

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00946

选择性雌激素受体调节剂对实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠的抗炎机制研究

胡 晓¹, 娄 磊², 袁 军³, 万 兴⁴, 王建怡⁵, 秦新月^{1*}

1. 重庆医科大学附属第一医院神经内科, 重庆 400016
2. 遵义医学院小儿内科, 遵义 563003
3. 贵州省人民医院中心实验室, 贵阳 550002
4. 贵州省人民医院肿瘤科, 贵阳 550002
5. 贵州省人民医院小儿内科, 贵阳 550002

[摘要] 目的 探讨选择性雌激素受体调节剂(SERM)减轻实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)炎症反应的可能机制。方法 用 MOG35-55 多肽诱发 60 只 EAE 小鼠模型,做去卵巢术。分为治疗组和对照组($n=30$),治疗组予 SERM(雷洛昔芬)治疗。比较 2 组 EAE 小鼠的临床症状评分。取脑和脊髓组织,行 H-E 染色、luxol fast blue(LFB)-H-E 染色观察病理学改变;实时荧光定量 PCR 及 ELISA 法检测基质金属蛋白酶 9(MMP-9)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、干扰素 γ (IFN- γ)、白细胞介素 4(IL-4)水平;蛋白质印迹分析检测髓鞘碱性蛋白(MBP)表达量,分析脱髓鞘情况。结果 治疗组 EAE 小鼠与对照组相比,治疗组临床症状减轻($P<0.01$)、发病率降低($P<0.05$);H-E 染色显示治疗组炎细胞浸润减少($P<0.05$);LFB-H-E 染色结果和 MBP 表达量显示治疗组脱髓鞘减轻($P<0.05$);实时荧光定量 PCR 及 ELISA 结果示治疗组脑和脊髓组织中 MMP-9、TNF- α 、IFN- γ 表达降低而 IL-4 增加($P<0.05$, $P<0.01$)。结论 SERM 可能通过降低 MMP-9、TNF- α 、IFN- γ 表达,增加 IL-4 表达,从而减轻 EAE 小鼠炎症反应。

[关键词] 实验性自身免疫性脑脊髓炎;选择性雌激素受体调节剂;炎症

[中图分类号] R 744. 5 [文献标志码] A [文章编号] 0258-879X(2010)09-0946-06

Anti-inflammatory mechanism of selective estrogen receptor modulator in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis

HU Xiao¹, LOU Lei², YUAN Jun³, WAN Xing⁴, WANG Jian-yi⁵, QIN Xin-yue^{1*}

1. Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

2. Department of Pediatrics, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, Guizhou, China

3. Department of Central Laboratory, the Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002, Guizhou, China

4. Department of Oncology, the Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002, Guizhou, China

5. Department of Pediatrics, the Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002, Guizhou, China

[Abstract] Objective To explore the anti-inflammatory mechanisms of selective estrogen receptor modulator (SERM) on experimental autoimmune encephalomyelitis(EAE). Methods EAE models were induced with MOG35-55 peptide in 60 mice and all animals were ovariectomized. The model animals were then divided into treatment group and control group ($n=30$). Treatment group was treated with SERM. The clinical symptom scores were compared between the two groups. The pathologic changes of the brain and spinal cord were studied by H-E staining and luxol fast blue(LFB)-HE staining. The expressions of MMP-9, TNF- α , IFN- γ , and IL-4 mRNA and protein were examined by quantitative real-time PCR and ELISA. Western blotting analysis was used to analyze the expression of myelin basic protein (MBP) so as to analyze the demyelination status. Results Clinical symptom scores and incidence of EAE in the treatment group were improved compared with those in the control group ($P<0.01$, $P<0.05$). H-E staining showed that infiltration of inflammatory cells was decreased in the treatment group ($P<0.05$). LFB-H-E staining and Western blotting analysis showed that the demyelination was improved in the treatment group ($P<0.05$). The results of quantitative real-time PCR and ELISA showed that the expression of MMP-9, TNF-

[收稿日期] 2010-03-24 [接受日期] 2010-07-26

[基金项目] 贵州省科技厅攻关项目[黔科合 sy(2009)3054]. Supported by Key Technology Program of Science and Technology Department of Guizhou Province[Qiankehe sy(2009)3054].

