

血管活性肠肽(VIP)对实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)大鼠脑组织 IL-17A 含量的影响

杨元,袁正洲,吕志宇,张淑江,李晓红,李作孝

(西南医科大学附属医院神经内科,四川 泸州 646000)

【摘要】 目的 探讨血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)对实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)大鼠脑组织 IL-17A 含量的影响。**方法** 60 只健康雌性 Wistar 大鼠随机分成正常对照组、EAE 对照组、VIP 低剂量防治组和 VIP 高剂量防治组。利用髓鞘碱性蛋白(MBP) + 完全福氏佐剂(CFA)诱导建立 EAE 模型。自造模当日起,每隔一日分别对 VIP 低、高剂量防治组大鼠腹腔注射 VIP 4 nmol/kg(0.2 mL)、16 nmol/kg(0.8 mL),正常对照组及 EAE 对照组注射 0.8 mL 生理盐水,连续 10 d。观察大鼠发病情况;ELISA 法检测脑组织匀浆中 IL-17A 因子含量变化;免疫组化技术,利用抗胶质纤维酸性蛋白抗体(GFAP)检测脑组织内的星型胶质细胞活化情况。**结果** VIP 各剂量防治组大鼠发病潜伏期延长、进展期缩短、发病高峰期神经功能障碍评分(NDS)降低,脑组织匀浆中 IL-17A 含量降低,活化的星型胶质细胞即 GFAP⁺ 细胞量减少,且各剂量组间存在一定剂量依赖关系。**结论** VIP 通过降低脑组织中 IL-17A 含量、抑制星型胶质细胞活化,发挥对 EAE 的防治作用。

【关键词】 血管活性肠肽;实验性自身免疫性脑脊髓炎;IL-17A;GFAP⁺ 星型胶质细胞

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)10-0032-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.10.007

Effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) on the content of IL-17A in the brain tissue of rats with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)

YANG Yuan, YUAN Zheng-zhou, LV Zhi-yu, ZHANG Shu-jiang, LI Xiao-hong, LI Zuo-xiao
(Department of Neurology, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou Sichuan 646000, China)

【Abstract】 Objective To explore the effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) on the content of IL-17A in the brain tissue of rat models of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). **Methods** Sixty healthy female Wistar rats were randomly divided into normal control group, EAE control group, low-dose VIP group and high-dose VIP group. Ten healthy guinea pigs were used to prepare anti-IL-17A antibody. Myelin basic protein (MBP) + complete adjuvant (CFA) were used to establish the EAE model. Since the first day of modelling, the low-dose and high-dose VIP groups received intraperitoneal injection of VIP 4 nmol/kg (0.2 mL) and 16 nmol/kg (0.8 mL), respectively, every other day for 10 consecutive days. The normal control group and EAE group were injected with 0.8 mL saline instead of VIP. The incubation period, progression and the peak of neurological dysfunction scores (NDS) of the rats were recorded. The levels

[作者简介] 杨元,女,硕士,E-mail: lsh880801@163.com,电话:18715760908。

[通讯作者] 李作孝,男,教授,硕士生导师,E-mail: lzx3235@sina.cn,电话:13882794776。

of IL-17A in the brain tissue was determined by ELISA assay, and the GFAP⁺ astrocyte activation in brain at morbidity peak in the rats was examined using anti-GFAP (glial fibrillary acidic protein) antibodies. **Results** The incubation period were extended, the progression period was shortened and the peak neurological dysfunction score (NDS) was decreased in the VIP-treated groups, in a dose-response relationship. The cytokine levels of IL-17A and the astrocyte activation degree in brain tissue were reduced in each VIP dose group, in a dose-response relationship. **Conclusions** VIP exerts therapeutic effect on experimental autoimmune encephalomyelitis through lowering the IL-17A content and inhibition of astrocyte activation in the brain tissue.

