

百日咳毒素减轻实验性自身免疫性 脑脊髓炎小鼠模型炎症反应的机制研究

王进昆, 高峰, 谢姝姮, 陈雪菲, 王崇谦, 汤志伟

昆明医科大学第一附属医院神经外科, 云南省昆明市 650032

摘要: **目的** 探讨百日咳毒素 (PTx) 对实验性自身免疫性脑脊髓炎 (EAE) 小鼠模型的作用及机制。 **方法** 将 C57BL/6 小鼠随机分为正常对照组、EAE 组和 PTx 治疗组, 每组 12 只。EAE 组和 PTx 治疗组用 MOG 35-55 诱导 EAE 模型。PTx 组于建模后第 7 天给予腹腔注射 1000 ng 的 PTx。随后观察两组临床症状, 组织学染色评价炎症反应和脱髓鞘改变, 并观察 VEGF 和血管新生现象, 并用 Western blot 检测脊髓 VEGF 和 Collagen IV 的整体水平。在体外, 用 PTx 刺激原代培养的神经元, 评价 PTx 对在体外对神经元 VEGF 表达的影响。 **结果** PTx 能减轻 EAE 模型的炎症反应和脱髓鞘改变, 在大脑 PTx 将炎症评分从 (3.4 ± 0.55) 分降至 (1.2 ± 0.45) 分, $P < 0.01$; 脱髓鞘评分从 (3.6 ± 0.55) 分降至 (1.4 ± 0.55) 分, $P < 0.01$ 。在脊髓 PTx 将炎症评分从 (3.6 ± 0.55) 分降至 (1.0 ± 0.71) 分, $P < 0.01$; 脱髓鞘评分从 (4.2 ± 0.84) 分降至 (1.4 ± 0.55) 分, $P < 0.01$ 。Western blot 检测显示, 与正常对照组比较, EAE 组 VEGF 下降 49.0% ($P < 0.01$), Collagen IV 下降 36.0% ($P < 0.01$); PTx 治疗后, 与 EAE 组比较, VEGF 上升 59.5% ($P < 0.01$), Collagen IV 上升 45.0% ($P < 0.01$)。体外实验显示, PTx 治疗 24 h 后 VEGF 在神经元上的表达增加, 与正常对照相比, 100 ng/ml 组上调 34.6% ($P < 0.01$), 400 ng/ml 组上调 76.9% ($P < 0.01$)。 **结论** PTx 可上调神经元内源 VEGF 的表达和血管新生现象, 继而在 EAE 模型中起保护作用。

关键词: 百日咳毒素; 多发性硬化; 血管内皮生长因子; 神经元; 血管新生; 小鼠

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2016.02.004

Mechanism of action of pertussis toxin in alleviating inflammatory response in the mouse model of experimental autoimmune encephalomyelitis

WANG Jin-Kun, GAO Feng, XIE Shu-Heng, CHEN Xue-Fei, WANG Chong-Qian, TANG Zhi-Wei. Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032, China

Corresponding author: TANG Zhi-Wei, E-mail: tangzhiwei7755@hotmail.com

Abstract: **Objective** To investigate the role and mechanism of action of pertussis toxin (PTx) in the mouse model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). **Methods** C57BL/6 mice were randomly divided into normal control group, EAE group, and PTx treatment group, with 12 mice in each group. In the EAE group and PTx treatment group, EAE model was established using MOG 35-55, and the mice in the PTx treatment group were given 1000 ng intraperitoneally injected PTx at 7 days after modeling. The clinical symptoms were observed in these two groups. Histological staining was used to evaluate inflammatory response and changes in demyelination and observe vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiogenesis. Western blot was used to measure the levels of VEGF and collagen IV. PTx was used to stimulate primary cultured neurons in vitro to assess the in vitro effect of PTx on VEGF expression in neurons. **Results** PTx alleviated the inflammatory response and demyelination in EAE model, and in the brain, PTx treatment reduced the inflammation score from 3.4 ± 0.55 to 1.2 ± 0.45 ($P < 0.01$) and the demyelination score from 3.6 ± 0.55 to 1.4 ± 0.55 ($P < 0.01$). In the spinal cord, PTx treatment reduced the inflammation score from 3.6 ± 0.55 to 1.0 ± 0.71 ($P < 0.01$) and the demyelination score from 4.2 ± 0.84 to 1.4 ± 0.55 ($P < 0.01$). The results of Western blot showed that compared with the normal control group, the EAE group showed a 49.0% reduction in VEGF ($P < 0.01$) and a 36.0% reduction in Collagen IV ($P < 0.01$); compared with the EAE group, the PTx treatment group showed a 59.5% increase in

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81360204); 云南省卫生科技计划项目 (2014NS178)

