

电针对阿尔茨海默病模型大鼠学习记忆和抗氧化能力的影响

易显富¹, 张泽月¹, 肖敏¹, 程蕊², 宋洁², 高翔³, 穆敬平¹, 彭力¹

(1. 湖北医药学院附属太和医院, 湖北 十堰 442000;

2. 湖北医药学院第一临床医学院, 湖北 十堰 442000;

3. 房县人民医院, 湖北 房县 442100)

【摘要】 目的 观察电针对 β 淀粉样蛋白 25~35 片段(A β 25~35)所致阿尔茨海默病(Alzheimer's diseases, AD)模型大鼠学习记忆能力和脑组织自由基代谢的影响。方法 48 只健康雌性 SD 大鼠随机分为 AD 模型组、假手术组、正常对照组和电针组, 每组 12 只, 采用 A β 25~35 建立 AD 模型, Morris 水迷宫观察大鼠学习记忆能力, 同时检测脑组织匀浆中超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)等抗氧化指标的水平 and 乙酰胆碱酯酶(AchE)、单胺氧化酶(MAO)、一氧化氮(NO)、过氧化氢酶(Cata-lase, CAT)、乳酸脱氢酶(LDH)的活性。结果 与 AD 模型组相比, 电针组能缩短大鼠的逃避潜伏期($P<0.01$), 明显增加大鼠的平台跨越次数($P<0.01$), 延长大鼠在目标象限的停留时间并增高平台象限停留路程占总路程的百分比($P<0.05$), 同时, 电针组能明显升高脑组织匀浆中 SOD、CAT、GSH、GSH-Px 的含量($P<0.01$), 降低 MDA、AchE、MAO、LDH、NO 的活性($P<0.01$)。且假手术组和正常对照组分别与 AD 模型组比较, 除假手术组平均速度差异无统计学意义外, 其余各指标差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 电针可改善 AD 模型大鼠的学习记忆能力, 同时还能增强机体的抗氧化能力, 对脑组织中自由基的代谢起到积极的作用。

【关键词】 AD; 电针; 学习记忆能力; 抗氧化

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2014)04-0475-05

Effect of Electro acupuncture on learning and memory ability as well as antioxidant capacity on rat models of Alzheimer's disease. YI Xian-fu¹, ZHANG Ze-yue¹, XIAO Min¹, CHENG Rui², SONG Jie², GAO Xiang³, MU Jing-ping¹, PENG Li¹. 1. Taihe Hospital Affiliated to Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, Hubei, CHINA; 2. The First Clinical Medical College, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, Hubei, CHINA; 3. Hubei Fangxian People's Hospital, Fangxian 442100, Hubei, CHINA

【Abstract】 Objective To observe the effect of electro acupuncture on the learning and memory ability, and free radical metabolism in brain tissue of rat models of amyloid beta protein 25~35 fragment (A β 25~35) induced Alzheimer's diseases (AD). **Methods** Forty-eight healthy female SD rats were randomly divided into AD model group, sham operation group, normal control group and acupuncture group, with 12 rats in each group. A β 25~35 was applied to construct AD models, and Morris water maze was used to observe the learning and memory ability of rats. Superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH), glutathione peroxidase (GSH-PX) level and acetylcholine esterase (AchE), monoamine oxidase (MAO), nitric oxide (NO), catalase (CAT), lactate dehydrogenase (LDH) activity in brain tissue homogenate were also detected. **Results** Compared with the AD model group, electro acupuncture can shorten the escape latency of rats ($P<0.01$), significantly increase the times of platform crossing ($P<0.01$), prolong the residence time in the percentage of rats and increase the target quadrant platform quadrant stay away the total distance ($P<0.05$). At the same time, electro acupuncture could significantly increase the content of SOD, CAT, GSH, GSH-Px ($P<0.01$), decrease MDA, AchE, MAO, LDH, NO activity ($P<0.01$). What's more, compared with the AD model group, the differences of above indexes in sham operation group and normal control group were significant except the average speed. **Conclusion** Electro acupuncture can improve the learning and memory ability of AD rats. Also, it can enhance the body's antioxidant capacity and has a positive effect on free radical in brain tissue metabolism.

【Key words】 Alzheimer's diseases (AD); Electro acupuncture; Ability of learning and memory; Antioxidant capacity

阿尔茨海默病(Alzheimer's diseases, AD)是一种常见的神经系统进行性变性疾病,临床特征包括进行性记忆等认知障碍和行为障碍^[1]。典型的病理学特征包括神经元细胞内神经纤维缠结、细胞外老年斑以及淀粉样血管变性,且病因和发病机制目前并不明确,因而对其治疗尚无特效药物^[2]。大量实验研究发现 AD 与脑组织氧化应激有着密切的关联。氧化应激(Oxidative Stress, OS)是指机体在遭受各种有害刺激时体内抗氧化与氧化作用失衡,而使机体倾向于氧化,从而导致中性粒细胞炎性浸润,蛋白酶分泌增加,产生大量氧化中间产物,包括体内高活性分子如活性氮自由基(RNS)和活性氧自由基(ROS),过多的氧化中间产物在体内产生负面作用,导致组织损伤。AD 的发生即为脑组织氧化应激作用出现故障,使得抗氧化与氧化作用失衡造成的。相关临床试验研究发现针刺疗法对 AD 具有安全有效、无毒副作用的优势^[3],电针治疗对 AD 模型动物学习记忆能力的衰退有明显改善作用,对脑组织神经递质水平、海马电活动及神经元、神经突触形态学及相关基因(例如 ApoE 基因、Tau 蛋白等)的表达等有显著的调节作用^[6-7]。本研究通过应用 A β 25~35 构建 AD 动物模型,探讨电针对 AD 大鼠学习记忆能力和脑组织自由基代谢的影响,为 AD 的针刺临床治疗提供实验依据,进一步探索非药物治疗 AD 的新途径。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 健康雌性 SD 大鼠 48 只,由湖北医药学院实验动物中心提供,饲养于标准实验环境中,自由摄取饮食,实验操作和处理过程严格遵守科技部有关善待实验动物的规定。实验动物合格证号:SCXK(鄂)2011-0009,4 个月龄,清洁级,体重(200 \pm 34)g,大鼠适应性喂养一周后,采用随机数字法将大鼠随机分成 4 组,每组 12 只:①AD 模型组;②假手术组;③正常对照组;④电针组。

