

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.08.011

塞来昔布对实验性自身免疫性脑脊髓炎模型小鼠 Th1 / Th17 细胞分化的抑制作用*

朱 燕¹, 谢晓辉¹, 焦 敏¹, 吴建华^{1,2△}

(1. 新疆维吾尔自治区人民医院, 新疆 乌鲁木齐 830001; 2. 新疆维吾尔自治区临床药学研究所, 新疆 乌鲁木齐 830001)

摘要:目的 探讨塞来昔布对实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)模型小鼠脊髓中 Th1 / Th17 细胞分化的抑制作用。方法 将 36 只 C57BL / 6 小鼠随机分为对照组(等体积生理盐水)、模型组(等体积生理盐水)、塞来昔布组(5 mg / kg), 各 12 只。皮下注射髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白 35 - 55(MOG₃₅₋₅₅)混合乳剂以复制 EAE 小鼠模型。建模成功后, 各组小鼠灌胃给予相应药物或生理盐水, 每天 1 次, 连续 35 d。对小鼠进行神经功能缺损评分; 光学显微镜下观察小鼠脊髓髓鞘脱失程度; 采用流式细胞仪测定小鼠脊髓中 CD₄⁺ T 细胞与 CD₈⁺ T 细胞占比, 分析 CD₄⁺ T 细胞的分化程度; 采用酶联免疫吸附法测定小鼠脊髓中白细胞介素 1β(IL - 1β)、白细胞介素 6(IL - 6)、肿瘤坏死因子 - α(TNF - α)表达水平; 采用 Western blot 法测定小鼠脊髓中环氧化酶 2(COX - 2)、核因子 κB(NF - κB)、含 NLR 家族 Pyrin 域蛋白 3(NLRP3)蛋白表达水平。结果 与模型组比较, 塞来昔布组小鼠同时时间点神经功能缺损评分显著降低, 小鼠脊髓中 CD₄⁺ T 细胞占比, CD₄⁺ T 细胞中 Th1 与 Th17 细胞占比, TNF - α, IL - 6, IL - 1β 水平, 以及 COX - 2, p - NF - κB, NLRP3 蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$)。模型组小鼠脊髓髓鞘脱失严重, 塞来昔布组虽可见部分髓鞘破坏, 但整体染色更深, 且髓鞘空泡区域较少。结论 塞来昔布可在一定程度上改善模型小鼠 EAE 症状, 其机制可能与抑制 COX - 2 活性, 减少 CD₄⁺ T 细胞向 Th1 与 Th17 亚型分化, 降低 TNF - α, IL - 6, IL - 1β 等炎性细胞因子水平有关。

关键词: 塞来昔布; 实验性自身免疫性脑脊髓炎; 小鼠; CD₄⁺ T 细胞; 炎性细胞因子

中图分类号: R967; R979.9

文献标志码: A

文章编号: 1006 - 4931(2022)08 - 0047 - 06

Inhibition Effect of Celecoxib on Th1 / Th17 Cells Differentiation of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Model Mice

ZHU Yan¹, XIE Xiaohui¹, JIAO Min¹, WU Jianhua^{1,2}

(1. People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi, Xinjiang, China 830001; 2. Xinjiang Uygur Autonomous Region Institute of Clinical Pharmacy, Urumqi, Xinjiang, China 830001)

Abstract: Objective To investigate the inhibition effect of celecoxib on Th1 / Th17 Cells differentiation in spinal cord of experimental autoimmune encephalomyelitis(EAE)model mice. **Methods** A total of 36 C57BL / 6 mice were randomly divided into the control group(equal volume of normal saline), the model group(equal volume of normal saline), the celecoxib group(5 mg / kg), with 12 mice in each group. Myelin oligodendrocyte glycoprotein 35 - 55 (MOG₃₅₋₅₅) mixed emulsion was subcutaneously injected to replicate the mouse model of EAE. After successful modeling, mice in each group were gavaged with corresponding drugs or normal saline once a day for 35 d. Neurological deficit of mice was scored, demyelination degree in spinal cord of mice was observed by optical microscope. Proportion of CD₄⁺ T cells and CD₈⁺ T cells in spinal cord of mice were measured and the differentiation degree of CD₄⁺ T cells was analyzed by flow cytometry. The expression levels of interleukin - 1β(IL - 1β), interleukin - 6(IL - 6), tumor necrosis factor - α(TNF - α) in spinal cord of mice were detected by enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA). The expression levels of cyclooxygenase - 2(COX - 2), nuclear factor - κB(NF - κB), NLR family pyrin domain containing 3(NLRP3)protein in spinal cord of mice were detected by Western blot. **Results** Compared with those in the model group, the neurological deficit score of mice in the same time point was decreased significantly in the celecoxib group. Proportion of CD₄⁺ T cells, proportion of Th1 and Th17 cells in CD₄⁺ T cells, the expression levels of TNF - α, IL - 6 and IL - 1β, the expression levels of COX - 2, p - NF - κB, NLRP3 protein decreased significantly in spinal cord of mice ($P < 0.05$). Demyelination of spinal cord of mice in the model group was severe, while partial myelin destruction was observed in the celecoxib group, the overall staining was deeper, and there were fewer vacuoles area in myelin sheath. **Conclusion** Celecoxib can improve the symptom of EAE in model mice to some extent, the mechanism of which could be related to the inhibition of COX - 2 activity, reduction of the differentiation from CD₄⁺ T cells to Th1 and Th17 subtypes and the levels of inflammatory cytokines such as TNF - α, IL - 6, IL - 1β.