【Key words】 Vasoactive intestinal peptide; Experimental autoimmune encephalomyelitis; IL-17A; GFAP⁺ astrocytes; Rats; Guinea pigs

多发性硬化(multiple sclerosis, MS)作为一种中枢神经系统(central nervous system, CNS)的自身免疫性疾病,其病因尚不明确,各种病因通过破坏 Th1/Th2 细胞免疫平衡,最终导致 CNS 炎细胞浸润、白质脱髓鞘、轴突变性等病理改变^[1,2]。随着对其动物模型实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)研究深入,越来越多的证据表明 Th17 细胞分泌的 IL-17A 因子在该疾病发病过程中也发挥重要的作用^[3-5]。血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)是一种非胆碱能非肾上腺能神经递质,由 28 个氨基酸残基组成,属于胰高血糖素-胰泌素家族^[6,7]。研究表明 VIP 通过诱导免疫细胞增殖、分化、活化及迁移,抑制炎症因子(IL-17A、IFN- γ 、NO 等)的合成及分泌,发挥免疫调节的作用^[8]。国内外有将 VIP 运用在类风湿关节炎(RA)的治疗报道^[9,10],但尚未明确阐明 VIP 对 MS 发病中各种免疫细胞因子的具体作用,因此本实验通过探讨 VIP 对 EAE 大鼠脑组织 IL-17A 含量影响、星型胶质细胞活化影响,为临床应用 VIP 治疗 MS 提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 主要实验动物、药物及试剂

健康雌性 Wistar 大鼠 60 只(200 g~250 g/只,6~8 周龄)、健康豚鼠 10 只(250 g~300 g)/只,均购于西南医科大学实验动物中心,均为一级合格动物【生产许可证号:SCXK(川)2013-17】(喂食清洁饲料和自来水,每日按时更换垫料,保持动物房的清洁、适宜的温度和湿度等,使用许可证号【SYXK(川)2013-181】);血管活性肠肽(北京博奥森生物技术有限公司);完全弗氏佐剂 CFA(美国 Sigma 公司产品);IL-17A ELISA 免疫试剂盒(广州雅怡生物科技有限公司);兔抗 GFAP 多克隆抗体(1:160)(上海雅吉生物科技有限公司);SP 免疫组化试剂盒(武汉博士德生物技术公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 免疫抗原的制备:断颈处死 10 只豚鼠后,在无菌条件下迅速分离出脊髓,去脊髓,称重后移入玻璃匀浆器,与等量的 0℃ 生理盐水混合后研磨成 50% 的全脊髓匀浆(WSCH)。将完全弗氏佐剂(CFA)与 WSCH 等体积混合,玻璃注射器抽打至油包水乳状,以滴在水面不散即为合格抗原。

1.2.2 实验动物分组、制模及药物干预:将 60 只雌性 Wistar 大鼠随机分为四组(15 只/组):正常对照组、EAE 对照组、VIP 低剂量防治组、VIP 高剂量防治组。将免疫抗原注入 EAE 对照组、VIP 低、高剂量防治组大鼠双侧后肢足掌皮下(0.2 mL/100 g)进行主动免疫,正常对照组给予等量生理盐水 + CFA。自造模当日起,VIP 低、高剂量防治组每隔一日分别腹腔注射 VIP 4 nmoL/kg (0.2 mL)、16 nmoL/kg (0.8 mL),正常对照组及 EAE 对照组给予腹腔注射 0.8 mL NS,连续 10 d。

1.2.3 动态观察实验动物:自造模日起,每日早晨 10 时由同一观察者采用 Kono's 评分标准对大鼠进行神经功能让障碍评分(NDS)。在发病高峰期(将连续 3 d 评分无加重、四肢瘫痪或死亡作为大鼠发病高峰期)处死大鼠,未发病大鼠饲养 8 周后处死。

1.2.4 检测脑组织匀浆中 IL-17A 含量变化:采用双抗体夹心(ABC-ELISA)法检测脑组织匀浆中 IL-17A 含量。

1.2.5 检测脑组织中星型胶质细胞的活化情况:利用免疫组织化学(SP)技术,采用抗胶质纤维酸性蛋白抗体(GFAP)检测各组大鼠脑组织内的星型胶质细胞活化情况。

将大鼠脑组织行石蜡切片后常规脱蜡、水化、清除内源性过氧化物酶活性、封闭组织蛋白后,逐次滴加一抗(以 1:160 稀释的兔抗 GFAP 多克隆抗体)、生物素标记的二抗(山羊抗兔 IgG 抗体)、链霉

卵白素(辣根酶标记),DAB 显色液,复染,脱水,透明,封片。400 倍光镜下观察大鼠脑组织 GFAP⁺ 细胞表达情况,胞质呈棕黄色为阳性细胞。采用 ImagePro Plus 软件分析 GFAP⁺ 细胞的平均光密度值(IOD),对 GFAP⁺ 表达行半定量测定。

