

外源性雄激素对实验性变态反应性脑脊髓炎的视神经形态功能的影响

高阳 刘瑛 袁敏而 顾欣祖

【摘要】 目的 研究在实验性变态反应性脑脊髓炎 (EAE) 中, 口服雄激素对视神经形态和功能的影响。**方法** 雌性 Wistar 大鼠被随机分为 3 组: 正常组、未治疗对照组和雄激素组。未治疗对照组每天以安慰剂灌胃, 雄激素组每天以 0.25mg/kg 甲睾酮灌胃。在第 20 天, 未治疗对照组和雄激素组注射完全弗氏佐剂-豚鼠脊髓匀浆 (CFA-GPSCH), 并辅以注射百日咳疫苗 (BPV) 诱导 EAE 模型。我们用光学显微镜和闪光视觉诱发电位 (F-VEP) 观察视神经形态和功能的变化。**结果** EAE 鼠发病后出现尾及后肢无力、麻痹甚至死亡等临床症状。与未治疗对照组相比, 雄激素组的 EAE 发病率和临床表现明显下降 ($p < 0.05$)。EAE 鼠 N1、P 和 N2 潜伏期明显延长, N1-P 和 P-N2 振幅降低。与未治疗对照组相比, 雄激素组的潜伏期明显缩短 ($p < 0.05$), 振幅升高 ($p < 0.05$)。未治疗对照组视神经可见广泛的脱髓鞘, 而雄激素组脱髓鞘不明显。**结论** 口服雄激素对 EAE 鼠视神经有保护作用。

【关键词】 睾酮 雄激素 实验性变态反应性脑脊髓炎 视神经炎 多发性硬化 F-VEP, 雌性

Effect of oral testosterone on the function and morphology of optic nerve in experimental autoimmune encephalomyelitis GAO Yang, LIU Ying, YUAN Min-Er, GU Xin-zu. Zhongshan Ophthalmic center, SUN Yat-sen University, Guang zhou, 510060, China

【Abstract】 Objective Considering that sex steroids could influence the immune system, we observed the effect of oral testosterone on the function and morphology of optic nerve in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). **Methods** Female Wistar rats were randomly divided into 3 groups: the normal group; the testosterone group fed with 0.25mg/kg methyltestosterone orally per day; the untreated control group fed with placebo. On the 20th day, the untreated control group and the testosterone group rats were induced to establish EAE model by injecting guinea pig spinal cord homogenate (GPSCH) in complete Freund's adjuvant (CFA) and bordetella pertussis vaccine (BPV). We observed the functional and morphological changes of optic nerve with the aid of flare-visual evoked potential and light microscope. **Results** EAE rats presented weakness or paralysis of tail and hind limb. Compared to the untreated control group, oral testosterone reduced the incidence of EAE and released signs. As to EAE rats the latency of N1, P and N2 wave had a marked prolongation, and the N1-P and P-N2 amplitude decreased. In the testosterone group, the latency was shorter than that of the untreated control group ($p < 0.05$), and the amplitude increased ($p < 0.05$). The results of light microscope showed extensive demyelination of optic nerve in the untreated control group, while demyelination of optic nerve in the testosterone group was not obvious. **Conclusions** Oral testosterone might protect optic nerve in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis.

【Key words】 Testosterone; Experimental autoimmune encephalomyelitis; Optic neuritis; Multiple sclerosis; Androgens; Females

视神经炎泛指视神经的炎症、蜕变及脱髓鞘等。其中急性脱髓鞘性视神经炎常为多发性硬化 (multiple sclerosis, MS) 的首发症状, 男女发病率之比为 1: 3。MS 作为自身免疫性疾病也存在性别差异, 女性发病率更高, 发病时间更早, 而且症

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30471847)

作者单位: 510060 广州, 中山大学中山眼科中心; 中山大学眼科学国家重点实验室

通讯作者: 顾欣祖, E-mail: jxgu168@yahoo.com

状随妊娠期激素水平的变化而变化^[1]。许多研究认为免疫、内分泌和中枢神经系统通过信号分子、激素和神经递质间的相互作用构成了一个网络, 则性激素就可以影响免疫系统。本实验利用 MS 和视神经炎的动物模型——实验变态反应性脑脊髓炎 (Experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE), 观察外源性雄激素对 EAE 中视神经形态功能的影响。

