MASM通过Wnt5a/FZD5途径调控星形胶质细胞活化抗多发性硬化症的机制研究

陈腾翔, 罗润永, 李世国, 黄益兴, 傅思凡, 李鑫炜, 林小婷, 胡若莹, 南丽红*, 陈亚萍*

(福建中医药大学药学院, 福建 福州 350122)

摘要: 通过采用髓鞘少突胶质细胞糖蛋白MOG_{35-55}多肽联合百日咳毒素建立实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)小鼠模型, 研究13-甲氨基-18-硫代苦参碱(MASM)对EAE小鼠的治疗作用及可能机制。采用Kono's 5分法进行神经功能评分, 将评分为0.5～3.5分的小鼠随机分为EAE组、MASM低、中、高剂量(1.5、3、6 mg·kg^{-1})及阳性对照组(芬戈莫德组, 1.0 mg·kg^{-1}), 另设一组正常对照组, 分组当天开始给药, 1次/天, 连续21天; HE染色观察小鼠脊髓组织的病理变化; 电镜法观察脊髓髓鞘超微结构的完整性; ELISA法检测血清中转化生长因子-β1 (TGF-β1)和单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1)的含量; qRT-PCR检测脊髓中抗原呈递相关基因*H2T23*的mRNA表达水平; 采用AutoDock软件对MASM和人卷曲同源物5 (FZD5)蛋白进行分子对接; Western blot法检测脊髓中胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、补体C3、糖蛋白无翅型小鼠乳房肿瘤病毒整合位点家族成员5a (Wnt5a)、FZD5、蛋白激酶Cα (PKCα)蛋白表达情况及糖原合成酶激酶3β (GSK3β)磷酸化水平。结果显示, MASM能明显改善EAE小鼠神经功能损伤及炎症细胞浸润、脊髓脱髓鞘等病理变化; 还可明显下调EAE小鼠脊髓中星形胶质细胞活化及A1表型标志物GFAP和C3蛋白、*H2T23* mRNA的表达水平($P < 0.05$, $P < 0.01$)。MASM与FZD5具有较强的结合能力, 并可明显下调EAE小鼠脊髓中Wnt5a、FZD5、PKCα蛋白的表达量及GSK3β的磷酸化水平($P < 0.05$, $P < 0.01$)。提示MASM可通过抑制AST活化及向A1型极化, 改善脊髓炎症反应和髓鞘脱失, 其作用与调控Wnt5a/FZD5途径的激活有关。动物实验经福建中医药大学动物伦理委员会批准(FJTCMIACUC 2023319)。

关键词: 多发性硬化症; 实验性自身免疫性脑脊髓炎; 13-甲氨基-18-硫代苦参碱; 星形胶质细胞; Wnt5a/FZD途径

中图分类号: R966 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870(2026)02-0515-08

The mechanism of MASM in treating multiple sclerosis by regulating astrocyte activation through Wnt5a/FZD5 pathway

CHEN Teng-xiang, LUO Run-yong, LI Shi-guo, HUANG Yi-xing, FU Si-fan, LI Xin-wei, LIN Xiao-ting, HU Ruo-ying, NAN Li-hong*, CHEN Ya-ping*

(*College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China*)

Abstract: This study systematically investigated the therapeutic mechanism of matrine derivative, (6*aS*,10*S*, 11*aR*, 11*bR*, 11*cS*) -10-methylaminododecahydro-3*a*, 7*a*-diaza-benzo (de) anthracene-8-thione (MASM), in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) through multi-dimensional analysis. The myelin oligodendrocyte glycoprotein MOG_{35-55}/pertussis toxin-induced EAE mouse model was established, and neurological impairment was confirmed using Kono's 5-point scoring system, mice with scores between 0.5 and

收稿日期: 2025-09-19; 修回日期: 2025-12-03.
基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (82204378); 福建中医药大学高层次人才科研启动项目 (X2019007-人才).
*通讯作者 E-mail: nlhong1152@163.com; zlchenyaping@126.com
DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-1123

3.5 were considered successful models. These mice were randomly divided into six groups: EAE control, MASM groups (1.5, 3 and 6 mg·kg^{-1}), a positive control group (fingolimod, 1.0 mg·kg^{-1}), and a normal control group. Drug administration was initiated on the day of grouping, once daily for 21 consecutive days. The Kono's score was used to evaluate the neurological function; HE staining and electron microscopy was used to observe the pathological changes of spinal cord; transforming growth factor-β1 and monocyte chemoattractant protein-1 content was detected by ELISA. The gene expression of *H2T23* was detected by qRT-PCR, the binding interactions between MASM and human frizzled homolog (FZD5) was evaluated by molecular docking, and protein expression levels of glial fibrillary acidic protein (GFAP), complement 3 (C3), wingless type mouse mammary tumor virus integration site family member 5a (Wnt5a), FZD5, protein kinase Cα (PKCα), and the phosphorylation level of glycogen synthase kinase 3 (GSK3β) were detected by Western blot. MASM significantly improved neurological function, reduced spinal cord inflammation and demyelination, and downregulated astrocyte activation markers (GFAP, C3, H2T23) ($P < 0.05$, $P < 0.01$) and Wnt5a/FZD5 pathway components (Wnt5a, FZD5, PKCα, p-GSK3β) ($P < 0.05$, $P < 0.01$). MASM demonstrates strong binding capacity to FZD. These findings suggest that MASM alleviates EAE by inhibiting astrocyte polarization *via* the Wnt5a/FZD5 pathway. The animal study was approved by the Animal Ethics Committee of Fujian University of Traditional Chinese Medicine (approval number: FJTCMIACUC 2023319).