2 统计学方法

计量资料结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示;多组计量资料均数比较,当方差齐时用单因素方差分析,方差不齐时采 Kruskal-Wallis 检验;两两比较采 LSD 检验;变量间相互关系采用 Pearson 直线相关分析。SPSS 17.0 软件包完成统计分析, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠的发病情况

正常对照组大鼠未发病,EAE 对照组、VIP 各剂量组大鼠均出现不同程度的临床症状:发病大鼠先后表现为食量下降,精神萎靡,后肢无力,尾部拖地,在免疫后第 14~17 天病情症状最为典型;大鼠

出现双侧后肢无力拖地、行走画圈、爬行困难、自伤后肢、精神极度衰弱、抽搐、甚至死亡。但与 EAE 对照组比较,VIP 低、高剂量组大鼠症状明显缓解,表现为发病潜伏期时间延长、进展期时间缩短、发病高峰期 NDS 降低。见表 1。

3.2 各组大鼠脑组织中 IL-17 的含量变化

同正常对照组比较,EAE 对照组、VIP 各剂量组大鼠脑组织匀浆中 IL-17A 含量升高;与 EAE 对照组比较,VIP 各剂量组大鼠脑组织匀浆中 IL-17A 含量明显降低;与 VIP 低剂量组比较,VIP 高剂量组脑组织匀浆中 IL-17A 含量明显降低。说明在 IL-17A 在 EAE 发病过程中起促进作用;同时 VIP 可以降低 EAE 大鼠脑组织匀浆中 IL-17A 含量,且呈一定剂量依赖关系。见表 2。

3.3 各组大鼠脑组织中星型胶质细胞活化情况

正常对照组大鼠脑组织未见 GFAP⁺ 细胞表达;EAE 对照组大鼠脑组织内活化的 GFAP⁺ 细胞呈弥漫性分布;VIP 各剂量组大鼠脑组织 GFAP⁺ 细胞明显减少,主要延血管周围分布。见表 3,图 1。

表 1 EAE 对照组、VIP 各剂量组大鼠发病潜伏期、进展期及高峰期神经功能障碍评分(NDS)的比较($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Comparison of the incubation period, progression period and peak neurological dysfunction scores in the EAE control group and each dose VIP treatment group

组别 Groups	潜伏期(d) incubation period	进展期(d) Progression period	NDS(min) NDS scores
EAE 对照组 Contol	10.34 ± 2.13	7.85 ± 1.65	4.16 ± 0.77
VIP 低剂量组 Low dose VIP	14.17 ± 1.67 [*]	6.20 ± 1.97 [*]	3.75 ± 0.98 ^Δ
VIP 高剂量组 High dose VIP	20.73 ± 1.98 ^{*●}	3.99 ± 1.57 ^{*○}	2.59 ± 0.58 ^{*●}
F	37.48	28.54	18.95
P	<0.01	<0.05	<0.01

注:与 EAE 对照组比较,^{*} $P < 0.01$,^{*} $P < 0.05$,^Δ $P > 0.05$;与 VIP 低剂量组比较,[●] $P < 0.01$,[○] $P < 0.05$ 。

Note. ^{*} $P < 0.01$, ^{*} $P < 0.05$ and ^Δ $P > 0.05$, Compared with the control group. [●] $P < 0.01$, [○] $P < 0.05$, Compared with the low-dose VIP group.

表 2 各组大鼠脑组织匀浆中 IL-17A 含量($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Content of IL-17A in the brain tissue of each group rats

组别 Groups	动物数 n	IL-17A (pg/mL)
正常对照组 Normal control	15	22.84 ± 3.51
EAE 对照组 EAE control	15	78.26 ± 5.87 [*]
VIP 低剂量组 Low-dose VIP	15	57.49 ± 4.85 ^{*●}
VIP 高剂量组 High-dose VIP	15	30.01 ± 5.59 ^{*●▲}
F		101.99
P		<0.01

注:与正常对照组比较,^{*} $P < 0.01$;与 EAE 对照组比较,[●] $P < 0.01$;与 VIP 低剂量组比较,[▲] $P < 0.01$ 。

Note. ^{*} $P < 0.01$, compared with the normal control group. [●] $P < 0.01$, compared with the EAE control group. [▲] $P < 0.01$, compared with the low-dose VIP group.

