

张沁丽,王玉芬,刘红,等.阿托伐他汀对自身免疫性脑脊髓炎小鼠髓鞘修复及 RhoA/Rock1 通路的影响 [J].中国比较医学杂志, 2022, 32(4): 68-76.

Zhang QL, Wang YF, Liu H, et al. Effects of atorvastatin on myelin repair and the RhoA/Rock1 pathway in mice with autoimmune encephalomyelitis [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(4): 68-76.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.04.010

阿托伐他汀对自身免疫性脑脊髓炎小鼠髓鞘修复及 RhoA/Rock1 通路的影响

张沁丽,王玉芬*,刘红,刘博雯

(长治医学院附属和平医院神经内科,山西 长治 046000)

【摘要】 目的 探讨阿托伐他汀对自身免疫性脑脊髓炎(EAE)小鼠髓鞘修复及 RhoA/Rock1 通路的影响。方法 采用 MOG35-55 免疫建立 EAE 小鼠模型,小鼠随机分为空白组、模型组、阿托伐他汀组、高脂饮食组、高脂饮食+阿托伐他汀组,每组 6 只,阿托伐他汀每只小鼠每天按 0.5 mL 混悬液灌服,连续 28 d。各组小鼠神经功能评分,采用苏木精-伊红(HE)、固蓝(LFB)染色、透射电镜及免疫组化染色方法检测各组小鼠脊髓组织炎症反应、髓鞘脱失及髓鞘再生情况;酶联免疫吸附法(ELISA)检测小鼠血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-6(IL-6)、一氧化氮(NO)的表达;蛋白免疫印迹(Western blot)法检测脑组织 RAS 同源基因家族成员 A(RhoA)、Rho 相关蛋白激酶 1(Rock1)蛋白表达;实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测脊髓组织硫酸软骨素蛋白多糖(NG2)、髓鞘碱性蛋白(MBP)及脑组织 RhoA、Rock1 mRNA 表达。结果 与空白组比较,模型组小鼠见较多炎性细胞浸润、发生明显髓鞘改变、部分髓鞘崩解、断裂、脱失;模型小鼠血清中 TNF- α 、IL-6、NO 的含量及脑组织 RhoA、Rock1 蛋白和 mRNA 表达均明显升高($P<0.01$),脊髓组织 NG2、MBP 蛋白及 mRNA 表达明显降低($P<0.01$)。与模型组比较,阿托伐他汀组小鼠见极少量炎性细胞浸润、脱髓鞘程度明显好转,明显降低小鼠血清中 TNF- α 、IL-6、NO 的含量及脑组织 RhoA、Rock1 蛋白和 mRNA 表达($P<0.05$),明显升高 MBP、NG2 蛋白和 mRNA 表达($P<0.05$);高脂饮食+阿托伐他汀组明显降低小鼠神经功能评分、脑组织 RhoA、Rock1 蛋白表达,明显升高 NG2 mRNA 表达。结论 阿托伐他汀能改善 EAE 小鼠炎性细胞浸润及脱髓鞘程度,降低高脂饮食 EAE 小鼠神经功能评分,其中作用机制可能与调节 RhoA/Rock1 通路改善脱髓鞘程度,从而发挥对 EAE 小鼠的治疗作用有关。

【关键词】 自身免疫性脑脊髓炎;髓鞘修复;阿托伐他汀;RhoA/ROCK-1 通路

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 04-0068-09

Effects of atorvastatin on myelin repair and the RhoA/Rock1 pathway in mice with autoimmune encephalomyelitis

ZHANG Qinli, WANG Yufen*, LIU Hong, LIU Bowen

(Department of Neurology, Heping Hospital, Changzhi Medical College, Changzhi 046000, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of atorvastatin on myelin repair and the RhoA/Rock1 pathway in mice with autoimmune encephalomyelitis (EAE). **Methods** MOG35-55 immunization was used to establish an EAE mouse model. The mice were randomly divided into the control group, model group, atorvastatin group, high fat diet group

[基金项目] 山西省卫生和计划生育委员会科研课题(2017164)。

[作者简介] 张沁丽(1979—),女,硕士,副主任医师,研究方向:脑血管病、脱髓鞘疾病。E-mail:shengmingkx2020@163.com

[通信作者] 王玉芬(1966—),硕士,主任医师,研究方向:脑血管病。E-mail:3385314799@qq.com

and high fat diet+atorvastatin group ($n=6$ per group). The atorvastatin was administered to each mouse daily by 0.5 mL suspension, for 28 consecutive days. Mice were scored for neurological function and clinical symptoms were observed. Hematoxylin-eosin (HE) staining, Luxol fast blue (LFB) staining, transmission electron microscopy and immunohistochemical staining method were used to detect inflammation and demyelination and remyelination of the spinal cord tissue of each group of mice. The expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and nitric oxide (NO) in serum was detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA); protein immunoblotting assay (Western blot) method was used to detect the expression of Ras homologous gene family member A (RhoA) and Rho associated protein kinase 1 (ROCK1) in brain tissue. Real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect the expression of chondroitin sulfate proteoglycan (NG2) and myelin basic protein (MBP) in spinal cord and *RhoA* and *Rock1* mRNA expression in brain tissue. **Results** Compared with the control group, the model group showed more inflammatory cell infiltration, marked demyelination, partial myelination disintegration, breakage and demyelination; TNF- α , IL-6 and NO in serum and the expression of RhoA, Rock1 protein and mRNA in brain tissue were significantly increased, while the expression levels of NG2 and MBP protein and mRNA in spinal cord tissue were significantly decreased ($P<0.01$). Compared with the model group, the atorvastatin group showed significant improvement in inflammatory cell infiltration and demyelination, significantly decreased TNF- α , IL-6 and NO in serum, expression of RhoA and Rock1 protein and mRNA in brain tissue and increased expression of MBP, NG2 protein and mRNA in brain tissue ($P<0.05$). The high fat diet + atorvastatin group showed significantly decreased neurological function scores, brain tissue RhoA and Rock1 expression and significantly increased NG2 mRNA expression. **Conclusions** Atorvastatin improved inflammatory cell infiltration and demyelination in EAE mice and reduced neurological function scores in EAE mice on a high fat diet. The mechanism of action may be related to the regulation of the RhoA/Rock1 pathway to improve the degree of demyelination and thus exert a therapeutic effect on EAE mice.

