

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

楼之茵¹, 程洁¹, 李琳¹, 陈伟¹, 王晓蓉¹, 浦政¹, 刘振国^{1*}, 肖保国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. 复旦大学附属华山医院神经病学研究所, 上海 200040)

摘要:【目的】观察大麻素 1 型受体(CB1R)在 C57B/L6 小鼠神经元和胶质细胞的表达及其在实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)小鼠中枢神经系统(CNS)和外周免疫器官的动态变化及其作用。【方法】取 C57B/L6 胎鼠的海马培养神经元及新生 C57B/L6 新生小鼠的皮层培养星形胶质细胞和小胶质细胞, 观察 CB1R 蛋白的表达; 观察正常对照、完全弗氏佐剂、EAE 和特异性 CB1R 抑制剂(SR141716A, SR1)干预组小鼠的神经功能缺损症状和体质量变化; 用 real time PCR 检测 CB1R mRNA 表达; Western blot 和荧光免疫组织化学法检测 CB1R 蛋白表达; 用 ELISA 法检测细胞因子 IL-1 β 、IL-4、IL-10、IL-17、IL-6、TNF- α 、IFN- γ 浓度的变化。【结果】①C57B/L6 小鼠神经元和小胶质细胞表达 CB1R, 星形胶质细胞不表达 CB1R。②EAE 小鼠神经元 CB1R 的表达显著低于 CFA 小鼠($P < 0.01$), 小胶质细胞 CB1R 的表达显著高于 CFA 小鼠($P < 0.01$)。EAE 小鼠脾脏中 CB1R 的表达与相同时点 CFA 小鼠无显著性差异($P > 0.05$)。③SR1 干预促进 EAE 早发, 上调 EAE 小鼠 CNS 和脾脏抗原特异性 T 细胞 IL-17、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的表达($P < 0.05$)。【结论】①神经元和小胶质细胞表达 CB1R。②EAE 小鼠脾脏中 CB1R 显著升高没有疾病特异性, 可能与非特异性免疫激活有关。③中枢神经细胞上的 CB1R 可能兼有神经保护和免疫调节双重作用, 参与 EAE 的发生和发展。

关键词: 大麻素 1 型受体; 神经元; 星形胶质细胞; 小胶质细胞; 实验性自身免疫性脑脊髓炎; 免疫调节

中图分类号: R744.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2014)06-0814-09

Immunomodulation and Expression of Cannabinoid 1 Receptor on Development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Mice

LOU Zhi-yin¹, CHENG Jie¹, LI Lin¹, CHEN Wei¹, WANG Xiao-rong¹, PU Zheng¹, LIU Zhen-guo^{1*}, XIAO Bao-guo²

(1. Department of Neurology, Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200092, China; 2. Institute of Neurology, Fudan University, Shanghai 200040, China)

Abstract: 【Objective】To explore the cellular distribution of cannabinoid 1 receptor (CB1R) in the central nervous system (CNS) of C57B/L6 mice. Detect the level of CB1R expression during experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). To study the immunomodulation of EAE by CB1R Antagonist. 【Methods】Prepared hippocampal neurons from C57B/L6 mice embryos (E18) and glia cells from C57B/L6 mice neonatal cortex (postnatal day 1). Mice were grouped randomly as normal group, complete Freund's adjuvant (CFA) group, EAE mice were grouped randomly as vehicle control group and CB1R antagonist (SR141716A, SR1) group. Clinical scores and body weight were recorded during the course of EAE. We detected the expression of CB1R by SYBR Green-based real time PCR, western-blot and immunostaining. The levels of cytokines (IL-1 β , IL-4, IL-10, IL-17, IL-6, TNF- α , and IFN- γ) were measured by ELISA. 【Results】CB1R was observed in neurons and microglia but barely detected in astrocytes. CB1R decreased significantly in neurons, while increased in microglia significantly. The level of CB1R expression in spleens did not show a significant difference compared with CFA-immunized mice. SR1 accelerates onset of EAE; SR1 up-regulated the expression of IL-17, TNF- α , IL-1 β and IL-6 in the CNS and the periphery. 【Conclusion】CB1R expressed in neurons and microglia. SR1 participate in the immune regulation in the CNS and the periphery. CB1R could play a prominent role in neuroprotection and immunomodulation.

Key words: cannabinoid 1 receptor; neurons; astrocytes; microglia; experimental autoimmune encephalomyelitis; immunomodulation

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2014, 35(6):814-822]

收稿日期: 2014-08-13

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(81200921)

作者简介: 楼之茵, 博士, 主治医师, E-mail: louzhiyin2003@163.com; * 通信作者: 刘振国, 博士生导师, 主任医师, 教授, E-mail: zhenguoliu2013@126.com

内源性大麻素系统(endocannabinoids system, ECS)主要包括三大成员:内源性大麻素、调节内源性大麻素合成与失活的相关蛋白与酶类和大麻素受体(cannabinoid receptor, CBR)^[1]。上世纪90年代,大麻素1型受体(cannabinoid 1 receptor, CB1R)和大麻素2型受体(cannabinoid 2 receptor, CB2R)被成功克隆^[2],尽管可能还存在其他受体亚型,但大麻素效用的发挥主要通过CB1R和CB2R实现^[1,3-4]。近年来,无论体外实验、动物实验还是临床研究均显示,内源性大麻素系统的失衡与多发性硬化的发生发展有关^[5-9]。因此,内源性大麻素系统在多发性硬化(multiple sclerosis, MS)中的作用,逐渐成为新的研究热点。鉴于CB1R在实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)发生发展中的作用尚缺乏系统而全面研究。本研究采用体外和体内实验,分别检测中枢神经细胞和外周免疫器官CB1R的表达,CB1R在EAE小鼠病程中的动态变化及其对细胞因子分泌的影响,旨在阐明CB1R的组织/细胞分布及其在EAE发生发展中作用。