表 3 EAE 对照组及 VIP 各剂量组大鼠脑组织免疫组化 GFAP⁺ 细胞的平均 IOD 值($\times 10^{-2}$)($\bar{x} \pm s$)

Tab.3 The average IOD of GFAP⁺ cells in the brain tissue of EAE control group and each dose VIP group by immunohistochemistry($\times 10^{-2}$)

组别 Groups	动物数 n	GFAP ⁺ 细胞平均 IOD($\times 10^{-2}$) Mean IOD of GFAP ⁺ cells
EAE 对照组 EAE control	15	15.78 ± 1.92
VIP 低剂量组 Low-dose VIP	15	12.40 ± 1.79 [*]
VIP 高剂量组 High-dose VIP	15	8.32 ± 1.82 ^{*▲}
F		48.09
P		<0.01

注:与 EAE 对照组比较,^{*} $P < 0.01$,^{*} $P < 0.05$;与 VIP 低剂量组比较,[▲] $P < 0.01$ 。

Note. ^{*} $P < 0.01$, ^{*} $P < 0.05$, compared with the EAE control group. [▲] $P < 0.01$, compared with the low-dose VIP group.

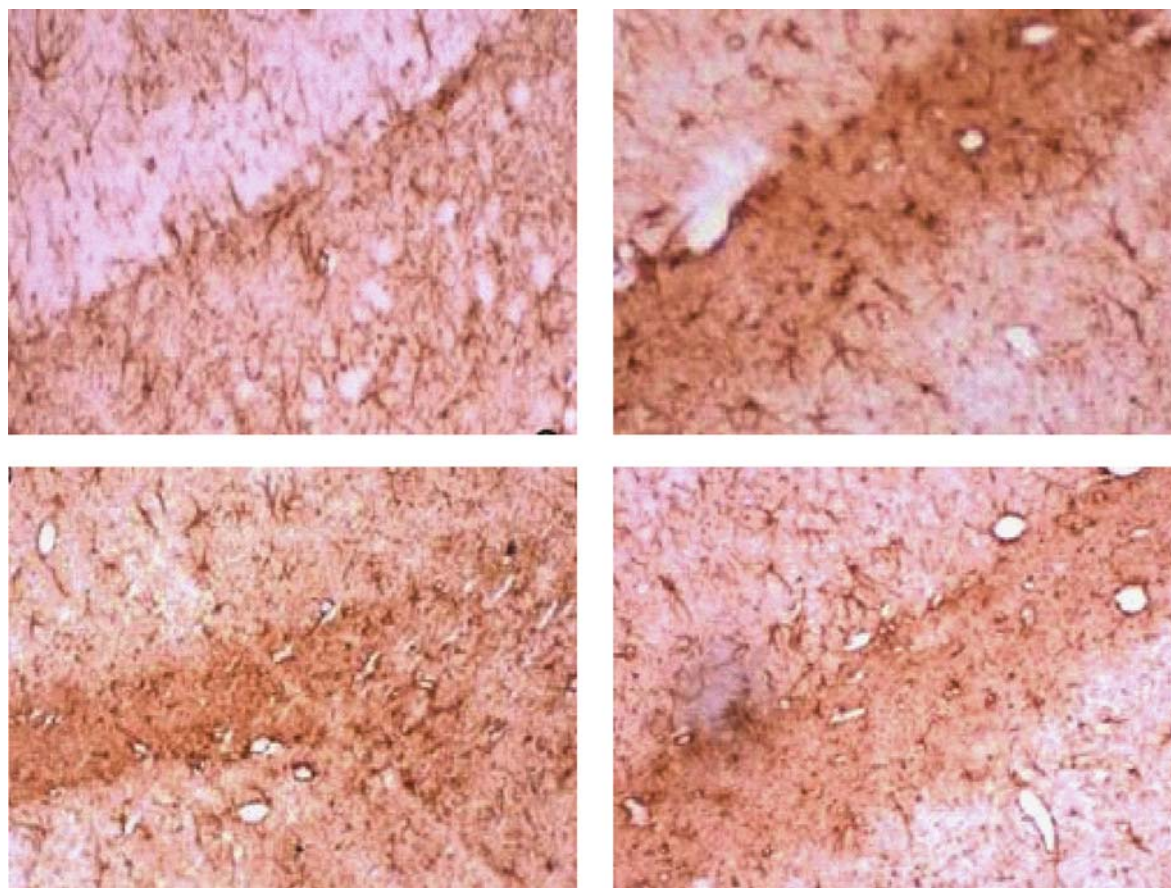


图 1 各组大鼠侧脑室旁脑组织 GFAP⁺ 细胞表达。免疫组化染色, (标尺 = 100 μ m)。

Fig. 1 Expression of GFAP⁺ cells in the rat lateral ventricle of all group rats. Immunohistochemical staining.