1.2 主要仪器与试剂 Morris 水迷宫及视频分析软件(上海吉量生物软件有限公司),脑立体定位仪(日本成茂 SR-5R 型),华佗牌 SDZ-II 电针仪(苏州医疗用品厂有限公司),华佗牌无菌针灸针(苏州医疗用品厂有限公司),A β 25~35 (Sigma 公司),超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)、乙酰胆碱酯酶(AchE)、单胺氧化酶(MAO)、一氧化氮(NO)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)、乳酸脱氢酶(LDH)测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.3 AD 模型制备 聚集态 A β 25~35 的准备:按说明书将 A β 25~35 溶于灭菌生理盐水中,稀释为 10 μ g/ μ l,密封后置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 1 周,老化成具有毒性的聚集状态,4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。在脑立体定位仪下,大鼠双侧海马一次性注射聚集态 A β 25~35 制作 AD 模型。大鼠称体质量,以 10%水合氯醛(400 mg/kg)腹腔注射麻醉后固定于脑立体定位仪上(使鼠头牢固、水平固定),常规暴露前囟。定位海马区(前囟后 3.5 mm,旁开 2 mm,脑膜表面下 2.7 mm),钻孔,1 μ l 微量进样器垂直进针,缓慢将聚集态 A β 25~35 注入,每侧 1 μ l (10 μ g/ μ l),注射速度 0.2 μ l/min,留针 15 min,缓慢撤针,使 A β 25~35 充分浸润局部组织。造模完成后第 15 天对大鼠再次进行 Y 型水迷宫筛选,凡 15 次测试中正确次数较造模前下降 1/3 者为造模成功。只有模型成功者才进入下一步实验,若出现死亡或不符合条件的大鼠则予以剔除,并遵循随机原则补齐动物。

1.4 干预方法 造模成功后第 2 天开始,电针组根据大鼠常用的针灸穴位,选取双侧“肾俞”穴(直刺 5 mm)、双侧“内关”(斜刺 4 mm)、“大椎”(斜刺 5 mm)。采用医用 15 mm,28# 无菌毫针刺入穴位,同侧“肾俞”、“内关”为一对电极(其中肾俞接负极,内关接正极),G6805-II 型电针治疗仪,施予疏密波,疏波 2 Hz,密波 30 Hz,电流强度 1 mA,输出电压 2~4 V,以局部轻颤为度。刺激时间为 30 min/次,1 次/d,每周 6 次,共治疗 2 周。模型组与电针组同时给予抓取、固定等刺激。假手术组:双侧海马注射等量生理盐水,余同模型组。正常对照组:正常饮食,不做任何处理。

1.5 大鼠学习记忆能力变化的检测(Morris 水迷宫实验) Morris 水迷宫装置由不锈钢圆形水槽、自动录像及计算机分析处理系统组成。水迷宫为一直径 150 cm、高 50 cm 圆形水池,水深 25 cm,等分为 I、II、III 及 IV 象限,在 II 象限中放置直径 10 cm 的圆形黑色站台,平台距水面 2 cm,水温保持在(23 \pm 2) $^{\circ}$ C,房间内光照恒定,无光线直射在水池内,池壁内贴有不同形状及颜色的标记物。迷宫上方安装摄像机以同步记录大鼠的运动轨迹。实验时用墨汁将迷宫内水染成黑色。采用上海吉量软件科技有限公司研制开发的 Morris 水迷宫视频分析系统进行信息处理,该系统能动态记录大鼠在水迷宫中游泳的录像资料,设定分析参数,进行在线或离线数据分析,并提供大鼠上台潜伏期、靶象限活动时间百分比、穿台次数、游泳速度、游泳路程等多个指标。实验前先将大鼠放入迷宫

中(不含平台)自由游泳2 min,每天训练4次,训练2 d以适应水环境。实验历时6 d,分两个阶段进行:(1)定位航行实验:每只大鼠进行4次训练,依次从第Ⅳ、Ⅲ、Ⅱ、Ⅰ象限的入水点面向池壁入水,记录其从入水到找到平台的时间,即逃避潜伏期(Escape latency)。大鼠爬上平台后,让其在平台上停留15 s,如果大鼠在100 s内未找到平台,则由实验者将其牵引至平台,并在平台上停留15 s,潜伏期则记为100 s,每两次训练间隔1 min,4次训练潜伏期的平均值记为当天的逃避潜伏期,共训练5 d。整个实验过程中水槽周围参照物(迷宫外线索)保持不变,同时实验者不能在动物视力范围之内。(2)空间搜索实验:第6天开始进行空间搜索实验,撤除平台,将大鼠从距离原平台位置(Ⅱ象限)较远的Ⅳ象限放入水中,记录大鼠90 s内穿越原平台目标象限的次数以及有效探索时间,分别计算在各象限停留时间的百分比,以检测大鼠的记忆能力。

1.6 脑组织中生化指标测定 水迷宫测试完毕24 h后,大鼠用10%水合氯醛(0.4 ml/100 g体重)腹腔注射麻醉,打开胸腔,右心室内取血,分离血清保存,待检备用。断头处死,于冰盒上快速取大脑,断头低温取脑,冷盐水冲洗去除血液和杂质。在4℃条件下分离出全脑和海马,取部分海马用以测定,其余海马与脑组织制成10%的匀浆液,4℃离心10 min,取

上清液,分别按照各试剂盒说明书操作,测定SOD、MDA、GSH、GSH-PX、AchE、CAT、MAO、LDH和NO含量。

1.7 统计学方法 使用SPSS17.0软件包进行统计学分析,数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间差异比较用单因素方差分析(One-way ANOVA),各组间两两比较采用SNK法,检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 电针对AD大鼠学习记忆能力的影响 在定位航行实验中,假手术组、正常组以及电针组分别与AD模型组比较,差异均具有统计学意义($P<0.01$);正常组和电针组分别与假手术组比较,除正常组第5天的逃避潜伏期差异有统计学意义($P<0.05$)以外,其余差异均无统计学意义($P>0.05$);且电针组逃避潜伏期比AD模型组明显缩短($P<0.01$) (见表1)。在撤平台后各组SD大鼠水迷宫空间搜索能力测试中(见表2),分别与假手术组、正常组和电针组比较,AD模型组平均速度较快,跨越平台次数、目标象限停留时间以及平台象限停留路程占总路程百分比均较少,且组间差异具有统计学意义($P<0.05$)。假手术组分别与正常组、电针组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。结果提示电针可改善AD模型大鼠的记忆功能障碍。

