β and IL-17 in the spinal cord were detected via enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the mRNA expressions of IL-1 β and IL-17 in the spinal cord were detected by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). **Results** The onset latency in the high-dose RA group was longer than that in the low-dose and medium-dose RA groups and the EAE model group ($P < 0.05$). Compared with the low-dose RA group and the EAE model group, the onset latency in the medium-dose RA group was longer ($P < 0.05$). Besides, the onset latency in the low-dose RA group was longer than that in the EAE model group ($P < 0.05$). The duration of disease progression in the high-dose RA group was shorter than that in the low-dose and medium-dose RA groups and the EAE model group ($P < 0.05$). The duration of disease progression in the medium-dose RA group was shorter than that in the low-dose RA group and the EAE model group ($P < 0.05$), while that in the low-dose RA group was even shorter than that in the EAE model group ($P < 0.05$). The neurological severity scores in the high-dose RA group were lower than those in the low-dose and medium-dose RA groups and the EAE model group ($P < 0.05$), those in the medium-dose RA group were lower than those in the low-dose RA group and the EAE model group ($P < 0.05$), while those in the low-dose RA group were even lower than those in the EAE model group ($P < 0.05$). The HE staining scores in the high-dose RA group were lower than those in the low-dose and medium-dose RA groups and the EAE model group ($P < 0.05$), those in the medium-dose RA group were lower than those in the low-dose RA group and the EAE model group ($P < 0.05$), while those in the low-dose RA group were even lower than those in the EAE model group ($P < 0.05$). The mRNA expressions of IL-1 β and IL-17 in the spinal cord in the control group were lower than the other groups ($P < 0.05$), those in the high-dose RA group were lower than those in the low-dose and medium-dose RA groups and the EAE model group ($P < 0.05$), those in the medium-dose RA group were lower than those in the low-dose RA group and the EAE model group ($P < 0.05$), while those in the low-dose RA group were even lower than those in the EAE model group ($P < 0.05$). Consistently, the levels of IL-1 β and IL-17 in the spinal cord as determined via ELISA exhibited parallel differences among the groups ($P < 0.05$). As for the level of p-NF- κ B, that in the control group was lower than the other groups ($P < 0.05$), that in the high-dose RA group was lower than that in the low-dose and medium-dose RA groups and the EAE model group ($P < 0.05$), that in the medium-dose RA group was lower than that in the low-dose RA group and the EAE model group ($P < 0.05$), while that in the low-dose RA group was even lower than that in the EAE model group ($P < 0.05$). **Conclusions** Raddeanin A may slow the disease onset and progression and alleviate the inflammation in the spinal cord of EAE mice, which may be achieved via regulating NF- κ B to reduce the secretion of inflammatory factors.

Keywords: encephalomyelitis; Raddeanin A; inflammatory factor; mouse

多发性硬化(multiple sclerosis, MS)是一种典型的自身免疫介导的中枢神经系统疾病,实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)是研究 MS 的经典动物模型^[1]。全世界约 250 万人罹患 MS,常见于 20 ~ 40 岁中青年,MS 具有病灶的空间多发性和时间多发性,反复发作,遗留神经系统症状和体征,MS 的治疗急性期以糖皮质激素为主、缓解期以免疫抑制剂为主,但仅依赖西药治疗往往副作用突出,病情反复^[2-3]。

中医药作为我国的传统医学,为 MS 的治疗提供了新的思路。传统中医认为 MS 多由外感邪热入里

至气血阻滞筋脉失养而成,急性期及缓解复发期的治疗多选用清热利湿、清热解毒类方^[4]。银莲花属植物干燥根茎名为竹节香附,有祛风湿、散寒止痛、消痈肿之功效,其中竹节香附素 A(raddeanin A, RA)是银莲花植物中含量较高、药理活性最好的化合物^[5]。