1 材料和方法

1.1 皮层神经元原代培养和鉴定

无菌条件下取C57B/L6胎鼠,分离海马组织,轻吹打成单细胞悬液,洗涤后用神经元完全培养液(Gibco)重悬。按 10^6 /mL密度接种于多聚L-赖氨酸(Sigma)预处理的培养板中。置37℃,体积分数为5%的CO₂饱和湿度的培养箱中,每3d换液;7d后使用小鼠抗MAP-2单克隆抗体(CHEMICON)和Hoechst33342(Sigma)染色,鉴定神经元纯度大于98%。

1.2 原代胶质细胞培养和鉴定

无菌条件下取新生C57B/L6小鼠(<24h)大脑,剥除脑膜及血管,吹打成单细胞悬液,洗涤后DMEM完全培养液(Gibco)重悬,置37℃,体积分数为5%CO₂饱和湿度培养箱培养。9d后洗涤贴壁细胞、胰酶消化,100 mL/L胎牛血清中止消化,调整细胞密度接种,细胞贴壁稳定24h后使用小鼠抗GFAP抗体(CHEMICON)和Hoechst33342染色,鉴定星形胶质细胞纯度大于98%。与星形胶质细胞共培养第12天镜下可见星形胶质细胞上单层生长的密集小胶质细胞。将小胶质细胞振摇后

贴壁,使用F4/80(Invitrogen)和Hoechst33342染色,鉴定小胶质细胞纯度大于95%。

1.3 EAE小鼠构建

1.3.1 实验动物和试剂 健康雌性C57B/L6小鼠,10周龄,体质量22~25g(上海斯莱克实验动物有限公司)。MOG₃₅₋₅₅/MBP₆₈₋₈₆肽段(北京联科生物公司),Mycobacterium Tuberculosis H37Ra(DIFCO),Pertussis Toxin(List Biology Laboratory 惠赠),complete Freund's adjuvant(Sigma)。

1.3.2 MOG₃₅₋₅₅抗原混悬液制备 MOG₃₅₋₅₅肽段3mg,溶于1mL PBS(3mg/mL);3mg TB溶于1mL完全弗氏佐剂(4mg/mL);针管混合器将等体积两种溶液充分混合,制成油包水乳白色混悬液。

1.3.3 EAE小鼠模型 于C57B/L6小鼠背部脊柱两侧4点皮下注射MOG₃₅₋₅₅抗原混悬液(200μL/只),尾静脉予PTX 2μg/mL,48h后PTX加强免疫。

1.3.4 CFA小鼠模型 3mg TB溶于1mL完全弗氏佐剂,1mL PBS取代MOG₃₅₋₅₅;制成CFA混悬液并按上述EAE制模方法处理小鼠。

1.3.5 EAE小鼠症状评估 每天记录小鼠体质量,评估临床症状,标准如下: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。

1.3.6 EAE+SR141716A(Cayman)干预组 分别于免疫当天,免疫后第4、7、11、15、19、23、27天,腹腔注射(每次0.1mL):SR141716A 3mg/kg、vehicle 50%PBS+50%DMSO。

1.4 q-PCR法分析CB1R mRNA表达

总RNA提取采用TRIZOL(Invitrogen)试剂。依照gene bank提供的小鼠CBR cDNA序列和β-actin cDNA序列,使用Primer Premier 5.0软件设计引物。CB1R引物:上游序列5'-CTG GAA CTG CAA GAA GCT -3',下游序列5'-GCC CCA GCA GAT GAT CAA CAC C -3',扩增长度:310 bp;β-actin引物:上游序列5'-AGC CAT GTA CGT AGC CAT CC -3',下游序列5'-CTC TCA GCT GTG GTG GTG AA -3',扩增长度:228 bp。cDNA合成应用逆转录试剂盒(TaKaRa)。应用Sybr Premix Ex Taq™(TaKaRa)扩增组织样本cDNA。反应条件:95℃ 90s,58℃ 90s,72℃ 120s,循环40次。以参照基因作为标准进行相对定量,采用ΔCT法

分析各组 CB1R 基因表达的相对比率。

1.5 Western-blot 法分析 CB1R 蛋白表达水平

细胞膜蛋白采用成分蛋白抽提试剂盒 (Millipore) 抽提, BCA 法定量。电泳的膜蛋白量 30 μg , 用 12% SDS-PAGE 不连续凝胶电泳分离后电转至 PVDF 膜上, 按常规方法进行封闭、洗膜、一抗、二抗作用后, 使用 Odyssey 近红外双色激光成像系统扫描获取相应 WB 谱带光密度值, CB1R 表达以 CB1R 与 GAPDH 整合光密度比值表示。

1.6 免疫荧光法检测细胞表达的 CB1R

1.6.1 脑冰冻切片制备 实验动物充分麻醉后使用 40 g/L 多聚甲醛固定至全身僵直, 脑组织经脱水, OCT 液氮包埋, 脑片 DG 区 5 μm 厚度作冰冻连续切片, 备用。

1.6.2 免疫荧光双标染色 常规方法将固定好的细胞玻片及组织切片洗涤、封闭后, 分别滴加一抗 (抗 CB1R 多克隆抗体, 抗 NeuN 多克隆抗体, 抗 GFAP 单克隆抗体, 抗 F4/80 多克隆抗体) 和相应荧光二抗, 作用充分后洗涤, 50% 甘油封片。

1.6.3 免疫阳性细胞计数 使用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析免疫荧光图像, 分别计数 5 张连续冠状位切片不同亚区 100 μm^2 面积中的免疫阳性细胞数, 每张切片上随机选取 5 个高倍视野, 取均值作为海马切片不同亚区单位面积中的阳性细胞数。皮质扣带回区分别计数 NeuN 免疫阳性和 NeuN/CB1R 免疫双阳性神经元; 齿状回 CA3 亚区分别计数 GFAP 免疫阳性和 GFAP/CB1R 免疫双阳性星形胶质细胞; 海马伞区分别计数 F4/80 免疫阳性和 F4/80 /CB1R 免疫双阳性小胶质细胞; 结果以双阳性细胞数占视野总细胞数的百分数表示。

