



纳米包装的虾青素通过消除过多内源性甲醛改善 多发性硬化模型小鼠脱髓鞘*

吕万佳^{1,2)} 曾鑫^{1,2)} 童志前⁴⁾ 邢杨⁶⁾ 杨旭^{2,3)} 武美娜^{5)**} 马萍^{1,2,3)**}

(¹⁾ 湖北科技学院药学院, 咸宁 437100; ²⁾ 湖北科技学院环境风险与相关疾病精准防控湖北省重点实验室, 咸宁 437100;

³⁾ 湖北智慧康养产业技术研究院, 咸宁 437100; ⁴⁾ 北京老年医院, 北京 100095; ⁵⁾ 山西医科大学生理学系, 太原 030001;

⁶⁾ 咸宁市疾病预防控制中心, 咸宁 437100)

摘要 目的 探讨清除内源性甲醛 (formaldehyde, FA) 对双环己酮草酰二胺 (cuprizone, CPZ) 诱导的多发性硬化 (multiple sclerosis, MS) 模型小鼠的脱髓鞘的改善效应及其机制。方法 采用 0.2% CPZ 建立 MS 慢性脱髓鞘模型, 将 80 只 C57BL/6J 雌性小鼠随机分为 4 组: 生理盐水 (normal saline, NS) 对照组、MS 模型 (CPZ+NS) 组、甲醛消除剂治疗组 (CPZ+NaHSO₃) (NaHSO₃, 一种 FA 消除剂)、纳米虾青素 (astaxanthin, ATX, 一种高效 FA 消除剂) 治疗组 (CPZ+聚乙二醇包装的纳米 ATX (PEG-ATX)@NPs)。通过旷场、Y 迷宫及爬杆实验评估运动能力及认知功能; 采用免疫荧光组化法检测脑组织离子化钙结合适配分子 1 (Iba1) 表达; 劳克坚牢蓝染色法检测脱髓鞘变化; 通过酶联免疫吸附分析 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒检测血液、脑脊液与脊髓中肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素 (interleukin, IL) -1 β 和 IL-6 含量; 采用甲醛探针 (Na-FA) 测定脑及脊髓内源性 FA 水平及荧光成像定量组织活性氧类 (reactive oxygen species, ROS) 强度。结果 与 NS 组相比, CPZ+NS 组小鼠体重下降, 运动协调及记忆能力减退, 髓鞘再生受阻 ($P<0.05$), 血液、脊髓和脑脊液中促炎症因子及 FA 含量显著升高 ($P<0.05$), 脑和脊髓组织 FA 及 ROS 荧光强度均显著增强 ($P<0.05$), Iba1 阳性小胶质细胞数量明显增多 ($P<0.05$), 脑脊液脱髓鞘严重 ($P<0.01$)。但是, FA 消除剂 NaHSO₃ 和 PEG-ATX@NPs 干预显著降低脑及脊髓 FA 含量, 减轻髓鞘损伤, 抑制小胶质细胞活化, 下调促炎症因子, 并改善模型小鼠的运动能力及认知行为。结论 纳米包装 ATX 可减少 CPZ 产生的 FA, 从而减缓 MS 模型小鼠的脱髓鞘及改善认知能力。

关键词 多发性硬化, 内源性甲醛, 炎症因子, 脱髓鞘, 双环己酮草酰二胺, 虾青素

中图分类号 R744.5+1, R363.1, R965, Q42

DOI: 10.3724/j.pibb.2025.0350

CSTR: 32369.14.pibb.20250350

多发性硬化症 (multiple sclerosis, MS) 是中枢神经系统以白质炎性脱髓鞘为主要特征的自身免疫性疾病^[1], 病变常累及脑室周围白质、脊髓、小脑与脑干等区域^[2]。其主要病理包括髓鞘脱失、炎症浸润、少突胶质细胞 (oligodendrocyte, OL) 减少及轴突损伤^[3]。MS 多见于 20~40 岁人群, 女性更为高发, 全球患者约 280 万例^[4]。临床表现取决于病灶部位, 可出现视物模糊、肌力下降、感觉异常、运动协调障碍、认知与情绪损害等一系列神经功能障碍^[5]。研究发现, 在髓鞘生成及轴突代谢中发挥关键作用的是 OL^[6], 髓鞘健康对中枢神经系统至关重要。因此 MS 研究多聚焦于改善髓鞘再生及减缓脱髓鞘进程^[7]。

甲醛 (formaldehyde, FA) 是早期地球环境中重要的小分子, 也是多种生物大分子如核糖、RNA、DNA 等有机物生成的前体^[8]。同时, 它作为室内空气污染物, 其导致动物记忆缺损和人类认知能力下降的神经毒性作用已被广泛认知。它普遍存在于脊椎动物细胞内, 可来源于甲醇氧化及 DNA 组蛋白去甲基化等代谢过程^[9]。基础和临床

* 国家自然科学基金 (42177416, 42477452) 湖北省卫生健康科技项目重点项目 (WJ2025Z017) 和湖北省科技创新基地 (平台) 计划项目 (2025CDB024) 资助。

** 通讯联系人。

马萍 Tel: 13886509837, E-mail: mping68@126.com

武美娜 Tel: 13834678553, E-mail: wmna@163.com

收稿日期: 2025-07-22, 接受日期: 2025-12-29

研究显示, FA可诱发神经纤维丝蛋白变性、神经元脱髓鞘等, 这一病理现象在神经退行性疾病患者尸检中常见, 与MS类似。气态FA暴露会导致记忆下降及体内髓鞘丢失, 引发相关脱髓鞘疾病^[10]。例如, 阿尔茨海默病模型小鼠脑内FA蓄积, 伴随脑皮层灰质存在多处脱髓鞘, 神经元脱髓鞘会损害神经冲动传导, 阻碍神经核团间通讯, 导致记忆紊乱。MS患者脑内胼胝体和脉络丛的神经元脱髓鞘, 也会造成运动和记忆能力受损^[11-12]。1989年, Khokhlov等^[13]发现, MS患者血液和脑脊液中FA浓度异常升高, 而甘氨酸可降低FA浓度, 对病情有缓解作用。这提示消除FA可能延缓脱髓鞘。

双环己酮草酰二脲(cuprizone, CPZ)诱发脱髓鞘, 是制备经典MS动物模型的药物。模型脑受损的特征为OL凋亡、小胶质细胞激活及胼胝体脱髓鞘^[14]。已有研究表明, CPZ诱导的小鼠不仅出现运动协调下降, 还表现出学习及记忆障碍^[15], 该模型能够较为准确地再现MS等脱髓鞘疾病的典型临床表现。停止CPZ喂养后, 小鼠可出现部分髓鞘再生^[16], 但修复有限, 这与MS患者髓鞘再生不足的临床特征一致^[17]。进一步研究发现, 髓鞘再生依赖少突胶质前体细胞的活化与分化, 因此该模型对揭示MS机制及筛选促髓鞘再生药物具有重要价值^[18]。

FA消除剂亚硫酸氢钠(sodium bisulfite, NaHSO_3)可有效清除体内内源性FA毒性, 可通过亲核加成反应形成稳定的羟甲基磺酸盐, 从而快速降低体内FA水平, 阻断其引发的炎症及血脑屏障损伤^[19]。该反应在生理条件下即可迅速进行, 能直接、快速地降低体内游离FA水平。其作为食品添加剂和临床药物已有长期的使用记录, 安全性明确, 适合作为本研究验证“清除内源性FA”策略的阳性对照^[20]。而另一种高效的FA消除剂虾青素(astaxanthin, ATX)具备抗氧化和FA清除能力, 其羟基和酮基结构可与FA发生加成反应。ATX是类胡萝卜素中最有效的天然抗氧化剂, 可通过中和单线态氧抑制氧化应激、增强免疫系统功能, 不仅可用作营养补充剂、抗氧化剂和免疫增强剂, 还能预防糖尿病、心血管疾病及神经退行性疾病^[21]。但是由于ATX水溶性差、易分解, 临床应用有限, 因此本研究以粒径<100 nm的纳米脂质体为载体包封ATX, 再对包封ATX的脂质体进行聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)表面修饰, 最终获得PEG修饰ATX纳米颗粒(PEG-ATX@NPs)。可提

升其稳定性和脑部递送效率, 同时PEG修饰能增强血脑屏障穿透能力^[22], 使脑内ATX浓度高于游离状态^[23]。研究结果显示, PEG-ATX@NPs可减少脑内CPZ产生的FA, 改善MS模型小鼠的认知和脱髓鞘。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

鉴于MS在女性中发病率显著高于男性^[24], 为更好地模拟人类疾病性别特征, 本研究选用雌性C57BL/6J小鼠进行实验。本实验选用6~8周龄的C57BL/6J小鼠共计80只, 体重范围为18~20 g, 实验用动物购买自北京维通利华实验动物技术有限公司提供的无特定病原体(special pathogen free, SPF)小鼠, 具备合法的实验动物生产资质, 编号为SYXK(浙)2023.0047。实验前, 所有小鼠均在湖北科技学院SPF级动物实验中心进行适应性饲养, 环境条件控制为温度(20 ± 2) $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度维持在45%~50%, 并采用12 h昼夜光照周期。经过为期1周的适应期后, 正式进入各项实验阶段。所有实验操作严格遵循国家及学校关于实验动物使用的伦理规范, 获湖北科技学院实验动物伦理审查委员会的批准(批准文号为202101012)。

1.1.2 药物与试剂

磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS)(P1003)、ATX(A9241)、蛋白酶抑制剂混合液(P6730)、活性氧类(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒(CA1410)均由北京索莱宝科技有限公司提供; CPZ(B802761)、 NaHSO_3 (S818005)均由上海麦克林科技有限公司提供; 离子化钙结合适配分子1(ionized calcium binding adapter molecule-1, Iba1)抗体(019-19741)由WOKO和光纯药公司提供; AF647标记山羊抗兔IgG(H+L)(A0468)、放射免疫沉淀法裂解缓冲液(radio-immunoprecipitation assay lysis buffer, RIPA)(P10013B)和4',6-二脒基-2-苯基吲哚二盐酸盐(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染色液(C1005)购自上海碧云天生物技术有限公司; 小鼠肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)(ml002095-1)、小鼠白介素(interleukin, IL)-6(ml002293-1)和小鼠IL-1 β (ml063132-1)酶联免疫吸附分析(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒均由上海酶联科技有限公司

提供; 髓鞘染色试剂盒(牢固蓝-焦油紫法)(G3245)购自索莱宝公司; 色谱级二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)(D103273)购自上海阿拉丁生化科技有限公司; 蛋黄卵磷脂(E80, F2020999045277)购自合肥巴斯夫生物技术有限公司; PEG-15 羟基硬脂酸酯(D8371)购自大连美伦生物科技有限公司; FA 探针(Na-FA)由济南大学荧光探针与生物医学成像研究所捐赠。