核因子 κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)信号级联反应在 MS/EAE 免疫和炎症反应的调节中起关键作用。研究显示 NF- κ B 表达水平在 MS 患者病变中心显著增加,参与诱导 Th17 细胞的分化,产生更多的促炎细胞因子,包括白细胞介素 1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-17 等^[6]。研究显示 RA

有明显抗炎抑制作用,其机制与 NF- κ B 通路有关^[7]。故本研究通过 RA 药物干预,观察、分析各组小鼠的神经缺损症状、炎症细胞及炎症指标的变化,初步探讨 RA 对 EAE 小鼠炎症的影响及调控机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

60 只 C57BL/6 雌性小鼠[实验动物生产许可证号:SCXK(京)2019-0010,实验动物使用许可证号:SYXK(川)2018-213],鼠龄 6~8 周,购自西南医科大学动物房。实验室内环境指标符合国家标准,分笼饲养,活动空间足够,定期更换垫料及饲料,提供充足、干净的饲料及水源。

1.2 材料与试剂

MOG35-55 多肽(上海吉尔生化有限公司),结核分枝杆菌 H37Ra(上海瑞楚生物科技有限公司),百日咳毒素、完全弗式佐剂(美国 Sigma 公司),RA(中国食品药品检定研究所),IL-1 β 、IL-17 酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂检测盒(武汉科鹿生物科技有限公司),苏木素染液、伊红染液、p-NF- κ B p65 抗体、BCA 蛋白质浓度测定试剂盒(美国 ASPEN 公司)。

1.3 EAE 模型的复制及处理

将小鼠随机分为对照组、EAE 模型组及 RA 低、中、高剂量组,每组 12 只。在无菌条件下,将 2 mg/mL MOG35-55 溶于磷酸盐缓冲液(0.01 mmol/L),与完全弗氏佐剂(浓度 10 mg/mL)制备成乳化混合物,分别对 EAE 模型组及 RA 低、中、高剂量组小鼠的两前肢、两后肢与脊柱连线处皮下注射(每只 0.2 mL)。于免疫 0、48 h 给每只小鼠腹腔注射百日咳菌稀释液 0.2 mL(0.5 μ g)。EAE 模型组及 RA 低、中、高剂量组小鼠连续腹腔注射药物(具体剂量见表 1)并在发病高峰期处死取材,空白对照组小鼠于模型复制后 4 周处死取材,在无菌条件下分离脊髓组织^[8]。

表 1 各种小鼠给药方式

组别	药物	给药方式
对照组	生理盐水	0.2 mL
EAE 模型组	生理盐水	0.2 mL
RA 低剂量组	RA	0.05 mg/kg \times 0.2 mL
RA 中剂量组	RA	0.1 mg/kg \times 0.2 mL
RA 高剂量组	RA	0.2 mg/kg \times 0.2 mL

1.4 神经功能缺损评分

观察各组小鼠的临床症状、神经功能缺损评分,采用 Weaver's 15 分法评分:根据尾巴活动分为无症状计 0 分;张力减低或远端瘫痪计 1 分;全瘫计 2 分。根据肢体活动分为无症状计 0 分;步态不稳计 1 分;轻瘫、行走时摇曳计 2 分;全瘫、行走时外翻计 3 分。尾部和四肢的评分相加为总分,若出现死亡计 15 分。

1.5 HE 染色及评分

4% 多聚甲醛固定脊髓组织,制备石蜡切片(片厚 4 μ m),石蜡切片经脱蜡、至水、苏木精染细胞核、伊红染细胞质,再脱水、晾干、封片,置于光学显微镜下进行观察,每张脊髓切片选取 5 个高倍视野,根据 HE 染色评分标准(见表 2)进行评分,取平均值。

表 2 HE 染色评分标准

镜下情况	评分
没有炎症细胞浸润	0
炎症细胞仅限于血管周围	1
实质内轻微炎症浸润(1~10 个/视野)	2
实质内严重炎症细胞浸润(11~100 个/视野)	3
实质内严重炎症细胞浸润(>100 个/视野)	4