收稿日期: 2016-03-05; **修回日期:** 2016-04-25

作者简介: 王进昆 (1960-), 男, 学士, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 主要从事脑血管病的研究。E-mail: 13708849879@163.com。

通讯作者: 汤志伟 (1980-), 男, 博士, 主治医师, 讲师, 硕士生导师, 主要从事脑血管病的研究。E-mail: tangzhiwei7755@hotmail.com。

VEGF ($P < 0.01$) and a 45.0% increase in collagen IV ($P < 0.01$). The in vitro experiment showed that at 24 hours after PTx treatment, the expression of VEGF in neurons was upregulated; compared with the normal control group, the 100 ng/ml group showed a 34.6% increase in the expression of VEGF, and the 400 ng/ml group showed a 76.9% increase. **Conclusions** PTx can upregulate endogenous VEGF in neurons and angiogenesis, and thus exerts a protective effect in EAE model.

Key words: pertussis toxin; multiple sclerosis; vascular endothelial growth factor; neuron; angiogenesis; mouse

多发性硬化 (multiple sclerosis, MS) 是一种发生于中枢神经系统的炎症性脱髓鞘疾病。实验性自身免疫性脑脊髓炎模型 (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) 是研究该疾病的基本模型。文献报道和我们的前期工作发现,大剂量百日咳毒素 (pertussis toxin, PTx) 可减轻 EAE 模型的临床症状^[1],但具体机制尚不完全清楚。

研究表明血管内皮细胞生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 及血管新生 (angiogenesis) 可能在 EAE 和 MS 的病理生理过程中发挥作用。有的报道提示,在 EAE 模型中 VEGF 和血管新生现象增加,而有的认为减少^[2-4, 17-19]。目前 VEGF 和血管新生在 EAE 发病机制中的作用依旧不清楚。Lu 等^[5]报道 PTx 可以在体外脑微血管内皮细胞系及体内诱导产生血管新生现象。此外,有证据表明,VEGF 具有神经保护作用,它能刺激神经元生长和存活^[6, 7]。为此,我们提出假设,PTx 能增加 VEGF 的表达进而诱导血管新生产生,同时这一作用对 EAE 有保护作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物和 EAE 模型诱导

将雌性的 C57BL/6 小鼠 (6 ~ 8 周, Taconic Laboratory, New York, USA) 随机分为 3 组:正常对照组、EAE 组和 PTx 治疗组,每组 12 只。

EAE 的诱导方法参考文献资料^[1],对 EAE 组和 PTx 治疗组的小鼠给予皮下注射 200 μ g 髓鞘少突胶质细胞糖蛋白 (myelin oligodendrocyte glycoprotein, MOG35-55; M-E-V-G-W-Y-R-S-P-F-S-R-V-V-H-L-Y-R-N-G-K, Bio-synthesis Inc. Lewisville, TX), MOG35-55 溶解于 50 μ l 完全弗氏佐剂乳胶剂,该乳胶剂含 0.5 mg 加热灭活的结核分枝杆菌 (CFA, Difco Laboratories, Detroit, MI)。在免疫诱导当天和和第 48 小时,分别腹腔注射 PTx 200 ng (List Biological laboratories Inc.)。在免疫诱导后第 7 天,给 PTx 治疗组小鼠再额外腹腔注射 1000 ng PTx。

1.2 神经功能检测

神经功能检测实验由实验观察者在双盲情况下给每只小鼠进行评价。采用 5 分法标准等级量表对

EAE 模型进行临床分级评分:0 分 = 无症状;1 分 = 尾巴瘫痪;2 分 = 单侧后肢无力;3 分 = 不完全双侧后肢瘫痪伴或不伴部分前肢无力;4 分 = 完全后肢瘫痪伴部分前肢无力;5 分 = 濒死状态或死亡^[1, 8]。对 3 组小鼠每天进行神经功能检测,并记录分值。

1.3 组织学检测

建模第 19 天,取小鼠脊髓和大脑。用 H&E 染色和 Luxol fast blue/periodic acid Schiff reagent (LFB/PAS) 分别来评价大脑和脊髓的炎症反应和脱髓鞘改变。免疫组织化学染色检测 VEGF 及 Collagen IV 的表达^[11]。

1.3.1 半定量系统评价大脑和脊髓的炎症反应和脱髓鞘改变

采用组织学打分半定量系统评价大脑和脊髓的炎症反应和脱髓鞘改变的程度。计数浸润渗透到脊髓及大脑的炎症细胞来评价炎症反应的程度。数码图片用 Axoplan 显微镜 (Zeiss, Thornwood, NY) 采集,明亮视野下放大 400 倍。在 H&E 染色中炎症细胞浸润渗透的严重程度根据下面的标准来打分^[9]:0 分 = 无炎症反应;1 分 = 炎症细胞仅渗透到血管及脑膜周围;2 分 = 炎症细胞轻度渗透到实质部分 (每个区域 1 ~ 10 个细胞);3 分 = 炎症细胞中度渗透到实质部分 (每个区域 11 ~ 100 个细胞);4 分 = 炎症细胞重度渗透到实质部分 (每个区域大于 100 个细胞)。

