

黏附分子 CD44 在实验性自身免疫性脑脊髓炎中的作用

徐晓娅¹, 郭晓聪², 邱涛¹, 黄琳明¹, 李作孝³

1. 四川省自贡市第一人民医院神经内科, 四川省自贡市 643000

2. 四川省自贡市第一人民医院检验科, 四川省自贡市 643000

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 探讨黏附分子 CD44 在实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)发病中的作用。方法 将 20 只大鼠随机分为正常对照组及 EAE 组, EAE 组采用粗制髓鞘碱性蛋白(MBP)抗原注入大鼠后足掌皮下(0.2 ml/100 g)制作 EAE 模型, 观察大鼠的发病情况及病理表现; 并采用免疫组织化学法检测两组大鼠脑组织 CD44 的含量。结果 正常对照组大鼠未发病, EAE 组大鼠均有不同程度的发病。HE 染色后, 光镜下观察, 正常对照组大鼠脑和脊髓无异常; EAE 组大鼠可见脑及脊髓实质内小血管充血, 小静脉周围有大量炎性细胞浸润, 血管周围白质脱髓鞘改变。免疫组化显示, 正常对照组大鼠脑和脊髓组织未发现 CD44 阳性细胞; EAE 组大鼠中枢神经系统(CNS)白质及灰白质交界处可见大量 CD44 阳性细胞。结论 EAE 模型中存在黏附分子 CD44 的高表达, 其对 EAE 的发病可能起到促进作用。

关键词: 多发性硬化; CD44; 实验性自身免疫性脑脊髓炎

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2019.04.007

Role of the adhesion molecule CD44 in experimental autoimmune encephalomyelitis

XU Xiao-Ya, GUO Xiao-Cong, QIU Tao, HUANG Lin-Ming, LI Zuo-Xiao. 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 role of the adhesion molecule CD44 in the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). **Methods** A total of 20 rats were randomly divided into EAE group and control group. Crude myelin basic protein (MBP) antigen (0.2 mL/100 g) was subcutaneously injected into the hind foot of the rats in the EAE group to establish an EAE model, and then disease onset and pathological manifestations were observed. Immunohistochemistry was used to measure the content of CD44 in brain tissue for both groups. **Results** Disease onset was not observed in the control group, while this was observed in the EAE group with varying degrees. Observation under a light microscope after HE staining showed no abnormalities in the brain and spine of the rats in the control group, while congestion of small blood vessels, inflammatory cell infiltration around small veins, and demyelination in white matter were observed in the EAE group. Immunohistochemistry showed that no CD44-positive cells were found in the brain and spinal tissues of the rats in the control group, while a large number of CD44-positive cells were observed at the junction of grey matter and white matter in the central nervous system. **Conclusions** There is high expression of the adhesion molecule CD44 in the rat model of EAE, which may promote the onset of EAE.

Key words: multiple sclerosis; CD44; experimental autoimmune encephalomyelitis; rat

多发性硬化(multiple sclerosis, MS)被广泛认为是一累及中枢神经系统(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。CD44 是一种黏附性糖蛋白, 主要参与细胞-

收稿日期: 2018-12-12; 修回日期: 2019-07-24

作者简介: 徐晓娅(1982-), 女, 副主任医师, 硕士研究生, 主要研究方向: 神经免疫。

通信作者: 李作孝(1964-), 男, 教授, 硕士生导师, 主要研究方向: 神经免疫。E-mail: lzx3235@sina.com。

细胞、细胞-基质之间的黏附。目前可见很多自身免疫性疾病中 CD44 表达增加的报道,如系统性红斑狼疮、银屑病、IgA 肾病、溃疡性结肠炎、特发性血小板减少性紫癜等^[1-5]。研究表明^[6],在 MS 患者中骨桥蛋白(osteopontin, OPN)表达增高,其主要与 CD44 结合,促进 IL-1、IL-2、IL-12 等的表达,抑制 IL-4 的表达,从而使免疫格局向 Th1 偏移,促进 MS 的发生发展,可见 OPN 是 CD44 表达的主要调控者。目前关于 CD44 分子在 EAE 中表达情况的研究报道较少。本实验通过制造 EAE 模型,测定正常对照组及 EAE 组大鼠脑和脊髓组织中 CD44 的含量,观察黏附分子 CD44 在 EAE 中的表达情况及初步探讨在其发病中的可能作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及试剂

