

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2021.08.015

五子衍宗丸对脱髓鞘模型小鼠脑组织星形胶质细胞神经营养因子分泌的影响

孙梦瀛¹, 樊慧杰¹, 柴智^{1✉}, 贾璐¹, 李艳荣¹, 肖午帅¹,
张波², 尉杰忠³, 肖保国⁴, 马存根^{1,3}

1. 山西中医药大学基础医学院, 山西省晋中市高校园区大学街 121 号, 030619; 2. 山西卫生健康职业学院; 3. 山西大同大学脑科学研究所; 4. 复旦大学华山医院神经病学研究所

摘要 目的 探讨五子衍宗丸对脱髓鞘模型小鼠髓鞘的影响及可能分子机制。方法 24 只 C57BL/6 雄性小鼠随机分为空白组、模型组和五子衍宗丸组, 每组 8 只。模型组和五子衍宗丸组小鼠采用含 0.2% 双环己酮草酰二胺的饲料饲喂 6 周, 空白组给予正常饲料。饲喂第 2 周末, 五子衍宗丸组给予五子衍宗丸药液 16 g/(kg·d) 灌胃, 空白组和模型组小鼠灌胃 0.5 ml 生理盐水, 共 4 周。卢卡斯快蓝染色观察各组小鼠脑组织髓鞘脱失情况并计算胼胝体区域平均积分光密度值; Western blot 法检测脑组织中髓鞘碱性蛋白 (MBP)、胶质纤维酸性蛋白 (GFAP)、胶质细胞源性神经营养因子 (GDNF)、脑源性神经营养因子 (BDNF)、神经胶质抗原 2 (NG2)、睫状神经营养因子 (CNTF) 蛋白表达水平。结果 卢卡斯快蓝染色结果显示, 模型组小鼠胼胝体区域蓝染颜色较正常组浅, 且组织结构松散稀疏, 呈现萎缩状态; 而五子衍宗丸组蓝染颜色加深, 组织结构较为致密, 胼胝体结构较饱满。与空白组比较, 模型组小鼠胼胝体区域平均积分光密度值明显减少, 脑组织 MBP、BDNF、GDNF、CNTF、NG2 蛋白表达降低, GFAP 蛋白升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较, 五子衍宗丸组小鼠胼胝体区域平均积分光密度值显著增加, 脑组织 MBP、BDNF、GDNF、CNTF、NG2 蛋白表达升高, GFAP 蛋白降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 五子衍宗丸对脱髓鞘模型小鼠具有髓鞘保护作用, 其作用机制可能与诱导星形胶质细胞分泌营养因子, 进而促进少突胶质细胞增殖和分化有关。

关键词 多发性硬化; 五子衍宗丸; 脱髓鞘; 星形胶质细胞; 神经营养因子; 髓鞘保护

多发性硬化 (multiple sclerosis, MS) 是一种自身免疫性疾病, 以中枢神经系统内髓鞘损伤和脱落为主要特征, 伴随炎性细胞浸润、轴突的继发性变性^[1]。中医学理论认为, “脑为髓海” “肾主骨生髓”, 肾气充足是脑功能健全的关键, 故临床多采用补肾药物治疗 MS。五子衍宗丸具有补肾益精的功用, 临床研究^[2]发现, 其可改善 MS 患者的认知障碍。实验研究^[3]结果显示, 五子衍宗丸可促进神经干细胞的增殖、分化。本课题组前期研究发

现, 五子衍宗丸可通过调节细胞凋亡相关基因的表达抑制 PC12 细胞的凋亡, 进而防治神经管畸形^[4]; 还可通过改善中枢神经系统内的炎性微环境发挥改善实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠神经功能的作用^[5]。双环己酮草酰二胺 (CPZ) 是一种主要针对中枢神经系统内少突胶质细胞的毒物, 通过螯合铜离子破坏细胞的呼吸链, 继而引起中枢神经系统髓鞘脱落和轴突损伤^[6]。因此, CPZ 诱导的脱髓鞘模型是用来研究 MS 髓鞘脱失和再生机制的理想动物模型。本研究通过建立 CPZ 诱导的脱髓鞘模型, 进一步探讨五子衍宗丸在髓鞘保护方面的作用及可能分子机制。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 24 只, 8 ~ 10 周龄,