1.3.2 用 Luxol fast blue 染色法对脱髓鞘程度进行评价

用 Luxol fast blue 染色的方法对多聚甲醛固定过的脑和脊髓切片进行染色,并在双盲条件下根据量表对脱髓鞘程度进行评价^[10]:0 分 = 正常白质;1 分 = 轻度局部脱髓鞘;2 分 = 多个部位脱髓鞘;3 分 = 汇合成片的血管周围或软膜下脱髓鞘;4 分 = 大片的血管周围或软膜下脱髓鞘,包括半边脊髓或大脑实质内有炎症细胞浸润渗透;5 分 = 广泛的血管周围和软膜下脱髓鞘,包括脊髓或大脑实质内有炎症细胞浸润渗透。每只小鼠至少计数 6 个部位。

1.3.3 免疫组织化学的方法检测 VEGF 和 Collagen IV

免疫组织化学的方法检测 VEGF (NG1651636,

Millipore Corporation, Billerica, MA) 和 Collagen IV (ab19808, Abcam Inc., Cambridge, MA) 在各组小鼠脊髓和大脑的表达情况。用免疫荧光双染检测 VEGF 在神经元上的表达情况,用 NeuN (MAB377, Millipore Corporation, Billerica, MA) 抗体来标记神经元。实验设置阴性对照和阳性对照,以排除抗体及染色过程中造成的假阳性或假阴性。

1.4 Western blot 蛋白定量分析

建模第 19 天,收集脑和脊髓组织,使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒,进行蛋白浓度测定。取相同剂量蛋白进行 Western blot。电泳及转膜,分别加入一抗 VEGF 和 Collagen IV,4℃ 缓慢摇动孵育过夜。加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗 (7074, Cell signaling technology; Danvers, MA),室温下孵育 1 h 后显色。结果与内参 β -actin (sc-47778, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) 进行比较,结果以百分比的形式表示。

1.5 体外实验

培养原代神经元细胞:取新生第一天小鼠,无菌条件下,在显微镜下取脑,分离出双侧皮质,置于神经元培养基 (Invitrogen Corporation, CA) 中。将皮质组织剪碎, Papain 消化液 (Worthington, Biochemical, Lakewood), 37℃ 消化 20 min,持续震荡 (150 rpm)。加入 10% FBS 液 (Sigma, St. Louis, MO) 终止消化过程,70 μ m 过滤器过滤。将所得混合液离心 3 min,转速 1500 rpm,弃上清液。用含有 0.5% 左旋谷氨酸 (L-glutamine) 和 2% 无血清 B27 (Invitrogen Corporation, CA) 的神经元培养基,重新形成细胞悬液。将细胞植入到 Poly-D-lysine 预处理过的培养皿。放置于 37℃,5% CO₂ 的培养箱继续培养,每 3~4 d 更换一次培养基。

细胞培养的第 7 天,PTx 治疗组原代神经元细胞予 PTx 处理,干预浓度分别为 100 ng/ml 和 400 ng/ml。治疗 24 h 后,用 4% 多聚甲醛固定细胞。用 VEGF (NG1651636, Millipore Corporation, Billerica, MA) 和 Map2 (3-1103, Gainesville, FL) 抗体双标记 VEGF 和神经元,检测 VEGF 在神经元上的表达。用 VisionWorks® LS 图像获取和分析软件 (Image Acquisition and Analysis Software, UVP, LLC, CA) 测定并计算 VEGF 表达的平均密度,作为 VEGF 的表达量进行比较。

1.6 统计学分析及图片处理

数据的记录、处理、运算、作图和统计学分析应

用 Microsoft Excel 2007、SPSS13.0 软件进行处理。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 的形式表示,计数资料用卡方检验进行分析,均数用成组设计的两样本均数的配对 *t* 检验或非配对 *t* 检验, $P < 0.05$ 为有差异统计学意义。图像资料采用 Adobe Photoshop CS (Adobe, Inc.) 软件进行编辑和处理。

2 结果

2.1 PTx 治疗能减轻 EAE 模型的临床神经功能损伤、炎症反应和脱髓鞘改变

建立 EAE 模型后,小鼠在 12 d 左右开始出现临床症状,主要表现为肢体功能障碍,且逐渐加重。在第 19 天时,临床评分为 (3.83 ± 0.39) 分,而 PTx 治疗组的 EAE 小鼠基本没有临床症状 (图 1 A)。

