

糖皮质激素在系统性红斑狼疮目标治疗中的应用进展

王 钢 综述 李向培 审校

摘要 系统性红斑狼疮是一种多系统受累的自身免疫性疾病。糖皮质激素在系统性红斑狼疮应用中的机制与作用、不良反应与安全值等问题越来越引起广泛关注。近年目标治疗的原则已经被成功地运用于类风湿关节炎等多种疾病,确定合理的治疗目标以及给予相应的系统化治疗,有助于控制患者的病情,改善患者的预后。本文综述了糖皮质激素的免疫抑制机制及在系统性红斑狼疮目标治疗中合理地使用,对于增加患者在治疗中获益及减少临床风险具有重要意义。

关键词 系统性红斑狼疮;糖皮质激素;目标治疗

中图分类号 R 593.241

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)11-1739-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.11.035

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)患者的10年生存率由20世纪50年代的50%增加到2000年后的90%以上^[1]。但是,SLE患者标准化死亡率仍然是普通人群的4.6倍,长期预后仍然不佳^[2]。2013年,SLE目标治疗国际工作组(T2T/SLE国际工作组)提出了SLE目标治疗的建议,强调SLE的治疗在控制疾病的活动的同时尽可能减少疾病的并发症与药物的毒副作用,以确保患者长期生存、阻止器官损害^[3]。糖皮质激素(glucocorticoids, GC)巨大抗炎潜力及免疫抑制作用使之在SLE的治疗中始终处于一线药物的地位,然而众多不良反应和长期应用所带来的器官损伤在某些情况下可能已经超过了疾病本身对患者产生的损伤。该文就近年GC的作用机制及在SLE中应用的进展作一综述。

1 GC的作用机制与GC抵抗

GC具有强大的免疫抑制抗炎作用及调节糖、脂

和蛋白质的生物合成和代谢的作用。高剂量的GC和(或)长时间的使用,可以引起多种不良反应。合成GC的临床效果取决于给药剂量、吸收率、代谢率、清除率、组织的浓度,特别是GC与GC受体(glucocorticoid receptors, GCRs)的亲合力^[4]。

1.1 GC与受体的作用 GC的抗炎和免疫抑制作用依赖于GCRs, GCRs的不同亚型激活不同信号通路。人类GCRs基因结构和表达的变异,可导致GC信号分子在不同的细胞中表达的多样性^[5]。

GC在细胞内有三种作用方式:第一,皮质醇-GCRs复合物(glucocorticoid-glucocorticoid receptors, GCGR)迁移到细胞核内与特定的DNA结合为同源二聚体,即GC反应元(glucocorticoid-responsive elements, GRE)。GRE通过激活或阻遏蛋白的表达促进或抑制基础转录复合物的装配^[6]。第二,低皮质醇水平时,GC应答基因调控GCGR和其他转录因子之间的相互作用。第三,通过膜结合受体和第二信使的GC信号分子(即非基因效应途径)^[7]。研究^[8]表明,GC抑制炎症反应是通过这三种机制:直接和间接的基因组效应以及非基因组效应机制。

1.2 GC的基因组和非基因组效应 GC的亲脂性结构使其可以轻易地通过胞质膜。GC与胞质GC受体(cytosolic glucocorticoid receptors, cGCR)结合导致受体的活化以及多蛋白复合物中受体的解离^[9]。GCGR复合体和GRE之间的相互作用决定了基因表达的调节,或为转录激活(transactivation, TA)或为转录抑制(transrepression, TR)。

TA可引起糖异生和骨质疏松、皮肤萎缩、生长发育迟缓和库欣征等相关的酶的转录,产生多种不良反应。长期的GC治疗导致肾脏的钠水潴留及对血管紧张素II反应增强引起高血压;GC通过骨细胞的GCRs诱导成骨细胞凋亡和破骨细胞活性增加,加剧骨质疏松症。TR介导了GC的基因组效应,抑制了许多促炎分子,成为GC免疫抑制和抗炎作用的最重要的因素之一^[10]。GC活基因组效应并调节蛋白质表达至少需要30~60 min,但免疫抑制和抗炎作用出现则需要几小时到几天^[11],当泼尼松

2017-05-12 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81373186)

作者单位:安徽医科大学附属省立医院风湿免疫科,合肥 230001

作者简介:王 钢,男,硕士研究生;