1.1.3 仪器

多功能荧光酶标仪(Hidex Chameleon V, Hidex, 芬兰), 可用于荧光检测等实验; 酶标仪(Bio Tek ELx800, SN211805, 美国), 适用于 ELISA 等检测; 低温冷冻离心机(5424R, Eppendorf, 德国), 用于样本离心处理; DFC450C 型荧光显微镜, 可观察荧光标记样本; CM1950 型冰冻切片机(德国 Leica 仪器有限公司), 用于制作冰冻切片; KZ-III-F 型低温型研磨仪(武汉塞维尔生物科技有限公司), 用于样本低温研磨; HH-42 三用电热恒温水箱(北京长源实验仪器厂), 提供恒温环境; 小动物活体成像系统(IVIS Spectrum, 瑞孚迪生物医学(上海)有限公司), 可进行活体成像观察; Y 迷宫和旷场箱(深圳市瑞沃德生命科技股份有限公司), 用于小鼠行为学实验。

1.2 方法

1.2.1 模型制备及分组

本研究选用 80 只 C57BL/6J 小鼠, 依据体重随机分配至 4 个实验组别: 生理盐水(normal saline, NS)组、MS 模型(CPZ+NS)组、FA 消除剂治疗(CPZ+NaHSO₃)组、纳米 ATX 治疗(CPZ+PEG-ATX@NPs)组。实验饲料通过粉碎后与 CPZ 粉末混合配制, 最终获得含 0.2% CPZ (剂量 6 mg/kg/d) 的特殊饲料。除 NS 组保持常规饲料喂养外, 其余 3 组持续摄入含 CPZ 饲料 4 周, 以构建慢性脱髓鞘动物模型。模型建立完成后, 所有实验组均恢复常规饲料喂养。随后, NaHSO₃ 组每 48 h 经腹腔注射 100 mg/kg NaHSO₃, CPZ+PEG-ATX@NPs 组每 48 h 经腹腔注射 10 mg/kg PEG-ATX@NPs, NS 组及 CPZ+NS 组则注射等量生理盐水, 持续干预 14 d (图 1a)。PEG-ATX@NPs 的制备策略及其增强血脑屏障穿透能力的有效性, 参考了本团队前期已建立的方法^[23], 该研究通过活体成像和高效液相色谱分析证实了 PEG 修饰的纳米脂质体可显著提高 ATX 在脑组织中的富集。NaHSO₃ (100 mg/kg) 的剂量参考了其他模型中有效清除内源性 FA 并且

显示其安全性的文献报道^[19]。PEG-ATX@NPs (10 mg/kg) 的剂量则基于本课题组前期的预实验和药效学研究, 该剂量能在保证安全性的前提下发挥最佳疗效。整个实验周期包括模型构建与药物干预两个阶段, 共计 6 周(图 1a)。因实验设计和检测方法需求, 部分检测(如免疫荧光、活体成像)所需样本量较小($n=3\sim4$), 而行为学及 ELISA 等检测所需样本量较大($n=7\sim8$)。

PEG-ATX@NPs 纳米粒子的制备。采用乳化法制备 PEG-ATX@NPs。4 g 蛋黄卵磷脂溶解于 2 ml 95% 乙醇中, 50°C 水浴加热, 形成橙黄色透明液体。然后加入 20 mg ATX (用适当的 DMSO 增溶)、4 g 长链脂肪酸、1 g PEG-15 羟基硬脂酸酯, 在水浴中摇匀加热至 60°C。因此, 磷脂分子被组装得到 ATX 包裹的脂质体(ATX@NPs)。然后在上述混合溶液中加入 0.15 g PEG2000, 加热 30 min 至 50°C。PEG2000 与 ATX 脂质体偶联(ATX@NPs)。采用 220 nm 过滤膜对脂质体进行挤压, 制备均匀的纳米颗粒(nanoparticles, NPs)。为了消除未封装的药物, 采用离心分离法, 将制备的药物在 4°C 的温度和 3 000 r/min 的转速下离心 5 min, 使未封装的药物从上清液中分离并随后去除。在本实验室前期已完成相关课题 PEG-ATX@NPs 纳米粒子的制备, 同时对粒径、Zeta 电位、封装率等都已经验证, 检测出本实验研究所用 PEG-ATX@NPs 的平均粒径为 79.4 nm, 聚集度指数(polydispersity index, *PDI*)<0.20, Zeta 电位为 -34.2 mV, 封装率为 (81.7±2.5)%^[23]。基于课题组已有研究, 本研究利用该药物具有较好的透过血脑屏障的特性, 进行对 MS 模型的疗效验证。

1.2.2 小鼠行为学检测

小鼠模型构建后, 实验过程中每隔 1 d 在固定时间点对各组小鼠的体重进行记录。给药 6 周结束后, 进行行为学测试, 在正式实验前, 先让小鼠适应实验环境以减少应激影响, 所有行为学测试均在隔音、光照均匀的实验室内进行。a. 旷场实验。在启动行为分析系统并完成相关参数设置后, 实验人员背向小鼠, 将实验对象轻柔地放置于清洁、无刺激性气味的实验箱内, 持续观察并记录其在 10 min 内的运动轨迹与行为表现。每次实验结束后, 对实验装置进行彻底清理, 确保下一组实验的环境一致性。b. Y 型迷宫实验。实验装置由 3 个长度相等、宽度约为 10 cm、长度约 40 cm 的通道构成, 形成“Y”字形结构, 各通道之间的夹角为 120°。将单

只小鼠置于迷宫中央位置, 允许其自由探索 5 min 以适应环境, 随后记录其首次选择的臂、进入次数及在各个臂中的停留时间等行为指标。c. 爬杆实验。采用高度为 50 cm、表面粗糙且顶部连接有粗糙球体的塑料杆作为实验工具。将小鼠头部朝上放置于杆顶, 待其调整方向朝下沿杆向下移动时, 开始计时, 记录从杆顶下降至底部所需的时间作为评估指标, 实验方法详见图 1c。

1.2.3 组织样本制备

用 1.25% 三溴乙醇麻醉小鼠后, 取眼球血备用, 用于 ELISA 检测。每组随机选取 4 只小鼠, 经心脏灌注生理盐水和 4% 多聚甲醛后, 解剖取脑组织与脊髓组织, 经多聚甲醛固定, 依次置于 10%、20%、30% 蔗糖溶液中梯度脱水, 冷冻切片包埋剂 (optimal cutting temperature compound, OCT) 包埋后用液氮速冻, 存放于 -80°C 冰箱备用, 后续用冰冻切片机切成 20 μm 的脑组织切片, 用于免疫荧光染色和劳克坚牢蓝染色 (Luxol fast blue, LFB)。各组其余小鼠仅经心脏灌注生理盐水, 取脑组织的皮层、海马、胼胝体等部分, 存放于 -80°C 冰箱, 用于后续 ELISA 检测。每组留存 6 只小鼠, 用于小动物活体成像和 FA 探针的荧光强度检测。

1.2.4 胼胝体区域 LFB 染色检测脱髓鞘变化

将冷冻切片浸入 1×PBS 缓冲液 3 min 以去除 OCT 包埋介质, 然后将切片依次置于 100%、95% 和 85% 梯度的乙醇中, 每个染缸浸泡 5 min。再取出切片, 置于 Luxol 溶液中, 在 60°C 下孵育染色过夜。取出切片, 置于 95% 乙醇溶液中浸洗 5 min。将组织切片从乙醇溶液中转移到去离子水中。将组织切片放置于 0.05% Li_2CO_3 溶液中, 15 s 后迅速取出切片。将切片立即置于 70% 乙醇溶液中, 直到能够清晰分辨出灰质和白质。将切片于 95% 和 100% 乙醇溶液中脱水, 在二甲苯溶液中透明 5 min, 最后用中性树胶作为封片剂, 显微镜下观察并拍片。

1.2.5 胼胝体区域免疫荧光染色检测 Iba1 表达情况

将冷冻切片浸入 1×PBS 缓冲液 3 min 以去除包埋介质。使用免疫组化的标记笔对玻片上脑组织区域进行定位后, 加入 1% BSA 溶液进行封闭处理, 持续 20~30 min。随后应用 0.5% Triton X-100 进行组织通透处理, 处理时长为 30 min。Iba1 一抗 (稀释比例 1:1 000) 滴加至切片表面, 置于湿盒中并在 4°C 条件下进行 12~18 h 的孵育。完成一抗孵育

后, 使用 1×PBS 缓冲液进行 5 次充分洗涤, 5 min/次。随后加入荧光标记的二抗 (稀释比例 1:300), 在室温避光环境中孵育 2 h, 再次进行 3 次 PBS 洗涤。最后采用含 DAPI 的抗荧光猝灭封片剂进行封片处理, 通过荧光显微镜观察 Iba1 的表达。定量分析时, 利用 Image J 软件对视野内阳性染色细胞进行计数, 以此获得各组 Iba1 的相对表达量。

1.2.6 ELISA 检测血液、脑和脊髓组织中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 含量

各组实验动物的胼胝体与脊髓组织被取出后, 进行称重处理, 并按照组织重量与 RIPA 裂解液 1:9 的比例进行混合。随后将混合样本置于低温研磨器中 (设定温度为 4°C , 工作频率为 60 Hz), 进行 30 s 的研磨操作, 间隔 15 s 后重复 2 次, 直至组织完全匀浆, 无明显颗粒状残留物。匀浆完成后, 将所得样本转移至预冷的离心管中, 使用预先冷却至 4°C 的高速离心机, 在 12 000 r/min 的转速下离心 30 min。离心结束后, 小心吸取上清液, 并将其转移至新的 EP 管中备用。根据 ELISA 试剂盒的操作指南, 对每组小鼠的胼胝体、脊髓组织以及血液样本中的 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 等炎症因子的浓度进行定量检测。

1.2.7 全脑和脊髓 FA 荧光成像检测

向 4 组小鼠腹腔分别注射浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$ 的特异性 FA 荧光探针 Na-FA, 等待 30 min 后, 用 1.25% 三溴乙醇溶液麻醉小鼠。将小鼠安乐死后, 分离脑组织和脊髓组织, 用 PBS 冲洗以去除表面血液及杂质, 随后将组织样品转移至细胞培养 12 孔板中, 吸去周围液体, 放置于成像暗箱平台。实验全程在冰面上进行且避免光线照射, 选择激发/发射滤波器 ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}=430\text{ nm}/540\text{ nm}$), 进行荧光成像和软件定量。

1.2.8 血液、脑和脊髓组织 FA 浓度检测

样本处理同 1.2.6 方法。取组织样本加入黑色 96 孔板, 每孔依次加入 40 μl 小鼠组织样品或 FA 标准溶液、120 μl PBS 及 40 μl Na-FA 工作液, 在常温条件下避光孵育 30 min 后, 采用多功能酶标仪对样品进行荧光强度的测定, 其中激发波长设定为 440 nm, 发射波长选择 543 nm。依据 FA 标准溶液构建标准曲线, 通过曲线方程计算血液及各组织的 FA 浓度。

