

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)05-0432-03

## 糖皮质激素在实验性变态反应性脑脊髓炎中对调节性 T 细胞的作用

刘 泉,王全立,周 勇 (军事医学科学院 9 所,北京 100053)

**Effect of glucocorticoid on CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis**

LIU Gao, WANG Quan-Li, ZHOU Yong

Ninth Institute, Military Academy of Medical Science, Beijing 100053, China

**【Abstract】** AIM: To investigate the modification by glucocorticoid on CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). **METHODS:** Glucocorticoid or placebo (control group) was injected into Balb/c mice that had been immunized with bovine myelin basic protein (MBP) extracted from the fresh spinal cord of OX. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cell specific FOXP3 and blood IL-10 were evaluated with flow cytometry and ELISA, respectively. **RESULTS:** Compared with the control group, less EAE symptoms were found in the glucocorticoid-injected group, and the levels of FOXP3 and blood IL-10 were statistically different from those in the control group. **CONCLUSION:** Glucocorticoid can relieve the symptoms of EAE by increasing regulatory T cells and their activities, which offers a potential theoretic basis for its clinical application.

**【Keywords】** glucocorticoid; encephalomyelitis, experimental autoimmune; T cells; FOXP3; IL-10

**【摘要】**目的: 研究糖皮质激素在实验性变态反应性脑脊髓炎(EAE)治疗中对调节性 T 细胞的调变作用。方法: 采用从新鲜牛脊髓中提取的髓鞘碱性蛋白(MBP)免疫诱导 Balb/c 小鼠成功诱发 EAE 后, 分组注射糖皮质激素或者安慰剂, 在采用指标评估基础上, 分别采用流式细胞术和 ELISA 方法检测 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> 调节性 T 细胞特异性 FOXP3 和血中 IL-10 的表达水平。结果: 与对照组相比, 糖皮质激素注射组小鼠发病程度轻, 调节性 T 细胞特异性 FOXP3 和血中 IL-10 的表达水平均有明显差异。结论: 糖皮质激素可能通过增加调节性 T 细胞的数量及活性, 减轻 EAE 的症状, 为临床治疗多发性硬化(MS)提供理论基础。

**【关键词】** 糖皮质激素; 脑脊髓炎; 自身免疫性; 实验性; T 细胞; FOXP3; IL-10

**【中图分类号】** R967 **【文献标识码】** A

收稿日期 2006-11-30; 接受日期 2006-12-30

作者简介: 刘 泉, 硕士生(导师王全立), 主治医师。Tel (010)

62876765 Email beijingliugao@hotmail.com

**0 引言**

多发性硬化(multiple sclerosis, MS)是由 T 细胞介导的、以中枢神经系统(CNS)白质脱髓鞘病变为特点的自身免疫性疾病<sup>[1]</sup>。糖皮质激素可通过多种途径调节免疫功能, 是目前治疗 MS 急性复发期的首选药物<sup>[2]</sup>。在动物模型中, 实验性变态反应性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)是一种由 Th 细胞介导的局限于中枢神经系统的迟发性超敏反应型自身免疫性疾病, 被认为是人类 MS 公认的理想动物模型<sup>[3]</sup>。本实验我们用从牛脊髓中提取出的髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein, MBP), 同时注射百日咳杆菌菌液, 诱发 Balb/c 小鼠产生 EAE 后, 辅以糖皮质激素治疗, 检测 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> 调节性 T 细胞特异性 FOXP3 和血中 IL-10 的表达水平。

**1 材料和方法**

**1.1 材料** Balb/c 雌性小鼠 30 只, 6~8 wk 龄, 体重 17~20 g, 购自第四军医大学实验动物中心。百日咳杆菌菌液购自成都生物制品研究所。福氏完全佐剂(FCA)及其他未声明试剂皆购自 Sigma 公司, 氢化可的松(hydrocortisone, HC)浓度为 5 g/L, 由天津金耀氨基酸有限公司提供。检测鼠调节性 T 细胞的 Mouse Treg Flow™ 试剂盒购自 Biologend 公司, IL-10 ELISA 检测试剂盒购自 R&D System 公司。

