

• 论 著 •

木犀草素对实验性自身免疫性脑脊髓炎大鼠 SPH/SPHK1/S1P1 通路及神经元凋亡的影响

郭鹏 任凯夕 沈金金

【摘要】 目的 探讨木犀草素(Luteolin)对实验性自身免疫性脑脊髓炎(Experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)大鼠神经酰胺-鞘氨醇(Sphingosine, SPH)/鞘氨醇激酶 1(Sphingosine kinase 1, SPHK1)/1-磷酸鞘氨醇受体 1(Sphingosine-1-phosphate 1, S1P1)通路蛋白表达水平及神经元凋亡的影响。**方法** 取雌性 Wistar 大鼠,采用注射豚鼠脊髓免疫抗原法建立 EAE 模型,将造模成功的 50 只大鼠随机分为模型(EAE)组, Luteolin 低(5mg/kg)、中(25 mg/kg)、高(50 mg/kg)剂量组, 芬戈莫德(FTY720)阳性对照组(61.7 mg/kg), 每组各 10 只;另取 10 只雌性 Wistar 大鼠,注射等量生理盐水,作为空白对照(Control)组;各组于造模 15 d 后开始给药, Luteolin 低、中、高剂量组经腹腔注射相应剂量 Luteolin 药物, 芬戈莫德(FTY720)阳性对照组灌胃给予相应剂量的 FTY720, EAE 组和 Control 组灌胃和腹腔注射等量生理盐水, 各组连续给药 14 d, 2 次/d; 各组大鼠于末次给药 12 h 后对大鼠 EAE 临床症状进行评分;取脊髓组织,用苏木精-伊红染色(Hematoxylin eosin, HE)及固蓝(Luxol fast blue, LFB)染色法检测大鼠髓鞘组织病理表现及脱髓鞘面积;原位缺口末端转移酶标记法(TdT-mediated dUTP nick and labeling, TUNEL)法检测髓鞘组织中神经元的凋亡情况并计算凋亡率;以蛋白免疫印迹法(Western Blot)检测髓鞘组织中通路蛋白 SPHK, SPH, S1P1 及凋亡蛋白半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-12(Cystein-aspartate protease-12, Caspase-12)蛋白相对表达水平。**结果** 与 Control 组比较, EAE 组大鼠 EAE 临床症状评分、脊髓组织炎性细胞浸润和髓鞘脱失程度、神经元凋亡率、髓鞘组织中 SPH, SPHK1, S1P1 及 Caspase-12 蛋白表达水平均升高($P < 0.05$);与 EAE 组比较, Luteolin 低、中、高剂量组及芬戈莫德(FTY720)阳性对照组大鼠 EAE 临床症状评分、脊髓组织炎性细胞浸润和髓鞘脱失程度、神经元凋亡率、髓鞘组织中 SPH, SPHK1, S1P1 及 Caspase-12 蛋白表达水平均降低($P < 0.05$),且 Luteolin 各剂量组上述指标水平呈剂量依赖性; Luteolin 高剂量组与芬戈莫德(FTY720)阳性对照组的上述指标水平均无明显差异($P > 0.05$)。**结论** Luteolin 可能通过抑制 EAE 模型大鼠髓鞘组织 SPHK, SPH, S1P1 蛋白表达来抑制 EAE 大鼠脱髓鞘病变及神经元凋亡。

【关键词】 木犀草素 自身免疫性脑脊髓炎 神经酰胺-鞘氨醇/鞘氨醇激酶/1-磷酸鞘氨醇受体 1 神经元凋亡

【中图分类号】 R742 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2021)02-0137-07

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2021.02.001

The effects of Luteolin on SPH/SPHK1/S1P1 pathway and neuron apoptosis in rats with experimental autoimmune encephalomyelitis Guo Peng, Ren Kaixi, Shen Jinjin. Department of Neurology, Tangdu Hospital, Air Force Military Medical University, Xi'an 710038

【Abstract】 Objective To investigate the effects of Luteolin on the ceramide-sphingosine (SPH)/sphingosine kinase (SPHK1)/sphingosine-1-phosphate receptor 1 (S1P1) pathway protein expression levels and neuron apoptosis in rats with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). **Methods** The female Wistar rats were selected, EAE model was established by injecting spinal cord immune antigen of guinea pigs, and 50 rats were randomly divided into model (EAE) group, Luteolin low (5 mg/kg), medium (25 mg/kg) and high (50 mg/kg) dose groups, and fingorod (FTY720) positive control group (61.7 mg/kg), with 10 rats in each group. In addition, another 10 female Wistar rats were injected with the same amount of normal saline as the control group. They were given drugs after 15 days of model in each group, corresponding dose of Luteolin was injected intraperitoneally in low, middle and high dose groups in the positive control group,