1.2.9 血液、胼胝体和脊髓组织 ROS 荧光强度检测

样本处理同 1.2.6 方法。取样本上清液加入黑色 96 孔板, 每孔加 200 μl 稀释倍数后的上清液及

2 μL 二氢乙锭 (dihydroethidium, DHE) 探针, 用移液枪吹打混匀, 37°C 避光孵育 30 min 后, 采用多功能酶标仪对样品进行 ROS 荧光强度的检测, 其中激发波长设定为 488 nm, 发射波长选择 610 nm, 定量每组的 ROS 荧光强度。

1.2.10 数据统计

本研究所有数据计算均采用 GraphPad Prism 10 软件完成, 免疫荧光结果分析借助 Image J 软件进行。实验数据以均数 $\pm$ 标准差 (mean $\pm$ SD) 表示, 以此反映数据的集中趋势与离散程度。在组间差异比较中, 多组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 若总体比较存在显著性, 则进一步采用 Bonferroni 法, 用于检验多组样本均值是否存在统计学差异; 而不同组间的两两比较则选用 *t* 检验, 检测两组间差异。统计学显著性阈值设定为 $P < 0.05$, 当 P 值小于该阈值时, 组间差异具有统计

学意义。本研究部分实验组样本量 (如 $n=3$) 虽能显示趋势, 但可能限制了统计功效, 根据前期预实验结果, 设定 $n=8$ 可使行为学差异的统计效能达到 80% 以上。结论的解释需考虑此局限性, 未来研究将增加样本量以提供更稳健的证据。

2 结 果

2.1 CPZ 诱导 MS 模型小鼠体重下降及行为学异常

本文利用旷场实验、爬杆实验、Y 迷宫实验以及体重测试, 检测了 4 组小鼠的自发活动、运动协调、短期空间记忆能力和体重变化情况 (图 1b~e)。

体重测试结果显示: 与 NS 组相比, CPZ+NS 组小鼠出现进食量减少、体重增长缓慢, 从第 21 天起体重呈下降趋势, 至第 43 天体重显著下降 ($P < 0.0001$); 但是经 NaHSO_3 和 PEG-ATX@NPs 干

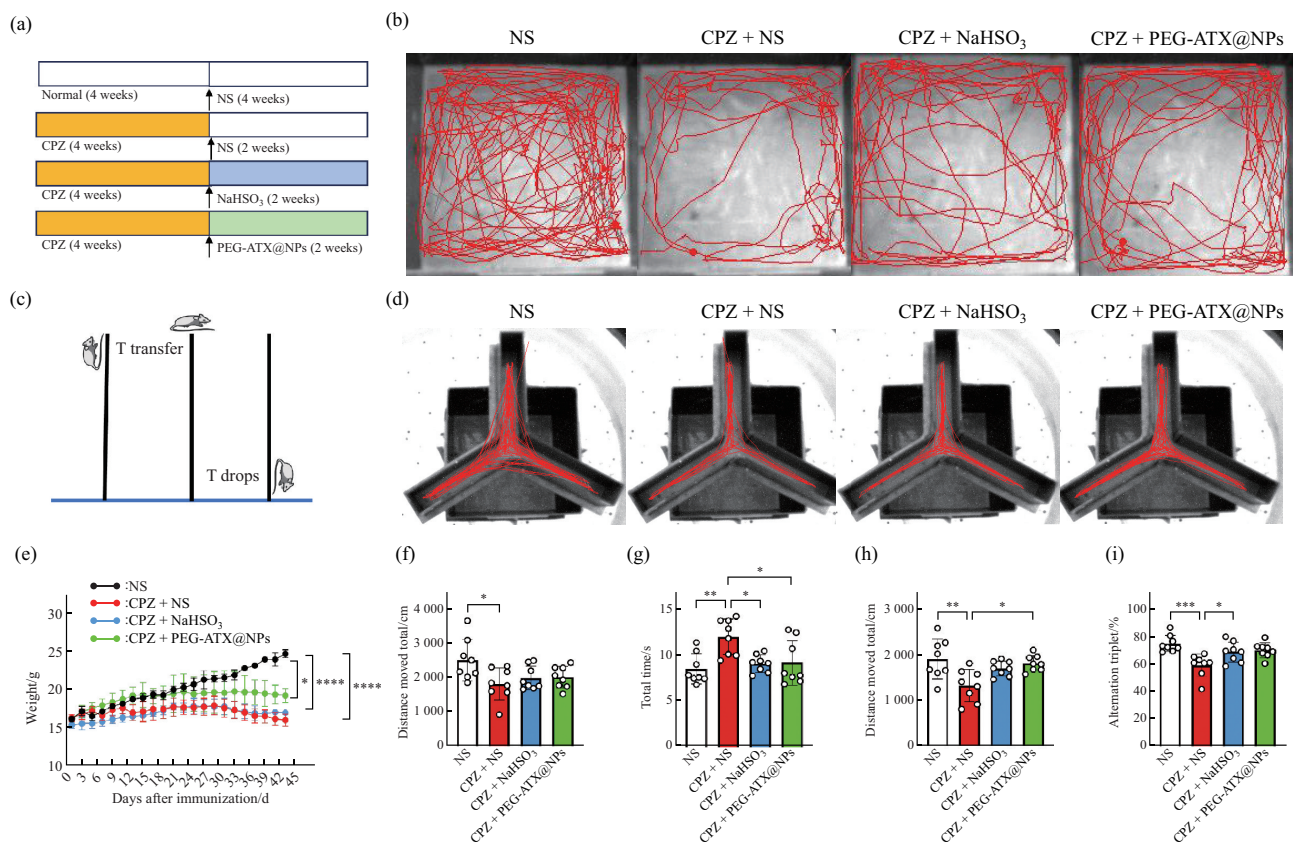


Fig. 1 Schematic of the experimental design and effects of different treatments on behavioral changes and body weight in mice (mean $\pm$ SD, $n=3-8$)

(a) Schematic diagram of experimental group design; (b) open field test trajectory diagram; (c) pole climbing test schematic diagram; (d) Y-maze test trajectory diagram; (e) statistical analysis of weight changes during modeling and drug administration; (f) statistical analysis of total movement distance in the open field test; (g) statistical analysis of total movement time in the pole climbing test; (h) statistical analysis of total movement distance in the Y-maze test; (i) statistical analysis of total movement distance and spontaneous alternation rate in the Y-maze test. All data are presented as mean $\pm$ standard deviation. One-way analysis of variance (ANOVA) was used for statistical analysis, followed by Bonferroni post hoc test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

预后, 小鼠体重至第43天体重逐步回升 ($P<0.05$,

旷场实验结果显示: 与NS组相比, CPZ+NS组小鼠在旷场的轨迹路程减少 (图1b), 同时在旷场实验中活动总距离显著减少 ($P<0.05$, 图1f)。

爬杆实验结果显示: 与NS组相比, CPZ+NS组小鼠在爬杆实验中从平衡杆爬至地面的时间明显延长 ($P<0.01$, 图1g); 与CPZ+NS组相比, CPZ+NaHSO₃组和CPZ+PEG-ATX@NPs组从平衡杆爬至地面的时间明显缩短 ($P<0.05$, 图1g)。

Y迷宫实验结果显示: 与NS组相比, CPZ+NS组小鼠在Y迷宫实验中活动总距离显著减少 ($P<0.01$, 图1h) 和短时记忆能力明显下降 ($P<0.001$, 图1i); 与CPZ+NS组相比, CPZ+PEG-ATX@NPs组小鼠在Y迷宫实验中活动总距离显著增加 ($P<0.05$, 图1h), CPZ+NaHSO₃组小鼠在Y迷宫实验中短时记忆能力显著提升 ($P<0.05$, 图1i)。

图1e)。

以上结果表明, 两种FA消除剂可改善CPZ诱导的脱髓鞘、体重减轻及行为学异常。

2.2 FA清除剂降低MS模型小鼠体内甲醛水平

通过Na-FA探针分别检测小鼠血液、胼胝体和脊髓中FA的浓度 (图2)。

血液中FA检测结果显示: 与NS组相比, CPZ+NS组血液FA浓度显著升高 ($P<0.01$, 图2a); 与CPZ+NS组相比, CPZ+NaHSO₃组血液FA浓度显著降低 ($P<0.01$, 图2a)。

胼胝体中FA检测结果显示: 与NS组相比, CPZ+NS组胼胝体FA浓度显著升高 ($P<0.001$, 图2b); 与CPZ+NS组相比, CPZ+NaHSO₃组胼胝体FA浓度显著降低 ($P<0.05$, 图2b)。

脊髓中FA检测结果显示: 与NS组相比, CPZ+NS组脊髓FA浓度显著升高 ($P<0.01$, 图2c); 与CPZ+NS组相比, CPZ+NaHSO₃组脊髓组

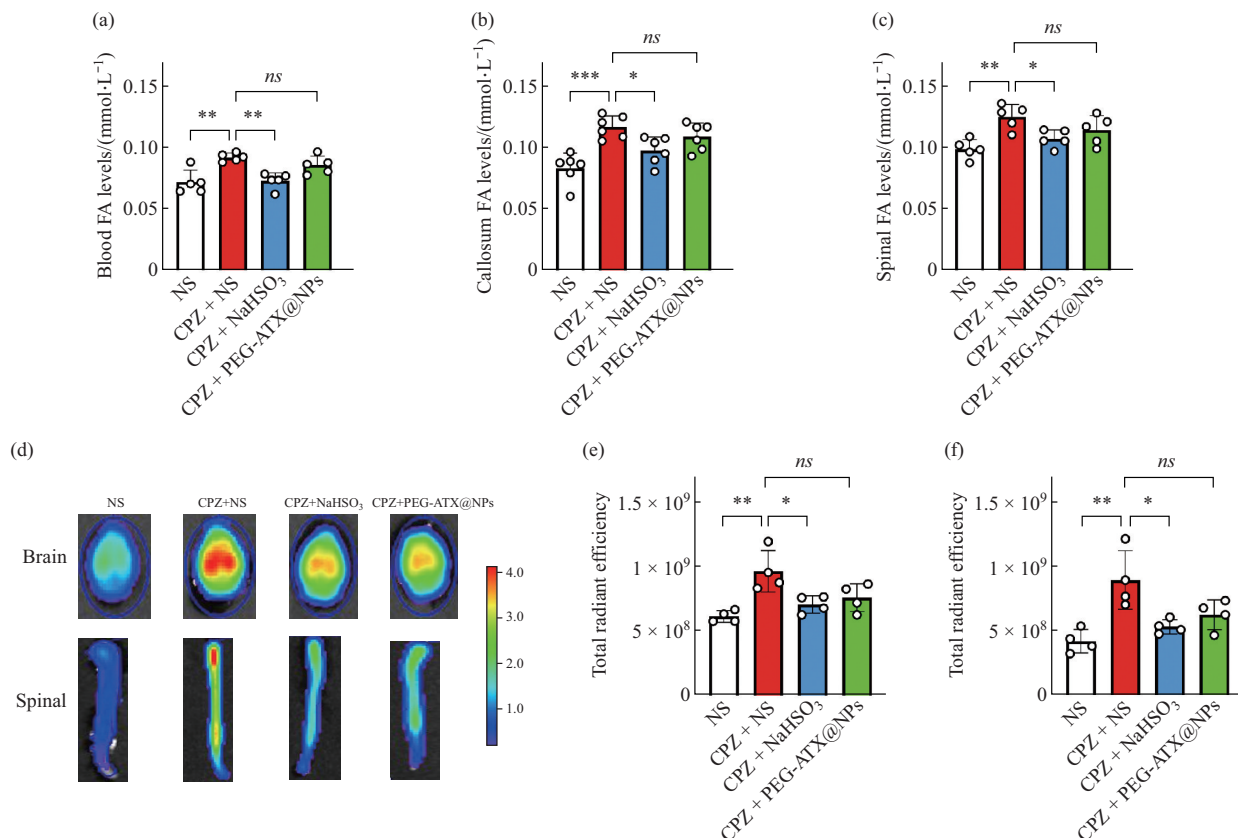


Fig. 2 Effects of different treatments on endogenous formaldehyde levels in the blood, callosum and spinal