雄性 Wister 大鼠 20 只,6~8 周龄,体重 200~250 g;豚鼠 4 只,体重 400~450 g,以上动物由西南医科大学实验动物科提供。主要实验试剂:氟氏完全佐剂(购自美国 Sigma 公司);兔抗大鼠 CD44 单克隆抗体(购自北京博奥森生物技术有限公司);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 20 只雄性大鼠随机分为正常对照组和 EAE 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(myelin basic protein, MBP)抗原。将 MBP 抗原注入 EAE 组大鼠双后肢足垫皮下,每只 0.2 ml/100 g。

1.2.2 神经功能评分及评分标准^[7] 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:后肢不完全瘫痪;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。

1.2.3 试验终止 EAE 组连续 3 d 症状评分无加重或四肢瘫痪、死亡作为 EAE 发病高峰期,在高峰期处死大鼠;正常对照组 4 周后处死。

1.2.4 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。

1.2.5 CD44 的测定 采用免疫组织化学法检测脑和脊髓组织 CD44 的表达;操作严格按 SP 试剂盒提供的说明书进行。

1.2.6 结果判断 免疫组化结果用美国 Nikon Spot 图像采集系统进行图像采集,用 Image-Pro Plus Version 5.1 图像分析系统分析。包浆呈棕黄色至深棕黄色为 CD44 阳性染色细胞。每张大鼠脑组织切片于光镜下($\times 400$)观察 10 个视野,计算 CD44 平均光密度(A)值。

1.3 统计学方法

统计学处理由 SPSS 16.0 软件完成。所得数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,变量间相互关系采用 Pearson 直线相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 发病情况

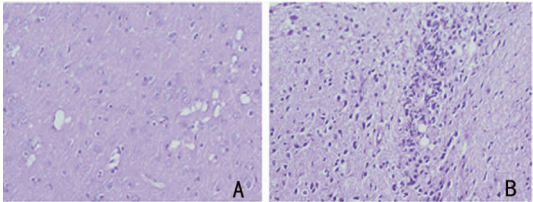
正常对照组大鼠未发病。EAE 对照组均有不同程度的发病,发病率 100%。发病动物表现为脱毛、食欲减退、体重下降显著,出现不同程度的肢体无力、共济失调、瘫痪等,部分动物伴尿便失禁。EAE 组发病潜伏期为(11.6 ± 2.5) d,进展期为(7.2 ± 1.4) d,高峰期症状评分为(3.1 ± 1.1) 分。

2.2 病理学检查

将大鼠的脑和脊髓切片经 HE 染色后,在光镜下观察显示:正常对照组大鼠脑和脊髓未见异常。EAE 对照组大鼠发病高峰期可见脑及脊髓实质内小血管充血,脑组织疏松肿胀,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,典型者形成“袖套”状改变,血管周围白质片状脱髓鞘改变。见图 1A、图 1B。

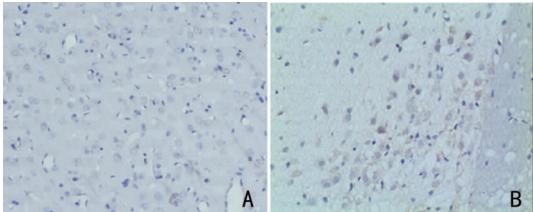
2.3 CD44 表达情况

正常对照组大鼠 CNS 内未发现 CD44 阳性细胞。EAE 对照组大鼠 CNS 白质及灰白质交界处可见大量 CD44 阳性细胞,主要分布在神经细胞胞浆,部分间质细胞亦有表达,呈棕黄色颗粒,染色深。CD44 高表达部位的炎症表现较重。图像分析结果显示, EAE 组 CD44 平均光密度值为 0.28 ± 0.006 。见图 2A、图 2B。



注：A：正常对照组；B：EAE 组

图 1 切片经 HE 染色后，光镜下所见（HE × 400）



注：A：正常对照组；B：EAE 组

图 2 两组脑组织中 CD44 表达的情况（× 400）

2.4 EAE 组 CD44 表达与发病潜伏期、进展期及高峰期神经功能障碍评分相关分析

结果显示：EAE 组发病高峰期 CD44 表达与发病潜伏期呈负相关 ($P < 0.01$)；与进展期呈正相关 ($P < 0.01$)；与发病高峰期神经功能障碍评分呈正相关 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 EAE 组 CD44 表达与潜伏期、进展期及神经功能障碍评分相关性

