

网络出版时间: 2016-6-6 13:52:31 网络出版地址: http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160606.1352.002.html

◇基础医学研究◇

重组 TACI-Ig 融合蛋白抑制抗 CD3 抗体 诱导 T 淋巴细胞增殖与活化

杨思民 汪庆童 刘亢亢 汪龙生 吴 莉 魏 伟

摘要 目的 探讨抗 CD3 抗体诱导小鼠 T 淋巴细胞增殖与活化的机制并观察重组人 TACI-Ig 融合蛋白(rhTACI-Ig)对其的影响。方法 免疫磁珠纯化得到小鼠 T 淋巴细胞,用抗 CD3 抗体刺激,同时给予 rhTACI-Ig、rhTNFR:Fc 或 IgG-Fc。 $[^3\text{H}]$ -TdR 参入法检测 T 细胞增殖能力,流式细胞术检测 T 细胞亚群比率,Western blot 法检测 B 淋巴细胞刺激因子、BAFF 受体(BAFFR)和跨膜激活剂及钙调素配体相互作用分子(TACI)两个受体及 IL-2 受体(IL-2R)表达水平和 NF- κ B 活性,采用小干扰 RNA(siRNA)抑制 T 细胞 BAFFR 或 TACI 的表达。结果 抗 CD3 抗体体外可促进 T 细胞增殖与活化,BAFF、白细胞介素-2(IL-2)、 γ -干扰素(IFN- γ)和转化生长因子- β (TGF- β)分泌,BAFFR、TACI、IL-2R 表达升高和 NF- κ B 活性增强($P < 0.05$)。RhTACI-Ig(0.1、1、10、100 $\mu\text{g/ml}$)体外给药可抑制抗 CD3 抗体诱导的 T 淋巴细胞增殖($P < 0.05$);rhTACI-Ig(1、10、100 $\mu\text{g/ml}$)可明显降低抗 CD3 抗体诱导产生的细胞因子水平($P < 0.05$, $P < 0.01$),显著抑制 CD4 $^{+}$ CD69 $^{+}$ T 细胞、CD4 $^{+}$ CD154 $^{+}$ T 细胞比率,提高 CD4 $^{+}$ CD62L $^{+}$ T 细胞比率($P < 0.05$, $P < 0.01$),且 rhTACI-Ig(10、100 $\mu\text{g/ml}$)能降低 T 细胞上 BAFFR、TACI、IL-2 受体的表达,抑制 NF- κ B 活性($P < 0.05$)。沉默 BAFFR 或 TACI 对抗 CD3 抗体诱导的 T 细胞增殖有抑制作用($P < 0.01$)。结论 抗 CD3 抗体部分通过产生 BAFF,激活 BAFFR 信号而促进 T 细胞增殖与活化,rhTACI-Ig 中和 BAFF,抑制 BAFF 相关受体的表达和 NF- κ B 活性,减少 T 细胞表达 IL-2 受体,阻止 T 细胞过度增殖与活化。

关键词 B 淋巴细胞刺激因子;重组 TACI-Ig 融合蛋白;T 淋巴细胞;免疫治疗;自身免疫病

中图分类号 R 593.22; R 392.3; R 392.5; R 967; R 979.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)07-0919-07

抗 CD3 抗体可以上调 T 淋巴细胞白细胞介素 2 受体(interleukine-2 receptor, IL-2R)表达,诱导细胞增殖与活化^[1]。活化的 T 细胞能分泌 IL-1、IL-2、IL-6、IL-10 和 B 淋巴细胞刺激因子(B lymphocyte stimulator, BlyS or BAFF)等多种细胞因子^[2]。BAFF 及 APRIL 水平的异常与类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)等自身免疫病的发病密切相关^[3]。BAFF 与 APRIL 有两个共同受体,即跨膜激活剂及钙调素配体相互作用分子(transmembrane activator or calcium-modulating cyclophilin ligand-interactor, TACI)和 BAFF 受体(receptor for B-cell activating factor, BAFFR)。重组 TACI-Ig 融合蛋白(rhTACI-Ig)是 TACI 的胞外部分和人 IgG1 的 Fc 段链接而成,能竞争性结合 BAFF 和 APRIL。该实验观察 rhTACI-Ig 对抗 CD3 抗体活化的 T 淋巴细胞及其相关受体和细胞因子的调节作用,并从 BAFFR 和 TACI 及其下游信号分子通路的角度,进一步探讨 BAFF 影响 T 细胞的机制,为 rhTACI-Ig 控制 T 细胞增殖与活化提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 雄性 SPF 级 C57BL/6J 小鼠,7~8 周龄(20 ± 2) g,购于上海实验动物研究中心。实验中涉及的小鼠实验方案均经安徽医科大学临床药理研究所动物伦理委员会批准。