1.7 酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测细胞因子的变化

在相应时点取不同组别 EAE 小鼠的脑和脊髓, 称取 80 mg 组织 (湿重), 冰浴条件下抽提组织胞浆蛋白 (millipore); 提取脾脏单个核细胞 ($6 \times 10^5/200 \mu\text{L}/\text{孔}$), 分别加入 MOC₃₅₋₅₅ 和 MBP₆₈₋₈₆ (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中孵育 48 h 后, 取上清液, 用 ELISA 法检测细胞因子 IL-1 β (invitrogen), IL-4、IL-10、IL-17 (eBioscience inc), IL-6、TNF- α 、IFN- γ (Pepro tech Inc) 的浓度。

1.8 统计学分析

使用 GraphPad Prism 4 统计处理数据。计量资料用 F 检验进行两样本方差齐性检验, 样本符合正态分布且方差齐时, 两组均数比较采用 t 检验, 数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示; 方差不齐时, 采用校正 t' 检验; 非计量资料采用多因素方差分析 (ANOVA), $P \leq 0.05$ 被认为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 小鼠原代神经元和胶质细胞培养和鉴定

原代神经元进行 MAP-2 和 Hoechst33342 双染, 纯度达 98% (图 1A)。星形胶质细胞行 GFAP 和 Hoechst33342 双染, 纯度达 98% (图 1B)。小胶质细胞行 F4/80 和 Hoechst33342 双染, 纯度达 95% 以上 (图 1C)。

2.2 神经元和胶质细胞 CB1R mRNA 和蛋白水平的表达

RT-PCR 和 Western-blot 结果显示: 原代培养的静息态神经元和小胶质细胞表达 CB1R; 原代培养的静息态星形胶质细胞未检测到 CB1R 的表达 (图 2)。

2.3 CB1R 在正常小鼠脑内的细胞分布

选择皮质扣带回观察计数神经元; 海马 CA3

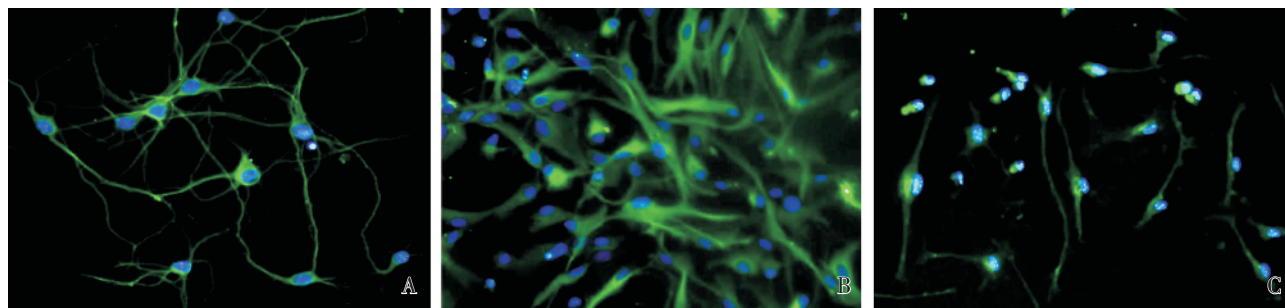


图1 小鼠原代神经元和胶质细胞鉴定

Fig.1 Identification of neurons and glial cells

A: primary neurons; B: astrocytes; C: microglia. 400 $\times$

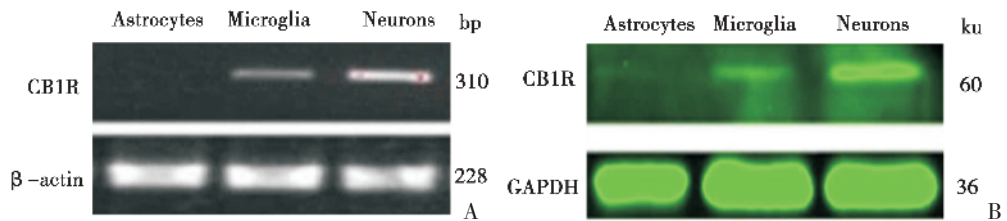


图 2 CB1R 在原代星形胶质细胞小胶质细胞和神经元上的表达
Fig.2 Expression of CB1R in primary cultured astrocytes, microglia, and neurons
A:mRNA ;B:protein

区观察计数星形胶质细胞；海马伞区观察计数小胶质细胞(图 3)。NeuN 标记神经元,GFAP 标记星形胶质细胞,F4/80 标记小胶质细胞。免疫组化结果显示，正常脑内神经元和小胶质细胞表达 CB1R,星形胶质细胞不表达 CB1R(图 4)。

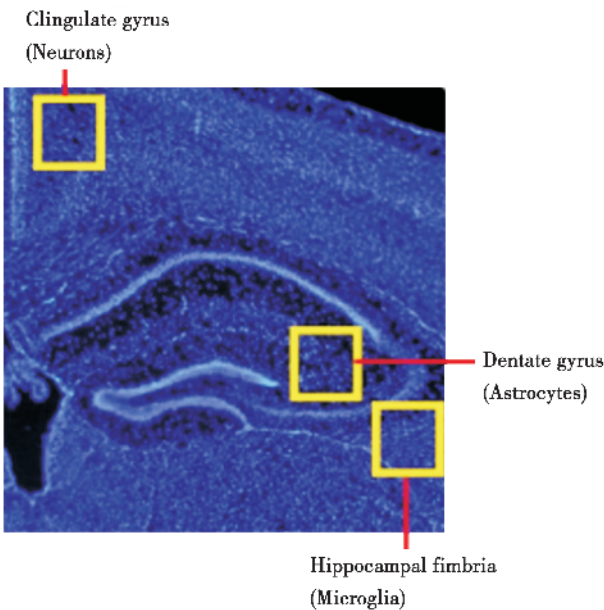


图 3 脑片海马区域神经元与胶质细胞
荧光染色的定位图示($\times 400$)
Fig.3 Location of immunofluorescence staining for neurons, microglia, and astrocytes in brain slides($\times 400$)

