

# 法舒地尔修饰的巨噬细胞治疗 实验性变态反应性脑脊髓炎的分子机制

刘金泉, 张继红, 刘春云

**摘要** 目的 探讨法舒地尔修饰的巨噬细胞治疗实验性变态反应性脑脊髓炎(EAE)的分子机制。方法 采用髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(MOG)诱导C57BL/6小鼠建立主动免疫EAE模型,免疫9 d后制备腹腔巨噬细胞,用PBS或法舒地尔处理72 h(对照组和实验组)。将对照组和实验组巨噬细胞经尾静脉回输至EAE模型小鼠中,每只 $5 \times 10^7$ 个细胞。治疗10 d后分析对照组和实验组小鼠临床行为和体质量变化;经腹腔分离2组小鼠巨噬细胞,采用流式细胞术分析2组M1和M2型巨噬细胞比例;采用荧光定量PCR分析M1和M2巨噬细胞标志物的表达情况;采用ELISA分析白细胞介素(IL)-4和IL-12的水平。结果 实验组小鼠临床症状评分较对照组下调,差异有统计学意义( $F = 6.135, P < 0.001$ )。与对照组比较,实验组小鼠体质量下降较少,差异有统计学意义( $F = 3.105, P = 0.011$ )。与对照组细胞比较,实验组细胞M2型标志物精氨酸酶(Arg-1)、YM-1和FIZZ mRNA与IL-4细胞因子水平升高,M1型标志物一氧化氮合酶(iNOS) mRNA和IL-12细胞因子水平下降,差异均有统计学意义( $t = 7.091, P < 0.001; t = 11.094, P < 0.001; t = 6.182, P < 0.001; t = 3.942, P < 0.001; t = 4.132, P < 0.001; t = 3.198, P < 0.001$ )。与对照组相比较,实验组的F4/80<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>巨噬细胞比例增加,而F4/80<sup>+</sup>CD16/32<sup>+</sup>巨噬细胞比例下调,差异有统计学意义( $t = 10.618, P < 0.001; t = 12.105, P < 0.001$ )。结论 法舒地尔修饰的巨噬细胞可改善EAE小鼠的临床症状,主要是通过改善机体巨噬细胞极性实现的。

**关键词** 法舒地尔; 实验性变态反应性脑脊髓炎; M1型巨噬细胞; M2型巨噬细胞

**中图分类号** R 74; R 58

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2021)01-0060-05  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.01.012

多发性硬化是中枢神经系统常见的自身免疫性疾病类型之一,其主要的病理表现为脱髓鞘轴突损

伤以及炎症反应,是导致人类残疾的主要神经疾病之一<sup>[1]</sup>。目前多发性硬化的治疗,药物,多为激素类药物,只能暂时性缓解病症,而且长期使用此类药物副作用明显,因此寻求效果好、毒副作用小的药物成为临床研究的重点<sup>[2]</sup>。随着细胞治疗的不断开展,动物实验<sup>[3]</sup>表明间充质干细胞对实验性变态反应性脑脊髓炎(experimental allergic encephalomyelitis, EAE)具有治疗作用,可抑制炎症因子的表达和减少变态反应性脑脊髓炎对脊髓的损伤。法舒地尔是Rho相关卷曲螺旋形成蛋白激酶1(Rho associated coiled coil forming protein kinase 1, ROCK1)选择性抑制剂,对EAE小鼠具有良好的治疗效果,可缓解EAE小鼠的临床症状<sup>[4-5]</sup>。近年的研究<sup>[6]</sup>显示法舒地尔修饰来源于EAE小鼠的脾脏单个核细胞建立被动EAE模型则无法导致EAE发生,这为EAE的临床治疗提供了很好的治疗方案。该研究在体外采用法舒地尔修饰来源于EAE小鼠的腹腔巨噬细胞,分析其对EAE小鼠的治疗作用及机制。

