

口服卡介菌治疗实验性自身免疫性脑脊髓炎的研究*

李争鸣 周秀萍 林 梅 李秀萍

(怀化医学高等专科学校 湖南 怀化 418000)

摘要 目的:观察口服卡介菌对实验性变态反应性脑脊髓炎(EAE)的治疗效果。方法:制备 EAE 大鼠模型,随机分为 BCG 高、中、低剂量组和 PBS 对照组,每组各 15 只,对大鼠治疗后的临床症状及病理组织学进行评估,提取脾脏淋巴细胞,流式细胞术检测 T 淋巴细胞亚群,3H-TdR 掺入法检测淋巴细胞增殖能力。结果:BCG 组 EAE 大鼠与对照组相比,临床症状减轻,发病时间延迟,炎性细胞浸润数减少,急性期,口服 BCG 各组 CD4⁺、CD8⁺T 细胞的数量随剂量增加而增加,缓解期 CD4⁺、CD8⁺T 细胞数量减少;口服 BCG 可促进 EAE 大鼠 T 淋巴细胞增殖能力,高、中剂量组上述变化均较其它分组明显。结论:口服 BCG 可很好的诱导免疫耐受,延迟 EAE 发病,减轻炎症反应,改善临床症状。

关键词: 多发性硬化;实验性变态反应性脑脊髓炎;卡介菌;免疫耐受

中图分类号:R392,R744.51 文献分类号:A 文章编号:1673-6273(2011)17-3258-04

Studies on the therapeutic effect of oral BCG on experimental autoimmune encephalomyelitis*

LI Zheng-ming, ZHOU Xiu-ping, LIN Mei, LI Xiu-ping

(Huaihua Medicine College, Huaihua 418000)

ABSTRACT Objective: To investigate the therapeutic effect of oral BCG on experimental autoimmune encephalomyelitis. **Methods:** The EAE rats were randomly divided into four groups: high dose BCG group, medium dose BCG group, low dose BCG group and PBS control group. Clinical score and HE staining were respectively used for clinical symptom assessment and pathological examination. Lymphocytes were extracted from spleen, then T-type lymphocyte subsets were tested by flow cytometry and lymphocyte proliferation was tested by assay of 3H-TdR incorporation. **Results:** Compared with control group, clinical symptom was relieved, the disease onset time was delayed, and the number of inflammatory cell infiltration was reduced in oral BCG group. The number of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes of oral BCG group was increased in a dose-dependent manner during acute phase, but decreased during remission phase. Oral BCG inhibited the proliferation of T lymphocytes. These changes in high and medium dose group were more obvious than those in low dose and control groups. **Conclusion:** Oral BCG could induce immune tolerance, delay the onset time, relieve inflammatory response and improve the clinical symptoms of EAE.

Key words: Multiple Sclerosis; EAE; BCG; Immune Tolerance

Chinese Library Classification: R392, R744.51 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)17-3258-04

前言

多发性硬化症(Multiple sclerosis, MS)为中枢神经系统自身免疫性脱髓鞘疾病,患者表现为运动功能障碍、视觉损害以及感觉异常等,病情反复发作,具有较高的致残率,严重影响患者生活质量,但目前尚无理想的 MS 治疗措施,可达到阻止病情发展,减轻神经系统损伤的目的^[1]。研究认为,多发性硬化症为一种细胞免疫、体液免疫共同参与的自身免疫性疾病,而卡介菌(BCG)对免疫系统,特别是 T 细胞,具有广泛的正向调节作用,特别是口服 BCG 可通过口服耐受中的旁站抑制原理,诱导特异性 T 细胞产生免疫耐受^[2-4]。因此我们观察了卡介菌口服对于 MS 的经典动物模型实验性自身免疫性脑脊髓炎(Experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)治疗效果,以期为临床 MS 治疗提供新的思路与实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康雌性 Lewis 大鼠,7~8 周龄,体重 200~250g,由湖南农大实验动物中心提供,清洁级环境中饲养,饮食自由。