**1.2 方法**

**1.2.1 MBP 的提取及定量** MBP 的提取参照文献[4] 将获得的新鲜牛脊髓去除杂质洗净后, 将 200 mL 预冷的氯仿-甲醇(2:1)混和液与 100 g 牛脊髓用高速组织匀浆机制成组织匀浆。将匀浆倒入烧杯中, 加入 800 mL 预冷的氯仿-甲醇(2:1)混和液, 置于 4℃ 冰箱磁力搅拌过夜。将磁力搅拌后的匀浆进行真空抽滤后得到的滤渣重新加入 1000 mL 氯仿-甲醇混和液, 磁力搅拌过夜。同法操作 6 次。取滤渣用 300 mL 消毒纯水溶解, 调 pH 至 3.0。置于 4℃ 冰箱中, 磁力搅拌 4 h, 12 000 r/min 离心 1 h。将上清液装入透析袋, 放入消毒纯水透析过夜。将透析袋用 PEG-20000 浓缩 3.5 h, 分装, 置于 -70℃ 备用。取少量浓缩液适量稀释后, 紫外分光光度计上测定 A<sub>260</sub> 和 A<sub>280</sub>, 计算出

浓缩液中的蛋白质浓度。蛋白质浓度( $\text{g/L}$ )= $(1.45 A_{280} - 0.74 A_{260}) \times$  稀释倍数。

1.2.2 EAE 的诱导及发病动物的评估 按照每只小鼠注射 MBP:FCA (1:1) 混和液 0.4 mL, 百日咳杆菌菌液:PBS 混合液(1:50) 0.2 mL。免疫时间:第 1, 7 日共免疫 2 次。对照组的小鼠不注射抗原物质。根据 Kono 等<sup>[5]</sup>的分级方法将小鼠的症状分为 6 级, 具体为 0 级(没有任何临床症状); 1 级(动物尾部无力); 2 级(动物尾部无力 + 前肢或后肢中等无力); 3 级(前肢或后肢严重无力, 人为翻身后不能恢复); 4 级(肢体麻痹, 人为翻身后不能恢复); 5 级(濒死状态)。

1.2.3 Balb/c 小鼠 EAE 的糖皮质激素注射及外周血采集 将 Balb/c 小鼠分为 EAE 诱导组、EAE 诱导同时肌肉注射生理盐水组和 EAE 诱导同时肌肉注射 HC 组, 每组 10 只。EAE 诱导同时肌肉注射 HC 组按照每只小鼠每日注射 0.1 mL HC 连续 7 d 或者到病情缓解。7 d 后每组各取 5 只小鼠心脏血液, 抗凝存放。其余 5 只进行发病评估。

1.2.4 鼠外周血 IL-10 及调节性 T 细胞检测 将抗凝血稍静置, 取上层血浆, 按照 ELISA 检测试剂盒说明书检测外周血 IL-10 含量, 余下血细胞用生理盐水混匀后, 以小鼠调节性 T 细胞检测试剂盒 Mouse Treg Flow™ 测定调节性 T 细胞水平。