表1 各组大鼠前5 d定位航行实验中寻找平台潜伏期时间比较($\bar{x}\pm s$, $n=12$, s)

组别	d 1	d 2	d 3	d 4	d 5
AD模型组	73.03±21.23	55.09±16.57	45.14±9.09	32.61±12.96	28.99±9.61
假手术组	43.04±24.08 ^a	28.00±8.60 ^a	23.00±5.62 ^a	16.74±6.17 ^a	14.93±4.50 ^a
正常组	31.01±11.90 ^a	24.23±7.08 ^a	19.00±3.95 ^a	17.51±6.46 ^a	10.99±4.50 ^{ab}
电针组	46.98±18.03 ^a	31.01±7.81 ^a	24.00±5.88 ^a	16.43±2.87 ^a	13.06±5.69 ^a
F值	10.05	20.33	40.44	11.62	19.34
P值	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

注:与AD模型组比较,^a $P<0.01$;与假手术组比较,^b $P<0.05$ 。

表2 撤平台后各组SD大鼠水迷宫空间搜索能力测试情况比较($\bar{x}\pm s$, $n=12$)

组别	平均速度(cm/s)	跨越平台(次)	目标象限停留时间(s)	平台象限停留路程占总路程百分比(%)
AD模型组	26.28±10.58	4.35±1.65	23.92±7.74	0.27±0.07
假手术组	21.17±5.11	8.83±2.56 ^b	37.16±14.14 ^b	0.36±0.19
正常组	18.54±4.97 ^a	8.69±4.31 ^b	38.23±6.83 ^b	0.39±0.15 ^a
电针组	19.13±6.81	9.40±4.47 ^b	39.01±19.32 ^a	0.38±0.14 ^a
F值	2.84	5.47	3.61	1.92
P值	0.05	0.00	0.02	0.14

注:与AD模型组比较,^a $P<0.05$,^{ab} $P<0.01$ 。

2.2 电针对SD大鼠脑组织氧化应激的影响 电针组与AD模型组比较,脑组织SOD增加110.81%,MDA减少36.32%,差异有统计学意义($P<0.01$)。对

于GSH-Px和GSH,电针组与AD模型组比较差异均有统计学意义($P<0.01$),且电针组、正常组以及假手术组之间分别比较差异亦无统计学意义($P>0.05$)

(见表 3)。提示电针可提高脑组织匀浆中 SOD 的活性,增强机体抗氧化能力,减轻自由基的损伤,减少氧自由基(Oxygen free radical, OFR)作用于膜脂质生成的脂质过氧化产物 MDA,从而减轻脂质过氧化,进而延缓衰老。

2.3 电针对 SD 大鼠脑组织中 AchE、MAO、CAT、LDH 活性和 NO 含量的影响 假手术组分别与正常组、电针组比较差异均无统计学意义($P>0.05$) (见表 4),且与 AD 模型组比较,电针组 SD 大鼠脑组织中 AchE 含量显著降低($P<0.01$),说明电针可通过调节胆碱能神经元的表达来降低 AchE 的活性,以促进

受损神经的恢复和再生。同时,电针组与 AD 模型组比较,脑组织中 MAO 含量降低 36.14%,CAT 含量增高 49.53%,LDH 含量降低 33.73%,差异有统计学意义($P<0.01$),提示电针可提高 CAT 活性,降低 MAO 和 LDH 的活性以抑制其表达。AD 模型组 SD 大鼠脑组织中的 NO 含量最高,且与假手术组、正常组以及电针组之间差异均有统计学意义($P<0.01$),即 NO 的神经毒性易导致学习记忆能力障碍。与 AD 模型组比较,电针组 NO 含量显著降低($P<0.01$),说明电针可降低 SD 大鼠脑组织中 NO 含量从而减轻其神经毒性。

表 3 电针对 SD 大鼠脑组织氧化应激的影响($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	SOD (U/mg prot)	MDA (nmol/mg prot)	GSH-Px (U/mg prot)	GSH (nmol/mg prot)
AD 模型组	62.42±14.10	8.26±1.54	17.95±4.35	9.67±1.98
假手术组	124.34±25.76 ^a	4.65±0.62 ^a	29.65±8.79 ^a	15.53±3.64 ^a
正常组	136.66±29.08 ^a	4.18±0.68 ^a	30.58±1.74 ^a	16.84±2.85 ^a
电针组	131.83±23.50 ^a	5.26±1.56 ^a	28.75±3.81 ^a	14.24±3.85 ^a
F 值	25.48	28.74	14.70	11.63
P 值	0.00	0.00	0.00	0.00

注:与 AD 模型组比较,^a $P<0.05$ 。

表 4 电针对 SD 大鼠脑组织中 AchE、MAO、CAT、LDH 活性和 NO 含量的影响($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	SAChE (U/mg prot)	MAO (U/h/mg prot)	CAT (U/mg prot)	LDH (U/mg prot)	NO ($\mu\text{mol/mg prot}$)
AD 模型组	8.61±1.55	115.81±26.30	10.72±2.84	29.94±7.62	3.86±1.54
假手术组	4.58±1.07 ^b	75.94±42.92 ^a	16.44±4.29 ^b	17.33±5.13 ^b	1.92±0.50 ^b
正常组	4.36±2.81 ^b	72.01±20.04 ^b	18.26±4.62 ^b	16.27±3.61 ^b	2.14±0.63 ^b
电针组	4.82±0.82 ^b	73.96±19.28 ^b	16.03±3.64 ^b	19.84±3.34 ^b	2.09±0.35 ^b
F 值	16.18	6.39	8.26	17.24	9.94
P 值	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

