

• 论著 •

雌激素对实验性变态反应性脑脊髓炎大鼠发病影响的研究

徐晓娅¹, 郭晓聪², 黄琳明¹, 李作孝³, 石强¹

1. 自贡市第一人民医院神经内科, 四川省自贡市 643000

2. 宜宾市第二人民医院检验科, 四川省宜宾市 644000

3. 泸州医学院附属医院神经内科, 四川省泸州市 646000

摘要:目的 探讨雌激素对实验性变态反应性脑脊髓炎(EAE)的影响。方法 将30只大鼠随机分为EAE组及大、小剂量雌激素干预组,每组10只,制作EAE模型,大、小剂量雌激素干预组分别给予皮下注射苯甲酸雌二醇1 mg/kg/d、250 μg/kg/d,连续10 d,观察各组的发病情况并采用HE染色观察脑和脊髓组织病理变化。结果 大、小剂量雌激素干预组的临床症状均较EAE组轻,表现为发病率减少、潜伏期延长、进展期缩短、高峰期神经功能损害较轻。病理切片提示雌激素干预组脑和脊髓炎症细胞浸润明显减少,其中以大剂量组更明显。结论 雌激素对多发性硬化动物模型EAE具有保护作用,且与剂量相关。

关键词:多发性硬化;雌激素;实验性变态反应性脑脊髓炎;大鼠

Study on effect of estrogen on experimental allergic encephalomyelitis in rats

XU Xiao-Ya, GUO Xiao-Cong, HUANG Lin-Ming, LI Zuo-Xiao, SHI Qiang. Department of Neurology, Zigong First People's Hospital, Zigong, Sichuan 643000, China

Corresponding Author: LI Zuo-Xiao, E-mail: lzx3235@sina.com

Abstract: Objective To investigate the effect of estrogen on experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in rats. **Methods** Thirty male rats were randomly divided into three groups: EAE model group, high-dose estrogen treatment group, and low-dose estrogen treatment group, with 10 rats in each group. The high- and low-dose estrogen treatment groups were subcutaneously injected with estradiol benzoate 1 mg/kg/d and 250 μg/kg/d, respectively, for ten days. Clinical symptoms of the rats were observed, and the pathological changes in cerebral and spinal cord tissues were observed by HE staining. **Results** The high- and low-dose estrogen treatment groups showed milder clinical symptoms as compared with the EAE model group, including lower incidence, longer delitescence, shorter progression period, milder neurological dysfunction at the peak stage of disease, and reduced infiltration of inflammatory cells into cerebral and spinal cord tissues. The protective effect was more obvious in the high-dose estrogen treatment group. **Conclusions** Estrogen has a protective effect on the multiple sclerosis model of EAE, and the effectiveness is positively correlated with dosage.

Key words: multiple sclerosis; estrogen; experimental allergic encephalomyelitis; rat

多发性硬化(multiple sclerosis, MS)被广泛认为是累及中枢神经系统(central nervous system, CNS)白质的自身免疫性脱髓鞘性疾病。实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)是公认的研究MS的理想动物模型。近年研究认为MS的发病机制兼有自身免疫性损伤和神经变性损伤两方面^[1]。多项研究表明,雌激素具有广泛的免疫调节作用和神经保护作用,

在多种自身免疫性疾病及神经变性疾病模型中具有重要作用。但目前关于雌激素与MS的研究报道较少。本实验通过制造EAE模型及雌激素干预,观察雌激素对EAE大鼠临床表现及病理改变的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及试剂

雄性Wistar大鼠30只,6~8周龄,体重(200

收稿日期:2014-04-11;修回日期:2014-07-23

作者简介:徐晓娅,主治医师,硕士研究生。

通讯作者:李作孝,教授,硕士生导师,主要从事神经免疫方面的研究。E-mail:lzx3235@sina.com。

~250 g);豚鼠5只,体重400~450 g,以上动物由泸州医学院实验动物科提供。主要实验试剂:氟氏完全佐剂,购自美国Sigma公司;苯甲酸雌二醇,购自上海通用药业股份有限公司。中性甲醛固定液由病理教研室提供。

1.2 方法

1.2.1 大鼠分组及EAE模型的建立^[2] 30只雄性大鼠随机分为EAE组,大剂量雌激素组,小剂量雌激素组,每组10只。将豚鼠处死后,在无菌操作下,迅速剥出脊髓,去掉马尾与脊膜,称重。加入生理盐水研磨成50%匀浆,与等量福氏完全佐剂混合,用注射器反复抽打成油包水乳液,即制得粗制碱性髓鞘蛋白(MBP)抗原。将MBP抗原注入3组大鼠双后肢足垫皮下,每只0.2 ml/100 g。