李向培,女,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-

mail: lixiangpei55@126.com

>30 mg/d 时基因组途径几乎完全饱和。而另一方面,当 GC 剂量 >100 mg/d 时起效迅速是通过非基因组效应发挥作用,非基因组的途径更有效且低毒^[12]。大剂量甲泼尼龙冲击治疗与非基因组效应有关。

在 GC 与 cGCR 结合后,从 cGCR 多蛋白复合物分离的蛋白质介导了非基因组效应。高剂量和极高剂量的 GC 可以通过非基因组效应引起许多速发的免疫抑制和抗炎作用。高浓度 GC 能改变细胞和线粒体膜的理化性质,GC 可以嵌入到膜中并改变膜相关蛋白质的功能,从而影响脂质过氧化和膜的渗透性。GC 与免疫细胞质膜的相互作用会迅速降低膜内外的钙钠循环,从而促进免疫抑制、减少炎症反应^[13]。

1.3 GC 抵抗的机制 小部分患者对 GC 治疗反应不佳,不同患者对 GC 不良反应的易感性也存在很大差异。GC 受体主要有两种亚型,GC α 和 GC β ,仅 GC α 受体与 GC 结合,GC β 的过度表达将导致 GC 抵抗^[6],但目前认为这一机制的作用可能较为有限,因为在大多数细胞中(除中性粒细胞外)GC β 的表达明显低于 GC α 。巨噬细胞移动抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)是一种促炎因子,在许多炎症性疾病中具有潜在的抗 GC 的作用,而 SLE、类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)患者中 MIF 表达升高,可能也是风湿性疾病 GC 抵抗产生的原因。多耐药基因 MRD1 编码的外排泵 P-糖蛋白 170,是一种 APT 结合盒转运蛋白,将 GC 转运到细胞外,也可导致 GC 抵抗。此外,其他 GC 抵抗的原因有:家族性 GC 抵抗、GCRs 结合或易位缺陷、调节性 T 细胞的减少、组蛋白乙酰化缺陷等^[14]。

2 GC 与 SLE 的目标治疗

SLE 是一种经典的需要长期甚至终身治疗的异质性慢性疾病,随病情的进展, SLE 患者的器官会出现不可逆的损伤,甚至早期死亡。2013 年由来自世界多地的风湿病、肾病、内科学、临床免疫学专家组成的 T2T/SLE 国际工作组采用以系统性的文献回顾作为基本依据,通过反复讨论、修改以及投票,提出了改善 SLE 目标治疗的 4 项原则和 11 条建议^[3]。建议的主要原则是:① 治疗 SLE 方案应由经治医师与患者充分沟通及知情的基础上制定;② SLE 应在控制疾病的活动的同时尽可能减少疾病的并发症与药物的毒副作用,以确保患者长期生存、阻

止器官损害、提高生活质量;③ SLE 的表现是复杂多样的,需要从多学科的角度进行诊疗;④ SLE 患者需要规律的、长期的监管或回访,以便及时调整治疗的方案。但由于 SLE 的异质性,目前尚不能总结出一个关于“目标等级”的建议。目标治疗注重于缓解病情,预防损伤以及提高患者的生活质量。

达到临床缓解或最大可能降低疾病的活动度是 SLE 治疗的首要目标。维持缓解、预防复发也十分重要。SLE 患者通常处于缓解期与复发期的反复过程, SLE 疾病活动会对患者的远期预后产生不良影响,因而预防疾病复发是 SLE 患者治疗中的一个重要目标^[3]。复发可以引起不同器官的损伤,而有时器官水平的损伤在出现了严重的损害或危及生命的情况时才被患者觉察。因而 SLE 患者需要规律的随访及时评估病情和调整治疗的方案。严重的 SLE 复发,通常需要采用中等剂量到高剂量的 GC 或免疫抑制剂的强化治疗。但是当治疗药物如 GC 持续使用超过实际所需时间或过高剂量可以产生器官损伤风险,特别是引起严重远期并发症。

