

益肾达络饮对实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠 PLP、Olig1、Olig2 蛋白表达的影响

朱文浩¹ 高 颖¹ 姜利霞² 朱陵群²

摘要 **目的** 研究益肾达络饮对实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)小鼠蛋白脂质蛋白(PLP)、少突胶质细胞转录因子 1(Olig1)、Olig2 蛋白表达的影响。**方法** 将 40 只小鼠随机分为正常组、模型组、中药组和西药组,每组各 10 只;模型组、中药组、西药组每只小鼠上腹部分两点皮下注射抗原乳剂 200 μL (含 PLP139-151 150 μg 、H37RA 400 μg),记为第 1 天;第 1、3 天尾静脉注射百日咳杆菌液 100 μL (含百日咳杆菌 0.6×10^6 个);造模后第 7 天给药,正常组和模型组给予生理盐水 0.1 mL/10 g 灌胃,中药组给予益肾达络饮(0.2 g 生药/10 g)灌胃,西药组给予泼尼松药液(0.039 mg/10 g)灌胃,共干预 54 天。采用 Western blot 法测定 EAE 小鼠脑组织内 PLP、Olig1、Olig2 的变化。**结果** 与正常组比较,模型组小鼠 PLP 及 Olig2 蛋白表达降低($P < 0.05$)。与模型组比较,中药组 PLP、Olig1 及 Olig2 蛋白表达均升高($P < 0.05$),西药组 PLP 及 Olig2 蛋白表达均升高($P < 0.05$);与西药组比较,中药组 Olig1 的表达水平升高($P < 0.05$)。**结论** 益肾达络饮可通过升高 EAE 小鼠脑组织内 Olig1、Olig2 的水平促进髓鞘再生。

关键词 益肾达络饮;实验性自身免疫性脑脊髓炎;髓鞘再生;蛋白脂质蛋白;少突胶质细胞转录因子 1;少突胶质细胞转录因子 2

Effect of Yishen Daluo Decoction on the Expression of PLP, Olig1, and Olig2 in Mice with Experimental Autoimmune Encephalomyelitis ZHU Wen-hao¹, GAO Ying¹, LOU Li-xia², and ZHU Ling-qun² 1 Department of Neurology, Dongzhimen Hospital Affiliated to Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100700), China; 2 Key Laboratory of Chinese Internal Medicine, Ministry of Education, Beijing Dongzhimen Hospital Affiliated to Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100700), China

ABSTRACT **Objective** To study the effect of Yishen Daluo Decoction (YDD) on the expression of protein lipoprotein (PLP), oligodendrocyte transcription factor 1 (Olig1), and oligodendrocyte transcription factor 2 (Olig2) in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). **Methods** Totally 40 mice were randomly divided into 4 groups, i.e., the normal group, the model group, the Chinese medicine (CM) group, and the Western medicine (WM) group, 10 mice in each group. Each mouse in the model, CM, and WM groups was subcutaneously injected with 200 μL antigen emulsion (containing 150 μg PLP139-151 and 400 μg H37RA) in two parts at the upper abdomen on the first day. 100 μL *Bordetella pertussis* juice (containing 0.6×10^6 *Bordetella pertussis*) was injected by caudal vein on the first and the third day. On the 7th day after modeling, each mouse in the normal group and the model group was intragastrically given normal saline (0.1 mL/10 g). YDD (0.2 g crude drug/10 g) was intragastrically given to mice in the CM group, and prednisone (0.039 mg/10 g) was intragastrically given to mice in the WM group. All mice were intervened for 54 days. Changes of PLP, Olig1, and Olig2 in the brain tissue of EAE mice were detected by Western blot. **Results** The levels of PLP and Olig2 in the brain tissue of the

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81072770)

作者单位:1.北京中医药大学东直门医院脑病科(北京 100700);2.北京中医药大学东直门医院中医内科学教育部重点实验室(北京 100700)

通讯作者:高 颖, Tel:010-84013209, E-mail:gaoying973@126.com

DOI: 10.7661/CJIM.2014.05.0562

model group were less than those of the normal group ($P < 0.05$). Compared with the model group, the levels of PLP, Olig1, and Olig2 in the brain tissue increased in the CM group ($P < 0.05$); the levels of PLP and Olig2 in the brain tissue increased in the WM group ($P < 0.05$). Compared with the WM group, the level of Olig1 in the brain tissue increased in the CM group ($P < 0.05$). Conclusion YDD could enhance remyelination by elevating the levels of Olig1 and Olig2 in the brain tissue of EAE mice.

