

· 论 著 ·

辛伐他汀对变态反应性脑脊髓炎小鼠 INF- γ 和 IL-10 表达的影响

曹江晨¹, 雷军平², 李路军³, 陈光勇⁴

[摘要] 目的 研究辛伐他汀(Simvastatin)对实验性变态反应性脑脊髓炎(experiment allergic encephalomyelitis, EAE)小鼠肿瘤坏死因子- γ (INF- γ)和白细胞介素-10(IL-10)表达的影响,探讨该药物对 EAE 保护作用的免疫调节机制。方法 通过皮下注射 MOC₃₃₋₅₅ 肽段诱导小鼠急性 EAE 模型,实验分为 EAE 给药组、EAE 对照组和正常对照组。观察各组小鼠体重等变化,测定 EAE 发病高峰期血清、培养的单核细胞及脾细胞培养上清液的 INF- γ 和 IL-10 水平。结果 辛伐他汀能降低 EAE 小鼠的发病率,减轻了症状的严重程度,并能显著降低 EAE 小鼠血清、单个核细胞及脾细胞培养上清中 INF- γ 水平,升高 IL-10 水平。结论 辛伐他汀可能通过其抑制 INF- γ 和上调 IL-10 的表达,调节免疫状态,从而对小鼠 EAE 起到保护作用。

[关键词] 多发性硬化;实验性变态反应性脑脊髓炎(EAE);辛伐他汀;INF- γ ;IL-10

[中图分类号] R744.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1672-271X(2011)01-0024-04

Effect of simvastatin on expression of INF- γ and IL-10 in mice with allergic encephalomyelitis

CAO Jiang-chen¹, LEI Jun-ping², LI Lu-jun³, CHEN Guang-yong⁴. 1. Out-patient Department of 73801 army, PLA, Wuxi, Jiangsu 214063, China; 2. Department of Cardiology, Changhai Hospital Affiliated to the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 3. Joint Logistics Department of the Nanjing Military Area Command, retired cadres health center, wuxi, Jiangsu 214063, China; 4. The First Affiliated Hospital of Fuzhou General Hospital, Nanjing Military Area Command, Putian, Fujian 351100, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of simvastatin on expression of INF- and IL-10 in mice with experiment allergic encephalomyelitis (EAE), and the immunomodulatory mechanism for protection of allergic encephalomyelitis. **Methods** EAE was induced in C57BL/6J mice by immunization with MOC33-55. Mice were randomly divided into three groups: EAE simvastatin treatment group, EAE sham treatment group, and normal control group. The clinical assessment of EAE was performed daily. The levels of INF- γ and IL-10 in the serum, and the cell suspension of cultured mononuclear cell (MNC) or spleen cell were analyzed by ELISA. **Results** Simvastatin reduced the incidence and severity of EAE, which was accomplished by the inhibited expression of INF- γ and enhanced expression of IL-10. **Conclusions** Simvastatin might ameliorated EAE through an immunomodulatory effect that inhibits the expression of INF- γ and enhances the expression of IL-10.

[Key words] multiple sclerosis; experiment allergic encephalomyelitis; simvastatin; INF- γ ; IL-10

多发性硬化(multiple sclerosis, MS)是中枢神经系统免疫相关性炎性脱髓鞘疾病,伴随缓慢或迅速加重的神经元轴突变性和功能丢失^[1],呈现出系列的神经功能障碍症状。由于对该疾病的发病机制尚

缺乏完全的了解,因此,深入揭示 MS 的发病机制,探索其治疗的新方法成为研究者们共同关注的热点。

近年来的研究显示,他汀类药物具有潜在的抗炎和免疫调节作用^[2],对一些神经系统自身免疫性疾病可能具有预防和治疗作用,国外已经展开了他汀类药物应用于 MS 治疗的临床试验工作^[3]。实验性变态反应性脑脊髓炎(EAE)是研究 MS 的模型之一,有些学者使用阿托伐他汀和洛伐他汀均对 EAE 临床症状具有明显的改善作用^[4-5]。本研究主要观察辛伐他汀对 EAE 模型小鼠外周血清中细胞因子

作者简介: 曹江晨(1974-),男,浙江嘉兴人,本科,主治医师,从事内科临床工作

作者单位: 1. 214063 江苏无锡,解放军 73801 部队门诊部; 2. 200433 上海,第二军医大学附属长海医院心内科; 3. 214063 江苏无锡,南京军区联勤部无锡干休所卫生所; 4. 351100 福建莆田,南京军区福州总医院第一附属医院