组织学检测提示,在 EAE 组的脊髓和大脑,可见大量炎症细胞在血管周围和实质内浸润渗透,且脱髓鞘改变明显,而 PTx 治疗组炎症反应程度和脱髓鞘改变显著减轻 (图 1 B、图 1 C)。

在大脑 PTx 将炎症评分从 (3.4 ± 0.55) 分降至 (1.2 ± 0.45) 分, $P < 0.01$;脱髓鞘评分从 (3.6 ± 0.55) 分降至 (1.4 ± 0.55) 分, $P < 0.01$ 。在脊髓,也可看到相似的治疗效果,PTx 将炎症评分从 (3.6 ± 0.55) 分降至 (1.0 ± 0.71) 分, $P < 0.01$;脱髓鞘评分从 (4.2 ± 0.84) 分降至 (1.4 ± 0.55) 分, $P < 0.01$ (表 1)。

表 1 EAE 组和 PTx 治疗组的炎症评分和脱髓鞘评分比较 ($\bar{x} \pm s$)

	炎症 (H&E)		脱髓鞘 (Fast Blue)	
	大脑	脊髓	大脑	脊髓
EAE 组	3.4 ± 0.55	3.6 ± 0.55	3.6 ± 0.55	4.2 ± 0.84
PTx 治疗组	1.2 ± 0.45	1.4 ± 0.55	1.0 ± 0.71	1.4 ± 0.55
<i>P</i> 值	0.0001	0.0002	0.0002	0.0002

2.2 PTx 治疗可以增加 VEGF 表达和血管新生

在 EAE 组中,脊髓灰质和大脑皮质的 VEGF 和 Collagen IV 表达较正常对照组下降,而 PTx 治疗后,在这些区域 VEGF 和 Collagen IV 表达明显上调 (图 2 A、图 2 B)。尽管在 EAE 组的炎症细胞渗透和脱髓鞘部位,VEGF 的表达和血管新生现象增加。但 Western blot 检测结果显示,与正常对照组相比,VEGF 下降 49% ($P < 0.01$),Collagen IV 下降 36% ($P < 0.01$)。而 PTx 治疗后,与 EAE 组相比,VEGF 上升 59.5% ($P < 0.01$),Collagen IV 上升 45% ($P < 0.01$) (图 2 C)。

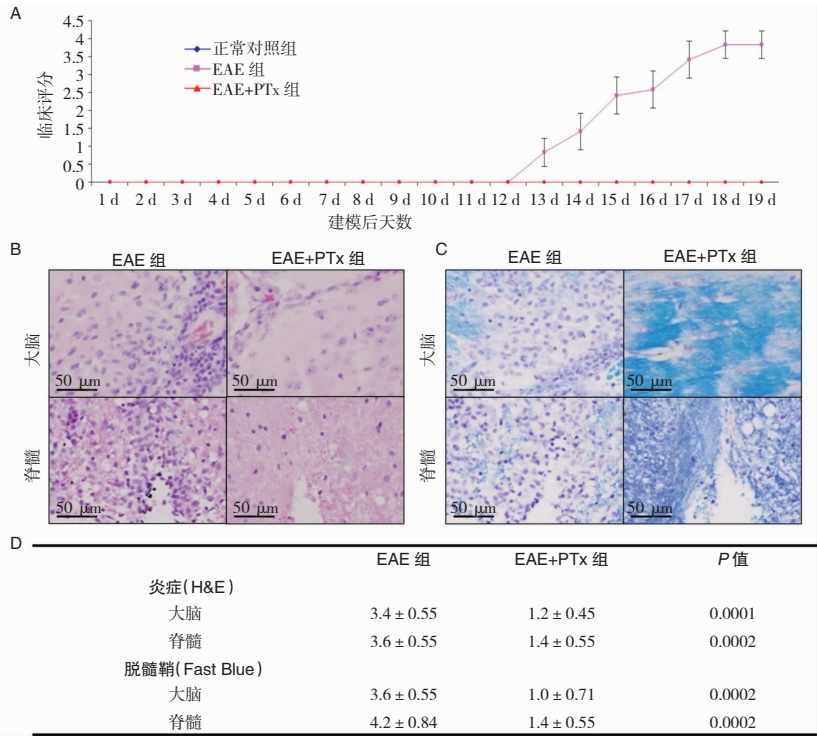


图 1 PTx 能减轻 EAE 模型的临床症状,炎症和脱髓鞘反应。A:采用 MOG 35-55 诱导 EAE 模型后,小鼠表现出明显的运动功能障碍,而 PTx 治疗后可明显缓解这种症状($n = 12$)。B:H&E 染色显示诱导 EAE 模型后大量炎症细胞浸润,而 PTx 治疗可减轻炎症细胞浸润($n = 5, \times 400$)。C:Luxol 快速蓝染色提示诱导 EAE 模型后,出现明显的脱髓鞘改变,而 PTx 治疗可缓解脱髓鞘改变($n = 5, \times 400$)。