KEYWORDS Yishen Daluo Decoction; experimental autoimmune encephalomyelitis; remyelination; protein lipoprotein; oligodendrocyte transcription factor 1; oligodendrocyte transcription factor 2

实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)是一种特异性致敏 $CD4^+$ T 细胞介导的自身免疫性疾病,是研究多发性硬化(multiple sclerosis, MS)的理想动物模型,以中枢神经系统内小血管周围大量的单核细胞浸润和髓鞘脱失为主要病理特征^[1]。因此,抑制炎症反应和促进髓鞘再生是治疗 MS 和 EAE 的主要措施。目前中医药治疗 MS 和 EAE 的研究多集中在调节免疫和抑制炎症反应,而对促进髓鞘再生的研究较少。本实验以蛋白脂质蛋白 139 - 151 (protein lipoprotein 139 - 151, PLP139 - 151)免疫雌性 SJL 小鼠建立复发 - 缓解型 EAE 模型,并给予中药复方益肾达络饮治疗,对其促进 EAE 小鼠脑组织髓鞘再生的疗效及作用机制进行研究。

材料与方法

1 实验动物 8 ~ 12 周龄 SJL 雌性小鼠 40 只,体重 (18.6 ± 0.3) g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,生产许可证编号: SCXK (京) 2012 - 0001。实验前小鼠于北京中医药大学东直门医院中医内科学教育部重点实验室先进行适应性饲养 1 周,温度 20 ~ 25 °C,相对湿度 50% ~ 70%, 12 h/12 h 明暗交替,自由饮水及进食。

2 药物 醋酸泼尼松片, 5 mg/片,河南天方药业股份有限公司生产,批号: 120431890;益肾达络饮片(由熟地 20 g、鹿角胶 10 g、当归 10 g、川芎 15 g、石菖蒲 10 g、栀子 10 g、豨莶草 15 g、生甘草 6 g 等共 12 味药组成)购自北京同仁堂参茸有限责任公司,饮片按照常规方法用去离子水煎煮 2 次,混匀后用双层纱布过滤,收集滤液,文火煎煮浓缩成 2 g 生药/mL,分装灭菌后 4 °C 冰箱内保存备用。醋酸泼尼松片用去离子水配制成 0.39 mg/mL 溶液。

3 试剂及仪器 PLP139 - 151 多肽(HSLGK-WLGHPDKF),由北京赛百盛基因技术有限公司合成,纯度 95.34%,订单号: 130401 - 3;人型结核分枝杆菌(*M. Tuberculosis* H37 RA),购自美国 DIFCO

公司,批号: 2072054;完全弗氏佐剂(Complete Freund's Adjuvant, CFA),购自美国 Sigma 公司,批号: 101M8711;百日咳杆菌原液,购自北京天坛生物制品股份有限公司,批号: 20120222;Luxol fast blue 染液,购自美国 Sigma 公司,批号: 17K1313;PLP (G-17),购自美国 Santa Cruz 公司,批号: I2811;抗少突胶质细胞转录因子 1 (oligodendrocyte transcription factor 1, Olig1) 抗体,购自美国 ABCAM 公司,批号: GR46222 - 5;抗 Olig2 抗体,购自美国 Abcam 公司,批号: GR22519 - 9;小鼠抗 - β -Actin,购自武汉博士德生物公司,批号: BM0627;辣根酶标记兔抗山羊 IgG (H + L): 购自北京中杉金桥生物技术有限公司,批号: 104669;辣根酶标记山羊抗兔 IgG (H + L),购自北京中杉金桥生物技术有限公司,批号: 103756;辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG-HRP,购自武汉博士德生物公司,批号: BST07A19BH; ZS83 - 1 型内切式组织匀浆器(浙江省浙西机械厂), 3K15 型 4 °C 低温离心机(美国 Sigma 公司), MK3 型酶标仪(德国赛默飞世尔仪器有限公司), MVS-1 型旋涡混合器(北京金北德工贸有限公司), UB1001 型隔水式培养箱(上海福玛实验设备有限公司)。

