

黄芩苷对实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠的影响

任应国, 张保朝, 贾东佩, 胡 科

(南阳市中心医院神经内科, 河南 南阳 473000)

【摘要】 目的 观察不同浓度黄芩苷 (baicalin) 对实验性自身免疫脑脊髓炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) 小鼠模型的作用, 并研究其初步机制。**方法** 建立实验性自身免疫性脊髓炎小鼠模型, 免疫后第 3 天给予高低剂量黄芩苷灌胃, 每天 1 次, 共 20 d。对小鼠活动进行神经功能评分, TUNEL 染色检测脊髓组织细胞凋亡情况, ATP 水平检测试剂盒检测脊髓组织 ATP 含量水平, 免疫印迹法 (Western blot) 检测 Bax、Bcl-2、cleaved cas-9 和 cleaved cas-3 蛋白表达水平。**结果** 黄芩苷能够提高实验性自身免疫脑脊髓炎小鼠神经功能, 延后发病时间; 黄芩苷干预后, TUNEL 染色结果显示脊髓组织凋亡细胞数下降, ATP 水平下降, 免疫印迹法结果显示 Bcl-2 的蛋白表达显著上升, Bax、cleaved cas-9 和 cleaved cas-3 的蛋白表达显著下降。**结论** 黄芩苷可通过抑制线粒体内源性凋亡途径抑制细胞凋亡, 保护线粒体, 提高实验性自身免疫脑脊髓炎小鼠神经功能, 为预防疾病提供了实验理论依据。

【关键词】 黄芩苷; 实验性自身免疫脑脊髓炎; 细胞凋亡; 线粒体; 多发性硬化

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 03-0052-05

doi: 10. 3969. j. issn. 1671 - 7856. 2017. 03. 010

Protective effect of Baicalin on experimental autoimmune encephalomyelitis in mice

REN Ying-guo, ZHANG Bao-chao, JIA Dong-pei, HU Ke

(Department of Neurology, Nanyang Centre Hospital, Nanyang 473000, China)

【Abstract】 Objective To observe the effects of different concentrations of baicalin on the mouse model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) and to explore its mechanisms. **Methods** A mouse model of EAE was established with MOG33-55 peptide and bacillus Calmette-Guerin (BGG) vaccine with complete Freund adjuvant (CFA). At the third day after immunization, high and low doses of baicalin were administered to the mice intragastrically once a day for 20 days. The neurological function of mice was evaluated. TUNEL staining was used to detect apoptosis in the spinal cord tissue. The level of ATP in spinal cord tissue was detected by an ATP determination kit. Furthermore, the protein expressions of Bax, Bcl-2, cleaved cas-3 and cleaved cas-9 were detected by western blot, respectively. **Results** Baicalin improved the neurological function and delayed the onset time in EAE mice. After the treatment with baicalin, the TUNEL staining showed that the number of apoptotic cells in spinal cord was decreased, and the ATP level decreased. Western blot revealed that the protein expression of Bcl-2 was significantly increased, while the protein expression of Bax, cleaved cas-3 and cleaved cas-9 were significantly decreased. **Conclusions** Baicalin can reduce apoptosis by inhibiting mitochondrial endogenous apoptosis pathway, protect the function of mitochondria and improve the neurological function in EAE mice, therefore, provide experimental evidence for the disease prevention.

【Key words】 Baicalin; Experimental autoimmune encephalomyelitis; Cell apoptosis; Mitochondria; Multiple sclerosis

多发性硬化(multiple sclerosis, MS)是一种中枢神经系统的自身免疫性疾病,特征性病理改变主要有白质脱髓鞘、炎性细胞浸润和轴突破坏等^[1]。多发性硬化患者多数表现为反复发作的神经功能障碍,病情严重者丧失正常的自理能力,对患者和家属带来诸多不便。实验性自身免疫性脑脊髓炎是多发性硬化的动物模型,主要病理特征是免疫细胞穿过血脑屏障进入中枢神经系统^[2]。