## 1 材料与方法

**1.1 实验材料与仪器** 雌性8周龄(20 g) C57BL/6小鼠购自北京维通利华实验动物有限公司,生产许可证号: SCXK(京)2017-0006,动物合格证号: 0001507。髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(MOG)多肽由西安联美生物科技有限公司合成;完全弗氏佐剂和注射破伤风毒素购自美国Sigma公司;结核杆菌购自美国BD公司;白细胞介素-4(interleukin-4, IL-4)和白细胞介素-12(interleukin-12, IL-12) ELISA试剂盒购自美国R&D公司;FITC抗小鼠F4/80、PE抗小鼠CD206、PE抗小鼠CD16/32流式抗体购自美国Ebioscience公司;RPMI 1640培养基、胎牛血清、胰酶以及青链霉素均购自美国Gibco生物有限公司;逆转录试剂盒和qPCR SYBR Green Master Mix购自南京诺唯赞生物有限公司;其他试剂均为国产分析纯试剂。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 EAE模型构建** 40只雌性C57BL/6小鼠

2020-09-04 接收

**基金项目:** 国家自然科学基金(编号: 81501032); 2019年山西省应用基础研究计划项目(编号: 201901D111307)

**作者单位:** 山西大同大学神经病学与精神病学教研室,大同 037009

**作者简介:** 刘金泉,男,硕士研究生,副教授,责任作者, E-mail: dtjin-quan@163.com

在 SPF 级环境中适应 1 周。将髓鞘少突胶质细胞糖蛋白 35-55 多肽和结核杆菌混合物与等体积的完全弗氏佐剂混匀,采用注射器反复抽推将组成制备成白色悬浊液,以静置不分层为最佳。将 40 只小鼠采用乙醚麻醉,将抗原乳液在小鼠脊柱两侧注射 4 个点,每点注射 100  $\mu\text{l}$ ,以注射当天作为注射免疫 0 d。并于小鼠免疫当天和免疫后 48 h 经腹腔注射百日咳毒素(500 ng/只)进行加强免疫。

**1.2.2 腹腔巨噬细胞的分离和处理** 雌性 C57BL/6 小鼠无菌条件下腹腔注射磷酸盐缓冲液 5 ml,按摩腹腔 30 min,然后将细胞悬液从腹腔吸出,1 500 r/min 离心 5 min,洗涤后加入 PRIM 1640 培养基,贴壁 2 h 后,除去未贴壁的细胞,贴壁细胞即为巨噬细胞。将细胞分为两份(来源于同一只供体小鼠),一份采用 PBS 处理,一份采用 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  法舒地尔处理,置 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  常规培养 72 h,用于后续回输使用。PBS 处理的巨噬细胞为对照组,法舒地尔处理的细胞为实验组。

**1.2.3 巨噬细胞回输** 将对照组和实验组细胞采用 0.25% 胰酶消化,然后将细胞密度调整为  $5 \times 10^7$  个/ml,给予 EAE 模型小鼠尾静脉注射 500  $\mu\text{l}$ ,然后继续在 SPF 级动物房饲养。

**1.2.4 临床症状评分** 采用 Kono 评分标准<sup>[4]</sup> 进行临床症状评分。无症状为 0 分;尾巴无力为 1 分;尾巴麻痹且出现轻微后肢无力为 2 分;尾巴麻痹且后肢严重无力者为 3 分;尾巴麻痹且后肢也出现麻痹反应者为 4 分;死亡为 5 分。

**1.2.5 荧光定量 PCR 分析** 对照组和实验组小鼠提取巨噬细胞,然后采用 RNA 提取试剂盒和逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA,采用紫外分光光度计测定浓度。然后设计诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、精氨酸酶 1(Arginase-1, Arg-1)、YMI、FIZZ 和 GAPDH 的 PCR 引物,引物浓度稀释为 10 pmol/L,结果如表 1 所示。按照下列体积制备 PCR 反应体系: 2  $\times$  SYBR Green Mix 10  $\mu\text{l}$ , F/R 引物各 0.5  $\mu\text{l}$ , cDNA (1 : 50) 2  $\mu\text{l}$ , 双蒸水 7  $\mu\text{l}$ , 总体积 20  $\mu\text{l}$ 。根据上述体系配制