3.4 相关性分析显示

利用 Pearson 直线相关软件分析,结果显示发病大鼠脑组织匀浆中 IL-17A 因子含量与与发病高峰期 NDS 呈正相关 ($r = 0.798$, $P < 0.05$),与脑组织匀浆中 GFAP⁺ 细胞平均 IOD 呈正相关 ($r = 0.825$, $P < 0.05$)。

4 讨论

IL-17A 作为一种具强促炎作用的细胞因子,其主要作用包括:①调节固有免疫^[11,12];IL-17A 作为炎症介质,参与自身免疫性炎性疾病的发生和发展,通过作用于基因靶点产生急性反应蛋白、炎症趋化因子等物质,同时上调 MHC-II 抗原、集落共刺激因子、及 T 细胞刺激因子、促使 T 细胞活化,导致免疫失衡;②信号转导作用^[13,14]:IL-17A 作为细胞内及细胞间信使,参与信号的转导过程,可促进多种炎性蛋白的转录及合成,加速免疫紊乱。

星型胶质细胞作为中枢神经系统一种非特异性抗原提呈细胞 (APC),参与复杂的免疫病理过

程^[15]。在 EAE 的炎症反应中,IL-17A 通过 Act1 转录因子激活星型胶质细胞促进释放炎症因子,加速髓鞘脱失的发生发展^[16,17],同时活化的星型胶质细胞通过上调 GFAP⁺ 的表达,形成活化的胶质斑块^[18]。因此抑制 IL-17A 产生、干预星型胶质细胞介导的炎症过程,是治疗 EAE 的一种有效方法。

本实验研究发现:与正常对照组相比,EAE 对照组、VIP 各剂量组大鼠脑组织匀浆中 IL-17A 含量升高 (P 均 < 0.01)、脑组织中 GFAP⁺ 细胞的平均光密度值 (IOD) 增加 ($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$),表明 IL-17A 在 EAE 发生发展过程中起促进作用。与 EAE 对照组比较,VIP 各剂量组大鼠脑组织匀浆中 IL-17A 含量均明显降低 ($P < 0.01$)、脑组织中 GFAP⁺ 细胞的 IOD 明显降低 ($P < 0.01$),且两者呈正相关关系 ($r = 0.825$, $P < 0.05$)。表明 VIP 通过降低发病大鼠脑组织匀浆中 IL-17A 含量,可明显缓解 EAE 大鼠脑组织星型胶质细胞活化的病理改变,从而减轻 EAE 的临床表现。

(下转第 68 页)

- [8] Bronsdon MA, Schoenkecht FD. *Campylobacter pylori* isolated from the stomach of the monkey, *Macaca nemestrina* [J]. J Clin Microbiol, 1988, 26(9): 1725–1728.
- [9] Reed, KD, and Berridge BR. *Campylobacter*-like organisms in the gastric mucosa of Rhesus monkeys [J]. Lab Anim Sci, 1988, 38: 329–331.
- [10] Takahashi S, Igarashi H, Ishiyama N, et al. Serial change of gastric mucosa after challenging with *Helicobacter pylori* in the cynomolgus monkey [J]. Zentralbl Bakteriell, 1993, 280: 51–57.
- [11] Masubuchi N, Takahashi S, Nakano M, et al. Experimental infection of the cynomolgus monkey with *Helicobacter pylori* [J]. Nippon Rinsho, 1993, 51: 3127–3131.
- [12] Reindel JF, Fitzgerald AL, Breider MA, et al. An epizootic of lymphoplasmacytic gastritis attributed to *Helicobacter pylori* infection in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) [J]. Vet Pathol, 1999, 36(1): 1–13.
- [13] Fox JG, Boutin SR, Handt LK, et al. Isolation and characterization of a novel *helicobacter* species, "*Helicobacter macacae*," from rhesus monkeys with and without chronic idiopathic colitis [J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(12): 4061–4063.
- [14] Marini RP, Muthupalani S, Shen Z, et al. Persistent infection of rhesus monkeys with '*Helicobacter macacae*' and its isolation from an animal with intestinal adenocarcinoma [J]. J Med Microbiol, 2010, 59(8): 961–969.
- [15] Fatemeh Soghra Abdi, Shahram Jamshidi, Farhad Moosakhani, et al. Detection of *Helicobacter* spp. DNA in the colonic biopsies of stray dogs: molecular and histopathological investigations [J]. Diagn Pathol, 2014, 9: 50.
- [16] Dubois A, Fiala N, Weichbrod RH, et al. Seroepizootiology of *Helicobacter pylori* gastric infection in nonhuman primates housed in social environments [J]. J Clin Microbiol, 1995, 33(6): 1492–1495.