黄芩苷是提取自黄芩的有效单体成分,近年来研究表明黄芩苷具有抗氧化、抗炎、抗菌以及抗凋亡的作用^[3, 4]。研究指出黄芩苷通过调节 Bax/Bcl-2 平衡,抑制线粒体内源性凋亡途径减轻肾小管上皮细胞的凋亡^[5]。黄芩苷通过下调 NF- κ B 信号通路的相关因子,对脑缺血大鼠具有抗炎与抗凋亡的作用^[6]。目前尚未有关于黄芩苷对多发性硬化作用的报道,本实验通过建立实验性自身免疫性脊髓炎小鼠模型,观察不同浓度黄芩苷对实验性自身免疫性脊髓炎小鼠的作用,并对初步机制进行探究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级雌性 C57B/6 小鼠 60 只,8~10 周龄,体重 18~22 g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司【SCXK(沪)2012-0002】,所有小鼠饲养于南阳市中医药学校药理实验室【SYXK(豫)2013-0016】,温度 22~25℃,相对湿度 40%~80% 环境中,自由饮食。

1.1.2 实验试剂

黄芩苷百日咳毒素购自中国食品药品检定研究院;结核杆菌购自 DIFCO 公司;完全弗氏佐剂购自 Sigma 公司;MOG33-35 多肽购自西安联美生物科技有限公司;ATP 检测试剂盒购自碧云天生物技术有限公司;TUNEL 试剂盒购自 Roche 公司;Bax、Bcl-2、cleaved cas-9、cleaved cas-3 和 GADPH 抗体购自 Santa Cruz 公司。

1.2 方法

1.2.1 实验性自身免疫性脑脊髓炎模型的建立

参考文献^[7],用 0.01 mol/L 的 PBS(pH7.2)将 MOG33-55 多肽稀释成 3 mg/mL;将结核杆菌放入

完全弗氏佐剂(CFA)中,使结核杆菌最终浓度为 4 mg/mL,与 MOG33-55 多肽等体积混合,用注射器于冰上抽打至油包水状态,作为诱导 EAE 的抗原乳剂。于小鼠背部、颈部、腋窝和蹊部四个点皮下注射抗原乳剂 0.2 mL/只,并于免疫当天和第 2 天分别给予腹腔注射百日咳毒素每只 500 ng。

1.2.2 实验分组与给药

将小鼠随机分为四组,每组 15 只小鼠,正常对照组(control),无任何干预措施,给予正常饮食;自身免疫性脑脊髓炎模型组(EAE),相应时间点灌胃相同体积生理盐水;黄芩苷低剂量组(Bai-L)和黄芩苷高剂量组(Bai-H),造模后第 3 天开始,分别给予黄芩苷 5 mg/kg 和 20 mg/kg 灌胃,每天 1 次,共给药 20 d。

1.2.3 神经功能评分

观察各组小鼠的活动情况,参照胡晓等^[7]的标准进行神经功能评分:0 分:行动正常,无明显异常;1 分:尾部无力;2 分:双后肢轻微无力;3 分:双后肢严重瘫痪;4 分:双后肢瘫痪;5 分:濒临死亡或死亡。对麻醉清醒后的大鼠进行神经功能评分,1-3 分为造模成功,0、4 分为造模不成功。

1.2.4 脊髓取材与 TUNEL 染色检测

给药完成后,10% 水合氯醛腹腔注射过量麻醉处死,打开胸腔暴露心脏,由心尖部插管至升主动脉,剪开右心耳,0.01 mol/L PBS 约 50 mL 迅速灌注至循环血液洗净,分成两份,一份保存于 -80℃ 液氮中,另一份用 4% 多聚甲醛固定,制作成石蜡切片,用 4% PFA/KPBS 溶液浸染 15 min,滴入 20 μ g/mL 蛋白酶 K 工作液,室温孵育 10 min,4% PFA 固定 5 min,加入 100 μ L 平衡液 8 min,滴加 TUNEL 反应液,并于湿盒中避光孵育 45 min,37℃,终止反应, KPBS 洗涤,滴入 DAPI 染液,孵育 15 min,封片,置于光学显微镜下观察,以视野内 TUNEL 阳性细胞数与总细胞数的比值表示。

1.2.5 脊髓组织的 ATP 水平检测

按照 ATP 检测试剂盒操作,将上述存放于液氮中的脊髓组织去除,每 20 mg 组织样品加入 0.2 mL 裂解液,冰上用匀浆器匀浆 20 min,4℃ 离心 10 min,取上清液,加入 0.1 mL ATP 检测工作液至检测孔,放置 3 min,加入 10 μ L 样品或标准品,依据标准曲线计算出样品 ATP 的浓度。