材料与方 法

一、材料

实验动物为生后 7 周、体重 180 ~ 220g 的清洁级 (SPF) 雌性 Wistar 大鼠, 双眼均为实验眼。将实验动物随机分为正常组、未治疗对照组和雄激素组; 普通级豚鼠, 体重 350 ~ 450g, 雌雄不限; 动物均为中山大学北校区实验动物中心提供。卡介苗 (批号 200604001) 和百日咳疫苗 (bordetella pertussis vaccine, BPV) 购自卫生部上海生物制品研究所, 卡介苗的浓度为 100mg/ml, BPV 的浓度为每毫升 10^{10} 个菌。甲睾酮片由天津力生制药股份有限公司生产。

完全福氏佐剂 (complete Freund's adjuvant, CFA) 的配制: 将液体石蜡和羊毛脂按体积比 2:1 共热至 70℃ 熔融后混匀, 分装后高压灭菌, 4℃ 保存备用。临用前按每毫升加入 10mg 卡介苗混匀制成 CFA。

豚鼠全脊髓匀浆 (GPSCH) 的制备: 豚鼠以氯胺酮过量麻醉后, 以预冷的 0.9% 氯化钠溶液心脏灌流至无血液流出后, 取出豚鼠脊髓, 加等量的 0.9% 氯化钠溶液, 制成全脊髓匀浆。

二、实验步骤

EAE 动物模型的诱导和症状评分: 取等量的全脊髓匀浆和完全福氏佐剂, 混匀后制成稳定的油包水型抗原乳剂, 放置 24h 以上不分层。大鼠每只脚垫皮内注射 0.1ml 抗原乳剂, 每只动物 0.4ml, 后肢皮下加注 0.5ml BPV。模型诱导后每日观察鼠的体重变化和体征并评分。参考临床评分标准, 使用双盲法对动物出现的体征评分: 0 分, 无明显异常; 1 分, 尾巴无力松弛; 2 分, 行动迟缓, 轻度共济失调; 3 分, 后肢无力; 4 分, 后肢麻痹; 5 分, 四肢麻痹或死亡^[2]。

给药方法与剂量: 将甲睾酮溶于 1% 的乙醇中, 雄激素组每只鼠每天给予 0.25mg/kg 甲睾酮^[3]灌胃, 未治疗对照组给予 1% 的乙醇灌胃。

F-VEP 检测: 免疫 14 ~ 30d 后, 应用 Neuropack-

II 电生理记录仪, 取出现症状后 48 ~ 72h 内的 Wistar 大鼠以氯胺酮 (50mg/kg) 腹腔麻醉后捆绑置于实验台上。采用银针电极, 记录电极插入枕后隆凸皮下, 参考电极置于双眼连线中点皮下, 接地电极置于尾部皮下, 暗适应 15min 后记录。采用全视野刺激球白色闪光刺激, 背景无色, 通频带低频 0.5Hz, 高频 100Hz, 频率 2Hz, 叠加 128 次, 连续测量至少 5 次, 每次间隔 10min。每只动物记录稳定波形 3 次, 检查一眼时, 用自制不透光黑色眼罩完全遮盖对侧眼。记录 N1、P 和 N2 的潜伏期和 N1-P、P-N2 振幅。

取材: 记录完 F-VEP 后立即氯胺酮过量麻醉处死大鼠, 摘除眼球, 尽可能包括较长的眶内段视神经, 于球后 1mm 处切断视神经。视神经以 4% 的多聚甲醛固定后包埋制成切片, 染色观察形态。

三、统计方法

全部数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SAS 软件包, EAE 鼠发病潜伏期及临床评分用两组完全随机化的 t 检验, F-VEP 潜伏期和振幅应用单因素方差分析。

结 果

一、行为学观察

动物自免疫后第 10 天开始, 相继出现尾无力、松弛、下垂, 麻痹以及后肢无力、麻痹甚至死亡等体征, 并于出现症状前的 1 ~ 2d 开始出现体重下降, 体重下降幅度和临床症状的严重程度相一致。雄激素组与未治疗对照组相比, 发病潜伏期延长 ($p < 0.05$), 发病率明显降低, 临床评分降低 ($p < 0.05$), 见表 1。