[修回日期] 2016–05–09

(上接第 35 页)

参考文献:

- [1] Abad C, Waschek JA. Immunomodulatory roles of VIP and PACAP in models of multiple sclerosis [J]. Curr Pharm Des, 2011, 17(10): 1025–1035.
- [2] Delgado M, Pozo D, Ganea D. The significance of vasoactive intestinal peptide in immunomodulation [J]. Pharmacol Rev, 2004, 56(2): 249–290.
- [3] Domingues HS, Mues M, Lassmann H, et al. Functional and pathogenic differences of Th1 and Th17 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. PLoS One, 2010, 5(11): e15531.
- [4] Kang ZZ, Altuntas CZ, Gulen MF, et al. Astrocyte-restricted ablation of interleukin-17-induced Act1-mediated signaling ameliorates autoimmune encephalomyelitis [J]. Immunity, 2010, 32(3): 414–425.
- [5] Geremia A, Jewell DP. The IL-23 /IL-17 pathway in inflammatory bowel diseases [J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2012, 6(2): 223–237.
- [6] Vaudry D, Falluel-Morel A, Bourgault S, et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery [J]. Pharmacol Rev, 2009, 61(3): 283–357.
- [7] Delgado M, Robledo D, Rueda B, et al. Genetic association of vasoactive intestinal peptide receptor with rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Rheum, 2008, 58(4): 1010–1019.
- [8] Waschek JA. VIP and PACAP: neuropeptide modulators of CNS inflammation, injury, and repair [J]. Br J Pharmacol, 2013, 169(3): 512–523.
- [9] Jimeno R, Gomariz RP, Garín M, et al. The pathogenic Th profile of human activated memory Th cells in early rheumatoid arthritis can be modulated by VIP [J]. J Mol Med (Berl), 2015, 93(4): 457–467.
- [10] Jimeno R, Leceta J, Garín M, et al. Th17 polarization of memory Th cells in early arthritis: the vasoactive intestinal peptide effect [J]. Leukoc Biol, 2015, 98(2): 257–269.
- [11] Patel DD, Kuchroo VK. Th17 cell pathway in human immunity: lessons from genetics and therapeutic interventions [J]. Immunity, 2015, 43(6): 1040–1051.
- [12] Sharma J, Balakrishnan L, Datta KK, et al. A knowledge base resource for interleukin-17 family mediated signaling [J]. J Cell Commun Signal, 2015, 9(3): 291–296.
- [13] Krstic J, Obradovic H, Kukulj T, et al. An overview of interleukin-17A and interleukin-17 receptor A structure, interaction and signaling [J]. Protein Pept Lett, 2015, 22(7): 570–578.
- [14] Waisman AI, Hauptmann J, Regen T. The role of IL-17 in CNS diseases [J]. Acta Neuropathol, 2015, 129(5): 625–637.
- [15] Yang JF, Tao HQ, Liu YM, et al. Characterization of the interaction between astrocytes and encephalitogenic lymphocytes during the development of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in mice [J]. Clin Exp Immunol, 2012, 170(3): 254–265.
- [16] Kang ZZ, Altuntas CZ, Gulen MF, et al. Astrocyte-restricted ablation of interleukin-17-induced Act1-mediated signaling ameliorates autoimmune encephalomyelitis [J]. Immunity, 2010, 32(3): 414–425.
- [17] Kang ZZ, Wang CH, Zepp J, et al. Act1 mediates IL-17-induced EAE pathogenesis selectively in NG2 + glial cells [J]. Nat Neurosci, 2013, 16(10): 1401–1408.
- [18] Yan YP, Ding XL, Li K, et al. CNS-specific therapy for ongoing EAE by silencing IL-17 pathway in astrocytes [J]. Mol Ther, 2012, 20(7): 1338–1348.

[修回日期] 2016–05–06