基金项目: 国家自然科学基金 (81703978, 81102552); 山西省重点研发计划 (201803D31209); 山西省青年拔尖人才支持计划 (晋组办字 (2019) 35 号文); 山西省自然科学基金 (201901D111334); 山西省高等学校科技创新计划 (2019L0724); 山西省重点实验室开放课题 (SXIDL-2018-04); 山西中医药大学中西医结合防治神经系统疾病研究科技创新团队 (2018TD-012)

✉ 通讯作者: chaizhi008@126.com, (0351) 3179952

体质量 18 ~ 20 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物许可证号: SCXK (京) 2016-0006。在无病原菌动物房适应性饲养 1 周, 自然光照, 温度 20 ~ 24 ℃, 相对湿度为 40% ~ 60%。

1.2 药物

五子衍宗丸免煎颗粒购自江阴天江药业有限公司, 方中枸杞子、菟丝子、覆盆子、五味子和车前子按照 4 : 4 : 2 : 1 : 1 的比例配伍。将药丸研磨成微细粉末, 用生理盐水溶解配制成浓度为 0.32 g/ml 的五子衍宗丸药液。

1.3 主要试剂及仪器

CPZ (批号: BCBV3777), Sigma 公司; 水合氯醛 (批号: 20170501), 天力化学试剂有限公司; 多聚甲醛 (批号: 20180505), 光复科技发展有限公司; 裂解液 (批号: 061919190814), 碧云天生物技术有限公司; 溶剂蓝 38 (批号: 20180515), 索莱宝公司; 碳酸锂 (批号: C10104162), 麦克林公司; 无水乙醇 (批号: 20190905)、二甲苯 (批号: 20190504), 天津市大茂化学试剂厂; 兔多克隆抗体髓鞘碱性蛋白 (MBP, 批号: GR3239203-1)、鸡多克隆胶质纤维酸性蛋白 (GFAP) 抗体 (批号: GR3257843-1)、兔多克隆胶质细胞源性神经营养因子 (GDNF) 抗体 (批号: GR3252286), 英国 Abcam 公司; 兔多克隆脑源性神经营养因子 (BDNF) 抗体 (批号: 3507448002)、神经胶质抗原 2 (NG2) 抗体 (批号: 0095800201), 武汉 ABelonal 公司; 兔多克隆睫状神经营养因子 (CNTF) 抗体 (批号: DZ17), 北京爱必信公司; β 肌动蛋白 (β -actin, 批号: BST17363873)、辣根过氧化物酶山羊抗兔 (批号: BST13A16A54), 武汉博士德生物工程有限公司; 辣根过氧化物酶山羊抗鸡 (批号: AF04134573), 北京博奥森生物技术有限公司; eECL 化学发光显影液 (批号: 40447), 康为世纪生物科技有限公司。

冰冻切片 (型号: CM1850)、正置显微镜 (型号: DM4000B/DFC450C), Leica 公司; 高速冷冻离心机 (Thermo Fisher 公司, 型号: Multifuge X1R); 凝胶电泳仪 (型号: PowerPacTM)、湿转膜仪 (型号: YY-Trans Blot)、凝胶成像分析仪 (型号: HOOD-II), Bio-Rad 公司。

1.4 分组及干预方法

24 只小鼠根据体质量采用随机数字表法分成空白组、模型组和五子衍宗丸组, 每组 8 只。参考文献 [7] 方法, 以 0.2% 的比例在小鼠饲料粉末

中掺入 CPZ 药物制作饲料, 模型组和五子衍宗丸组给予 CPZ 饲料饲喂 6 周, 空白组给予正常饲料。饲喂第 2 周末, 五子衍宗丸组小鼠给予五子衍宗丸药液 16 g/(kg · d) 灌胃, 空白组和模型组小鼠灌胃 0.5 ml 生理盐水。各组均每天灌胃 2 次, 两次间隔时间为 12 h, 共 4 周。

1.5 观察指标及方法

灌胃 4 周末腹腔注射 10% 水合氯醛 (10 ml/kg) 麻醉小鼠。麻醉完全后, 开胸暴露心脏。每组采用随机数字表法选取 4 只小鼠用生理盐水进行心脏灌注直至肝脏发白后, 用 4% 多聚甲醛进行心脏灌注固定体内组织, 取出完整脑组织, 置于 4% 多聚甲醛中 4 ℃ 固定 2 h, 再放置于 30% 蔗糖溶液中脱水 24 h。OCT 包埋制作组织包块, 将组织制备成 10 μ m 连续冠状冰冻切片。每组其余 4 只小鼠用生理盐水心脏灌注至肝脏发白后, 取出完整脑组织, 称重后放置于研磨器中, 加入组织裂解液充分研磨, 4 ℃、12 000 r/min 离心 30 min, 离心半径为 5 cm, 取上清液置于 -80 ℃ 冰箱保存备用。