所需要的体积,然后每孔 20  $\mu\text{l}$  加到 96 孔荧光定量 PCR 板中,1 000 r/min 离心 2 min 将液体完全甩至板子底部。然后在荧光定量 PCR 仪上设置以下参数: 变性 95  $^{\circ}\text{C}$ 、30 s; 退火 58  $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 延伸 72  $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 39 个循环,然后制作熔解曲线。反应结束后直接从仪器上读取目的基因 mRNA 的相对表达水平。

**1.2.6 ELISA 分析细胞因子** 对照组和实验组小鼠经腹腔提取巨噬细胞,培养 24 h 后,取细胞培养上清液,采用 ELISA 试剂盒测定巨噬细胞分泌的 IL-12 和 IL-10 细胞因子的水平。

**1.2.7 流式细胞检测** 对照组和实验组腹腔巨噬细胞  $1 \times 10^6$  采用 0.25% 胰酶消化,细胞用 PBS 洗涤 1 次,每组分 2 份,将细胞重悬于 100  $\mu\text{l}$  PBS,一份加入 FITC 抗小鼠 F4/80 和 PE 抗小鼠 CD206 各 5  $\mu\text{l}$ ,另一份加入 FITC 抗小鼠 F4/80 和 PE 抗小鼠 CD16/32 各 5  $\mu\text{l}$ ,冰上避光孵育 1 h,然后采用 PBS 洗涤 1 次,然后重悬于 300  $\mu\text{l}$  PBS 溶液中,采用流式细胞术分析不同巨噬细胞亚群的比例。

**1.3 统计学处理** 所有数据均采用 SPSS 19.0 统计学软件进行分析,计量数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间计量数据比较采用  $t$  检验,检验水准  $\alpha = 0.05$ ,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 2 组小鼠临床症状分析** 40 只小鼠建模成功率 100%,未出现死亡。中枢神经 HE 染色结果如图 1 显示,对照组小鼠脊髓存在大量炎症细胞的浸润,而实验组小鼠骨髓中炎症细胞浸润较少。对照组和

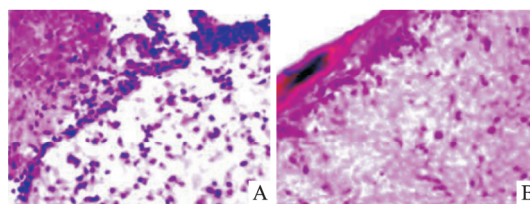


图 1 对照组和实验组小鼠中枢神经系统病理性改变  
HE 染色  $\times 100$   
A: 对照组; B: 实验组

表 1 荧光定量 PCR 引物序列

| 基因    | 引物序列(正义链)(5'-3')         | 引物序列(反义链)(5'-3')         |
|-------|--------------------------|--------------------------|
| iNOS  | CTGCAGCACTTGGATCAGGAACCT | GGAGTAGCCTGTGTGCACCTGGAA |
| Arg-1 | CAGAAGAATGGAAGAGTCAG     | CAGATATGCAGGGAGTCACC     |
| FIZZ1 | CAACAGGATGAAGACTGCAACCT  | GGGACCATCAGCTAAAGAAG     |
| YM-1  | TCACAGGTCTGGCAATTCTTCTG  | TTTGTCTTAGGAGGCTTCTCTC   |
| GAPDH | TCGGTGTGAACGGATTTCGC     | CTCTTGCTCAGTGTCTCTTC     |

实验组小鼠临床评分和体质量分析显示,与对照组比较,实验组小鼠经尾静脉回输巨噬细胞后临床症状评分降低,体质量上升,差异有统计学意义( $F = 6.135, P < 0.001; F = 3.105, P = 0.011$ )。见图2。