FTY720 was given by gavage, and EAE group and control group were given the same amount of saline by gavage and intraperitoneal injection, continuous administration for 14 days, twice a day. The clinical symptoms of EAE were evaluated after 12 hours of the last administration, the spinal cord was taken, and the pathological damage and demyelination area of myelin tissue in rats were measured by hematoxylin eosin (HE) and solid blue (LFB) staining, terminal dextrynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) was used to detect the apoptosis of neurons in myelin tissues and calculate the apoptosis rate. In addition, Western blotting was used to detect relative expression levels of SPHK, SPH, S1P1 and caspase-12 in myelin tissues. **Results** Compared with those in control group, the EAE clinical symptom score, inflammatory cell infiltration and demyelination, neuron apoptosis rate, protein expression levels of SPH, SPHK1, S1P1 and caspase-12 in myelin tissue of rats in EAE group were higher ($P < 0.05$). Compared with those in EAE group, the EAE clinical symptom score, inflammatory cell infiltration and demyelination, neuron apoptosis rate, protein expression levels of SPH, SPHK1, S1P1 and caspase-12 in myelin tissue of rats in Luteolin low, medium, high dose groups and positive control group were lower ($P < 0.05$), and the above parameters of Luteolin groups were dose-dependent, while there was no significant difference between the Luteolin high dose group and the positive control group ($P > 0.05$). **Conclusion** Luteolin might inhibit demyelination and neuron apoptosis of EAE rats by inhibiting the SPHK, SPH and S1P1 protein expressions.

【Key words】 Luteolin Experimental autoimmune encephalomyelitis Ceramide-sphingosine/sphingosine kinase/sphingosine-1-phosphate receptor 1 Neurons Apoptosis

实验性自身免疫性脑脊髓炎 (Experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) 是由 $CD4^+$ T 淋巴细胞介导, 以中枢神经系统脱髓鞘、部分轴索损伤为特征的变态反应性疾病, 与人类中枢神经系统脱髓鞘疾病多发性硬化 (Multiple sclerosis, MS)、急性播散性脑脊髓炎特征相似, 是研究中枢神经系统脱髓鞘疾病常用的动物模型^[1-2]。MS 可导致患者出现间歇性神经功能障碍, 严重影响患者的生命健康^[3-4]。目前, 临床上尚无治疗 MS 的特效药物, 而寻找安全、有效、便宜的治疗 MS 的药物是目前临床研究 MS 治疗的亟待解决的首要问题^[5]。近年来研究发现, 神经元凋亡与 EAE 发病及 MS 神经功能障碍关系密切^[6], 而神经鞘磷脂及其代谢产物—鞘氨醇激酶 (Sphingosine kinase, SPHK) 可促进神经酰胺-鞘氨醇 (sphingosine, SPH) 催化并转化为鞘氨醇-1-磷酸 (Sphingosine-1-phosphate, S1P) 调控炎症反应及神经细胞凋亡而治疗癫痫、MS 等多种疾病^[7-8]。

木犀草素 (Luteolin) 是从木犀草的茎叶中提取的黄酮类化合物, 具有抗炎、抗菌、抗肿瘤等多种生物学效应^[9-10]。近年来研究发现, Luteolin 对脑组织及神经元凋亡和损伤具有保护作用^[11-12]。但 Luteolin 对 EAE 和 MS 的治疗作用及 Luteolin 对 SPH/SPHK/S1P1 通路的调控作用未见报道。本研究推测, Luteolin 可能通过调控 SPH/SPHK/S1P1 通路以抑制神经元凋亡来治疗和改善 EAE 及

MS。本研究通过建立大鼠 EAE 模型对此进行验证, 以期临床用药提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物

清洁级健康雌性 Wistar 大鼠 70 只, 体重 200 ~ 220 g, 由广东省医学实验动物中心提供, 生产许可证号为 SCXK(粤) 2018-0002, 动物质量合格证号为省科委 2000A027。所有大鼠于本院动物房中饲养, 饲养条件: 自然光照, 自由饮食、饮水, 温度 25 °C, 相对湿度 50%, 噪音 < 80 分贝, 保持动物房环境及鼠笼清洁、透气。本研究经本院动物伦理委员会批准同意, 批号为 IACUC-01 (20160917)。试验符合 3R 原则。

1.1.2 主要试剂及仪器

Luteolin (货号为 BZ008) 购自山东临沂艾泽拉斯生物科技有限公司, 规格为 20 mg; 芬戈莫德 (货号为 A-1485) 购自成都思天德生物科技有限公司; 百日咳杆菌 (Pertussis vaccine, PV) 疫苗 (货号为 231141)、完全弗氏佐剂 (Complete Freund's adjuvant, CFA) 试剂 (货号为 7027) 均购自北京博雷科技发展有限公司; SPH 抗体 (货号为 ab235057)、SPHK1 抗体 (货号为 ab109522); S1P1 抗体 (货号为 ab77076)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-12 (Cysteine-aspartate protease-12, Caspase-12) 抗体 (货号为

ab140882)均购自美国 abcam 公司;苏木精-伊红染色(HE)染色试剂盒(货号为 LMO105)购自上海联迈生物工程有限公司;原位缺口末端转移酶标记法(Transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling assay, TUNEL)染色试剂盒(货号为 11767291910)购自上海嵎崑达实业有限公司;BCA 蛋白定量试剂盒(货号为 P0768)和胰蛋白酶(货号为 P0231)均购自美国 Pierce 公司;蛋白电泳仪(型号为 1659001)、半干转膜仪(型号为 Trans-Blot SD)均购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 大鼠 EAE 模型建立及分组给药