4 分组及模型制备 40 只雌性 SJL 小鼠随机分为正常组、模型组、中药组和西药组,每组各 10 只。在模型组、中药组、西药组每只小鼠上腹部,分两点皮下注射抗原乳剂 200 μ L (含 PLP139 - 151 150 μ g、H37RA 400 μ g),记为第 1 天;第 1、3 天尾静脉注射百日咳杆菌液 100 μ L (含百日咳杆菌 0.6×10^6 个)^[2]。正常组不做任何处理。死亡或未发病的小鼠予以剔除。

5 干预方法 造模后第 7 天给药。正常组和模型组给予生理盐水 0.1 mL/10 g 灌胃,中药组给予益肾达络饮(0.1 mL/10 g,相当于临床人用药量的 9 倍)灌胃,西药组给予泼尼松药液(0.1 mL/10 g,相当于临床人用药量的 9 倍)灌胃,共干预 54 天。

6 PLP、Olig1、Olig2 蛋白检测及方法 最后一次治疗结束后 2 h 取材。先用 3.5% 水合氯醛腹腔注

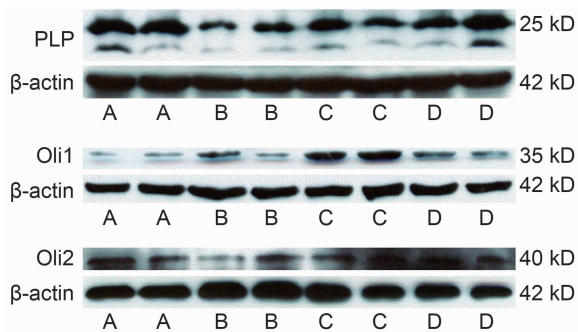
射麻醉,迅速剪开胸腔,暴露心脏,将灌注针经左心室插入主动脉,在右心耳处剪开右心房,先用预冷的生理盐水灌注,待流出的液体由红色变成无色时,迅速取出脑和脊髓,放入液氮中保存,备用。采用 Western blot 法,取脑和脊髓,加入 RIPA 裂解液,用电动匀浆器低温条件下匀浆,4℃、12 000 r/min 离心 10 min,提取蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。经 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后将电泳产物转移至 NC 膜上,5%脱脂奶粉封闭,一抗[PLP(G-17) 1:300 稀释;Anti-Olig1 antibody 1:1 000 稀释;Anti-Olig2 antibody 1:1 000 稀释]孵育,二抗[辣根酶标记兔抗山羊 IgG 1:6 000 稀释,辣根酶标记山羊抗兔 IgG 1:6 000 稀释,辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG 1:6 000 稀释]孵育,ECL 发光,显影,定影。用 NIH Image J1.41 计算灰度值,与内参(β -actin)做比值后分析。

7 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。计量资料进行正态性和方差齐性检验,多个样本均数的比较用 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组发病率及死亡率比较 模型组小鼠的发病率为 80.0% (8/10),中药组小鼠的发病率为 77.8% (7/9),西药组小鼠的发病率为 60.0% (6/10),三组发病率比较差异无统计学意义($P > 0.05$),中药组小鼠在 EAE 发病前因肺部感染死亡 1 只。