【Keywords】 autoimmune encephalomyelitis; myelin repair; atorvastatin; RhoA/ROCK-1 pathway

多发性硬化症 (multiple sclerosis, MS) 是中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 的一种慢性自身免疫性和退行性疾病, 其病理改变包括中枢神经系统白质中的多发性脱髓鞘斑块, 并伴有反应性胶质增生和轴突损伤^[1]。尽管对 MS 的病因、发病机制和治疗的研究越来越多, 但目前对 MS 的治疗方案尚相对有限, MS 仍然是世界范围内的治疗挑战^[2]。虽然 MS 的病因和机制仍不清楚, 但神经炎症被证明在 MS 的发生和发展中发挥了关键作用, 过度的炎症会导致细胞死亡和组织损伤, 如脱髓鞘损伤和轴突损伤^[3]。在成人 CNS 中, 受损神经元轴突再生不良的部分原因是髓鞘相关轴突生长抑制剂的存在, 如髓鞘相关糖蛋白、Nogo、少突胶质细胞-髓鞘糖蛋白等, 这些抑制剂可以激活 RhoA^[4]。研究表明 RhoA 的激活会导致生长锥的塌陷和轴突生长的抑制, 而 RhoA 的失活可以促进受损中枢神经系统的轴突再生和功能恢复, RhoA 的下游效应因子是 Rho 相关激酶 (Rock), 包括 Rock1 和 Rock2, Rock 活化可促进肌球蛋白轻链磷酸酶的磷酸化^[5]。因此, 我们推测 RhoA/Rock 信号通路可能参与自身免疫性脑脊髓炎。他汀类药物是 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A (HMG-CoA) 还原酶抑制剂, 广泛用于

降低胆固醇, 以减少动脉粥样硬化和心血管发病率^[6]。最近在自身免疫性疾病动物模型中的研究表明, 他汀类药物的抗炎和免疫调节特性可能有益于神经退行性疾病的治疗^[7]。目前关于阿托伐他汀在治疗 MS 中的作用机制的研究主要集中在免疫调节方面, 关于其是否可通过调节髓鞘修复及 RhoA/Rock 通路来改善 MS 进展的研究尚少。因此, 本研究旨在探讨阿托伐他汀对自身免疫性脑脊髓炎小鼠髓鞘修复及 RhoA/Rock1 通路的影响, 以为 MS 的治疗提供数据支撑。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

选用 30 只 SPF 级 C57BL/6 雌性近交系小鼠, 6~8 周, 18~20 g, 购自成都达硕实验动物有限公司 [SCXK(川)2020-030], 饲养于长治医学院动物实验房 [SYXK(晋)2022-0001], 饲养条件为室温 (24 ± 2) °C 的环境中, 维持光-暗 12 h 循环交替, 并予以充足的饲料和洁净饮水。研究方案经长治医学院实验动物伦理委员会批准 (IACUC 2019072A), 并按照实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

1.1.2 菌株

结核杆菌 H37Ra (批号: RNCC263834) 购自美国 ATCC 公司。

1.2 主要试剂与仪器

阿托伐他汀 (批号: 20141008) 购自辉瑞制药; MOG35-55 购自西安联美生物, 纯度 >95% 杆菌; 百日咳素 (PTX, 批号: C7897)、完全弗氏佐剂 (CFA, 批号: F5881) 购自美国 Sigma 公司; 苏木素染液 (批号: R20568)、伊红染液 (批号: R24044) 购于 yuanye Bio-Technology Co., Ltd (上海); IL-6 (货号: ZC-36404)、TNF- α (货号: ZC-37624)、NO (货号: ZC-S0647) ELISA 试剂盒购自上海茁彩生物; 相关一抗 NG2 (货号: #52635)、MBP (货号: #2396)、RhoA (货号: #2117)、Rock1 (货号: #4035)、生物素化山羊抗兔 IgG (H+L) (货号: #32935) 购自 CST; RNA TRIzol Reagent (批号: 15596026)、TB Green™ Premix Ex Taq™ II (货号: A44662) 购自 ThermoFisher SCIENTIFIC (上海); Western blot 细胞裂解液 (货号: P0013)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (货号: P0009) 购自上海碧云天生物; ECL 发光试剂盒 (货号: E-IR-R307)、Immobilon-PSQ PVDF 膜 (货号: E-BC-R266) 购自武汉 Elabscience。实时荧光定量 (RT-PCR) 仪 (型号 PIKORed 96) 和全功能酶标仪 MK3 均为美国 ThermoFisher 仪器。

1.3 实验方法

1.3.1 自身免疫性脑脊髓炎小鼠模型制备及分组

将实验小鼠随机分为 5 组, 空白组、模型组 (实验性自身免疫性脑脊髓炎)、阿托伐他汀组、高脂饮食组、高脂饮食+阿托伐他汀组, 每组 6 只。建模步骤^[8]: 将抗原 MOG35-55 用生理盐水稀释成 5 mg/mL, 并按 1:1 等体积加入 CFA, 加入结核杆菌 H37Ra 使其终浓度为 4 mg/mL, 充分混合乳化。乳化后按每只 0.1 mL 于小鼠脊柱两侧分四点皮下注射, 0、48 h 每只小鼠腹腔注射 0.5 mL PTX (百日咳毒素 500 ng)。空白组以等量生理盐水代替 MOG 多肽, 其余步骤和方法相同。

