

DOI:10.16781/j.0258-879x.2017.03.0345

• 研究快报 •

大麻素 1 型受体过表达在实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠中的作用

程洁¹, 李琳¹, 楼之茵¹, 赵忠新^{2*}

1. 上海交通大学医学院附属新华医院神经内科, 上海 200092

2. 第二军医大学长征医院神经内科, 上海 200003

[摘要] **目的** 探讨大麻素 1 型受体 (cannabinoid 1 receptor, CB1R) 过表达对实验性自身免疫性脑脊髓炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) 小鼠神经功能的影响及其作用机制。 **方法** 选取 24 只 C57B/L6 小鼠, 采用 MOG₃₅₋₅₅ 免疫诱导构建 EAE 小鼠模型, 随机分为 2 组, 一组采用质粒转染技术使小鼠脊髓组织 CB1R 过表达, 另一组给予溶剂作为对照。观察对照组和 CB1R 过表达组 EAE 小鼠的神经功能缺损症状, 采用蛋白质印迹法检测小鼠脊髓组织中 CB1R 蛋白的表达, 采用酶联免疫吸附试验检测小鼠脊髓组织中细胞因子白介素 (IL)-10、IL-17、IL-6、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的浓度。 **结果** 免疫后第 14、28 天时 CB1R 过表达组 EAE 小鼠发生神经功能缺损的程度低于对照组 ($P < 0.05$)。与对照组相比, CB1R 过表达组 EAE 小鼠脊髓组织中 CB1R 蛋白的表达水平升高 ($P < 0.01$), IL-10 的浓度升高 ($P < 0.05$), 而 IL-17、IL-6、TNF- α 的浓度降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。 **结论** 中枢神经细胞中 CB1R 的过表达能够延缓 EAE 的发生和发展, 这种作用可能是通过免疫调节实现的。

[关键词] CB1 大麻酚受体; 实验性自身免疫性脑脊髓炎; 白介素类; 肿瘤坏死因子 α

[中图分类号] R 744.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2017)03-0345-04

Effect of cannabinoid 1 receptor overexpression on mice with experimental autoimmune encephalomyelitis

CHENG Jie¹, LI Lin¹, LOU Zhi-yin¹, ZHAO Zhong-xin^{2*}

1. Department of Neurology, Xinhua Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200092, China

2. Department of Neurology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

[Abstract] **Objective** To explore the effect of cannabinoid 1 receptor (CB1R) overexpression on the neurological function of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) and the related mechanism. **Methods** Twenty-four C57B/L6 mice were selected to prepare EAE models by MOG₃₅₋₅₅ immunization and were divided into two groups. CB1R was overexpressed in mouse spinal cord tissue by plasmid transfection technique in CB1R overexpression group, and the other group was given solvent as control. The neurological deficits of mice were observed in control group and CB1R overexpression group. The expression of CB1R in the spinal cord of mice were detected by Western blotting analysis. The concentrations of interleukin (IL)-10, IL-17, IL-6, and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were measured by ELISA. **Results** The degree of neurological deficit of mice in the CB1R overexpression group was significantly lower than that in the control group on 14th and 28th day after immunization ($P < 0.05$). Compared with the control group, the expression of CB1R protein in spinal cord in the CB1R overexpressing group was significantly increased ($P < 0.01$), the concentration of IL-10 was significantly increased ($P < 0.05$), and the concentrations of IL-17, IL-6, and TNF- α were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** CB1R overexpression in central nervous cells can postpone the development and progression of EAE in mice, which may be achieved through immunomodulation.