肿瘤坏死因子- γ (INF- γ) 和白细胞介素-10 (IL-10) 含量的影响,以及对培养的单核细胞和脾细胞分泌上述细胞因子的影响。探讨辛伐他汀对 EAE 的保护作用及其机制,为临床治疗 MS 提供理论依据,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 雄性健康 C57BL/6J 小鼠 50 只,清洁级,8 周龄,体重 19 ~ 26 g,由中国科学院上海实验动物中心提供,动物使用许可证号为 SYXK (沪)200-0003;常规条件饲养。

1.2 实验试剂 髓鞘少突胶质糖蛋白肽段 33-55 (Myelin-oligodendrocyte glycoprotein, MOG₃₃₋₅₅)、福氏完全佐剂 (CFA)、结核分支杆菌 H37Ra、百日咳毒素 (PTX)、刀豆素 A (Con-A) 等 (均为美国 Sigma 公司产品)。辛伐他汀 (Simvastatin) (美国 Calbiochem 公司产品)。RPMI1640 培养基、胎牛血清 (FCS) 等 (均为美国 GIBCO 生物技术公司产品)。免疫酶联反应 (ELISA) 方法测定 INF- γ 和 IL-10 的试剂盒为上海晶美公司产品。

1.3 EAE 模型的建立

1.3.1 建模方法^[5]及分组 实验动物随机分为 EAE 给药组、EAE 对照组、正常对照组,每组 10 只。EAE 给药组和对照组于实验开始日,在小鼠双侧腰窝皮下注射含 300 μ g MOG₃₃₋₅₅ 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 100 μ l,同时注射含 500 μ g 结核分支杆菌 H37Ra 的福氏完全佐剂。免疫的当天及免疫后 48 h 分别静脉注射 200 ng 百日咳毒素。正常对照组按同样方法注射等量不含 MOG₃₃₋₅₅ 的 PBS 及相应佐剂。辛伐他汀给药组小鼠从免疫当天开始按 2 mg/(kg · d) 体重的药量给予静脉注射。

1.3.2 评价标准 自免疫当日始,每天由两名实验者对实验组动物 EAE 症状进行盲法评价打分,直至实验结束日 (第 26 天或动物死亡)。0 分:正常,无明显症状;1 分:尾巴或者后肢无力;2 分:尾巴和后肢同时无力;3 分:后肢部分麻痹;4 分:四肢瘫痪完全麻痹;5 分:濒死或死亡。动物出现明显发病症状后,或 EAE 评分连续 3 d 无明显增加,视为疾病高峰期 (平均为免疫后 17 d);将症状开始减退后,或 EAE 评分连续 3 d 无明显降低,为实验观察结束日 (平均 26 d)。在计算每组发病率时,以 EAE 评分分值 ≥ 1 视为发病。

1.4 单核细胞分离与培养 免疫后第 17 天,取各实验组小鼠眶静脉血约 1 ml,血凝后分离收集血清, -20℃ 保存待用。取肝素抗凝 (25 U/ml) 全血约

1.5 ml, Hanks 液稀释 1 倍后将其铺在葡聚糖-泛葡胺 (Ficoll-Urografin) 分层液 (比重 1.077) 上,离心 30 min (2000 r/min, 离心半径 8 cm)。单核细胞悬于分层液上层,呈白膜状,用毛细吸管吸取单核细胞层, Hanks 液清洗、离心 7 min (1500 r/min, 离心半径 8 cm), 重复 3 遍。加入含 5% 小牛血清 RPMI-1640 培养基制成细胞悬液 (细胞计数 2×10^5 /ml)。用台盼蓝染色法检测细胞活力,活细胞比例均 $> 95\%$ 。取 1 ml 调配完毕的细胞悬液放入培养皿中,加入 Con-A (10 μ g/ml) 放置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 4 h 以激活单个核细胞。收集上清液, -20℃ 保存待用。

1.5 脾细胞的分离与培养^[6] 免疫后第 17 天,动物眶静脉取血留样后,颈椎脱臼处死,取出脾脏,制作脾细胞悬液。在冰浴的 Hanks 液中将脾剪成小块,加入 400 U/ml 胶原酶 (Ⅲ型) 5 ml/只脾脏, 37℃ 消化 20 min,用尼龙网过滤,得到单细胞悬液。用 Tris-NH₄Cl (Tris 碱-氯化氨溶液) 裂解去除红细胞后,细胞重悬浮于含 10% FCS RPMI 1640 培养液中,以 5×10^5 每孔的密度种植于 96 孔板 (美国 Corning 公司),每只动物来源的细胞设 3 个复孔,培养液中加入 MOG₃₃₋₅₅ 至 10 μ g/ml 浓度。细胞上清液于 48 h 后收集 -20℃ 保存待测。

