

补肾固髓片对实验性变态反应性脑脊髓炎动物发病及病理组织形态的影响

刘晓艳¹ 孙 怡¹ 王安民² 王岚芬¹

摘要 为了观察中药补肾固髓片对实验性变态反应性脑脊髓炎(EAE)动物的发病及病理组织形态的影响,本实验采用兔脊髓匀浆和完全福氏佐剂制成的抗原-佐剂乳化液诱导豚鼠EAE动物模型,应用中药补肾固髓片作为治疗药物,以醋酸泼尼松作为对照药物,经口灌药。结果,大剂量补肾固髓片能明显抑制EAE发病,减轻其病情,对脑和脊髓的炎症反应和脱髓鞘改变亦有明显抑制作用,与对照药醋酸泼尼松组比较差异无显著性。中剂量补肾固髓片在某些方面有效,小剂量组则无明显疗效。表明大剂量补肾固髓片能抑制EAE动物发病,并能明显改善其病情及病理改变,提示中药补肾固髓片有临床研究和应用价值;而且其治疗作用与给药剂量相关。

主题词 脑脊髓炎,实验性自身免疫/中药疗法 @ 补肾固髓片

多发性硬化(MS)是中枢神经系统脱髓鞘疾病。实验性变态反应性脑脊髓炎(EAE)的临床症状、病理改变及免疫学特征与MS相似,故用于MS治疗的实验研究^[1,2]。中医药对EAE发病的影响研究很少,为了探讨中医药对多发性硬化的治疗作用,我们应用补肾固髓片对EAE豚鼠发病情况和神经组织病理的影响进行了观察,并与醋酸泼尼松进行对照研究。

1 材料

1.1 实验动物:豚鼠48只,雌雄各半,6~8周龄左右,体重280~320g(购自北京药品检定所动物繁育场,京动管字1994-073号)。

1.2 主要试剂及药物:液体石蜡,减毒卡介苗,戊巴比妥钠,补肾固髓片(由淫羊藿15g,肉苁蓉12g,仙茅10g,生地黄15g,制首乌15g,郁金10g,丹参15g等药物组成,中国中医研究院西苑医院实验药厂提供,每片含生药0.5g),醋酸泼尼松5mg/片(北京第四制药厂生产)。

1.3 主要仪器:切片机、展片机、烤片机、Olympus显微镜、Leica DC 100—图像分析仪。

2 方法

2.1 EAE动物模型的制备:选择体重2.5kg的健康

家兔,麻醉后心脏放血致死,立即在无菌条件下分离出脊髓,取4g与完全福氏佐剂(无菌液体石蜡16ml,减毒卡介苗80mg)充分混合,配成抗原-佐剂乳化液,给豚鼠两后肢每足底皮下注射0.05ml,8天后按同法再注射1次,两次注射总量为0.2ml/只。致敏5~7天后发病,发病动物饮食减少,体重下降,有的表现为后肢瘫,有的表现为四肢瘫,还有的伴尿、便失禁^[1]。

2.2 实验分组与给药方法:将豚鼠性别均衡下随机分为6组,每组8只:补肾固髓片大、中、小剂量组、醋酸泼尼松组、模型组、空白对照组。各给药组均经口灌药,补肾固髓片大、中、小剂量组分别按13.2g/kg、6.6g/kg、3.3g/kg体重的生药以蒸馏水配制成不同浓度灌服(3ml/只);醋酸泼尼松组按4.375mg/kg体重用蒸馏水配制成溶液灌服(3ml/只);模型组、空白对照组均灌服等体积蒸馏水(3ml/只),每天1次。补肾固髓片给药组于动物致敏前14天给药,醋酸泼尼松组于动物发病后立即给药,各给药组均于致敏后1月停药。

2.3 EAE神经组织病理切片制备及观察

2.3.1 取材:每只发病动物均于濒死状态下麻醉后心脏放血处死,空白对照组动物于4周后处死,发病后未死亡动物及未发病动物分别于致敏后6~8周处死,动物处死后立即将大脑和脊髓取出,放置于福尔马林液中固定。每只动物脑部取材为大脑前叶、海马回-丘脑的冠状切面、脑干、小脑的矢状切面4部分,脊髓为颈膨大、胸髓(约5~8节段)和腰膨大3部分。