1.5.1 卢卡斯快蓝染色观察脑组织髓鞘脱失程度

切片置于溶剂蓝 38 溶液中 60 ℃ 浸泡 12 ~ 18 h, 再浸于 95% 乙醇溶液于摇床上清洗, 反复浸于碳酸锂溶液和 75% 乙醇溶液中进行分化, 于蒸馏水中洗去多余染液, 浸于梯度乙醇溶液中进行脱水, 二甲苯固定。自然晾干后中性树胶封片观察, 用 Image-Pro Plus 6.0 计算胼胝体区域平均积分光密度值。

1.5.2 Western blot 法检测脑组织 MBP、GFAP、BDNF、GDNF、CNTF 和 NG2 蛋白表达

将各组脑组织提取液参照说明书加入蛋白上样缓冲液, 入沸水煮 10 min。采用 SDS-PAGE 凝胶电泳, 转膜后, 用 5% 脱脂奶粉于摇床上封闭 1 h, TBST 缓冲液清洗多余的奶粉, 加入一抗 MBP (1 : 500)、GFAP (1 : 1000)、BDNF (1 : 500)、GDNF (1 : 500)、CNTF (1 : 400) 和 NG2 (1 : 500), 4 ℃ 孵育过夜。次日, TBST 缓冲液清洗后, 加入相应辣根过氧化物酶标记的二抗 (1 : 3000), 摇床上室温孵育 2 h 后, TBST 清洗多余的抗体。将 eECL 显影液滴于蛋白膜上并涂抹均匀, 置于凝胶成像分析仪拍照, 用 Image J 1.8.0 计算灰度值。

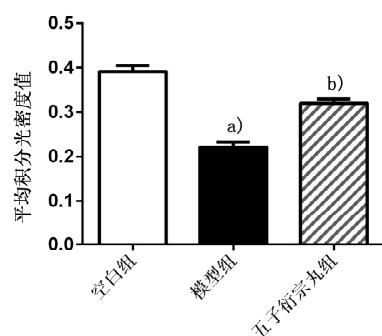
1.6 统计学方法

采用 GraphPad Prism 6.0 统计软件进行数据分析, 计量资料符合正态分布用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠脑组织髓鞘脱失程度比较

卢卡斯快蓝染色 ($\times 200$) 显示, 与空白组相比, 模型组小鼠胼胝体区域蓝染颜色较浅, 且组织结构松散稀疏, 呈现萎缩状态; 而五子衍宗丸组蓝染颜色加深, 组织结构较为致密, 胼胝体结构较饱满。图 1 示, 与空白组比较, 模型组胼胝体区域平均积分光密度值明显减少 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 五子衍宗丸组胼胝体区域平均积分光密度值显著增加 ($P < 0.05$)。



注: a) 与空白组比较, $P < 0.05$; b) 与模型组比较, $P < 0.05$ 。

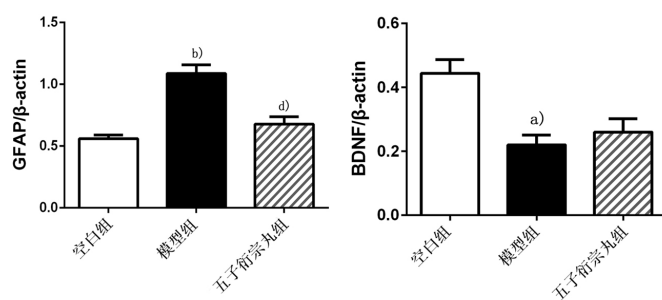
图 1 各组小鼠脑组织胼胝体区域平均积分光密度值比较

2.2 各组小鼠脑组织 MBP、NG2 蛋白表达比较

图 2 示, 与空白组比较, 模型组小鼠脑组织中 MBP、NG2 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 五子衍宗丸组 MBP、NG2 蛋白表达水平增高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。各组小鼠脑组织 MBP、NG2 蛋白电泳图见图 3。