Key words: multiple sclerosis; experimental autoimmune encephalomyelitis; (6*aS*,10*S*,11*aR*,11*bR*,11*cS*)-10-methylaminododecahydro-3*a*,7*a*-diaza-benzo (de) anthracene-8-thione; astrocyte; Wnt5a/FZD5 pathway

多发性硬化症 (multiple sclerosis, MS) 是一种慢性自身免疫性疾病, 其主要特征为中枢神经系统白质炎性脱髓鞘并伴有轴突损伤[1]。研究发现星形胶质细胞 (astrocyte, AST) 在MS疾病进展中起着重要作用, 当AST被“激活”, 转变为“反应性AST”时, 通过分泌神经毒性物质, 导致炎症反应、突触结构损伤, 并抑制髓鞘再生进程[2,3]。因此, 调控AST的过度活化, 抑制炎症反应, 改善髓鞘再生微环境, 成为MS治疗的有效途径。有研究发现, 糖蛋白无翅型小鼠乳房肿瘤病毒整合位点家族成员5a (wingless type mouse mammary tumor virus integration site family member 5a, Wnt5a) 在AST活化的过程中发挥重要作用[4,5]。Wnt5a/人卷曲同源物 (human frizzled homolog, FZD) 信号通路是Wnt非经典通路的重要组成部分, 在炎症反应及AST成熟中发挥调控作用[6,7]。

苦参碱是清热解毒中药苦参的主要活性成分。据报道苦参碱对实验性自身免疫性脑脊髓炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) 模型小鼠具有较好的治疗作用[8]。但是苦参碱半衰期短、治疗效率低[9], 为此, 课题组以苦参碱为先导化合物, 用硫原子取代羰基氧原子, 并在酮位上引入甲基胺基, 设计合成了硫代苦参碱衍生物 (专利号ZL 200910199252.0)。进一步研究发现, 衍生物中的13-甲氨基-18-硫代苦参碱 [(6*aS*,10*S*,11*aR*,11*bR*,11*cS*)-10-methylaminododecahydro-3*a*, 7*a*-diaza-benzo (de) anthracene-8-thione, MASM] 药理活性最强, 且口服生物利用度明显提高, 半衰期明显延长[10,11]。课题组前期研究[12]发现, MASM可明显改善EAE小鼠症状, 减少白质炎症和脱髓鞘现象。但其是否通过Wnt5a/FZD5途径调控AST的活化发挥治疗作用, 尚未见相关报道。故本研究通过建立EAE小鼠模型, 观察MASM对髓鞘保护作用, 并进一步探讨其可能的作用机制, 为MASM在MS中的进一步深入开发提供科学依据。

材料与方法

药物与试剂 MASM (海军军医大学特药研究中心, 批号: M192306); 芬戈莫德 (fingolimod, FTY) (大连美仑生物科技有限公司, 货号: MB1552); MOG_{35-55}/CFA emulsion PTX试剂盒 (Hooke Laboratories公司, 货号: EK-2110); 转化生长因子-β1 (transforming growth factor-β1, TGF-β1) 和单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) ELISA试剂盒 (上海茁彩生物科技有限公司, 货号: ZC-39043、ZC-38075); 胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 抗体 (杭州华安生物技术有限公司, 货号: EM140707); 糖原合成酶激酶3β (glycogen synthase kinase 3, GSK3β)、p-GSK3β、FZD5和β-actin抗体 (苏州康何欣生物科技有限公司, 货号: CQA8398、CQA8055、CPA2255和CPA9100); 补体C3 (complement 3, C3) 抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司, 货号: 66157-1-lg); Wnt5a抗体 (武汉爱博泰克生物科技有限公司, 货号: A2133); 蛋白激酶Cα (protein kinase Cα, PKCα) 抗体 (美国ImmunoWay Biotechnology

公司, 货号: YT3754)。RevertAid First Strand cDNA Synthesis 试剂盒 (美国 Thermo Fisher 科技公司, 货号: K1622); SYBR Green qPCR Mix (山东思科捷生物技术有限公司, 货号: AH0402)。

仪器 多功能酶标仪 (瑞士 TECAN 公司, 型号 Infinite 200 PRO); 光学显微镜 (德国 Leica 公司, 型号 DM4000B LED); 化学发光成像系统 (美国 Bio-Rad 公司, 型号 ChemiDoc XRS+); 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Applied Biosystem 公司, 型号 ABI7900); 透射电子显微镜 (日本 Hitachi 公司, 型号: HT7800)。

实验动物 SPF 级健康雌性 C57 BL/6 小鼠, 6～8 周, 体质量 (20 ± 2) g, 购自广东维通利华实验动物技术有限公司, 生产许可证号: SCXK (粤) 2022-0063。于福建中医药大学实验动物管理中心实施实验饲养, 许可证号: SYXK (闽) 2019-0007。本研究获福建中医药大学动物伦理委员会审核批准, 伦理审查编号: FJTCMIACUC 2023319。动物实验操作严格遵循动物福利相关规定。