项目	R	P
潜伏期	-0.889	<0.01
进展期	0.797	<0.01
神经功能障碍评分	0.772	<0.01

3 讨论

EAE 作为一种中枢神经系统自身免疫性脱髓鞘病变模型，是世界公认的研究人类 MS 的动物模型。较多研究证实，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^[8]；自身免疫性 T 细胞从外周迁移 CNS 可以破坏生理性免疫豁免^[9]。CD44 分子是细胞表面跨膜蛋白多糖的一个家族，广泛表达于多种细胞上，包括 B 淋巴细胞、T 淋巴细胞、单核巨噬细胞、内皮细胞及成纤维细胞等，主要参与细胞 - 细胞、细胞 - 基质之间的黏附。CD44 分子的配体为细胞外基质，主要有透明质酸、层粘连蛋白、纤粘连蛋白和胶原蛋白等多种配体。T 细胞上的 CD44 与其配体结合可促进 T 细胞的黏附，诱导 IL-2 产生，增加 T 细胞的活性；而单核

细胞的 CD44 与配体结合则使 IL-1 释放增多，促进单核细胞的聚集，从而促进免疫反应。

目前可见多种自身免疫性疾病（如银屑病、系统性红斑狼疮等）CD44 表达增加的报道。近年来国外已开始有关 CD44 在 EAE 中的研究。Kim 等^[10]经过对 EAE 大鼠脊髓进行研究发现，CD44 在星形胶质细胞及炎性细胞中表达明显增加，促进 EAE 的发生发展。Garin 等^[11]通过向 EAE 大鼠体内接种 CD44 的干扰基因，抑制 CD44 的表达，发现 EAE 的严重程度明显减轻，其病理结果提示中枢神经系统损害明显减轻，浸润细胞凋亡增加。以上研究提示黏附分子 CD44 有促进 EAE 发生发展的作用。但目前 CD44 分子对 EAE 的作用机制尚不明确。Clemente 等^[12]研究发现，骨桥蛋白在 EAE 的复发中有重要的作用，其分子 C 端与黏附分子 CD44 结合，可下调 IL-10 的表达，抑制淋巴细胞的凋亡，故 CD44 分子有可能通过骨桥蛋白通路促进 EAE 复发。Chang 等^[13]研究表明，CD44、透明质酸及多功能蛋白聚糖等分子可能被白质的星型胶质细胞上调，这些分子形成络合物，抑制少突胶质细胞的成熟和髓鞘的再生，提示 CD44 可能通过皮层髓鞘再生减少而促进 EAE 发病。Chitrala 等^[14]通过将 CD44 基因敲除的老鼠的排泄物移入 CD44 野生型的 EAE 大鼠发现，EAE 症状的明显减轻；经对肠道菌群高通量细菌 16 S rRNA 基因测序，EAE CD44 基因敲除大鼠与 CD44 野生型 EAE 大鼠比较，显示出显著的多样性、丰富性和均匀性；故其研究结论认为 CD44 基因缺失的小鼠，可能通过改变肠道微生物群和不饱和短链脂肪酸而导致 EAE 的缓解，此研究为 CD44 在 EAE 中的作用机制提出了全新的观点。Winkler 等^[15]研究指出，中枢神经系统血管内皮细胞淋巴细胞溢出是炎性脱髓鞘疾病（包括 MS 及 EAE）的关键步骤。葡糖胺聚糖透明质酸（glycosaminoglycan hyaluronan，HA）与其受体脑血管内皮细胞上的 CD44 分子结合，对于激活 T 细胞进入中枢神经系统至关重要，这也为 CNS 炎性脱髓鞘的机制提供了新的见解。上述研究均表明，CD44 分子可能通过多种机制在 EAE 的发病中起着促进作用。

但同时，也有研究得出了相反的结论。Flynn 等^[16]通过研究却发现，CD44 缺乏的 EAE 小鼠与野生型比较，其临床症状更重、中枢神经系统的免疫细胞数量及细胞因子含量更多，其研究结论认为

CD44 分子可能通过作用于细胞因子的产生、T 细胞的分化、T 细胞内皮细胞的相互作用、以及血脑屏障的完整性而发挥对 EAE 的保护作用。故目前 CD44 在 EAE 中的作用尚无一致定论。