2.3 各组小鼠脑组织 GFAP、BDNF、CNTF、GDNF 蛋白表达比较

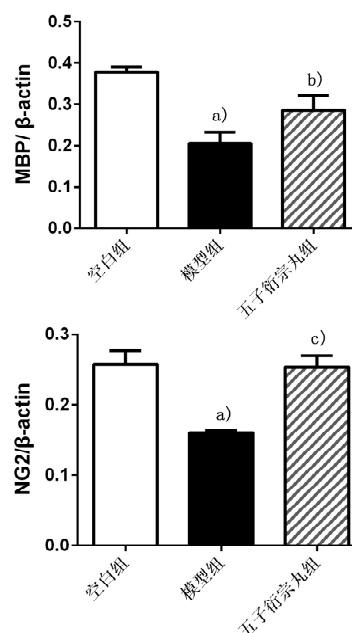
图 4 示, 与空白组比较, 模型组小鼠脑组织 BDNF、CNTF 和 GDNF 蛋白表达水平降低, GFAP



注: GFAP, 胶质纤维酸性蛋白; BDNF, 脑源性神经营养因子; CNTF, 睫状神经营养因子; GDNF, 胶质细胞源性神经营养因子; β-actin, β 肌动蛋白。

a) 与空白组比较, $P < 0.05$; b) 与空白组比较, $P < 0.01$; c) 与模型组比较, $P < 0.05$; d) 与模型组比较, $P < 0.01$ 。

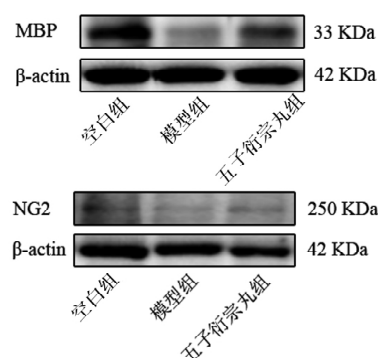
图 4 各组小鼠脑组织 GFAP、BDNF、GDNF 和 CNTF 蛋白表达比较



注: MBP, 髓鞘碱性蛋白; NG2, 神经胶质抗原 2; β-actin, β 肌动蛋白。

a) 与空白组比较, $P < 0.01$; b) 与模型组比较, $P < 0.05$; c) 与模型组比较, $P < 0.01$ 。

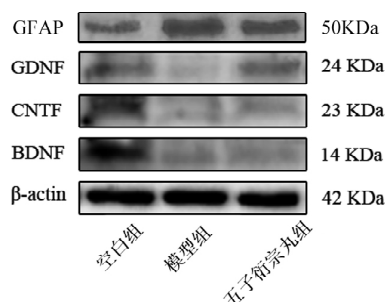
图 2 各组小鼠脑组织 MBP、NG2 蛋白表达比较



注: MBP, 髓鞘碱性蛋白; NG2, 神经胶质抗原 2; β-actin, β 肌动蛋白。

图 3 各组小鼠脑组织 MBP、NG2 蛋白电泳图

蛋白升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较,五子衍宗丸组 CNTF、GDNF 蛋白表达升高,GFAP 蛋白降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。各组小鼠脑组织 GFAP、BDNF、GDNF 和 CNTF 蛋白电泳图见图 5。



注: GFAP, 胶质纤维酸性蛋白; BDNF, 脑源性神经营养因子; CNTF, 睫状神经营养因子; GDNF, 胶质细胞源性神经营养因子; β -actin, β 肌动蛋白。

图 5 各组小鼠脑组织 GFAP、BDNF、GDNF 和 CNTF 蛋白电泳图

3 讨论

根据 MS 临床症状可将其归属于中医学“痿症”范畴,病机为肾虚、脾虚和肝郁血虚,病位在脑,累及脏腑以肾为主^[8]。研究表明,中医药治疗 MS 不仅可改善患者的临床表现、减轻神经功能障碍程度^[9],还可延缓残疾进程、降低年复发率^[10-11],具有延缓疾病进程、无不良反应等特点^[12]。五子衍宗丸方中君药为菟丝子、枸杞子,二者同归肝经、肾经,滋补肝肾之阴,充养精气血;臣药为覆盆子、五味子,同归肾经,协同君药补肾涩精;车前子为佐使药,性寒,归肾、肝、肺经,可泻肾中虚火,通利小便。诸药合用,既补肝肾阴阳,固肾涩精,又可利尿泻热,补中寓泻,共奏益精填髓功效。