1.3.2 给药方法

高脂饮食组、高脂饮食+阿托伐他汀组均给予高脂饲料喂养 3 周后开始免疫、干预, 空白组、模型组、阿托伐他汀组给予普通饲料喂养 3 周后开始免疫、干预。阿托伐他汀给药剂量为 8 mg/(kg·d), 将 40 mg 阿托伐他汀溶于 125 mL 的 0.1 mol/L PBS 溶液中形成混悬液, 其终浓度为 0.32 mg/mL。免疫

后第 3 天开始应用小鼠灌胃针每只小鼠每天灌服 0.5 mL 混悬液, 连续 28 d。其中, 高脂饲料配比为: 胆固醇 1%、蛋黄粉 10%、猪油 10%、普通饲料 79%。阿托伐他汀给药剂量参考 Zeyghami 等^[9]的报道。

1.3.3 神经功能评分

采用 Knoz 评分法^[10]评估小鼠病情变化, 连续观察直至动物处死, 具体评分标准如下: 0 分: 无症状; 1 分: 尾部失去张力; 2 分: 后肢力弱; 3 分: 后肢瘫痪; 4 分: 后肢及前肢瘫痪; 5 分: 濒临死亡或死亡。

1.3.4 HE 染色和 LFB 染色观察

苏木精-伊红 (HE) 染色: 取小鼠脑脊髓, 用 4% 多聚甲醛固定 24 h 后, 将组织标本放入含 30% 蔗糖的 4% 多聚甲醛中保存, 脑脊髓组织石蜡包埋, 连续切片, 厚度 5 μ m, 用 HE 染色评价炎症细胞浸润情况。并采用双盲法进行炎症细胞浸润评分: 0 分, 无炎症细胞浸润; 1 分, 脑膜细胞浸润; 2 分, 血管周细胞浸润最多 4 个小区域; 3 分, 血管周细胞浸润 5 个或 5 个以上小区域, 和/或 1 个以上大型细胞浸润; 4 分, 大量细胞浸润, 累及 20% 以上的白质。

固蓝 (LFB) 染色: 为了评估脱髓鞘, 切片按上述方法处理, 并用 LFB 染色。将组织切片在 60℃ 的 0.1% LFB 溶液中孵育过夜, 然后在 0.05% 的碳酸锂溶液中进行区分, 以区分白质和灰质, 最后在光学显微镜下观察切片。采用以下评分标准对小鼠的脱髓鞘情况进行双盲法评估: 0 分, 无髓鞘丢失; 1 分, 小范围髓鞘丢失; 2 分, 2 个或 3 个小范围髓鞘丢失; 3 分, 最多 2 个大规模髓鞘丢失; 4 分, 大范围髓鞘丢失, 累及超过 20% 的白质。

1.3.5 ELISA 法检测

按照 ELISA 试剂盒说明操作, 检测小鼠血清中 TNF- α 、IL-6、NO 的表达。

1.3.6 透射电镜观察

取脑组织, 切取胼胝体区域组织, 组织块切成 1 mm³×1 mm³×3 mm³ 大小转入 2.5% 戊二醛固定液中 4℃ 固定 24 h。组织块用 1% 锇酸后固定 2 h, 然后梯度丙酮脱水, 组织块用环氧树脂包被, 切取半薄切片 1% 甲苯胺蓝染色后, 超薄切片用醋酸铀酰和柠檬酸铅染色, 在透射电镜下观察中枢神经系统胼胝体区髓鞘超微结构改变。

1.3.7 免疫组织化学染色观察

脑脊髓组织切片脱蜡复水, 用 3% H₂O₂ 室温孵育 30 min, 加正常山羊血清后 37℃ 孵育 30 min, 滴

加一抗(NG2、MBP(1:300))37℃孵育 1 h。用山羊抗兔 IgG-辣根过氧化物酶(1:200)室温孵育 2 h。用 DAB 试剂显示阳性细胞,苏木精复染、酒精盐酸分化、脱水、中性树胶封片,显微镜观察,用 Image Pro Plus 6.0 软件对 NG2、MBP 进行定量分析。

1.3.8 qRT-PCR 检测

根据制造商的说明,采用 TRIzol 试剂从脑组织或脊髓组织中提取总 RNA,然后对 RNA 进行量化,将一定量的 RNA 逆转录成 cDNA。随后使用 TaKaRa TB Green™ PreMix Ex Taq™ 的聚合酶链式反应对基因表达水平进行定量,用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算基因表达水平,并用内源性参考 GAPDH 值进行归一化。本研究中使用的引物序列如表 1 所示。qRT-PCR 反应条件为预变性 95℃ 30 s,变性 95℃ 5 s,退火 55℃ 30 s,延伸 72℃ 30 s,45 个循环,记录 CT 值。

1.3.9 Western blot 分析

脑组织用冷 PBS 洗涤 2 次,用添加了蛋白酶和磷酸酶抑制剂的裂解缓冲液从脑组织提取蛋白质,冰上孵育,裂解产物在 12000 r/min 下离心 15 min,收集上清液,并通过 BCA 蛋白检测试剂盒分析蛋白浓度。然后,将上清液与 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶样品加载缓冲液混合,并转移到 PVDF 膜(微孔)上,根据制造商的说明,转移的印迹与封闭剂(5%脱脂牛奶在 Tris 缓冲盐水中)室温封闭 2 h 后,将膜与抗 RhoA(1:500)、Rock1(1:500)或 β -actin(1:2500)的抗体在 4 抗下一起孵育过夜。然后,在摇床上用 TBST 缓冲液(含 0.1%

Tween 20 的 Tris 缓冲液,pH=7.6)和生物素化山羊抗兔 IgG 抗体孵育 2 h。使用增强型化学荧光检测试剂盒(ECL)进行显影,使用化学发光成像仪检测化学发光膜的免疫反应性,并通过使用 Image-ProPlus 分析光密度,以 β -actin 为内参,对蛋白进行量化,实验重复 3 次。