[作者简介] 胡 晓, 博士生. 现在贵州省人民医院神经内科, 贵阳 550002. E-mail: natasan520@163.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 023-89012478, E-mail: qinxinyue@yahoo.com

α , and IFN- γ were decreased and the expression of IL-4 was increased ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion** SERM can alleviate the inflammation symptom in EAE mice through decreasing MMP-9, TNF- α , and IFN- γ and increasing IL-4 expression.

[Key words] experimental autoimmune encephalomyelitis; selective estrogen receptor modulators; inflammation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(9):946-951]

实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)是一种以特异性致敏的 CD4⁺ T 细胞介导为主、以中枢神经系统(central nervous system, CNS)内小血管周围出现单核细胞浸润及髓鞘脱失为特征的自身免疫性疾病,是国际公认的人类多发性硬化(multiple sclerosis, MS)的动物模型。与其他多种自身免疫性疾病一样,MS 存在着性别差异,表现为:与男性相比,女性发病率较高,且初发时间也较早。在女性 MS 患者妊娠末期,疾病的严重程度明显减轻,复发时间延长,复发次数明显减少;但是在产后,伴随着雌激素水平的下降,疾病的复发次数增多、症状又逐渐加剧,提示体内高水平雌激素对女性 MS 患者具有保护作用^[1]。雷洛昔芬(raloxifene)为人工合成的非类固醇类苯噻酚化合物,是一种选择性雌激素受体调节剂(selective estrogen receptor modulators, SERM)。研究发现雷洛昔芬对 CNS 的保护作用与参与免疫调节有关^[2],但对该作用的细胞和分子机制目前还知之甚少。因此本实验构建了 C57BL/6 小鼠 EAE 模型,观察用雷洛昔芬治疗后小鼠 CNS 中炎症因子的变化,探讨雷洛昔芬减轻 EAE 小鼠炎症反应的可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料 雌性 C57BL/6 小鼠 60 只,4~8 周龄,体质量 15~20 g,购自重庆医科大学实验动物中心,合格证号: SCXK(渝) 2007-000341。实验材料: MOG35-55 多肽(序列: MEVGWYRSPFSRVVH-LYRNGK)购自西安美联多肽合成有限公司,纯度 >97%, -20℃ 保存备用;百日咳毒素由成都生物制品研究所馈赠;卡介苗购自中国药品生物制品检定所;luxol fast blue(LFB)、焦油紫、完全弗氏佐剂均购自 Sigma 公司;TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司;BioRT 反转录扩增试剂盒购自 BioFlux 公司;SYBR Master Mixture 试剂盒购自 TaKaRa 公司;小鼠抗髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein, MBP)抗体购自 ABCAM 公司,蛋白定量试剂盒购自 HyClone-Pierce 公司;PVDF 膜购自 Bio-Rad 公司;GAPDH 抗体、羊抗鼠 IgG 购自 Santa Cruz 公司;小鼠 MMP-9、TNF- α 、IFN- γ 、IL-4 ELISA 试剂盒均购自 R&D 公司;ECL-PLUS 试剂盒购自 Amersham 公司;雷洛

昔芬(易维特)购自礼来苏州制药有限公司;碳酸锂、伊红等化学试剂购自恒因生物有限公司;引物由上海生工生物工程技术有限公司设计并合成。

1.2 去卵巢手术及 EAE 动物模型的制备 将雌性 C57BL/6 小鼠 60 只腹腔麻醉行双侧输卵管结扎及卵巢摘除,术后 2 周制备 EAE 模型。用 0.01 mol/L 的 PBS 将 MOG35-55 稀释成 300 μ g/ml,然后将稀释液与等量的完全弗氏佐剂(卡介苗的终浓度为 10 mg/ml)混合,用玻璃注射器抽打至油包水状态,制成诱导 EAE 的抗原乳剂。按 0.2 ml/只分别于背部、颈部、腋窝、踝部 4 点皮下注射^[3],制作 EAE 模型。将去卵巢的 EAE 小鼠分为治疗组和对照组,各 30 只。自免疫第 10 天起,至免疫后 30 d,治疗组 EAE 小鼠每天予雷洛昔芬 1 mg/kg 灌胃治疗^[4]。