1.2 主要试剂和仪器

卡介菌(BCG,北京生物制品研究所);大鼠 MBP87-99(美国 AIEXIS 生物化学公司);完全弗氏佐剂、Ficoll 淋巴细胞分离液(Sigma 公司);FITC-CD4⁺ 单抗和 PE-CD8⁺ 单抗(美国 Biosciences Pharmingen 公司);3H-TdR(上海原子能研究所);刀豆球蛋白 A 四型 ConA Type IV (Calbiochem 公司);流式细胞仪(Beckman Coulter 公司)

1.3 方法

1.3.1 EAE 大鼠模型的建立 以 125μL 预冷生理盐水溶解

* 基金项目 湖南省教育厅课题资助项目(06C069)

作者简介 李争鸣,男,教授, E-mail: lzm66@sina.com

(收稿日期:2011-05-02 接受日期:2011-05-28)

MBP87-99 150μg，按 1:1 比例加入含 10mg/ml 卡介菌的完全弗氏佐剂(CFA)配成乳化液，经大鼠双后足底多点注射，免疫当天及免疫后坚持每天观察发病情况。

1.3.2 动物分组及干预 EAE 模型大鼠随机分为 4 组，每组 15 只，其中 A:BCG 高剂量组 (30mg/kg) B:BCG 中剂量组 (10mg/kg) C:BCG 低剂量组(0.5mg/kg) D:PBS 对照组(相应等体积 PBS)，各实验组大鼠于免疫后 0~14d 连续经口灌药，体积均为 0.5ml。免疫完成后，每天对 EAE 大鼠临床症状进行评分，标准为 0 分:无明显症状;1 分:尾张力部分或完全消失，引发垂尾;2 分:后肢力部分麻痹，引发行路不稳和(或)姿态维持缺乏;3 分:后肢完全麻痹和(或)前肢力弱;4 分:四肢完全麻痹，或伴尿便失禁;5 分:涉死状态或死亡，同时观察记录大鼠的体重变化。分别于免疫后第 15d(急性期)、第 27d(缓解期)处死大鼠进行检测。

1.3.3 脊髓组织病理染色 参考文献进行^[5]，大鼠腹腔注射 10%水合氯醛麻醉后，开胸经左心室灌注 100ml 温生理盐水冲洗，100ml 4%多聚甲醛固定，分离脊髓，脱水包埋做冰冻切片(5μm)。HE 染色后于高倍镜下(400 倍)计数视野内炎性细胞，进行组织学评分 0:无炎症细胞浸润;1:仅血管与脊髓周围存在炎症细胞浸润;2:脊髓内轻微炎症细胞浸润(每视野细胞计数 1~10);3:脊髓内中度炎症细胞浸润(每视野细胞计数 11~100);4:脊髓内重度炎症细胞浸润(每视野细胞计数 >100)。

1.3.4 脾脏淋巴细胞提取制备及检测 无菌条件下，摘取大鼠脾脏，剥除表面结缔组织被膜，200 目滤网中研磨，PBS 冲洗收集细胞沉淀，加入 Tris-NH₄Cl 裂解红细胞后，1500r/min 离心 5min，取细胞沉淀以 PBS 洗涤，DMEM 重悬并调整细胞浓度为 1×10⁷/ml。取细胞悬液 0.5ml，分别加入 10μl FITC-CD4⁺ 单抗和 PE-CD8⁺ 单抗，4℃避光孵育 1h 后，预冷 PBS 洗涤细胞，经 1%多聚甲醛固定后进行单核淋巴细胞流式细胞仪检测。

1.3.5 淋巴细胞增殖实验 96 孔板中加入分离的淋巴细胞 (1×10⁶ 个/孔)，设 3 个复孔，孔中加入 PHA (终浓度 5mg/L)或 ConA (终浓度 5 mg/L)，于 37℃、50% CO₂ 孵育 72 h，加入 3H-TdR (终浓度 1 μCi/ml)，继续培养 16h，收集细胞 β 射线计数器测定放射脉冲数(cpm)值。