Key words: celecoxib; experimental autoimmune encephalomyelitis; mouse; CD₄⁺ T cells; inflammatory cytokines

* 基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金[2020D01C104]。

第一作者: 朱燕, 女, 大学本科, 主管药师, 研究方向为药理学, (电子信箱)dongyandf@163.com。

△通信作者: 吴建华, 女, 硕士研究生, 主任药师, 研究方向为临床药理学和药事管理, (电子信箱)1520580268@qq.com。

多发性硬化症(MS)属中枢神经系统免疫炎性疾病,临床表现为强直痉挛、共济失调、认知功能障碍等。全球范围内MS发病率约为十万分之二,女性发病率明显高于男性^[1]。糖皮质激素为MS疾病发作急性期的一线药物,可快速恢复患者的神经功能。 β -干扰素为疾病进展期的一线药物,旨在抑制T淋巴细胞活化,减少穿过血脑屏障的炎性细胞因子数量^[2]。现阶段,主要应用实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)动物模型作为载体进行MS临床前研究^[3]。塞来昔布属经典高度特异性环氧合酶2(COX-2)抑制剂,抗炎选择性较高,已获批用于类风湿关节炎和其他免疫炎性疾病的治疗。有研究显示,塞来昔布具有中枢神经系统保护作用,并能抑制T淋巴细胞的活化,减少花生四烯酸向前列环素/前列腺素和血栓素转化,且减少其他炎性细胞因子的分泌^[4]。然而,关于塞来昔布治疗EAE的基础研究至今鲜有报道。为此,本研究中拟采用外源性髓鞘抗原诱导小鼠复制EAE模型,探讨塞来昔布对EAE的改善效果及对T淋巴细胞活化的影响。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

仪器:BX53型光学显微镜(日本Olympus公司);IC1000型细胞计数仪(上海Countstar公司);CytoFLEX型流式细胞仪(美国Beckman公司);Fc型酶标仪(美国Thermo公司);Mini-protean Tetra型凝胶电泳装置(美国Biorad公司);5200型化学发光成像仪(上海天能生物技术有限公司)。

试剂:塞来昔布(美国MCE公司,批号为M538736,含量>99.0%);鼠源髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白35-55(MOG₃₅₋₅₅)、完全弗氏佐剂(CFA)、百日咳毒素(PTX),均购自美国Sigma公司(批号分别为s101834,s111972,s101721);FITC-anti-mouse CD₄抗体、FITC-anti-mouse CD₈抗体、PE-Anti-mouse IL-17抗体、PE-Anti-mouse IFN- γ 抗体均购自美国Biolegend公司(批号分别为137057,148732,120983,142711);Anti-mouse COX-2抗体、Anti-mouse p-NF- κ B抗体、Anti-mouse NF- κ B抗体、Anti-mouse NLRP3抗体、Anti-mouse β -actin抗体、HRP conjugated IgG(H+L)抗体,均购自北京博奥森生物技术有限公司(批号分别为bs1832,bs1283,bs2192,bs1129,bs1837,bs1655);罗氏(LFB)染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号为s3292);白细胞介素1 β (IL-1 β)、白细胞介素6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒,均购自深圳达科为生物技术股份有限公司(批号分别为1005-1307,1008-1725,1002-1335);台盼蓝染色液(美国Gibco生物公司,批号为13704);RIPA组织裂解液(上海碧云天生物技术有限公司,批号为

b190372);ECL超敏发光液(上海天能生物技术有限公司,批号为1605)。

动物:健康SPF级C57BL/6小鼠36只,雄性,7~8周龄,体质量22~26 g,购自新疆医科大学动物实验中心,动物生产许可证号SCXK(新)2018-0001。饲养于新疆医科大学动物实验中心SPF级动物房中,环境温度(22 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C,相对湿度(55 $\pm$ 5)%,人工昼夜(12h/12h)交替。所有大鼠自由饮食饮水,适应性喂养1周。本研究动物实验研究方案基于“3R”原则开展,获得了新疆医科大学动物实验伦理委员会批准。

1.2 方法

建模、分组及给药:将36只大鼠根据体质量及活跃度随机分为对照组(等体积生理盐水)、模型组(等体积生理盐水)、塞来昔布组(5 mg/kg),各12只。将MOG₃₅₋₅₅多肽用磷酸缓冲盐液(PBS)稀释至6 mg/mL,与CFA等体积混合。使用双通道连接器连接5 mL注射器,反复推拉混合制成MOG₃₅₋₅₅油包水抗原乳剂(现配现用)。取模型组与塞来昔布组小鼠进行抗原免疫,背部多点皮下注射抗原乳剂,每只小鼠4点,共注射0.2 mL抗原乳剂(MOG₃₅₋₅₅多肽含量为每只600 μ g);抗原乳剂免疫结束后0 h和48 h,给予PTX腹腔注射(每只0.1 mL,含百日咳杆菌活菌10⁹个)作为增敏剂以提高模型发病率。建模成功后,各组小鼠灌胃给予相应药物或生理盐水,每天1次,连续35 d。