1.2.2 模型干预 EAE模型建立后常规饲养,于造模当天开始,小剂量雌激素组每日皮下注射苯甲酸雌二醇250 μg/kg/d,连续10 d。大剂量雌激素组每日皮下注射苯甲酸雌二醇1 mg/kg/d,连续10 d。EAE对照组每日注射橄榄油,连续10 d。

1.3 神经功能评分及评分标准

于建模后第1天开始(建模当天计为第1天),每日同一时段由同一人单盲观察发病情况,进行神经功能评分。0分:无明显异常;1分:后肢不全瘫痪;2分:后肢完全瘫痪;3分:后肢全瘫伴前肢不全瘫;4分:四肢全瘫或死亡。症状介于两条标准之间者以±0.5分计。造模到开始发病的时间为潜伏期,四肢瘫痪、死亡或连续3 d症状评分无加重时为高峰期,中间时间则为进展期。

1.4 脑和脊髓组织病理观察

脑和脊髓组织标本用中性甲醛固定后,在泸州医学院病理教研室作组织切片,常规脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋和切片(8 μm厚)。切片后烘干、脱蜡

和常规苏木素-伊红染色,光镜下观察病理改变。

1.5 统计学方法

所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间样本均数比较采用方差分析,两两比较采用LSD检验。计数资料采用Fisher's Exact Test检验。统计学处理由SPSS 16.0软件完成。

2 结果

2.1 发病情况

EAE发病动物表现为脱毛、食欲减退、体质量下降显著,出现不同程度的肢体无力、共济失调、瘫痪等,部分动物伴尿便失禁。雌激素治疗组发病率减低,潜伏期延长,进展期缩短,高峰期症状评分减低,以大剂量组变化更明显。见表1。

表1 各组临床表现比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	发病率(%)	潜伏期(d)	进展期(d)	高峰期症状评分(分)
EAE对照组	100	11.6 ± 2.5	7.2 ± 1.4	3.1 ± 1.1
雌激素小剂量组	80	17.5 ± 1.6	5.1 ± 0.6	1.5 ± 1.1
雌激素大剂量组	50 [▲]	24.2 ± 3.0 [*]	3.4 ± 0.8 [☆]	0.6 ± 0.7 [☆]

注:与EAE对照组比较,▲ $P < 0.05$,^{*} $P < 0.01$;与小剂量组比较,[☆] $P < 0.05$,^{*} $P < 0.01$ 。

2.2 病理学检查

EAE对照组大鼠发病高峰期可见组织疏松肿胀,脑及脊髓实质内小血管充血,血管周围主要是小静脉周围有大量炎性细胞浸润,主要为淋巴细胞及单核细胞,形成“袖套”状改变,血管周围白质明显脱髓鞘改变,少突胶质细胞变性。大、小剂量雌激素组脑及脊髓也可见淋巴细胞单核细胞等炎性细胞浸润,及不同程度的白质脱髓鞘改变,但较EAE对照组明显减轻,其中大剂量雌激素组病理改变最轻,部分未发病动物未见明显病理损害。见图1。