1.6 INF- γ 和 IL-10 含量测定 用 ELISA 法测定动物血清、单核细胞和脾细胞培养上清液中 INF- γ 和 IL-10 的含量,实验操作按照试剂盒说明进行。

1.7 统计学处理 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,进行单因素方差分析 (One-way ANOVA),组间两两比较采用 t 检验;计数资料采用 Fisher 精确概率检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 辛伐他汀对 EAE 小鼠体重改变及 EAE 评分的影响 正常对照组未发病,其体重及行为均未见明显改变。动物在免疫后 14 d 左右陆续出现发病症状,临床评分逐渐增加并伴随有体重的减轻,提示造模成功。实验发现, EAE 给药组的发病率为 80% (16/20), 低于 EAE 对照组 100% (20/20) ($P = 0.053$),提示辛伐他汀可以降低 EAE 的发病率;同时,给药组动物体中体重下降幅度也明显小于对照组 (图 1)。更为重要的是,动物临床症状的评分发现,给药组患病小鼠症状的平均分值显著低于对照组 (图 2),表明辛伐他汀能改善 EAE 发病的严重程度,缓减临床症状。

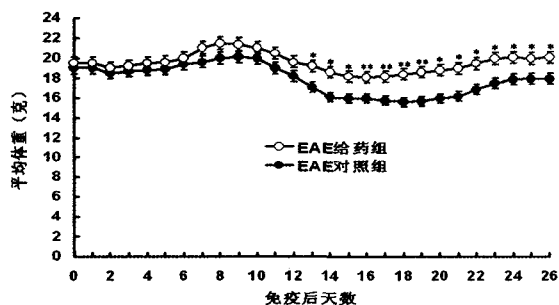


图1 两组 EAE 小鼠体重变化情况
注:与 EAE 对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

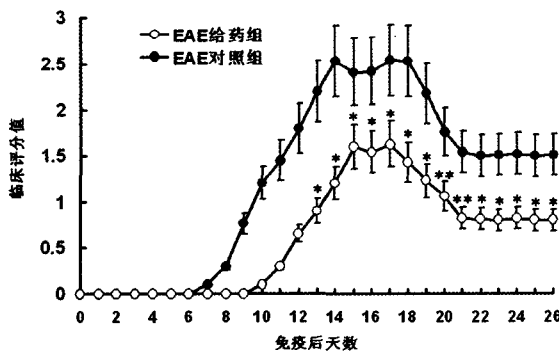


图2 两组 EAE 小鼠临床评分值变化情况
注:与 EAE 对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

2.2 辛伐他汀对 EAE 小鼠血清、单核细胞及脾细胞中 $\text{INF-}\gamma$ 和 IL-10 含量的影响 三个试验均提示: EAE 给药组和 EAE 对照组的 $\text{INF-}\gamma$ 和 IL-10 较之正常对照组均有显著增高, EAE 给药组的 $\text{INF-}\gamma$ 升高幅度显著低于 EAE 对照组;表明辛伐他汀能降低 EAE 小鼠血清中的 $\text{INF-}\gamma$ 水平。相反, EAE 给药组的 IL-10 升高幅度则显著高于 EAE 对照组,表明辛伐他汀能增加 EAE 小鼠血清中的 IL-10 水平。见表 1。

3 讨论

MS 的病因至今仍未完全阐明。较为普遍的一种观点认为是髓鞘成分特异的致敏性 T 淋巴细胞 (Th1 细胞介导) 侵入中枢神经系统攻击髓鞘, 从而在局部造成髓鞘的炎症损害^[7]。EAE 模型很好地模拟了 MS 的这一自身免疫反应的病理过程, 因而

被作为研究 MS 的理想动物模型^[8]。血脑屏障完整性的破坏及其所致的通透性增加对 EAE 疾病的进展起到了重要作用, 被 MOG 蛋白致敏的 T 淋巴细胞穿过血脑屏障进入脑实质, 在局部产生大量细胞因子, 攻击髓鞘, 产生髓鞘碎片, 继而被吞噬, 造成脱髓鞘改变。在这一病理过程中, 机体的多种炎性细胞和免疫调节细胞参与到其中, 最终由于免疫功能的失衡而产生免疫变态反应。