1.3 临床症状评分标准 免疫当日及免疫后所有动物每日称重并进行神经功能评分,EAE 模型评分采用较为通用的 5 分评分法: 1 分,动物尾部无力;2 分,后肢无力;3 分,后肢瘫痪;4 分,前肢瘫痪;5 分,濒死状态或死亡^[5]。

1.4 标本采集 两组 EAE 小鼠于免疫后第 16 天(急性期)、第 23 天(缓解期)、第 30 天(慢性期)分 3 批取脑和脊髓组织,除一部分用于病理检查,余脊髓组织即刻用于抽提 RNA,脑组织用无菌生理盐水冲洗后置液氮中速冻,转移至 -80℃ 冰箱备用。

1.5 病理检查 取急性发病期 EAE 小鼠 3 只的脊髓和脑组织用 4% 多聚甲醛固定 24 h,石蜡包埋,制成厚度 5 μ m 的切片,用常规方法行 H-E 染色和 LFB-H-E 染色^[3]。根据文献[6],对炎症反应程度进行评分: 0 分,无炎症细胞浸润;1 分,炎症细胞仅浸润在脑表面,即蛛网膜下腔内;2 分,轻度炎症细胞脑实质浸润;3 分,中度炎症细胞脑实质浸润;4 分,重度和弥漫性脑实质见炎症细胞浸润。对脱髓鞘程度进行评分: 0 分,无髓鞘脱失;1 分,轻度髓鞘脱失;2 分,中度髓鞘脱失;3 分,重度髓鞘脱失。

1.6 实时荧光定量 PCR 检测脊髓组织中 MMP-9、TNF- α 、IFN- γ 、IL-4 mRNA 的表达水平 取 2 组 EAE 小鼠急性期、缓解期、慢性期脊髓组织,即刻用 TRIzol 试剂提取每个样本的总 RNA,经测定其 260 nm 和 280 nm 光密度比值在 1.8~2.2,用 BioRT 反转录扩增试剂盒反转录合成 cDNA,根据 SYBR Master Mixture 试剂盒的产品说明书进行实时定量 PCR 检测。

β -actin作为内参。引物序列分别为:MMP-9 上游 5'-GCC CTG GAA CTC ACA CGA CA-3',下游 5'-TTG GAA ACT CAC ACG CCA GAA G-3';TNF- α 上游 5'-GCC ACA AGC AGG AAT GAG AAG-3',下游 5'-GCC ACA AGC AGG AAT GAG AAG-3';IFN- γ 上游 5'-TTT GCA GCT CTT CCT CAT-3',下游 5'-TGC CAG TTC CTC CAG ATA -3';IL-4 上游 5'-TCT CGA ATG TAC CAG GAG CCA TAT C-3',下游 5'-AGC ACC TTG GAA GCC CTA CAG A- 3'; β -actin 上游 5'-GTG GAC ATC CGC AAA GAC-3',下游 5'-AAA GGG TGT AAC GCA ACT A-3'。扩增条件为:95℃预变性 30 s;95℃变性 10 s,58℃退火 15 s,72℃延伸 10 s,45 个循环;72℃延伸 10 min。同时设 RT 质控和 PCR 扩增 2 个空白对照。根据目的基因与内参基因的 Ct 差值,得到 2 组标本的 MMP-9、TNF- α 、IFN- γ 、IL-4 相对表达量。

1.7 ELISA 法检测脑组织中 MMP-9、TNF- α 、IFN- γ 、IL-4 的浓度 2 组 EAE 小鼠于免疫后急性期、缓解期、慢性期分 3 批取脑组织,取部分脑组织,冰上 PBS 冲洗,滤纸吸干,以生理盐水配成 10%脑组织匀浆,匀浆液 5 000 r/min($r=10$ cm)低温离心 10 min,取上清液,采用双抗体夹心 ELISA 法检测 MMP-9、TNF- α 、IFN- γ 、IL-4 浓度,具体方法按 ELISA 试剂盒说明书操作。