EAE 模型的建立 严格按照 MOG_{35-55}/CFA emulsion PTX 试剂盒说明书, 小鼠皮毛消毒后在小鼠背部正中上下 2 点各皮下注射 100 μL 髓鞘少突胶质细胞糖蛋白 (myelin oligodendrocyte glycoprotein, $MOG)_{35-55}$ 乳剂。注射当天 2 及 24 h 后, 腹腔注射百日咳毒素 (pertussis toxin, PTX) 100 μL。造模第 10 天依据 Kono's 5 分法及说明书中的评分细则进行神经功能评分, 评分为 0.5～3.5 者视为造模成功, 纳入实验分组。评分细则如下, 0 分: 与未免疫的小鼠相比, 运动功能无明显变化; 0.5 分: 尾尖无力下垂; 1 分: 尾巴无力, 从根部拿起时通常垂下; 1.5 分: 尾巴和后腿无力, 行走时微晃; 2 分: 尾巴和后腿无力, 歪头或行走时一条腿拖地; 2.5 分: 尾巴无力, 后肢瘫痪, 行走时后肢拖地; 3 分: 全尾瘫痪, 后肢双侧脚掌外翻, 腹部触地; 3.5 分: 尾巴无力, 后肢瘫痪, 前肢单侧无力, 爬行时转圈; 4 分: 尾巴无力, 四肢全部瘫痪, 少移动但比较警觉, 通常在持续 4.0 两天后进行安乐死, 该小鼠在剩余时间评分为 5.0; 4.5 分: 尾巴无力, 四肢全部瘫痪, 比较少进行活动, 通常推荐安乐死, 该小鼠在剩余时间评分为 5.0; 5 分: 因瘫痪而死亡或被安乐死。

药物的配置 精密称取 1.8 mg MASM 粉末, 加入 6 mL 生理盐水中, 超声溶解, 配成 0.3 $mg·mL^{-1}$ MASM 溶液。

分组和给药 将造模成功的小鼠随机为 5 组, 分别为模型组 (EAE 组)、MASM 组 (1.5、3.0、6.0 $mg·kg^{-1}$) 及阳性对照 FTY 组 (1.0 $mg·kg^{-1}$), 每组 10 只; 另取 10 只作为正常对照组 (control 组)。各组小鼠均在分组后按 0.2 mL 每 10 g 体质量灌胃给予相应的药物, 正常对照组和 EAE 组均给予生理盐水, 每天 1 次, 连续 21 天 (图 1)。

ELISA 法检测 EAE 小鼠血清中 TGF-β1、MCP-1 含量 末次给药 1 h 后, 摘眼球取血, 室温静置 2 h 后, 4 ℃, 3 000 $r·min^{-1}$, 离心 15 min, 吸取上清。严格按照 ELISA 试剂盒说明书, 检测血清中 TGF-β1 和 MCP-1 含量。

HE 染色 脊髓组织石蜡切片脱蜡复水, 苏木素浸染, 分化液分化, 伊红浸染, 中性树胶封片, 于显微镜下观察脊髓病理变化。

透射电镜 取脊髓组织切成大约 1 mm^3 的小块后在电镜固定液中进行固定, 然后用戊二醛后固定 2 h, 乙醇室温梯度脱水后, 依次用丙酮和 812 包埋剂 1∶1 混合液及纯 812 包埋剂渗透过夜, 再放于 60 ℃烤箱聚合 48 h, 用半薄切片机将树脂块切为 1.5 μm 的半薄片, 甲苯胺蓝染色后于光镜下定位, 切片 (60～80 nm), 捞片。2% 醋酸铀饱和乙醇溶液染色 8 min (避光), 依次用 70% 乙醇和超纯水清洗; 2.6% 枸橼酸铅溶液染色 8 min (避 CO_2), 干燥过夜, 透射电子显微镜下观察。轴突直径与髓鞘厚度之间的关系用 G-ratio 值来表示, 其计算方法为: G-ratio = 内轴突直径/轴突和髓鞘总直径。

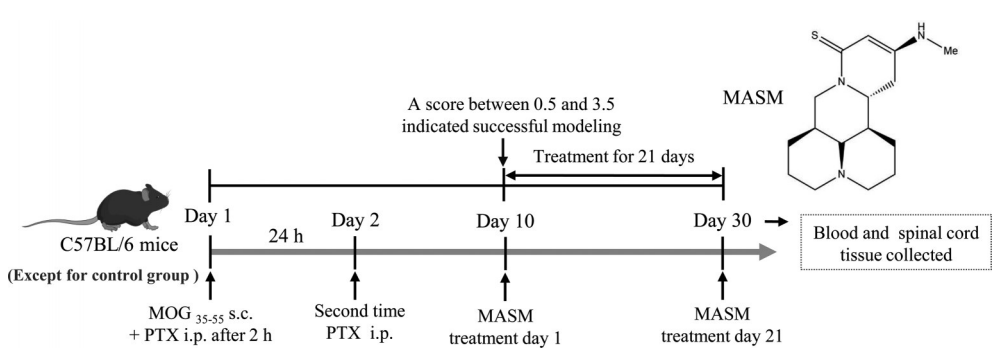


Figure 1 Schedule of the animal experiment. MASM: (6*aS*,10*S*,11*aR*,11*bR*,11*cS*)-10-Methylaminododecahydro-3*a*,7*a*-diaza-benzo (de) anthracene-8-thione

qRT-PCR 法检测脊髓中抗原呈递相关基因 *H2T23* 的 mRNA 表达水平　TRIzol 法提取脊髓组织的总 RNA, 使用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis 试剂盒逆转录得到 cDNA, 再采用 SYBR Green qPCR Mix 试剂盒检测 *H2T23* 的 mRNA 表达水平。引物由浙江尚亚生物技术有限公司合成并验证, *H2T23* 序列为 F (5'→3'): AGCTGTGATCATCCTTGGAGC, R (5'→3'): CCAGTCAGAGGTCTGGAAGC; *β*-actin 序列为 F (5'→3'): TGTCCACCTTCCAGCAGATGT, R (5'→3'): AGCTCAGTAACAGTCCGCCTAG。本实验以 *β*-actin 为内参进行校正, 计算 *H2T23* 的相对表达量。