(a) Quantitative statistical analysis chart of FA concentration in mouse blood detected by Na-FA probe; (b) quantitative statistical analysis chart of FA concentration in mouse callosum detected by Na-FA probe; (c) quantitative statistical analysis chart of FA concentration in mouse spinal cord detected by Na-FA probe; (d) fluorescence imaging of FA in mouse brain and spinal using Na-FA probe via *in vivo* animal imaging system; (e) statistical quantitative analysis chart of fluorescence intensity in mouse brain by small animal *in vivo* imaging; (f) statistical quantitative analysis chart of fluorescence intensity in mouse spinal cord by small animal *in vivo* imaging. All data are presented as mean±standard deviation. Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Bonferroni post hoc test. $n=3-6$; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; ns: not statistically significant.

织FA浓度显著降低 ($P<0.05$, 图2c)。但是, 与CPZ+NS组相比, CPZ+PEG-ATX@NPs组小鼠血液、胼胝体和脊髓中FA的浓度有下降趋势, 但无显著意义。

通过小动物活体成像系统对小鼠全脑及脊髓组织进行检测, 成像结果显示, 与NS组相比, CPZ+NS组全脑和脊髓成像的荧光更强, 但经过NaHSO₃和PEG-ATX@NPs干预后, CPZ+NaHSO₃组和CPZ+PEG-ATX@NPs组全脑和脊髓成像的荧光减弱(图2d)。

进一步统计分析发现: 与NS组相比, CPZ+NS组全脑荧光强度更高 ($P<0.01$, 图2e); 与CPZ+NS组相比, CPZ+NaHSO₃组全脑荧光强度降低 ($P<0.05$, 图2e)。与NS组相比, CPZ+NS组脊髓的荧光强度也更高 ($P<0.01$, 图2f); 与CPZ+NS组相比, CPZ+NaHSO₃组全脑荧光强度降低 ($P<0.05$, 图2f)。与CPZ+NS组相比, CPZ+PEG-ATX@NPs组脊髓FA荧光强度有下降趋势, 但无统计意义。

上述结果表明, FA消除剂NaHSO₃和PEG-ATX@NPs减少了小鼠的胼胝体组织、脊髓组织及血液中的FA浓度。

2.3 FA清除剂减少MS模型小鼠促炎症因子的释放

通过ELISA方法检测血液、胼胝体和脊髓的促炎症因子TNF- α 、IL-1 β 和IL-6含量水平(图3)。

血液中检测结果显示: 与NS组相比, CPZ+NS组小鼠血液中TNF- α ($P<0.01$, 图3a)、IL-1 β ($P<0.001$, 图3d)和IL-6 ($P<0.05$, 图3g)含量显著升高; 与CPZ+NS组相比, CPZ+NaHSO₃组小鼠血液中TNF- α ($P<0.01$, 图3a)和IL-1 β ($P<0.05$, 图3d)含量显著降低, CPZ+PEG-ATX@NPs组小鼠血液IL-1 β ($P<0.01$, 图3d)含量显著降低。

胼胝体中检测结果显示: 与NS组相比, CPZ+NS组小鼠胼胝体中TNF- α ($P<0.001$, 图3b)、IL-1 β ($P<0.001$, 图3e)和IL-6 ($P<0.001$, 图3h)含量显著升高; 与CPZ+NS组相比, CPZ+NaHSO₃组小鼠胼胝体中IL-1 β ($P<0.01$, 图3e)含量显著降低, CPZ+PEG-ATX@NPs组小鼠胼胝体中TNF- α ($P<0.05$, 图3b)、IL-1 β ($P<0.01$, 图3e)和IL-6 ($P<0.01$, 图3h)含量显著降低。

脊髓中检测结果显示: 与NS组相比, CPZ+NS组小鼠脊髓中TNF- α ($P<0.001$, 图3c)、IL-1 β

($P<0.01$, 图3f)和IL-6 ($P<0.01$, 图3i)含量显著升高; 与CPZ+NS组相比, CPZ+NaHSO₃组小鼠脊髓中TNF- α ($P<0.05$, 图3c)含量显著降低, CPZ+PEG-ATX@NPs组小鼠脊髓中IL-1 β ($P<0.01$, 图3f)和IL-6 ($P<0.01$, 图3i)含量显著降低。

以上结果提示, 清除内源FA可抑制神经炎症反应。

2.4 FA清除剂减轻胼胝体脱髓鞘

采用LFB组织化学染色评估胼胝体脱髓鞘变化, 定位小鼠脑的胼胝体部位(图4b)。染色结果(图4a)显示, 与NS组相比, CPZ+NS组在CPZ诱导4周后有髓鞘区域的密度(蓝色)明显降低, 说明该组小鼠胼胝体出现明显的髓鞘脱失, 在NaHSO₃和PEG-ATX@NPs干预后, 观察到有髓鞘区域的密度显著增加。通过量化胼胝体区域髓鞘缺失(脱髓鞘)的面积与空白对照组相比的比率的定量分析结果表明, 与NS组相比, CPZ+NS组小鼠脱髓鞘面积比较严重 ($P<0.01$) (图4c), 与CPZ+NS组相比, CPZ+NaHSO₃组和CPZ+PEG-ATX@NPs组小鼠的脱髓鞘会有缓解但无显著意义。这些结果说明, 通过清除FA可以有效缓解胼胝体脱髓鞘。

2.5 内源FA蓄积增强胼胝体氧化应激

氧化应激也是脱髓鞘的一种重要机制。为进一步阐明FA毒性是否涉及氧化应激途径, 本文评估了小鼠血液、胼胝体和脊髓中的ROS荧光强度, 并分析了ROS荧光强度与胼胝体FA浓度的相关性(图5)。

血液中检测结果显示: 与NS组相比, CPZ+NS组小鼠的血液中ROS荧光强度显著升高 ($P<0.01$, 图5a); 与CPZ+NS组相比, CPZ+PEG-ATX@NPs组小鼠的血液中ROS荧光强度显著降低 ($P<0.05$, 图5a)。

胼胝体中检测结果显示: 与NS组相比, CPZ+NS组小鼠的胼胝体中ROS荧光强度显著升高 ($P<0.01$, 图5b); 与CPZ+NS组相比, CPZ+PEG-ATX@NPs组和CPZ+NaHSO₃组小鼠的胼胝体中ROS荧光强度有降低趋势且无显著意义。

脊髓中检测结果显示: 与NS组相比, CPZ+NS组小鼠的脊髓中ROS荧光强度显著升高 ($P<0.001$, 图5c); 与CPZ+NS组相比, CPZ+NaHSO₃组小鼠的脊髓中ROS荧光强度有显著降低 ($P<0.05$, 图5c), CPZ+PEG-ATX@NPs组小鼠的

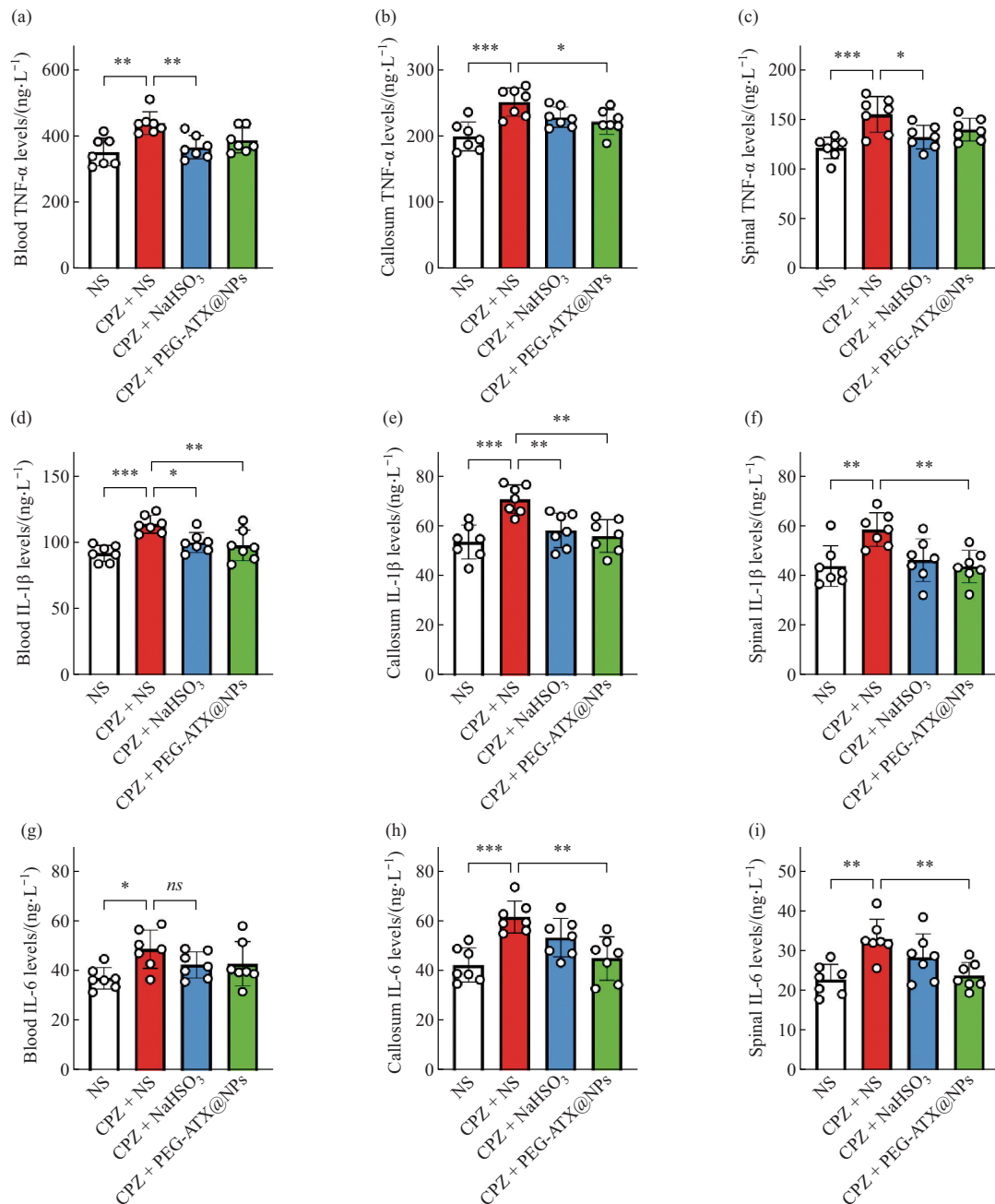


Fig. 3 The effects of different treatments on the expression of neuroinflammatory cytokines