1.8 蛋白质印迹检测脑组织中 MBP 表达 取急性发病期 EAE 小鼠部分脑组织加蛋白裂解液匀浆器 4℃研磨,14 000 r/min($r=8$ cm)高速离心 40 min 吸取上清液。使用蛋白定量试剂盒测定裂解产物的蛋白浓度为 2 μ g/ μ l。用 SDS-PAGE 电泳分离等量的蛋白质,然后电转移至 PVDF 膜。将膜浸入 TBST 5%脱脂奶粉中室温放置 1 h,与 1:1 000 稀释的小鼠抗 MBP 抗体和 1:2 500 稀释的抗 GAPDH 抗体共孵育,4℃过夜。与 1:5 000 稀释的羊抗鼠 IgG 在室温下孵育 1 h。经过多次清洗,用 ECL-PUS 试剂盒观察蛋白条带。使用 Alpha Imager 2200 凝胶成像分析系统扫描拍照,并测定条带的密度值,以 MBP/GAPDH 条带密度的相对值表示蛋白表达水平。

1.9 统计学处理 计量资料均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 12.0 统计软件进行数据分析,2 组间比较用 t 检验;多组间参数比较采用单因素方差分析。检验水平(α)为 0.05。

2 结 果

2.1 临床症状评分比较 30 只对照组 EAE 小鼠免疫 12 d 后开始逐渐发病,表现为活动减少、食欲减退、体质量减轻、尾部及四肢无力。发病高峰为 14~18 d,高峰过后,EAE 小鼠的体质量逐渐恢复,症状有所缓解,至第 30 天有 2 只小鼠遗留有尾部拖垂的症状。按照评分标准,大于 1 分为发病,对照组共 28 只发病,发病率达 90%以上,平均丧失最大体质量为(3.184 $\pm$ 1.242) g。30 只治疗组 EAE 小鼠免疫 14 d 后开始逐渐发病,共 8 只发病,发病率为 26.7%,平均丧失最大体质量为(1.122 $\pm$ 0.58) g。2 组发病率及平均丧失最大体质量差异有统计学意义($P<0.05$)。临床症状评分见图 1A、体质量变化见图 1B。

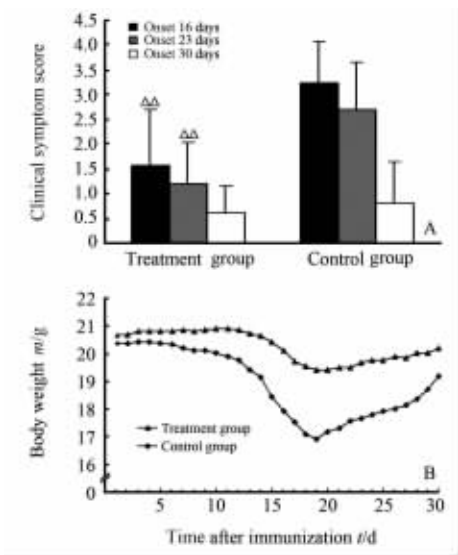


图 1 各组 EAE 小鼠临床症状评分及体质量变化曲线
Fig 1 Clinical symptom score and weight change curve of EAE mouse in each group

EAE: Encephalomyelitis. $\Delta\Delta P<0.01$ vs control group. $n=10$, $\bar{x}\pm s$

2.2 病理改变 H-E 染色见对照组 EAE 小鼠急性发病期脑和脊髓组织有明显的炎性细胞浸润,以淋巴细胞为主(图 2A),CNS 的炎症细胞浸润评分为(3.88 $\pm$ 0.48)分。治疗组 EAE 小鼠 CNS 内炎症细胞的浸润明显减少(图 2B),炎症细胞浸润评分为(0.96 $\pm$ 0.32)分,与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。LFB-H-E 染色见对照组 EAE 小鼠脑和脊髓有明显脱髓鞘改变(图 2C),脱髓鞘评分为(2.12 $\pm$ 0.26)分,脱髓鞘区域有大量炎症细胞浸润,提示髓鞘破坏和炎症有关系。治疗组脱髓鞘情况明显减轻(图 2D),评分为(0.78 $\pm$ 0.28)分,与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。