MS 在病理上的突出表现是外周免疫细胞在中枢神经系统浸润以及髓鞘脱失^[13]。CPZ 诱导的髓鞘脱失模型是非 T 细胞介导的,因而是用来研究髓鞘脱失和再生的理想模型。本研究卢卡斯快蓝染色结果表明,髓鞘脱失模型小鼠经五子衍宗丸治疗后,胼胝体区域蓝染颜色加深且组织结构较致密,胼胝体区域平均积分光密度值显著增加,与其他研究对胼胝体的保护作用^[14-15]一致。MBP 是中枢神经系统内髓鞘形成的主要蛋白之一,在脑内的表达水平反映了髓鞘的脱失程度^[16]。Western blot 结果显示,CPZ 的摄入会导致髓鞘脱失,MBP 表达水平下降,五子衍宗丸治疗后 MBP 表达上调,表明可促进髓鞘再生,改善髓鞘脱失。以上结果均说明五子衍宗丸具有良好的髓鞘保护作用。

在脱髓鞘疾病发生过程中,分布在中枢神经系统内的少突胶质细胞前体细胞会分泌 NG2 作为细胞活化的第一标记^[17]。星形胶质细胞是中枢神经系统内数量最多的胶质细胞,生理状态下具有支持、营养神经元的作用^[18]。GFAP 是星形胶质细胞的特征性标记物,通过检测其表达可观察星形胶质细胞的活性^[19]。本研究结果显示,一方面,五子衍宗丸可以抑制星形胶质细胞增多,缓解脑内恶性环境加剧,同时可能促进星形胶质细胞分泌 BDNF、GDNF 和 CNTF 等神经营养因子,改善中枢神经系统内营养环境,为少突胶质细胞前体细胞、髓鞘的再生提供营养支持。另一方面,五子衍宗丸可上调 NG2 蛋白表达水平,提示五子衍宗丸可以促进少突胶质细胞前体细胞发育和增殖,进而促进髓鞘的形成,抑制髓鞘的脱失,发挥神经保护作用。

综上所述,五子衍宗丸具有明显的髓鞘保护作用,可能通过诱导星形胶质细胞分泌神经营养因子,改善脑内营养环境,促进少突胶质细胞的发育而发挥作用。

参考文献

- [1] MOSSAKOWSKI AA, POHLAN J, BREMER D, et al. Tracking CNS and systemic sources of oxidative stress during the course of chronic neuroinflammation [J]. Acta Neuropathol, 2015, 130(6): 799-814.
- [2] 曹圣, 热增才旦, 李永平, 等. 五子衍宗丸临床研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2017, 13(14): 55-56.
- [3] 曹圣, 热增才旦, 李永平, 等. 五子衍宗丸应用机理探讨 [J]. 时珍国医国药, 2017, 28(10): 2476-2478.
- [4] 李瑞雪, 樊慧杰, 柴智, 等. 五子衍宗丸对神经管畸形细胞模型凋亡途径的影响 [J]. 中医杂志, 2019, 60(13): 1134-1141.
- [5] 张若楠, 柴智, 樊慧杰, 等. 五子衍宗丸对实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠防治作用及其机制研究 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(4): 1316-1319.
- [6] VEGA-RIQUER JM, MENDEZ-VICTORIANO G, MORALES-LUCKIE RA, et al. Five decades of cuprizone, an updated model to replicate demyelinating diseases [J]. Curr Neuropathol, 2019, 17(2): 129-141.
- [7] SEN MK, MAHNS DA, COORSSEN JR, et al. Behavioural phenotypes in the cuprizone model of central nervous system demyelination [J]. Neurosci Biobehav Rev, 2019, 107(23-46). doi: 10.1016/j.neubiorev.2019.08.008.
- [8] 张法英. 多发性硬化的中医理论文献研究 [J]. 北京: 中国中医科学院, 2015.
- [9] 王殿华, 陈金亮. 参鹿益髓汤治疗多发性硬化症 41 例 [J]. 中医杂志, 2011, 52(6): 518-519.