1.4 统计学方法

使用 SPSS 22.0 软件(IBM Corp.)对数据进行统计分析,数据表示为平均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$),采用单因素方差分析(one-way ANOVA)进行多组间比较分析,方差齐性时用 LSD 检验,方差不齐时用 Tamhane's T2 检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 阿托伐他汀对自身免疫性脑脊髓炎小鼠神经功能评分的影响

与空白组比较,模型组小鼠神经功能评分于给药前、给药 15 d、给药 28 d 时均明显升高($P<0.01$),与模型组比较,阿托伐他汀组和高脂饮食+阿托伐他汀组于给药 15 d 和给药 28 d 明显降低神经功能评分,且 28 d 时降低更明显($P<0.05$),见表 2。

2.2 阿托伐他汀对自身免疫性脑脊髓炎小鼠炎性脑浸润和脊髓脱髓鞘的影响

空白组:未见明显炎性细胞浸润(炎细胞浸润评分为 0 分)及未发生脱髓鞘改变(脱髓鞘评分 0 分)。模型组:小鼠脑组织白质区神经纤维束间见较多炎性细胞浸润,以核呈圆形深染的淋巴细胞为

表 1 PCR 引物序列

Table 1 PCR primer sequences

引物 Primer	正向引物 Forward primer(5'-3')	反向引物 Reverse primer(5'-3')
MBP	ACACCCCTTTCAGTTCACCC	GGAAGCCTGGACCACACAG
NG2	TCCAGTCATGCCGAAATCTCAC	TGGTAGGGTCCACGACATGAAG
RhoA	GGAGTGTTTCAGCAAAGACCAAAG	CACAAGATGAGGCCACCCAGA
Rock1	GGAAACGCTCCGAGACTG	CTGGGATTTGCTGAAGGTAAG
GADPH	ATCCCATCACCATCTTCCAG	CCATCACGCCAGTTTCC

表 2 各组小鼠神经功能评分

Table 2 Neurological function scores of mice in each group

组别 Groups	给药前 Pre-administration	给药 15 d Administered 15 d	给药 28 d Administered 28 d
空白组 Control group	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
模型组 Model group	3.36 \pm 0.50**	3.56 \pm 0.53**	3.49 \pm 0.72**
阿托伐他汀组 Atorvastatin group	3.34 \pm 0.41	1.83 \pm 0.88 [#]	1.14 \pm 0.02 [#]
高脂饮食组 High fat diet group	3.33 \pm 0.39	2.25 \pm 0.78	2.08 \pm 0.05
高脂饮食阿托伐他汀组 High fat diet + atorvastatin group	3.39 \pm 0.25	1.86 \pm 1.36 [#]	1.52 \pm 0.02 [#]

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$ 。

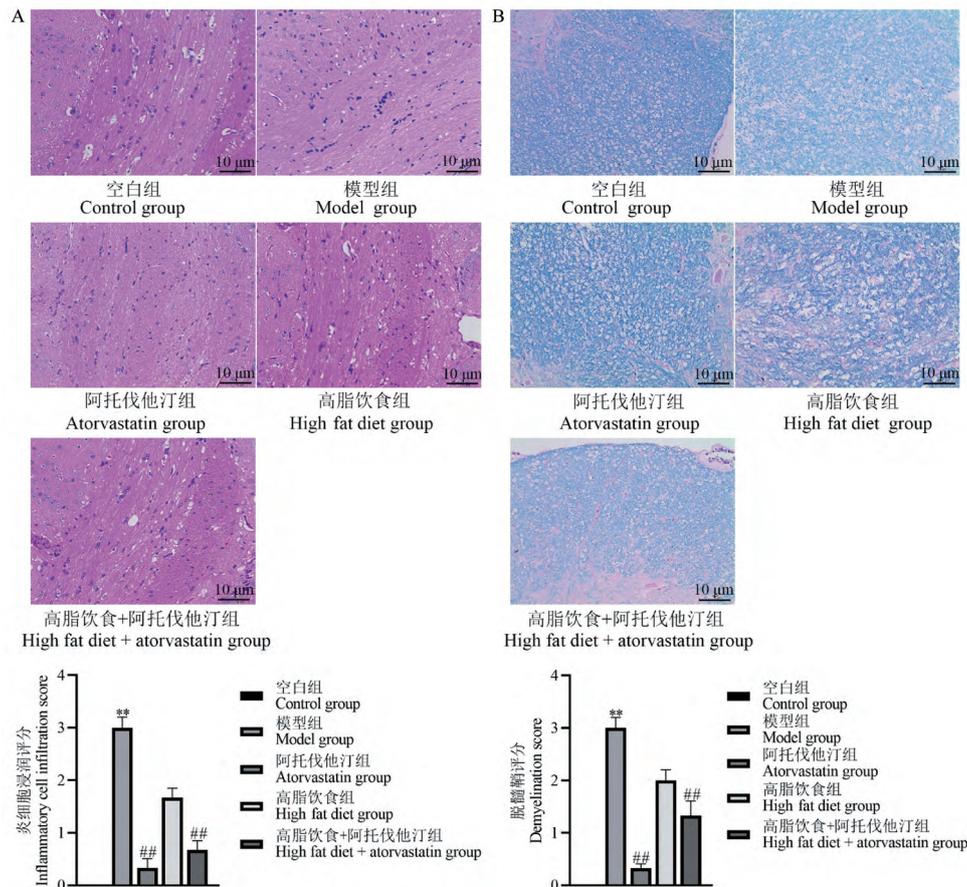
Note. Compared with control group, ** $P<0.01$. Compared with model group, [#] $P<0.05$.