1.2.6 免疫印迹法(Western blot)

提取细胞蛋白定量,调整蛋白量。取等量裂解产物,加入体积:上样缓冲液(1:4)进行 SDS-PAGE 电泳。电泳后转移至 PVDF 膜上,5%脱脂牛奶室温封闭 2 h,加入相应一抗 4℃孵育 4 h,TBST 洗涤 3 次,每次 10 min;再加入相对应二抗室温孵育 1 h,TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,暗室中进行荧光显色。

1.2.7 统计学分析

用 SPSS16.0 统计软件对数据进行分析。计量数据均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组间数据采用方差分析,两组间比较采用 Bonferroni 校正的 t 检验,以 $P < 0.05$ 表示统计学上差异有显著性。

2 结果

2.1 各组小鼠的症状与神经功能评分

对照组小鼠活动状态良好,无发病;EAE 组小鼠发病高峰在免疫后 10d 发病,并在发病后 2~4 d 内达发病高峰;与 EAE 组小鼠相比,Bai-L 组与 Bai-H 组小鼠的神经功能评分明显降低,发病时间延后,并在短时间内恢复接近正常水平,如图 1 所示。

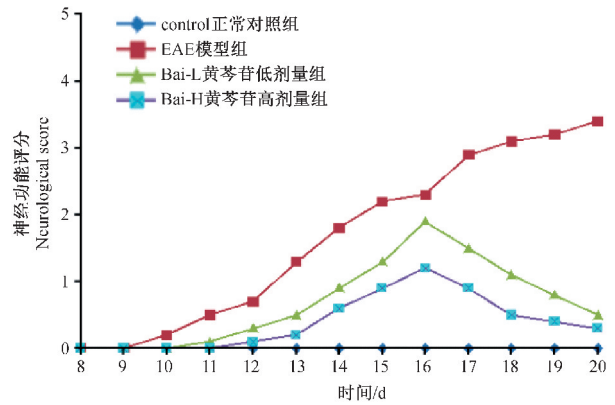


图 1 各组小鼠的神经功能评分

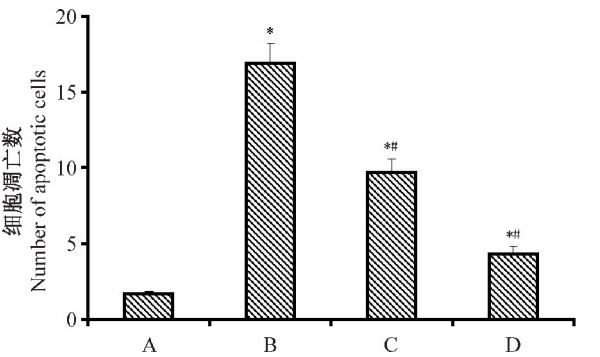
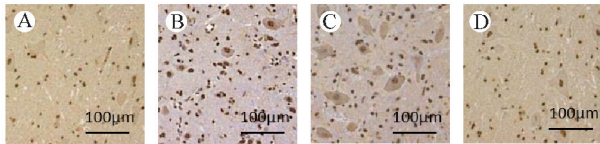
Fig.1 Neurological function scores of the mice in each group

2.2 TUNEL 染色检测细胞凋亡情况

TUNEL 染色结果显示,EAE 组小鼠 TUNEL 阳性细胞数量显著高于 control 组($P < 0.05$);给予黄芩苷干预后,Bai-L 组与 Bai-H 组的 TUNEL 阳性细胞数量显著低于 EAE 组($P < 0.05$),并随黄芩苷剂量增大而减少。如图 2 所示。

2.3 各组小鼠脊髓组织 ATP 含量水平的检测

结果显示,与 control 组相比,EAE 组小鼠脊髓组织中 ATP 含量水平显著下降($P < 0.05$);与 EAE 组相比,Bai-L 组与 Bai-H 组小鼠脊髓组织中 ATP 含量水平显著上升($P < 0.05$),并随黄芩苷浓度的



注:A:control 正常对照组;B:EAE 模型组;C:Bai-L 黄芩苷低剂量组;D:Bai-H 黄芩苷高剂量组。下图同。

* $P < 0.05$,vs 正常对照组;# $P < 0.05$,vs 模型组。($\bar{x} \pm s, n = 6$)

图 2 TUNEL 染色检测细胞凋亡情况

Note. A: Control; B: EAE model group; C: Low dose baicalin group; D: High dose baicalin group. The same as in Fig.3 and 4.