MASM 与靶蛋白 FZD5 的分子对接　从 UniProtKB 数据库 (https://www.uniprot.org) 检索 FZD5 蛋白序列, 将该序列导入 SWISS-MODLE 网站, 获取蛋白质最优结构, 并保存为 PDB 格式; 通过 PYMOL 软件优化蛋白质结构, 去除多余配体和水分子。利用 DiscoverStudio 软件对化合物 MASM 进行能量最小化处理。采用 Autodock vina1.5.6 软件进行分子对接, 通过 Pymol3.1 和 Discovery Studio 2019 软件进行可视化分析。关注氢键、疏水作用和范德华力等分子间作用力并分析 MASM 与靶蛋白 FZD5 之间的分子相互作用模式。

Western blot 法检测 GFAP、C3 蛋白及 Wnt5a/FZD5 途径相关蛋白的表达　严格按照试剂盒说明书, 提取脊髓组织总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。30 μg 上样, 电泳分离, 转膜至 NC 膜上, 用快速封闭液封闭 25 min, 冰上孵育一抗 (稀释比 *β*-actin 为 1∶20 000, GFAP 为 1∶5 000, C3 为 1∶10 000, Wnt5a 为 1∶1 000, FZD5 为 1∶1 000, PKC*α* 为 1∶1 000, GSK3*β* 为 1∶1 000, p-GSK3*β* 为 1∶1 000) 过夜; 二抗 (稀释比为 1∶3 000) 室温孵育 70 min 后, ECL 发光后显影。Image J 图像软件分析灰度值, 以 *β*-actin 为内参计算目的蛋白的相对表达量。

统计学分析　利用 SPSS 27.0 统计分析应用软件实现资料处理数据分析, 用 GraphPad Pism 9.5 绘图软件绘图。统计数据用平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 符合正态分布的数据各组间统计选择单因素方差 (one-way ANOVA) 分析方法, 若方差齐, 事后比较选择 LSD 法, 方差不齐, 则选择 Games-Howel 法; 不符合正态分布的数据用非参数检验。以 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

结果

1　MASM 对 EAE 小鼠神经功能的影响

EAE 组小鼠出现精神萎靡、尾巴无力、后肢外翻、全肢瘫痪爬行转圈等严重情况, 随着时间的延长, Kono's 评分逐渐升高, 与正常对照组相比具有显著性差异 ($P < 0.01$); MASM 给药干预第 9 天, 6.0 mg·kg^{-1} MASM 组评分明显低于 EAE 组小鼠 ($P < 0.01$) , 给药干预第 18、21 天, 3.0 和 6.0 mg·kg^{-1} MASM 组评分均明显低于 EAE 组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结果提示, MASM 能够减轻 EAE 小鼠的神经损伤症状 (图 2)。

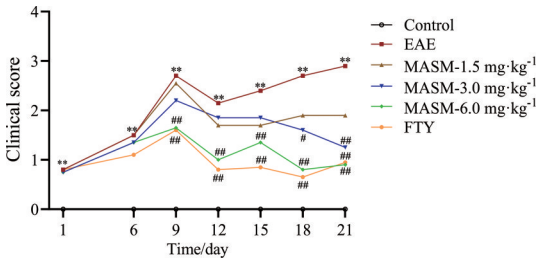


Figure 2　Effect of MASM on Kono's scores of EAE mice. n = 10, $\bar{x} \pm s$. $^{**}P < 0.01$ *vs* control group; $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$ *vs* EAE group. EAE: Experimental autoimmune encephalomyelitis, FTY: Fingolimod (1.0 mg·kg^{-1})

2　MASM 对 EAE 小鼠脊髓病理变化的影响

如图 3 所示, 正常对照组小鼠脊髓组织结构清晰完整, 轴突外髓鞘结构完整, 厚度均匀, 清晰致密, 边缘规整, 具有轨道样致密板层结构。轴突直径与髓鞘厚度之间的关系用 G-ratio 值来表示, 该值被广泛用于评价髓鞘的结构和功能, 数值越小, 髓鞘越厚, 表明有更多的髓鞘包绕在轴突外部。实验结果显示, EAE 组小鼠脊髓白质区域出现大量炎性细胞浸润, 并伴有明显的组织空泡, 且 G-ratio 值明显高于正常组 ($P < 0.01$), 提示模型小鼠出现明显的脱髓鞘现象; MASM 干预后, 小鼠脊髓病理改变有一定程度的改善, 且 G-ratio 值显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 提示 MASM 可有效促进髓鞘的再生。