神经功能缺损评分:给药期间每天观察小鼠并进行神经功能缺损评分。0分,无任何临床症状;0.5分,尾部肌张力减弱,尾部尖端下垂;1分,尾部尖端下垂伴步态蹒跚;1.5分,尾部无力伴步态蹒跚;2分,两后肢不完全瘫痪(即一后肢或两后肢瘫痪);2.5分,单后肢瘫痪伴另一后肢不完全瘫痪;3分,双后肢完全瘫痪;3.5分,双后肢瘫痪,前肢肌张力减弱或瘫痪;4分,双后肢完全瘫痪伴一只前肢不完全瘫痪;5分,濒死状态或死亡。

脊髓髓鞘脱失程度观察:末次给药后,以CO₂安乐死法处死小鼠(3只),立即打开腹腔,穿破心尖灌注生理盐水,剪开心耳,冲洗出血液。待冲洗出液体无色,灌注4%多聚甲醛固定液。用镊子小心剪除脊柱周围组织,逐节暴露脊柱,完整剥离脊柱,于4%多聚甲醛固定液中固定12 h以上。以75%,85%,95%,100%乙醇逐级脱水。再以二甲苯乙醇混合液(1:1,V/V),二甲苯I、二甲苯II浸泡脊髓,透化组织。将组织进行石蜡包埋,切片(5 μ m)。切片以二甲苯I、二甲苯II脱蜡,经乙醇水化,蒸馏水清洗,浸入0.1%LFB溶液中,60 $^{\circ}$ C温箱中浸染8~12 h,蒸馏水冲洗,在0.05%碳酸锂水溶液中分色10 s,70%酒精继续分色,蒸馏水冲洗1 h。自然晾干,以伊红染色液染色30 s,二甲苯透化,中性树脂封片。在光学显微镜观察并拍片。

脊髓单核细胞中 CD_4^+ / CD_8^+ T细胞占比测定:末次给药后, CO_2 安乐死处死小鼠(3只),剪开背部皮肤,用镊子剪除脊柱周围组织,逐节暴露脊柱,完整剥离脊柱,沿脊柱长轴方向将注射器插入脊柱,推动注射器,以PBS冲洗出脊髓。400 g离心5 min,弃上清液,加入1 mL 0.05%胰酶消化,加入5 mL含血清培养基终止消化。400 g离心5 min,弃上清液,细胞沉淀加入5 mL含血清培养基重悬。取20 μ L细胞悬液,以台盼蓝染液对细胞染色,采用细胞计数仪进行计数。取 1×10^6 个脊髓单核细胞,PBS洗3次,加入Anti- CD_4 与Anti- CD_8 流式荧光抗体重悬细胞,4 $^\circ$ C孵育30 min。400 g离心5 min,留沉淀,PBS洗2次。加入200 μ L PBS重悬细胞,采用流式细胞仪测定。

脊髓单核细胞中 CD_4^+ T细胞分化程度分析:取 1×10^6 个脊髓单核细胞,PBS洗3次,留沉淀。加入Anti- CD_4 、Anti-IFN- γ (Th1)/Anti-IL-17(Th17)流式荧光抗体重悬细胞,4 $^\circ$ C孵育30 min,400 g离心5 min,留沉淀,PBS洗2次。加入200 μ L PBS重悬细胞,采用流式细胞仪分析。

脊髓单核细胞中炎症因子水平检测:采用ELISA法。取30 mg脊髓组织,液氮冷冻,加入RIPA组织裂解液匀浆,提取蛋白。12 000 r/min离心20 min,取上清液,测定蛋白浓度。设置空白孔、待测样品孔进行加样,室温孵育2 h。清洗3次后拍干,每孔中加入100 μ L Biotiny抗体工作液,室温孵育1 h。清洗3次后拍干,每孔中加入100 μ L亲和链霉素-HRP工作液,室温避光孵育20 min。清洗3次后拍干,每孔中加入100 μ L 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)溶液,室温避光孵育5~20 min,根据颜色变化加入终止液,以酶标仪在450 nm波长处检测各组样品的吸光度(OD)值,绘制标准曲线,计算即得。

脊髓组织中COX-2、核因子 κ B(NF- κ B)、含NLR家族Pyrin域蛋白3(NLRP3)蛋白表达水平检测:采用Western blot法。同上述方法测定上清液中蛋白浓度。加入上样缓冲液,100 $^\circ$ C金属浴中使蛋白变性。各组取约10 μ g上样,湿转(2 mA/60 min)。以4%脱脂奶粉封闭,磷酸盐吐温缓冲液(PBST)清洗3次,加入一抗溶液,4 $^\circ$ C过夜,PBST清洗3次,室温避光孵育HRP标记的山羊抗兔/鼠IgG(H+L)二抗稀释液2 h,PBST清洗3次,滴加ECL超敏发光液,显影仪下显影,获得不同灰度条带并使用Image J软件分析,以 β -actin作为内参,计算即得。