表 1 两组 EAE 鼠发病潜伏期、发病率及临床评分

分组	潜伏期 (d)	发病率 (%)	临床评分
未治疗对照组	12.00 ± 2.02	8/10(80.0)	2.88 ± 0.58
雄激素组	16.00 ± 1.73	3/8(37.5)	1.33 ± 0.41

二、F-VEP 结果

与正常组相比, EAE 鼠 N1、P 和 N2 潜伏期明显延长, N1-P 和 P-N2 振幅降低。与未治疗对照组相比, 雄激素组的潜伏期明显缩短 ($p < 0.05$)、振幅提高 ($p < 0.05$)。(见表 2、图 1)

表 2 各组 F-VEP 潜伏期及振幅

分组	N1 (ms)	N1-P (μv)	P(ms)	P-N2 (μv)	N2(ms)
正常眼	32.76 ± 3.73	15.13 ± 3.57	47.95 ± 5.34	19.57 ± 3.51	93.61 ± 7.66
对照组	53.61 ± 3.21	5.89 ± 2.76	80.84 ± 9.83	7.58 ± 2.16	160.59 ± 12.76
雄激素组	43.21 ± 4.59	10.64 ± 1.97	57.68 ± 7.93	14.77 ± 3.17	118.79 ± 9.37

三、视神经光镜观察结果:

1. HE 染色: 正常组视神经纵切面可见神经纤

维排列规则致密整齐,染色均匀,胶质细胞较少(图2a)。未治疗对照组视神经纵切面神经纤维走行迂曲呈波浪状,可见弥漫脱髓鞘改变(图2c)。而雄激素组视神经脱髓鞘不明显,仅表现为炎症细胞、胶质细胞增多,结构较紊乱(图2e)。

砂罗铬花青染色(SC):正常组视神经SC染色后神经纤维呈密集平行排列的蓝色纤维,排列规则,胶质细胞较少(图2b)。未治疗对照组视神经纵切面可见神经纤维呈蓝色波浪状,走形迂曲,不规则,

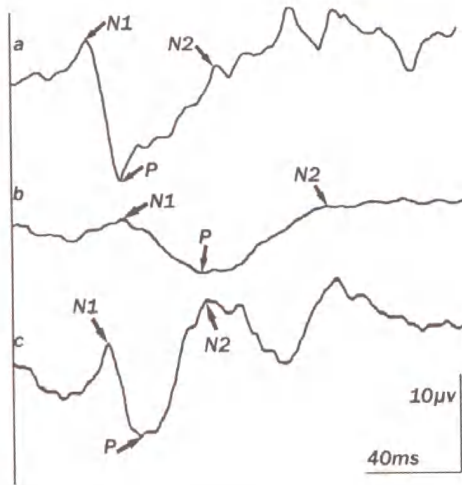


图1 正常组、未治疗对照组和雄激素组的F-VEP
a, 正常组F-VEP。b, 未治疗对照组F-VEP。c, 雄激素组F-VEP。
与正常鼠相比, EAE鼠潜伏期明显延长、振幅降低。而与未治疗对照组相比, 雄激素组的潜伏期缩短($p < 0.05$), 振幅升高($p < 0.05$)

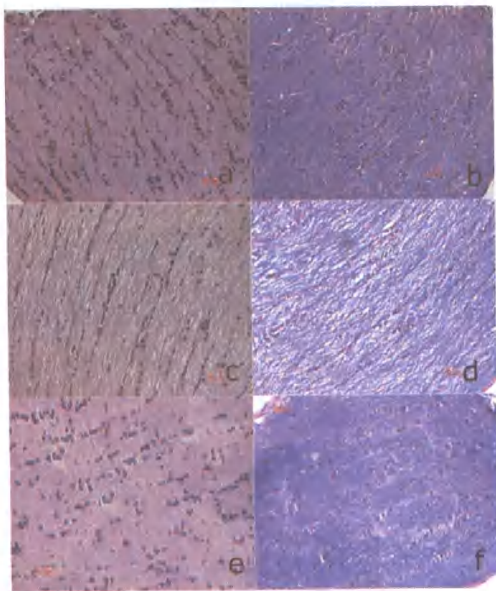


图2 各组的视神经纵切片
正常组(a,b), 未治疗对照组(c,d)和雄激素组(e,f)的视神经纵切片。其中a,c,e为H&E染色, b,d,f为SC染色。未治疗对照组视神经可见明显的脱髓鞘改变(c,d);而雄激素组视神经脱髓鞘不明显(e,f)。