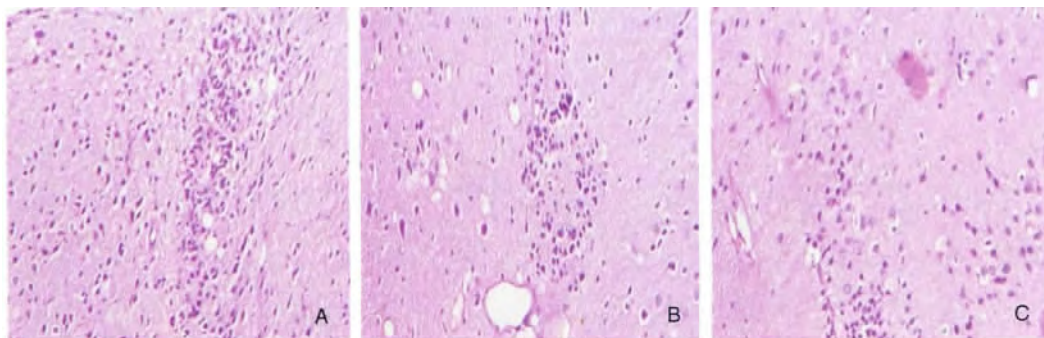


图1 病理学检查结果,HE × 400。A: EAE组;B: 小剂量雌激素组;C: 大剂量雌激素组。

3 讨论

目前 MS 的病因及发病机制尚不清楚,国内外研究均发现,MS 患者中存在多种抗体,支持 MS 系免疫相关的疾病^[3]。EAE 作为一种中枢神经系统变态反应性脱髓鞘病变模型,是世界公认的研究人类 MS 的动物模型。许多研究证实,EAE 是细胞免疫及体液免疫均参与的错综复杂的病理免疫过程,以细胞免疫为主^[4]。同时 MS 患者晚期多有明显智能损害,MRI 提示脑沟增宽、脑回变窄、脑室系统扩张等脑萎缩表现。近年国外研究发现,MS 病程中伴有灰质的萎缩,白质损害中也伴有华勒变性及轴突的减少,故目前认为,MS 的发病机制兼有自身免疫性损伤和神经变性损伤两方面^[1]。

研究表明,雌激素对中枢神经系统发挥着重要的调节和保护作用,这一观点得到广泛认可^[5]。雌激素可影响学习记忆和认知功能,降低老年性痴呆的发病率^[6],减轻脑损伤后脑细胞死亡的程度,提高脑损伤后的恢复能力。国外大量关于雌激素与 EAE/MS 的研究表明,EAE 大鼠的发病情况、症状严重程度与雌激素水平也有一定关系^[7]。针对 MS 患者的研究也表明,MS 患者中枢神经系统病灶处的雌激素水平明显增高^[8]。雌激素能够延迟 MS/EAE 的病程进展,降低复发率,减少活动病灶^[9],对 MS 具有明显的保护作用。此作用是通过与其受体结合实现的。体内多种细胞的细胞膜或细胞核上均有雌激素受体(estrogen receptor, ER)表达。ER 分为 ER α 和 ER β 两种。通过选择性雌激素受体配体实验研究显示^[10],在 MS 发病的初期及高峰期,雌激素主要通过 ER α 结合,通过免疫调节,抑制炎症反应而达到保护 EAE 的作用;而在疾病后期及缓解期,雌激素主要通过 ER β 结合,通过非抗炎效应,对疾病发挥重要的保护作用。但最近又有研究表明,雌激素对 EAE 大鼠的神经系统的保护作用以及抗炎作用是通过 ER α 而非 ER β 受体传导途径实现的^[11]。故雌激素对 MS/EAE 发挥保护作用的具体机制目前尚不清楚。

本实验为避免内源性雌激素干扰,故选用了雄性大鼠。研究结果提示,模型组大鼠经过一定潜伏期后均出现不同程度的 EAE 症状,提示造模成功,雌激素干预组部分动物发病,发病率与雌激素剂量呈反比。从雌激素对大鼠 EAE 模型发病的影响可以看出,雌激素具有降低 EAE 动物发病率、延长发病潜伏期、缩短病情的进展期、减轻神经功能的损

害、降低 EAE 死亡率的作用,其作用大小与雌激素剂量有关,高剂量作用更明显。

经神经组织病理切片检查证实 EAE 模型组脱髓鞘改变及炎性细胞浸润明显,符合 EAE 病理表现。雌激素各治疗组病理表现较 EAE 对照组减轻,以高剂量治疗组病理改变最轻。说明雌激素可减轻 EAE 大鼠的病理损害,作用与雌激素剂量有关。本实验病理切片未见明显轴突崩解、神经细胞数量减少等神经变性表现,可能与复制的系急性单相病程的 EAE 模型,病程比较短,在疾病高峰期就已经处死动物,尚未出现此类损害表现有关。有待我们进一步进行深入研究。

雌激素对 EAE 作用的深入研究,为防治 MS 提供了新方法。国外已有将雌激素用于治疗 MS 患者的研究报道^[1,12],并发现它能明显减少 MS 患者中枢神经系统内的病灶,同时还能改善 MS 所致的认知功能的损害。但目前,雌激素的临床应用还存在广泛争议,如雌激素能增加乳腺癌、子宫内膜癌、卵巢癌的发病率等。乳腺和子宫内膜等组织中主要表达的是 ER α ,故近年有研究尝试通过使用选择性 ER β 配体治疗达到保护 MS 的作用而避免其导致生殖系统肿瘤的副作用的发生^[1]。故将来有望通过使用雌激素或选择性的作用于雌激素的受体的药物来达到临床上治疗 MS 的目的。本实验仅观察研究了雌激素对 EAE 临床表现及病理变化的影响,进一步深入研究雌激素对 EAE 的作用机制将为雌激素的临床安全治疗提供重要依据。