注:与 AD 模型组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$ 。

3 讨论

AD 属于祖国医学“老年呆病”范畴,其发病率逐年升高,尚无特效药物。现代临床研究发现,肾俞、大椎、内关三穴相配伍的穴位组合针刺可明显提高 AD 患者的学习记忆能力,其治疗机制是多靶点、多水平、多途径的整体调节^[8-9]。针刺通过影响胆碱能神经系统的功能、抗氧化、改善突触形态可塑性来提高 AD 大鼠的学习记忆能力。本研究发现电针组与 AD 模型组比较,其逃避潜伏期、跨越平台次数和目标象限停留时间等均表现出明显差异($P<0.05$),结果表明针刺可改善 SD 大鼠的学习记忆能力。

相关研究证实,在 AD 患者脑内可出现过氧化表现,患者的大脑中能够检测到典型的氧化应激标记物如 8-OH-dG 和 8-OH-G 等,AD 与氧化应激具有明确的相关性,氧化应激可以作为 AD 的一个早期预测指

标^[10-11]。同时,AD 时糖基化、羰基化以及硝基化等氧化应激标记物的产生或含量也会增加^[12]。脑组织内 SOD、GSH-Px 及 MDA 含量可反映脑组织清除氧自由基的能力,故本研究着重探讨这些指标的变化来反映电针对 AD 大鼠的影响。SOD 是存在于需氧代谢细胞中的一种自由基清除剂,在自由基的产生与清除平衡中起着重要作用^[13]。MDA 是氧自由基脂质过氧化的最终产物,在血清和组织中的含量可反映机体脂质过氧化的速度和强度。GSH 是重要的过氧化物分解酶,可清除活性氧诱发的脂质过氧化物,保护细胞膜结构和功能完整性,从而抗衰老或延缓衰老进程^[14]。GSH-Px 可特异地催化 GSH 对过氧化物的还原反应,能清除过氧化物代谢产物,阻断脂质过氧化链锁反应,减缓衰老过程^[15]。NO 是重要的生物活性分子,具有扩张血管、抑制粘附分子对炎性细胞粘附的作用^[16]。

AchE 可将乙酰胆脂(Ach)水解成胆碱和乙酸,促进神经元发育和神经的再生;CAT 是催化过氧化氢(H₂O₂)分解成 O₂ 和 H₂O 的酶,MAO 可提高 H₂O₂ 水平,诱导神经系统老化;LDH 是体内重要的糖酵解酶^[17]。SOD、GSH-Px 和 MDA 等指标相互作用、相互影响,可共同反映 SD 大鼠的抗氧化及脑组织自由基代谢的能力。本研究发现电针能明显升高脑组织匀浆中 SOD、CAT、GSH-Px、GSH 的含量 ($P<0.01$),降低 MDA、AchE、MAO、LDH、NO 的活性 ($P<0.01$)。结果表明电针可诱导脑组织 SOD、CAT、GSH-Px、GSH 增高,抑制 MDA 和 NO 的生成,拮抗 MAO 和 LDH 活性,下调 AchE 表达,改善脑内过氧化状态,增强脑组织的抗氧化能力。

综上所述,电针可提高 AD 模型大鼠的学习记忆能力,增强机体的抗氧化能力,对脑组织中自由基的代谢起到正调节作用。其机制可能是电针提高了 SOD、CAT 抗氧化系统的活性而发挥了对神经元的保护作用,并通过增强氧自由基清除系统的功能,从而提高机体抗氧化能力实现的。

参考文献

[1] 罗 强,王永红. 阿尔茨海默病的免疫治疗研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(4): 866-868.
 [2] 黄婷婷,刘鹏飞. 影像学方法在诊断阿尔茨海默病中应用[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2012, 26(2): 108-110.
 [3] 范红波. 氧自由基在老年痴呆发病机制中的作用[J]. 中国现代医药杂志, 2012, 14(4): 130-132.
 [4] 高 丽,张颖冬. 胰岛素在阿尔茨海默病发病机制中作用的研究进展[J]. 中国临床神经科学, 2010, 18(3): 318-321, 332.
 [5] 兰 崑,唐 巍,曹坤茂,等. 针灸治疗血管性痴呆的现代研究及思路探讨[J]. 中医药临床杂志, 2012, 24(6): 559-562.

[6] Verghese PB, Castellano JM, Garai K, et al. ApoE influences amyloid-beta (Abeta) clearance despite minimal apoE/Abeta association in physiological conditions [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110 (19): E1807-1816.
 [7] 刘智斌,牛文民,杨晓航,等. “嗅三针”对阿尔茨海默病大鼠海马 Bcl-2 和 Bax 表达的干预效应[J]. 针刺研究, 2011, 1: 7-11.
 [8] 苏 芮,韩振蕴,范吉平. 阿尔茨海默病中医病因病机探讨[J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(5): 743-744.
 [9] 于 琦,崔 蒙,李园白,等. 中医药治疗阿尔茨海默病临床试验文献评价[J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(4): 788-791.
 [10] 魏 艳,谢兆宏,许继平,等. 阿尔茨海默病生物标记物的研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(15): 3332-3334.
 [11] Seal M, Mukherjee S, Pramanik D, et al. Analogues of oxy-heme Abeta: reactive intermediates relevant to Alzheimer's disease [J]. Chem Commun (Camb), 2013, 49(11): 1091-1093.
 [12] 傅 燧,肖世富. 氧化应激与阿尔茨海默病的神经病理机制研究进展[J]. 中华临床医师杂志, 2010, 4(9): 1646-1648.
 [13] Lopez N, Tormo C, De Blas I, et al. Oxidative stress in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment with high sensitivity and specificity [J]. J Alzheimers Dis, 2013, 33(3): 823-829.
 [14] Garai-Ibabe G, Saa L, Pavlov V. Enzymatic product-mediated stabilization of CdS quantum dots produced in situ: application for detection of reduced glutathione, NADPH, and glutathione reductase activity [J]. Anal Chem, 2013, 85(11): 5542-5546.
 [15] 梅峥嵘,司徒冰,黄汉辉,等. 灯盏花素对阿尔茨海默病模型大鼠学习记忆和抗氧化能力的影响[J]. 中国药理学杂志, 2012, 47(5): 347-350.
 [16] Zhang J, Little CJ, Tremmel DM, et al. Notch-Inducible Hyperphosphorylated CREB and Its Ultradian Oscillation in Long-Term Memory Formation [J]. J Neurosci, 2013, 33(31): 12825-12834.
 [17] Vieira LR, Gravato C, Soares AM, et al. Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish Pomatoschistus microps: linking biomarkers to behaviour [J]. Chemosphere, 2009, 76(10): 1416-1427.