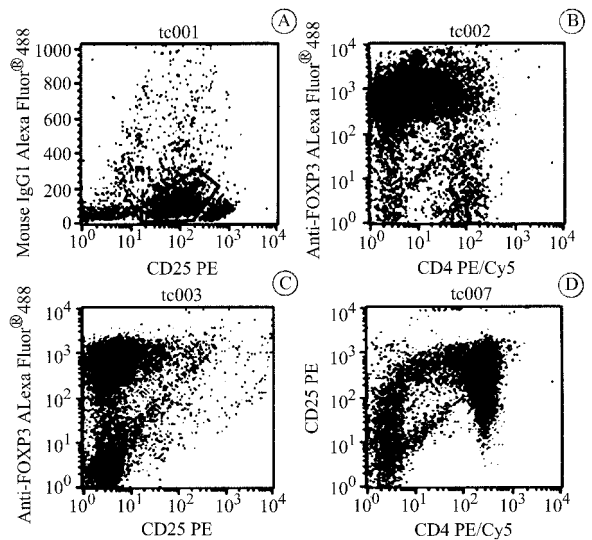
统计学处理: 实验所得数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 10.0 软件进行方差分析及 LSD-*t* 检验, 以  $P < 0.05$  表示具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 小鼠指征评估 与文献[4]描述类似, Balb/c 小鼠在 MBP 等免疫条件下, 最早第 3 日出现尾部无力、后肢稍外展的临床症状, 第 10~15 日, 症状达到高峰, 出现质量减轻、行动非常缓慢、推之不动、弓背、尾部无力、后肢无力、明显外展、瘫痪等症状, 最高临床分级达 4 级, 第 21 日开始, 症状缓解, 第 30 日基本恢复正常。但是在糖皮质激素治疗组, 最早第 10 日开始时, 才出现轻微的尾部无力、后肢稍外展的 1 到 2 级临床症状, 第 13~15 日, 症状达到高峰, 出现质量减轻等症状, 最高临床分级达到 3 级, 病情较快缓解, 到第 19 日基本恢复正常。

2.2 小鼠调节性 T 细胞的检测 在糖皮质激素治疗组,  $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+$  和  $\text{FOXP3}^+$  的调节性 T 细胞水平明显高于对照组 [ $(15.8 \pm 3.2)\% \text{ vs } (2.4 \pm 1.6)\%$ ,  $P < 0.05$ ,  $n = 5$ ] 和未治疗组 [ $(15.8 \pm 3.2)\% \text{ vs } (2.9 \pm 1.5)\%$ ,  $P < 0.05$ ,  $n = 5$ ], 对照组和未治疗

组间没有明显差别 [ $(2.4 \pm 1.6)\% \text{ vs } (2.9 \pm 1.5)\%$ ,  $P > 0.05$ ,  $n = 5$ ] (图 1)。



A: 对照; B:  $\text{CD4}/\text{FOXP3}$  双染色; C:  $\text{CD25}/\text{FOXP3}$  双染色; D:  $\text{CD4}/\text{CD25}$  双染色。

图 1 糖皮质激素治疗组调节性 T 细胞的分布

2.3 小鼠外周血 IL-10 水平的检测 在糖皮质激素治疗组, IL-10 水平高于对照组 [ $(80.5 \pm 8.6) \text{ ng/L vs } (18.6 \pm 5.6) \text{ ng/L}$ ,  $P < 0.05$ ,  $n = 5$ ] 和未治疗组 [ $(80.5 \pm 8.6) \text{ ng/L vs } (20.4 \pm 6.3) \text{ ng/L}$ ,  $P < 0.05$ ,  $n = 5$ ], 对照组和未治疗组间没有明显差别 [ $(18.6 \pm 5.6) \text{ ng/L vs } (20.4 \pm 6.3) \text{ ng/L}$ ,  $P > 0.05$ ,  $n = 5$ ].

## 3 讨论

MS 是 T 细胞介导的 CNS 脱髓鞘疾病, 已致敏的 T 淋巴细胞通过血脑屏障进入脑内, 在抗原呈递细胞作用下再次活化<sup>[6]</sup>。以往发现, MS 发病时, 小胶质细胞作为 CNS 内最重要的抗原呈递细胞, 对激活 T 细胞具有重要作用<sup>[7]</sup>。对于针对 MS 或者 EAE 糖皮质激素治疗的 T 淋巴细胞的研究中, 往往着重于效应细胞, 如  $\text{CD4}^+ \text{Th1}/\text{Th2}$  细胞, 或者  $\text{CD8}^+$  的杀伤性 T 细胞, 但是对于这几年的研究热点  $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+ \text{FOXP3}^+$  调节性 T 细胞在糖皮质激素治疗下的调变, 迄今未见文献报道。