主,部分炎性细胞围绕在血管周围;脊髓组织 LFB 染色可见髓鞘蓝染区域的面积显著减少,可见大面积髓鞘脱失后着色为白色的区域,即发生明显脱髓鞘改变。阿托伐他汀组和高脂饮食组:小鼠脑组织白质区神经纤维束间见极少量炎性细胞浸润,以及少量小胶质细胞增生;脱髓鞘程度较模型组好转。高脂饮食+阿托伐他汀组:小鼠脑组织白质区神经纤维束间见少量淋巴细胞浸润,少量小胶质细胞增生;脱髓鞘程度较模型组好转。进一步量化分析,

与模型组比较,阿托伐他汀组、高脂饮食+阿托伐他汀组小鼠炎性细胞浸润评分及脱髓鞘评分明显降低 ($P<0.01$) (图 1)。

2.3 阿托伐他汀对自身免疫性脑脊髓炎小鼠炎性细胞因子的影响

与空白组比较,模型组小鼠血清中 TNF- α 、IL-6、NO 的含量明显升高 ($P<0.01$),与模型组比较,阿托伐他汀可明显降低小鼠血清中 TNF- α 、IL-6、NO 的含量 ($P<0.05$),见表 3。



注:A:HE 染色及定量分析;B:LFB 染色及定量分析。与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$ 。

图 1 小鼠炎性脑浸润和脊髓脱髓鞘变化

Note. A, HE staining and quantitative analysis. B, LFB staining and quantitative analysis. Compared with control group, ** $P<0.01$. Compared with model group, ## $P<0.01$.

Figure 1 Changes of inflammatory brain infiltration and spinal cord demyelination in mice

表 3 各组小鼠血清中 TNF- α 、IL-6、NO 的含量

Table 3 Contents of TNF- α , IL-6 and NO in serum of mice in each group

组别 Groups	TNF- α (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	NO (μ mol/L)
空白组 Control group	93.43 \pm 2.29	17.50 \pm 0.88	0.80 \pm 0.03
模型组 Model group	104.36 \pm 2.50**	20.81 \pm 0.42**	0.91 \pm 0.03**
阿托伐他汀组 Atorvastatin group	97.00 \pm 3.85#	18.14 \pm 0.88#	0.83 \pm 0.02#
高脂饮食组 High fat diet group	102.13 \pm 3.89	19.05 \pm 1.78	0.88 \pm 0.05
高脂饮食+阿托伐他汀组 High fat diet + atorvastatin group	99.39 \pm 4.85	19.68 \pm 1.36	0.86 \pm 0.02

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$ 。

Note. Compared with control group, ** $P<0.01$. Compared with model group, # $P<0.05$.

2.4 阿托伐他汀对自身免疫性脑脊髓炎小鼠髓鞘再生修复的影响

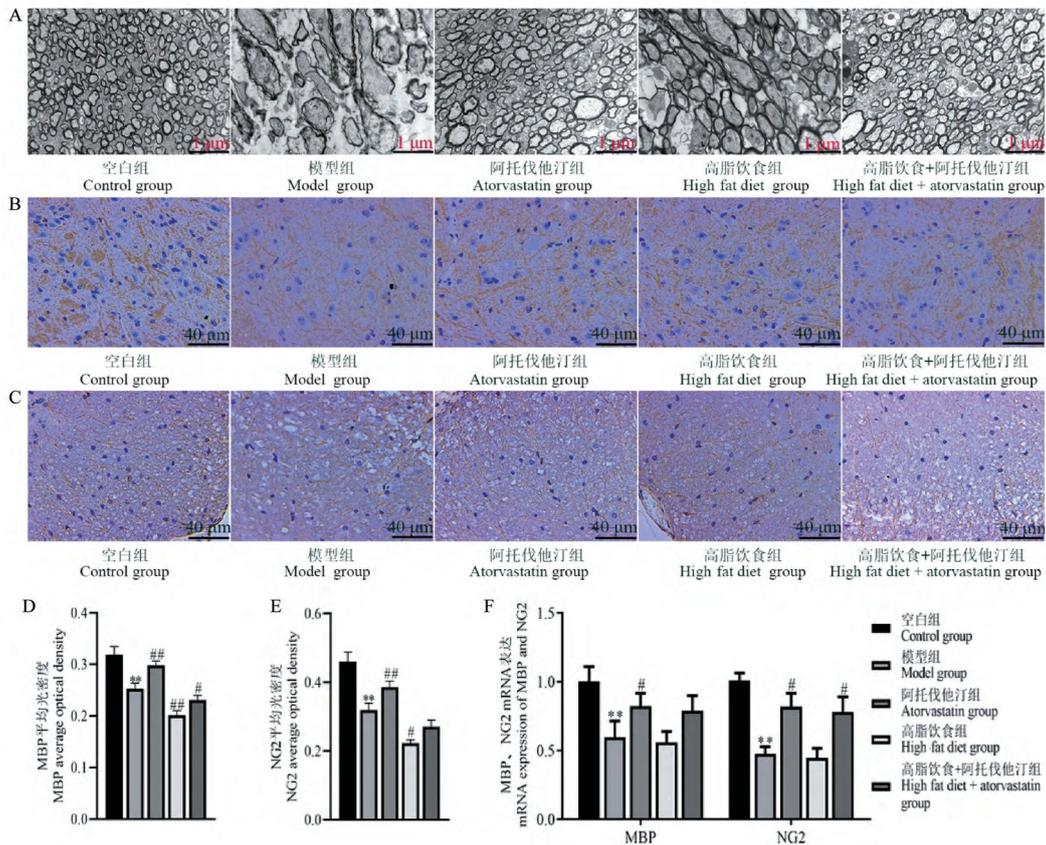
透射电镜观察结果显示,空白组小鼠的轴突间距、髓鞘板层结构正常。模型组髓鞘呈松散的层状结构,排列极为松散,部分髓鞘崩解、断裂、脱失,轴索萎缩变性,结构不清晰。阿托伐他汀组和高脂饮食+阿托伐他汀组可见髓鞘排列松散,少量髓鞘崩解脱失及轴索萎缩,结构尚清晰。高脂饮食组髓鞘呈松散的层状结构,结构不清晰(图 2A)。免疫组化检测结果显示,模型组较空白组 NG2、MBP 表达明显降低($P<0.01$),与模型组比较,阿托伐他汀组 NG2、MBP 表达明显升高($P<0.01$)(图 2B~2E)。qRT-PCR 检测表明,与空白组比较,模型组 MBP、NG2 mRNA 表达明显降低($P<0.01$),与模型组比较,阿托伐他汀可明显升高 MBP、NG2 mRNA 表达($P<0.05$)(图 2F)。