(收稿日期:2013-08-17)

读者·作者·编者

标准医学名词表(待续)

(本表以全国自然科学名词审定委员会公布的《医学名词》为据)

不宜用	宜用	不宜用	宜用
胸水	胸腔积液	血象	血常规
休止龋	静止龋	血液动力学	血流动力学
羞明	畏光	牙间乳头	龈乳头
嗅敏度试验	普雷茨试验	牙医学	口腔医学
悬雍垂	腭垂	牙周韧带	牙周膜
薛氏位、许累位	许勒位	亚当斯卡环	改良式箭头卡环
血管加压素、抗利尿激素	血管升压素	亚急性肝坏死、亚急性黄色肝萎缩	亚急性重型肝炎
血脑屏障	血-脑脊液屏障	岩部炎	岩锥炎
血凝	血细胞凝集	研究模型	诊断模型
血色素	血红蛋白	锥后裂	次裂

来氟米特对实验性变态反应性脑脊髓炎小鼠 T 细胞亚群及 Th1 型细胞因子的影响

袁正洲¹, 李作孝¹, 马勋泰¹, 罗斌², 胡高云², 杨波², 陈琪³
(泸州医学院附属医院神经内科¹、介入科²、肝胆外科³, 四川 泸州 646000)

【摘要】 目的 探讨来氟米特(Leflunomide, LEF)对实验性变态反应性脑脊髓炎(EAE)小鼠模型发病防治作用及可能的免疫学机制。方法 将 30 只雌性 C57BL/6 小鼠随机分为 EAE 对照组及高、低剂量 LEF 防治组, 每组 10 只。通过注射髓鞘少突胶质细胞糖蛋白 35-55 (MOG35-55)免疫介导构建 EAE 模型。从造模前 3 d 开始起 EAE 对照组及高、低剂量 LEF 防治组分别予以生理盐水 8 mg/(kg·d)、LEF 2 mg/(kg·d)灌胃, 连续 10 d。观察小鼠发病情况及外周血中 T 细胞亚群及 IFN- γ 、IL-2 水平的变化。结果 LEF 各防治组小鼠临床症状较轻, 发病高峰期外周血 T 细胞亚群 CD₄⁺、CD₈⁺ 分布比例较 EAE 对照组明显升高 ($P < 0.01$), CD₄⁺/CD₈⁺ 值明显降低 ($P < 0.01$); 发病高峰期外周血 IL-2、INF- γ 含量较 EAE 对照组明显降低 ($P < 0.01$), 且高剂量降低更明显 ($P < 0.01$)。结论 LEF 对 EAE 具有防治作用, 效果与 LEF 剂量有关, 其防治作用可能与调节 T 淋巴细胞亚群分布及抑制 IFN- γ 、IL-2 水平有关。

【关键词】 实验性变态反应性脑脊髓炎; 多发性硬化; 来氟米特; T 细胞亚群; Th1 型细胞因子

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2014)04-0480-04

Effect of leflunomide on T cell subsets and Th1-type cytokines in experimental allergic encephalomyelitis mice.

YUAN Zheng-zhou¹, LI Zuo-xiao¹, MA Xun-tai¹, LUO Bing², HU Gao-yun², YANG Bo², CHEN Qi³. Department of Neurology¹, Department of Interventional Therapy², Department of Hepatobiliary Surgery³, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan, CHINA

【Abstract】 Objective To investigate the effect of leflunomide (LEF) on experimental allergic encephalomyelitis (EAE) mice and the possible immunological mechanisms. **Methods** Thirty female C57BL/6 mice were randomly divided into EAE control group, high and low dose leflunomide treatment group, with $n=10$ in each group. EAE model was built by injection of myelin oligodendrocyte glycoprotein 35-55 (MOG35-55). From three days before modeling, the control group, the high dose treatment group, and low dose treatment group were feed saline, leflunomide 8 mg/(kg·d), leflunomide 2 mg/(kg·d) for 10 days, respectively. Incidence was observed in mice and peripheral blood T cell subsets and IFN- γ , IL-2 levels were detected. **Results** Each treatment group have mild clinical symptoms, and peripheral blood T cell subsets CD₄⁺, CD₈⁺ distribution rates were significantly higher than EAE control group ($P < 0.01$), while CD₄⁺/CD₈⁺ value was lower ($P < 0.01$). The peripheral blood IL-2, INF- γ levels in high and low dose treatment group were significantly lower than EAE control group ($P < 0.01$), and the reduction in high dose treatment group was more significant ($P < 0.01$). **Conclusion** Leflunomide has preventive effect on EAE, and the effect is dose related with the leflunomide. Its preventive effect may be related to the regulation of T lymphocyte subsets and inhibition of IFN- γ , IL-2.

【Key words】 Experimental allergic encephalomyelitis; Multiple sclerosis; Leflunomide; T cell subsets; Th1 type cytokines

多发性硬化(Multiple sclerosis, MS)是一种以中枢神经系统(Centralnervous system, CNS)不同部位及不同程度白质脱髓鞘为主要病理特征的自身免疫性疾病^[1]。患者大多遗留不同程度的后遗症而影响生活质量。来氟米特(Leflunomide, LEF)是人工合成的噁唑类化合物,作为一种新型的免疫抑制剂最早应用

于器官移植^[2]。LEF也已用于自身免疫性疾病的治疗,除对类风湿性关节炎疗效显著外,在全身性红斑狼疮、肾小球疾病、皮肤疾病等治疗中也取得了较好的治疗疗效,且药物不良反应较小^[3]。目前国内外未见其用于防治 MS 及其动物模型 EAE 的报道。本研究探讨 LEF 对 MS 的动物模型 EAE 是否具有防治作

基金项目:泸州市科技创新苗子培育计划项目[编号:2013-R-51(8/18)]