(a) Statistical analysis of TNF- α concentration in blood; (b) statistical analysis of TNF- α concentration in callosum; (c) statistical analysis of TNF- α concentration in spinal; (d) statistical analysis of IL-1 β concentration in blood; (e) statistical analysis of IL-1 β concentration in callosum; (f) statistical analysis of IL-1 β concentration in spinal; (g) statistical analysis of IL-6 concentration in blood; (h) statistical analysis of IL-6 concentration in callosum; (i) statistical analysis of IL-6 concentration in spinal. All data are expressed as mean $\pm$ standard deviation. Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Bonferroni post hoc test. $n=7$; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; ns: not statistically significant.

脊髓中 ROS 荧光强度有显著降低 ($P<0.01$, 图 5c)。

相关性分析发现, CPZ+NS 组小鼠胼胝体的 FA 浓度与血液中 ROS 荧光强度呈正相关 ($P<0.01$, 图 5d)、与胼胝体组织中 ROS 荧光强度呈正相关 ($P<0.01$, 图 5e), 与脊髓组织中 ROS 荧光强度呈

正相关 ($P<0.01$, 图 5f)。

以上结果表明, 通过清除内源性 FA, 可有效抑制氧化应激反应, 从而减轻小鼠的脱髓鞘程度。

2.6 FA 清除剂减少小胶质细胞活化

小胶质细胞活化作为判断神经炎症的核心环节, 为在细胞水平去验证 FA 清除的抗炎效果, 本

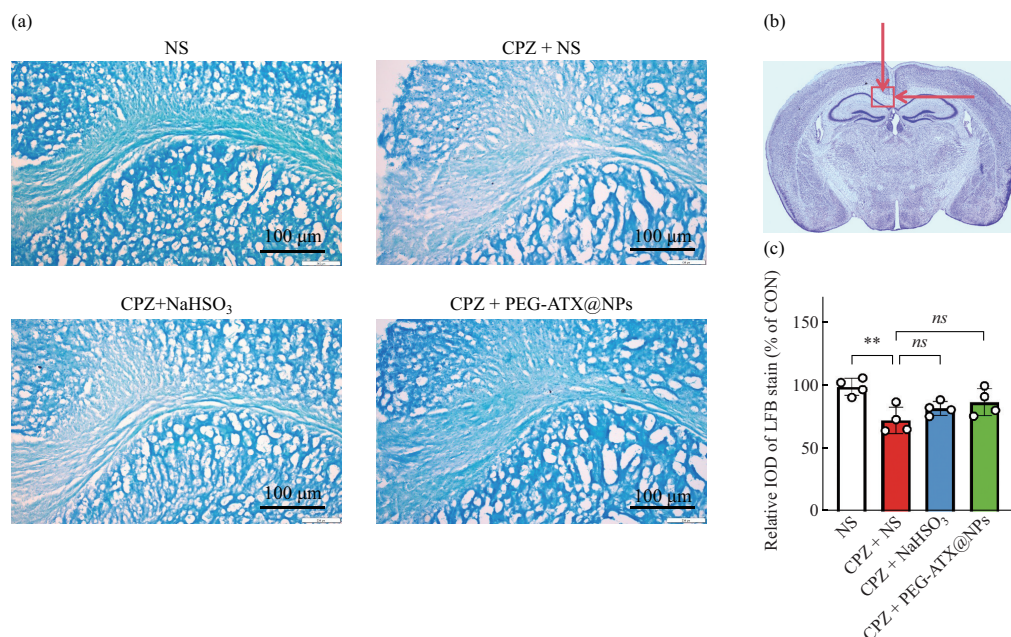


Fig. 4 Characterization of demyelination in the corpus callosum assessed by LFB histochemistry

(a) Representative images of LFB-stained coronal sections of the callosum from four different types of modeled mice; (b) the marked area on the brain coronal section represents the callosum region; (c) quantitative assessment of the demyelinated area ratio in each group using Image J software. All data are presented as mean±standard deviation. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test. $n=4$; ** $P<0.01$; ns: Not significant.

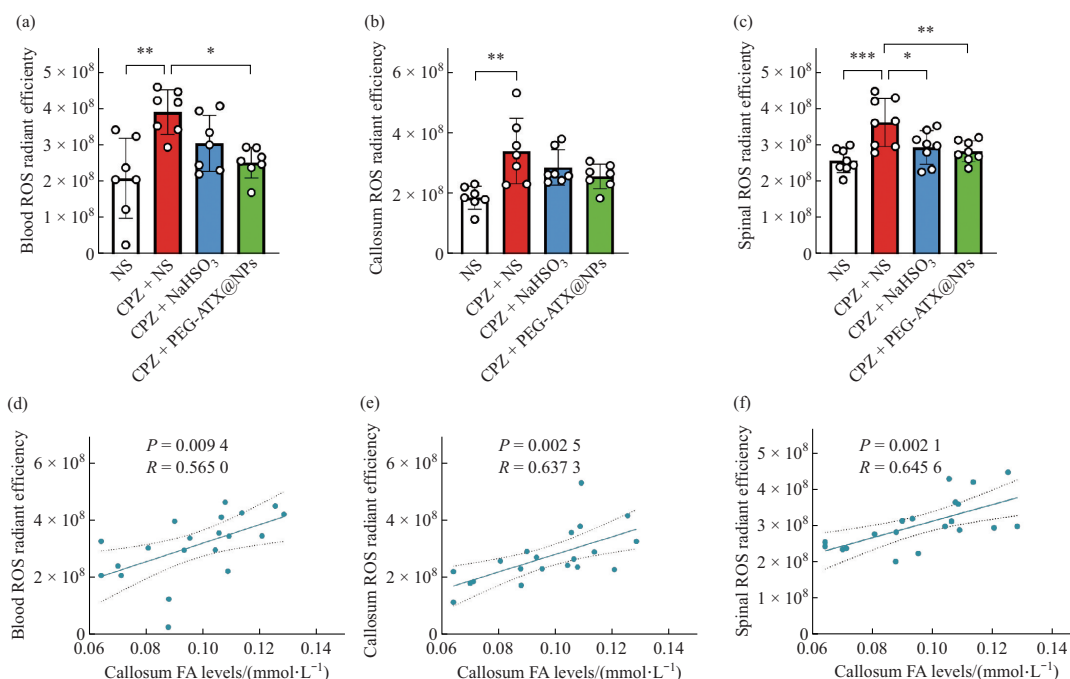


Fig. 5 Quantification of reactive oxygen species levels in tissues and their correlation with formaldehyde concentration in the callosum

(a) Fluorescence intensity of reactive oxygen species in mouse blood; (b) fluorescence intensity of reactive oxygen species in callosum tissue of mouse brain; (c) fluorescence intensity of reactive oxygen species in mouse spinal; (d) correlation between reactive oxygen species fluorescence intensity in mouse blood and formaldehyde concentration in the callosum; (e) correlation between reactive oxygen species fluorescence intensity in the mouse callosum and formaldehyde concentration in the callosum; (f) correlation between reactive oxygen species fluorescence intensity in the mouse spinal and formaldehyde concentration in the callosum. P values represent results of Pearson correlation analysis, and R values indicate Pearson correlation coefficients. Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni post hoc test. All data are presented as mean±standard deviation. $n=7$; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

文通过免疫荧光染色观察了胼胝体区小胶质细胞标志物 Iba1 的表达与形态变化 (图 6), 定位小鼠脑部的胼胝体区域 (图 6b)。通过荧光图结果显示 (图 6a), NS 组小鼠脑内小胶质细胞多呈分支状, 而 CPZ+NS 组小鼠脑中小胶质细胞多呈阿米巴样, 胞体增大, 呈类圆形巨细胞形态, 分支短小, 也可以看到 CPZ+NaHSO₃ 和 CPZ+PEG-ATX@NPs 组小鼠小胶质细胞形态较 CPZ+NS 组有所改变, 形态趋于正常组。

进一步定量分析发现: 与 NS 组比较, CPZ+

NS 组小鼠胼胝体区域的 Iba1 阳性小胶质细胞数量明显增多 ($P<0.001$) (图 6c); 与 CPZ+NS 模型组比较, CPZ+PEG-ATX@NPs 组小鼠胼胝体小胶质细胞数量明显减少 ($P<0.01$) (图 6c)。同时与 NS 组比较, Iba1 阳性细胞占 DAPI 标记总细胞的比例也增加 ($P<0.001$) (图 6d); 与 CPZ+NS 模型组比较, CPZ+PEG-ATX@NPs 组 Iba1 阳性细胞占 DAPI 标记总细胞的比例也减少 ($P<0.01$) (图 6d)。