李茂全等<sup>[8]</sup>发现, 在体外利用小胶质细胞系 N9 模型模拟 EAE 糖皮质激素治疗后, N9 表面的抗原呈递分子 MHC II 和共刺激分子 OX40L 表达都显著下调。T 细胞活化的双信号学说指出, 抗原呈递细胞将抗原处理成肽段与 MHC 结合形成复合物提供 T 细胞活化所需的第一信号, 而抗原呈递细胞与 T 细胞表面的共刺激分子相互作用提供第二信号<sup>[9]</sup>。OX40

及其配体 OX40L 是近年发现的一对共刺激分子, 研究证实 OX40/OX40L 的作用为抗原呈递细胞维持活化后 T 淋巴细胞功能所必需<sup>[10]</sup>。与此同时, Ito 等<sup>[11]</sup>发现 OX40L 分子能够从诱发阶段到效应阶段以及记忆性调节性 T 细胞的功能丧失。所以我们考虑是否在 EAE 模型中, 糖皮质激素一方面通过削弱小胶质细胞的 APC 功能, 减低特异性 T 细胞杀伤效应; 另一方面减弱 OX40L 的表达, 从而减弱对局部调节性 T 细胞的“失能”效应。我们的实验结果显示, 糖皮质激素作用后, 小鼠的 EAE 无论从发病的时间还是周期都明显改善, 调节性 T 细胞的数量与单纯 MBP 免疫组和对照治疗组比较都有明显增加。对应地, 反映调节性 T 细胞功能的 IL-10 分泌水平也明显增加。IL-10 也是抑制 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞的重要细胞因子<sup>[12]</sup>。

糖皮质激素对整个免疫过程的调节是多角度和多层次的<sup>[13]</sup>, 我们的实验结论在一定基础上解释了临床上激素治疗对 MS 的缓解的原因。由于小鼠的 EAE 模型和人类的 MS 有一定差距, 基于临床患者中调节性 T 细胞的研究需要进一步进行。

## 【参考文献】

- [1] Hafler DA, Slavik JM, Anderson DE, et al. Multiple sclerosis[J]. Immunol Rev, 2005, 204: 208-231.
- [2] Rizvi SA, Bashir K. Other therapy options and future strategies for

- treating patients with multiple sclerosis[J]. Neurology, 2004, 63(12 Suppl 6): S47-S54.
- [3] Skundric DS. Experimental models of relapsing-remitting multiple sclerosis: current concepts and perspective[J]. Curr Neurovasc Res, 2005, 2(4): 349-362.
- [4] 贾怡, 陈文捷, 李虹, 等. 牛 MBP 诱导 BALB/c 和 C57BL/6 小鼠实验性变态性脑脊髓炎样反应的研究[J]. 现代免疫学, 2005, 25(3): 187-190.
- [5] Kono DH, Urban JL, Horvath SJ, et al. Two minor determinants of myelin basic protein induce EAE in SJL/J mice[J]. J Exp Med, 1988, 168: 213-227.
- [6] Kanwar JR. Anti-inflammatory immunotherapy for multiple sclerosis/experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) disease[J]. Curr Med Chem, 2005, 12(25): 2947-2962.
- [7] Jack C, Ruffini F, Bar-Or A, et al. Microglia and multiple sclerosis[J]. J Neurosci Res, 2005, 81(3): 363-373.
- [8] 李茂全, 王艳艳, 余晓东, 等. 糖皮质激素对活化后小胶质细胞株 N9 中 MHC-II 和 OX40L 表达的影响[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2006, 13(2): 69-72.
- [9] Peggs KS, Allison JP. Co-stimulatory pathways in lymphocyte regulation: the immunoglobulin superfamily[J]. Br J Haematol, 2005, 130(6): 809-824.
- [10] Bertram EM, Dawicki W, Watts TH. Role of T cell costimulation in anti-viral immunity[J]. Semin Immunol, 2004, 16(3): 185-196.
- [11] Ito T, Wang YH, Duramad O, et al. OX40 ligand shuts down IL-10-producing regulatory T cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(35): 13138-13143.
- [12] Xystrakis E, Boswell SE, Hawrylowicz CM. T regulatory cells and the control of allergic disease[J]. Expert Opin Biol Ther, 2006, 6(2): 121-133.
- [13] Herold MJ, McPherson KG, Reichardt HM. Glucocorticoids in T cell apoptosis and function[J]. Cell Mol Life Sci, 2006, 63(1): 60-72.