2.4 溶剂对照组和 SR1 干预组 EAE 小鼠病程中
体质量与神经功能缺损评分的变化

与相同时点的溶剂对照组相比,SR1 干预的 EAE 小鼠从免疫后第 5 天起,神经功能缺损评分显著升高 ($P < 0.01$),说明 SR1 干预加重免疫反应,促进 EAE 早发。但从免疫后第 13 天起,两组神经功能缺损评分无显著性差异 ($P > 0.05$,图

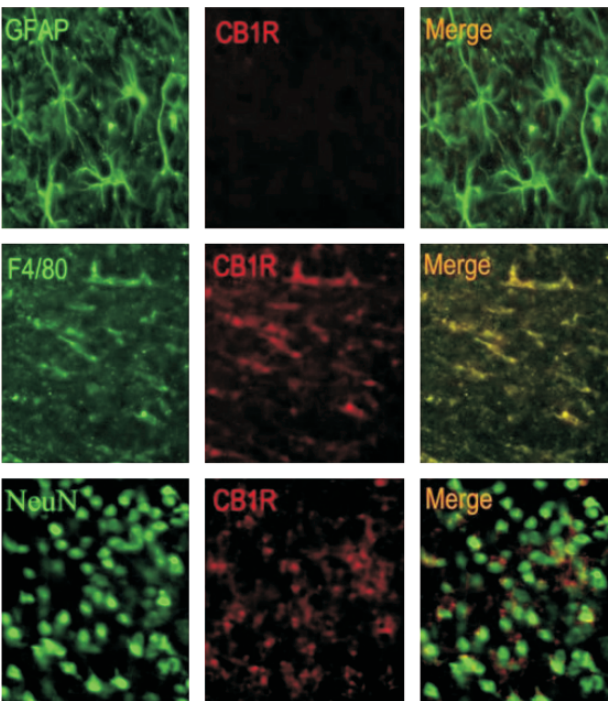


图 4 正常脑 GFAP、F4/80 和 NeuN 与 CB1R 的免疫荧
光双染
Fig.4 Immunofluorescence double staining of GFAP/
CB1R, F4/80/CB1R, and NeuN/CB1R in healthy mice
($\times 400$)

5A)。与相同时点的溶剂对照组相比,SR1 干预的 EAE 小鼠从免疫后第 6 天起体质量显著降低($P < 0.05$,图 5B)。

2.5 CB1R 在 CFA 与 EAE 小鼠脑内细胞分布的
动态变化

EAE 小鼠神经元和小胶质细胞 CB1R 的动态变化:CB1R 主要表达在神经元,小胶质细胞少量表达,比较于相同时点的 CFA 组,EAE 小鼠神经元 CB1R 的阳性细胞百分数显著降低($P < 0.05$,图 6、8),小胶质细胞 CB1R 的阳性细胞百分数显著

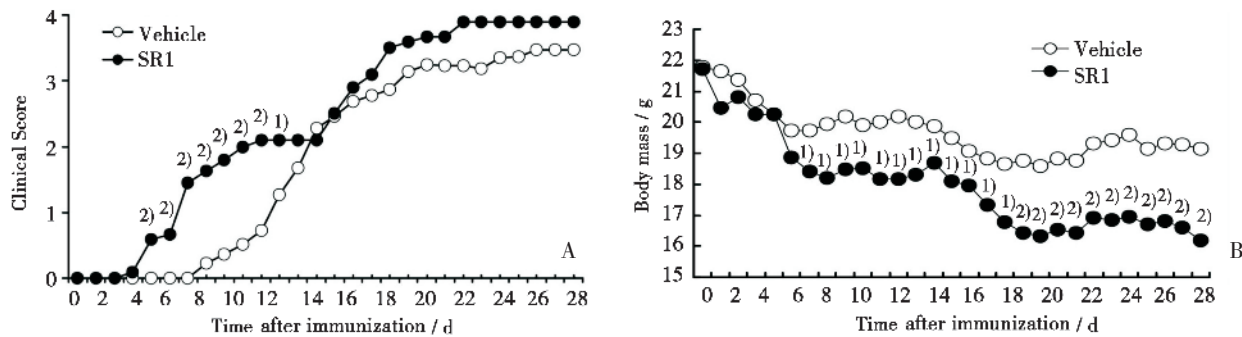


图 5 不同组别小鼠神经功能缺损评分变化(A)和体质量变化(B)

Fig.5 Clinical score (A) and body weight (B) in EAE treated with SR141716A and vehicle