2 各组小鼠脑组织 PLP、Olig1 及 Olig2 蛋白表达比较(图 1,表 1) 与正常组比较,模型组小鼠 PLP 及 Olig2 蛋白表达降低($P < 0.05$)。与模型组比较,中药组 PLP、Olig1 及 Olig2 蛋白表达均升高($P < 0.05$),西药组 PLP 及 Olig2 蛋白表达均升高($P < 0.05$)。与西药组比较,中药组 Olig1 表达升高($P < 0.05$)。



注:A 为正常组;B 为模型组;C 为中药组;D 为西药组

图 1 各组小鼠脑组织 PLP、Olig1 及 Olig2 蛋白表达

表 1 各组小鼠脑组织 PLP、Olig1 及 Olig2

蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量	n	PLP	Olig1	Olig2
正常	-	6	0.57 ± 0.04	0.217 ± 0.034	1.16 ± 0.29
模型	-	6	0.32 ± 0.07 *	0.352 ± 0.110	0.56 ± 0.20 *
中药	0.2 g/10 g	6	0.47 ± 0.06 Δ	0.723 ± 0.021 Δ $\blacktriangle$	1.49 ± 0.43 Δ
西药	0.039 mg/10 g	6	0.55 ± 0.06 Δ	0.319 ± 0.052	1.61 ± 0.06 Δ

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$;与西药组比较, $\blacktriangle P < 0.05$

讨 论

MS 是一种以中枢神经系统白质炎性脱髓鞘为主要病理特点的自身免疫性疾病^[3]。目前尚无有效根治措施,治疗的主要目的是抑制急性期的炎症反应。泼尼松是治疗多发性硬化的主要治疗药物,能通过抑制炎症反应而改善轴索传导,促进血脑屏障的恢复,缩短急性期和复发期的病程,但不能防止复发^[3]。中医药可以减轻 MS 患者的症状,并且有降低复发率、减少不良反应的优势。

本课题组认为 MS 的基本病机是“湿热浊毒,损伤督脉,戕害脑髓,败坏形体”^[4]。益肾达络饮是基于此病机拟定的用于治疗 MS 的有效方剂,本方由熟地、鹿角胶、栀子、石菖蒲、萆薢、豨莶草、生甘草等药物组成,具有益肾温阳、清热化湿、解毒通络的功效,临床应用可改善 MS 患者的临床症状,延缓复发。研究表明,本方可以改善 EAE 小鼠的神经功能评分,降低复发率,减轻炎性细胞浸润和髓鞘脱失^[2]。

PLP 是一种含疏水氨基酸的具有离子传送特性的内层膜蛋白^[5,6],也是脑髓鞘的主要成分之一,通过检测 PLP 含量的变化可以反映髓鞘损伤的程度。本实验研究结果显示,模型组 EAE 小鼠 PLP 的表达水平低于正常组($P < 0.05$),说明模型组 EAE 小鼠存在明显的髓鞘脱失,经益肾达络饮、泼尼松治疗后,中药组、西药组 EAE 小鼠 PLP 的表达水平高于模型组($P < 0.05$),说明益肾达络饮、泼尼松有减轻髓鞘损伤的作用。

Olig 包括 Olig1、Olig2 和 Olig3 三种亚型,属于新的碱性螺旋-环-螺旋(basic helix-loop-helix, bHLH)转录因子家族。在脊髓,Olig 和原神经基因共同构成了神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞的组合码^[7]。其中 Olig1 和 Olig2 特异性表达于神经组织,Olig3 主要表达于非神经组织^[8]。Olig1 是脑内少突胶质细胞髓鞘再生的主要调节子^[9],它能使少突胶质前体细胞分化成髓鞘形成少突胶质细胞,在 MS 的髓鞘再生中起重要作用^[10]。Olig2 过表达可以诱导神经干细胞分化成成熟的少突胶质细胞^[11],注射 Olig2-