狼疮肾炎(lupus nephritis, LN)是 SLE 多系统损害中最重要的临床表现之一,临床发生率可高达 60%~86%。如不经干预治疗,约一半的重症 LN 可发展至终末期肾病^[15]。2012 年美国风湿病学会(ACR)推出了关于 LN 筛查、治疗和管理的指南^[16]。指南推荐 III 型和 IV 型 LN 的诱导治疗方案起始时采用 GC 冲击(甲泼尼龙 500~1 000 mg/d,每天 1 次,连用 3 d),之后口服泼尼松[0.5~1 mg/(kg·d)],逐渐减至最小维持量,但是没有给出最小维持量和维持时间的具体建议。T2T/SLE 工作组认为严重活动的 SLE 的临床表现能够通过早发现、早治疗而得到改善,特别是 LN。如果诊断(肾活检)和免疫抑制剂治疗不及时,往往会增加肾病复发以及终末期肾病的风险。因而强烈建议对 LN 早发现、早治疗,经过诱导缓解后,推荐至少持续 3 年的免疫抑制治疗,以期得出最佳的疗效。维持治疗可以巩固缓解以及预防复发。

对于一些仅有血清学活动(抗双链 DNA 滴度增加伴血清补体降低)而无临床表现的患者(serologically active clinically quiescent SACQ),复发的风险会增加。不同的 SLE 患者,血清学指标与临床预后可能会有显著的差别。虽然有报道随机接受 GC 治疗的 SACQ 患者严重复发的概率要低^[17],但也存在增加患者过度使用激素的风险。有研究^[18]随访了 SACQ 患者 10 年,显示总的损伤是少于有临床表

现的 SLE 患者。因此,对于 SACQ 患者,建议密切关注病情,不必增强治疗。

SLE 疾病可导致器官损伤甚至死亡,延缓及预防损伤进一步发展是治疗 SLE 的主要目标。损伤可出现在早期(在第 1~3 年内)或晚期(在发病过程中),原发病或是伴随疾病,以及长期用药这些因素都与 SLE 患者逐步发生的器官损伤有关。因此预防组织损伤包括控制疾病的活动、预防复发、避免药物的毒副作用。建议提出 SLE 的维持治疗应以使用最低剂量 GC 为目标。大量研究^[19]表明,全身的 GC 治疗和 SLE 患者的肌肉、心脏、外周血管、眼睛、代谢等系统逐步损伤之间有着明显的剂量相关性,是否有一个低水平的安全的剂量尚无定论。基于客观的证据以及药理学的考量,工作组提出治疗时尽可能地降低 GC 使用量,并将维持剂量降低到最低水平,如果情况许可,GC 可以停用^[3]。

3 GC 在 SLE 治疗中的应用策略与减停

SLE 目标治疗的宗旨是进一步改善患者的生存与预后。随着生存率的增加,SLE 患者的死亡原因也随之明显改变,死于急性发作的患者减少,死于心血管事件、感染或癌症的患者增多^[20]。美国霍普金斯狼疮队列研究对 SLE 患者的器官损伤与 GC 的使用之间的关系进行了研究,采用 SLE 国际合作医疗中心/美国风湿病学会损伤指数(SDI)来评估 539 例患者发生器官损伤的情况,匹配了年龄、种族、性别之后,用 Cox 比例风险回归分析来评估损伤发生的风险与累积泼尼松剂量、高剂量的泼尼松(≥ 60 mg/d 且 > 2 个月)、甲泼尼龙的冲击治疗(1 000 mg 静脉注射 1~3 d)。累积泼尼松剂量的风险评估基于 36.5 g 的基准剂量(如 10 mg/d 的泼尼松使用 10 年或相当剂量),结果显示累积泼尼松剂量与骨质疏松骨折显著相关(相对风险比 2.5,95% CI: 1.7、3.7)。每次静脉冲击治疗都会小幅增加骨质疏松骨折的风险(相对风险比 1.3,95% CI: 1.0、1.8)。持续 2 个月的高剂量泼尼松治疗会使缺血性坏死(95% CI: 1.1、1.4)和中风(95% CI: 1.0、1.5)的风险增加 1.2 倍。长期使用泼尼松治疗的 SLE 患者发生永久性器官损伤的风险显著增加。SLE 器官损伤与累积泼尼松剂量(骨质疏松性骨折、冠心病、白内障)、高泼尼松剂量(缺血性骨坏死、中风)、甲泼尼龙冲击治疗(认知功能障碍)独立相关^[21]。