1) $P < 0.05$ vs vehicle mice, 2) $P < 0.01$ vs vehicle mice

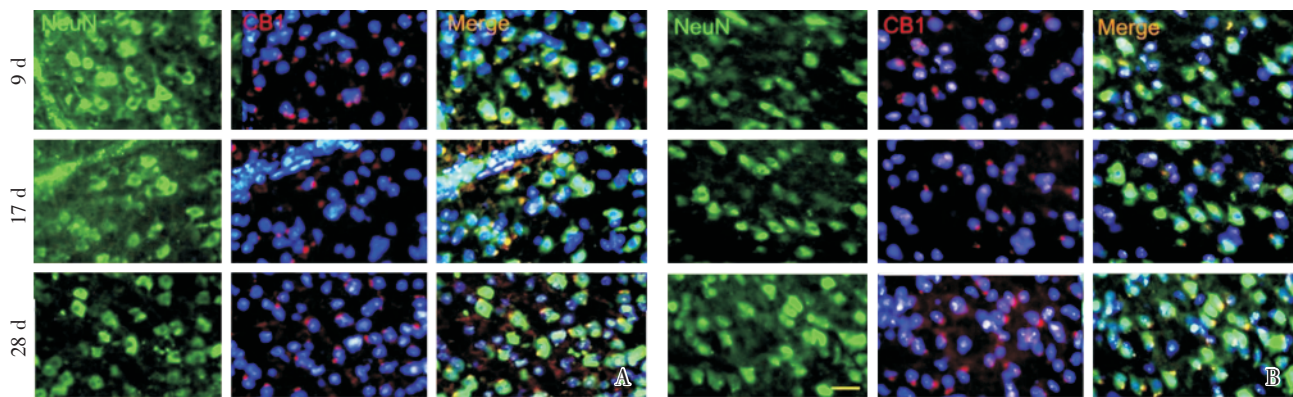


图 6 免疫荧光双染 CFA 和 EAE 小鼠脑 NeuN 与 CB1R 的动态变化

Fig.6 Immunofluorescence double staining of CB1R on neurons of CFA and EAE mice

The immunodouble staining of CB1R/NeuN in cingulated gyrus. Scale bars = 20 μm

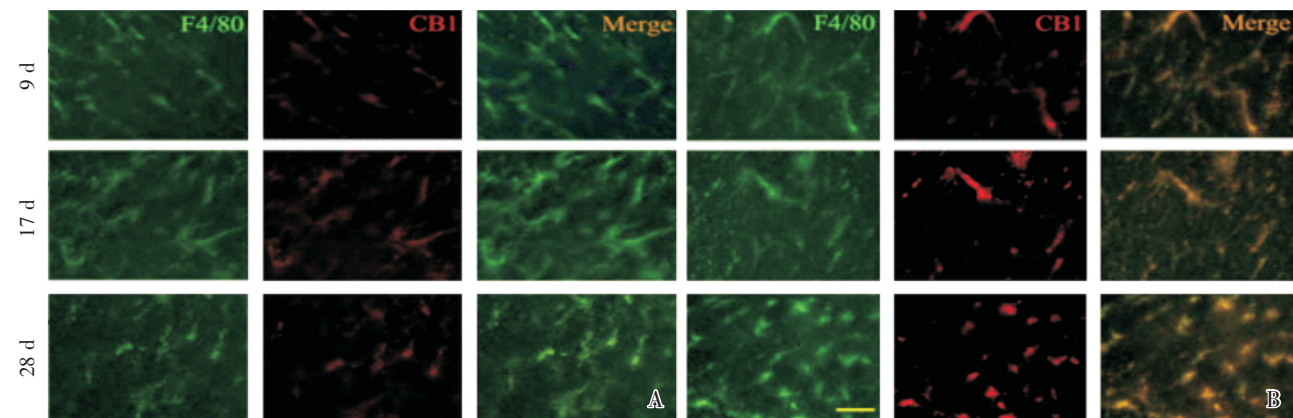


图 7 免疫荧光双染 CFA 和 EAE 小鼠脑 F4/80 和 CB1R 的动态变化

Fig.7 Immunofluorescence double staining of CB1R on microglia of CFA and EAE mice

The immunodouble staining of CB1R/F4/80 in hippocampal fimbria. A: CFA, B: EAE. Scale bars = 20 μm

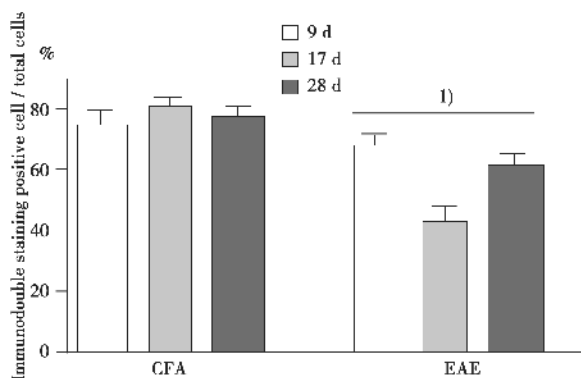


图 8 CFA 和 EAE 小鼠 NeuN 与 CB1R 的免疫双阳性细胞百分数

Fig.8 The percentage of the immunodouble staining positive cells of CB1R/NeuN in cingulate gyrus

1) $P < 0.01$ vs. CFA mice

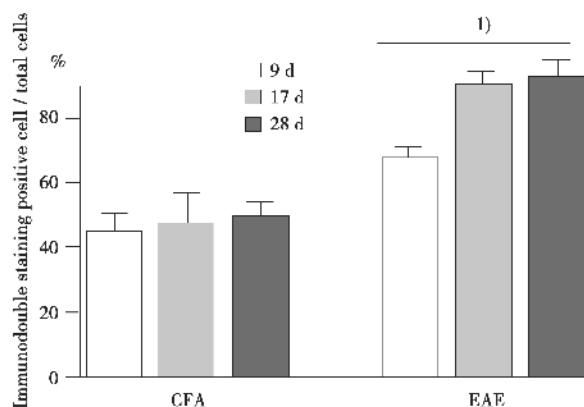


图 9 CFA 和 EAE 小鼠 F4/80 与 CB1R 的免疫双阳性细胞百分数

Fig.9 The percentage of the immunodouble staining positive cells of CB1R/F4/80 in hippocampal fimbria

1) $P < 0.001$ vs. CFA mice

升高 ($P < 0.05$, 图 7、9)。

2.6 CB1R 在 CFA 与 EAE 小鼠脊髓与脾脏组织的动态变化

CFA 和 EAE 小鼠脊髓组织 CB1R mRNA 和蛋白在各时点的表达均显著低于正常对照组 ($P < 0.01$)。EAE 小鼠脊髓 CB1R mRNA 和蛋白的表达在免疫后第 9、17、28 天分别显著低于 CFA 小鼠 ($P < 0.01$, 图 10A)。

CFA 和 EAE 小鼠 CB1R mRNA 和蛋白在各时点的表达均显著高于正常对照组 ($P < 0.01$)。EAE 小鼠 CB1R mRNA 和蛋白的表达在免疫后第 9、17、28 天分别与 CFA 小鼠无显著差异 ($P > 0.05$, 图 10B)。

2.7 SR1 对细胞因子网络的调节作用

使用 SR141716A 干预的 EAE 小鼠在发病高峰期和缓解期,脑(A)、脊髓(B)和脾脏单个核细胞(C)中 Th1、Th17 的表达水平显著高于溶剂对照组 ($P < 0.05$),而 Th2 细胞因子的表达水平显著低于溶剂对照组 ($P < 0.05$, 图 11)。