1.3 统计学处理

采用SPSS 21.0统计学软件分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,多组数据间比较采用单因素方差分析(One-way Anova),各组数据两两比较采用Tukey检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 神经功能

对照组小鼠未出现任何EAE症状。模型组,给药第8天,部分小鼠出现神经功能损伤症状;第14天,所有小鼠均出现不同程度的EAE症状;第21天,小鼠EAE症状达到高峰,第23天时,神经功能缺损评分最高,为 (3.33 ± 0.54) 分;第28天开始,小鼠EAE症状逐渐缓解,神经功能缺损评分开始降低。塞来昔布组,给药第12天,部分小鼠出现EAE症状;第19天,所有小鼠出现不同程度的EAE症状;第26天,神经功能缺损评分最高,为 (1.75 ± 0.68) 分;之后,小鼠EAE症状逐渐缓解;第35天时,神经功能缺损评分为0~1分。详见图1。

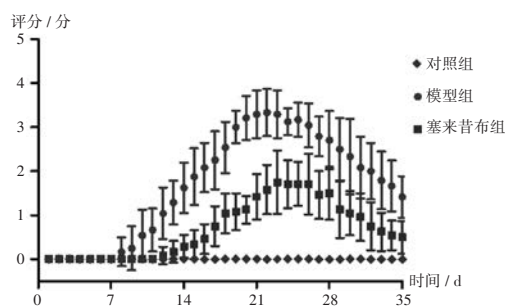


图1 各组小鼠神经功能缺损评分

Fig. 1 Neurological deficit score of mice in each group

2.2 髓鞘脱失程度

对照组小鼠脊髓组织髓鞘完整;模型组小鼠脊髓髓鞘脱失严重,表现为局部区域染色较淡,髓鞘间距增加且有较多的空泡区,甚至出现髓鞘的断裂;塞来昔布组虽可见部分髓鞘破坏,但整体染色较模型组更深,且髓鞘空泡区域较少。详见图2。

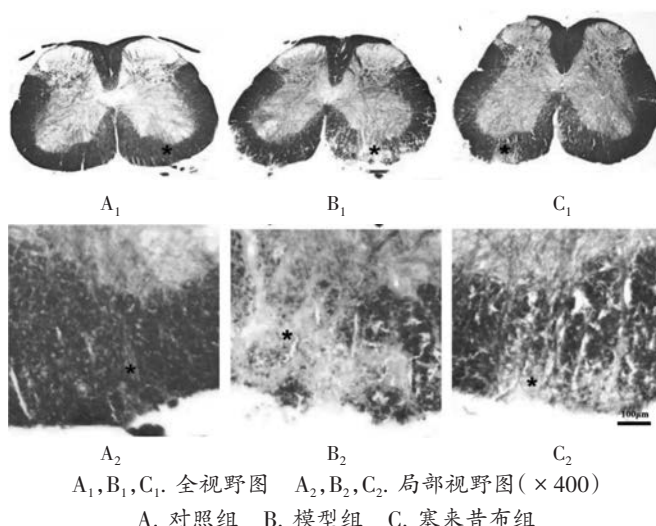


图2 小鼠脊髓组织脱髓鞘罗氏染色图(*表示脊髓髓鞘脱失区域)

A₁, B₁, C₁. Full view A₂, B₂, C₂. Partial view($\times 400$)

A. Control group B. Model group C. Celecoxib group

Fig. 2 LFB staining of demyelination in spinal cord tissues of mice(* represents the demyelination region in spinal cord)