参 考 文 献

- [1] Gold SM, Voskuhl RR. Estrogen and testosterone therapies in multiple sclerosis. *Prog Brain Res*, 2009, 175: 239-251.
- [2] 董梅,刘瑞春,郭力,等. Wistar 大鼠实验性变态反应性脑脊髓炎的模型建立. *脑与神经疾病杂志*, 2004, 12(6): 425-428.
- [3] 周昊,杨欢. 中枢神经系统自身免疫疾病相关抗体. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2013, 40(3): 289-293.
- [4] Buntinx M, Ameloot M, Steds P, et al. Interferon-gamma-induced calcium influx in T lymphocytes of multiple sclerosis and rheumatoid arthritis patient: a complementary mechanism for T cell activation. *J Neuroimmunol*, 2002, 124(1-2): 70-82.
- [5] Kipp M, Amor S, Krauth R, et al. Multiple sclerosis: neuroprotective alliance of estrogen-progesterone and gender.

- Front Neuroendocrinol, 2012, 33(1): 1-16.
- [6] Sarkaki A, Amani R, Badavi M, et al. Pre-treatment effect of different doses of soy isoflavones on spatial learning and memory in an ovariectomized animal model of Alzheimer's disease. Pak J Biol Sci, 2008, 11(8): 1114-1119.
- [7] Garay L, Gonzalez Deniselle MC, Geeman L, et al. Steroid protection in the experimental autoimmune encephalomyelitis model of multiple sclerosis. Neuroimmunomodulation, 2008, 15(1): 76-83.
- [8] Luchetti S, van Eden CG, Schuurman K, et al. Gender differences in multiple sclerosis: induction of estrogen signaling in male and progesterone signaling in female lesions. Neuropathol Exp Neurol, 2014, 73(2): 123-135.
- [9] Subramanian S, Matejuk A, Zamora A, et al. Oral feeding with ethinyl estradiol suppresses and treats experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL mice and inhibits the recruitment of inflammatory cells into the central nervous system. Immunology, 2003, 170(3): 1548-1555.
- [10] Tiwari-Woodruff S, Morales LB, Lee R, et al. Differential neuroprotective and antiinflammatory effects of estrogen receptor ER α and ER β ligand treatment. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(37): 14813-14818.
- [11] Spence RD, Wisdom AJ, Cao Y, et al. Estrogen mediates neuroprotection and anti-inflammatory effects during EAE through ER α signaling on astrocytes but not through ER β signaling on astrocytes or neurons. Neurosci, 2013, 33(26): 10924-10933.
- [12] Sicotte NL, Giesser BS, Tandon V, et al. Testosterone treatment in multiple sclerosis: a pilot study. Arch Neurol, 2007, 64(5): 683-688.

《国际神经病学神经外科学杂志》征稿、征订启事

《国际神经病学神经外科学杂志》创刊于1974年,由教育部主管,中南大学主办,中南大学湘雅医院承办。是目前国内唯一一本同时涵盖神经病学和神经外科学两个相联学科的专业学术期刊。本刊被收录为“中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊)”。

促进国内外学术的双向交流,为中国神经科学走向世界搭建新的平台。

我们热忱欢迎国内外神经科学工作者踊跃来稿,通过本刊介绍自己的研究成果和临床经验。对于论著、临床经验交流、疑难病例讨论、病例报道等类型的文章将优先发表。

《国际神经病学神经外科学杂志》刊号为CN 43-1456/R,ISSN 1673-2642,邮发代号42-11,全国公开发行。读者对象主要为国内外从事神经病学、神经外科专业及相关专业的医务人员。杂志为双月刊,每期定价13元,全年定价78元。欢迎各级医师到当地邮局订购。杂志社也可办理邮购。

为更好地筹集办刊资金,保证刊物的健康发展,本刊将竭诚为药品厂商、医疗器械厂商和广告公司提供优质服务,并长期向各级医疗单位征集协办单位,具体事宜请与本刊编辑部联系。

联系地址:湖南省长沙市湘雅路87号(中南大学湘雅医院内)《国际神经病学神经外科学杂志》编辑部,邮编:410008,电话/传真:0731-84327401,E-mail地址:jinn@vip.163.com,网址:http://www.jinn.org.cn/。