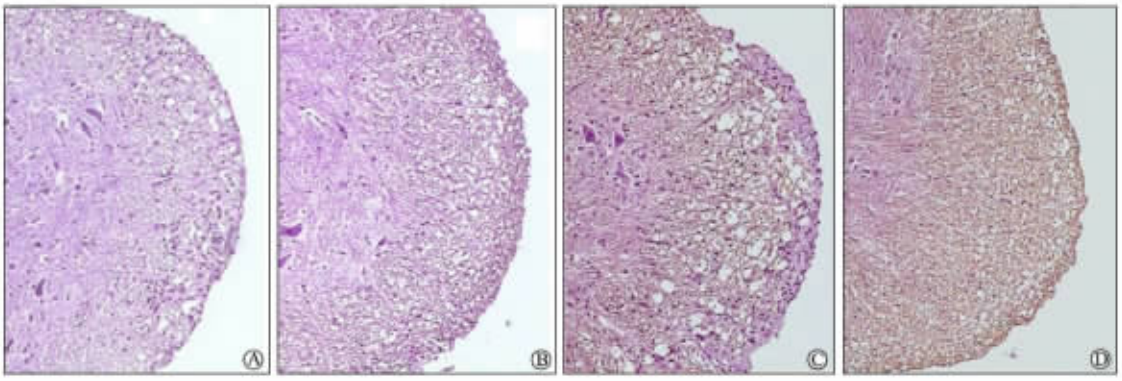


图 2 病理学观察炎症细胞浸润和脱髓鞘的情况

Fig 2 Pathological observation of inflammatory cell infiltration and demyelination

EAE; Encephalomyelitis; A: H-E staining in spinal cord at acute onset of EAE mice in control group; B: H-E staining in spinal cord at acute onset of EAE mice in treatment group; C: LFB-H-E staining at acute onset of EAE mice in control group; D: LFB-H-E staining at acute onset of EAE mice in treatment group. Original magnification: $\times 200$

2.3 EAE 小鼠脊髓中 MMP-9、TNF- α 、IFN- γ 、IL-4 mRNA 表达量及其在脑组织中浓度测定 对照组 EAE 小鼠发病高峰过后,体质量逐渐恢复,随着症状的缓解,脊髓中 MMP-9、TNF- α 、IFN- γ mRNA 表达量及其在脑组织中浓度逐渐减低,IL-4 逐渐增加。如图 3、图 4 所示,治疗组 EAE 小鼠发病

急性期(第 16 天)和缓解期(第 23 天)脊髓中 MMP-9、TNF- α 、IFN- γ mRNA 表达量及其在脑组织中浓度与对照组相比降低($P<0.05$, $P<0.01$),IL-4 增加($P<0.05$, $P<0.01$),治疗组各指标在慢性发病期(第 30 天)与对照组相比差异无统计学意义($P>0.05$)。

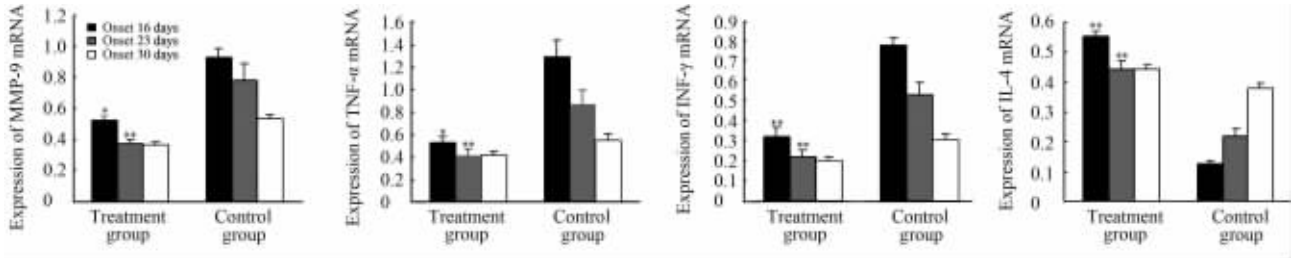


图 3 实时荧光定量 PCR 检测脊髓中 MMP-9、TNF- α 、IFN- γ 、IL-4 mRNA 表达量

Fig 3 Expression of MMP-9, TNF- α , IFN- γ , and IL-4 mRNA in spinal cord as examined by quantitative real-time RT-PCR

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control group. $n=10$, $\bar{x}\pm s$