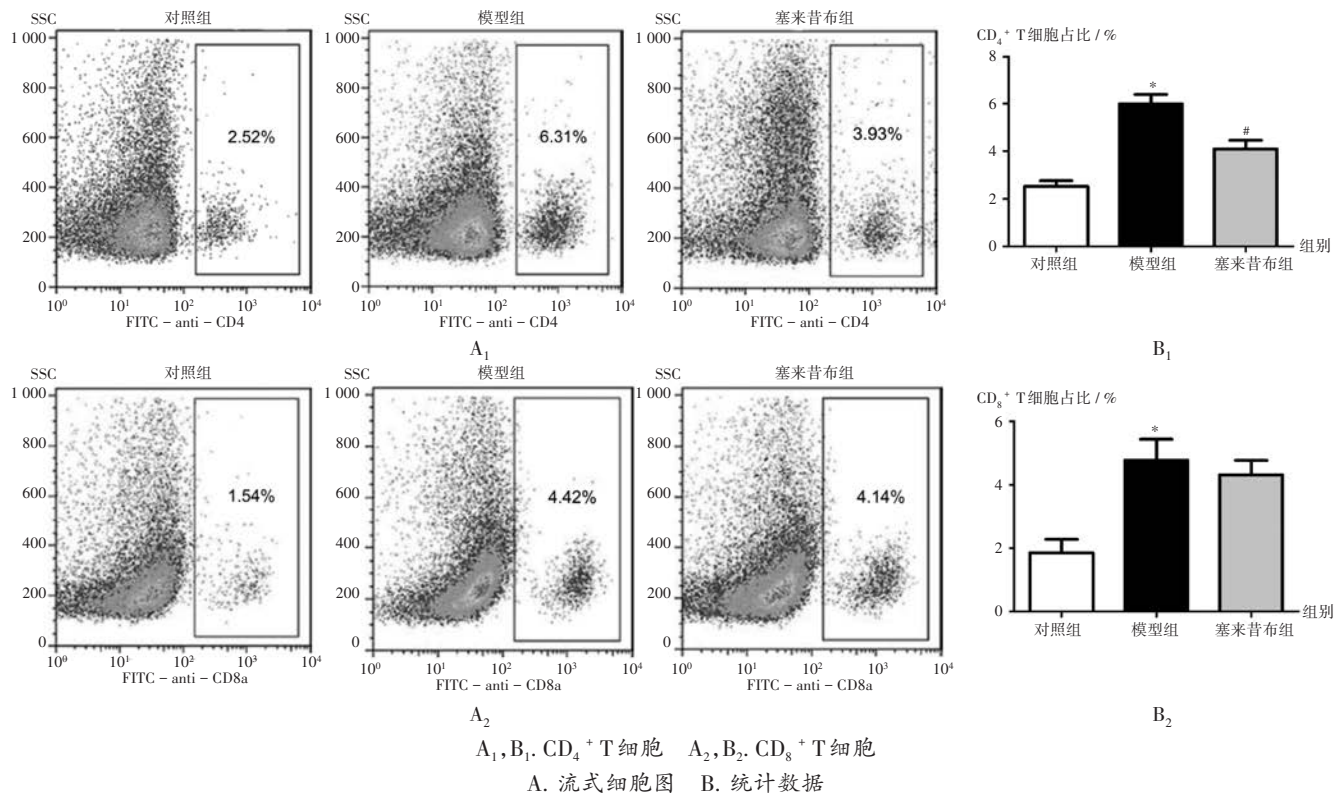


图3 各组小鼠脊髓中CD₄⁺与CD₈⁺T细胞占比

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$ 。图4、表1、图5同。

A₁,B₁. CD₄⁺ T cells A₂,B₂. CD₈⁺ T cells
A. Flow cytometry plot B. Data statistics

Fig. 3 Proportion of CD₄⁺ T cells and CD₈⁺ T cells in spinal cord of mice in each group

Note: Compared with those in the control group, * $P < 0.05$ (for Fig. 3 - 5 and Tab. 1); Compared with those in the model group, # $P < 0.05$ (for Fig. 3 - 5 and Tab. 1).

2.3 CD₄⁺ / CD₈⁺ T 细胞占比

与对照组比较,模型组小鼠脊髓中CD₄⁺ T细胞与CD₈⁺ T细胞显著增加($P < 0.05$);与模型组比较,塞来昔布组小鼠脊髓中CD₄⁺ T细胞占比显著降低($P < 0.05$),CD₈⁺ T细胞占比无显著改变($P > 0.05$)。详见图3。

2.4 CD₄⁺ T 细胞分化程度

与对照组比较,模型组小鼠脊髓的CD₄⁺ T细胞中Th1与Th17占比显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,塞来昔布组小鼠脊髓的CD₄⁺ T细胞中Th1与Th17占比显著降低($P < 0.05$)。详见图4。

2.5 炎症因子水平

与对照组比较,模型组小鼠脊髓中TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,塞来昔布组小鼠脊髓中TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平显著降低($P < 0.05$)。详见表1。

2.6 COX-2, NF- κ B, NLRP3 蛋白表达水平

与对照组比较,模型组小鼠脊髓中COX-2, p-NF- κ B, NLRP3蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,塞来昔布组小鼠脊髓中COX-2, p-NF- κ B, NLRP3蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$)。详见图5。

3 讨论

MS是由内源性髓磷脂抗原靶向激活CD₄⁺ T细胞和CD₈⁺ T细胞,造成严重的神经炎症并破坏神经细胞髓鞘,导致进行性神经功能障碍。由外源性髓磷脂少突胶质糖蛋白诱导的EAE,在临床症状与组织病理学方面,髓鞘组织和血脑屏障的破坏与MS十分相似^[5]。故小鼠EAE模型常用于MS发病机制研究与新疗法的开发。本研究中,小鼠采用MOC₃₅₋₅₅混合乳剂免疫,在免疫时间到达第2周,模型组小鼠神经功能缺损评分逐渐升高,陆续出现肌张力消失,拖尾且伴有瘫痪的现象。这与临床MS患者肢体无力、半身不遂的症状相吻合。一直以来,自身抗原免疫介导的髓鞘破坏被认为是MS的主要病理表现。多项有关MS的影像学研究均表明,进行性髓鞘脱失是导致MS患者发生不可逆性神经功能损伤的主要原因^[6-7]。本研究中,LFB染色显示模型组小鼠脊髓中髓鞘脱失明显。综合以上小鼠神经功能缺损评分与病理切片结果,提示EAE小鼠模型复制成功。