参考文献^[13]制备豚鼠全脊髓匀浆液(Guinea pig spinal cord homogenate, GPSCH),具体操作方法为取健康豚鼠 3 只(雌雄不限,体重 400g 左右),用 3%戊巴比妥钠麻醉后取脊髓,制成 50%(m/v)的 GPSCH;取羊毛脂 10g、液体石蜡油 40 mL、灭活的卡介苗制成含 10mg/mL 的 PV 的完全 CFA;将 GPSCH 与 CFA 等量混匀,置于冰上抽打成油包水型乳剂,即得抗原,备用。参考文献^[14]构建大鼠 EAE 模型,具体操作方法为取 60 只雌性 Wistar 大鼠,每只大鼠于四足垫皮下按足掌向足趾方向注射抗原 0.5 mL,同时于双后足背皮下注射 PV 0.05 mL 后将大鼠置于笼中,常规饲养 15 d 后根据文献^[15]对大鼠 EAE 临床症状进行评分,若 EAE 临床症状评分 ≥ 2 分,表明造模成功。共造模成功大鼠 50 只,并将其随机分为 EAE(模型)组、Luteolin 低(5 mg/kg)、中(25 mg/kg)、高(50 mg/kg)剂量组、芬戈莫德(FTY720)阳性对照组(61.7 mg/kg),每组各 10 只;另取 10 只雌性 Wistar 大鼠,于相同部位注射生理盐水 0.5 mL,饲养 15 d 后作为空白对照(Control)组。各药均于分组后开始给药,Luteolin 及阳性对照组分别参考文献^[14,16]以生理盐水配置为 0.50、2.50、5.00 及 6.17 mg/mL 的混悬液,Luteolin 处理组大鼠以 10 mL/kg 的剂量经腹腔注射给药;阳性对照组以 10 mL/kg 的剂量灌胃给药;Control 组与 EAE 组注射和灌胃给予等剂量生理盐水,各组连续给药 14 d,2 次/d。

1.2.2 各组大鼠 EAE 临床症状评分

各组大鼠于末次给药 12 h 后参考文献^[15]采用国际通用的 5 分法观察和评估大鼠 EAE 临床症状,评分标准:0 分为大鼠状态正常;1 分为大鼠尾部张力消失,步态轻度笨拙;2 分为大鼠一侧后下肢无

力,步态不稳,被动翻身后仍可复位;3 分为大鼠两后肢瘫痪,被动翻身后不能恢复,但给予刺激后可以挪动;4 分为大鼠两后肢瘫痪伴前肢瘫痪;5 分为大鼠濒死状态或死亡。

1.2.3 大鼠标本采集

各组大鼠在做完 EAE 评分后麻醉处死,取脊髓组织,剪取 0.5 g 用组织匀浆器匀浆、离心分离后置于 -20°C 冰箱保存备用;剩余脊髓组织迅速置于 4%多聚甲醛中固定 24 h 备用。

1.2.4 各组大鼠髓鞘组织 HE 及 LFB 染色

取 1.2.3 中 4%多聚甲醛溶液中固定 24 h 的脊髓组织,进行常规透明、浸蜡、包埋后切成厚度为 5 μm 的切片,按 HE 及 LFB 染色试剂盒说明书进行染色、脱水、透明后封片,置于光学显微镜下观察组织病理变化。

1.2.5 各组大鼠髓鞘组织 TUNEL 染色及神经元凋亡检测

取 1.2.3 中 4%多聚甲醛溶液中固定 24 h 的脊髓组织,进行常规透明、浸蜡、包埋后切成厚度为 5 μm 的切片,按 TUNEL 染色试剂盒说明书进行染色、脱水、透明后封片,置于高倍显微镜下观察,随机选 5 个视野,计数阳性染色细胞数,根据公式计算凋亡率 = 阳性染色细胞数 / (阳性染色细胞数 + 未染色细胞数) $\times 100\%$ 。每组数据测量 3 次,取平均值。

1.2.6 Western Blot 检测脊髓组织中 SPH, SPHK1, S1P1 及 Caspase-12 蛋白相对表达水平

取 1.2.3 中 -20°C 冰箱保存的上清液,于 4°C 冰箱中解冻后用蛋白提取试剂盒提取蛋白,按 BCA 试剂盒说明书测定蛋白水平后取 50 μg 蛋白进行电泳、转膜反应后置于 5%的脱脂奶粉溶液中,于摇床上 37°C 封闭 2 h,将目的蛋白条带置于孵育盒中,加入抗体(SPH, SPHK1, S1P1, Caspase-12, β -actin, 1:1000、1:1000、1:1000、1:1000、1:2000)于 4°C 冰箱中孵育过夜,经 TBST 漂洗 3 次,加入 1:1000 的羊抗兔二抗溶液,于摇床上室温孵育 2 h,经 TBST 再次漂洗 3 次,采用增强化学发光法显色,以凝胶成像仪观察条带并拍照,并以 Image-J 软件分析各组蛋白相对表达水平。

1.2.7 统计学处理

采用 SPSS22.0 软件,计量资料以平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较进行单因素方差分析,进一步两两比较采用 SNK- q 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组大鼠 EAE 临床症状评分