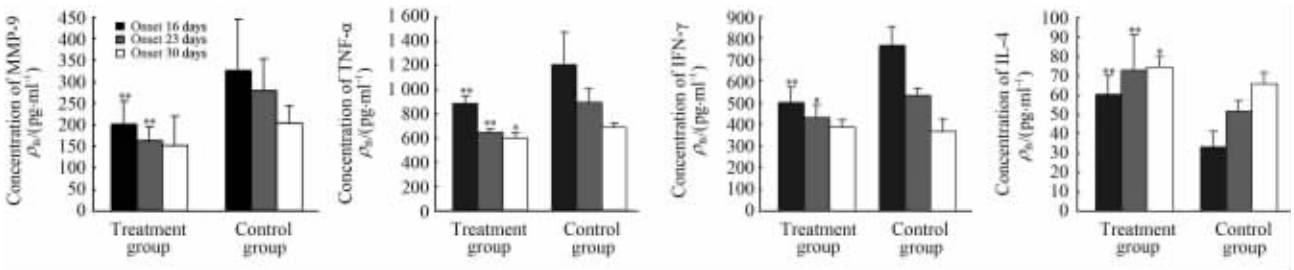


图 4 ELISA 法检测脑组织中 MMP-9、TNF- α 、IFN- γ 、IL-4 含量

Fig 4 Cerebral MMP-9, TNF- α , IFN- γ and IL-4 levels as detected by ELISA

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control group. $n=10$, $\bar{x}\pm s$

2.4 蛋白质印迹检测脑组织中 MBP 蛋白表达量 蛋白质印迹分析结果可见相对分子质量约21 000

的 MBP 特异性条带和相对分子质量约 36 000 的 GAPDH 特异性条带(图 5),治疗组急性发病期脑组

织中 MBP 蛋白表达量为 0.972 ± 0.219 ,明显高于对照组的 $0.177 \pm 0.072(P < 0.05)$ 。

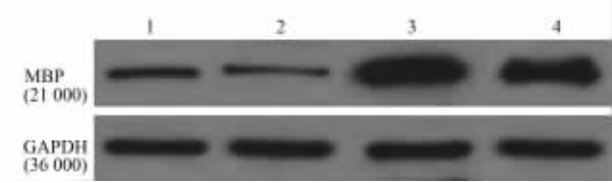


图 5 蛋白质印迹分析检测 MBP 蛋白的表达
Fig 5 MBP protein expression as examined
by Western blotting analysis
1,2: Control group; 3,4: Treatment group

3 讨 论

SERM 是近年来人工合成的非甾类化合物,具有一定的组织特异性。在生殖系统组织中,表现为雌激素拮抗剂的作用,不促进子宫内膜增生,不增加阴道出血,从而避免了雌激素替代治疗引起的子宫内膜增生和乳腺癌等副作用。而在生殖系统以外的组织中,SERM 表现为部分雌激素激动剂的作用,能够防止骨钙流失和降低血清胆固醇水平,这种组织选择性拮抗剂/激动剂的特点使它有可能成为一种激素替代治疗的理想药物。近年来 SERM 对 CNS 的作用也逐渐引起了人们的关注。研究发现 SERM 能够通过调节星形胶质细胞增殖修复脑损伤^[2,7],表明 SERM 在 CNS 可能表现为雌激素激动剂而起神经保护作用^[8],然而关于 SERM 的神经保护作用的细胞和分子机制,目前还知之甚少。本实验用雷洛昔芬治疗的 EAE 小鼠,其临床症状减轻、发病率降低。取脑和脊髓组织行 H-E 染色发现治疗后 EAE 小鼠 CNS 炎症细胞的浸润减少。MBP 作为 CNS 髓鞘蛋白的主要构成成分,在 CNS 脱髓鞘疾病中具有重要价值。研究发现 MBP 可以作为 CNS 白质脱髓鞘的指标^[9]。LFB-H-E 染色是显示神经纤维髓鞘的可靠而常用的染色方法^[10]。本实验中 LFB-H-E 染色及脑组织中 MBP 蛋白含量检测发现雷洛昔芬治疗后 EAE 小鼠 CNS 髓鞘破坏减轻。这些说明雷洛昔芬能减轻 EAE 小鼠临床症状、炎症反应和髓鞘脱失情况。

MS 主要是由 CD4⁺ Th1 细胞介导的一种 CNS 炎症脱髓鞘性自身免疫疾病,细胞因子在其发病机制中起重要作用^[11]。CD4⁺ 细胞分为 Th1 和 Th2 亚型,Th1 类细胞因子如 IL-2、IL-12、IFN- γ 、TNF- α 等,能促进炎症的发生,激活巨噬细胞,对脱髓鞘的产生起着极为重要的作用;Th2 型细胞因子如 IL-4、IL-5 和 IL-10 等,有抑制 Th1 型细胞因子的作用,通