通讯作者:李作孝。E-mail:lzx3235@sina.com

用及其对 T 细胞亚群及 Th1 型细胞因子的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 雌性 C57BL/6 小鼠 30 只, 6~8 周龄, 体重(20±2) g, 购自四川大学华西实验动物中心, 为一级合格动物。实验前在泸州医学院附属医院中心实验室常规饲养 7 d。

1.2 实验药品及试剂 来氟米特片(LEF)购自苏州长征-欣凯制药有限公司。髓鞘少突胶质细胞糖蛋白 35-55 多肽(MOG35-55)由上海强耀生物科技有限公司合成, 纯度>95%; 福氏不完全佐剂(IFA)购自 Sigma 公司; 百日咳毒素(PTx)购自 Alexis 公司; 结核分枝杆菌 H37Ra (MT)购自 BD 公司。T 细胞亚群检测试剂盒(FITC-CD₄/PE-CD₈)购自 COULTER 公司; 细胞因子 IL-2 ELISA 检测试剂盒购自北京华英生物技术研究所产品; IFN- γ ELISA 试剂盒购自晶美生物工程有限公司。

1.3 方法

1.3.1 EAE 模型制作 小鼠通过随机数字表随机分为三组: EAE 对照组及高、低剂量 LEF 防治组, 每组 10 只。将 MOG35-55 及结核分枝杆菌 H37Ra (MT)溶解于 IFA 中制成免疫抗原, 其中每毫升抗原含 1 mg MOG35-55 及 4 mg 结核分枝杆菌。在小鼠后背中线两侧分四点注入免疫抗原, 每只注入 0.2 ml。在造模后当天及第 2 天, 每只小鼠腹腔注射 PTx 200 ng 加强免疫反应。

1.3.2 模型干预 从造模前 3 d 开始起每天高、低剂量 LEF 组分别予以 LEF 片 8 mg/(kg·d)、2 mg/(kg·d) (用 2 ml 注射用生理盐水溶解)灌胃; EAE 对照组每日 2 ml 生理盐水灌胃, 连续 10 d。

1.3.3 动物模型评价 每日定时对实验 C57BL/6 小鼠进行神经功能障碍评分。评分标准: 0 分, 未发病; 1 分, 后肢轻度无力(包括尾巴无力); 2 分, 中度后肢无力或者轻度共济失调; 3 分, 中至重度后肢无力; 4 分, 严重后肢无力; 5 分, 中度以下四肢无力的截瘫; 6 分, 四肢全瘫或严重共济失调或者死亡^[4]。

1.3.4 实验终止 C57BL/6 小鼠在发病高峰期(连续 3 d 症状评分无加重、四肢瘫痪或死亡时)处死, 实验终止时取小鼠心脏动脉血 2 ml。

1.3.5 IL-2、IFN- γ 水平及 T 细胞亚群 CD₄⁺、CD₈⁺ 测定 ELISA 法测 IFN- γ 、IL-2 含量, 按照说明书操作, 通过标准品吸光度值绘制标准曲线再计算各样本值。流式细胞仪测定外周血 T 细胞亚群 CD₄⁺、CD₈⁺ 分布。

1.4 统计学方法 计数资料采用率描述。计量

资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 两组间样本均数比较采用 *t* 检验, 多组间样本均数比较, 符合正态分布且方差齐时使用单因素方差分析(One-way ANOVA), 方差不齐或非正态分布时采用 Kruskal-Wallis H 检验(Kruskal-Wallis H test)。统计学处理由 SPSS19.0 软件包分析完成。P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 EAE 对照组及 LEF 各防治组发病潜伏期、进展期及临床表现 C57BL/6 小鼠造模后主要表现为精神萎靡、活动减少、食欲减弱、体重下降等。注射抗原 17 d 左右, EAE 小鼠逐渐出现单后肢或双后肢或伴前肢不同程度的无力、共济失调、瘫痪; 而高、低剂量 LEF 组症状较 EAE 对照组明显减轻, 表现为潜伏期天数延长、进展期缩短、神经功能障碍评分降低(P<0.01 或 P<0.05), 高剂量改善更明显(P<0.01 或 P<0.05), 见表 1。

表 1 EAE 对照组及 LEF 各防治组发病潜伏期和进展期比较($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	潜伏期(d)	进展期(d)	神经功能障碍评分(分)
EAE 对照组	10	17.15±1.75	5.22±1.41	4.22±1.13
低剂量 LEF 防治组	10	18.42±1.31 ^b	4.68±1.55 ^b	3.45±1.33 ^a
高剂量 LEF 防治组	10	19.67±1.43 ^{ad}	3.65±1.19 ^{ac}	3.05±0.75 ^{ad}
H 值		5.62	6.74	5.31
P 值		<0.05	<0.01	<0.01

注: 与 EAE 对照组比较, ^aP<0.01, ^bP<0.05; 与小剂量 LEF 防治组比较, ^cP<0.01, ^dP<0.05。

2.2 EAE 对照组及 LEF 各防治组发病高峰期 T 细胞亚群分布变化 LEF 各防治组发病高峰期外周血 T 细胞亚群 CD₄⁺、CD₈⁺ 分布比例较 EAE 对照组明显升高(P<0.01), CD₄⁺/CD₈⁺ 值明显降低(P<0.01); 高剂量 LEF 防治组大鼠发病高峰期外周血 CD₄⁺、CD₈⁺ 分布比例较低剂量 LEF 组明显增高(P<0.01), CD₄⁺/CD₈⁺ 值降低不明显(P>0.05), 见表 2。

表 2 EAE 对照组及 LEF 各防治组发病高峰期 T 细胞亚群 CD₄⁺、CD₈⁺、CD₄⁺/CD₈⁺ 值($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	CD ₄ ⁺ (%)	CD ₈ ⁺ (%)	CD ₄ ⁺ /CD ₈ ⁺
EAE 对照组	10	35.49±0.58	13.81±0.23	2.57±0.04
低剂量 LEF 防治组	10	40.68±1.24 ^a	21.75±1.28 ^a	1.88±0.11 ^a
高剂量 LEF 防治组	10	43.87±1.04 ^{ab}	23.58±0.81 ^{ab}	1.86±0.09 ^{ac}
H 值		226.11	428.88	215.55
P 值		<0.01	<0.01	<0.01