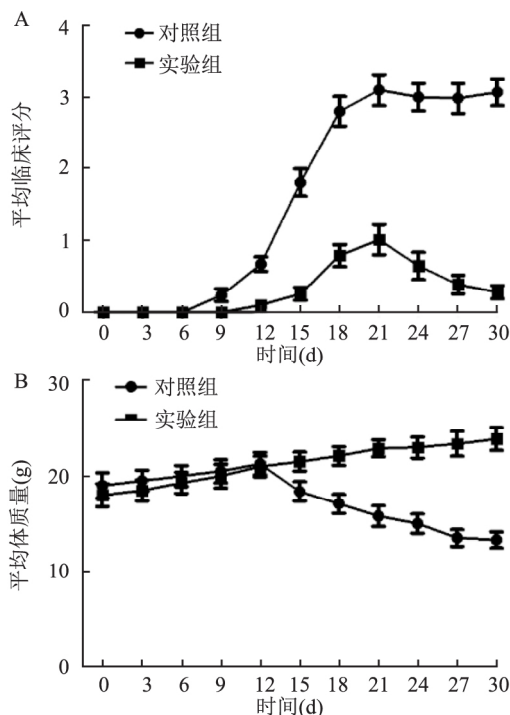


图2 两组小鼠平均临床症状评分和体质量比较

A: 两组小鼠平均临床症状评分比较; B: 两组小鼠平均体质量比较

**2.2 法舒地尔对体外巨噬细胞的影响** 法舒地尔体外处理小鼠腹腔巨噬细胞 72 h 后,采用荧光定量 PCR 分析 M1 和 M2 型巨噬细胞标志物,结果如表 2 所示,与未处理细胞比较,法舒地尔处理巨噬细胞后,M1 型巨噬细胞标志物 iNOS 和 IL-12 mRNA 表达水平下调,而 M2 型巨噬细胞标志物 Arg1 和 YM-1 mRNA 表达水平上调,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表2 法舒地尔体外处理对巨噬细胞表型的影响( $n = 20, \bar{x} \pm s$ )

| 组别  | iNOS        | IL-12       | Arg-1       | YM-1        |
|-----|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 未处理 | 1.09 ± 0.21 | 0.96 ± 0.19 | 1.03 ± 0.22 | 1.00 ± 0.19 |
| 处理  | 0.32 ± 0.11 | 0.29 ± 0.09 | 3.01 ± 0.35 | 3.91 ± 0.42 |
| t 值 | 3.109       | 2.891       | 2.999       | 3.015       |
| P 值 | 0.009       | 0.025       | 0.019       | 0.014       |

**2.3 2 组小鼠巨噬细胞亚群比较** 结果如图 3 所示,流式细胞术分析对照组和实验组小鼠腹腔巨噬细胞亚群的变化,对照组 F4/80<sup>+</sup> CD16/32<sup>+</sup> 巨噬细

胞比例( $72.8 \pm 10.2$ ) % 高于实验组( $8.0 \pm 2.9$ ) % ,差异有统计学意义( $t = 12.105, P < 0.001$ )。而对照组小鼠腹腔 F4/80<sup>+</sup> CD206<sup>+</sup> 巨噬细胞比例( $9.1 \pm 3.0$ ) 低于实验组( $82.3 \pm 12.8$ ) ,差异有统计学意义( $t = 10.618, P < 0.001$ )。