过下调内皮细胞和巨噬细胞的应急状态参与炎症修复,提示诱导或激活 Th2 细胞可能有潜在的保护 Th1 型细胞介导的自身免疫性疾病的作用。Th1/Th2 平衡是机体行使防御、自身稳定和免疫监视的重要机制,大量研究表明 MS 患者中存在 Th1/Th2 类细胞因子的失衡^[12-14],纠正 Th1/Th2 失衡已成为新的治疗策略之一^[15]。IFN- γ 是促进 Th0 细胞向 Th1 细胞分化的主要细胞因子,能促进淋巴毒素或 TNF- α 等介质的释放引起 CNS 脱髓鞘,还能诱导其他细胞因子如 IL-1 和 IFN- α 的产生,从而加重对髓鞘及少突胶质细胞的破坏,是 EAE 发病的关键致病因子之一^[16]。与 IFN- γ 相反,IL-4 主要促进 Th2 的分化,IFN- γ 与 IL-4 之间的平衡对 Th0 分化成 Th1 或 Th2 起关键调控作用。TNF- α 是 EAE 中另一种重要炎性介质,它多由巨噬细胞产生,不仅能刺激巨噬细胞释放炎性介质,对髓鞘也具有毒性作用。临床研究表明,MS 患者的血清和脑脊液中 TNF- α 水平升高,且与临床病程和血脑屏障的受损程度密切相关^[17]。MMPs 是一组锌钙依赖性蛋白水解酶,其家族中的 MMP-9 与 MS 及 EAE 发病密切相关,MMP-9 表达于 Th1 细胞,能增加 Th1 细胞的迁徙能力^[18],对 MS 早期发病机制中 CNS 的免疫细胞增多具有重要调节作用。研究发现,EAE 鼠中 MMP-9 表达异常活跃,酶的活性明显增加,有损坏血脑屏障、降解髓鞘和破坏轴索的作用^[19-20]。本实验发现发病高峰期后,EAE 小鼠临床症状逐渐缓解,随之脑和脊髓组织中 MMP-9、TNF- α 、IFN- γ 的含量逐渐减低,IL-4 逐渐增高,进一步说明了这些炎症因子与 EAE 的发生发展密切相关,Th1/Th2 类细胞因子的失衡是 EAE 发病的重要免疫机制。用雷洛昔芬治疗的 EAE 小鼠,脑和脊髓组织中 MMP-9、TNF- α 、IFN- γ 的表达量较对照组降低,IL-4 增高。这一结果似乎可以认为雷洛昔芬对 TNF- α 、IFN- γ 的免疫抑制作用其实是雷洛昔芬对 Th1 型免疫反应的抑制。由此推断,雷洛昔芬可能对 CD4⁺T 细胞分化进行调节,抑制 Th1 型反应,促使 Th1 向 Th2 转变,IL-4 增加。同时雷洛昔芬能够影响 MMP-9 的生成,保护血脑屏障,减少 EAE 炎症细胞进入 CNS,这些可能是雷洛昔芬对 EAE 发挥免疫调节的重要机制。

综上,雷洛昔芬可抑制 EAE 的发病,其免疫抑制机制并不是单一的,而是多因素多途径的。本实验应用雷洛昔芬治疗 EAE,希望能为今后临床应用雷洛昔芬辅助治疗 MS 等 CNS 自身免疫性疾病提供实验依据。

[参 考 文 献]

[1] Niino M, Hirotani M, Fukazawa T, Kikuchi S, Sasaki H. Estrogens as potential therapeutic agents in multiple sclerosis[J]. Cent Nerv Syst Agents Med Chem, 2009, 9: 87-94.

[2] Bebo B F Jr, Dehghani B, Foster S, Kurniawan A, Lopez F J, Sherman L S. Treatment with selective estrogen receptor modulators regulates myelin specific T-cells and suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. Glia, 2009, 57: 777-790.

[3] 胡 晓,袁 军,万 兴,娄 磊,王建怡. 实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠模型的建立及其病理学和影像学表现[J]. 贵阳医学院学报, 2009, 34: 78-83.