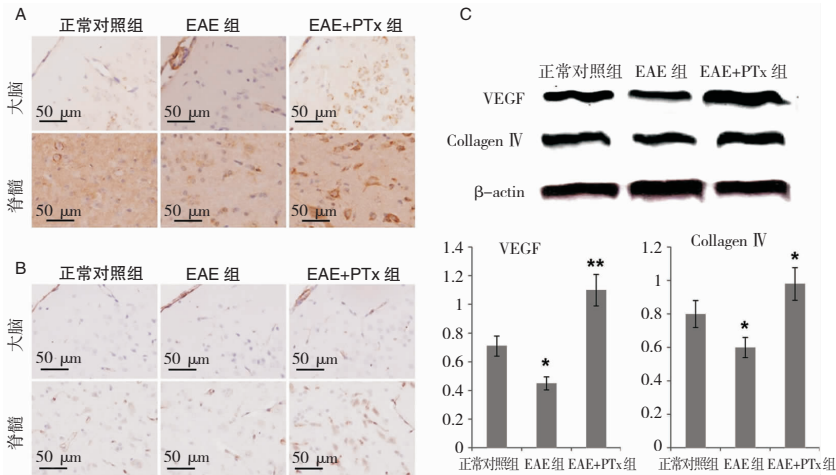


图 2 PTx 能 EAE 模型的 VEGF 表达和血管新生。A:PTx 可增加 EAE 模型的 VEGF 表达($n = 5, \times 400$)。B:Collagen IV 抗体染色提示 PTx 可增加 EAE 模型的血管新生($n = 5, \times 400$)。C:Western blot 显示 EAE 模型的 VEGF 和 Collagen IV 的表达下降($n = 4$; * 与正常对照组比较, $P < 0.05$),而 PTx 可增加 EAE 模型的 VEGF 和 Collagen IV 的表达($n = 4$; * 与 EAE 组比较, $P < 0.05$; ** 与 EAE 组比较, $P < 0.01$)。

2.3 PTx 治疗可以增加神经元 VEGF 表达并减少神经元凋亡

采用 VEGF 和 NeuN 抗体双染,来检测神经元 VEGF 的表达情况。结果显示,诱导 EAE 后,VEGF 阳性的神经元细胞较正常对照组有所减少,但差异

无统计学意义。而 PTx 治疗后,将脊髓灰质区的 VEGF 和 NeuN 双阳性细胞从 64 ± 11 个/ mm^2 上调到 188 ± 25 个/ mm^2 ($P < 0.01$),在大脑则从 87 ± 15 个/ mm^2 上调到 408 ± 67 个/ mm^2 ($P < 0.01$) (图 3 A、图 3B)。采用 Caspase3 和 NeuN 抗体双染来检测

神经元的凋亡情况,结果显示,正常组 Caspase3 和 NeuN 双阳性细胞数为 5 ± 5 个/ mm^2 ,EAE 组为 70 ± 10 个/ mm^2 ,PTx 治疗组为 21 ± 5 个/ mm^2 ,与 EAE 组相比差异具有统计学意义($P < 0.01$)(图 3 C、图 3D)。

2.4 体外实验显示 PTx 增加 VEGF 在神经元上的表达

为了进一步观察 PTx 能否在体外增加神经元

上 VEGF 的表达,我们培养了原代神经元细胞。在细胞培养的第 7 天,用 100 ng/ml 和 400 ng/ml 两个浓度级别的 PTx 刺激神经元。结果显示,PTx 治疗 24 h 后 VEGF 在神经元上的表达增加,与正常对照组相比较,100 ng/ml 组上调 34.6% ($P < 0.01$),400 ng/ml 组上调 76.9% ($P < 0.01$)(图 4)。