本研究结果提示, EAE 组大鼠经过一定潜伏期后均出现不同程度的 EAE 症状, 且其神经组织病理切片检查证实存在脱髓鞘改变及炎性细胞浸润, 符合 EAE 病理表现, 提示造模成功; 采用免疫组化技术对正常对照组、EAE 组大鼠脑和脊髓白质组织表达 CD44 的阳性细胞进行了检测, 结果显示正常对照组大鼠脑和脊髓白质组织未发现 CD44 表达的阳性细胞, EAE 对照组大鼠脑和脊髓白质组织可见大量 CD44 表达的阳性细胞, 主要分布在大脑、脑干、脊髓白质及灰白质交界的小血管周围。相关性分析显示, EAE 对照组大鼠发病高峰期 CD44 表达量与 EAE 发病的潜伏期呈负相关, 与进展期和高峰期神经功能障碍评分呈正相关。提示 EAE 大鼠中枢神经系统存在 CD44 分子的过度表达, 且表达程度与 EAE 大鼠发生、发展及病情程度密切相关; 此研究结果与之前大多数研究(认为 CD44 对 EAE 具有发病具有促进作用)相一致。但本研究只是对 CD44 在 EAE 中的表达情况进行了初步探索, 尚未对其机制进行深入研究。总的来说, 目前 CD44 在 EAE 中的作用尚无定论, 且其机制尚不清楚, 值得深入探讨。

参 考 文 献

- [1] Yoo SA, Leng L, Kim BJ, et al. MIF allele-dependent regulation of the MIF coreceptor CD44 and role in rheumatoid arthritis [J]. *Proc Natl Acad Sci U. S. A*, 2016, 113(49): E7917-E7926.
- [2] Lindqvist U, Phil-Lundin I, Engström-Lorent A. Dermal distribution of hyaluronan in psoriatic arthritis; coexistence of CD44, MMP3 and MMP9 [J]. *Acta Derm Venereol*, 2012, 92(4): 372-377.
- [3] Kim S, Kim YH, Choi KH, et al. Glomerular epithelial CD44 expression and segmental sclerosis in IgA nephropathy [J]. *Clin Exp Nephrol*, 2016, 20(6): 871-877.
- [4] Abdelazeem MA, El-Sayed M. The pattern of CD44 and matrix metalloproteinase 9 expression is a useful predictor of ulcerative colitis-associated dysplasia and neoplasia [J]. *Ann Diagn Pathol*, 2015, 19(6): 369-374.
- [5] Crow AR, Amash A, Lazarus AH, et al. CD44 antibody-mediated amelioration of murine immune thrombocytopenia (ITP): mouse background determines the effect of FcγRIIb genetic disruption [J]. *Transfusion*, 2015, 55(6 Pt 2): 1492-1500.
- [6] Comabella M, Pericot L, Goertsches R, et al. Plasma osteopontin levels in multiple sclerosis [J]. *Neuroimmunol*, 2005, 158(1/2): 231-239.
- [7] Drew PD, Chavis JA, Bhatt R. Sex steroid regulation of microglial cell activation: relevance to multiple sclerosis [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2003, 1007(1): 329-334.
- [8] 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]. *J Neuroimmunol*, 2002, 124(1-2): 70-82.
- [9] 彭永, 甘露, 李淑萍, 等. 髓鞘抗原特异性 CD8 + T 细胞在 MS/EAE 脑组织免疫豁免中作用的研究进展 [J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2018, 45(5): 532-535.
- [10] Kim MD, Cho HJ, Shin T, et al. Expression of osteopontin and its ligand, CD44, in the spinal cords of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *Neuroimmunol*, 2004, 151(1-2): 78-84.
- [11] Garin T, Rubinstein A, Grigoriadis N, et al. CD44 variant DNA vaccination with virtual lymph node ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis through the induction of apoptosis [J]. *Neurol Sci*, 2007, 258(1-2): 17-26.
- [12] Clemente N, Comi C, Raineri D, et al. Role of Anti-Osteopontin Antibodies in Multiple Sclerosis and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis [J]. *Front Immunol*, 2017, 8(1): 321.
- [13] Chang A, Staugaitis SM, Dutta R, et al. Cortical remyelination: a new target for repair therapies in multiple sclerosis [J]. *Ann Neurol*, 2012, 72(6): 918-926.
- [14] Chitrula KN, Guan H, Singh NP, et al. CD44 deletion leading to attenuation of experimental autoimmune encephalomyelitis results from alterations in gut microbiome in mice [J]. *Eur J Immunol*, 2017, 47(7): 1188-1199.
- [15] Winkler CW, Foster SC, Matsumoto SG, et al. Hyaluronan anchored to activated CD44 on central nervous system vascular endothelial cells promotes lymphocyte extravasation in experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(40): 33237-33251.
- [16] Flynn KM, Michaud M, Madri JA, et al. CD44 deficiency contributes to enhanced experimental autoimmune encephalomyelitis: a role in immune cells and vascular cells of the blood-brain barrier [J]. *Am J Pathol*, 2013, 182(4): 1322-1336.