1.6 Western blotting 检测 NF- κ B 蛋白磷酸化

取新鲜脑脊髓组织蛋白质提取总蛋白溶液,经电泳、转膜,加入封闭液室温封闭,抗体孵育时加入 5% 牛血清白蛋白,稀释为 1:1 000 的 p-NF- κ B p65 一抗,4 $^{\circ}$ C 过夜。次日加入 5% 脱脂牛奶稀释为 1:10 000 的二抗(山羊抗兔)室温孵育 30 min。洗膜后暗室中曝光、显影、定影,扫描、存档,Alpha Ease FC 软件分析光密度值。

1.7 ELISA 检测 IL-1 β 、IL-17 水平

按照 ELISA 试剂盒说明书测定脊髓组织 IL-1 β 、IL-17 表达水平,各孔溶液光密度值减去空白值后,绘出标准曲线,并根据相应光密度值,由标准曲线换算出样品中 IL-1 β 、IL-17。

1.8 实时荧光定量聚合酶链反应检测 IL-1 β 、IL-17 mRNA 表达

冰上取 100 mg 新鲜脊髓组织,于 1 mL 预冷的 TRIpure 中充分研磨,匀浆液小心倒入 1.5 mL EP 管中,加入 250 μ L 三氯甲烷,充分混匀,冰上静置 5 min。将混合液 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min。超净工作

台中小心吸取上清 500 μL 于 1.5 mL EP 管中,加入等体积 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的异丙醇,颠倒混匀,-20 $^{\circ}\text{C}$ 静置 15 min。溶液 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,加入 1 mL 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 75% 乙醇,颠倒数次,清洗 RNA 沉淀,4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,于超净工作台将乙醇充分挥发干净,加入 10 μL RNase-Free Water,充分溶解 RNA。将反应液放入 PCR 仪上 70 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min,迅速冰浴 2 min,使用 EnTurbo™ SYBR Green PCR SuperMix 试剂盒进行。反应体系: 2 \times Master Mix 5.0 μL ,引物工作液(2.5 μm)1.0 μL ,模板 1.0 μL ,双蒸馏水 2.0 μL ,Rox 1.0 μL ,实时荧光定量聚合酶链反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,共循环 40 次。以 GAPDH 作为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算 IL-1 β 、IL-17 mRNA 相对表达量。引物序列见表 3。

表 3 IL-1 β 、IL-17 mRNA 引物序列

基因	序列	长度/bp
GAPDH	正向: 5'-CGCTAACATCAAATGGGGTG-3'	201
	反向: 5'-TTGCTGACAATCTTGAGGGAG-3'	
IL-1 β	正向: 5'-GTGGCAGCTACCTATGTCTTGC-3'	251
	反向: 5'-CCACTTGTGGCTTATGTCTCTGT-3'	
IL-17	正向: 5'-CTCAGACTACCTCAACCGTTCC-3'	198
	反向: 5'-CACTTCTCAGGCTCCCTCTTC-3'	

1.9 统计学方法

数据分析采用 SPSS 20.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较用方差分析,两两比较用 LSD- t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠发病情况

EAE 模型组于免疫第 8 天开始陆续发病,RA 药物干预组于免疫第 11、13、15 天陆续发病,对照组未发病。EAE 模型组及 RA 药物干预组小鼠发病程度不一,主要表现为早期精神萎靡,活动减少,逐渐出现尾部脱垂、肢体张力减低或远端瘫痪,严重的甚至濒死或死亡。