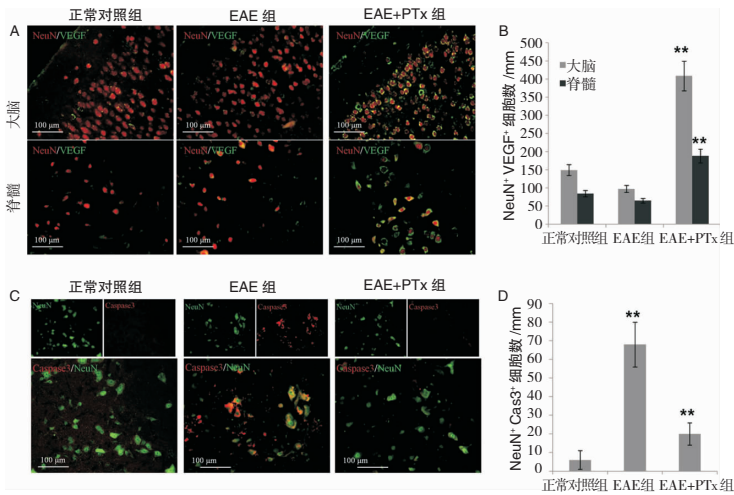


图 3 PTx 能上调 EAE 模型的神经元 VEGF 的表达和减少神经元的凋亡。A 和 B:VEGF 和 NeuN 抗体双染提示 PTx 可增加 EAE 模型神经元 VEGF 的表达($n = 5, \times 200$),半定量分析显示在大脑和脊髓,PTx 治疗后,表达 VEGF 神经元的数量增加($n = 5; **$ 与 EAE 组比较, $P < 0.01$)。C 和 D:Caspase3 和 NeuN 抗体双染提示 PTx 可减少 EAE 模型神经元的凋亡($n = 5, \times 200$),半定量分析显示,诱导 EAE 模型后神经元凋亡增加($n = 5; **$ 与正常对照组比较, $P < 0.01$),而 PTx 治疗可减少神经元的凋亡($n = 5; **$ 与 EAE 组比较, $P < 0.01$)。

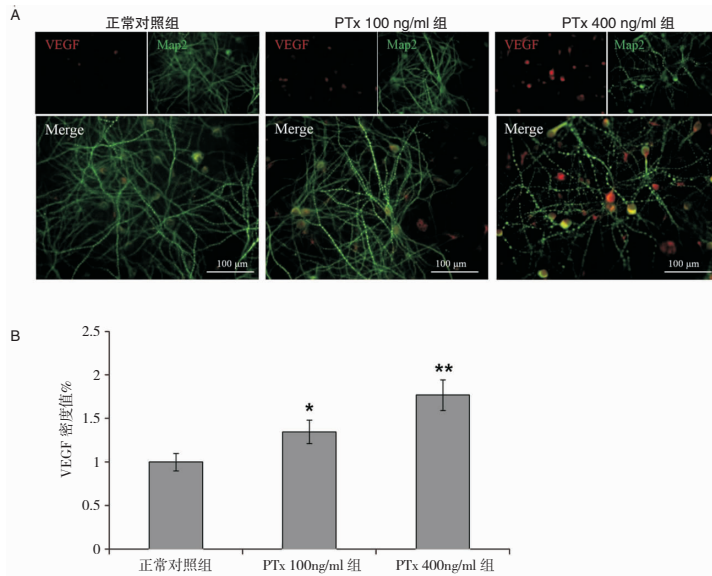


图 4 PTx 在体外能增加神经元 VEGF 的表达。A:VEGF 和 MAP2 抗体双染原代培养神经元细胞($\times 200$)。B:半定量分析显示 PTx 可增加体外神经元 VEGF 的表达,且和浓度成正相关($n = 10; *$ 与正常对照组比较, $P < 0.05; **$ 与 PTx100 ng/ml 组比较, $P < 0.05$)。

3 讨论

早期的研究显示,当用小鼠脊髓匀浆组织溶于完全弗氏佐剂中来诱导 EAE 模型时,PTx 可以增加模型的成功率和加重神经功能损伤症状^[12]。后来的研究显示 PTx 能破坏血脑屏障,防止自身反应 T 细胞抗原产生,刺激抗原呈递细胞(APCs),不可逆地抑制第二信使和影响信号通路^[13-15]。所有的这些结果都在解释 PTx 帮助诱导 EAE 模型的可能机制。最近,我们和其他研究者的结果显示,PTx 对 EAE 有治疗作用,无论是单次大剂量还是反复多次小剂量给药都有治疗和保护作用^[1, 16]。尽管这些发现是全新的并能引起人们兴趣的,但其中的机制尚不清楚。

我们的研究发现,诱导小鼠 EAE 模型后,在小鼠脊髓和大脑的白质区域发生严重的炎症反应和脱髓鞘改变,但 PTx 腹腔注射治疗可显著减轻白质区域的炎症反应和脱髓鞘改变。我们发现在 EAE 模型中,VEGF 和血管新生现象是下降的,而 PTx 治疗能逆转这种现象,并显著升高脊髓和大脑灰质区域的 VEGF 和血管新生现象,且能减轻神经元的凋亡。在体外实验中,我们发现,PTx 能增加原代神经元 VEGF 的表达,并和剂量呈正相关。据此,我们认为 VEGF 和血管新生现象在 EAE 模型中起保护作用,是 PTx 在 EAE 模型中起保护作用的机制之一。