与 Control 组比较,EAE 组大鼠出现尾部及四肢肌力下降及瘫痪等临床症状,且 EAE 临床症状评分升高($P<0.05$);与 EAE 组比较,Luteolin 低、中、高剂量组及阳性对照组大鼠 EAE 临床症状评分降低($P<0.05$),且 Luteolin 各剂量组上述指标水平呈剂量依赖性;Luteolin 高剂量组与阳性对照组的上述指标水平均无明显差异($P>0.05$)(表 1)。

表 1 各组大鼠 EAE 临床症状评分比较
($\bar{x} \pm s, n = 10, \text{pg/mL}$)

组别	VEGF
Control 组	0.00 ± 0.00
EAE 组	4.69 ± 0.12 *
Luteolin 低剂量组	3.28 ± 0.11 *△
Luteolin 中剂量组	2.52 ± 0.10 *△#
Luteolin 高剂量组	1.75 ± 0.09 *△#▲
阳性对照组	1.72 ± 0.10 *△#▲

注:与 Control 组比较,* $P<0.05$;与 CC 组比较,△ $P<0.05$;与 Luteolin 低剂量组比较,# $P<0.05$;与 Luteolin 中剂量组比较,▲ $P<0.05$

2.2 大鼠髓鞘组织 HE 染色

Control 组大鼠髓鞘组织结构正常;与 Control 组比较,EAE 组大鼠髓鞘组织炎性细胞浸润明显、

神经元细胞核膜、核仁模糊,且坏死变性现象严重;与 EAE 组比较,Luteolin 低、中、高剂量组及阳性对照组大鼠髓鞘组织炎性浸润及神经元坏死明显得到改善,且 Luteolin 各剂量组上述指标水平呈剂量依赖性(图 1)。

2.3 各组大鼠髓鞘组织固蓝染色

Control 组大鼠髓鞘组织结构正常,染色均匀;与 Control 组比较,EAE 组大鼠髓鞘组织海绵状空泡样改变严重、脱髓鞘面积变大;与 EAE 组比较,Luteolin 低、中、高剂量组及阳性对照组大鼠髓鞘组织海绵状空泡样改变及脱髓鞘面积减小,且 Luteolin 各剂量组上述指标水平呈剂量依赖性(图 2)。

2.4 各组大鼠髓鞘组织 TUNEL 染色及神经元凋亡率

Control 组大鼠髓鞘组织中被染成棕黄色的凋亡神经元较少;与 Control 组比较,EAE 组大鼠髓鞘组织中被染成棕黄色的凋亡神经元增多,且细胞凋亡率升高($P<0.05$);与 EAE 组比较,Luteolin 低、中、高剂量组,阳性对照组大鼠髓鞘组织中被染成棕黄色的凋亡神经元减少,且细胞凋亡率降低($P<0.05$),且 Luteolin 各剂量组上述指标水平呈剂量依赖性;Luteolin 高剂量组与阳性对照组的上述指标水平均无明显差异($P>0.05$)(表 2、图 3)。

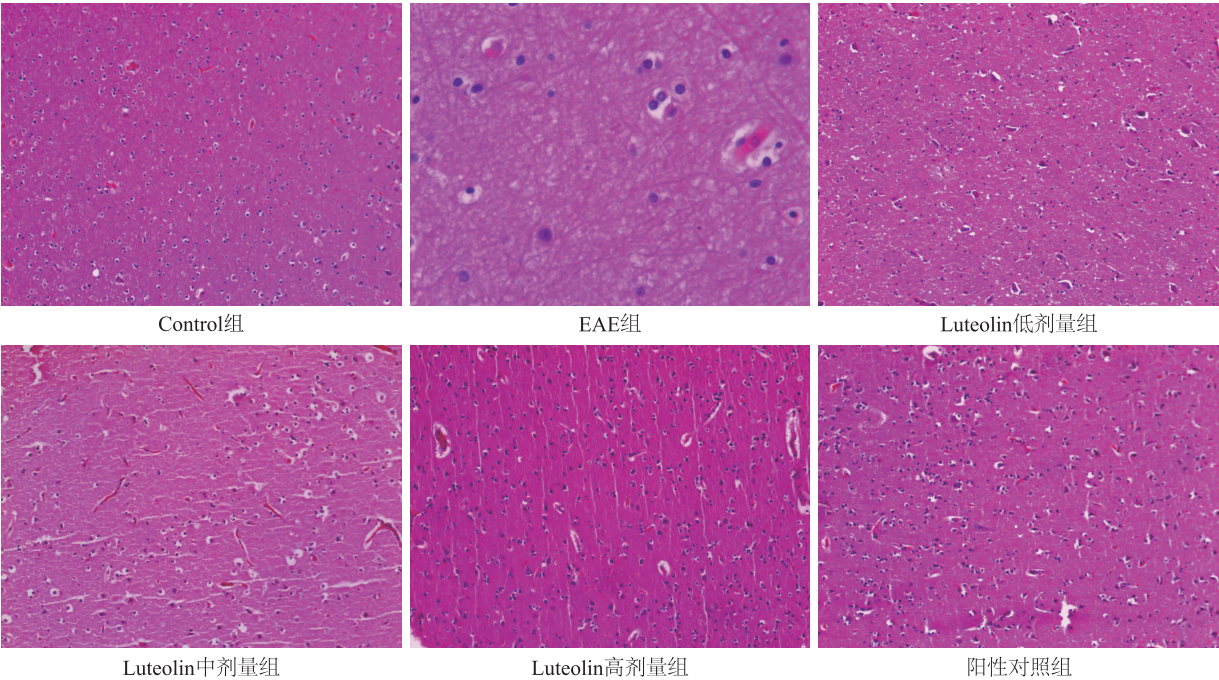


图 1 各组大鼠髓鞘组织 HE 染色(×200 倍)