以上结果说明, 清除 FA 可以有效抑制小胶质细胞中 Iba1 的表达, 减少小胶质细胞异常活化。

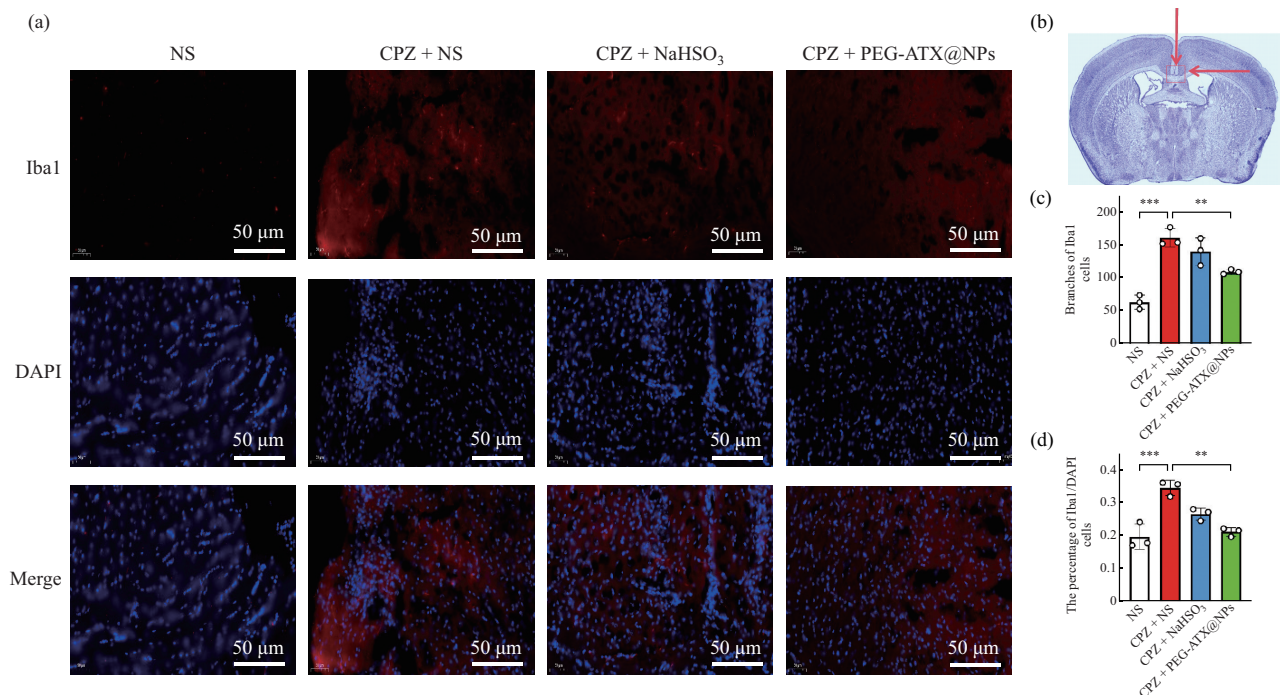


Fig. 6 Immunofluorescence analysis of microglial activation and morphological changes in the corpus callosum

(a) Immunofluorescence staining of microglia was performed using Iba1 antibody and DAPI dye. Iba1: ionized calcium-binding adapter molecule 1 (red, a microglial marker). DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole (blue, a nuclear dye). (b) The labeled area on the brain coronal section represents the corpus callosum region. (c) Statistical analysis of the number of branches in microglia. (d) Statistical analysis of the number of branches in microglia. All data are presented as mean±standard deviation. One-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test was used. $n=3$; ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

2.7 FA水平与炎症因子浓度、行为学相关性分析

CPZ 饲料干预的小鼠血清、胼胝体和脊髓组织的 FA 浓度与细胞因子释放促炎症因子之间是有关联的^[25], 本文通过线性相关性分析, 以检验这些变量之间的关系。

结果显示, 检测的 CPZ+NS 组小鼠组织样本中, 血清 FA 水平与 TNF- α 呈正相关 ($P=0.000\ 1$, 图 7a)、与 IL-1 β 浓度呈较弱正相关 ($P=0.727\ 1$, 图 7b) 和 IL-6 浓度呈较弱正相关 ($P=0.057\ 9$, 图 7c), 胼胝体 FA 水平与 TNF- α 浓度呈较弱正相关 ($P=0.395\ 0$, 图 7d)、与 IL-1 β 浓度呈正相关

($P<0.05$, 图 7e) 和 IL-6 浓度呈正相关 ($P<0.01$, 图 7f), 脊髓 FA 水平与 TNF- α 浓度呈较弱正相关 ($P=0.455\ 1$, 图 7g)、IL-1 β 浓度呈较弱正相关 ($P=0.123\ 4$, 图 7h) 与 IL-6 浓度呈正相关 ($P<0.05$, 图 7i)。

此外, 还分析药物主要作用的脑区中胼胝体组织 FA 水平与旷场的运动距离呈较弱负相关 ($P=0.163\ 1$, 图 7j), 与爬杆的下降时间的平衡能力呈正相关 ($P<0.05$, 图 7k), 与 Y 迷宫的自发交替率的记忆能力下降时间的平衡能力呈负相关 ($P<0.01$, 图 7l)。

本研究也观察到 FA 水平与其他部分炎症指标

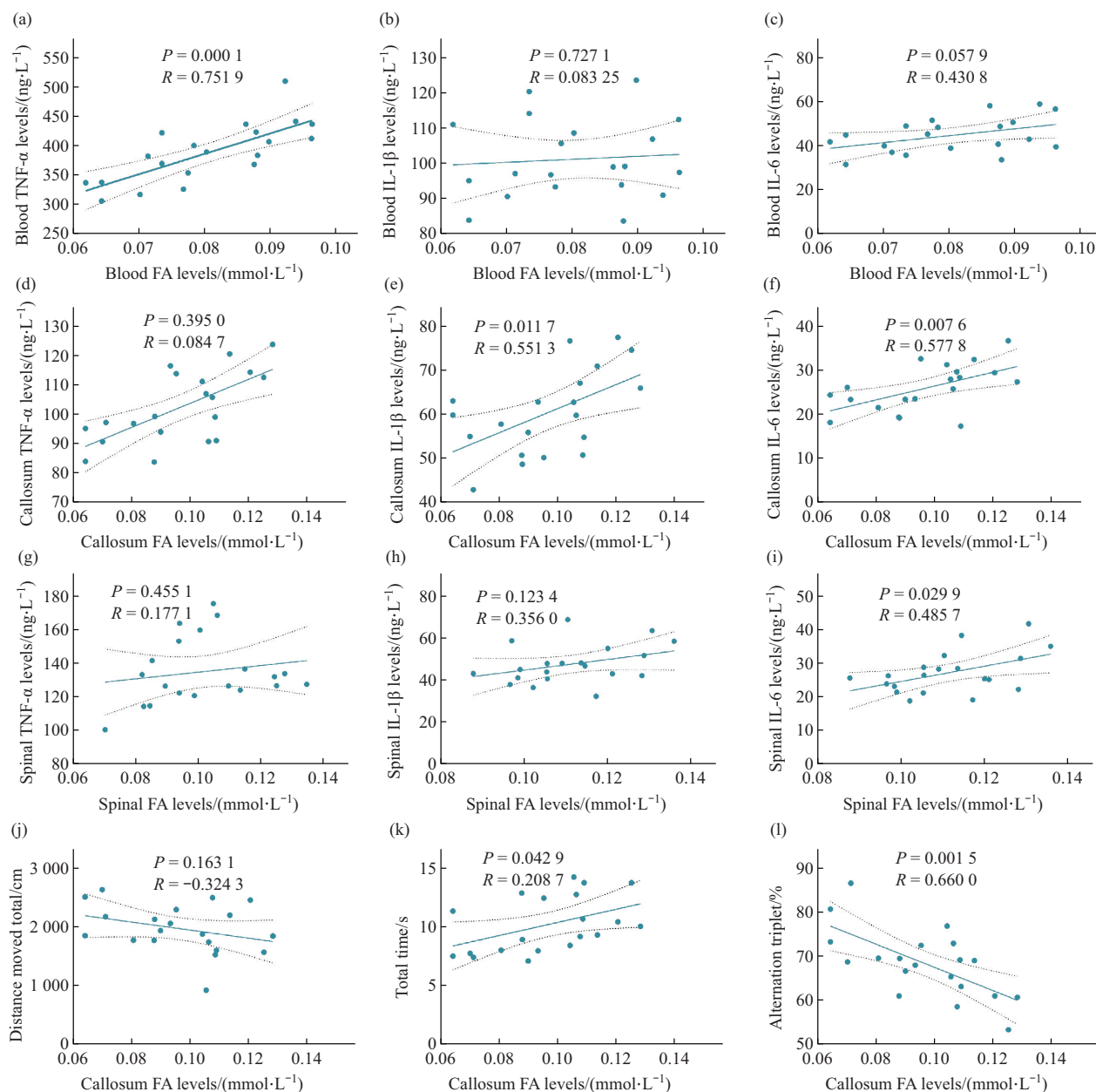


Fig. 7 Correlation analyses between endogenous formaldehyde levels, inflammatory cytokines and behavioral indices

(a) Statistical analysis of the correlation between blood FA levels and TNF- α ; (b) statistical analysis of the correlation between blood FA levels and IL-1 β ; (c) statistical analysis of the correlation between blood FA levels and IL-6; (d) statistical analysis of the correlation between callosum FA levels and TNF- α ; (e) statistical analysis of the correlation between callosum FA levels and IL-1 β ; (f) statistical analysis of the correlation between callosum FA levels and IL-6; (g) statistical analysis of the correlation between spinal FA levels and TNF- α ; (h) statistical analysis of the correlation between spinal FA levels and IL-1 β ; (i) statistical analysis of the correlation between spinal FA levels and IL-6; (j) statistical analysis of the correlation between FA levels in the corpus callosum and total distance traveled in the open field test; (k) statistical analysis of the correlation between FA levels in the corpus callosum and total time spent in the pole climbing test; (l) statistical analysis of the correlation between FA levels in the corpus callosum and memory performance. P values are Pearson correlation analyses and R values are Pearson correlation coefficients.

及行为学参数之间存在一定的变化趋势，尽管未达到统计学显著性，这些数据也表明内源性FA水平与部分炎症因子存在关联性，尤其是胼胝体组织中内源性FA蓄积对炎症因子和行为变化的影响。

3 讨论

3.1 蓄积的FA是诱发MS的可能机制

本研究探讨了胼胝体与脊髓组织中内源性FA

蓄积与MS发生的联系,发现FA消除剂 NaHSO_3 和PEG-ATX@NPs可降低体内FA浓度。特别是胼胝体与脊髓组织中蓄积的FA浓度与促炎症因子水平呈显著正相关。蓄积的FA可穿透血脑屏障直接诱发炎症反应^[26]。清除FA能够降低组织炎症水平^[27],减少小胶质细胞活化并改善运动与认知缺陷,提示蓄积的FA诱发了MS的发生。