GC 治疗 SLE 的用法及用量主要取决于疾病的严重程度和受累器官的情况。短期口服 GC 可用于

治疗轻度至中度 SLE 复发。但是最常见的情况是,治疗复发的起始剂量会一直服用到数月后的下一次随访,存在超剂量 GC 导致器官损伤的风险。有研究^[22]应用肌注曲安奈德以避免这个问题,在 FLOAT 试验(flares in lupus: outcome assessment trial)中比较了口服一个甲泼尼龙剂量包(首日 24 mg,每日递减 4 mg,1 周内停药)与肌肉注射曲安奈德 100 mg/次,轻到中度 SLE 复发患者被随机分为甲泼尼龙组或曲安奈德注射组,每周 1 次,随访 4 周。结果两种疗法同样有效,曲安奈德组在前 2 周有较好的反应,提示起效略快,但在第 4 周时两种方法已无剂量差异。FLOAT 试验表明采用曲安奈德注射治疗避免了每日服用甲泼尼龙的问题,也可能减低了 GC 的毒性。

高剂量的泼尼松,即 1 mg/(kg·d),被推荐用于治疗严重的 SLE,但是证据并不充分。Ruiz-Iratorza et al^[23]比较了中等剂量的泼尼松为基础的方案与克鲁塞斯方案—美国国立卫生研究院(national institutes of health, NIH)的 LN 诱导治疗方案,前者的方案使用甲泼尼龙冲击 3 d 后给予中等量泼尼松(15~30 mg/d)联合羟氯喹和环磷酰胺并迅速减少激素用量,这种治疗 6 个月的平均泼尼松剂量是 9 mg/d;而 NIH 高剂量方案是泼尼松 1 mg/(kg·d)联合环磷酰胺,6 个月的平均泼尼松剂量是 25 mg/d。结果中等剂量方案毒性显著降低,包括代谢副作用、骨坏死和骨质疏松性骨折。本研究显示,在中等剂量方案使肾脏反应更快且更持久,100% 的患者最终实现完全反应,而高剂量治疗的患者只有 70%^[24]。

最近发表的“无口服激素”治疗 LN 的前瞻性研究^[25]被认为是 LN 治疗的阶段性进展。Condon et al^[25]探讨了对于活检证实符合国际肾脏病学会/肾脏病理学会(ISN/RPS) III、IV 或 V 型 LN 患者不采用口服激素的方案(利妥昔单抗方案)。50 例患者于第 1 天和第 15 天予以 2 倍剂量的利妥昔单抗(1 g)及甲泼尼龙(500 mg)冲击治疗,后停用 GC 仅用霉酚酸酯维持(起始剂量 500 mg,最大剂量 1.5 g,每天 2 次)。共 45 例患者达到完全缓解或部分缓解,平均缓解时间为 37 周(4~200 周)。其中 72% ($n=36$) 达到完全缓解,18% ($n=9$) 达到部分缓解。达到完全缓解或部分缓解的时间不受基线 LN 类型的影响。共有 11 例患者出现了 12 次复发,平均复发时间为缓解后 65.1 周(20~112 周)。副反应发生率 18%,其中 10% 为感染。2 例(4%) 死亡。利

妥昔单抗方案表明, LN 的治疗方案中可避免使用口服 GC。目前尚没有对利妥昔单抗方案与标准治疗进行比较, 是否标志着 LN 的治疗方案的巨大进步有待进一步验证。

疾病活动程度是决定 GC 能否成功减停药的最主要因素。一个纳入了 866 例患者的霍普金斯狼疮队列的大型前瞻性队列研究^[26] 表明了研究开始时低 SLEDAI 评分(0 ~ 2) 往往预示着在随访期泼尼松可以停药。无疾病活动是可以停药的最重要的临床变量。Zahr et al^[26] 的研究调查了成功减低至 5 mg 以下的患者, 减量后至少随访了 1 年, 55% 的患者维持低于 5 mg 的剂量。分析显示 2000 年以后, 成功减量 5 mg 以下超过 1 年的患者的比例与 2000 年前相比从 46% 增加到 61% ($P = 0.0008$)。这可能与人们对长期使用 GC 造成的远期危害认识的不断增加有关^[19, 21]。

另一项霍普金斯狼疮队列研究中, 当泼尼松剂量 > 540 mg/月(或累积总剂量 > 64.8 g) , 无患者存活 10 年以上的时间, 因此, 高剂量 GC 治疗的 SLE 患者需治疗疾病活动的同时最大限度地减少由于累积 GC 剂量导致的器官损害^[19]。对于高剂量泼尼松治疗的患者, 治疗方案应个体化, 诱导缓解后 GC 减量应缓慢, 在减药过程中如病情反复, 可暂时维持原剂量, 或加用免疫抑制剂联合治疗^[20]。早期缓解并长期维持, 为安全减药创造条件, 早诊断是有效治疗(最好在发病 3 ~ 5 个月内开始治疗) 必不可少的条件, 但关于何时停药, 没有一个固定的时间表和可靠的血清学参数, 治疗时减停药需根据医师的判断。