* $P < 0.05$, vs. the control group; # $P < 0.05$, vs. the model group.

Fig.2 Cell apoptosis in the neurons of mouse brains

增大而上升程度增大。如表 1 所示。

2.4 Bax 与 Bcl-2 蛋白表达水平的变化

与 control 组相比,EAE 组的 Bax 蛋白表达显著上升($P < 0.05$),Bcl-2 蛋白表达显著降低($P < 0.05$);与 EAE 组相比,Bai-L 组与 Bai-H 组的 Bax 蛋白表达显著下降($P < 0.05$),Bcl-2 蛋白表达显著上升($P < 0.05$)。

表 1 各组小鼠脊髓组织 ATP 含量水平($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 The level of ATP in spinal cord tissue of mice in each group

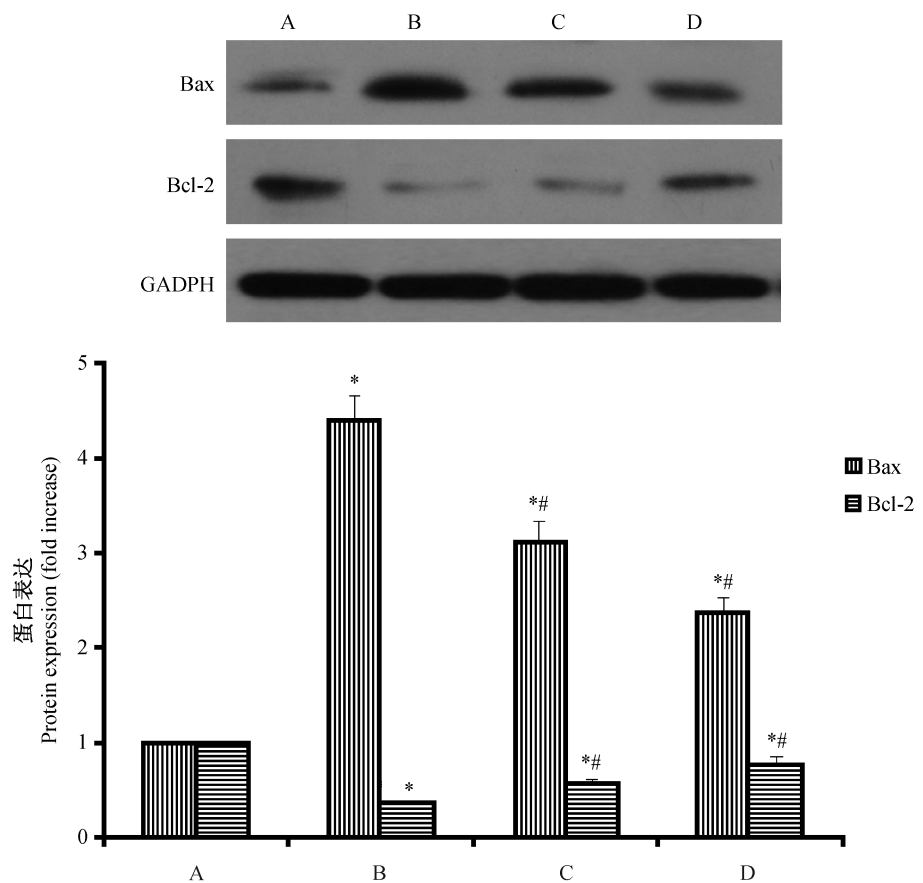
分组 Groups	ATP 含量水平 Content of ATP/nmol/mL
正常对照组 control	43.17 ± 6.73
模型组 EAE	24.67 ± 4.67 *
黄芩苷低剂量组 Bai-L	32.29 ± 3.73 *#
黄芩苷高剂量组 Bai-H	37.51 ± 3.11 **

注: * $P < 0.05$,vs 正常对照组;# $P < 0.05$,vs 模型组。

Note. * $P < 0.05$, vs. the control group; # $P < 0.05$, vs. the EAE model group.