2.3.2 切片染色:(1)HE染色:取材标本梯度酒精脱水后置二甲苯透明,石蜡包埋;切片厚5μm,烤片;再脱蜡和脱水,苏木素染色,盐酸酒精分化,氨水反蓝,伊红复染;梯度酒精脱水;过二甲苯、树胶固封。(2)髓鞘染色:髓鞘染色用Loyez苏木素染色法。脱水、石蜡包埋、切片、烤片、再脱蜡和脱水同HE染色,然后蒸馏水洗,入4%铁明矾水溶液24小时,蒸馏水充分洗,再入Loyez苏木素染液1~2小时(置56℃温箱中),自来水浸洗10分钟,各级酒精脱水,二甲苯透明,树胶固封。

2.3.3 病理组织学观察及图像分析:首先于普通显微镜下观察每张切片的病理组织形态,然后用图像分析仪分析每只动物的炎细胞浸润及脱髓鞘部分所占面积(百分数)。

基金项目:国家中医药管理局科研基金资助课题(95A21A9)

1 中国中医研究院西苑医院神经科,北京西苑操场1号(100091)

2 中国中医研究院基础理论研究所病理室

收稿日期:2000-04-30;修回日期:2000-12-25

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

表 1 EAE 各组动物临床发病情况比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	潜伏期(天)	体重损失(g)	临床体征评分(分)
模型组	8	6.75±2.43	89.5±11.84	4.38±1.19
醋酸泼尼松组	8	9.40±5.50	43.8±8.11**	1.88±2.10
补肾固髓片小剂量组	8	7.75±2.60	85.13±12.04	4.25±1.49
补肾固髓片中剂量组	8	11.17±4.36	62.33±12.26**	1.88±2.10
补肾固髓片大剂量组	8	14.75±1.89*	39.25±8.96**	0.38±0.74**

与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.4 观察指标:观察各组动物的临床发病情况,观察其发病潜伏期、体重损失情况(发病前每周测 1 次体重,致敏后每 3 天测 1 次体重)、发病率、死亡率、临床体征(临床体征按参考文献^[2,3]评分。0 分:未发病;1 分:后肢轻瘫;2 分:后肢中度瘫;3 分:后肢重度瘫加轻度尿失禁;4 分:3 分级加前肢轻度瘫加尿便失禁;5 分:4 分级加濒死状态,或死亡)。肉眼观察每只动物的脑和脊髓的形态,并于普通光镜下观察每张切片的病理组织形态。用图像分析仪分析每只动物病理切片的炎细胞浸润及脱髓鞘部分所占面积(百分数)。

2.5 统计学方法:所有资料用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用美国 Stata4.0 版软件对发病潜伏期、体重损失、临床体征评分及炎细胞浸润及脱髓鞘部分所占面积(百分数)进行单因素方差分析,对发病率和死亡率进行 χ^2 检验。

3 结果

3.1 各组 EAE 动物临床发病情况比较:空白对照、模型、醋酸泼尼松、补肾固髓片小、中、大剂量各组发病率分别为 0/8、8/8、5/8、8/8、6/8、4/8;病死率分别为 0/8、7/8、3/8、6/8、5/8、3/8,各组间比较差异均无显著性($P > 0.05$)。表 1 示,模型组动物病情较重,醋酸泼尼松组动物病情稍轻,与模型组比较其体重损失明显减少($P < 0.01$)、临床体征评分有降低趋势($P = 0.068$);补肾固髓片中剂量组与模型组比较,体重损失减少($P < 0.01$),临床体征评分有减低趋势($P = 0.068$);补肾固髓片大剂量组动物病情较轻,与模型组比较其发病潜伏期延长($P < 0.05$),体重损失明显减少($P < 0.01$),临床体征评分减低($P < 0.01$)。

3.2 病理组织学观察

肉眼观察:各动物标本取材后观察,模型组和补肾固髓片小剂量组早期发病动物脑和脊髓表面静脉充盈,未发现出血及凹陷的斑块组织;其他动物标本均未见静脉充盈、出血及凹陷的斑块组织。

普通光镜观察:空白对照组:神经组织病理检查未见异常。模型组:脑和脊髓蛛网膜下腔可见血管扩张充血,有少量淋巴细胞、中性粒细胞浸润。大脑、脑干的病变以脑室周围、室管膜下病变最为明显,白质血管扩张