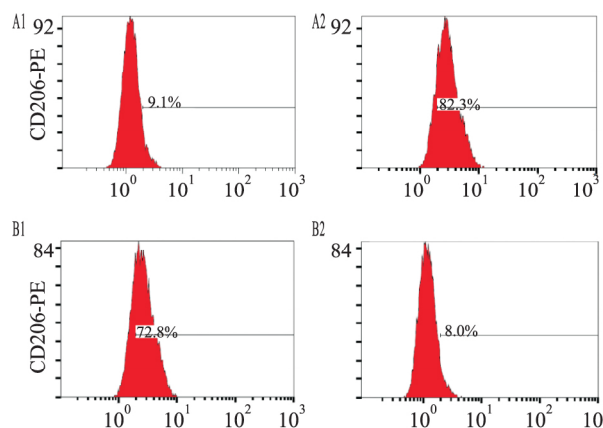


图3 流式细胞术分析了对照组和实验组

小鼠巨噬细胞亚群的变化

A: M2 巨噬细胞比例变化; B: M1 巨噬细胞比例变化; 1: 对照组; 2: 实验组

**2.4 2 组小鼠巨噬细胞表型分析** 采用荧光定量 PCR 和 ELISA 分析了 M1 和 M2 型巨噬细胞标志物的表达情况,结果显示,与对照组比较,实验组小鼠腹腔巨噬细胞 iNOS mRNA 和 IL-12 细胞因子的表达水平下调,差异有统计学意义( $t = 4.132, P < 0.001; t = 3.198, P < 0.001$ )。与对照组比较,实验组小鼠腹腔巨噬细胞 Arg-1、YM-1、FIZZ mRNA、IL-10 细胞因子表达水平上调,差异均有统计学意义( $t = 7.091, P < 0.001; t = 11.094, P < 0.001; t = 6.182, P < 0.001; t = 3.942, P < 0.001$ )。见图4。

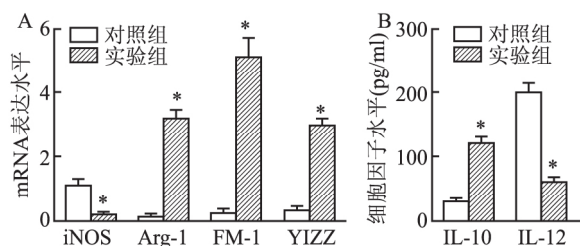


图4 对照组和实验组小鼠腹腔 M1 和 M2 型巨噬细胞标志物表达水平

A: 荧光定量 PCR 结果分析; B: ELISA 结果分析; 与对照组比较: \*  $P < 0.05$

### 3 讨论

多发性硬化是由免疫细胞介导的中枢神经系统

功能障碍,每次发作会造成身体的损伤,严重影响患者的身体健康和生活质量。EAE 的免疫发病机制与多发性硬化的发病机制极为类似,均表现为中枢神经系统炎症的大量浸润和白质脱髓鞘并表现为多种神经功能障碍,由于两者的相似性,EAE 模型是目前人类多发性硬化疾病的主要动物模型<sup>[8]</sup>。目前对于 EAE 或者多发性硬化没有特效药,以 EAE 为模型的相关治疗研究有望为多发性硬化的治疗提供新的途径。细胞治疗采用生物工程方法获取和/或通过体外扩增、特殊培养等处理后,使这些细胞具有增强免疫、杀死病原体 and 肿瘤细胞、促进组织器官再生和机体康复等治疗功效,从而达到治疗疾病的目的,是目前治疗多发性硬化的一种趋势<sup>[9]</sup>。大量研究<sup>[10]</sup>显示采用间充质干细胞对 EAE 小鼠具有治疗作用,其可抑制炎症因子的表达和减少脊髓变态反应性。

ROCK1 信号途径是机体中重要的信号转导通路,其在多发性硬化和 EAE 发生过程中发挥着重要作用。目前研究显示采用 ROCK1 抑制剂法舒地尔可以治疗 EAE,并减少炎症细胞浸润和脱髓鞘现象,机制研究<sup>[11]</sup>显示法舒地尔可以改变 T 淋巴细胞、巨噬细胞的表型。研究<sup>[12]</sup>表明修饰的脾脏单个核细胞可以抑制 EAE 被动模型的发生。这一结果提示体外修饰的免疫细胞可以在体内缓解 EAE 的症状。