COX是花生四烯酸代谢的限速酶,主要分为COX-1和COX-2两种亚型。COX-2为同工酶,属诱导型酶,在脊髓组织中广泛分布,当细胞受到炎症刺激时,脊髓

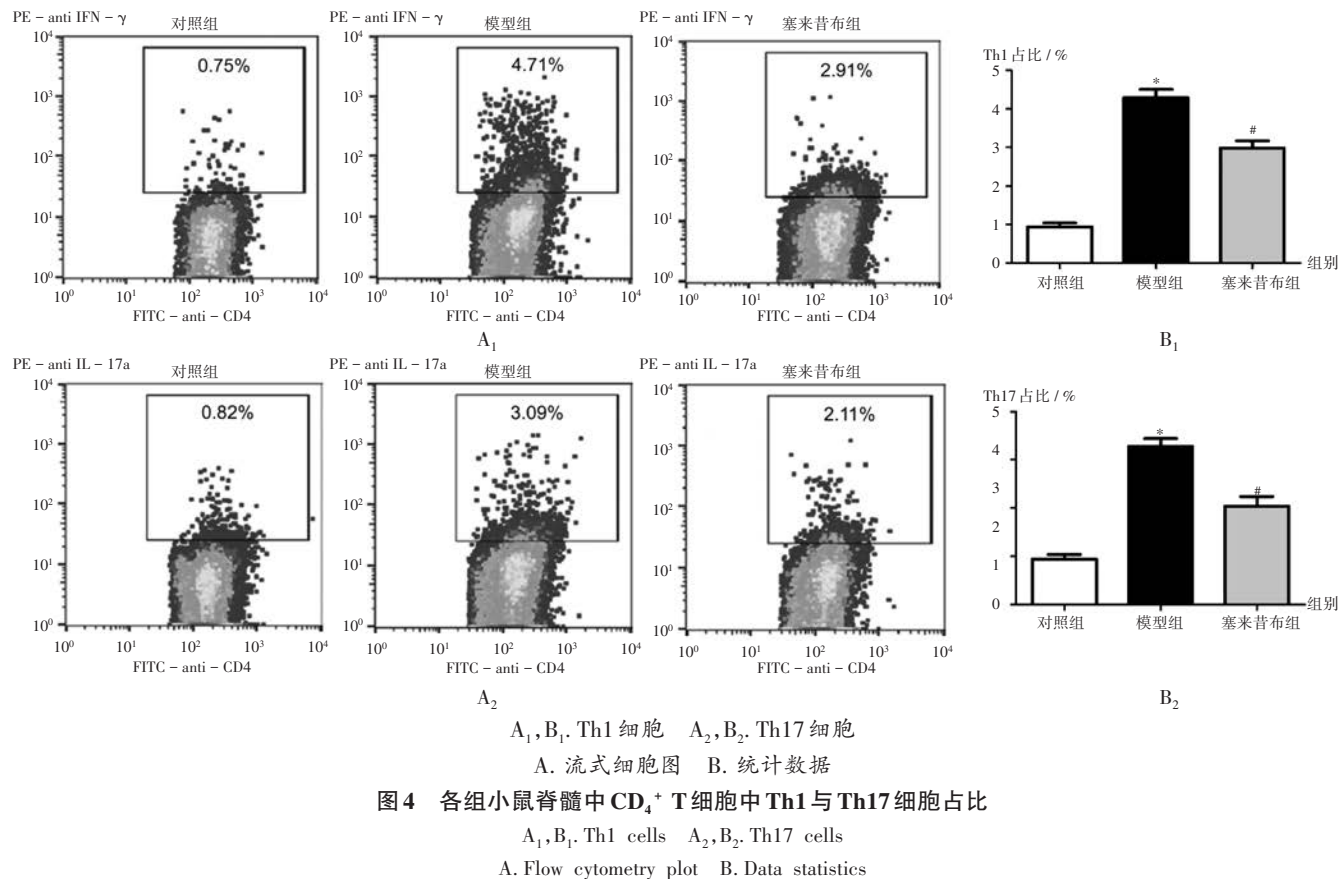


表 1 各组小鼠脊髓中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 表达水平比较
($\bar{X} \pm s$, pg/mL, $n = 3$)

Tab.1 Comparison of expression levels of TNF- α , IL-6 and IL-1 β in spinal cord of mice in each group($\bar{X} \pm s$, pg/mL, $n = 3$)

组别	TNF- α	IL-6	IL-1 β
对照组	223.87 $\pm$ 22.74	59.87 $\pm$ 11.44	55.93 $\pm$ 9.68
模型组	353.08 $\pm$ 43.41*	123.54 $\pm$ 9.93*	91.85 $\pm$ 7.00*
塞来昔布组	277.17 $\pm$ 44.04#	94.39 $\pm$ 16.77#	83.44 $\pm$ 9.19#