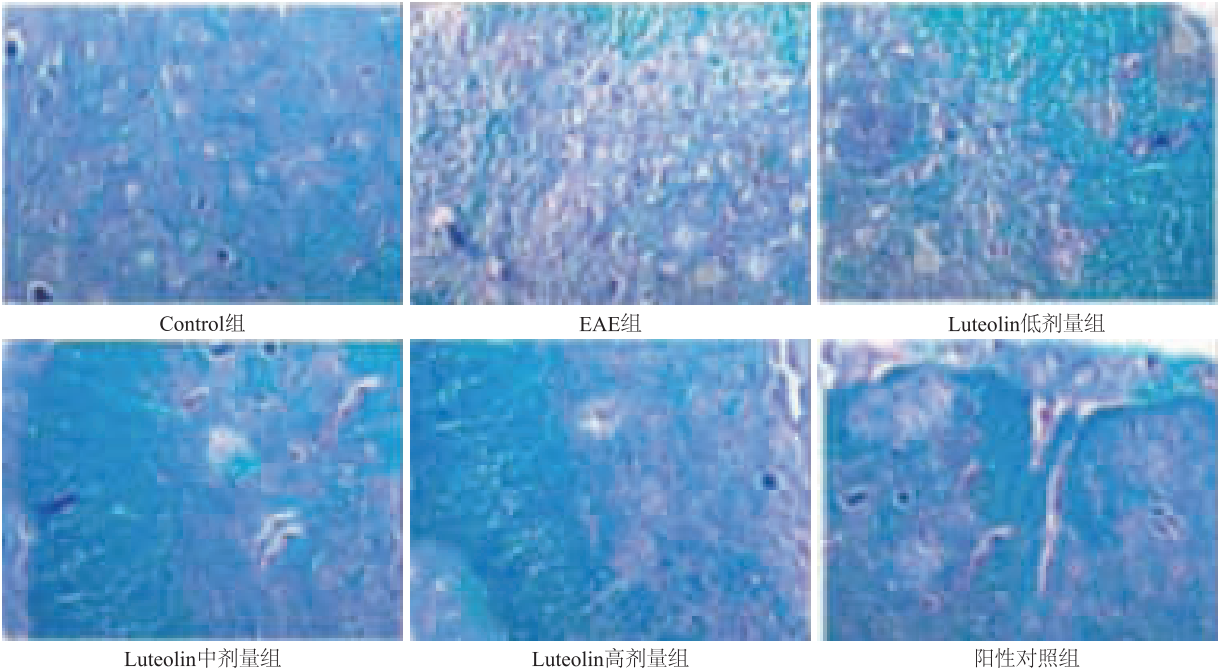


图 2 各组大鼠髓鞘组织 LFB 染色(×200 倍)