编辑 袁天峰

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2007)05-0434-01

## 藏红花酒治疗压疮 9 例疗效观察

贾红兵, 高云, 李栗辉, 郑岚

(解放军第 323 医院泌尿外科, 陕西西安 710054)

【关键词】藏红花酒, 湿敷, 压疮

【中图分类号】R473.5 【文献标识码】B

0 引言 压疮是临床上最常见的并发症之一。压疮是局部组织持续受压、血液循环障碍、持续缺血缺氧、营养不良而形成的压力性溃疡。多发、大面积压疮不但痊愈慢, 而且易复发, 给患者带来极大的痛苦<sup>[1]</sup>。我们采用藏红花酒局部湿敷治疗压疮, 特别是 II 期以上压疮, 收到良好疗效。

### 1 资料和方法

1.1 一般资料 本组 9 例 (男 7 女 2) 例, 年龄 68 岁~82 岁。据压疮的临床表现进行评估: 浅表溃疡期 7 例, 坏死溃疡期 2 例。压疮面积: <2 cm<sup>2</sup> 2 例, 2~5 cm<sup>2</sup> 4 例, >5 cm<sup>2</sup> 3 例。患者全身状况: 极度消瘦 4 例, 大小便失禁 3 例, 肥胖 2 例。压疮分期: II 期 6 例, III 期 3 例。压疮发生时间 6 d~7 mo。

1.2 药物配制 藏红花 20 g 用 500 mL/L 乙醇浸泡 1 wk。1

wk 后过滤装瓶备用。

1.3 方法 彻底清创后, 用藏红花酒均匀地喷于疮面上, 湿敷藏红花酒纱条后, 无菌敷料包扎, 每日换药 3 次~4 次。

1.4 疗效标准 显效: 换药 1~2 次, 伤口内分泌物消失, 创面清洁, 肉芽组织鲜红, 四周皮肤向心性生长; 有效: 换药 4~5 次, 伤口内分泌物消失, 肉芽组织开始生长, 创缘出现新生上皮细胞; 无效: 换药 8~9 次, 伤口内分泌物仍存在。

2 结果 本组 9 例, 有效率 100%。浅表溃疡期 7 例, 治愈时间 10 d; 坏死溃疡期 2 例, 治愈时间 26 d。

3 讨论 压疮的基本病理改变首先是患者受压部位的组织缺血, 继之发生坏死<sup>[2]</sup>。藏红花, 又叫红花, 原产埃及, 系从地中海沿岸经印度传入西藏。具有活血祛瘀、通络、凉血解毒、养血的功能。能促进血管新生, 改善创面微循环, 消除炎性水肿, 加速创面坏死组织脱落, 促进肉芽组织生长, 加速病损组织修复的作用。同时, 500 mL/L 乙醇消毒, 对皮肤、黏膜、伤口的刺激小, 并且有杀菌、使组织脱水、促进创面干燥的作用。藏红花酒湿敷治疗压疮特别是创面肉芽组织生长缓慢或无肉芽组织生长的 III、IV 期压疮效果明显, 且价格低廉, 取材方便, 为临床应用提供了经验。

### 【参考文献】

- [1] 何永莲. 综合治疗老年病人深度压疮的疗效观察[J]. 护理研究, 2006, 20(5): 1247-1248.
- [2] 费珍美. 中西医结合治愈压疮 67 例体会[J]. 护理研究, 2003, 17(4B): 474.

编辑 许福明

收稿日期 2007-01-17; 接受日期 2007-01-30

作者简介 贾红兵, 主管护师. Tel (029) 84756185 Email: cardlab@fmmu.edu.cn