3　MASM 对 EAE 小鼠脊髓内 AST 活化及表型的影响

GFAP 是 AST 活化的标志物, 而 C3 和 *H2T23* 被认为是 A1 型 AST 特征性标志物。AST 活化为 A1 表型, 通过释放炎症因子 (TGF-*β*1、MCP-1 等), 形成神经抑制性微环境, 阻碍髓鞘再生进程。如图 4 所示, 与正常对照组相比, EAE 模型组小鼠脊髓组织中的 GFAP、C3 蛋白, *H2T23* mRNA 表达及血清中 TGF-*β*1、MCP-1 含量均明显升高增加 ($P < 0.01$); 经 MASM 干预后, 脊髓组织中 GFAP、C3 蛋白, *H2T23* mRNA 表达及血清中 TGF-*β*1、MCP-1 含量均明显少于 EAE 组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

4　MASM 与靶蛋白 FZD5 的分子对接结果

采用 Autodock 平台进行分子对接, 并对 MASM 与靶蛋白 FZD5 的结合亲和力进行量化评估, 结果显示 (图 5), MASM 与 FZD5 蛋白的结合能较低 (−6.2 kcal·mol^{-1}), 表明 MASM 与靶蛋白可发生热力学上自发的强结合

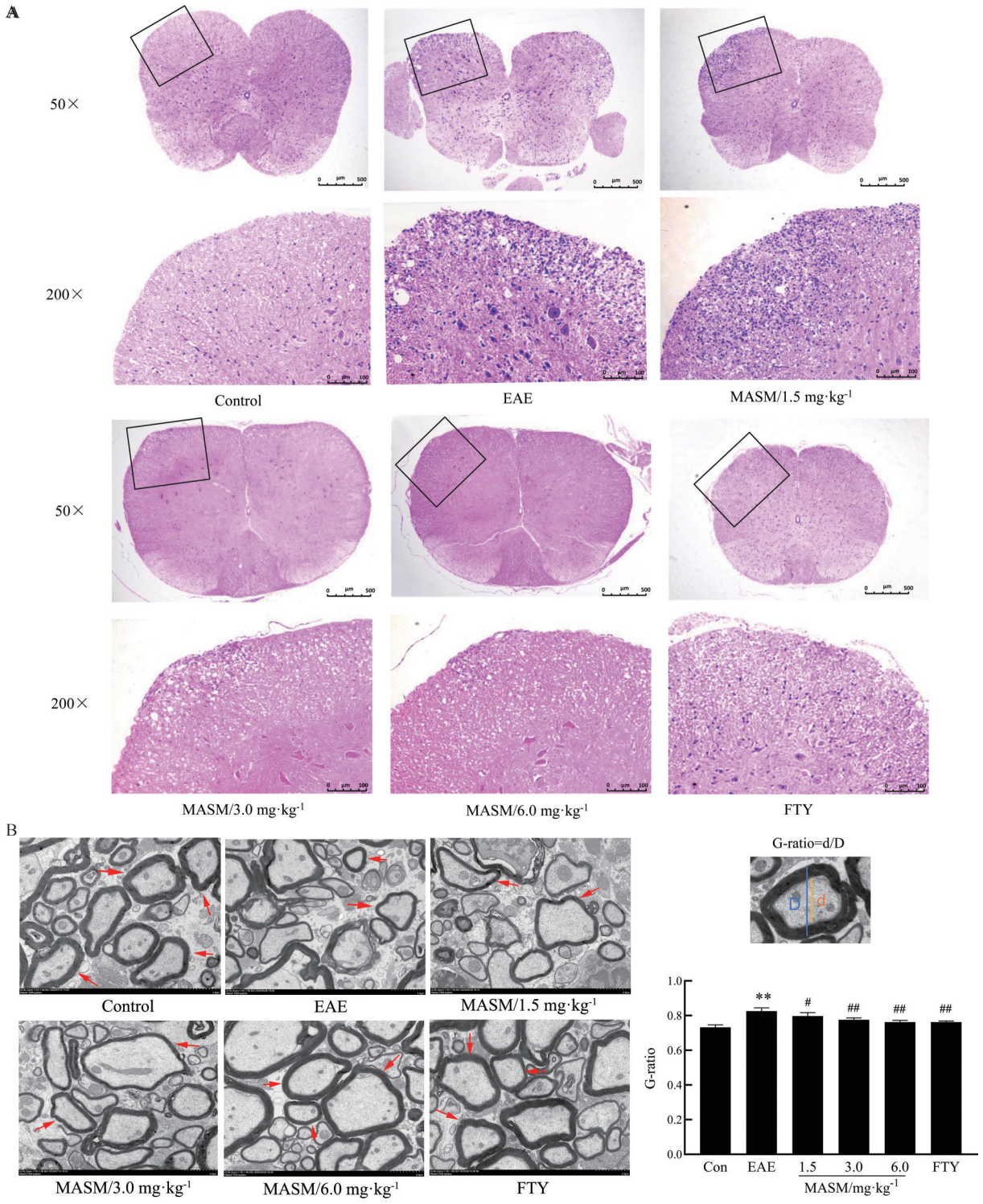


Figure 3 Effect of MASM on pathological changes in the spinal cord of EAE mice. A: HE staining results of pathological sections; B: The microstructure of lumbar myelin sheath under transmission electron microscopy (5 000×, scale bars: 2.0 μm), the red arrow represents the typical myelin sheath morphology of each group, G-ratio = axonal diameter (d)/ the outer (axon plus myelin) diameter (as shown). $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. $^{**}P < 0.01$ *vs* control group; $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$ *vs* EAE group. HE: Hematoxylin-eosin