FA驱动脱髓鞘的可能存在多种机制。a. 蛋白质修饰介导的直接损伤作用: FA可对髓鞘碱性蛋白核心结构发生修饰,导致蛋白质构象与功能异常,直接削弱髓鞘的结构完整性与稳定性,进而触发髓鞘的分解及降解进程。b. 刺激炎症因子释放FA可刺激巨噬细胞和小胶质细胞释放炎症因子,而后者导致轴突损伤并继发性诱导髓鞘丢失,这一过程是脱髓鞘疾病病理进展的关键环节^[28]。就小胶质细胞而言,其形态学特征与生理功能存在显著关联:在生理稳态下,这类细胞处于静息态,表现为细长突起的固定分布,并通过突起的动态延伸感知微环境变化;然而,当CNS遭遇损伤性刺激时,小胶质细胞会快速转化为阿米巴样活化态^[29]。研究数据表明,TNF- α 、IL-1 β 、IL-6等炎症介质的异常分泌是小胶质细胞激活的重要标志^[30]。di Penta等^[31]研究表明,降低氧化应激水平及促炎症细胞因子的表达,有助于改善与神经炎症相关的脱髓鞘和轴突损伤^[32]。c. 本研究发现,FA积累与ROS水平升高显著相关。FA可促进小胶质细胞释放大量的ROS,进一步加剧少突胶质细胞的氧化应激损伤,同时使机体氧化应激反应异常增强,且相关氧化应激酶的活性与含量显著降低^[33],同时抑制OL存活与髓鞘再生能力,形成了内源性FA在体内过多的蓄积进而导致脱髓鞘病变的恶性循环(图S1a)。通过 NaHSO_3 和PEG-ATX@NPs这两种FA清除剂可以有效地作用于体内的内源性FA,减少FA的蓄积对体内髓鞘的影响(图S1b, c)。未来的研究将聚焦于验证FA是否通过调控如核因子 κB (nuclear factor- κB , NF- κB)或核转录因子红系2相关因子2(nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2)等关键信号通路来介导这一过程。

3.2 蓄积的FA作为MS治疗新靶点

MS的发病机制尚未明确,现阶段临床干预方案主要聚焦于免疫调节^[34], β 干扰素、醋酸格拉默、芬戈莫德等具有免疫调节特性的制剂^[35]。尽管这些已获批准的药物治疗可缓解病情并改善生活质量,但对慢性进展期的持续性脱髓鞘与轴突损伤

作用有限,亦难以促进髓鞘再生^[36]。因此,开发新型、更具针对性的治疗策略具有迫切性。本研究提出的“清除过量内源性FA”策略从非免疫途径出发,可通过减少FA直接损伤髓鞘的作用,并缓解与脱髓鞘伴随的炎症及氧化应激。既往研究亦提示,FA可能在MS病理中发挥作用,其机制涉及氧化应激、炎症反应及髓鞘破坏等^[37-38]。尽管部分指标变化未达到显著水平,但整体趋势支持“内源性FA参与脱髓鞘病理过程”的假设,因果关系仍需进一步机制实验验证。

所采用的CPZ模型具有OL丢失、持续脱髓鞘与炎症激活等特征^[39],与MS慢性进展期高度相关^[40]。因此,本研究中 NaHSO_3 与PEG-ATX@NPs的干预策略,在转化意义上更侧重于MS慢性进展阶段的神经保护,旨在延缓脱髓鞘进程、减轻继发的神经炎症与氧化损伤,而非急性期的免疫抑制。从临床转化角度看, NaHSO_3 具有既往安全性基础,可作为辅助疗法,与现有免疫调节药物联合应用,尤其适用于对常规治疗响应不佳的进展型MS患者^[41]。而PEG-ATX@NPs作为一种创新的脑内靶向递送系统,其转化路径需经历更严格的临床前开发,包括药代动力学、长期毒理学评价以及剂型优化,未来有望成为针对血脑屏障穿透性要求高的神经保护性治疗新选择^[42]。

4 结 论

本研究结果表明:通过调控内源性FA的过度生成,能够显著缓解CPZ诱发的小鼠脱髓鞘模型中运动协调能力下降及行为异常现象,同时减少髓鞘损伤程度。该机制主要涉及抑制小胶质细胞的病理性激活,从而有效降低神经炎症与氧化应激水平。这种干预方式不仅优化了脑组织的微环境,还在髓鞘保护方面展现出显著效果。

本研究首次揭示了清除内源性FA在CPZ诱导的慢性脱髓鞘模型中的保护作用,但仍存在一些局限性。首先,实验干预周期相对较短,未能评估 NaHSO_3 与PEG-ATX@NPs的长期使用安全性,例如其对肝、肾等主要器官的潜在影响。其次,本研究仅设置了单一剂量进行干预,缺乏系统的剂量-效应关系研究,未来需通过设置不同剂量梯度以确定最佳治疗窗。后续研究将重点考察长期给药的安全性,并深入探索不同剂量下FA清除效率与神经保护效果的关联,为最终的临床转化提供更充分的实验依据。

内源性FA的异常蓄积可能是影响脱髓鞘疾病发生发展的重要因素,而清除体内过量内源性FA作为潜在治疗靶点,有望为MS等脱髓鞘病变的干预提供新策略。不过,其调控小胶质细胞的具体作用机制仍需进一步实验验证。

附件 见本文网络版 (<http://www.pibb.ac.cn>, <http://www.cnki.net>) :

PIBB_20250350_Figure_S1.pdf

参 考 文 献

- [1] Marcus R. What is multiple sclerosis?. JAMA, 2022, **328**(20): 2078
- [2] Sato F, Nakamura Y, Katsuki A, *et al.* Curdlan, a microbial β -glucan, has contrasting effects on autoimmune and viral models of multiple sclerosis. Front Cell Infect Microbiol, 2022, **12**: 805302
- [3] Pollock N M, Fernandes J P, Woodfield J, *et al.* Gasdermin D activation in oligodendrocytes and microglia drives inflammatory demyelination in progressive multiple sclerosis. Brain Behav Immun, 2024, **115**: 374-393
- [4] Tian D C, Zhang C, Yuan M, *et al.* Incidence of multiple sclerosis in China: a nationwide hospital-based study. Lancet Reg Health West Pac, 2020, **1**: 100010
- [5] An K, Xue M J, Zhong J Y, *et al.* Arsenic trioxide ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice by inducing CD4⁺ T cell apoptosis. J Neuroinflammation, 2020, **17**(1): 147
- [6] Nave K A, Werner H B. Ensheatment and myelination of axons: evolution of glial functions. Annu Rev Neurosci, 2021, **44**: 197-219
- [7] Zirngibl M, Assinck P, Sizov A, *et al.* Oligodendrocyte death and myelin loss in the cuprizone model: an updated overview of the intrinsic and extrinsic causes of cuprizone demyelination. Mol Neurodegener, 2022, **17**(1): 34
- [8] Ai L, Tan T, Tang Y, *et al.* Endogenous formaldehyde is a memory-related molecule in mice and humans. Commun Biol, 2019, **2**: 446
- [9] Robertson M P, Miller S L. An efficient prebiotic synthesis of cytosine and uracil. Nature, 1995, **375**(6534): 772-774
- [10] Kou Y, Zhao H, Cui D, *et al.* Formaldehyde toxicity in age-related neurological dementia. Ageing Res Rev, 2022, **73**: 101512
- [11] Geurts J J, Bè L, Roosendaal S D, *et al.* Extensive hippocampal demyelination in multiple sclerosis. J Neuropathol Exp Neurol, 2007, **66**(9): 819-827
- [12] Marceaux J C, Dilks L S, Hixson S. Neuropsychological effects of formaldehyde use. J Psychoact Drugs, 2008, **40**(2): 207-210
- [13] Khokhlov A P, Zavalishin I A, Savchenko I N, *et al.* Disorders of formaldehyde metabolism and its metabolic precursors in patients with multiple sclerosis. Zh Nevropatol Psikhiatr Im S S Korsakova, 1989, **89**(2): 45-48
- [14] Khalilian B, Madadi S, Fattahi N, *et al.* Coenzyme Q10 enhances remyelination and regulate inflammation effects of cuprizone in corpus callosum of chronic model of multiple sclerosis. J Mol Histol, 2021, **52**(1): 125-134
- [15] Lubrich C, Giesler P, Kipp M. Motor behavioral deficits in the cuprizone model: validity of the rotarod test paradigm. Int J Mol Sci, 2022, **23**(19): 11342
- [16] Liu B, Xin W, Tan J R, *et al.* Myelin sheath structure and regeneration in peripheral nerve injury repair. Proc Natl Acad Sci USA, 2019, **116**(44): 22347-22352
- [17] Kipp M. How to use the cuprizone model to study de- and remyelination. Int J Mol Sci, 2024, **25**(3): 1445
- [18] Sui R X, Miao Q, Wang J, *et al.* Protective and therapeutic role of Bilobalide in cuprizone-induced demyelination. Int Immunopharmacol, 2019, **66**: 69-81
- [19] Zhao D, Wu Y, Zhao H, *et al.* Midbrain FA initiates neuroinflammation and depression onset in both acute and chronic LPS-induced depressive model mice. Brain Behav Immun, 2024, **117**: 356-375
- [20] Yang G, Tong Y, Wang X, *et al.* Guizhi Fuling capsule relieves memory deficits by inhibition of microglial neuroinflammation through blocking JAK2/STAT3 pathway in presenilin1/2 conditional double knockout mice. Front Immunol, 2023, **14**: 1185570
- [21] Chen Z, Li W, Shi L, *et al.* Kidney-targeted astaxanthin natural antioxidant nanosystem for diabetic nephropathy therapy. Eur J Pharm Biopharm, 2020, **156**: 143-154
- [22] Zhou X, Wang C, Feng S, *et al.* Transactivating-transduction protein-polyethylene glycol modified liposomes traverse the blood-spinal cord and blood-brain barriers. Neural Regen Res, 2012, **7**(35): 2784-2792
- [23] Gu Z, Zhao H, Song Y, *et al.* PEGylated-liposomal astaxanthin ameliorates A β neurotoxicity and Alzheimer-related phenotypes by scavenging formaldehyde. J Control Release, 2024, **366**: 783-797
- [24] Koch-Henriksen N, Magyari M. Apparent changes in the epidemiology and severity of multiple sclerosis. Nat Rev Neurol, 2021, **17**(11): 676-688
- [25] Sen M K, Mahns D A, Coorssen J R, *et al.* Behavioural phenotypes in the cuprizone model of central nervous system demyelination. Neurosci Biobehav Rev, 2019, **107**: 23-46
- [26] Shcherbakova L N, Tel'pukhov V I, Trenin S O, *et al.* Permeability of the blood-brain barrier for intravascular formaldehyde. Bull Exp Biol Med, 1986, **102**(5): 1553-1554
- [27] Correale J, Marrodan M, Ysraelit M C. Mechanisms of neurodegeneration and axonal dysfunction in progressive multiple sclerosis. Biomedicine, 2019, **7**(1): E14
- [28] Rauf A, Badoni H, Abu-Izneid T, *et al.* Neuroinflammatory markers: key indicators in the pathology of neurodegenerative diseases. Molecules, 2022, **27**(10): 3194
- [29] 李彦青,杨智超,王翰斌,等. 细叶远志皂苷通过抑制炎症与氧化应激减轻CPZ诱导的小鼠髓鞘脱失. 时珍国医国药, 2023,