1.4 统计学处理

所有结果以均数±标准差或百分比表示，采用 SPSS13.0 统计软件进行样本间 t 检验或方差分析，以 P<0.05 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 组间大鼠临床观察比较

EAE 模型大鼠表现为精神萎靡，皮毛无光泽，运动减少，食欲下降和体重减轻，神经系统损伤主要症状为尾巴下垂，双后肢力弱或麻痹，部分大鼠出现四肢瘫痪，大小便失禁，严重者出现濒死状态或死亡，病情多于发病后 3~8d 内自行或经治疗后缓解好转。其中 A 组 EAE 大鼠首次发病时间为 14~19d(平均 16.72±0.91d) B 组首次发病时间 15~18d (平均 16.34±0.77d) C 组首次发病时间 10~15d (平均 12.03±1.01d) A、B 两组平均发病时间显著长于 C 组(P<0.05)，而 A、B 两组间比较差异无显著性 (P>0.05) A、B、C 组与 D 组 (9~13d，平均

10.14±0.35d)相比发病时间均明显延迟(P<0.01) A 组高峰期临床症状评分为 1.26±0.21 B 组为 1.53±0.29 C 组为 1.84±0.31 均显著低于 D 组 3.28±0.26 大鼠临床评分(P<0.01)，其中又以 A 组大鼠临床症状最轻(图 1)。发病前 1~2d EAE 模型大鼠体重明显下降，以后随着病情的缓解，大鼠体重可逐渐恢复至正常水平，且体重减少程度与临床症状程度一致 A 组最大体重变化为 16.35±4.78g B 组为 19.12±5.16g C 组为 32.87±11.05g D 组为 39.15±13.33g，以 D 组大鼠体重变化最明显，各组间比较差异均有显著性(P<0.05)(图 2)。

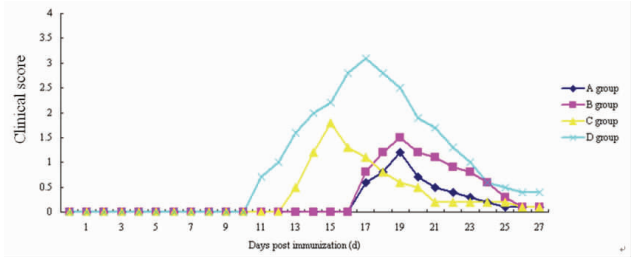


图 1 组间 EAE 大鼠临床评分比较

Fig.1 Comparison of clinical score between groups

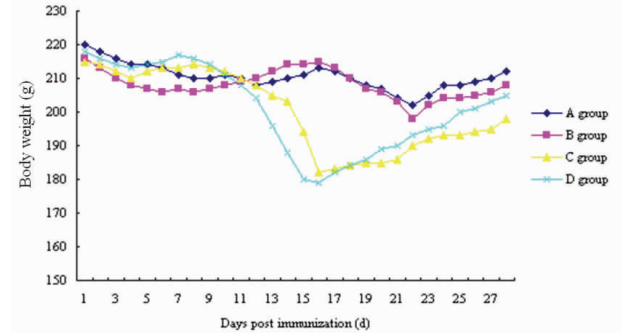


图 2 组间 EAE 大鼠体重变化比较

Fig.2 Comparison of change of body weight between groups

2.2 组间大鼠组织病理学检查比较

显微镜下可见 EAE 模型大鼠脊髓组织内呈明显炎症反应，表现为血管扩张、充血、水肿，炎性细胞浸润明显(以淋巴细胞为主)，存在典型的“袖套”状改变。A 组炎症评分 2.08±0.17 B 组炎症评分 2.16±0.22 C 组炎症评分 2.52±0.44 D 组炎症评分 3.72±0.35，其中 A、B、C 组大鼠炎症程度均明显低于 D 组(P<0.01)，而 A 组与 B 组间比较差异无显著性(P>0.05)(图 3)，提示 BCG 能够减轻炎症细胞在 EAE 病灶局部的浸润。