效应 (结合能低于−5.0 kcal·mol^{-1})。从分子互作机制来看, 配体与受体间主要通过疏水作用 (如alkyl作用) 和范德华力形成稳定的相互作用模式。上述结果表明, FZD5可作为MASM的直接作用靶点。

5 MASM对Wnt5a/FZD5途径相关蛋白表达水平的影响

如图6所示, 与正常对照组相比, EAE组小鼠脊髓中Wnt5a、FZD5、PKCα蛋白表达量及GSK3β磷酸化水

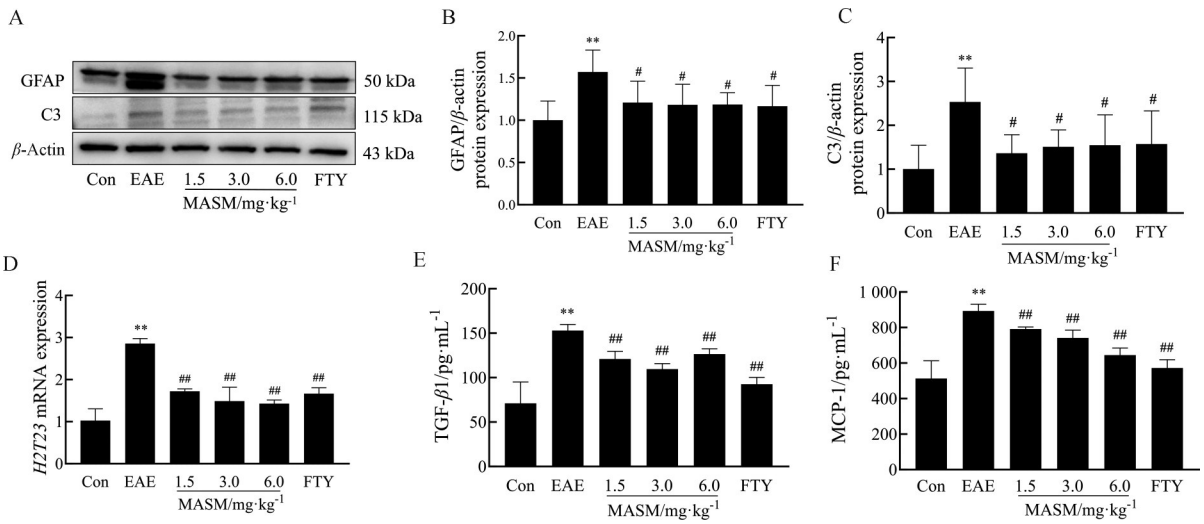


Figure 4 Effect of MASM on the activation and transformation of AST in EAE mice. A: Representative Western blot of GFAP and C3 expression; B, C: Quantification of the protein expression of GFAP (B) and C3 (C) in spinal cord of EAE mice (n = 4). β-actin was used as an internal control; D: The mRNA expression of *H2T23* in spinal cord of EAE mice (n = 3); E, F: The serum TGF-β1 (E) and MCP-1 (F) levels of EAE mice (n = 6). $\bar{x} \pm s$. $^{**}P < 0.01$ *vs* control group; $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$ *vs* EAE group. AST: Astrocyte; GFAP: Glial fibrillary acidic protein; TGF-β1: Transforming growth factor-β1; MCP-1: Monocyte chemoattractant protein-1

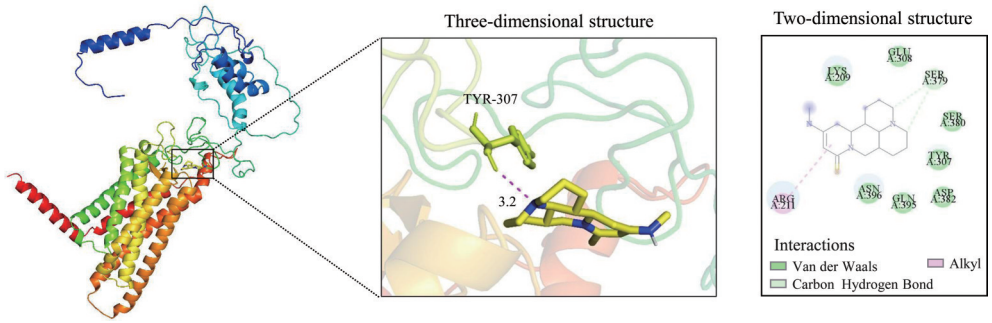


Figure 5 Molecular docking outcomes with the lowest binding energy between MASM and FZD5. FZD5: Human frizzled homolog 5

平显著升高 ($P < 0.01$), 而经 MASM 干预后 Wnt5a、FZD5、PKCα 蛋白表达量及 GSK3β 磷酸化水平明显低于 EAE 组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