充血,Rirchow—Robin 氏空隙扩张,周围有多量淋巴细胞、单核细胞浸润,还有少量嗜酸性粒细胞和中性粒细胞,明显处血管周围呈袖口状浸润;星形胶质细胞及少突胶质细胞增生,胞浆肿胀,数量增多,小胶质细胞亦增生变形。大脑、脑干白质处呈斑状及小片状髓鞘脱失,轻处则见轴突肿胀、蛇形、断裂、甚或消失,脑干以桥脑髓鞘脱失最为明显,呈灶状、片状。上述病变内还可见有格子细胞。部分神经元细胞胞浆肿胀,致使胞体呈圆形,尼氏小体减少或消失;有的神经元胞体固缩浓染,收缩呈三角形,核仁消失,有的胞核与深染的胞浆不易区别开来;脊髓病变腰髓较颈髓、胸髓为重,白质内血管扩张充血、水肿,血管周围有淋巴细胞及单核细胞浸润,可见小灶状及片状髓鞘脱失,其附近轴突亦可见肿胀、蛇形、断裂、甚或消失,有的神经元胞浆肿胀,有的神经元固缩浓染。醋酸泼尼松组:早期发病动物脑和脊髓白质内血管扩张充血、炎细胞浸润、胶质细胞增生、神经元和轴突改变及髓鞘脱失较模型组略轻,发病较晚的动物和未发病的动物无明显炎细胞浸润及髓鞘脱失,神经元、轴突亦无明显异常。补肾固髓片小、中剂量组:小剂量组炎细胞浸润、胶质细胞增生、神经元和轴突改变及髓鞘脱失较模型组略轻,中剂量组上述病变较模型组、小剂量给药组病变轻。补肾固髓片大剂量组:少数早期发病动物脑和脊髓的血管扩张充血,血管周围可见少量炎细胞浸润及轻微的髓鞘脱失,晚期发病动物和未发病动物无炎细胞浸润及髓鞘脱失,胶质细胞、神经元和轴突亦无明显异常。

3.3 各组炎细胞浸润及脱髓鞘面积图像分析结果比较:表 2 示,模型组与空白对照组各项指标比较差异有非常显著性意义($P < 0.01$);醋酸泼尼松组与模型组比较炎细胞浸润明显减轻($P < 0.01$),脱髓鞘面积亦减少($P < 0.05$);补肾固髓片大剂量组与模型组比较炎细胞浸润面积明显减少($P < 0.01$),脱髓鞘面积明显减少($P < 0.01$)。

4 讨论

我国多发性硬化临床病例报道有逐年增多的趋势,中医药治疗多发性硬化的临床报道亦愈来愈多,并取得了一定的疗效,但中医药的实验研究却很少,仅见

表2 EAE 各组动物炎细胞浸润与脱髓鞘面积图像比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	炎细胞浸润面积	桥脑脱髓鞘面积	脊髓脱髓鞘面积
空白对照组	8	1.38 ± 0.55**	2.79 ± 0.94**	12.76 ± 1.30**
模型组	8	7.75 ± 0.72	8.63 ± 2.06	21.19 ± 3.02
醋酸泼尼松组	8	4.61 ± 1.02**	5.52 ± 1.65**	16.10 ± 3.63*
补肾固髓片小剂量组	8	6.67 ± 1.12	7.81 ± 1.06	19.28 ± 1.19
补肾固髓片中剂量组	8	5.87 ± 1.25	6.19 ± 1.20	17.04 ± 2.91
补肾固髓片大剂量组	8	3.92 ± 1.54**	5.17 ± 1.67**	14.58 ± 3.37**

与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

郁金、雷公藤对实验性变态反应性脑脊髓炎动物影响的报道^[1,2,4]。本实验观察发现补肾固髓片对 EAE 有一定治疗作用。

模型组动物病情较重,光镜下可见明显的炎细胞浸润和轻度脱髓鞘改变,与文献报道相符^[1,5];醋酸泼尼松组动物病情稍轻,与模型组比较其体重损失明显减少、临床体征评分有降低趋势、炎细胞浸润明显减轻、髓鞘脱失面积亦减少;补肾固髓片小剂量组动物的临床发病情况、炎细胞浸润和脱髓鞘面积与模型组相比差异无显著性。补肾固髓片中剂量组与模型组相比,体重损失减少;临床体征评分、炎细胞浸润面积与模型组比较有减少趋势;补肾固髓片大剂量组动物病情较轻,与模型组比较其发病潜伏期延长、体重损失明显减少,临床体征评分减低,光镜下观察及图像分析结果亦表明,其炎细胞浸润和脱髓鞘明显减轻,与模型组比较炎细胞浸润面积明显减少、脱髓鞘面积明显减少。补肾固髓片大、中剂量组分别与醋酸泼尼松组比较,各项指标经统计学处理差异均无显著性。对发病率和死亡率的统计处理各组间比较差异无显著性,考虑主要原因是样本数小,进一步研究尚需加大样本量。