4 结语

在充分应用 GC 抗炎的巨大潜力的同时应该尽全力减少其不良反应。临床应根据患者的条件和疾病控制的情况谨慎衡量治疗的利与弊, 最大可能减少 GC 的用量。联合免疫抑制剂和羟氯喹均能达到减停泼尼松的目的。对于 GC 的安全值、停药与复发之间的关系仍需进一步研究。必须要牢记的是, GC 治疗给患者带来的伤害绝不应该超过 SLE 疾病本身的损伤。

参考文献

[1] Mak A, Cheung M W, Chiew H J, et al. Global trend of survival and damage of systemic lupus erythematosus: meta-analysis and meta-regression of observational studies from the 1950s to 2000s [J]. *Semin Arthritis Rheum*, 2012, 41(6) : 830 - 9.

[2] Lopez R, Davidson J E, Beeby M D, et al. Lupus disease activity

and the risk of subsequent organ damage and mortality in a large lupus cohort [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2012, 51(3) : 491 - 8.

[3] van Vollenhoven R F, Mosca M, Bertias G, et al. Treat-to-target in systemic lupus erythematosus: recommendations from an international task force [J]. *Ann Rheum Dis*, 2014, 73(6) : 958 - 67.

[4] Schacke H, Schottelius A, Docke W D, et al. Dissociation of transactivation from transrepression by a selective glucocorticoid receptor agonist leads to separation of therapeutic effects from side effects [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(1) : 227 - 32.

[5] Lu N Z, Cidlowski J A. The origin and functions of multiple human glucocorticoid receptor isoforms [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2004, 1024: 102 - 23.

[6] Hebbar P B, Archer T K. Chromatin remodeling by nuclear receptors [J]. *Chromosoma*, 2003, 111(8) : 495 - 504.

[7] Hafezi-Moghadam A, Simoncini T, Yang Z, et al. Acute cardiovascular protective effects of corticosteroids are mediated by non-transcriptional activation of endothelial nitric oxide synthase [J]. *Nat Med*, 2002, 8(5) : 473 - 9.

[8] Rhen T, Cidlowski J A. Antiinflammatory action of glucocorticoids - New mechanisms for old drugs [J]. *New Engl J Med*, 2005, 353(16) : 1711 - 23.

[9] Almawi W Y, Melemedjian O K. Molecular mechanisms of glucocorticoid antiproliferative effects: antagonism of transcription factor activity by glucocorticoid receptor [J]. *J Leukoc Biol*, 2002, 71(1) : 9 - 15.

[10] Coutinho A E, Chapman K E. The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2011, 335(1) : 2 - 13.

[11] Buttgerit F, Burmester G R, Straub R H, et al. Exogenous and endogenous glucocorticoids in rheumatic diseases [J]. *Arthritis Rheum*, 2011, 63(1) : 1 - 9.

[12] van der Goes M C, Jacobs J W, Bijlsma J W. The value of glucocorticoid co-therapy in different rheumatic diseases-positive and adverse effects [J]. *Arthritis Res Ther*, 2014, 16 Suppl 2: S2.

[13] Stahn C, Buttgerit F. Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids [J]. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 2008, 4(10) : 525 - 33.

[14] Barnes P J, Adcock I M. Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases [J]. *Lancet*, 2009, 373(9678) : 1905 - 17.

[15] Seligman V A, Lum R F, Olson J L, et al. Demographic differences in the development of lupus nephritis: a retrospective analysis [J]. *Am J Med*, 2002, 112(9) : 726 - 9.

[16] Hahn B H, McMahon M A, Wilkinson A, et al. American college of rheumatology guidelines for screening, treatment, and management of lupus nephritis [J]. *Arthritis Care Res(Hoboken)*, 2012, 64(6) : 797 - 808.