1.2 药物和试剂 小鼠淋巴细胞分离液购于天津市灏洋生物制品科技有限责任公司;全 T 细胞分选试剂盒购于德国美天旌生物技术有限公司;DMEM 培养基购于美国 Gibco 公司;氘标记的胸腺嘧啶核苷(^3H -TdR)购于中国科学院上海应用物理研究所;T 细胞培养上清液 IL-2、IL-4、干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)和转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)水平 ELISA 试剂盒购于美国 R&D

2016-04-06 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81173075、81330081、81202541);安徽省自然科学基金(编号:1208085QH146);

安徽医科大学青年拔尖人才支持计划(2013);第三批安徽医科大学校级中青年学术技术带头人基金

作者单位:安徽医科大学临床药理研究所、抗炎免疫药物教育部重点实验室、安徽抗炎免疫药物协同创新中心,合肥 230032

作者简介:杨思民,男,硕士研究生;

魏 伟,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: wwei@ahmu.edu.cn;

汪庆童,女,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: hf-wqt727@163.com

公司; 兔抗 CD3 多克隆抗体购于北京博奥森生物技术有限公司; rhTNFR: Fc 购于上海中信国健药业有限公司; 重组 TACI-Ig 融合蛋白(批号: 20120607) 和阴性对照 IgG-Fc(批号: 20120603) 由烟台荣昌生物制药有限公司提供; 流式抗体 CD69/PE、CD154/PE、CD62L/PE、CD4/FITC 购于美国 Biogend 公司; 抗 BAFFR、TACI、IL-2R 一抗购于美国 Santa Cruz 公司; 抗 NF- κ B p100/p52 和抗磷酸化 NF- κ B p100/p52 (S865) 一抗购于英国 Abcam 公司; 辣根酶标记的山羊抗兔 IgG 及山羊抗鼠 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 购于上海吉玛制药技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 小鼠脾脏 T 淋巴细胞的分离 处死小鼠, 无菌剥离脾脏, 常规制备小鼠脾脏细胞悬液后用小鼠淋巴细胞分离液纯化, 分离得脾脏单个核细胞悬液后进行细胞计数。调节细胞浓度至每 40 μ l 含 10^7 个细胞。每 10^7 个细胞加入 10 μ l 非 T 细胞的生物素化抗体混合物, 轻轻震荡混合经 4 $^{\circ}$ C 孵育后再按照每 10^7 个细胞加入 20 μ l 抗生物素微珠的比例, 轻轻震荡混合经 4 $^{\circ}$ C 孵育后, 将细胞悬液在冲洗的 PBS 流净前加入处于磁场中的分离柱, 收集流出液, 再用 500 μ l PBS 冲洗 3 遍后得到未被磁性标记的 T 淋巴细胞。将得到的 T 淋巴细胞重新计数铺板培养。

1.3.2 分组和给药 将收集到的 T 淋巴细胞分为正常组、刺激组、rhTACI-Ig 浓度组(0.01、0.1、1、10、100 μ g/ml)、IgG-Fc(10 μ g/ml) 阴性对照组和重组人 II 型肿瘤坏死因子受体-抗体融合蛋白(tumour necrosis factor Fc fusion protein, rhTNFR: Fc)(10 μ g/ml) 阳性对照组。除正常组外, 其余各组均用 anti-CD3(10 μ g/ml) 刺激。T 淋巴细胞给药培养 72 h 后分别用于细胞增殖检测、细胞因子水平测定、细胞亚群检测以及受体和信号分子表达水平测定。

1.3.3 T 淋巴细胞增殖检测 在 96 孔培养板上, 每孔加入 100 μ l 纯化 T 淋巴细胞悬液(终浓度为 1×10^7 /ml) 及 anti-CD3(终浓度为 10 μ g/ml), 同时每个孔加入不同浓度的 rhTACI-Ig(终浓度为 0.01、0.1、1、10、100 μ g/ml)、rhTNFR: Fc(终浓度为 10 μ g/ml) 或 IgG-Fc(终浓度为 10 μ g/ml), 每孔的终容积为 200 μ l, 置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱培养。在收集细胞前 12 h 时每孔加入 25 μ l ³H-TdR(10⁵ Bq/ml) 后培养结束, 用多头细胞收集器收集细胞于玻璃纤维滤纸上, 用液闪仪测其放射性。