VEGF 和血管新生现象在 EAE 模型中的变化报道结果不一致,有的报道提示,VEGF 和血管新生现象增加,而有的认为减少^[2-4, 17-19]。究其原因,一方面是检测的时间点和检测方法不同^[18];另一方面,是由于检测局部还是整体造成的。Tham 等^[17]和 Proescholdt 等^[4]都用豚鼠的 MBP 肽在 Lewis 大鼠中诱导 EAE 模型,Tham 等的结果显示在脊髓灰质和腰段脊髓匀浆组织中 VEGF 的表达是下降的,而 Proescholdt 等发现 VEGF 在 EAE 炎症部位(白质)是增加的。谭书伟等^[30]报道,多发性硬化的患者较正常人更易患者缺血性脑血管病,提示在多发性硬化患者中枢系统血管新生现象减少可能。我们的结果显示 VEGF 和血管新生现象在 EAE 病变部位(白质)是增加的,但这种增加是局部的,与炎症反应相关的,并没有改变 VEGF 和血管新生现象在 EAE 模型中总体的降低。

Lu 等^[5]研究结果显示,在体外 PTx 能诱导大脑微血管内皮细胞血管新生现象,在体内也能诱导血

管新生现象。有报道显示,PTx 能诱导内皮细胞产生一氧化氮(NO)^[20]。而 NO 有助于血管新生现象的产生^[21]。我们的研究结果显示,当 PTx 治疗后,EAE 模型临床症状和炎症反应都明显减轻,组织学检测显示在脊髓和大脑的灰质区,VEGF 和血管新生现象都增加,且匀浆组织检测总体水平也增加。提示上调 VEGF 和血管新生现象是 PTx 保护 EAE 模型的机制之一。

研究显示 VEGF 具有神经保护作用并能刺激神经元生长和增加存活能力^[6, 7, 22]。在运动系统疾病中,神经元的退变与神经元内源性的 VEGF 表达下调是相关的,如肌萎缩侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)和 Kennedy 疾病^[23-27]。已有报道显示,用基因修饰的方法使 VEGF 的表达下调会导致运动神经元退行性改变^[24, 25]。有意思的是,Smith 等^[28]报道在 EAE 模型的脊髓中,不仅仅是髓质还包括神经元都是淋巴细胞攻击的目标,并随之退行性改变。已有证据表明,在 EAE 模型中,神经元细胞减少^[28, 29]。我们发现 PTx 治疗显著的上调神经元上 VEGF 的表达,并且 PTx 治疗能防止 EAE 模型中炎症反应和脱髓鞘改变的发生。这些结果提示,上调神经元的 VEGF 表达在 EAE 模型中起神经保护作用。

总的来讲,我们的研究结果发现 PTx 治疗可上调神经元内源性 VEGF 表达和血管再生现象,能减轻 EAE 模型的炎症反应和脱髓鞘改变,以及减少神经元凋亡,在 EAE 模型中起保护作用。

参 考 文 献

- [1] Yin JX, Tu JL, Lin HJ, et al. Centrally administered pertussis toxin inhibits microglia migration to the spinal cord and prevents dissemination of disease in an EAE mouse model. *PLoS One*, 2010, 5: e12400.
- [2] Kirk SL, Karlik SJ. VEGF and vascular changes in chronic neuroinflammation. *J Autoimmun*, 2003, 21: 353-363.
- [3] Roscoe WA, Welsh ME, Carter DE, et al. VEGF and angiogenesis in acute and chronic MOG ((35-55)) peptide induced EAE. *J Neuroimmunol*, 2009, 209: 6-15.
- [4] Proescholdt MA, Jacobson S, Tresser N, et al. Vascular endothelial growth factor is expressed in multiple sclerosis plaques and can induce inflammatory lesions in experimental allergic encephalomyelitis rats. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2002, 61: 914-925.
- [5] Lu C, Pelech S, Zhang H, et al. Pertussis toxin induces angiogenesis in brain microvascular endothelial cells. *J Neu-*