中 COX-2 表达水平升高,促进前列腺素、前列环素和血栓素等炎症因子的合成,导致炎症反应^[8]。COX-2 在健康大脑的神经细胞和内皮细胞中表达。在 EAE 大

鼠中,炎症病变的内皮细胞中 COX-2 的表达上调^[9]。本研究中,ELISA 检测结果显示模型小鼠脊髓中 TNF- α , IL-1 β , IL-6 水平显著升高。此外,Western blot 结果显示,COX-2, NLRP3, p-NF- κ B 在模型小鼠脊髓中表达水平显著升高。因此,MOG₃₅₋₅₅ 混合乳剂免疫诱导小鼠 EAE 可能是通过上调 COX-2 水平达成的。

塞来昔布对 COX-2 的亲合力是 COX-1 的 700 倍,可选择性抑制 COX-2 活性而发挥抗炎作用,可避免抑制 COX-1 活性而防止胃肠道反应的发生^[10],故具有更好的抗炎选择性与更低的副作用。临床类风湿关节炎患者的治疗研究显示,塞来昔布相比于布洛芬,在炎

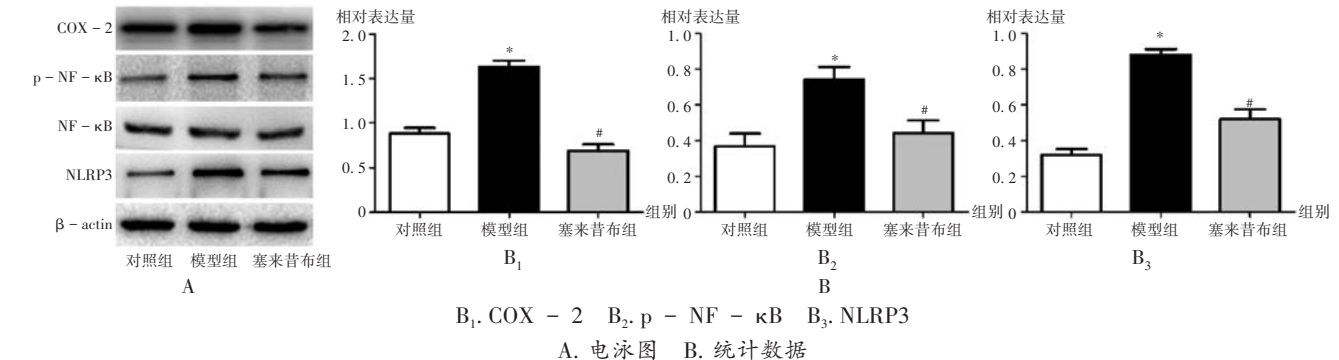


图 5 各组小鼠脊髓中 COX-2、p-NF- κ B、NLRP3 蛋白表达水平
B₁. COX-2 B₂. p-NF- κ B B₃. NLRP3
A. Electrophoretic map B. Data statistics

Fig.5 Expression levels of COX-2, p-NF- κ B, NLRP3 protein in the spinal cord of mice in each group

性细胞因子及类风湿因子水平调节方面作用更强,且药品不良反应发生率更低^[11]。同时,塞来昔布在中枢神经系统退行性疾病中也有广泛的应用,如在抑郁样行为动物模型中,可通过提高海马组织中抗氧化保护作用,减轻氧化应激,发挥抗抑郁样行为作用^[12]。上述结论为塞来昔布在EAE中治疗的应用提供了理论基础。本研究中,塞来昔布组小鼠神经功能损伤的时间轴明显延后,且神经功能缺损评分峰值显著低于模型组;同时,治疗后期小鼠神经功能损伤症状明显减轻。LFB染色显示小鼠脱髓鞘反应明显改善,ELISA检测结果显示炎性细胞因子分泌明显减少。故塞来昔布能显著改善EAE模型小鼠病理症状。

EAE发病过程中,T细胞的过度活化与增殖是介导中枢神经系统病变的重要原因^[13]。本研究中,模型小鼠CD₄⁺T细胞与CD₈⁺T细胞均出现明显增殖现象。但塞来昔布在显著抑制CD₄⁺T细胞增殖的同时,对CD₈⁺T细胞的增殖也存在一定的抑制。其原因可能是,塞来昔布改善模型小鼠病理症状主要是通过抑制CD₄⁺T细胞增殖介导的。有学者提出,髓磷脂诱导的CD₄⁺T细胞分化在自身免疫性脱髓鞘疾病中起着驱动器的作用^[14]。本研究中将目标集中于塞来昔布对CD₄⁺T细胞分化的调节上。在抗原免疫过程中,髓鞘抗原刺激T细胞在外周免疫器官中分化为Th1与Th17效应细胞,穿过血脑屏障,迁移至中枢神经系统造成EAE。Th1与Th17在诱导EAE的过程中,不断释放IFN- γ 、TNF- α 、IL-17等炎性细胞因子,造成炎性浸润,导致髓鞘脱失。已有研究报道,IFN- γ 与IL-17能正反馈调节多种细胞因子如TNF- α 、IL-1 β 、IL-6的生成,放大机体中炎性级联反应,进而破坏髓鞘组织^[15]。此外,将体外培养的分分泌IL-17的Th17细胞与分泌IFN- γ 的Th1细胞注入正常小鼠体内,均会诱导EAE的发病与进展^[16]。本研究中,与对照组比较,模型组小鼠脊髓中Th1与Th17在CD₄⁺T细胞中占比显著增加;与模型组比较,塞来昔布组上述指标显著降低。