巨噬细胞是一类功能多样的细胞亚群,其在不同的刺激下可发生表型的变化,进而发挥不同的生物学作用<sup>[13]</sup>。巨噬细胞在脂多糖或者 TH1 型细胞因子干扰素- $\gamma$  的作用下会向炎症性 M1 型巨噬细胞分化,从而放大免疫炎症反应,因此,炎症 M1 型巨噬细胞促进了 EAE 的发生和发展;但是其在 TH2 型细胞因子 IL-4、IL-13 和 IL-10 的刺激下,会向抗炎性 M2 型巨噬细胞转化,并释放炎症抑制因子 IL-10 进一步抑制机体免疫反应,达到缓解炎症反应的目的。研究<sup>[14]</sup>表明 M2 型巨噬细胞可改善 EAE 小鼠免疫微环境,减少神经元变性和脱髓鞘,起到保护机体的作用。

本研究将腹腔巨噬细胞与法舒地尔在体外进行共培养,将共培养细胞经尾静脉回输给 EAE 模型小鼠,分析了法舒地尔修饰的巨噬细胞对 EAE 模型的治疗作用。研究结果显示,采用法舒地尔修饰的巨噬细胞可以改善 EAE 小鼠的临床症状,同时可以抑制小鼠体质量的下降,说明体外法舒地尔修饰的巨噬细胞对 EAE 具有治疗作用。进一步分析显示,经

法舒地尔修饰的巨噬细胞治疗后的 EAE 小鼠,其体内 M2 型巨噬细胞的比例提高,而 M1 型巨噬细胞的比例下调,说明法舒地尔修饰的巨噬细胞进入小鼠体内改善了 EAE 小鼠体内的免疫环境。M2 型巨噬细胞可以分泌 IL-10,而 IL-10 是主要的免疫抑制细胞因子,其不仅作用于巨噬细胞,使机体炎症 M1 型巨噬细胞亚群降低,而且可以诱导 TH0 细胞向 TH2 型细胞分化,进而使机体免疫偏向于抗炎状态,对改善 EAE 具有重要的意义。

综上所述,给 EAE 小鼠回输抗炎性 T 淋巴细胞或者给予抗炎性的细胞因子则可改善 EAE 小鼠免疫微环境,达到治疗 EAE 的目的。

### 参考文献

- [1] Carlson R J, Doucette J R, Knox K, et al. Pharmacogenomics of interferon- $\beta$  in multiple sclerosis: what has been accomplished and how can we ensure future progress? [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2015, 26(2): 249 - 61.
- [2] Byun E, Caillier S J, Montalban X, et al. Genome-wide pharmacogenomic analysis of the response to interferon beta therapy in multiple sclerosis [J]. Arch Neurol, 2008, 65(3): 337 - 44.
- [3] Yousefi F, Lavi Arab F, Saeidi K, et al. Various strategies to improve efficacy of stem cell transplantation in multiple sclerosis: focus on mesenchymal stem cells and neuroprotection [J]. J Neuroimmunol, 2019, 328: 20 - 34.
- [4] Chen C, Yu J Z, Zhang Q, et al. Role of Rho kinase and fasudil on synaptic plasticity in multiple sclerosis [J]. Neuromolecular Med, 2015, 17(4): 454 - 65.
- [5] Yu J Z, Ding J, Ma C G, et al. Therapeutic potential of experimental autoimmune encephalomyelitis by fasudil, a Rho kinase inhibitor [J]. J Neurosci Res, 2010, 88(8): 1664 - 72.
- [6] Guo S D, Liu C Y, Yu J W, et al. Nasal delivery of fasudil-modified immune cells exhibits therapeutic potential in experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. CNS Neurosci Ther, 2019, 25(6): 783 - 95.
- [7] Urban J L, Kumar V, Kono D H, et al. Restricted use of T cell receptor V genes in murine autoimmune encephalomyelitis raises possibilities for antibody therapy [J]. Cell, 1988, 54(4): 577 - 92.
- [8] Pol S, Schweser F, Bertolino N, et al. Characterization of leptomeningeal inflammation in rodent experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of multiple sclerosis [J]. Exp Neurol, 2019, 314: 82 - 90.
- [9] Genc B, Bozan H R, Genc S, et al. Stem cell therapy for multiple sclerosis [J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1084: 145 - 74.
- [10] Scolding N J, Pasquini M, Reingold S C, et al. Cell-based therapeutic strategies for multiple sclerosis [J]. Brain, 2017, 140(11): 2776 - 96.
- [11] Yan L, Jiang B, Niu Y, et al. Intrathecal delivery of human ESC-derived mesenchymal stem cell spheres promotes recovery of a pri-