[Key words] CB1 cannabinoid receptor; experimental autoimmune encephalomyelitis; interleukins; tumor necrosis factor- α

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2017, 38(3): 345-348]

[收稿日期] 2016-10-21 **[接受日期]** 2016-12-26

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金(81200921)。Supported by National Natural Science Foundation of China for Young Scientists (81200921)。

[作者简介] 程洁, 博士生, 主治医师。E-mail: jjchengjj@sina.com

* 通信作者 (Corresponding author)。Tel: 021-81885451, E-mail: zhaozx@medmail.com.cn

近年来,内源性大麻素系统(endocannabinoid system, ECS)在多发性硬化(multiple sclerosis, MS)中的作用正逐渐得到广泛关注并成为新的研究热点。已有研究证实在MS中存在ECS功能失调^[1],但多个有关植物源性大麻素治疗MS的大型临床双盲实验的结论并不一致^[2-3]。内源性大麻素具有按需合成、快速降解的特点,因此大麻素受体(cannabinoid receptor, CBR)在MS发生和发展中的调节作用已成为新的研究热点和难点。

研究提示大麻素1型受体(cannabinoid 1 receptor, CB1R)参与了MS的发生和发展,可能具有神经保护作用^[4-6],但对于CB1R在正常小鼠和实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)小鼠病程的不同时期以及中枢神经系统不同类型细胞上的表达特点却知之甚少,阻碍了有关CB1R在MS发生、发展中的作用机制的研究。本研究通过质粒转染技术诱导CB1R过表达,探讨CB1R在EAE发生、发展中的可能机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物及试剂 健康雌性C57B/L6小鼠24只,8~10周龄,体质量22~25 g,购自上海斯莱克实验动物有限公司[动物许可证号:SCXK(沪)-2007-0005]。MOG₃₅₋₅₅肽段购自杭州联科生物公司。白介素(IL)-10、IL-17、IL-6、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)购自美国Peprotech公司。

1.2 MOG₃₅₋₅₅抗原混悬液制备 取MOG₃₅₋₅₅肽段3 mg,溶于1 mL PBS(3 mg/mL)中;另取3 mg结核菌素溶于1 mL完全弗氏佐剂(4 mg/mL)中。采用针管混合器将两种溶液等体积充分混合,制成油包水样乳白色混悬液,以静置后无分层为合格。

1.3 MOG₃₅₋₅₅诱导的EAE小鼠模型构建及症状评估 C57B/L6小鼠背部脊柱两侧四点皮下注射MOG₃₅₋₅₅抗原混悬液(200 μ L/只),同时尾静脉注射百日咳毒素(PTX) 200 ng/只,48 h后再次尾静脉注射PTX 200 ng加强免疫。所有小鼠置于相同的饲养环境中,自由饮食,自然作息。每周记录小鼠体质量,评估临床症状。从免疫当天开始进行小鼠的临床症状评分,直至免疫后第28天。症状评估采用国际评分标准:0分,无症状;1分,垂尾;2分,行路

不稳/后肢力弱/翻正反射迟钝;3分,后肢麻痹和(或)前肢力弱;4分,前肢麻痹;5分,四肢瘫;6分,濒临死亡或死亡。

1.4 MOG₃₅₋₅₅诱导的EAE小鼠分组及处理 取EAE小鼠24只,随机分为EAE对照组和EAE CB1R过表达组,每组12只,两组小鼠的神经功能评分差异无统计学意义。免疫当天,EAE对照组小鼠于L_{4/5}间隙注射对照溶剂15 μ L,过表达组于L_{4/5}间隙注射经预实验筛选选取的实验用载体,过表达CB1R(NM_007726.3)的载体pLOV.CMV.eGFP.2A.EF1a.PuroR(pLOV)。引物序列:正义链(同源重组序列目的基因5'端配对序列)5'-AAC CCC GGT CCG ATG GCT AGC ATG AAG TCG ATC TTA GAC GGC C-3';反义链(同源重组序列目的基因3'端配对序列)5'-CGT CAT CCT TGT AGT CGC TAG CCA GAG CCT CGG CAG ACG TGT C-3'。

1.5 蛋白质印迹法检测CB1R蛋白表达水平 免疫后第28天处死小鼠取脊髓组织,采用成分蛋白抽提试剂盒(Millipore)抽提细胞膜蛋白,BCA法定量。蛋白质提取物(30 μ g)用SDS-PAGE分离,并转移到PVDF膜。常规方法进行封闭、洗膜,一抗、二抗作用后在膜抗CB1R中过夜(4 $^{\circ}$ C)。用化学发光(ECL)系统(GE Healthcare)辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的二抗和ECL试剂盒检测条带。