2.2 各组小鼠发病潜伏期、疾病进展期、神经系统缺损评分比较

各组小鼠发病潜伏期、疾病进展期、神经功能缺

损评分比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。高剂量组发病潜伏期较 RA 低剂量组、RA 中剂量组、EAE 模型组长($P < 0.05$),RA 中剂量组较 RA 低剂量组、EAE 模型组长($P < 0.05$),RA 低剂量组较模型组长($P < 0.05$)。高剂量组疾病进展期较 RA 低剂量组、RA 中剂量组、EAE 模型组短($P < 0.05$),RA 中剂量组较 RA 低剂量组、EAE 模型组短($P < 0.05$),RA 低剂量组较 EAE 模型组短($P < 0.05$)。高剂量组神经功能缺损评分较 RA 低剂量组、RA 中剂量组、EAE 模型组低($P < 0.05$),RA 中剂量组较 RA 低剂量组、EAE 模型组低($P < 0.05$),RA 低剂量组较 EAE 模型组低($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 各组小鼠发病潜伏期、疾病进展期、神经系统缺损评分比较 ($n=12, \bar{x} \pm s$)

组别	发病潜伏期/d	疾病进展期/d	神经功能缺损评分
EAE 模型组	10.167 \pm 2.406	7.667 \pm 1.231	8.167 \pm 1.642
RA 低剂量组	13.583 \pm 2.109	6.250 \pm 1.422	6.833 \pm 1.697
RA 中剂量组	15.833 \pm 1.850	4.583 \pm 1.621	4.583 \pm 1.443
RA 高剂量组	17.917 \pm 1.165	3.417 \pm 1.165	2.667 \pm 1.073
F 值	35.172	22.196	32.218
P 值	0.000	0.000	0.000

2.3 各组小鼠脊髓组织 HE 染色情况

各组小鼠脊髓组织可见不同程度的炎症细胞浸润,其中 EAE 模型组最为显著,可见炎症细胞聚集于血管周围形成袖套型改变,其他组炎症细胞较少,且随着剂量的增加浸润情况逐渐减轻(见图 1)。EAE 模型组 HE 染色评分为(2.70 \pm 0.29)分,RA 低剂量组为(2.16 \pm 0.41)分,RA 中剂量组为(1.62 \pm 0.21)分,RA 高剂量组为(0.93 \pm 0.28)分,经方差分析,差异有统计学意义($F=37.464, P=0.000$),RA 高剂量组较 RA 低剂量组、RA 中剂量组和 EAE 模型组低($P < 0.05$),RA 中剂量组较 RA 低剂量组、EAE 模型组低($P < 0.05$),RA 低剂量组较 EAE 模型组低($P < 0.05$)。

2.4 各组小鼠脊髓组织 IL-1 β 和 IL-17 mRNA 相对表达量比较

各组小鼠脊髓组织 IL-1 β 和 IL-17 mRNA 水平比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。对照组低于 RA 低剂量组、RA 中剂量组、RA 高剂量、EAE 模型组($P < 0.05$),RA 高剂量组低于 RA 低剂量组、RA 中剂量组、EAE 模型组($P < 0.05$),RA 中剂量组低于 RA 低剂量组、EAE 模型组($P < 0.05$),RA 低剂量组低于模型组($P < 0.05$)。见表 5。

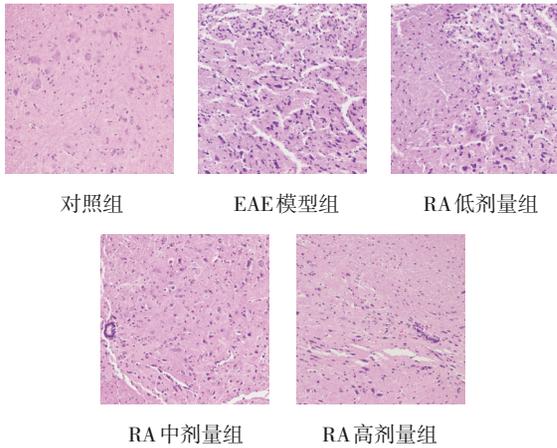


图 1 各组小鼠脊髓组织炎症细胞浸润情况 (HE 染色 × 200)