2.5 阿托伐他汀对自身免疫性脑脊髓炎小鼠 RhoA/ROCK-1 通路的影响

与空白组比较,模型组小鼠脑组织 RhoA、Rock1 mRNA 和蛋白表达均明显升高($P<0.01$),与模型组比较,仅阿托伐他汀可明显降低小鼠脑组织 RhoA、Rock1 mRNA 和蛋白表达($P<0.05$),见图 3。

3 讨论

MS 是一种以自身免疫性炎症、脱髓鞘和轴突损伤为特征的中枢神经系统慢性疾病^[11]。文献^[12]显示脂质代谢和炎症途径在许多点相互交叉调节,并通过局部机制参与调节中枢神经系统的神经功能。不仅如此, Mandoj 等^[13]认为与胆固醇异常稳态相关的血栓形成和神经退行性机制可能有助于 MS 进展。Tettey 等^[14]进行的一项前瞻性队列研究亦表明高胆固醇水平对于 MS 患者产生不利影响,

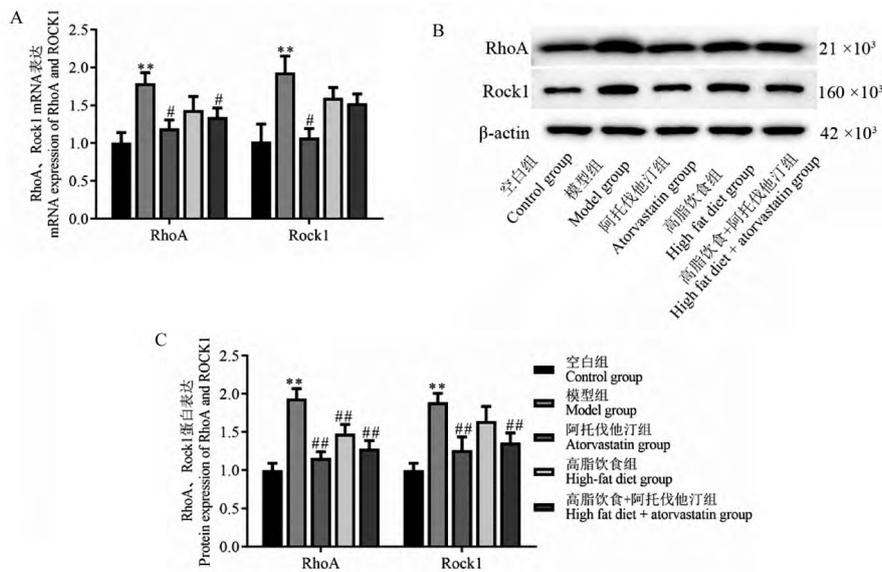


注:A:透射电镜观察;B:MBP 免疫组化染色;C:NG2 免疫组化染色;D:MBP 平均光密度;E:NG2 平均光密度;F:MBP、NG2 mRNA 表达。与空白组比较, ** $P<0.01$;与模型组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

图 2 各组小鼠髓鞘再生修复情况

Note. A, Transmission electron microscope observation. B, MBP immunohistochemical staining. C, NG2 immunohistochemical staining. D, MBP average optical density. E, NG2 average optical density. F, MBP and NG2 mRNA expression. Compared with control group, ** $P<0.01$. Compared with model group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

Figure 2 Remyelination and repair of mice in each group



注:A:RhoA、Rock1 mRNA 相对表达;B:RhoA、Rock1 蛋白表达条带;C:RhoA、Rock1 蛋白相对表达。与空白组比较, ** $P < 0.01$;与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 3 各组小鼠 RhoA/ROCK-1 通路相关因子的表达

Note. A, RhoA and Rock1 mRNA expression. B, RhoA and Rock1 protein expression bands. C, RhoA and Rock1 protein expression. Compared with control group, ** $P < 0.01$. Compared with model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

Figure 3 Expression of RhoA/ROCK-1 pathway related factors in each group of mice

与残疾及疾病的进展相关。故高脂与 MS 之间存在一定联系。阿托伐他汀作为临床常用的降血脂药物,其安全性已经得到肯定,但目前关于其是否可改善 MS 髓鞘修复及是否可通过调节降脂水平来改善 MS 的研究尚少。EAE 可较好的模拟 MS 临床表现及病理特征,由此,本研究选用 MOC35-55 多肽片段诱导 EAE 小鼠模型作为研究对象,设置阿托伐他汀组的同时设置高脂饮食组、高脂饮食+阿托伐他汀组,观察其对髓鞘再生修复情况及对 RhoA/Rock-1 通路的影响,为他汀在 MS 治疗中的应用提供更多依据,为 MS 的治疗提供更多契机。

神经炎症是中枢神经系统最基本的保护性反应之一,在许多生理和病理过程中发挥着至关重要的作用^[15]。大脑和脊髓作为一种自我防御机制,可以对损伤产生免疫反应,这些反应包括消除侵袭性病原体,清除受损细胞,促进组织修复^[16]。然而,神经炎症过程是一把双刃剑,在不平衡的条件下,可能导致不同程度的组织损伤和功能障碍^[17]。过度的神经炎症反应已被认为是 MS 的病因之一,控制炎症是该病早期的主要治疗目标^[18]。在 EAE 模型小鼠连续给予阿托伐他汀、高脂饮食+阿托伐他汀后,我们观察到与未治疗的小鼠相比,神经学评分被明显改善,而高脂饮食组小鼠神经学评分未见明