综上所述,本研究中利用MOC₃₅₋₅₅混合乳剂免疫小鼠构建了EAE模型,并证实了塞来昔布能有效改善小鼠EAE症状。通过对脊髓细胞的提取与检测,初步证实塞来昔布通过抑制COX-2表达,抑制CD₄⁺T细胞增殖,减少CD₄⁺T细胞向Th1与Th17细胞分化及炎性细胞因子的分泌,最终改善小鼠髓鞘脱失的情况。

参考文献

[1] KCH - HENRIKSEN N, SORENSEN PS. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology [J]. *Lancet Neurol*, 2010, 9(5): 520 - 532.
[2] 蒋丽阳, 刘文东, 袁峰泉, 等. 多发性硬化症的药物治疗进展[J]. *医学理论与实践*, 2017, 30(15): 2212 - 2214.
[3] 杨 潇, 曹雪珍, 魏旭峰, 等. 冬凌草甲素抑制T细胞核因

子 κ B(NF- κ B)通路减轻小鼠实验性自身免疫性脑脊髓炎症状[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2020, 36(6): 492 - 498.

- [4] ANTONIO G, ARRIGO FGC, EGIDIO JP. Clinical perspectives of anti - inflammatory therapy in the elderly: the lipoxigenase (LOX) / cyclooxygenase (COX) inhibition concept [J]. *Arch Gerontol Geriatr*, 2004, 38(3): 201 - 212.
[5] MAI WH, LIU XW, WANG JF, et al. Protective effects of CX3CR1 on autoimmune inflammation in a chronic EAE model for MS through modulation of antigen - presenting cell - related molecular MHC - II and its regulators [J]. *Neurol Sci*, 2019, 40(4): 779 - 791.
[6] YE H EA, FOX RJ. Demyelinating lesions and progressive MS: Location, location, location [J]. *Neurol*, 2019, 93(7): 283 - 284.
[7] 周福庆, 龚洪翰, 张兴伟, 等. 磁共振弥散张量成像定量分析复发 - 缓解型多发性硬化患者表现正常的脑干白质纤维束[J]. *中国医学影像学杂志*, 2010, 26(3): 460 - 463.
[8] ZHANG QL, ZHANG J, XIA PF, et al. Anti - inflammatory activities of gentiopicroside against iNOS and COX - 2 targets [J]. *Chin Herb Med*, 2019, 11(1): 108 - 112.
[9] DEININGER MH, SCHLUESENER HJ. Cyclooxygenases - 1 and - 2 are differentially localized to microglia and endothelium in rat EAE and glioma [J]. *J Neuroimmunol*, 1999, 95(1 / 2): 202 - 208.
[10] ALSAYED SSR, ELSHEMY HAH, ABDELGAWAD MA, et al. Design, synthesis and biological screening of some novel celecoxib and etoricoxib analogs with promising COX - 2 selectivity, anti - inflammatory activity and gastric safety profile [J]. *Bioorg Chem*, 2017, 70: 173 - 183.
[11] REED GW, ABDALLAH MS, SHAO M, et al. Effect of aspirin coadministration on the safety of celecoxib, naproxen, or ibuprofen [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2018, 71(16): 1741 - 1751.
[12] SANTIAGO RM, BARBIERO J, MARTYNHAK B, et al. Anti-depressant - like effect of celecoxib piroxicam in rat models of depression [J]. *J Neural Transm*, 2014, 121(6): 671 - 682.
[13] WAN X, PEI W, ZHANG Y, et al. Inconsistence between number and function of autoreactive T cells in the course of experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *Immunol Invest*, 2018, 47(1): 1 - 17.
[14] 张俊华, 郑配国, 马雪涵, 等. EAE小鼠胸腺主要凋亡细胞群及其细胞凋亡机制的初步探讨[J]. *免疫学杂志*, 2014, 30(9): 764 - 767.
[15] SOUZA P, GONCALVES ED, PEDROSO GS, et al. Physical exercise attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting peripheral immune response and blood - brain barrier disruption [J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(6): 4723 - 4737.
[16] WIRASINHA RC, VIJAYAN D, SMITH N, et al. GPR65 inhibits experimental autoimmune encephalomyelitis through CD₄⁺T cell independent mechanisms that include effects on iNKT cells [J]. *Immunol Cell Biol*, 2018, 96(2): 128 - 136.

(收稿日期: 2021 - 05 - 02; 修回日期: 2021 - 09 - 10)