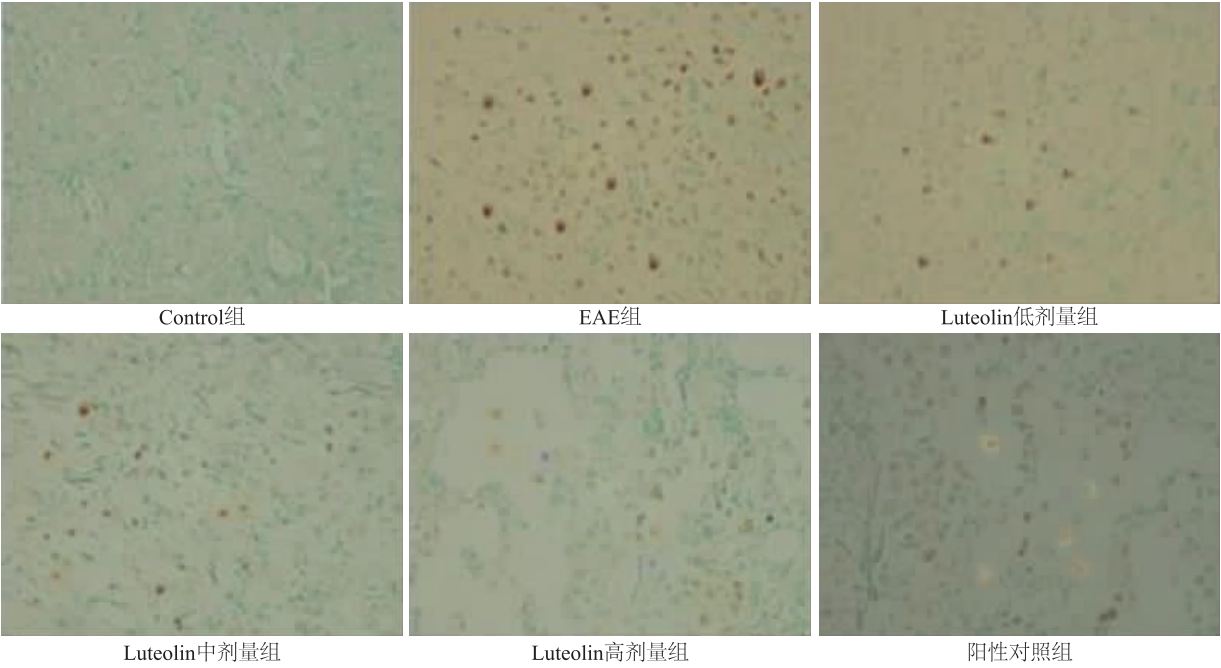


图 3 各组大鼠髓鞘组织 TUNEL 染色(×400 倍)

表 2 各组大鼠髓鞘组织中神经元凋亡率($\bar{x} \pm s, n = 10, \%$)

组别	凋亡率
Control 组	10.03 ± 3.69
EAE 组	68.28 ± 5.01 *
Luteolin 低剂量组	52.12 ± 4.94 *△
Luteolin 中剂量组	41.05 ± 4.81 *△#
Luteolin 高剂量组	30.01 ± 4.02 *△#▲
阳性对照组	29.08 ± 3.99 *△#▲

注:与 Control 组比较,* $P < 0.05$;与 EAE 组比较,△ $P < 0.05$;与 Luteolin 低剂量组比较,# $P < 0.05$;与 Luteolin 中剂量组比较,▲ $P < 0.05$

2.5 各组大鼠髓鞘组织中 SPH,SPHK1,S1P1 及

Caspase-12 蛋白相对表达水平

与 Control 组比较,EAE 组大鼠髓鞘组织中 SPH,SPHK1,S1P1 及 Caspase-12 蛋白表达水平升高($P < 0.05$);与 EAE 组比较,Luteolin 低、中、高剂量组大鼠髓鞘组织中 SPH,SPHK1,S1P1 及 Caspase-12 蛋白表达水平降低($P < 0.05$),且 Luteolin 各剂量组上述指标水平呈剂量依赖性;Luteolin 高剂量组与阳性对照组的上述指标水平均无明显差异($P > 0.05$)(表 3、图 4)。

表 3 各组大鼠髓鞘组织中 SPH,SPHK1,S1P1 及 Caspase-12 蛋白表达水平($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	SPH/ β -actin	SPHK1/ β -actin	S1P1/ β -actin	caspase-12/ β -actin
Control 组	0.29 \pm 0.11	0.21 \pm 0.12	0.19 \pm 0.10	0.26 \pm 0.13
EAE 组	1.34 \pm 0.15*	1.39 \pm 0.13*	1.36 \pm 0.13*	1.38 \pm 0.14*
Luteolin 低剂量组	1.01 \pm 0.12* Δ	1.06 \pm 0.15* Δ	1.05 \pm 0.13* Δ	1.09 \pm 0.15* Δ
Luteolin 中剂量组	0.83 \pm 0.13* Δ #	0.86 \pm 0.12* Δ #	0.82 \pm 0.14* Δ #	0.85 \pm 0.12* Δ #
Luteolin 高剂量组	0.53 \pm 0.14* Δ # \blacktriangle	0.57 \pm 0.13* Δ # \blacktriangle	0.50 \pm 0.12* Δ # \blacktriangle	0.51 \pm 0.13* Δ # \blacktriangle
阳性对照组	0.52 \pm 0.13* Δ # \blacktriangle	0.56 \pm 0.14* Δ # \blacktriangle	0.49 \pm 0.12* Δ # \blacktriangle	0.50 \pm 0.13* Δ # \blacktriangle

注:与 Control 组比较,* $P<0.05$;与 EAE 组比较, $\Delta P<0.05$;与 Luteolin 低剂量组比较,# $P<0.05$;与 Luteolin 中剂量组比较, $\blacktriangle P<0.05$

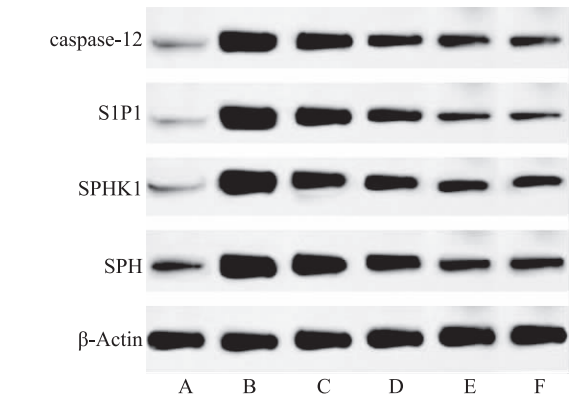


图 4 各组大鼠髓鞘组织 SPH,SPHK1,S1P1 及 Caspase-12 蛋白表达水平 A 为 Control 组;B 为 EAE 组;C 为 Luteolin 低剂量组;D 为 Luteolin 中剂量组;E 为 Luteolin 高剂量组;F 为阳性对照组