表 5 各组小鼠脊髓组织 IL-1β 和 IL-17 mRNA 相对表达量比较 (n=12, $\bar{x} \pm s$)

组别	L-1β mRNA	IL-17 mRNA
对照组	1.033 ± 0.100	1.017 ± 0.077
EAE 模型组	3.110 ± 0.153	3.120 ± 0.261
RA 低剂量组	2.380 ± 0.139	2.311 ± 0.054
RA 中剂量组	1.927 ± 0.188	2.002 ± 0.244
RA 高剂量组	1.303 ± 0.151	1.302 ± 0.087
F 值	190.262	145.758
P 值	0.000	0.000

2.5 各组小鼠脊髓组织 IL-1β、IL-17 水平比较

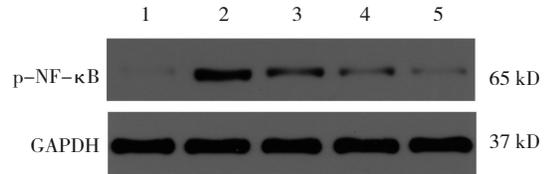
各组小鼠脊髓组织 IL-1β、IL-17 水平比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。对照组低于 RA 低剂量组、RA 中剂量组、RA 高剂量、EAE 模型组 ($P < 0.05$), RA 高剂量组低于 RA 低剂量组、RA 中剂量组、EAE 模型组 ($P < 0.05$), RA 中剂量组低于 RA 低剂量组、EAE 模型组 ($P < 0.05$), RA 低剂量组低于 EAE 模型组 ($P < 0.05$)。见表 6。

表 6 各组小鼠脊髓组织 IL-1β、IL-17 水平比较 (n=12, pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	IL-1β	IL-17
对照组	6.507 ± 0.974	25.567 ± 1.154
EAE 模型组	16.503 ± 0.780	63.517 ± 1.141
RA 低剂量组	14.710 ± 0.887	51.000 ± 1.619
RA 中剂量组	11.307 ± 0.678	42.983 ± 1.419
RA 高剂量组	8.210 ± 0.870	32.500 ± 1.269
F 值	147.798	759.154
P 值	0.000	0.000

2.6 各组小鼠脊髓组织 NF-κB 蛋白磷酸化表达水平比较

对照组、EAE 模型组、RA 低剂量组、RA 中剂量组、RA 高剂量组脊髓组织 NF-κB 蛋白磷酸化水平分别为 (0.11 ± 0.01)、(0.61 ± 0.02)、(0.35 ± 0.05)、(0.22 ± 0.04)、(0.15 ± 0.03), 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 218.246, P = 0.000$)。对照组低于 RA 低剂量组、RA 中剂量组、RA 高剂量组、EAE 模型组 ($P < 0.05$), RA 高剂量组低于 RA 低剂量组、RA 中剂量组和 EAE 模型组 ($P < 0.05$), RA 中剂量组低于 RA 低剂量组和 EAE 模型组 ($P < 0.05$); RA 低剂量组低于 EAE 模型组 ($P < 0.05$)。见图 2。



1: 对照组; 2: EAE 模型组; 3: RA 低剂量组; 4: RA 中剂量组; 5: RA 高剂量组。

图 2 各组小鼠 p-NF-κB 蛋白条带图

3 讨论

MS 是神经系统常见的自身免疫疾病, 通过 MOG 复制的 C57BL/6 小鼠的 EAE 模型, 诱导 T 细胞反应, 引发髓鞘抗体的产生, 是研究 MS 的发病机制和治疗策略的理想模型^[9]。本研究 and 以往研究相同, 通过 MOG + CFA + PTX 免疫后, 模型组与药物干预组小鼠会出现不同程度的 EAE 症状, 且在发病高峰期的小鼠脊髓组织可见典型炎症细胞浸润病理改变, 符合 EAE 病理表现^[10], 提示模型复制成功。