NSCs 可以减轻复发 - 缓解型 EAE 小鼠的神经功能缺损症状^[12]。本实验研究结果显示,中药组 EAE 小鼠 Olig1、Olig2 的表达水平明显高于模型组 ($P < 0.05$),中药组 Olig1 表达水平高于西药组 ($P < 0.05$),Olig2 表达水平与西药组无差异 ($P > 0.05$),说明益肾达络饮可通过升高 EAE 小鼠脑内 Olig1、Olig2 的水平促进髓鞘再生,而泼尼松可以通过升高 Olig2 的水平而促进髓鞘再生。因此,Olig1/2 过表达是促进内源性髓鞘再生和 CNS 脱髓鞘疾病功能恢复的有效治疗方法^[13]。

综上所述,本实验从蛋白水平检测了 EAE 小鼠脑组织内 PLP、Olig1、Olig2 表达,结果表明益肾达络饮可升高 EAE 小鼠脑组织内 Olig1、Olig2 水平,升高脑组织中 PLP 表达,提示益肾达络饮可能通过促进脑组织内 Olig1、Olig2 表达,促进髓鞘再生。本实验未对 PLP、Olig1、Olig2 基因表达进行检测,在今后的实验中应进一步研究 PLP、Olig1、Olig2 基因水平表达,使其机制更加明确。本实验证明,中药可以促进少突胶质细胞转录因子的表达,促进髓鞘再生,为 MS 等脱髓鞘疾病的治疗提供了理论依据。

参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] 朱文浩,高颖,关东升,等.益肾达络饮对实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠神经功能评分和病理特征的影响[J].辽宁中医杂志, 2013, 40(7): 1467 - 1469.
- [3] 吴江,贾建平,崔丽英主编.神经病学[M].北京:人民卫生出版社, 2010:236 - 246.
- [4] 尚晓玲,高颖.关于多发性硬化病因病机的理论探讨[J].中国中医基础医学杂志, 2006, 12(6): 414 - 415.
- [5] Smith R, Cook J, Dickens PA. Structure of the proteolipid protein extracted from bovine central nerv-

ous system myelin with nondenaturing detergents [J]. J Neurochem, 1984, 42(2): 306 - 313.

- [6] Stoffel W, Hillen H, Giersiefen H. Structure and molecular arrangement of proteolipid protein of central nervous system myelin [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1984, 81(16): 5012 - 5016.
- [7] Zhou Q, Anderson DJ. The bHLH transcription factors Olig2 and Olig1 couple neuronal and glial subtype specification[J]. Cell, 2002, 109(1): 61 - 73.
- [8] Takebayashi H, Yoshida S, Sugimori M, et al. Dynamic expression of basic helix-loop-helix Olig family members: implication of Olig2 in neuron and oligodendrocyte differentiation and identification of a new member, Olig3 [J]. Mech Dev, 2000, 99(1 - 2): 143 - 148.
- [9] Xin M, Yue T, Ma Z, et al. Myelinogenesis and axonal recognition by oligodendrocytes in brain are uncoupled in Olig1-null mice [J]. J Neurosci, 2005, 25(6): 1354 - 1365.
- [10] Li H, Lu Y, Smith HK, et al. Olig1 and Sox10 interact synergistically to drive myelin basic protein transcription in oligodendrocytes[J]. J Neurosci, 2007, 27(52): 14375 - 14382.
- [11] Copray S, Balasubramanian V, Levenga J, et al. Olig2 over-expression induces the *in vitro* differentiation of neural stem cells into mature oligodendrocytes[J]. Stem Cells, 2006, 24(4): 1001 - 1010.
- [12] Sher F, Amor S, Gerritsen W, et al. Intraventricularly injected Olig2-NSCs attenuate established relapsing-remitting EAE in mice [J]. Cell Transplant, 2012, 21(9): 1883 - 1897.
- [13] Cheng X, Wang Y, He Q, et al. Bone morphogenetic protein signaling and olig1/2 interact to regulate the differentiation and maturation of adult oligodendrocyte precursor cells [J]. Stem Cells, 2007, 25(12): 3204 - 3214.

(收稿:2013 - 03 - 15 修回:2014 - 02 - 10)