[4] Tapia-Gonzalez S, Carrero P, Pernia O, Garcia-Segura L M, Diz-Chaves Y. Selective oestrogen receptor (ER) modulators reduce microglia reactivity *in vivo* after peripheral inflammation; potential role of microglial ERs[J]. J Endocrinol, 2008, 198: 219-230.

[5] Legge K L, Min B, Bell J J, Caprio J C, Li L, Gregg R K, et al. Coupling of peripheral tolerance to endogenous interleukin 10 promotes effective modulation of myelin-activated T cells and ameliorates experimental allergic encephalomyelitis [J]. J Exp Med, 2000, 191: 2039-2052.

[6] 王顺和. 脱髓鞘病变中轴突损伤的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30: 386-389.

[7] Cerciat M, Unkila M, Garcia-Segura L M, Arevalo M A. Selective estrogen receptor modulators decrease the production of interleukin-6 and interferon-gamma-inducible protein-10 by astrocytes exposed to inflammatory challenge *in vitro* [J]. Glia, 2010, 58: 93-102.

[8] Sheldahl L C, Marriott L K, Bryant D M, Shapiro R A, Dorsa D M. Neuroprotective effects of estrogen and selective estrogen receptor modulators begin at the plasma membrane[J]. Minerva Endocrinol, 2007, 32: 87-94.

[9] Bartosik-Psujek H, Stelmasiak Z. Biochemical markers of damage of the central nervous system in multiple sclerosis[J]. Ann Univ Mariae Curie Skłodowska Med, 2001, 56: 389-392.

[10] Deloire-Grassin M S, Brochet B, Quesson B, Delalande C, Dousset V, Canioni P, et al. *In vivo* evaluation of remyelination in rat brain by magnetization transfer imaging[J]. J Neurol Sci, 2000, 178: 10-16.

[11] Zhang J, Weiner H L, Hafler D A. Autoreactive T cells in multiple sclerosis[J]. Int Rev Immunol, 1992, 9: 183-201.

[12] Suryani S, Sutton I. An interferon-gamma-producing Th1 subset is the major source of IL-17 in experimental autoimmune encephalitis[J]. J Neuroimmunol, 2007, 183(1-2): 96-103.

[13] Chitnis T, Khoury S J. Cytokine shifts and tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. Immunol Res, 2003, 28: 223-239.

[14] McGeachy M J, Anderton S M. Cytokines in the induction and resolution of experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. Cytokine, 2005, 32: 81-84.

[15] Butti E, Bergami A, Recchia A, Brambilla E, Del Carro U, Amadio S, et al. IL4 gene delivery to the CNS recruits regulatory T cells and induces clinical recovery in mouse models of multiple sclerosis[J]. Gene Ther, 2008, 15: 504-515.

[16] Monteiro de Castro G, Eduarda Zanin M, Ventura-Oliveira D, Aparecida Vilella C, Ashimine R, de Lima Zollner R. Th1 and Th2 cytokine immunomodulation by gangliosides in experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. Cytokine, 2004, 26: 155-163.

[17] Sonobe Y, Jin S, Wang J, Kawanokuchi J, Takeuchi H, Mizuno T, et al. Chronological changes of CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets in the experimental autoimmune encephalomyelitis, a mouse model of multiple sclerosis[J]. Tohoku J Exp Med, 2007, 213: 329-339.

[18] Abraham M, Shapiro S, Karni A, Weiner H L, Miller A. Gelatinases (MMP-2 and MMP-9) are preferentially expressed by Th1 vs Th2 cells[J]. J Neuroimmunol, 2005, 163(1-2): 157-164.

[19] Fainardi E, Castellazzi M, Bellini T, Manfrinato M C, Baldi E, Casetta I, et al. Cerebrospinal fluid and serum levels and intrathecal production of active matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) as markers of disease activity in patients with multiple sclerosis[J]. Mult Scler, 2006, 12: 294-301.

[20] Kurzepa J, Bartosik-Psujek H, Suchozebrska-Jesionek D, Rejdak K, Stryjecka-Zimmer M, Stelmasiak Z. [Role of matrix metalloproteinase in the pathogenesis of multiple sclerosis][J]. Neurol Neurochir Pol, 2005, 39: 63-67.

[本文编辑] 孙 岩