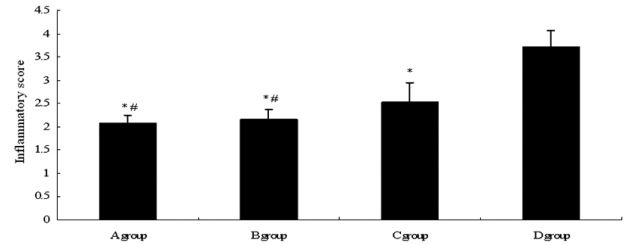


图 3 各级间炎症评分比较

*P<0.01 与 D 组比较 #P<0.01 与 C 组比较

Fig.3 Comparison of inflammatory score between groups

*P<0.01 compared with D group; #P<0.01 compared with C group

2.3 组间 T 淋巴细胞百分比变化

免疫当天,各组间大鼠脾脏 CD4⁺ 和 CD8⁺T 淋巴细胞数目差异无显著性 (P>0.05),急性期时(治疗后第 15d),CD4⁺ 和 CD8⁺T 淋巴细胞相较于治疗前明显升高,而在缓解期(治疗后第 27d),两者水平逐渐恢复;第 15d,A 组 CD4⁺ T 细胞最高 (P<0.01),依次为 A 组>B 组>C 组>D 组,但 C 组与 D 组间比

较差异无统计学意义(P>0.05),第 27d,A 组 CD4⁺ T 明显低于其它组(P<0.05),而 B 组、C 组间无显著差异(P>0.05),第 15d,A 组、B 组间 CD8⁺T 淋巴细胞无明显差异,但仍高于 C 组和 D 组 (P<0.05),第 27d,各组 CD8⁺T 淋巴细胞数目减少,其中以 A 组变化程度最大(P<0.05)(表 1)。

表 1 各组 EAE 大鼠 CD4⁺ 和 CD8⁺T 淋巴细胞的变化(%)
Table 1 Changes of levels of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes between groups

Groups	CD4 ⁺ T(%)			CD8 ⁺ T(%)		
	Before treatment	15d post-treatment	27d post-treatment	Before treatment	15d post-treatment	27d post-treatment
A group	38.27± 3.21	56.63± 2.52 [▲]	36.84± 2.94 [▲]	13.68± 0.55	21.93± 1.46 [●]	16.31± 0.53 [▲]
B group	38.10± 3.42	49.58± 2.19 ^{▲#}	40.27± 2.35 ^{●#}	14.08± 0.77	19.25± 1.18 [●]	15.85± 0.66 ^{●#}
C group	37.76± 3.60	43.01± 3.23	41.65± 2.17	13.92± 0.86	16.72± 1.53	15.91± 0.82
D group	37.92± 3.18	41.66± 3.87	43.38± 3.22	14.15± 1.03	17.31± 0.92	14.26± 0.74

Note : ▲P<0.01 ●P<0.05 compared with D group #P<0.05 compared with B group

2.4 组间 T 淋巴细胞增殖能力比较

BCG 高剂量组、中剂量组、低剂量组与 PBS 对照组 cpm 值分别为 18368± 975、18074± 692、14573± 501 和 11893± 287,各 BCG 组 cpm 值明显高于 PBS 对照组,并以高剂量组淋巴细胞水平最高(P<0.01),提示口服中 BCG 对于 EAE 大鼠 T 淋巴细胞增殖能力有显著的促进作用(图 4)。