显变化。此外,脑部炎症浸润以及脊髓脱髓鞘程度也有所减轻。EAE 模型小鼠血清中 TNF- α 、IL-6、NO 的含量明显高于空白组,阿托伐他汀可明显降低 EAE 模型小鼠血清中 TNF- α 、IL-6、NO 的含量,高脂饮食+阿托伐他汀干预后 EAE 模型小鼠血清中 TNF- α 、IL-6、NO 的含量无明显变化,但有降低趋势。在正常的中枢神经系统条件下,NO 调节多种生理过程,如血流、免疫反应和突触传递。然而,越来越多的证据表明 iNOS 诱导的高 NO 水平与 MS 的许多病理表现有关^[19]。同样,本实验证实 EAE 模型小鼠的 NO 含量明显升高。根据阿托伐他汀缓解 EAE 症状的功能,阿托伐他汀可下调 NO 的产生,高脂饮食+阿托伐他汀组可下调 NO 的水平,但无明显改善。因此,中枢神经系统抗炎能力的明显提高可能归因于阿托伐他汀的神经保护作用,饲喂高脂饲料的 EAE 小鼠给予阿托伐他汀后 TNF- α 、IL-6、NO 含量较 EAE 模型小鼠有降低趋势,提示阿托伐他汀可能通过降脂改善 MS 病理学特征和促炎因子的表达等。

髓鞘修复被认为是 MS 功能恢复的关键,然而,脱髓鞘给轴突带来了巨大的新陈代谢负担,造成不可逆的损害,导致 MS 的永久性神经缺陷^[20]。MS 的脱髓鞘病变是由神经炎症和自身免疫机制引起

的,然而,中枢神经系统可以在脱髓鞘事件后再生,特别是在 MS 的初期。但随着脱髓鞘攻击次数的增加和时间的延长,再髓鞘形成的效果似乎降低,并导致具有神经症状的损伤^[21]。研究已表明 IFN- γ 诱导的炎症和少突胶质细胞死亡被认为是 MS 病变髓鞘再生不良的主要因素^[22]。EAE 中过多的 IL-1 β 产生会杀死神经元和少突胶质细胞,但也会通过诱导胰岛素样生长因子 1 (IGF-1) 的产生来促进髓鞘再生^[23]。此外 TNF- α 、IL-6 在 EAE 小鼠的脱髓鞘免疫炎症病变中驱动脱髓鞘^[24]。由此,探讨髓鞘修复对于开发抗 MS 进展的恢复性疗法至关重要。NG2 是一种表达在少突胶质前体细胞膜上的糖蛋白,可作为少突胶质前体细胞的特异性细胞标志物^[25]。MBP 是一种具有黏附作用并在髓鞘的形成中起到关键作用的一个重要的髓鞘组成成分^[26],在少突胶质前体细胞分化过程中,有丝分裂后期的少突胶质细胞成熟阶段,髓鞘抗原 MBP 被合成,并在髓鞘外缘形成稳定膜状板层结构,从而保证了髓鞘的完整性^[27]。RhoA/ROCK-1 信号通路是体内普遍存在的信号转导通路,参与细胞的形态发生、粘附、迁移和增殖等多种生物学过程^[28]。在成人中枢神经系统中,受损神经元轴突再生不良的部分原因是髓鞘相关轴突生长抑制剂的存在,如髓鞘相关糖蛋白、Nogo、少突胶质细胞-髓鞘糖蛋白等,这些抑制剂可以激活 RhoA^[4]。激活的 RhoA 会导致生长锥塌陷和轴突生长抑制,而 RhoA 的失活可以促进受损中枢神经系统的轴突再生和功能恢复,RhoA 的下游效应因子 Rock 活化可促进肌球蛋白轻链磷酸酶的磷酸化^[5]。本研究结果显示,阿托伐他汀组和高脂饮食+阿托伐他汀组可见髓鞘排列松散,少量髓鞘崩解脱失,少量轴索萎缩,结构尚清晰;模型组小鼠较空白组 NG2、MBP 蛋白及 mRNA 表达明显降低,阿托伐他汀可明显升高小鼠 MBP、NG2 蛋白及 mRNA 表达;且模型组小鼠脑组织 RhoA、Rock1 蛋白和 mRNA 表达均较空白组明显升高,仅阿托伐他汀可明显降低小鼠脑组织 RhoA、Rock1 蛋白和 mRNA 表达。揭示阿托伐他汀在自身免疫性脱髓鞘疾病中的有效保护作用,可能通过降脂改善 MS 髓鞘崩解。

综上所述,阿托伐他汀明显缓解了 EAE 疾病的进展,促进了 EAE 髓鞘修复,抑制炎症因子的产生,并有降低高脂饮食 EAE 小鼠神经功能评分及髓鞘崩解的作用,是潜在的治疗 MS 的药物,具有新的作

用机制,RhoA/Rock-1 可能是治疗 MS 的一个有前途的治疗靶点。

参考文献:

- [1] 王敏,李作孝. 基于 JAK2/STAT3/SOCS3 信号通路探讨复方甘草酸苷对实验性自身免疫性脑脊髓炎的防治作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(6): 62-68.
- [2] Correale J, Gaitán MI, Ysraelit MC, et al. Progressive multiple sclerosis: from pathogenic mechanisms to treatment [J]. Brain, 2017, 140(3): 527-546.
- [3] Faber H, Kurtoic D, Krishnamoorthy G, et al. Gene expression in spontaneous experimental autoimmune encephalomyelitis is linked to human multiple sclerosis risk genes [J]. Front Immunol, 2020, 11: 2165.
- [4] Cafferty WB, Duffy P, Huebner E, et al. MAG and OMGP synergize with Nogo-A to restrict axonal growth and neurological recovery after spinal cord trauma [J]. J Neurosci, 2010, 30(20): 6825-6837.
- [5] Chen Y, Tian Y. Influence of miR-26b on hepatic cirrhosis and portal pressure in rats with cirrhotic portal hypertension by targeting hENT1 depending on RhoA/ROCK-1 pathway [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(4): 1668-1673.
- [6] Lanzillo R, Moccia M, Russo CV, et al. Therapeutic lag in reducing disability progression in relapsing-remitting multiple sclerosis: 8-year follow-up of two randomized add-on trials with atorvastatin [J]. Mult Scler Relat Disord, 2019, 28: 193-196.
- [7] Ghasami K, Faraji F, Fazeli M, et al. Interferon β -1a and atorvastatin in the treatment of multiple sclerosis [J]. Iran J Immunol, 2016, 13(1): 16-26.
- [8] 刘建春,张红珍,李俊莲,等. 黄芪皂苷对实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠的神经保护及修复机制研究 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(11): 6700-6704.
- [9] Zeyghami MA, Hesam E, Khadivar P, et al. Effects of atorvastatin and metformin on development of pentylenetetrazole-induced seizure in mice [J]. Heliyon, 2020, 6(4): e03761.
- [10] 李振飞,聂玲玲,陈丽萍,等. 雷帕霉素通过上调 TGF- β /smad 信号通路减轻小鼠的实验性自身免疫性脑脊髓炎 [J]. 南方医科大学学报, 2019, 39(1): 35-42.
- [11] Domínguez-Mozo MI, Nieto-Guerrero A, Pérez-Pérez S, et al. MicroRNAs of human herpesvirus 6A and 6B in serum and cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients [J]. Front Immunol, 2020, 11: 2142.
- [12] Ferreira HB, Melo T, Monteiro A, et al. Serum phospholipidomics reveals altered lipid profile and promising biomarkers in multiple sclerosis [J]. Arch Biochem Biophys, 2021, 697: 108672.
- [13] Mandoj C, Renna R, Plantone D, et al. Anti-annexin antibodies, cholesterol levels and disability in multiple sclerosis [J]. Neurosci Lett, 2015, 606: 156-160.
- [14] Tettey P, Simpson S Jr, Taylor B, et al. An adverse lipid profile is associated with disability and progression in disability, in

- people with MS [J]. *Mult Scler*, 2014, 20(13): 1737-1744.
- [15] Berglund R, Guerreiro-Cacais AO, Adzemovic MZ, et al. Microglial autophagy-associated phagocytosis is essential for recovery from neuroinflammation [J]. *Sci Immunol*, 2020, 5(52): 5077.
- [16] Marchese E, Valentini M, Di Sante G, et al. Alternative splicing of neurexins 1-3 is modulated by neuroinflammation in the prefrontal cortex of a murine model of multiple sclerosis [J]. *Exp Neurol*, 2020, 335: 113497.
- [17] Mimouna S, Rollins DA, Shibu G, et al. Transcription cofactor GRIP1 differentially affects myeloid cell-driven neuroinflammation and response to IFN- β therapy [J]. *J Exp Med*, 2021, 218(1): e20192386.
- [18] Yamamoto S, Sakemoto C, Iwasa K, et al. Ursolic acid treatment suppresses cuprizone-induced demyelination and motor dysfunction via upregulation of IGF-1 [J]. *J Pharmacol Sci*, 2020, 144(3): 119-122.
- [19] Teixeira NB, Picolo G, Giardini AC, et al. Alterations of peripheral nerve excitability in an experimental autoimmune encephalomyelitis mouse model for multiple sclerosis [J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 266.
- [20] Cheli VT, Correale J, Paez PM, et al. Iron metabolism in oligodendrocytes and astrocytes, implications for myelination and remyelination [J]. *ASN Neuro*, 2020, 12: 1759091420962681.
- [21] Matias-Guñu J, Oreja-Guevara C, Matias-Guñu JA, et al. Vitamin D and remyelination in multiple sclerosis [J]. *Neurologia (Engl Ed)*, 2018, 33(3): 177-186.
- [22] Wooliscroft L, Silbermann E, Cameron M, et al. Approaches to remyelination therapies in multiple sclerosis [J]. *Curr Treat Options Neurol*, 2019, 21(7): 34.
- [23] Duncan GJ, Plemel JR, Assinck P, et al. Myelin regulatory factor drives remyelination in multiple sclerosis [J]. *Acta Neuropathol*, 2017, 134(3): 403-422.
- [24] Vallée A, Vallée JN, Guillevin R, et al. Interactions between the canonical WNT/ β -catenin pathway and PPAR gamma on neuroinflammation, demyelination, and remyelination in multiple sclerosis [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2018, 38(4): 783-795.
- [25] Xing YL, Röth PT, Stratton JA, et al. Adult neural precursor cells from the subventricular zone contribute significantly to oligodendrocyte regeneration and remyelination [J]. *J Neurosci*, 2014, 34(42): 14128-14146.
- [26] Vincze A, Mázló M, Seress L, et al. A correlative light and electron microscopic study of postnatal myelination in the murine corpus callosum [J]. *Int J Dev Neurosci*, 2008, 26(6): 575-584.
- [27] 郑双双, 赵经纬. 复髓鞘机制及其在多发硬化症脱髓鞘模型中的研究进展 [J]. *浙江大学学报(医学版)*, 2020, 49(4): 524-530.
- [28] 吴进福, 周晓慧, 范慧敏, 等. RhoA/ROCK 信号通路在左心疾病致大鼠肺动脉高压模型中的作用 [J]. *中国实验动物学报*, 2015, 23(6): 612-616.

[收稿日期] 2021-03-02