1.6 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测细胞因子的表达 免疫后第28天分别取对照组和CB1R过表达组EAE小鼠脊髓,称取80 mg脊髓组织,冰浴条件下提取组织胞质蛋白。在37 $^{\circ}$ C细胞培养箱中孵育48 h后取上清液,ELISA法检测IL-10、IL-17、IL-6、TNF- α 的浓度。

1.7 统计学处理 使用GraphPad Prism 5.0软件进行分析。计量资料用F检验进行样本方差齐性检验;样本符合正态分布且方差齐性时,两组均数比较采用t检验。检验水准(α)为0.05。

2 结果

2.1 各组EAE小鼠神经功能缺损评分的动态变化 免疫后第7、14、21、28天评估小鼠的神经功能缺损情况。第14天时对照组与CB1R过表达组EAE小鼠的神经功能缺损评分差异有统计学意义

($P < 0.05$),第28天时CB1R过表达组小鼠的神经功能缺损评分也低于对照组($P < 0.05$,图1)。

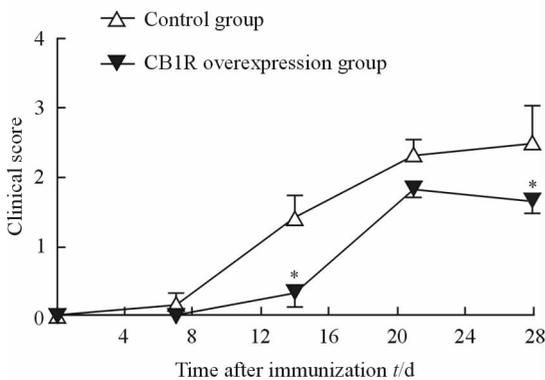


图1 不同时间点对照组和CB1R过表达组EAE小鼠神经功能缺损的变化

Fig 1 Clinical scores of neurological deficit in EAE mice at different time points in control and CB1R overexpression groups

CB1R: Cannabinoid 1 receptor; EAE: Experimental autoimmune encephalomyelitis. * $P < 0.05$ vs control group. $n = 12$, $\bar{x} \pm s$

2.2 各组EAE小鼠脊髓组织中CB1R的蛋白水平 蛋白质印迹法结果(图2)显示,相较于对照组,CB1R过表达组EAE小鼠脊髓组织中CB1R蛋白的表达水平升高($P < 0.01$)。

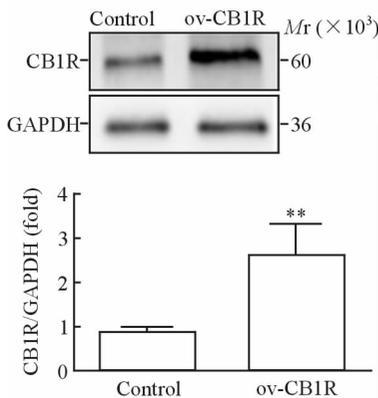


图2 对照组和CB1R过表达组EAE小鼠脊髓组织中CB1R的表达水平

Fig 2 Expression of CB1R in spinal cord in EAE mice in control and CB1R overexpression groups

CB1R: Cannabinoid 1 receptor; EAE: Experimental autoimmune encephalomyelitis; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; ov-CB1R: CB1R overexpression. ** $P < 0.01$ vs control group. $n = 12$, $\bar{x} \pm s$

2.3 各组EAE小鼠脊髓组织中细胞因子的浓度 ELISA实验结果(图3)显示,相较于对照组,CB1R过表达组EAE小鼠脊髓组织中IL-10的浓度升高($P < 0.05$),而IL-17、IL-6、TNF- α 的浓度降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

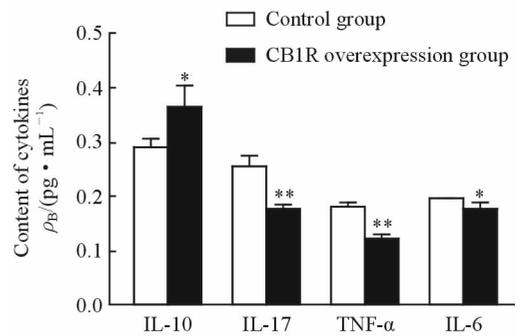


图3 对照组和CB1R过表达组EAE小鼠脊髓组织中细胞因子的表达

Fig 3 Expression of cytokines in spinal cord in EAE mice in control and CB1R overexpression groups