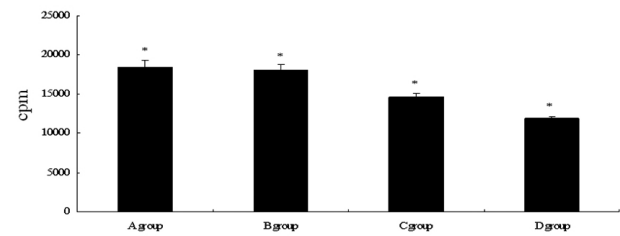


图 4 各级间 T 淋巴细胞转化功能比较
*P<0.01 各区间比较

Fig.4 Comparison of inflammatory score between groups
*P<0.01 Compared within groups

3 讨论

MS 主要发病机制为继发于炎症反应后出现异常免疫应答,导致中枢神经系统功能损伤,因此抑制机体异常免疫反应,使得免疫系统处于特异性无应答状态,可有效阻止病情发展,改善临床相关症状。口服耐受是指经过口服某种蛋白质抗原,诱导粘膜组织产生针对该抗原的免疫耐受,而对其它抗原仍保持着正常的免疫应答能力^[6,7]。口服耐受的临床疗效观察在多种自身免疫的动物模型应用中均取得了令人满意的结果,但 III 期临床研究中治疗效果却未能达到预期效果,分析其可能原因为自身免疫性疾病相关抗原、发病机制与免疫反应的复杂性^[8]。而近年来口服耐受中旁站抑制理论的提出,则表明可以通过筛选某种非特异性的抗原物质,诱导机体特异性免疫耐受的形成,阻止靶器官的免疫病理反应和炎症发生,适应不同患者和

(或)疾病的需要^[9]。

研究发现,卡介菌可通过抑制抗体生成,调节细胞因子与受体的表达,有效减少过敏性哮喘的发病率,延迟发病时间,缓解哮喘的严重程度,提示通过口服 BCG 进行机体免疫系统的调节来治疗某些自身免疫疾病具有一定的可行性^[10,11]。本研究中,观察比较了口服不同剂量 BCG 对 EAE 模型大鼠的治疗效果,结果表明,BCG 治疗可呈剂量依赖性的延迟大鼠首次发病时间,减轻临床表现,使得达到高峰时的临床评分与体重改变程度均低于阴性对照组,特别是在高剂量组最为明显。此外 EAE 大鼠病理表现类似于 MS 患者,表现为炎症细胞的浸润所引起的病灶局部脱髓鞘等中枢神经系统破坏,而本研究中病理学检查结果显示 BCG 可降低脊髓组织学评分,有效抑制炎症反应,减轻炎症细胞在脊髓中的浸润,起到神经元保护作用^[12,13]。

已知 BCG 为非特异性免疫增强剂,可激活 T 淋巴细胞,增强细胞免疫功能,同时稳定肥大细胞膜,减少活性物质释放,从而调节机体失调的免疫反应恢复正常^[14-16]。我们检测了各组 EAE 大鼠脾脏单核 T 淋巴细胞亚群,流式检测发现各 BCG 组 CD4⁺ 和 CD8⁺T 淋巴细胞百分率较 PBS 对照组增加,而 3H-TdR 掺入法结果表明 BCG 三种浓度均可增强淋巴细胞的增殖能力,促进淋巴细胞转化,表明 BCG 治疗 EAE 的可能机制为激活细胞免疫能力,调节机体体液免疫功能,与文献报道相一致。

可见,口服 BCG 可以诱导机体产生免疫耐受,减轻炎症反应,改善 EAE 临床症状,且病情严重程度与口服 BCG 抗原的用量关系密切,但其可能的作用机制仍有待于进一步研究。

参 考 文 献(References)

[1] Cavanaugh JT, Gappmaier VO, Dibble LE, et al. Ambulatory activity in individuals with multiple sclerosis [J]. J Neurol Phys Ther, 2011, 35(1):26-33
[2] 毕胜, 韩丽丽, 潘尚哈, 等. 白细胞介素 -1α 及 IL-1RA 与多发性硬化关系的研究[J]. 现代生物医学进展, 2009, 9(21):4030-4032
Bi Sheng, Han Li-li, Pan Shang-hua, et al. The relationship between