Th1 细胞 (T 辅助细胞 1) 和 Th2 细胞的免疫应答的发生和免疫反应的调控在其中起到关键的作用。 Th1 细胞分泌多种促炎性因子, 激活免疫反应, 其中代表性的因子就是 $\text{INF-}\gamma$ 。事实上, EAE 就是典型 Th1 细胞驱动的自身免疫病, 抑制 $\text{INF-}\gamma$ 能大大降低 EAE 的发病率及其临床评分, 减缓病情, 而过继性移植髓鞘特异的 $\text{INF-}\gamma$ 分泌性 Th1 细胞足以诱发 EAE^[8]。相反, Th1 细胞则主要分泌具有免疫抑制作用的细胞因子, 对机体免疫起到负性调控作用, 而 IL-10 是其中的典型代表。实验表明, 敲除 IL-10 基因的小鼠 EAE 症状明显加重, 死亡率增高^[9], 而用过表达 IL-10 基因的神经干细胞移植 EAE 小鼠体内后, 能产生比移植神经干细胞更好的治疗效果^[10], 说明 IL-10 对 EAE 病情有明显的抑制和缓解作用。由于 $\text{INF-}\gamma$ 和 IL-10 的浓度水平反应机体免疫的平衡状态, 因而也就成为了人们用来反映 EAE 病理过程发展的常用指标^[11-12]。

本研究结果表明, 辛伐他汀能明显降低小鼠的 EAE 发病率, 抑制了 EAE 导致的体重减轻, 并降低 EAE 临床评分, 改善发病症状的严重程度, 提示其可能对 MS 具有治疗的作用^[13]。为进一步探讨辛伐他汀改善 EAE 病情的可能机制, 观察辛伐他汀对是否可能通过免疫调节作用实现这一功能, 本实验进一步测定了 EAE 发病高峰期 (即免疫后第 17 天) 上述的两个指标, 即 $\text{INF-}\gamma$ 和 IL-10 的表达变化。结果发现辛伐他汀能显著的抑制 $\text{INF-}\gamma$ 的表达而同时增强 IL-10 的表达, 这一结果在检测外周血清水平、单核细胞分泌水平以及脾细胞分泌水平等三个不同的实验中得到了一致的验证。

表 1 辛伐他汀对 EAE 小鼠血清、单核细胞及脾细胞中 $\text{INF-}\gamma$ 和 IL-10 含量的影响 (ng/ml , $\bar{x} \pm s$)

组别	n	血清		单核细胞		脾细胞	
		$\text{INF-}\gamma$	IL-10	$\text{INF-}\gamma$	IL-10	$\text{INF-}\gamma$	IL-10
正常对照组	10	1.84 ± 0.02	4.85 ± 0.02	2.46 ± 0.03	6.38 ± 0.08	3.86 ± 0.06	10.02 ± 0.10
EAE 对照组	10	$4.34 \pm 0.04^*$	$7.62 \pm 0.06^*$	$6.76 \pm 0.09^*$	$9.83 \pm 0.09^*$	$12.35 \pm 0.29^*$	$20.64 \pm 0.20^*$
EAE 给药组	10	$2.83 \pm 0.01^{\#}$	$10.09 \pm 0.09^{\#}$	$3.76 \pm 0.06^{\#}$	$15.18 \pm 0.12^{\#}$	$8.31 \pm 0.16^{\#}$	$34.07 \pm 0.22^{\#}$

注:与正常对照组比较,* $P < 0.01$;与 EAE 对照组比较,[#] $P < 0.01$

此外,有些学者报告他汀类药物降低冠状动脉综合征患者血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6) 和 C 反应蛋白 (CRP) 的水平,能明显抑制炎症反应,从而能降低心血管事件发生率^[14-15]。

综上所述,本研究提示辛伐他汀可能具有调节 Th1 细胞和 Th2 细胞之间的平衡作用,从而调节 EAE 小鼠的免疫状态,达到预防或缓解 EAE 之作用。本研究为辛伐他汀治疗 MS 提供间接的证据,并给出了可能的机制解释。