IL-1β、IL-17 等炎症因子在刺激、活化、招募炎症细胞中产生重要作用, 是 EAE 的发病过程的潜在靶点^[11-12]。已有研究显示 IL-1β 可以刺激星形胶质细胞募集并激活白细胞, 可以对中枢神经系统内皮细胞产生作用, 促进细胞因子产生和中性粒细胞的黏附, 导致 EAE 神经组织发生炎症反应^[13-14]。IL-17 是一种有效的促炎细胞因子, 是 Th17 细胞的标志, IL-17 可通过破坏血脑屏障的紧密连接, 使 Th17 细胞进入 MS 患者或 EAE 模型的中枢神经系统造成神经损伤^[15]。NF-κB 是 T 细胞和其他被认为参与 MS 发病的细胞 (包括 B 细胞、树突状细胞、巨噬细胞和中枢神

经胶质细胞)活化的中心因子^[16]。NF- κ B 可以调控促炎因子 IL-1 β 、IL-17 的产生^[17]。p65 蛋白是 NF- κ B 复合物的核心分子, NF- κ B p65 蛋白磷酸化后迅速入细胞核进行转录, 因此 NF- κ B p65 蛋白磷酸化水平是衡量 NF- κ B 经典炎症信号通路活化的重要指标^[18]。本研究结果表明, EAE 小鼠发病高峰期脊髓组织发生炎症反应, 可能与激活 p-NF- κ B 并增加 IL-1 β 、IL-17 炎症因子的转录及释放有关。

RA 是从中药两头尖提取出的三萜皂苷, 具有免疫调节、抗炎作用、抗肿瘤等作用^[19]。王莎莎等^[7]在构建靶向 NF- κ B 通路基因模型的体外细胞实验中研究表明, RA 能够显著抑制转染后细胞的 NF- κ B 信号通路, 减少 I κ B 及其磷酸化蛋白的表达。张雪萍等^[8]研究显示, 两头尖醇提物对佐剂性关节炎大鼠有治疗作用, 能显著下调 IL-1 β 、IL-6、IL-8、肿瘤坏死因子 α 等因子水平。李洪波等^[20]研究显示, RA 能阻止肝缺血再灌注大鼠的氧化应激失衡, 减少 IL-1 β 等炎症因子的释放。本研究发现药物干预组可延长发病潜伏期, 降低发病高峰期神经功能评分, 减轻小鼠脊髓组织炎症细胞浸润, 说明 RA 对 EAE 小鼠有一定防治作用。并且通过 RA 干预的 EAE 小鼠 IL-1 β 、IL-17 水平及 mRNA 表达、NF- κ B 蛋白磷酸化表达较模型组降低, 故推测 RA 可能通过抑制 NF- κ B 磷酸化, 减少促炎因子 IL-1 β 、IL-17 释放, 减轻促进炎症反应, 改善 EAE 小鼠炎症细胞浸润及发病情况, 但具体作用的靶点有待进一步深入研究。

参 考 文 献 :