- [0] 谢瑶,严冬,孟甜甜,等. 基于电话回访探讨中医药对复发缓解型多发性硬化患者复发与残疾的影响 [J]. 中医杂志, 2020, 61(6): 509–513.
- [1] 樊永平,王苏. 中医辨证治疗对复发缓解型多发性硬化患者复发率的影响 [J]. 中医杂志, 2015, 56(8): 683–685.
- [2] 吴彦青,郭玉红,刘清泉. 中医药干预多发性硬化的作用机制与治疗研究展望 [J]. 世界中医药, 2017, 12(4): 735–737.
- [3] CORREALE J, GAITÁN MI, YSRRAELIT MC, et al. Progressive multiple sclerosis: from pathogenic mechanisms to treatment [J]. Brain, 2017, 140(3): 527–546.
- [4] YU H, WU M, LU G, et al. Prednisone alleviates demyelination through regulation of the NLRP3 inflammasome in a C57BL/6 mouse model of cuprizone-induced demyelination [J]. Brain Res, 2018, 1678: 75–84. doi: 10.1016/j.brainres.2017.09.034.
- [5] WANG SS, BI HZ, CHU SF, et al. CZ-7, a new derivative of Claulansine F, promotes remyelination induced by cuprizone by enhancing myelin debris clearance [J]. Brain Res Bull, 2020, 159: 67–78. doi: 10.1016/j.brainresbull.2020.03.017.
- [6] XU H, YANG HJ, LI XM. Differential effects of antipsychotics on the development of rat oligodendrocyte precursor cells exposed to cuprizone [J]. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci, 2014, 264(2): 121–129.
- [7] AHMED S, GULL A, KHUROO T, et al. Glial cell: a potential target for cellular and drug based therapy in various CNS diseases [J]. Curr Pharm Des, 2017, 23(16): 2389–2399.
- [8] BAECHER-ALLAN C, KASKOW BJ, WEINER HL. Multiple sclerosis: mechanisms and immunotherapy [J]. Neuron, 2018, 97(4): 742–768.
- [9] 王明达,周亮,罗天元,等. 星形胶质细胞在髓鞘形成与修复中作用的研究进展 [J]. 神经解剖学杂志, 2019, 35(4): 451–454.

Effect of *Wuzi Yanzong Pills* (五子衍宗丸) on the Secretion of Neurotrophic Factors by Astrocytes in Brain Tissues of Demyelination Model Mice

SUN Mengying¹, FAN Huijie¹, CHAI Zhi¹, JIA Lu¹, LI Yanrong¹, XIAO Wushuai¹, ZHANG Bo², WEI Jiezhong³, XIAO Baoguo⁴, MA Cungen^{1,3}

1. School of Basic Medical Sciences, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong, 030619; 2. Shanxi Health Vocational College; 3. Institute of Brain Science, Shanxi Datong University; 4. Institute of Neurology, Huashan Hospital of Fudan University

ABSTRACT Objective To explore the effect of *Wuzi Yanzong Pills* (WYP, 五子衍宗丸) on the myelin sheath of demyelination model mice as well as the underlying molecular mechanism. **Methods** Twenty-four C57BL/6 male mice were randomly divided into a blank group, model group and WYP group, with eight mice in each group. Mice in the model group and WYP group were fed with 0.2% dicyclohexanone oxalyl dihydrazide for six weeks, while those in the blank group were fed normally. On the second weekend of feeding, 16 g/(kg·d) WYP solution was administered by gavage in the WYP group, while 0.5 ml normal saline was given by gavage in the blank group and model group, for four weeks. Lucas fast blue staining was used to observe the demyelination of the brain tissue and to calculate the average optical density value in the corpus callosum region; Western blot method was used to detect myelin basic protein (MBP), glial fibrillary acidic protein (GFAP), glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neuron-glia antigen 2 (NG2), ciliary neurotrophic factor (CNTF) protein expression levels. **Results** The blue staining color of the corpus callosum region of the model group was lighter than that of the normal group, and the tissue structure was more loose and sparse, showing a shrinking state; while there were darker blue staining color, denser tissue structure and fuller thickness of the corpus callosum in the WYP group. Compared to the blank group, the model group significantly decreased the average optical density value in the corpus callosum region, as well as reduced the expression levels of MBP, BDNF, GDNF, CNTF, and NG2 proteins in the brain tissue ($P < 0.01$). Compared to the model group, the WYP group significantly increased the average optical density value in the corpus callosum region, as well as increased the MBP, GFAP, BDNF, GDNF, CNTF, and NG2 protein expression levels ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** WYP can protect the myelin in the demyelination model mice, which may be related to the promotion of the proliferation and differentiation of oligodendrocytes by accelerating astrocytes to secrete neurotrophic factors.

Keywords multiple sclerosis; *Wuzi Yanzong Pills* (五子衍宗丸); demyelination; astrocytes; neurotrophic factors; myelin protection

(收稿日期: 2020-06-29; 修回日期: 2020-09-10)

编辑: 邓 媛