[17] Tseng C E, Buyon J P, Kim M, et al. The effect of moderate-dose corticosteroids in preventing severe flares in patients with serologically active, but clinically stable, systemic lupus erythematosus:

- findings of a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled trial[J]. *Arthritis Rheum*, 2006, 54(11): 3623–32.
- [18] Steiman A J, Gladman D D, Ibañez D, et al. Outcomes in patients with systemic lupus erythematosus with and without a prolonged serologically active clinically quiescent period[J]. *Arthritis Care Res(Hoboken)*, 2012, 64(4): 511–8.
- [19] Thamer M, Hernán M A, Zhang Y, et al. Prednisone, lupus activity, and permanent organ damage[J]. *J Rheumatol*, 2009, 36(3): 560–4.
- [20] Fei Y, Shi X, Gan F, et al. Death causes and pathogens analysis of systemic lupus erythematosus during the past 26 years[J]. *Clin Rheumatol*, 2014, 33(1): 57–63.
- [21] Zonana-Nacach A, Barr S G, Magder L S, et al. Damage in systemic lupus erythematosus and its association with corticosteroids[J]. *Arthritis Rheum*, 2000, 43(8): 1801–8.
- [22] Danowski A, Magder L, Petri M. Flares in lupus: Outcome Assessment Trial(FLOAT), a comparison between oral methylprednisolone and intramuscular triamcinolone[J]. *J Rheumatol*, 2006, 33(1): 57–60.
- [23] Ruiz-Irastorza G, Danza A, Perales I, et al. Prednisone in lupus nephritis: how much is enough[J]. *Autoimmun Rev*, 2014, 13(2): 206–14.
- [24] Ruiz-Arzuza I, Ugarte A, Cabezas-Rodríguez I, et al. Glucocorticoids and irreversible damage in patients with systemic lupus erythematosus[J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2014, 53(8): 1470–6.
- [25] Condon M B, Ashby D, Pepper R J, et al. Prospective observational single-centre cohort study to evaluate the effectiveness of treating lupus nephritis with rituximab and mycophenolate mofetil but no oral steroids[J]. *Ann Rheum Dis*, 2013, 72(8): 1280–6.
- [26] Zahr Z A, Fang H, Magder L S, et al. Predictors of corticosteroid tapering in SLE patients: the hopkins lupus cohort[J]. *Lupus*, 2013, 22(7): 697–701.

(上接第 1738 页)

- ration of fibroblast-like synoviocytes through suppressing G-protein-coupled receptor kinase 2[J]. *Planta Med*, 2012, 78(7): 665–71.
- [9] Tashiro S, Shima H. Multicolor FISH and immunofluorescence analysis[J]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, 2006, 51(14): 1978–80.
- [10] 徐澍, 魏芳, 贾晓益, 等. BAFF-BAFFR 及信号转导分子参与佐剂性关节炎的免疫反应及芍药苷-6'-O-苯磺酸酯的作用[J]. *安徽医科大学学报*, 2016, 51(5): 643–9.
- [11] Barbierato M, Argentini C, Skaper S D. Indirect immunofluorescence staining of cultured neural cells[J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 846: 235–46.
- [12] Ghatak A, Combs C K. Iba1 immunoreactivity is enhanced following an antigen retrieval treatment with EDTA, pH 6.0[J]. *Methods X*, 2014, 1: 269–74.
- [13] 于博, 李晨, 王辉, 等. 不同抗原修复方法对内翻性乳头状瘤石蜡切片 Pan 染色的影响[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2014, 28(17): 1311–3.
- [14] 邓娟, 周华东, 陈曼娥, 等. 局灶性脑缺血再灌注大鼠神经元 DNA 氧化损伤的研究[J]. *中华危重病急救医学*, 2001, 13(8): 478–80.

Establishment of GRK2 immunofluorescence methods in the spleen of rats with adjuvant arthritis

Wang Yang, Li Yifan, Cui Dongqian, et al

(*Institute of Clinical Pharmacology, Anhui Medical University,*

Key Laboratory of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Ministry of Education,

Collaborative Innovation Center of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Hefei 230032)

Abstract Immunofluorescence assay for G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) in spleen tissue of rats with adjuvant arthritis was established. Four key conditions of immunofluorescence assay were investigated: ① Effect of penetrating agent Triton X-100 on the result; ② Effects of different antigen repair fluids: Effects of citric acid buffer and pH 9.0 EDTA buffer; ③ Effects of different closed times: 20 min, 30 min, 40 min and 50 min; ④ Effects of different primary antibody concentrations: 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 and 1:500. Experimental results showed that Triton X-100 penetration enhancing antigen expression; Citric acid buffer is better than pH 9.0 EDTA buffer, which improves the expression of antigen; the concentration of 1:100 of primary antibody was most suitable for the intensity of fluorescence signal; 50 min of blocking time could significantly remove background nonspecific staining.

Key words GRK2; spleen tissue; immunofluorescence