2.5 Cleaved cas-9 和 Cleaved cas-3 蛋白表达水平的变化

与 control 组相比,EAE 组的 cleaved cas-9 和



注: * $P < 0.05$, vs 正常对照组; # $P < 0.05$, vs 模型组。 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

图3 Bax 与 Bcl-2 蛋白表达水平的变化

Note. * $P < 0.05$, vs. the control group; # $P < 0.05$, vs. the EAE group.

Fig. 3 Protein expression of Bax and Bcl-2 in the mice

cleaved cas-3 蛋白表达显著上升 ($P < 0.05$); 与 EAE 组相比, Bai-L 组与 Bai-H 组的 cleaved cas-9 和 cleaved cas-3 蛋白表达显著下降 ($P < 0.05$), 下降幅度与黄芩苷浓度呈正比。

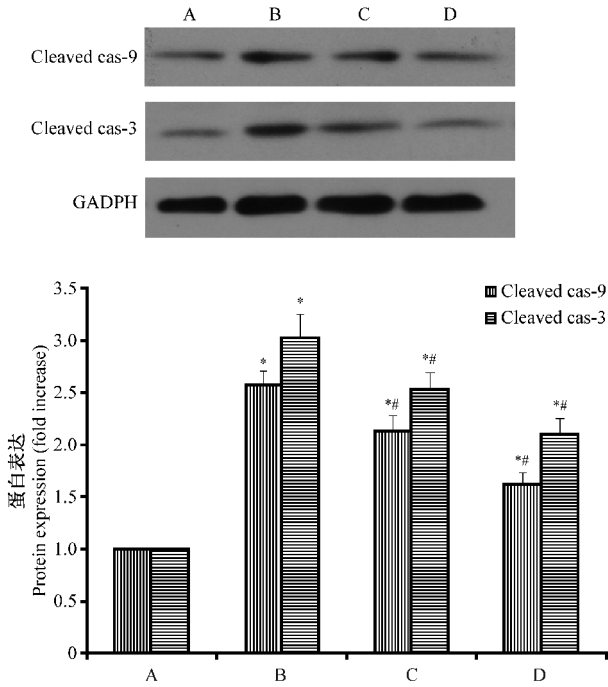
3 讨论

多发性硬化是导致青中年非创伤性神经残疾的主要原因之一, 是中枢神经系统炎性脱髓鞘疾病, 但病因尚不明确, 普遍认为多发性硬化的发病是遗传与环境因素相互作用的结果, 约有 15% ~ 20% 的患者具有多发性硬化家族史, 大多数患者家庭有不超过两个或三个受影响的人^[8]。近年来, 认为氧化应激反应对于多发性硬化的发生发展起到重要作用。

本实验建立实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠模型, 免疫 3 d 后给予黄芩苷灌胃, 观察小鼠的发病情况, 数据显示 EAE 小鼠普遍在免疫后 10 d 发病, 而给予黄芩苷干预后, 发病时间显著延迟, 且小鼠

临床症状明显减轻, 并逐渐平缓。提示黄芩苷具有改善 EAE 小鼠神经功能的作用。

线粒体是 ATP 生成的主要来源, ATP 水平能够反映线粒体的功能状况^[9]。线粒体损伤引起线粒体膜通透性增加, 钙离子内流增加, 促进氧自由基的生成, 使合成 ATP 产生障碍, 最终导致细胞凋亡^[10]。有报道指出氧化损伤的强信号存在于多发性硬化活动性病灶区域, 而非活动性病灶显示较弱的氧化损伤信号^[11]。本实验显示实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠脊髓组织中 ATP 含量水平显著降低, TUNEL 染色结果显示阳性凋亡细胞数增多, 在给予黄芩苷干预后, 显著升高 EAE 组小鼠脊髓组织的 ATP 含量水平, 但凋亡细胞数显著减少, 并与黄芩苷剂量呈负相关。提示黄芩苷可能通过提高 ATP 的含量, 具有保护线粒体的作用, 同时通过抑制细胞凋亡, 起到发挥保护神经元的作用, 从而提高 EAE 小鼠的神经功能, 对实验性自身免疫性脑脊髓炎具有一定的改善作用。



注: * $P < 0.05$, vs 正常对照组; # $P < 0.05$, vs 模型组。 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

图 4 Cleaved cas-9 和 Cleaved cas-3 蛋白表达水平的变化

Note. * $P < 0.05$, vs. the control group;

$P < 0.05$, vs. the EAE group.