CB1R: Cannabinoid 1 receptor; EAE: Experimental autoimmune encephalomyelitis; IL: Interleukin; TNF: Tumor necrosis factor. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group. $n = 12$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

CB1R又名中枢型大麻素受体,主要位于脑、脊髓与周围神经系统中。脑内CB1R主要分布于基底神经节(黑质、苍白球、外侧纹状体)、海马CA锥体细胞层、小脑和大脑皮质。CB1R的分布特征可能与大麻类物质对记忆、认知、运动控制的调节作用有关。

随着研究的深入,目前发现CBR系统在众多神经系统疾病中起着重要的神经保护和免疫调节作用[7-8]。既往研究表明正常小鼠脑内CB1R主要在神经元中表达,少量在小胶质细胞中表达,而在星形胶质细胞中不表达[9]。与正常小鼠比较,EAE小鼠神经元上CB1R的阳性细胞百分数显著降低,而小胶质细胞中CB1R的阳性细胞百分数显著增加[9]。Berrendero等[10]也发现EAE病程中CB1R的表达减少与小鼠的神经功能缺损程度密切相关。由此表明CB1R在EAE中可能具有神经保护的作用,其对EAE发生、发展的影响可能通过小胶质细胞介导的免疫反应实现。

实验表明,CB1R活化后对EAE神经功能缺损的影响结果并不一致[11-12]。上调CB1R或脑损伤后给予内源性大麻素(2-AG)可产生脑保护作用[13-14]。本课题组前期研究发现特异性CB1R拮抗剂SR141716A(SR1)干预的EAE小鼠的起病时间(免疫后第5天)提前,早期神经功能缺损显著高于对照组[9]。为明确CB1R是否参与了EAE发生、发展中的神经保护,本研究通过质粒转染技术使EAE小鼠脊髓CB1R过表达,结果发现CB1R过表达组EAE小鼠的神经功能较同时点对照组显著减轻。此外,我们发现CB1R过表达组脊髓中EAE小鼠IL-10

的浓度明显升高,而 IL-17、IL-6、TNF- α 的浓度降低。IL-10 是由 Th2 细胞产生的强效抗炎因子,可下调促炎因子的表达,从而发挥免疫调节作用。也有研究证实 IL-10 水平升高在 MS 的免疫病理过程中具有重要的保护作用^[15]。IL-17 由 Th17 细胞分泌,IL-6 由 Th2 细胞分泌、TNF- α 由 Th1 细胞分泌,这些 T 细胞因子均有促炎作用,参与诱导麻痹和炎症反应^[16];其中 IL-17A 不仅与中枢神经系统脱髓鞘疾病发病密切相关,还与疾病的严重程度有关^[17]。CB1R 可调控炎症因子的水平,同时也受炎症因子的影响。研究发现不同细胞群与促炎因子特别是 TNF- α 的刺激也可诱导 CB1R mRNA 的合成^[18]。本研究中 CB1R 过表达 EAE 小鼠脊髓组织中 IL-10 的浓度升高,而 IL-17、IL-6、TNF- α 的浓度降低,表明 CB1R 可能参与了 EAE 的发生与发展,并具有一定的免疫保护作用。

综上所述,中枢神经系统 CB1R 过表达能够减轻 EAE 的发生和发展,这种作用可能是通过调节细胞因子的表达来实现的。今后我们将进一步深入研究 EAE 小鼠中 CB1R 的表达变化及相关机制,为寻求 MS 新的治疗策略提供新思路。

[参考文献]