1.3.4 T 淋巴细胞培养上清液中 IL-2、IFN- γ 、IL-4、TGF- β 水平检测 在 24 孔培养板上, 每孔加入 500 μ l 纯化 T 淋巴细胞悬液(1×10^7 /ml) 和 anti-CD3(终浓度为 10 μ g/ml), 同时每个孔加入不同浓度的 rhTACI-Ig、rhTNFR: Fc 或 IgG-Fc, 每孔的终容积为 1 ml。培养 72 h 后离心(3 000 r/min, 10 min), 取上清液, 采用 ELISA 法检测 IL-2、IFN- γ 、IL-4、TGF- β 水平。

1.3.5 T 淋巴细胞亚群比例检测 在 50 ml 培养瓶中, 每瓶分别加入 2×10^7 个经纯化 T 淋巴细胞悬液和抗 CD3(终浓度为 10 μ g/ml), 加入后最终的容积为 2 ml, 加入不同浓度的 rhTACI-Ig、rhTNFR: Fc 或 IgG-Fc, 培养 72 h 后, 收集细胞, 每管 300 μ l 细胞悬液(1×10^6 /ml), 分别加入 5 μ l 适当稀释的 CD154-PE/CD4-FITC 一抗、CD69-PE/CD4-FITC 一抗、CD62L-PE/CD4-FITC 一抗, 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min 后用流式细胞仪检测。

1.3.6 T 淋巴细胞 BAFFR、TACI、IL-2R、磷酸化和总 NF- κ B p100/p52 检测 将 6 孔板内给药处理后的 T 淋巴细胞转移至 2 ml EP 管中, 离心(3 000 r/min, 5 min), 弃去培养液。每管加入 50 μ l 蛋白裂解液(PMSF 1:100), 充分混匀, 冰上静置裂解 30 min 后, 在 -80 $^{\circ}$ C 和 4 $^{\circ}$ C 冰箱间反复冻融 3 次, 离心(14 000 r/min, 15 min), 小心吸取上清液即得总蛋白, 用 Western blot 法检测 BAFFR、TACI、IL-2R、磷酸化和总 NF- κ B p100/p52 的表达。将提取的蛋白定量后加入上样缓冲液, 进行 SDS-PAGE 电泳, 转移至 PVDF 膜后, 用封闭液封闭 2 h, 洗脱缓冲液洗 3 次, 4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育一抗过夜。次日, 室温下复温 10 min, 洗脱缓冲液洗 3 次, 37 $^{\circ}$ C 摇床孵育对应的二抗 2 h, 洗脱缓冲液洗 3 次, ECL 试剂盒显色。用凝胶成像系统扫描结果, 以特异性条带的灰度值来反映蛋白表达水平。

1.3.7 siRNA 转染 将分离的 T 淋巴细胞按 3×10^6 /孔接种在 12 孔培养板中, 1 000 r/min, 离心 10 min, 弃上清液。每管加入 100 μ l Nucleofector Solution、100 nmol/L siRNA, 使用细胞核转染仪进行电转。电转后, 立即补充培养液至 1.5 ml, 培养 24 h 后加 BAFF 继续作用 24 h。TACI siRNA 序列为 5'-CAGCGGAGTGGAGAAGTTGAA-3'; BAFFR siRNA 序列为 5'-TGTGGAAAGGACGAAACACC-3'。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件处理和分析数据, 结果以表示, 两组均数间差异比较用 *t* 检验, 多组均数间差异的比较采用 One Way Anova 检验。

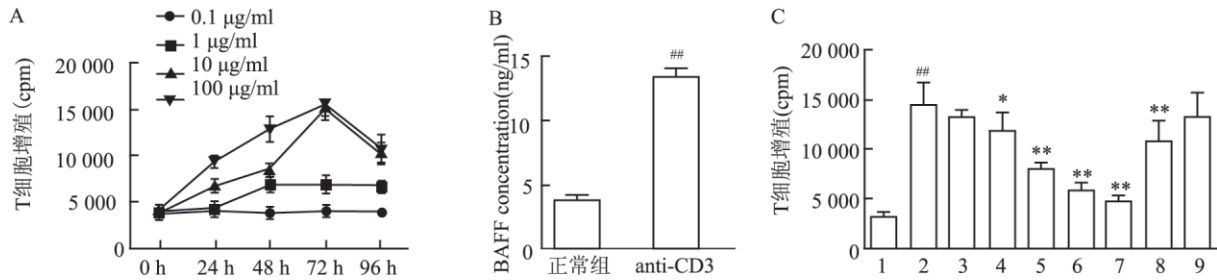


图1 rhTACI-Ig 体外对抗 CD3 抗体诱导的 T 淋巴细胞增殖能力的影响

1: 正常组; 2: anti-CD3 10 µg/ml; 3: rhTACI-Ig 0.01 µg/ml; 4: rhTACI-Ig 0.1 µg/ml; 5: rhTACI-Ig 1 µg/ml; 6: rhTACI-Ig 10 µg/ml; 7: rhTACI-Ig 100 µg/ml; 8: rhTNFR : Fc 10 µg/ml; 9: IgG-Fc 10 µg/ml; 与正常组比较: $^{##}P < 0.01$; 与抗 CD3 刺激组比较: $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$