- 34(11):2599-2605
- Li Y Q, Yang Z C, Wang H B, *et al.* Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2023, **34**(11): 2599-2605
- [30] Yue Y, Stone S, Lin W. Role of nuclear factor κ B in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neural Regen Res*, 2018, **13**(9): 1507-1515
- [31] di Penta A, Moreno B, Reix S, *et al.* Oxidative stress and proinflammatory cytokines contribute to demyelination and axonal damage in a cerebellar culture model of neuroinflammation. *PLoS One*, 2013, **8**(2): e54722
- [32] Costa I, Barbosa D J, Silva V, *et al.* Research models to study ferroptosis's impact in neurodegenerative diseases. *Pharmaceutics*, 2023, **15**(5): 1369
- [33] Mihai D P, Ungurianu A, Ciotu C I, *et al.* Effects of venlafaxine, risperidone and febuxostat on cuprizone-induced demyelination, behavioral deficits and oxidative stress. *Int J Mol Sci*, 2021, **22**(13): 7183
- [34] Han M, Sun Y, Zhao W, *et al.* Comprehensive characterization of TNFSF14/LIGHT with implications in prognosis and immunotherapy of human gliomas. *Front Immunol*, 2022, **13**: 1025286
- [35] 李彦青, 李晓慧, 王青, 等. 灵孢多糖促进双环己酮草酰二胺诱导的脱髓鞘小鼠髓鞘再生的机制. 2025(7): 1265-1273
- Li Y Q, Li X H, Wang Q, *et al.* *Chin Pharmacol Bull*, 2025(7): 1265-1273
- [36] He Y, An J, Yin J J, *et al.* Ethyl pyruvate-derived transdifferentiation of astrocytes to oligodendrogenesis in cuprizone-induced demyelinating model. *Neurotherapeutics*, 2021, **18**(1): 488-502
- [37] Matsuoka T, Takaki A, Ohtaki H, *et al.* Early changes to oxidative stress levels following exposure to formaldehyde in ICR mice. *J Toxicol Sci*, 2010, **35**(5): 721-730
- [38] Sayad-Fathi S, Zaminy A, Babaei P, *et al.* The methanolic extract of *Cinnamomum zeylanicum* bark improves formaldehyde-induced neurotoxicity through reduction of phospho-tau (Thr231), inflammation, and apoptosis. *Excli J*, 2020, **19**: 671-686
- [39] Zhan J, Mann T, Joost S, *et al.* The cuprizone model: dos and donots. *Cells*, 2020, **9**(4): E843
- [40] Klotz L, Antel J, Kuhlmann T. Inflammation in multiple sclerosis: consequences for remyelination and disease progression. *Nat Rev Neurol*, 2023, **19**(5): 305-320
- [41] Lubis M A R, Park B D, Lee S M. Modification of urea-formaldehyde resin adhesives with blocked isocyanates using sodium bisulfite. *Int J Adhes Adhes*, 2017, **73**: 118-124
- [42] Abd AL-Shaybany T N, AL-Dujaili A N. Physiological study of the effect astaxanthin (shrimp extract) on some biochemical markers in male rats induced by formaldehyde. *IOP Conf Ser Mater Sci Eng*, 2019, **571**(1): 012052

Nanopackaged Astaxanthin Improves Demyelination in Multiple Sclerosis Model Mice by Scavenging Excessive Endogenous Formaldehyde*

LÜ Wan-Jia^{1,2)}, ZENG Xin^{1,2)}, TONG Zhi-Qian⁴⁾, XING Yang⁶⁾, YANG Xu^{2,3)},
WU Mei-Na^{5)**}, MA Ping^{1,2,3)**}

⁽¹⁾College of Pharmacy, Hubei University of Science and Technology, Xianning 437100, China;

⁽²⁾Hubei Key Laboratory of Environmental Risk and Related Diseases Precision Prevention and Control, Hubei University of Science and Technology, Xianning 437100, China;

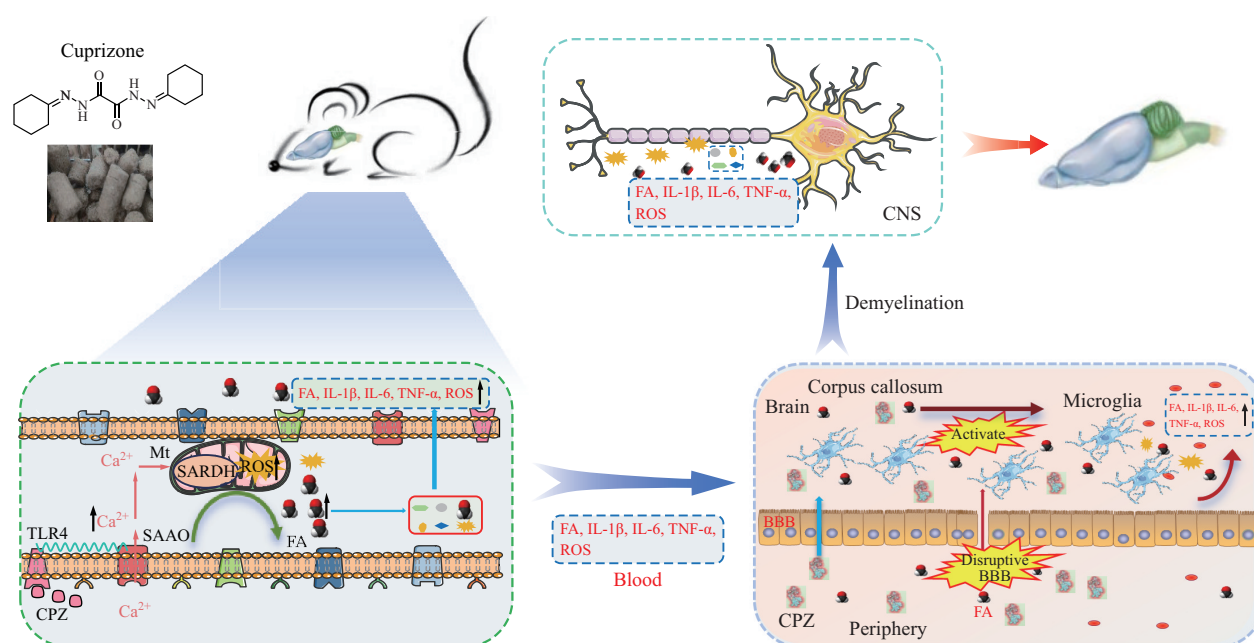
⁽³⁾Hubei Smart Health Industry Technology Research Institute, Xianning 437100, China;

⁽⁴⁾Beijing Geriatric Hospital, Beijing 100095, China;

⁽⁵⁾Department of Science, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China;

⁽⁶⁾Xianning Center for Disease Control and Prevention, Xianning 437100, China)

Graphical abstract



Abstract Objective Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory demyelinating disease of the central nervous system (CNS); however, its underlying neurological pathogenic mechanisms remain incompletely understood. Endogenous formaldehyde (FA), a metabolic byproduct of methylation-demethylation cycles, has

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (42177416, 42477452), the Key Project of Health Science and Technology of Hubei Province (WJ2025Z017) and Hubei Provincial Projects of the Science and Technology Innovation Base (Platform) (2025CDB024).

** Corresponding author.

MA Ping. Tel: 86-13886509837, E-mail: mping68@126.com

WU Mei-Na. Tel: 86-13834678553, E-mail: wmna@163.com

Received: July 22, 2025 Accepted: December 29, 2025

recently been implicated in neurotoxicity, oxidative damage, and cognitive impairment. This study aimed to investigate whether excessive FA contributes to myelin sheath demyelination in mice and to evaluate the protective effects and mechanisms of two FA-elimination strategies: sodium bisulfite (NaHSO_3), a classical FA scavenger, and polyethylene glycol-modified astaxanthin nanoparticles (PEG-ATX@NPs), a brain-targeted nano-antioxidant formulation. **Methods** A chronic demyelination model was established by feeding female C57BL/6J mice a diet containing 0.2% cuprizone (CPZ) for four weeks, followed by a two-week intervention period. Eighty mice were randomly assigned to four groups: NS (normal saline), CPZ+NS, CPZ+ NaHSO_3 , and CPZ+PEG-ATX@NPs. Behavioral tests, including open-field, Y-maze, and pole-climbing assays, were conducted to assess locomotor activity, motor coordination, and working memory. FA levels in serum, corpus callosum, and spinal cord were measured using an Na-FA fluorescent probe and quantified *via in vivo* and *ex vivo* fluorescence imaging. Neuroinflammatory responses were evaluated by measuring TNF- α , IL-1 β , and IL-6 levels using ELISA, while oxidative stress was assessed by reactive oxygen species (ROS) fluorescence intensity. Demyelination was examined *via* Luxol fast blue staining, and microglial activation was analyzed by Iba1 immunofluorescence. Correlation analyses were performed to explore relationships among FA levels, inflammatory cytokines, ROS intensity, and behavioral parameters. **Results** Compared with the NS group, mice in the CPZ+NS group exhibited significant weight loss, impaired motor coordination and memory, and markedly reduced myelin regeneration ($P<0.05$). FA levels and pro-inflammatory cytokines were significantly elevated in serum, corpus callosum, and spinal cord ($P<0.05$). FA-associated fluorescence in brain and spinal tissues, as well as ROS intensity across all tissues examined, also increased substantially ($P<0.05$). CPZ treatment induced pronounced microglial activation and severe demyelination in the corpus callosum ($P<0.01$). Both NaHSO_3 and PEG-ATX@NPs effectively reduced FA accumulation in the brain and spinal cord, attenuated demyelination, suppressed microglial activation, decreased inflammatory cytokine levels, and improved motor and cognitive performance. These results confirm that CPZ induced severe demyelination accompanied by oxidative stress, neuroinflammation, and abnormal FA accumulation. Following intervention with either NaHSO_3 or PEG-ATX@NPs, endogenous FA levels in the CNS were substantially reduced. Both treatments alleviated demyelination and significantly decreased the number of activated microglia. Levels of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 in serum, corpus callosum, and spinal cord were downregulated. Behavioral performance improved significantly, as evidenced by enhanced locomotor activity, better coordination, and improved memory function. These findings indicate that both FA-scavenging agents mitigate CPZ-induced biochemical and behavioral abnormalities. **Conclusion** This study demonstrates that excessive endogenous FA is closely associated with cognitive impairment, inflammatory dysregulation, and demyelination in a CPZ-induced chronic demyelination mouse model. Clearing abnormally elevated FA effectively reduces neuroinflammation, suppresses microglial overactivation, decreases oxidative stress, and alleviates demyelination, ultimately improving motor and cognitive outcomes in mice. These results suggest that targeting endogenous FA represents a promising therapeutic strategy for MS and other demyelinating disorders. Further investigations are warranted to explore the long-term safety, dosage optimization, and molecular pathways involved in FA-mediated neurotoxicity.

Key words multiple sclerosis, endogenous formaldehyde, inflammatory factors, demyelination, cuprizone, astaxanthin

DOI: 10.3724/j.pibb.2025.0350

CSTR: 32369.14.pibb.20250350