- mate multiple sclerosis model [1]. *Cell Death Discov*, 2018, 4: 28.
- [2] Liu C, Li Y, Yu J, et al. Targeting the shift from M1 to M2 macrophages in experimental autoimmune encephalomyelitis mice treated with fasudil [J]. *PLoS One*, 2013, 8( 2): e54841.
- [3] Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: *in vivo* veritas [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122( 3): 787 – 95.
- [4] Mikita J, Dubourdieu-Cassagno N, Deloire M S, et al. Altered M1/M2 activation patterns of monocytes in severe relapsing experimental rat model of multiple sclerosis. Amelioration of clinical status by M2 activated monocyte administration [J]. *Mult Scler*, 2011, 17( 1): 2 – 15.

## Molecular mechanism of fasudil-modified macrophages in the treatment of experimental allergic encephalomyelitis

Liu Jinquan, Zhang Jihong, Liu Chunyun

( *Dept of Neurology and Psychiatry, Shanxi Datong University, Datong 037009* )

**Abstract Objective** To explore the molecular mechanism of fasudil-modified macrophages in the treatment of experimental allergic encephalomyelitis ( EAE ). **Methods** C57BL/6 mice were induced by myelin oligodendrocyte glycoprotein( MOG ) to establish an active immune EAE model. Peritoneal macrophages were prepared after 9 days of immunization and the mice were either unable to be treated with or without fasudil for 72 h ( control group and experimental group ). Macrophages from the control group and the experimental group were transfused into EAE mice models, with each mouse containing  $5 \times 10^7$  cells. After treatment for 10 days, the changes of clinical behavior and body weight of mice in the control group and experimental group were analyzed. Macrophages in the two groups were isolated from the abdominal cavity and the ratio of M1 and M2 macrophages in the two groups was analyzed by flow cytometry. The expression of macrophage markers in M1 and M2 was analyzed by fluorescence quantitative PCR. The levels of interleukin-10 ( IL-10 ) and interleukin-12 ( IL-12 ) were analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay ( ELISA ). **Results** The clinical symptom score of the experimental group was significantly lower than that of the control group (  $F = 6.135, P < 0.001$  ). Compared with the control group, the weight loss of mice in the experimental group was less, and the difference was statistically significant (  $F = 3.105, P = 0.011$  ). Compared with the control group, the M2-labeled arginase ( Arg-1 ), YM-1, FIZZ and IL-10 cytokine levels in the observation group increased significantly, while the M1-labeled nitric oxide synthase ( iNOS ) and IL-12 cytokine levels decreased significantly (  $t = 7.091, P < 0.001$ ;  $t = 11.094, P < 0.001$ ;  $t = 6.182, P < 0.001$ ;  $t = 3.942, P < 0.001$ ;  $t = 4.132, P < 0.001$ ;  $t = 3.198, P < 0.001$  ). Compared with the control group, the proportion of macrophages in F4/80-CD206 increased significantly, while the proportion of macrophages in F4/80-CD11b/32 decreased significantly (  $t = 10.618, P < 0.001$ ;  $t = 12.105, P < 0.001$  ). **Conclusion** Fasudil-modified macrophages can significantly improve the clinical symptoms of EAE mice, and its mechanism is mainly through improving the polarity of macrophages.

**Key words** fasudil; experimental allergic encephalomyelitis; M1 type macrophages; M2 type macrophages