- interleukin-1 α and interleukin-1 receptor antagonist (IL-1RA) gene polymorphism and the multiple sclerosis patients in the Northeast of China [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2009,9(21):4030-4032
- [3] Kato C, Mikami M. Effect of aging on BCG immunostimulation of Porphyromonas gingivalis infection in mice [J]. Biomed Res, 2011;32(1):45-54
- [4] Buddle BM, Denis M, Aldwell FE, et al. Vaccination of cattle with Mycobacterium bovis BCG by a combination of systemic and oral routes [J]. Tuberculosis (Edinb), 2008, 88(6):595-600
- [5] 薛松, 钟美佐, 刘巍, 等. 黄芪扶正汤抗小鼠 Lewis 肺癌机制的实验研究[J]. 肿瘤药学, 2011, 1(1):37-39
Xue Song, Zhong Mei-zuo, Liu Wei, et al. The experimental study for HFD's mechanism to inhibit Lewis lung cancer in mice [J]. Anti-tumor Pharmacy, 2011, 1(1): 36-39
- [6] Monsonogo A, Beserman ZP, Kipnis J, et al. Beneficial effect of orally administered myelin basic protein in EAE-susceptible lewis rats in a model of acute CNS degeneration. J Autoimmun, 2003, 21:131-138
- [7] Dobakhti F, Ajdary S, Taghikhani M, et al. Immune response following oral immunization with BCG encapsulated in alginate microspheres [J]. Iran J Immunol, 2006, 3(3):114-120
- [8] Hyun JG, Barrett TA. Oral tolerance therapy in inflammatory bowel disease [J]. Am J Gastroenterol, 2006, 101:569-571
- [9] Clark SO, Kelly DL, Badell E, et al. Oral delivery of BCG Moreau Rio de Janeiro gives equivalent protection against tuberculosis but with reduced pathology compared to parenteral BCG Danish vaccination [J]. Vaccine, 2010, 28(43):7109-7116
- [10] 陈兴平, 李永喜, 邓云华, 等. 卡介菌多糖核酸对免疫抑制小鼠 T 淋巴细胞亚群的影响[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2002, 31(3): 336-340
- Chen Xing-ping, Li Yong-xi, Deng Yun-hua, et al. Effect of BCG-PSN on T lymphocyte subsets of immunodepressive mice [J]. J Huazhong Univ Sci Tech (Health Sci), 2002, 31(3):336-340
- [11] Cross ML, Lambeth MR, Aldwell FE. Murine immune responses to oral BCG immunization in the presence or absence of prior BCG sensitization [J]. Immunol Cell Biol, 2010, 88(2):224-227
- [12] Vipond J, Cross ML, Lambeth MR, et al. Immunogenicity of orally-delivered lipid-formulated BCG vaccines and protection against Mycobacterium tuberculosis infection [J]. Microbes Infect, 2008, 10(14-15): 1577-1581
- [13] Kuruvilla TA, Bridgitte A. Timing of zero dose of OPV, first dose of hepatitis B and BCG vaccines [J]. Indian Pediatr, 2009, 46(11): 1013-1015
- [14] 宫巧俐, 张颖, 丁朴宏. 呼吸训练配合卡介苗多糖核酸雾化吸入对慢阻肺患者康复的研究 [J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(18): 3516-3519
Gong Qiao-li, Zhang Ying, Di Pu-hong. Effect of respiratory training with BCG polysaccharides nucleic acid inhalation on rehabilitation of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2010, 10(18):3516-3519
- [15] Xiong C, Li Q, Lin M, et al. The efficacy of topical intralesional BCG-PSN injection in the treatment of erosive oral lichen planus: a randomized controlled trial [J]. J Oral Pathol Med, 2009, 38(7):551-8
- [16] Chatila TA. Role of regulatory T cells in human diseases [J]. J Allergy Clin Immunol, 2005, 116(5):949-59