部分纤维呈串珠状,虽然纤维走行的总趋势与纵轴平行,但多走行偏斜,可见弥漫脱髓鞘改变,胶质细胞增多呈粉红色(图2d)。雄激素组视神经脱髓鞘不明显,纤维走行较规则,炎症细胞、胶质细胞增多,结构较紊乱(图2f)。

讨论

EAE模型:

EAE是MS最常用的动物模型。EAE和MS多累及视神经。MRI上的视神经增强影在视神经炎和EAE中非常相似^[4,5]。视神经炎病理显示的炎症和脱髓鞘改变也可见于EAE中。EAE中VEP的潜伏期延长,类似MS和视神经炎病人。这些相似点说明EAE是研究视神经炎和MS理想的动物模型。国外有多种制作EAE的方法,其中最为理想的是应用重组少突胶质细胞髓鞘糖蛋白(rrMOG)和完全弗氏佐剂(CFA)免疫Brown Norway鼠^[6],符合人类视神经炎的发病。但rrMOG的制作复杂不易获得限制了这种方法的应用。Guy J等^[7]以Strain-13豚鼠脊髓免疫该鼠建立了EAE,由于国内豚鼠的品系复杂,背景知识及相关试剂缺乏不宜作为实验对象。因此我们选取了对诱发EAE敏感的Wistar大鼠作为实验对象,以豚鼠脊髓为免疫原,建立了EAE模型。该模型与正常鼠相比,临床症状明显,F-VEP潜伏期延长,振幅降低($p < 0.05$);视神经的HE和SC染色可见典型的炎症和脱髓鞘改变(见图2)。说明该模型可以较好的模拟人类视神经炎。

雄激素对EAE的保护作用:

人们发现视神经炎、MS和SJL/J小鼠的EAE都存在性别差异,原因可能是雄激素的保护作用或雌激素的促发作用,为此人们进行了大量的研究。1997年Danal M^[8]等通过在雌性SJL/J小鼠皮下安装不同剂量的双氢睾酮(DHT)来研究外源性雄激素对于EAE的影响,发现超过雄性生理剂量的DHT可以明显降低EAE的发病率,减轻临床症状。2003年Karen M^[9]等对雌雄SJL/J和C57BL/6小鼠都进行了去势并放置不同剂量的DHT或睾酮的研究,发现雄鼠去势后EAE症状加重,而雌鼠去势与否对EAE症状无影响,这两点说明内源性雄激素对EAE有保护作用,而内源性雌激素则无EAE促发作用;生理剂量的DHT和睾酮就可以降低EAE的发病率,减轻临床表现,这一点又说明外源性雄激素对EAE也有保护作用。但雄激素对EAE的作用机制尚不清楚,归纳起来可能为以下几点。

雄激素的作用机制:

EAE 是一种 Th 细胞介导的疾病, Th 细胞介导的免疫反应有两种: Th1 细胞分泌 Th1 细胞因子(IL-2、TNF- α 、IFN- γ 等), 介导 EAE 的发生; Th2 细胞产生 Th2 细胞因子(IL-4、IL-5、IL-6 等), 对 EAE 有保护作用。内源性和外源性雄激素通过增加 Th2/Th1 细胞因子的比例^[10], 降低 EAE 发病率, 减轻临床症状。Kovacs 等的研究发现雄激素受体广泛存在于脾脏细胞、胸腺细胞及外周血细胞上, 雄激素可以直接作用于免疫效应细胞, 调节细胞因子的表达, 提高 Th2/Th1 细胞因子的比值。