注: 与 EAE 对照组比较, ^aP<0.01; 与小剂量 LEF 防治组比较, ^bP<0.01, ^cP<0.05。

2.3 EAE 对照组及 LEF 各防治组 C57BL/6 小鼠发病高峰期外周血 IL-2、INF- γ 含量变化 LEF 各防治组发病高峰期外周血 IL-2、INF- γ 含量较 EAE 对照

组明显降低($P<0.01$);高剂量 LEF 防治组 C57BL/6 小鼠发病高峰期外周血 IL-2、INF- γ 含量较较低剂量 LEF 防治组低($P<0.01$),见表 3。

表 3 EAE 对照组及 LEF 各防治组 C57BL/6 小鼠发病高峰期外周血 IL-2、INF- γ 含量变化($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	IL-2 (ng/ml)	INF- γ (ng/ml)
EAE 对照组	10	23.37 \pm 1.19	15.14 \pm 1.10
低剂量 LEF 防治组	10	13.96 \pm 1.18 ^a	12.77 \pm 0.51 ^a
高剂量 LEF 防治组	10	9.45 \pm 0.52 ^{ab}	11.42 \pm 0.86 ^{ab}
H 值		137.32	56.17
P 值		< 0.01	< 0.01

注:与 EAE 对照组比较,^a $P<0.01$;与小剂量 LEF 防治组比较,^b $P<0.01$ 。

3 讨论

MS 是中枢神经系统炎性脱髓鞘疾病,是遗传易患个体与环境因素相互作用而发生的自身免疫所介导的疾病。MS 患者具有多个异常的免疫环节,包括自身抗体破坏髓鞘以及自身反应性 T 细胞激活,同时 MS 患者脑脊液、外周血以及脑组织中出现多种活化反应性 T 细胞。自 20 世纪中叶, Kabat 等在成功地造出 MS 的动物模型 EAE 以来,EAE 造模动物发展种类繁多,猴、大鼠、C57BL/6 小鼠等均有报道^[5]。C57BL/6 小鼠是用来建立 MS 模型的理想品系,但由于其价格较高,且造模过程中抗原及百日咳毒素价格不菲同时不易获取,国内较少使用,而国际上普遍采用 C57BL/6 小鼠构建稳定的模型^[6]。

LEF 是美国 FDA 批准用于类风湿关节炎治疗的一种新型免疫抑制剂。作为一种新型的免疫抑制剂最早应用于器官移植,LEF 同时也已用于自身免疫性疾病的治疗^[7]。LEF 通过抑制抑制淋巴细胞活化及由此而致的免疫反应。本实验选择 8 mg/(kg·d)、2 mg/(kg·d) 两种剂量 LEF 对 EAE 小鼠进行干预,发现 LEF 通过发挥其抗炎功能,能够延长 EAE 发病潜伏期、缩短进展期、减轻神经功能障碍评分,对 EAE 有保护作用且剂量依赖关系作用效果明显。

在 MS 的诸多发病机制中,由于体内免疫平衡被打破,从而引发的自身免疫性疾病被认为是最重要的一种机制^[8]。T 淋巴细胞参与细胞免疫的,根据 T 淋巴细胞表面的抗原不同可分为 CD₄⁺ 以及 CD₈⁺ 两类细胞^[9]。T 细胞在脱髓鞘中起重要作用,在 MS 患者脑组织病灶中发现大量的 CD₄⁺ 和 CD₈⁺ T 细胞,在有针对性地去除 EAE 大鼠的 CD₄⁺ Th 细胞后,EAE 大鼠病情有所缓解乃至恢复正常^[10]。如果去除了大鼠的 CD₄⁺ T 细胞,则可以导致大鼠对 EAE 产生抵抗。对猴实验性变态反应性脑脊髓炎血和脑脊液 T 淋巴细胞亚群

动态观察发现,急性期猴 EAE 血中 CD₄⁺/CD₈⁺ 明显升高,猴 EAE 发病后脑脊液 CD₄⁺ T 细胞在急性期比血中 CD₄⁺ T 细胞升高更明显,CD₄⁺/CD₈⁺ 明显比发病前高,证实了 EAE 是 CD₄⁺ T 细胞介导为主的免疫紊乱。推测 EAE 发病时存在 CD₄⁺ T、CD₈⁺ T 等免疫活性细胞增殖能力下降:EAE 动物存在 T 细胞亚群分布异常、CD₄⁺/CD₈⁺ 值倒置。本研究结果显示:EAE 组发病高峰期外周血 T 细胞亚群 CD₄⁺、CD₈⁺ 分布比例较 LEF 防治组明显降低,CD₄⁺/CD₈⁺ 值明显增高。提示 EAE 发病与 CD₄⁺、CD₈⁺ 分布比例降低、CD₄⁺/CD₈⁺ 值增高有关。LEF 可能通过提高 EAE 大鼠 CD₄⁺、CD₈⁺ 分布比例和降低 CD₄⁺/CD₈⁺ 值,纠正 T 细胞亚群分布异常从而发挥对 EAE 的保护作用。其保护作用与剂量有关,高剂量作用更为明显。

根据其分泌不同的细胞因子,CD₄⁺ T 细胞又被分为 Th1、Th2 等细胞。Th1 细胞主要分泌 IL-2、INF- γ 等。通常情况下,机体产生的细胞因子较少,在受到抗原、细胞因子以及内毒素等刺激后能够迅速产生大量细胞因子^[11]。有研究显示中枢神经系统的 IL-2 mRNA 及蛋白在 EAE 在恢复期降低,而在诱导期以及急性期增高。用基因敲除 IL-2 的 C57BL/6 小鼠来造 EAE 模型,实验显示未敲除的野生型小鼠全部发病,而敲除 IL-2 的小鼠仅有 23% 的造模成功率^[12]。证实了 IL-2 缺乏的 C57BL/6 小鼠对 EAE 易感性下降。INF- γ 协同 TNF- α 上调星形细胞对 MHCII 类分子的表达,促进抗原递呈,加速炎症反应的启动。本研究发现 LEF 各防治组发病高峰期外周血 IL-2、INF- γ 含量较 EAE 对照组明显降低,高剂量 LEF 防治组外周血 IL-2、INF- γ 含量较较低剂量 LEF 防治组低,与既往研究结果相似。

综上所述,LEF 能够延长 EAE 发病潜伏期、缩短进展期、减轻神经功能障碍评分,对 EAE 具有保护作用,且剂量依赖关系作用效果明显。其保护作用可能与提高 EAE 大鼠 CD₄⁺、CD₈⁺ 分布比例和降低 CD₄⁺/CD₈⁺ 值,纠正 T 细胞亚群分布异常以及降低 Th1 型细胞因子 IL-2、INF- γ 有关。LEF 为防治 MS 提供了新的研究方向,而其在 MS 患者中的安全有效性还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Valera P, Zavattari P, Albanese S, et al. A correlation study between multiple sclerosis and type 1 diabetes incidences and geochemical data in Europe [J]. Environmental Geochemistry and Health, 2013, 25(4): 1-20.