3 讨论

近年来研究发现,内源性大麻素系统在众多神经系统疾病,尤其在神经变性病中发挥神经保护和免疫调节的重要作用^[10-11]。由于内源性大麻素的合成和降解迅速,有关大麻素受体功能的调节在疾病治疗中的潜在作用成为研究的热点和难点^[12]。目前,CB1R 在正常小鼠神经细胞及外周组

织的表达情况知之甚少。本研究发现:正常小鼠脑内 CB1R 主要表达于神经元,小胶质细胞少量表达,星形胶质细胞不表达 CB1R,与国外的研究发现相似^[13-15]。

虽然有学者在 MS 患者的病理组织上看到了 CB1R 表达在皮层的神经元,少突胶质细胞,小胶质细胞和浸润的巨噬细胞与 T 淋巴细胞上^[16]。但目前尚未有动态观察 CB1R 变化与 MS 的关系,为了模拟在 MS 患者体内观察 CB1R 的动态变化,我们建立 EAE 模型,结果发现: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 CB1R 的阳性细胞百分数显著增加,Berretero 等^[17]也曾在 EAE 发病高峰期观察到基底核和皮层中 CB1R 表达下调。鉴于神经元表达的 CB1R 占绝对优势,EAE 病程中神经元 CB1R 的表达减少与神经功能缺损症状加重呈正相关,我们推测,神经元和小胶质细胞表达的 CB1R 可能发挥不同的作用。在对 CB1R^{-/-}基因敲除小鼠的研究中发现,EAE 症状恶化迅速,更易发生神经微丝的损伤和诱导细胞凋亡启动的 caspase 3 相对增加^[18],且 CB1R^{-/-}基因敲除的 EAE 小鼠轴索病理变化出现较早,受 1 次攻击所致的残障水平相当于野生型受 3~4 次攻击的效果^[19]。1 位 46 岁女性在应用 CB1R 拮抗剂(rimonabant)治疗肥胖症后出现 MS 的表现,中断治疗后数周其症状基本消失^[20]。近期有研究发现 MS 患者 CB1R 基因若存在长 AAT 重复序列,会导致更严重的神经白质损伤和神经元

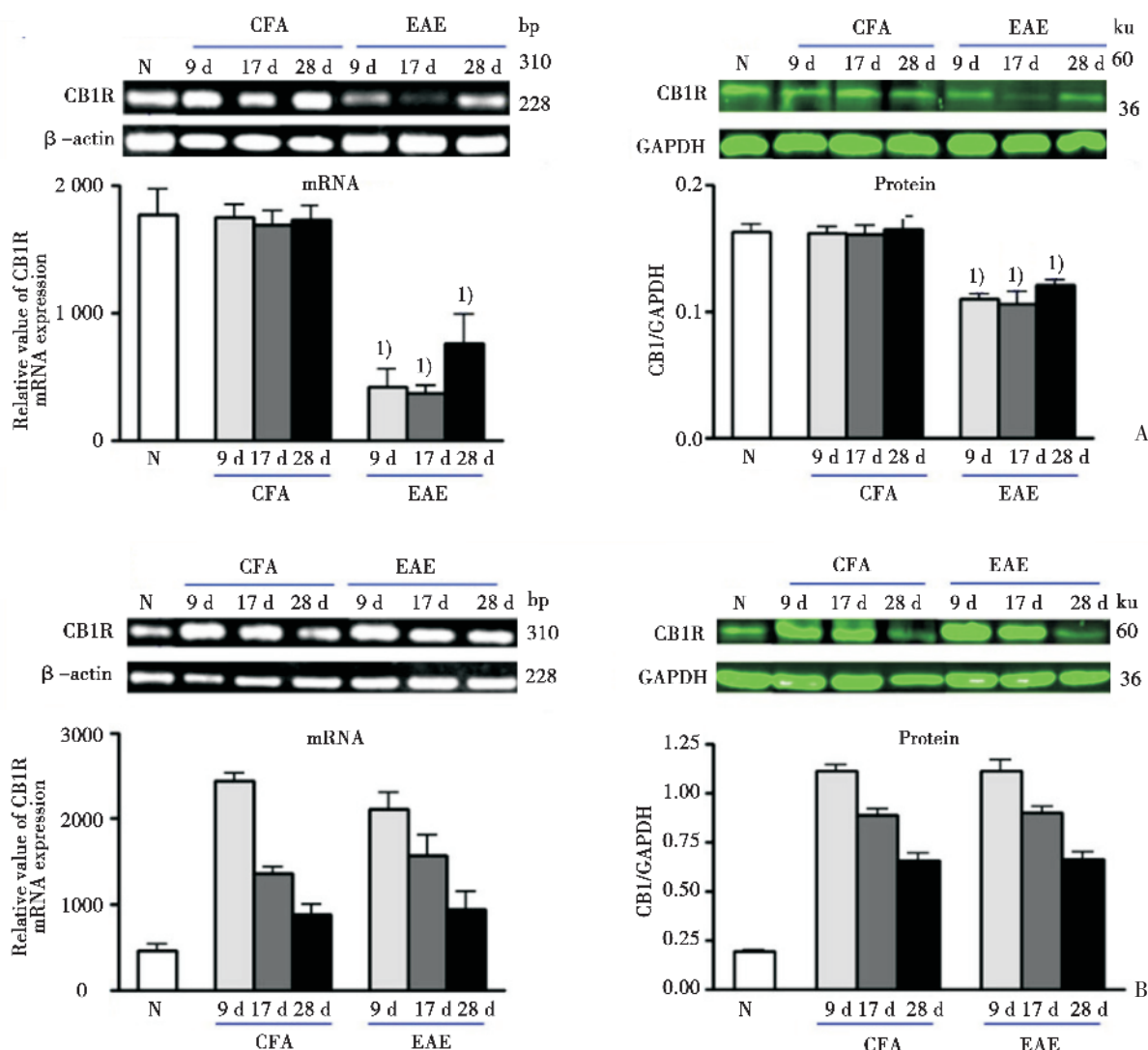


图 10 CFA 和 EAE 小鼠 CB1R 在 CNS 和外周免疫器官的动态表达

Fig.10 Dynamic change of CB1R expression during EAE

A: Expression of CB1R mRNA and protein in spinal cords; B: Expression of CB1R mRNA and protein in spleens