人们对于雄激素对于 EAE 的作用做了大量的研究, 但至今没有人研究雄激素对 EAE 视神经是否有影响。因此我们的实验用雌性 Wistar 大鼠为实验对象, 研究口服甲睾酮对与 EAE 发病及视神经形态、功能的影响。发现外源性雄激素可以减轻 EAE 的视神经损伤。但具体的机制尚不清楚, 可能与雄激素对血脑屏障的保护作用有关。血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 通透性改变是导致 EAE 脱髓鞘的重要因素^[11-13]。尽管 EAE 血管内皮细胞超微结构仍然完整, 但其已丧失了保持 BBB 完整性的能力^[14]。在免疫介导的视神经炎和 MS 中也可见相当程度的 BBB 破坏。实际上人们认为导致脱髓鞘的炎症细胞和体液因子正是通过破坏的 BBB 进入中枢神经系统的, 而这是导致视神经炎和 MS 的主要原因。雄激素与血管内皮细胞上的受体结合, 改善血管通透性和淋巴细胞黏附能力, 保护 BBB, 减少炎症细胞向中枢神经系统的迁移, 从而对视神经产生保护作用。

综上所述, EAE 是视神经炎和多发性硬化理想的动物模型, 为我们研究视神经炎和 MS 的发病机制、治疗和预后奠定了基础。关于 EAE 存在的性别差异和雄激素在其中的作用机制目前仍不完全清楚, 但通过研究雄激素对 EAE 血脑屏障的作用和机制, 预期将会取得进一步的成果。

参 考 文 献

- 1 Drew PD, Chavis JA, Bhatt R. Sex steroid regulation of microglial cell activation: relevance to multiple sclerosis. *Ann NY Acad Sci*, 2003, 1007: 329-334
- 2 林嘉友. 实验性变态反应性脑脊髓炎动物模型. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2003, 10(1):33-34
- 3 Daniela RM, Gaston C, German A, et al. Oral Testosterone in Male Rats and the Development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Neuroimmunomodulation* 2005;12:246-254
- 4 Guy J, Fitzsimmons J, Ellis EA, et al. Gadolinium-DTPA-enhanced magnetic resonance imaging in experimental optic neuritis. *Ophthalmology* 1990, 97:601-607
- 5 Guy J, Mancuso A, Quisling RG, et al. Gadolinium-DTPA-enhanced magnetic resonance imaging in optic neuropathies. *Ophthalmology* 1990, 97:592-599
- 6 Amor S, Groome N, Lington C, et al. Identification of epitopes of myelin oligodendrocyte glycoprotein for the induction of experimental allergic encephalomyelitis in SJL and Biozzi AB/H mice. *J Immunol*. 1994 Nov 15;153(10):4349-4356
- 7 Guy J, Ellis EA, Hope GM, et al. Influence of antioxidant enzymes in reduction of optic disc edema in experimental optic neuritis. *J Free Radic Biol Med*. 1986;2(5-6):349-357
- 8 Dalal M, Kim S, Voskuhl RR. Testosterone therapy ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis and induces a T helper 2 bias in the autoantigen-specific T lymphocyte response. *J Immunol* 159:3-6
- 9 Karen MP, Kyi KL, Judith FA, et al. Androgens are protective in experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, 2004: 146, 144-152
- 10 Darlington C. Multiple sclerosis and gender. *Curr Opin Investig Drugs*, 2002, 3(6):911-914
- 11 Hu P, Pollard J, Hunt N, et al. Microvascular and cellular responses in the optic nerve of rats with acute experimental allergic encephalomyelitis (EAE). *Brain Pathol* 1998, 8: 475-486
- 12 Suckling AJ, Reiber H, Kirby JA, et al. Chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis: immunological and blood-cerebrospinal fluid barrier dependent changes in the cerebrospinal fluid. *J Neuroimmunol* 1983, 4:35-45
- 13 Pañ W, Banks WA, Kennedy MK, et al. Differential permeability of the BBB in acute EAE: enhanced transport of TNT-alpha. *Am J Physiol* 1996, 271:636-642
- 14 Rovaris M, Mastrorardo G, Gasperini C, et al. MRI evolution of new MS lesions enhancing after different doses of gadolinium. *Acta Neurol Scand* 1998, 98:90-93. 428

(收稿时间: 2006-09)