讨论

MS 是一种以髓鞘破坏为主要特征, 伴有炎症反应、神经病变的中枢神经系统的渐进性退化症。MOG 是免疫球蛋白超家族的成员, 仅在髓鞘和少突胶质细胞突起的表面表达, 而 MOG_{35-55} 是髓鞘少突胶质细胞糖蛋白的 35～55 位氨基酸片段, 作为自身抗原诱导 T 细胞活化, 识别和攻击髓鞘蛋白, 造成髓鞘脱失、中枢神经系统轴突传导受损, 导致小鼠进行性的后肢瘫痪。同时联合 PTX 使血管通透性增加, T 细胞更易通过屏障作用于神经髓鞘, 故 MOG_{35-55} 多肽联合 PTX 建立的 EAE 模型表现与 MS 的临床病理表现相似, 是目前公认的经典模型[13,14]。实验结果显示, 造模后小鼠出现精神萎靡、尾巴无力、后肢外翻、全肢瘫痪爬行转圈等严重情况, 随着时间的延长, Kono's 评分逐渐升高; 脊髓白质出现明显的炎性细胞浸润, 伴有大量组织空泡, 并出现明显的脱髓鞘现象, 以上提示 EAE 模型制备成功。MASM 干预后, Kono's 评分明显降低, 脊髓病理改变均有不同程度的改善, 且脱髓鞘现象明显减少 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 提示 MASM 对 EAE 小鼠具有较好的治疗作用, 并呈一定的剂量依赖性。

AST 是哺乳动物脑内分布最广的一类细胞, 在 MS 疾病进展中起着重要作用。当 MS 发生后, 处于静息状态的 AST 被激活, 形成反应性 AST, 其基因表达、形态和功能发生明显变化, 活化后的 AST 可分化为 A1 表型, 通过释放炎症因子及趋化因子, 如 MCP-1、TGF-β1 等, 导致炎症和组织损伤, 并形成神经抑制性微环境, 阻碍髓鞘再生进程[15]。GFAP 是一种Ⅲ型中间丝状蛋白, 是 AST 内的主要骨架蛋白, 常作为 AST

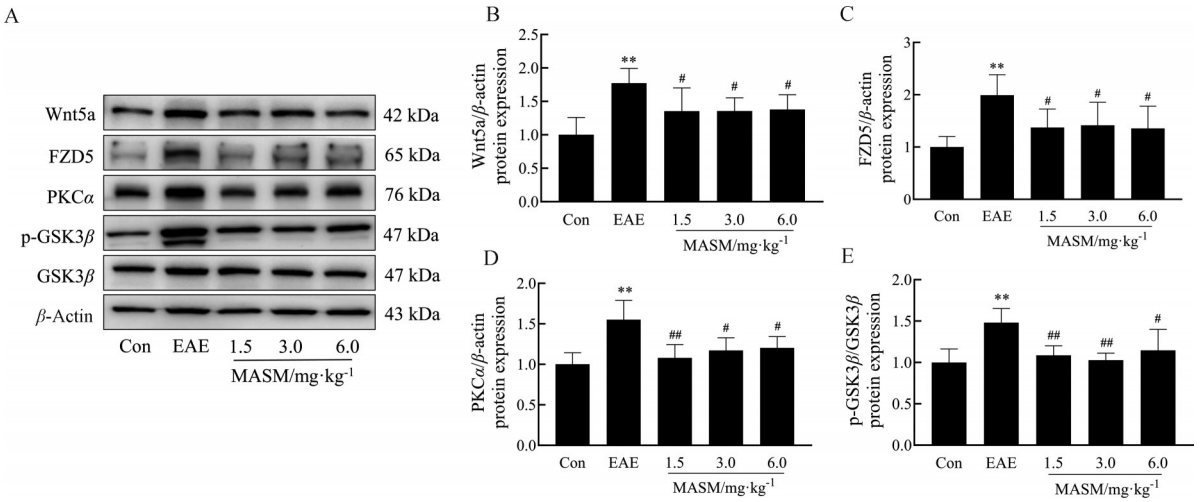


Figure 6 Effect of MASM on the expression of Wnt5a/FZD5 signaling pathway-related proteins in EAE mice. A: Representative Western blots of Wnt5a, FZD5, PKCα and GSK3β expression; B−E: Quantitative analysis of the relative intensity of Wnt5a (B), FZD5 (C), PKCα (D), the phosphorylated GSK3β (E) in the spinal cord of mice. β-Actin was used as an internal control. $n = 4$, $\bar{x} \pm s$. $^{**}P < 0.01$ *vs* control group; $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$ *vs* EAE group. Wnt5a: Wingless type mouse mammary tumor virus integration site family member 5a, PKCα: Protein kinase Cα, GSK3β: Glycogen synthase kinase 3β

活化的生物标志物, 而C3和H2T23被认为是A1型AST特征性标志物[16]。故本研究通过检测脊髓中GFAP和C3的表达水平以评价AST的活化程度及表型转化。实验结果显示, EAE组脊髓中GFAP、C3蛋白表达量及*H2T23* mRNA水平显著增加 ($P < 0.01$), 提示造模后脊髓中AST被激活并转化为A1表型。MASM治疗后, 可明显抑制AST的活化。

Wnt5a/FZD信号通路是Wnt非经典通路的重要组成部分。当MS发生后, Wnt5a表达增加, 通过非经典途径与G蛋白偶联受体FZD结合调控蛋白激酶PKCα的重新定位与激活[17]。活化的PKCα可磷酸化糖原合酶激酶GSK-3β, 使其失活[18]。而GSK-3β可与二聚体转录因子AP-1中的c-Jun结合, 使其泛素化降解失活[19]。Wnt5a信号使GSK-3β磷酸化失活后, 导致c-Jun增多, 大量易位到细胞核, 促进H2T23、C3的表达使得AS转化为A1表型[20], 增加相关炎症因子的释放, 抑制髓鞘修复, 加重髓鞘损伤。分子对接结果显示, MASM与靶蛋白FZD5有较强的结合能力, 动物实验结果显示, EAE小鼠脊髓组织中Wnt5a、FZD5、PKCα蛋白的表达量及GSK3β磷酸化水平显著增加 ($P < 0.01$), 经MASM治疗后Wnt5a、FZD、PKCα蛋白的表达量及GSK3β磷酸化水平显著减少 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