【参考文献】

- [1] Confavreux C, Vukusic S. Natural history of multiple sclerosis: a unifying concept [J]. Brain, 2006, 129 (3): 606-616.
- [2] Steinman L. Immune therapy for autoimmune diseases [J]. Science, 2004, 305 (5681): 212-216.
- [3] Weber MS, Youssef S, Dunn SE, et al. Statins in the treatment of central nervous system autoimmune disease [J]. J Neuroimmunol, 2006, 178 (1-2): 140-148.
- [4] Luccarini I, Ballerini C, Biagioli T, et al. Combined treatment with atorvastatin and minocycline suppresses severity of EAE [J]. Exp Neurol, 2008, 211 (1): 214-226.
- [5] Paintlia AS, Paintlia MK, Singh AK, et al. Inhibition of rho family functions by lovastatin promotes myelin repair in ameliorating experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. Mol Pharmacol, 2008, 73 (5): 1381-1393.
- [6] Fu YF, Wang JX, Zhao Y, et al. S-Adenosyl-l-homocysteine hydro-lase inactivation curtails ovalbumin-induced immune responses [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2006, 316 (3): 1229-1237.
- [7] Peterson JW, Trapp BD. Neuropathobiology of multiple sclerosis [J].

- Neurologic Clin, 2005, 23 (1): 107-129.
- [8] Gold R, Linington C, Lassmann H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research [J]. Brain, 2006, 129 (8): 1953-1971.
- [9] Bettelli E, Das MP, Howard ED, et al. IL-10 is critical in the regulation of autoimmune encephalomyelitis as demonstrated by studies of IL-10- and IL-4-deficient and transgenic mice [J]. J Immunol, 1998, 161 (7): 3299-3306.
- [10] Yang JX, Jiang ZL, Fitzgerald DC, et al. Adult neural stem cells expressing IL-10 confer potent immunomodulation and remyelination in experimental autoimmune encephalitis [J]. J Clin Invest, 2009, 119 (12): 3678-3691.
- [11] Wang Y, Mei YH, Feng DC, et al. Triptolide modulates T-cell inflammatory responses and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. J Neurosci Res, 2008, 86 (11): 2441-2449.
- [12] Fu FY, Zhu NY, Ni J, et al. (5R)-5-Hydroxytriptolide (LLDT-8), a novel triptolide derivative, prevents experimental autoimmune encephalomyelitis via inhibiting T cell activation [J]. J Neuroimmunol, 2006, 175 (1-2): 142-151.
- [13] Stuve O, Prod'homme T, Youssef S, et al. Statins as potential therapeutic agents in multiple sclerosis [J]. Curr Neurol Neurosci Rep, 2004, 4 (3): 237-244.
- [14] 陈卫兵, 蒲红, 黄丽娜. 早期应用辛伐他汀治疗急性冠状动脉综合征临床观察及对炎症因子的影响 [J]. 东南国防医药, 2003, 5 (5): 330-332.
- [15] 丁雪燕, 罗助荣. 急性冠脉综合征血清脑钠肽水平及阿托伐他汀对其影响 [J]. 东南国防医药, 2009, 11 (1): 37-39.

(收稿日期: 2010-08-06; 修回日期: 2010-11-06)

(本文编辑: 潘雪飞; 英文编辑: 王健东)

《第三军医大学学报》征订启事

《第三军医大学学报》为国内外公开发行的综合性医药卫生类学术期刊, 被国内各大检索系统和《美国化学文摘》(CA)、《俄罗斯文摘杂志》(PЖ)、《波兰哥白尼索引 (IC)》等国际知名检索系统收录, 两度被评为国家期刊奖百种重点期刊, 为中国科技论文统计源期刊、中国自然科学类核心期刊和中国科学引文数据库 (CSCD) 核心库收录期刊。主要刊载国内外医学领域 (军事医学、基础医学、临床医学、药学、预防医学、检验医学、生物医学工程等) 所取得的新理论、新成果、新经验、新技术、新方法。主要栏目有: 专家述评、专题报道、论著、技术方法、研究快报、短篇论著、经验交流、疑难病例、个案与短篇和学术之窗等。读者对象主要为从事医药卫生工作的中高级科研、医疗、教学机构人员和高等医药院校师生。

该刊创刊于 1979 年, 半月刊, 国际标准大 16 开本, 96 页, 105g 铜版纸彩色双胶印刷, 国内邮发代号: 78-91, 国外邮发代号: M6529。可在当地邮局订阅, 也可来函或致电我刊编辑部办理邮购, 免收邮寄费。每期定价 10 元, 全年共 240 元。欢迎投稿, 欢迎订阅。

地址: 重庆市沙坪坝区高滩岩正街 30 号《第三军医大学学报》编辑部; 邮编: 400038
 电话: (023) 68752187; E-mail: aammt@mail.tmmu.com.cn; 网址: http://aammt.tmmu.com.cn/
 联系人: 唐素芳