3 讨论

MS 的主要病理特征为炎症、胶质增生、轴索病变和脱髓鞘化,而 EAE 为 MS 的理想动物模型^[17]。抗原类型、纯度、活性以及所选动物品系是决定 EAE 模型临床特点的主要因素^[18],本研究参照文献^[14]用相对较敏感、较易获得的雌性青年 Wistar 大鼠作为实验动物,用 GPSCH + CFA + PV 原浆液的方法进行致敏,建立 EAE 模型急性 MS 病程,结果显示与 Control 组比较,EAE 组大鼠出现尾部及四肢肌力下降及瘫痪等临床症状,且 EAE 临床症状评分升高,HE 染色及 LBF 染色发现大鼠脊髓组织炎性细胞浸润和髓鞘脱失面积增加,TUNEL 染色发现脊髓神经元出现核染色质固缩、缩小、核碎裂及凋亡小体增加,且神经元凋亡率增高,提示 EAE 模型大鼠出现炎症和脱髓鞘化等病理特征,表明造模成功。

目前对于 MS 的主要治疗方法为使用皮质类固醇激素、免疫球蛋白、血浆置换及免疫抑制药物如硫唑嘌呤、甲氨蝶呤等来延缓病情发展,这些方法虽能在一定程度上缓解 MS 症状,但其长期应用疗效不

稳定,且不良反应较大,目前尚无最佳的治疗方案^[5]。MS 脱髓鞘病变中轴突损伤及神经元病变的研究越来越为人们重视,而中药天然提取物 Luteolin 对神经损伤和病变具有较好的改善作用,王秋月等^[11]发现 Luteolin 可通过抑制细胞内活性氧簇水平、调节炎症因子水平、抵抗神经元凋亡来保护 β -淀粉样肽损伤神经元;刘涛等^[12]发现 Luteolin 可抑制糖尿病脑梗死大鼠神经细胞凋亡。鉴于 Luteolin 较好的抗炎及神经保护作用,故本研究推测 Luteolin 可能对 MS 脱髓鞘病变中神经元病变有较好的治疗作用,故建立 EAE 模型对此进行验证,结果显示与 EAE 模型组比较,Luteolin 低、中、高剂量组及阳性对照组大鼠尾部及四肢肌力下降及瘫痪等临床症状评分降低、脊髓组织炎性细胞浸润和髓鞘脱失面积减少、脊髓神经元核质固缩、缩小、核碎裂及凋亡等损伤现象减轻,且神经元凋亡率也降低,且 Luteolin 各剂量组上述指标水平呈剂量依赖性降低,表明 Luteolin 可抑制 MS 大鼠脱髓鞘病变及神经元凋亡,对 MS 及 EAE 具有一定的治疗作用。

反应性星形胶质细胞化和神经元凋亡是 MS 最明显的两大病理特征^[19]。Kamermans 等^[20]研究证实反应性星形胶质细胞可聚集在 MS 及 EAE 损伤的髓鞘周围,通过释放促炎性因子和细胞因子,作用于神经元,加剧 MS 及 EAE 炎症反应和髓鞘病变。近年来研究发现,抑制 S1P 通路可缓解 MS 及 EAE 炎症反应和髓鞘病变,Luo 等^[21]研究发现 SPHK 可促进 SPH 转化为 S1P,S1P 与受体 S1P1 结合后可促进反应性星形胶质细胞聚集并释放促炎和细胞因子,引起神经元凋亡,加重 MS 及 EAE 病情发展,表明 S1P 通路 与 MS 及 EAE 病情发展关系密切;Yazdi 等^[22]研究发现用 S1P 受体激动剂 FTY720 能有效阻止 S1P 与受体 S1P1 结合,可阻止炎症介质向神经元浸润,从而缓解神经元损伤、凋亡并促进髓鞘再生,达到延缓 MS 及 EAE 病情发展的目的。本研究发现,与 Control 组比较,EAE 组大鼠髓鞘

组织 SPHK, SPH, S1P1 蛋白表达水平增高, 且凋亡蛋白 Caspase-12 表达水平也升高, 提示 SPHK/SPH/S1P1 通路激活, S1P 与受体 S1P1 结合后可能促进了反应性星形胶质细胞聚集并释放促炎和细胞因子, 导致神经元凋亡。与 EAE 组比较, Luteolin 低、中、高剂量组及阳性对照组大鼠髓鞘组织 SPHK, SPH, S1P1 及 Caspase-12 蛋白水平表达均降低, 且 Luteolin 各剂量组上述指标水平呈剂量依赖性, 表明 Luteolin 对 EAE 大鼠脱髓鞘病变及神经元凋亡有改善作用, 可能通过抑制 SPHK/SPH/S1P1 通路激活来实现的。

综上所述, 在 EAE 模型大鼠中 Luteolin 可能通过抑制髓鞘组织 SPHK, SPH, S1P1 蛋白表达来抑制 EAE 大鼠脱髓鞘病变及神经元凋亡, 这为临床治疗 EAE 及 MS 和开发 Luteolin 的药理作用提供一定的参考。但本研究也存在一定的不足, SPH/SPHK/S1P1 通路调控促炎因子和细胞因子, 抑制神经元凋亡的机制及靶标分子相对复杂, 本研究未设置通路抑制剂进行研究, Luteolin 也有可能通过其它途径来改善 MS 及 EAE 大鼠脱髓鞘病变及神经元凋亡, 这有待后续继续研究。