- [1] GLATIGNY S, BETTELLI E. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as animal models of multiple sclerosis (MS)[J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2018, 8(11): a028977.
- [2] HAUSER S L, CREE B A C. Treatment of multiple sclerosis: a review[J]. *Am J Med*, 2020, 133(12): 1380-1390.
- [3] 中国免疫学会神经免疫分会, 中华医学会神经病学分会神经免疫学组. 多发性硬化诊断和治疗中国专家共识(2018版)[J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2018, 25(6): 387-394.
- [4] 周哲屹, 卢昌均, 汪鸿浩, 等. 中医药治疗多发硬化性的研究进展[J]. *山东中医杂志*, 2017, 36(1): 74-77.
- [5] 刘雨, 刘磊, 田从魁, 等. 银莲花属植物化学成分及药理研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(5): 912-919.
- [6] LI H X, LIU S, HAN J M, et al. Role of toll-like receptors in neuroimmune diseases: therapeutic targets and problems[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 777606.
- [7] 王莎莎, 刘鑫, 张月, 等. 竹节香附素 A 抗炎作用的研究[J]. *中国临床药理学杂志*, 2018, 34(13): 1554-1557.
- [8] 张雪萍, 蔡广知, 安娜, 等. 两头尖醇提物抗佐剂性关节炎作用的研究[J]. *中药药理与临床*, 2016, 32(2): 134.
- [9] AHARONI R, GLOBERMAN R, EILAM R, et al. Titration of myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) -induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model[J]. *J Neurosci Methods*, 2021, 351: 108999.
- [10] SCHULTZ V, van der MEER F, WRZOS C, et al. Acutely damaged axons are remyelinated in multiple sclerosis and experimental models of demyelination[J]. *Glia*, 2017, 65(8): 1350-1360.
- [11] VASANTHAKUMAR A, KALLIES A. Interleukin (IL)-33 and the IL-1 family of cytokines-regulators of inflammation and tissue homeostasis[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2019, 11(3): a028506.
- [12] RUIZ de MORALES J M G, PUIG L, DAUDÉN E, et al. Critical role of interleukin (IL)-17 in inflammatory and immune disorders: an updated review of the evidence focusing in controversies[J]. *Autoimmun Rev*, 2020, 19(1): 102429.
- [13] LÉVESQUE S A, PARÉ A, MAILHOT B, et al. Myeloid cell transmigration across the CNS vasculature triggers IL-1 β -driven neuroinflammation during autoimmune encephalomyelitis in mice[J]. *J Exp Med*, 2016, 213(6): 929-949.
- [14] SHAN K, PANG R R, ZHAO C H, et al. IL-17-triggered downregulation of miR-497 results in high HIF-1 α expression and consequent IL-1 β and IL-6 production by astrocytes in EAE mice[J]. *Cell Mol Immunol*, 2017, 14(11): 909-923.
- [15] SETIADI A F, ABBAS A R, JEET S, et al. IL-17A is associated with the breakdown of the blood-brain barrier in relapsing-remitting multiple sclerosis[J]. *J Neuroimmunol*, 2019, 332: 147-154.
- [16] HUSSMAN J P, BEECHAM A H, SCHMIDT M, et al. GWAS analysis implicates NF- κ B-mediated induction of inflammatory T cells in multiple sclerosis[J]. *Genes Immun*, 2016, 17(5): 305-312.
- [17] LIU X Q, ZHANG X J, NIU X J, et al. Mdivi-1 modulates macrophage/microglial polarization in mice with EAE via the inhibition of the TLR2/4-GSK3 β -NF- κ B inflammatory signaling axis[J]. *Mol Neurobiol*, 2022, 59(1): 1-16.
- [18] PRESCOTT J A, MITCHELL J P, COOK S J. Inhibitory feedback control of NF- κ B signalling in health and disease[J]. *Biochem J*, 2021, 478(13): 2619-2664.
- [19] 栗真真, 苏天琪, 洪彪, 等. 齐墩果烷型三萜皂苷类化学成分的研究进展[J]. *中国现代中药*, 2020, 22(7): 1140-1150.
- [20] 李洪波, 黄锐, 代将, 等. 竹节香附素 A 对肝缺血再灌注大鼠的保护作用机制[J]. *实验动物与比较医学*, 2021, 41(1): 55-60.

(李科 编辑)

本文引用格式: 杨滢, 李作孝, 李晓红. 竹节香附素 A 对实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠炎症的影响及其调控机制研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2023, 33(14): 39-44.

Cite this article as: YANG Y, LI Z X, LI X H. Effects of Raddeanin A on inflammation and the underlying mechanisms in EAE mice[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2023, 33(14): 39-44.