变性^[21]。上述证据都提示体内存在由 CB1R 介导的内源性神经保护机制。

小胶质细胞是脑内的主要免疫效应细胞。脑细胞损伤后小胶质细胞迅速活化和增殖,发挥吞噬效应,通过产生神经毒性分子和神经营养因子发挥双重作用^[22]。我们的实验发现:正常小鼠冰冻脑片中,静止的小胶质细胞呈分枝状生长,胞体小,EAE 小鼠发病高峰期小胶质细胞激活,突起回缩、胞体增大乃至巨噬细胞样,其 CB1R 阳性细胞百分数也以时间依赖的方式增多。这些结果提示 CB1R 可能通过影响小胶质细胞在“致炎”与“抗炎”之间的功能转换,进而发挥免疫调节作用。在外周免疫器官脾脏中,CB1R 的表达在免疫后第 9

天就显著高于正常对照组,并以时间依赖的方式递减,但与相同时点的 CFA 组相比差异无统计学意义。该结果提示脾脏中 CB1R 水平的增加可能没有 EAE 疾病特异性,而是与免疫介导的非特异性免疫激活有关。EAE 小鼠神经元和小胶质细胞上 CB1R 的动态表达变化,究竟提示 CB1R 在免疫调节和神经保护中发挥怎样的作用?与细胞因子网络的平衡存在怎样的关系?我们进一步检测了特异性 CB1R 抑制剂 (SR141716A, SR1) 干预的 EAE 小鼠脑和脊髓组织以及脾脏自发性和抗原特异性 T 细胞培养上清液中细胞因子的浓度变化。结果显示,SR1 干预的 EAE 小鼠,脊髓 IL-17、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的浓度较相同时点的溶剂对照组

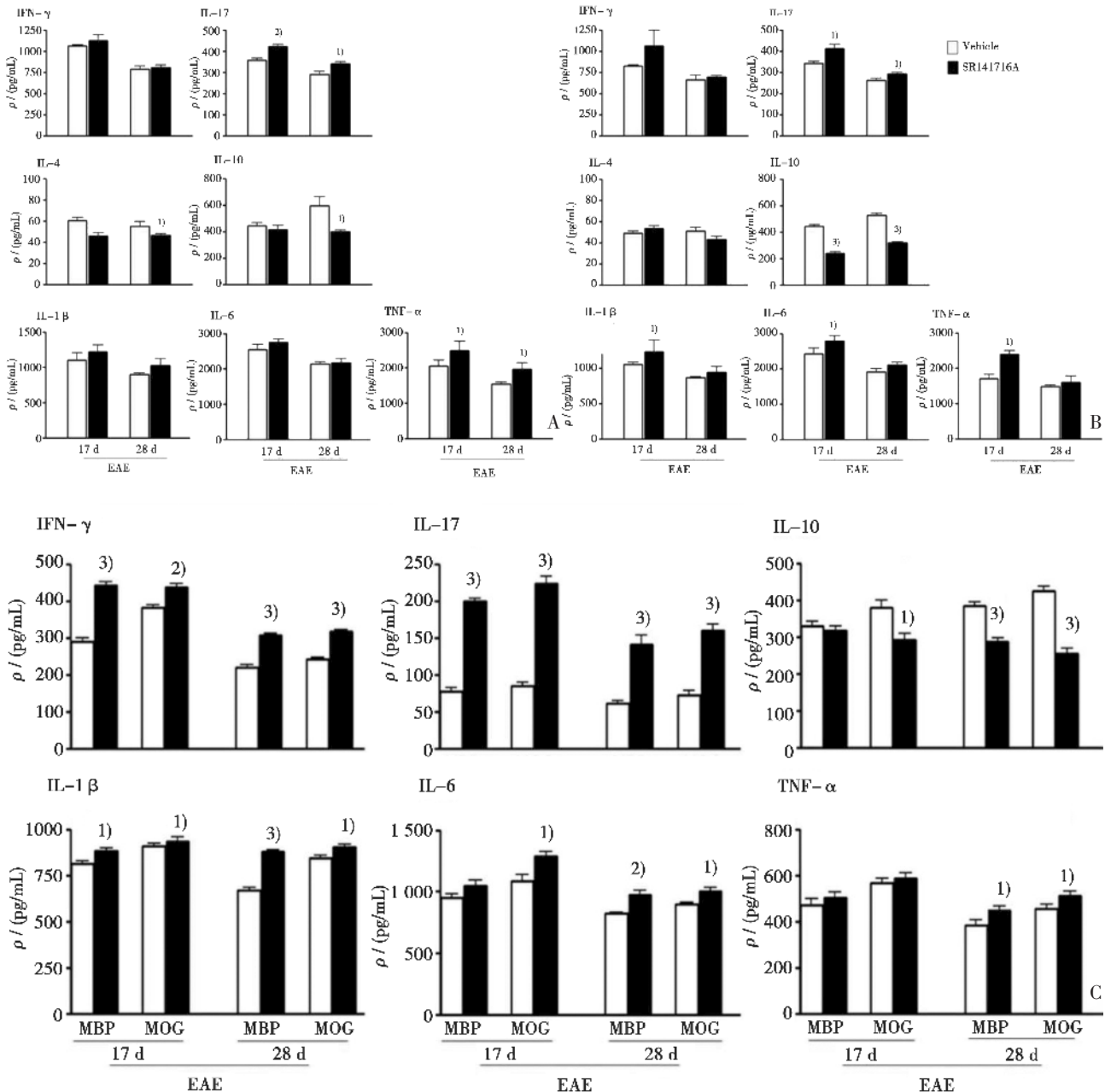


图 11 SR141716A 对脑、脊髓和脾脏单核细胞分泌细胞因子的动态调节

Fig.11 SR141716A modulates the levels of cytokines and chemokines in brains, spinal cords and in spleens at different time-points of EAE development

A: Brains; B: Spinal cords; C: Spleen. 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$, 3) $P < 0.001$ vs. vehicle.