- [1] CENTONZE D, BARI M, ROSSI S, PROSPERETTI C, FURLAN R, FEZZA F, et al. The endocannabinoid system is dysregulated in multiple sclerosis and in experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *Brain*, 2007(Pt 10), 130: 2543-2553.
- [2] THAERA G M, WELLIK K E, CARTER J L, DEMAERSCHALK B M, WINGERCHUK D M. Do cannabinoids reduce multiple sclerosis-related spasticity? [J]. *Neurologist*, 2009, 15: 369-371.
- [3] SMITH P F. New approaches in the management of spasticity in multiple sclerosis patients: role of cannabinoids[J]. *Ther Clin Risk Manag*, 2010, 6: 59-63.
- [4] CHEN C C, ZECHARIAH A, HSU Y H, CHEN H W, YANG L C, CHANG C. Neuroaxonal ion dyshomeostasis of the normal-appearing corpus callosum in experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *Exp Neurol*, 2008, 210: 322-330.
- [5] CENTONZE D, FINAZZI-AGRO A, BERNARDI G, MACCARRONE M. The endocannabinoid system in targeting inflammatory neurodegenerative diseases[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2007, 28: 180-187.
- [6] VAN DER WALT A, BUTZKUEVEN H, KOLBE S, MARRIOTT M, ALEXANDROU E, GRESLE M, et al. Neuroprotection in multiple sclerosis: a therapeutic challenge for the next decade [J]. *Pharmacol Ther*, 2010, 126: 82-93.
- [7] FQWLER C J, ROIO M L, RODRIGUEZ-GAZTELUMENDI A. Modulation of the endocannabinoid system; neuroprotection or neurotoxicity? [J]. *Exp Neurol*, 2010, 224: 37-47.
- [8] ROSSI S, BERNARDI G, CENTONZE D. The endocannabinoid system in the inflammatory and neurodegenerative processes of multiple sclerosis and of amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Exp Neurol*, 2010, 224: 92-102.
- [9] 楼之茵,程洁,李琳,陈伟,王晓蓉,浦政,等.大麻素 1 型受体在实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠中的动态表达及其作用 [J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2014, 35:814-822.
- [10] BERRENDERO F, SANCHEZ A, CABRANES A, PUERTA C, RAMOS J A, GARCIA-MERINO A, et al. Changes in cannabinoid CB₁ receptors in striatal and cortical regions of rats with experimental allergic encephalomyelitis, an animal model of multiple sclerosis [J]. *Synapse*, 2001, 41: 195-202.
- [11] NI X, GELLER E B, EPIHIMER M J, EISENSTEIN T K, ADLER M W, TUMA R F. Win 52212-2, a cannabinoid receptor agonist, attenuates leukocyte/endothelial interactions in an experimental autoimmune encephalomyelitis model [J]. *Mult Scler*, 2004, 10: 158-164.
- [12] JACKSON S J, PRYCE G, DIEMEL L T, CUZNER M L, BAKER D. Cannabinoid-receptor 1 null mice are susceptible to neurofilament damage and caspase 3 activation [J]. *Neuroscience*, 2005, 134: 261-268.
- [13] PANIKASHYILI D, SIMEONIDOU C, BENSABAT S, HANUS L, BREUER A, MECHOULAM R, et al. An endogenous cannabinoid (2-AG) is neuroprotective after brain injury [J]. *Nature*, 2001, 413: 527-531.
- [14] MARSICANO G, GOODENOUGH S, MONORY K, HERMANN H, EDER M, CANNICH A, et al. CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity [J]. *Science*, 2003, 302: 84-88.
- [15] 周建光,杨梅. IL-10 与自身免疫性疾病关系的研究进展 [J]. *医学综述*, 2012, 18: 2743-2745.
- [16] 侯娟. 多发性硬化免疫机制研究新进展 [J]. *国际免疫学杂志*, 2009, 32: 468-471.
- [17] 梁军利,钱琪,马晓丽,吕海东,许明予. 白细胞介素-17A 在复发缓解型多发性硬化发病机制中的作用研究 [J]. *实用医学杂志*, 2014, 30: 409-411.
- [18] JEAN-GILLES L, GRAN B, CONSTANTINESCU C S. Interaction between cytokines, cannabinoids and the nervous system [J]. *Immunobiology*, 2010, 215: 606-610.