参 考 文 献

- [1] Belikan P, Bühler U, Wolf C, et al. CCR7 on CD4(+) T cells plays a crucial role in the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. J Immunol, 2018, 200(8): 2554-2562.
- [2] Pol S, Schweser F, Bertolino N, et al. Characterization of leptomeningeal inflammation in rodent experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of multiple sclerosis[J]. Exp Neurol, 2019, 314(1): 82-90.
- [3] Sun L, Telles E, Karl M, et al. Loss of HDAC11 ameliorates clinical symptoms in a multiple sclerosis mouse model[J]. Life Sci Alliance, 2018, 1(5): e201800039.
- [4] Edwards KR, Garten L, Button J, et al. Neurofilament light chain as an indicator of exacerbation prior to clinical symptoms in multiple sclerosis[J]. Mult Scler Relat Disord, 2019, 31(1): 59-61.
- [5] 胡锦全, 王云甫, 孙延鹏, 等. 米托蒽醌治疗多发性硬化有效性和安全性的 Meta 分析[J]. 现代医学, 2014, 42(5): 482-486.
- [6] Wilmes AT, Reinehr S, Kühn S, et al. Laquinimod protects the optic nerve and retina in an experimental autoimmune encephalomyelitis model[J]. J Neuroinflammation, 2018, 15(1): 183.
- [7] 董媛媛, 冯邦哲, 孙影, 等. 鞘氨醇激酶/1-磷酸鞘氨醇信号通路在中枢神经系统疾病中的研究进展[J]. 癫痫杂志, 2018, 4(2): P. 129-P. 134.

- [8] Dominguez G, Maddelein ML, Pucelle M, et al. Neuronal sphingosine kinase 2 subcellular localization is altered in Alzheimer's disease brain[J]. Acta Neuropathol Commun, 2018, 6(1): 25.
- [9] Qian W, Liu M, Fu YT, et al. Antimicrobial mechanism of luteolin against Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes and its antibiofilm properties[J]. Microb Pathog, 2020, 142(10): 104056.
- [10] Tan XH, Zhang KK, Xu JT, et al. Luteolin alleviates methamphetamine-induced neurotoxicity by suppressing PI3K/Akt pathway-modulated apoptosis and autophagy in rats[J]. Food Chem Toxicol, 2020, 137(12): 111179.
- [11] 王秋月, 高卫真. 木犀草素对 A β 25-35 诱导神经元损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(9): 170-174.
- [12] 刘涛, 张俊会, 李娜, 等. 木犀草素对糖尿病脑梗死大鼠神经细胞凋亡及 HSP70mRNA, Fas mRNA 表达的影响[J]. 中国医药导报, 2014, 11(1): 21-23.
- [13] Kuerten S, Gruppe TL, Laurentius LM, et al. Differential patterns of spinal cord pathology induced by MP4, MOG peptide 35-55, and PLP peptide 178-191 in C57BL/6 mice[J]. APMIS, 2011, 119(6): 336-346.
- [14] 邹维, 李卓. 芬戈莫德对实验性自身免疫性脑脊髓炎大鼠脑组织中基质金属蛋白酶表达的影响[J]. 实用医学杂志, 2014, 30(3): 373-376.
- [15] Urban JL, Kumar V, Kono DH, et al. Restricted use of T cell receptor V genes in murine autoimmune encephalomyelitis raises possibilities for antibody therapy[J]. Cell, 1988, 54(4): 577-592.
- [16] 周亮, 乔印玲, 王莉, 等. 木犀草素通过抑制 PTEN PI3K-AKT 信号通路以及对免疫功能的调节作用介导对肺癌模型大鼠的干预研究[J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(12): 2128-2133, 2140.
- [17] Robinson AP, Harp CT, Noronha A, et al. The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS: utility for understanding disease pathophysiology and treatment [J]. Handb Clin Neurol, 2014, 122(1): 173-189.
- [18] 王玉琳, 石天宇, 马宁, 等. 实验性自身免疫性脑脊髓炎模型的建立及要素选择[J]. 黑龙江中医药, 2018, 48(4): 121-124.
- [19] 张宇, 张美妮. 星形胶质细胞在多发硬化中作用的研究新进展[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2014, 21(4): 290-293.
- [20] Kamermans A, Planting KE, Jalink K, et al. Reactive astrocytes in multiple sclerosis impair neuronal outgrowth through TRPM7-mediated chondroitin sulfate proteoglycan production [J]. Glia, 2019, 67(1): 68-77.
- [21] Luo J, Chen R, Zeng S, et al. The effects of berberine on a murine model of multiple sclerosis and the SPHK1/S1P signaling pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 490(3): 927-932.
- [22] Yazdi A, Ghasemi-Kasman M, Javan M. Possible regenerative effects of fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis disease: An overview on remyelination process[J]. J Neurosci Res, 2020, 98(3): 524-536.

(2020-06-18 收稿)