本研究表明, MASM可改善EAE小鼠的病理状态, 具有促进EAE小鼠神经功能修复的作用, 其与调控Wnt5a/FZD途径的激活、抑制AST活化及向A1型转化, 以及抑制髓鞘脱失有关。

致谢: 特别感谢海军军医大学王彦教授和张俊平教授在本课题研究期间提供的指导和帮助。

作者贡献: 陈腾翔、罗润永负责实验和文章初稿撰写; 李世国、黄益兴、傅思凡、李鑫炜参与部分动物实验; 林小婷、胡若莹负责数据分析; 陈亚萍、南丽红负责课题设计、实验指导和文章修订。

利益冲突: 本文不存在任何利益冲突。

References

[1] Bjelobaba I, Savic D, Lavrnja I. Multiple sclerosis and neuroinflammation: the overview of current and prospective therapies [J]. Curr Pharm Des, 2017, 23: 693-730.

[2] Nair A, Frederick TJ, Miller SD. Astrocytes in multiple sclerosis: a product of their environment [J]. Cell Mol Life Sci, 2008, 65: 2702-2720.

[3] Correale J, Farez MF. The role of astrocytes in multiple sclerosis progression [J]. Front Neurol, 2015, 6: 180.

[4] Liu X, Bae C, Liu B, et al. Development of opioid-induced hyperalgesia depends on reactive astrocytes controlled by Wnt5a signaling [J]. Mol Psychiatry, 2023, 28: 767-779.

[5] Zhu A, Shen L, Xu L, et al. Suppression of Wnt5a, but not Wnts, relieves chronic post-thoracotomy pain *via* anti-inflammatory modulation in rats [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 493: 474-480.

[6] Chen M, Zhong W, Hu Y, et al. Wnt5a/FZD5/CaMKII signaling pathway mediates the effect of BML-111 on inflammatory reactions in sepsis [J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8: 17824-17829.

[7] Liu C, Nathans J. An essential role for frizzled 5 in mammalian ocular development [J]. Development, 2008, 135: 3567-3576.

[8] Zhao XY, Zhu L, Shi XF, et al. Effects of matrine on

macrophage M1/M2 polarization in EAE micethrough MAPK signaling pathway [J]. J Zhengzhou Univ (Med Sci) [郑州大学学报 (医学版)], 2022, 57: 32-38.

[9] Zhang L, Liu W, Zhang R, et al. Pharmacokinetic study of matrine, oxymatrine and oxysophocarpine in rat plasma after oral administration of *Sophora flavescens* Ait. extract by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. J Pharm Biomed Anal, 2008, 47: 892-898.

[10] Hu H, Wang S, Zhang C, et al. Synthesis and *in vitro* inhibitory activity of matrine derivatives towards pro-inflammatory cytokines [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2010, 20: 7537-7539.

[11] Li L, Lu F, Ding S, et al. Pharmacokinetic, tissue distribution, metabolite, and toxicity evaluation of the matrine derivative, (6*aS*,10*S*,11*aR*,11*bR*,11*cS*)-10-methylaminododecahydro-3*a*,7*a*-diaza-benzo (de) anthracene-8-thione [J]. Molecules, 2024, 29: 297.

[12] Fan ZY, Chen YP, Chen L, et al. The matrine derivate MASM inhibits astrocyte reactivity and alleviates experimental autoimmune encephalomyelitis in mice [J]. Int Immunopharmacol, 2022, 108: 108771.

[13] Constantinescu CS, Farooqi N, O'brien K, et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS)[J]. Br J Pharmacol, 2011, 164: 1079-1106.

[14] Bittner S, Afzali AM, Wiendl H, et al. Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG_{35-55}) induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 mice [J]. J Vis Exp, 2014, (86): 51275.

[15] Wu Q, Miao X, Zhang J, et al. Astrocytic YAP protects the optic nerve and retina in an experimental autoimmune encephalomyelitis model through TGF-β signaling [J]. Theranostics, 2021, 11: 8480-8499.

[16] Lawrence JM, Schardien K, Wigdahl B, et al. Roles of neuropathology-associated reactive astrocytes: a systematic review [J]. Acta Neuropathol Commun, 2023, 11: 42.

[17] Liu A, Chen S, Cai S, et al. Wnt5a through noncanonical Wnt/JNK or Wnt/PKC signaling contributes to the differentiation of mesenchymal stem cells into type II alveolar epithelial cells *in vitro* [J]. PLoS One, 2014, 9: e90229.

[18] Jaworski T, Banach-Kasper E, Gralec K. GSK-3β at the intersection of neuronal plasticity and neurodegeneration [J]. Neural Plast, 2019, 2019: 4209475.

[19] Hur EM, Zhou FQ. GSK3 signalling in neural development [J]. Nat Rev Neurosci, 2010, 11: 539-551.

[20] Liu C, Shen L, Xu L, et al. Ror2 mediates chronic post-thoracotomy pain by inducing the transformation of A1/A2 reactive astrocytes in rats [J]. Cell Signal, 2022, 89: 110183.