Fig. 4 Protein expression of cleave cas-9 and cleaved cas-3 in the mice

Bcl-2 家族中的促凋亡因子 Bax 与抗凋亡因子 Bcl-2 之间相互作用,当 Bcl-2 激活后,导致线粒体外膜孔道形成,促使 cyt-c 转移至胞质中,激活 caspase-9,被激活的 caspase-9 进而激活 caspase-3,从而诱导细胞凋亡^[12]。本实验发现 EAE 小鼠 Bcl-2、cleaved caspase-9 与 cleaved caspase-3 的表达在免疫后升高,与线粒体损伤相对应,黄芩苷显著抑制 Bcl-2、cleaved caspase-9 与 cleaved caspase-3 的表达,抑制线粒体损伤,减少促凋亡因子的水平同时提高抗凋亡因子的水平,从而减少细胞凋亡的发生。提示黄芩苷可能通过线粒体内源性凋亡途径抑制 EAE 小鼠脊髓组织细胞凋亡,从而发挥对实验性自身免疫性脑脊髓炎的改善作用。

综上所述,本实验观察黄芩苷提高 EAE 小鼠的神经功能,通过发挥对线粒体的保护作用,抑制线

粒体途径的细胞凋亡,为黄芩苷用于临床研究提供了一定的实验理论基础。

参考文献:

[1] Calabres M, Favaretto A, Martini V, et al. Grey matter lesions in MS from histology to clinical implications [J]. Prion, 2013, 7 (1) : 20 - 27.

[2] Mascanfroni ID, Yeste A, Vieira SM, et al. IL-27 acts on DCs to suppress the T cell response and autoimmunity by inducing expression of the immunoregulatory molecule CD39 [J]. Nat Immunol, 2013, 14 (10) : 1054 - 1063.

[3] Guo M, Zhang N, Li D, et al. Baicalin plays an anti-inflammatory role through reducing nuclear factor- κ B and p38 phosphorylation in *S. aureus*-induced mastitis [J]. Int Immunopharmacol, 2013, 16 (2) : 125 - 130.

[4] Zhou BR, Yin HB, Xu Y, et al. Baicalin protects human skin fibroblasts from ultraviolet A radiation-induced oxidative damage and apoptosis [J]. Free Radic Res, 2012, 46 (12) : 1458 - 1471.

[5] 林森. 黄芩苷对大鼠肾脏缺血在灌注损伤保护作用及机制研究 [D]. 复旦大学, 2013.

[6] Tu XK, Yang WZ, Shi SS, et al. Baicalin inhibits TLR2/4 signaling pathway in rat brain following permanent cerebral ischemia [J]. Inflammation, 2011, 34 (5) : 463 - 470.

[7] 胡晓, 袁军, 万兴, 等. 实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠模型的建立及其病理学和影像学表现 [J]. 2009, 34 (6) : 613 - 617.

[8] Safavizadeh N, Rahmani SA, Zaefizadeh M. Investigation of cytochrome c oxidase gene subunits expression on the multiple sclerosis [J]. Indian J Hum Genet, 2013, 19 (1) : 18 - 25.

[9] Wysocka-Kapcinska M, Kucharczyk R. Structure, biogenesis and mechanism of function of the mitochondrial ATP synthase complex [J]. Postepy Biochem, 2012, 58 (3) : 344 - 352.

[10] 秦双立, 官至忠. 线粒体损伤和氧化应激的关系 [J]. 国外医学 (医学地理分册), 2013, 34 (3) : 197 - 200.

[11] Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, et al. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination [J]. Ann Neurol, 2000, 47 (6) : 707 - 717.

[12] Qi X, Lewin AS, Sun L, et al. Suppression of mitochondrial oxidative stress provides long-term neuroprotection in experimental optic neuritis [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007, 48 (2) : 681 - 691.

[修回日期] 2016 - 04 - 29