子痫前期患者胎盘 NF-κB 的表达及其与细胞因子变化的相关性

陈芳荣, 龚护民, 茹美艳, 施 蕾, 卢 敏

(海南省人民医院妇产科, 海南 海口 570311)

【摘要】 目的 探讨子痫前期患者胎盘 NF-κB 的表达及其与细胞因子的变化关系。方法 选取在海南省人民医院妇产科住院的晚孕产妇 120 例, 其中正常妊娠组 40 例, 子痫前期组 80 例(轻度 40 例, 重度 40 例)。采用免疫组化法检测胎盘 NF-κB p65、VCAM-1、IκB-α 和 Bcl-1 的表达。采用 ELISA 法检测分娩前血清 TNF-α、VCAM-1 和 IL-4 水平。子痫前期组和正常妊娠组进行统计学分析, 判断结果有无统计学意义。结果 子痫前期组较正常妊娠组的胎盘 NF-κB p65、VCAM-1 表达明显升高; IκB-α、Bcl-1 表达明显降低($P < 0.01$); 子痫前期患者血清细胞因子 TNF-α、VCAM-1 水平明显高于正常妊娠组, IL-4 水平明显低于对照组($P < 0.01$)。结论 子痫前期患者胎盘 NF-κB 活化增强与细胞因子表达密切相关, 其参与免疫炎症反应及胎盘细胞损伤, 加速子痫前期的发病过程。

【关键词】 子痫前期; NF-κB; 细胞因子; 炎症

【中图分类号】 R714.24*5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2014)04-0483-04

Expression of NF-κ B in placenta of preeclampsia and its relationship with changes of cytokines. CHEN Fang-rong, GONG Hu-ming, RU Mei-yan, SHI Lei, LU Min. Department of Gynaecology and Obstetrics, People's Hospital of Hainan Province, Haikou 570311, Hainan, CHINA

【Abstract】 Objective To investigate the expression of nuclear factor-kappa B (NF-κB) in placenta of preeclampsia and its relationship with the changes of cytokines. **Methods** One hundred and twenty late pregnant patients in Department of Gynaecology and Obstetrics in People's Hospital of Hainan Province were recruited: 40 normal pregnant women (the control group) and 80 preeclampsia patients (the preeclampsia group, 40 with mild preeclampsia and 40 with severe preeclampsia). Expression of placenta NF-κB p65, VCAM-1, IκB-α and Bcl-1 were determined by immunofluorescence. Serum TNF-α, VCAM-1 and IL-4 levels before delivery were detected by ELISA. The preeclampsia group and the control group were analyzed statistically to determine whether the results were statisti-

基金项目: 海南省自然科学基金资助项目(编号: 30636)

通讯作者: 龚护民。E-mail: 13337610058@163.com

[2] Wiacek R, Kolossa K, Jankowski T, et al. The efficacy and safety of leflunomide in patients with active rheumatoid arthritis [J]. Adv Clin Exp Med, 2012, 21(3): 337-342.

[3] Chen XC, Liu T, Li JJ, et al. Efficacy and safety of leflunomide for the treatment of BK virus-associated hemorrhagic cystitis in Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation recipients [J]. Acta Haematologica, 2013, 130(1): 52-56.

[4] Brod SA, Hood ZM. Ingested (oral) SST inhibits EAE [J]. Autoimmunity, 2011, 44(5): 437-443.

[5] Stepanov AV, Belogurov AA, Mamedov AE, et al. Therapeutic effect of encapsulated into the nanocontainers MBP immunodominant peptides on EAE development in DA rats [J]. Bioorganicheskaia Khimiia, 2012, 38(3): 306-314.

[6] Ma X, Jiang Y, Wu A, et al. Berberine attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis in C57 BL/6 mice [J]. PloS One, 2010, 5(10): 1-10.

[7] Ren Q, Zeng HS, Zeng XFL. Leflunomide inhibits the apoptosis of human embryonic lung fibroblasts infected by human cytomegalovirus [J]. Eur J Med Res, 2013, 18:3.

[8] Zhang Y, Guo T B, Lu H. Promoting remyelination for the treatment of multiple sclerosis: opportunities and challenges [J]. Neuroscience Bulletin, 2013, 29(2): 144-154.

[9] Jiang H, Braunstein NS, Yu B, et al. CD₈⁺ T cells control the TH phenotype of MBP-reactive CD₄⁺ T cells in EAE mice [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(11): 6301-6306.

[10] Bettini M, Rosenthal K, Evavold BD. Pathogenic MOG-reactive CD₈⁺ T cells require MOG-reactive CD₄⁺ T cells for sustained CNS inflammation during chronic EAE [J]. Journal of Neuroimmunology, 2009, 213(1-2): 60-68.

[11] Mannie MD, Clayson BA, Buskirk EJ, et al. IL-2/neuroantigen fusion proteins as antigen-specific tolerogens in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): correlation of T cell-mediated antigen presentation and tolerance induction [J]. Journal of Immunology, 2007, 178(5): 2835-2843.

[12] Webster KE, Walters S, Kohler RE, et al. *In vivo* expansion of T reg cells with IL-2-mAb complexes: induction of resistance to EAE and long-term acceptance of islet allografts without immunosuppression [J]. J EXP Med, 2009, 206(4): 751-760.

(收稿日期: 2013-10-28)