中药补肾固髓片主要由淫羊藿、肉苁蓉、仙茅、生地黄、郁金、丹参、制何首乌等药物组成。淫羊藿、仙茅、肉苁蓉补肾阳,强筋骨;生地黄、制何首乌养阴填精益肾;郁金、丹参活血化瘀,诸药合用补肾阳,益精髓,活血通经。现代药理研究证明,上述诸药可从不同方面调节免疫和内分泌功能,如动物实验表明淫羊藿多糖可促进抑制性 T 淋巴细胞(Ts)产生;在细胞培养系统内,0.04 μg/ml 浓度的淫羊藿可明显抑制促有丝分裂原诱发的小鼠淋巴细胞增殖,对 T、B 淋巴细胞的增殖均呈抑制作用^[6]。肉苁蓉能增强单核-巨噬细胞的吞噬能力,并且淫羊藿有激素样作用,肉苁蓉有激活肾上腺、释放皮质激素的作用^[6,7]。生地黄对外周血 T 淋巴细胞具有双向调节作用,可抑制免疫功能亢进,而且既能促进肾上腺皮质激素的合成,还能减轻糖皮质激素对垂体-肾上腺皮质系统功能和形态的影响^[6,7]。丹参能够改善体液免疫功能,对已沉积的抗原-抗体复合

物有促进吸收和消除的作用。郁金水浸醇提取物在多方面具有类似糖皮质激素样作用,对网状内皮系统、单核-巨噬细胞吞噬系统及体液免疫均有抑制作用^[8];应用郁金水浸醇提取物治疗 EAE 豚鼠,发现可明显降低其发病率和死亡率^[1];淫羊藿、生地黄、丹参、郁金还有一定的抗炎作用^[6,7]。由此可知中药补肾固髓片可通过改善机体的免疫功能和内分泌调节机制,起到积极的治疗作用。

综上所述,大剂量补肾固髓片可抑制或延缓 EAE 动物发病,并减轻其病情,防治炎症及髓鞘脱失等,与醋酸泼尼松比较差异无显著性。中剂量补肾固髓片在某些方面有效,而小剂量补肾固髓片则无明显效果。实验结果说明,补肾固髓片能抑制 EAE 动物发病,并能减轻其病情,提示补肾固髓片对 MS 有治疗作用。

参考文献

- 1 戴例明,陈敏珠,徐叔云.郁金对豚鼠实验性过敏性脑脊髓炎模型的治疗.药学学报,1982,17(9):693-694.
- 2 戚晓昆,朱克,张凤英,等.雷公藤总萜等药物对实验性过敏性脑脊髓炎动物发病的影响.中华神经精神科杂志,1995,28(6):363-365.
- 3 Johns LD, Flanders KC, Ranges GE, et al. Successful treatment of experimental allergic encephalomyelitis with transforming growth factor-β1. J Immunol, 1991, 147(6):1792-1796.
- 4 李春光,李贵和,刘向清,等.雷公藤治疗实验性变态反应性脑脊髓炎的病理组织学观察.中西医结合杂志,1989,9(2):98-99.
- 5 戚晓昆,蒲传强,朱克,等.实验性变态反应性脑脊髓炎模型病理及组化研究.中华神经科杂志,1996,29(2):97-99.
- 6 阴健,郭力弓.中药现代研究与临床应用.北京:学苑出版社,1995:171-651.
- 7 郑虎占,董泽宏,余靖.中药现代研究与应用.北京:学苑出版社,1997:1093-1193,1892-1909,2781-2799.

热烈祝贺

河北巨鹿县痔瘻专科培训学校
建校 16 周年

1985.5~2001.5

招生电话:(0319)4333842,4338495,4332207