显著升高, IL-10 产生则显著降低, IFN- γ 的变化无显著性差异; 脾脏自发性/抗原特异性 T 细胞培养上清液中上述细胞因子的浓度变化也呈现相似的结果。显然, SR1 打破了 Th2 细胞因子与 Th1/Th17 细胞因子间的平衡, 使促炎因子增多。脑脊髓和脾脏自发性/抗原特异性 T 细胞培养上清液中细胞因子的变化提示 SR1 诱导 EAE 小鼠的起病时间提前

以及加重早期神经功能缺损症状可能的分子机制有: ①激活 CNS 中小胶质细胞, 引发免疫级联瀑布效应, 导致神经元损伤和髓鞘的脱失; ②损伤的神经元使 CB1R 的保护作用进一步降低, 使 Th2 细胞因子向 Th1/Th17 细胞因子转化, 导致炎症因子 IL-6 和 TNF- α 显著增多, IL-10 显著降低。

综上所述, 中枢神经细胞上的 CB1R 可能兼

有神经保护和免疫调节双重作用,参与 EAE 的发生和发展。而 EAE 小鼠脾脏中 CB1R 的变化没有疾病特异性,可能与非特异性免疫激活有关。

参考文献:

- [1] Di Iorio G, Lupi M, Sarchione F, et al. The endocannabinoid system: a putative role in neurodegenerative diseases [J]. *Int J High Risk Behav Addict*, 2013, 2(3): 100–106.
- [2] Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, et al. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA[J]. *Nature*, 1990, 346(6284): 561–564.
- [3] Malfitano AM, Basu S, Maresz K, et al. What we know and do not know about the cannabinoid receptor 2 (CB2) [J]. *Semin Immunol*, 2014, 48(14): S1044–5323.
- [4] Crowe MS, Nass SR, Gabella KM, et al. The endocannabinoid system modulates stress, emotionality, and inflammation [J]. *Brain Behav Immun*, 2014, 72(14): S0889–1591.
- [5] Jawahar R, Oh U, Yang S, et al. A systematic review of pharmacological pain management in multiple sclerosis [J]. *Drugs*, 2013, 73(15): 1711–1722.
- [6] Pozzilli C. Advances in the management of multiple sclerosis spasticity: experiences from recent studies and everyday clinical practice [J]. *Expert Rev Neurother*, 2013, 13(12): 49–54.
- [7] Velayudhan L, Van Diepen E, Marudkar M, et al. Therapeutic potential of cannabinoids in neurodegenerative disorders: a selective review [J]. *Curr Pharm Des*, 2014, 20(13): 2218–2230.
- [8] Langford RM, Mares J, Novotna A, et al. A double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group study of THC/CBD oromucosal spray in combination with the existing treatment regimen, in the relief of central neuropathic pain in patients with multiple sclerosis [J]. *J Neurol*, 2013, 260(4): 984–997.
- [9] Pryce G, Baker D. Potential control of multiple sclerosis by cannabis and the endocannabinoid system [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2012, 11(5): 624–641.
- [10] Fowler CJ, Rojo ML, Rodriguez-Gaztelumendi A. Modulation of the endocannabinoid system: neuroprotection or neurotoxicity? [J]. *Exp Neurol*, 2010, 224(1): 37–47.
- [11] 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(1): 92–102.
- [12] Pertwee RG. Targeting the endocannabinoid system with cannabinoid receptor agonists: pharmacological strategies and therapeutic possibilities [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2012, 367(1607): 3353–3363.
- [13] Zhang H, Hilton DA, Hanemann CO, et al. Cannabinoid receptor and N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D --evidence for altered expression in multiple sclerosis [J]. *Brain Pathol*, 2011, 21(5): 544–557.
- [14] Coiret G, Ster J, Grewe B, et al. Neuron to astrocyte communication via cannabinoid receptors is necessary for sustained epileptiform activity in rat hippocampus [J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e37320.
- [15] Alkaitis MS, Solorzano C, Landry RP, et al. Evidence for a role of endocannabinoids, astrocytes and p38 phosphorylation in the resolution of postoperative pain [J]. *PLoS One*, 2010, 5(5): e10891.
- [16] Benito C, Romero JP, Tolon RM, et al. Cannabinoid CB1 and CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are specific markers of plaque cell subtypes in human multiple sclerosis [J]. *J Neurosci*, 2007, 27(9): 2396–2402.
- [17] Berrendero F, Sanchez A, Cabranes A, et al. Changes in cannabinoid CB (1) receptors in striatal and cortical regions of rats with experimental allergic encephalomyelitis, an animal model of multiple sclerosis [J]. *Synapse*, 2001, 41(3): 195–202.
- [18] Jackson SJ, Diemel LT, Pryce G, et al. Cannabinoids and neuroprotection in CNS inflammatory disease [J]. *J Neurol Sci*, 2005, 233(1–2): 21–25.
- [19] Pryce G, Ahmed Z, Hankey DJ, et al. Cannabinoids inhibit neurodegeneration in models of multiple sclerosis [J]. *Brain*, 2003, 126(10): 2191–2202.
- [20] van Oosten BW, Killestein J, Mathus-Vliegen EM, et al. Multiple sclerosis following treatment with a cannabinoid receptor-1 antagonist [J]. *Mult Scler*, 2004, 10(3): 330–331.
- [21] Rossi S, Bozzali M, Bari M, et al. Association between a genetic variant of type-1 cannabinoid receptor and inflammatory neurodegeneration in multiple sclerosis [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e82848.
- [22] Strachan-Whaley M, Rivest S, Yong VW. Interactions between microglia and T cells in multiple sclerosis pathobiology [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2014, 34(8): 615–622.

(编辑 徐杰)