- roschi Res, 2008, 86: 2624-2640.
- [6] Rosenstein JM, Krum JM. New roles for VEGF in nervous tissue—beyond blood vessels. *Exp Neurol*, 2004, 187: 246-253.
 - [7] Storkebaum E, Lambrechts D, Carmeliet P. VEGF: once regarded as a specific angiogenic factor, now implicated in neuroprotection. *Bioessays*, 2004, 26: 943-954.
 - [8] Tonra JR, Reiseter BS, Kolbeck R, et al. Comparison of the timing of acute blood-brain barrier breakdown to rabbit immunoglobulin G in the cerebellum and spinal cord of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Comp Neurol*, 2001, 430: 131-144.
 - [9] Okuda Y, Sakoda S, Fujimura H, et al. IL-6 plays a crucial role in the induction phase of myelin oligodendrocyte glycoprotein 35-55 induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*, 1999, 101: 188-196.
 - [10] Kuerten S, Kostova-Bales DA, Frenzel LP, et al. MP4- and MOG: 35-55-induced EAE in C57BL/6 mice differentially targets brain, spinal cord and cerebellum. *J Neuroimmunol*, 2007, 189: 31-40.
 - [11] Sternberger LA, Sternberger NH. The unlabeled antibody method: comparison of peroxidase-antiperoxidase with avidin-biotin complex by a new method of quantification. *J Histochem Cytochem*, 1986, 34: 599-605.
 - [12] Linthicum DS, Frelinger JA. Acute autoimmune encephalomyelitis in mice. II. Susceptibility is controlled by the combination of H-2 and histamine sensitization genes. *J Exp Med*, 1982, 156: 31-40.
 - [13] Kamradt T, Soloway PD, Perkins DL, et al. Pertussis toxin prevents the induction of peripheral T cell anergy and enhances the T cell response to an encephalitogenic peptide of myelin basic protein. *J Immunol*, 1991, 147: 3296-3302.
 - [14] Black WJ, Munoz JJ, Peacock MG, et al. ADP-ribosyltransferase activity of pertussis toxin and immunomodulation by Bordetella pertussis. *Science*, 1988, 240: 656-659.
 - [15] Shive CL, Hofstetter H, Arredondo L, et al. The enhanced antigen-specific production of cytokines induced by pertussis toxin is due to clonal expansion of T cells and not to altered effector functions of long-term memory cells. *Eur J Immunol*, 2000, 30: 2422-2431.
 - [16] Weber MS, Benkhoucha M, Lehmann-Horn K, et al. Repetitive pertussis toxin promotes development of regulatory T cells and prevents central nervous system autoimmune disease. *PLoS One*, 2010, 5: e16009.
 - [17] Tham E, Gielen AW, Khademi M, et al. Decreased expression of VEGF-A in rat experimental autoimmune encephalomyelitis and in cerebrospinal fluid mononuclear cells from patients with multiple sclerosis. *Scand J Immunol*, 2006, 64: 609-622.
 - [18] Seabrook TJ, Littlewood-Evans A, Brinkmann V, et al. Angiogenesis is present in experimental autoimmune encephalomyelitis and pro-angiogenic factors are increased in multiple sclerosis lesions. *J Neuroinflammation*, 2010, 7: 95.
 - [19] Holley JE, Newcombe J, Whatmore JL, et al. Increased blood vessel density and endothelial cell proliferation in multiple sclerosis cerebral white matter. *Neurosci Lett*, 2010, 470: 65-70.
 - [20] Zharikov SI, Krotova KY, Belayev L, et al. Pertussis toxin activates L-arginine uptake in pulmonary endothelial cells through downregulation of PKC- α activity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004, 286: L974-L983.
 - [21] Ziche M, Morbidelli L. Nitric oxide and angiogenesis. *J Neurooncol*, 2000, 50: 139-148.
 - [22] Ma Y, Qu Y, Fei Z. Vascular endothelial growth factor in cerebral ischemia. *J Neurosci Res*, 2011, 89: 969-978.
 - [23] Azzouz M, Ralph GS, Storkebaum E, et al. VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS model. *Nature*, 2004, 429: 413-417.
 - [24] Oosthuyse B, Moons L, Storkebaum E, et al. Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat Genet*, 2001, 28: 131-138.
 - [25] Sopher BL, Thomas PS, Jr LaFevre-Bernt MA, et al. Androgen receptor YAC transgenic mice recapitulate SBMA motor neuronopathy and implicate VEGF164 in the motor neuron degeneration. *Neuron*, 2004, 41: 687-699.
 - [26] Storkebaum E, Lambrechts D, Dewerchin M, et al. Treatment of motoneuron degeneration by intracerebroventricular delivery of VEGF in a rat model of ALS. *Nat Neurosci*, 2005, 8: 85-92.
 - [27] Wang Y, Mao XO, Xie L, et al. Vascular endothelial growth factor overexpression delays neurodegeneration and prolongs survival in amyotrophic lateral sclerosis mice. *J Neurosci*, 2007, 27: 304-307.
 - [28] Smith T, Groom A, Zhu B, et al. Autoimmune encephalomyelitis ameliorated by AMPA antagonists. *Nat Med*, 2000, 6: 62-66.
 - [29] Meyer R, Weissert R, Diem R, et al. Acute neuronal apoptosis in a rat model of multiple sclerosis. *J Neurosci*, 2001, 21: 6214-6220.
 - [30] 谭书伟, 罗家明, 余巨明. 多发性硬化与缺血性脑血管病关系的研究进展. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2014, 41(2): 145-148.