2 结果

2.1 抗 CD3 抗体诱导 T 淋巴细胞 BAFF 分泌和增殖及 rhTACI-Ig 的作用 抗 CD3 抗体不同浓度梯度和作用时间实验显示, 10 µg/ml 抗体刺激 T 淋巴细胞 72 h 为体外刺激的亚适浓度和最适时间。抗 CD3 抗体(10 µg/ml) 刺激 72 h, T 淋巴细胞分泌大量 BAFF 且增殖功能明显亢进 ($F = 2.869$, $P = 0.0004$)。rhTACI-Ig(0.1、1、10、100 µg/ml) 和 rhTNFR : Fc(10 µg/ml) 可明显抑制异常活化的 T 淋巴细胞增殖反应 ($F = 51.75$, $P < 0.05$, $P < 0.01$)。见图 1。

2.2 抗 CD3 抗体刺激对 T 淋巴细胞培养上清液中细胞因子水平的影响以及 rhTACI-Ig 对其的影响

抗 CD3 抗体刺激可使 T 淋巴细胞培养上清液中 IL-2、IFN- γ 和 TGF- β 水平显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), IL-4 浓度升高但无显著性。rhTACI-Ig(1、10、100 µg/ml) 可明显降低 IL-2 ($F = 5.571$, $P < 0.01$) 和 IFN- γ ($F = 3.876$, $P < 0.01$) 水平; 降低 IL-4 ($F = 7.105$, $P < 0.05$) 和 TGF- β ($F = 1.663$, $P < 0.05$) 水平。RhTNFR: Fc 可以显著降低抗 CD3 抗体刺激后升高的 IL-2、IL-4 水平 ($P < 0.05$), 但对 IFN- γ 和 TGF- β 无明显作用; IgG-Fc 组对上述经抗 CD3 刺激后升高的细胞因子水平均无明显影响。见图 2。

2.3 rhTACI-Ig 对抗 CD3 抗体刺激的 T 淋巴细胞亚群比率的影响 抗 CD3 抗体体外刺激 T 淋巴细胞, 可使 CD4 $^{+}$ CD69 $^{+}$ 和 CD4 $^{+}$ CD154 $^{+}$ 细胞比率显著升高 ($P < 0.01$), 同时显著降低 CD4 $^{+}$ CD62L $^{+}$ 细胞比率 ($P < 0.01$)。rhTACI-Ig(1、10、100 µg/ml) 可显著抑制被升高的 CD4 $^{+}$ CD69 $^{+}$ 细胞比率 ($F = 14.19$, $P < 0.05$, $P < 0.01$); rhTACI-Ig(0.1、1、10、100 µg/ml) 可明显降低 CD4 $^{+}$ CD154 $^{+}$ 细胞比率

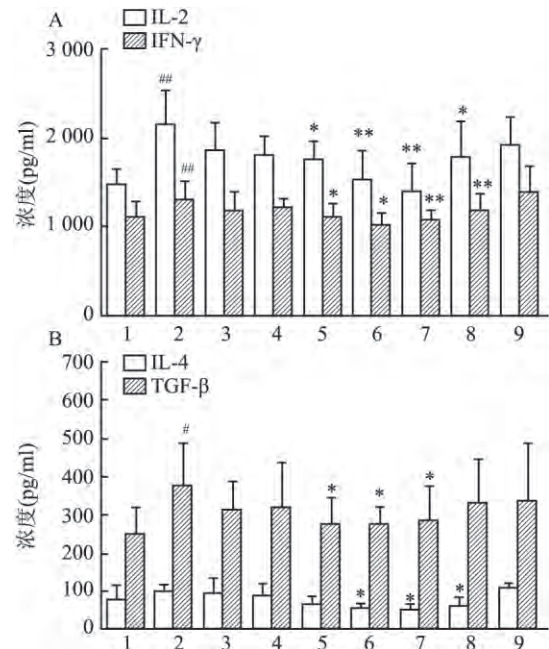


图2 抗 CD3 抗体刺激对于 T 淋巴细胞培养

上清液中细胞因子水平的影响以及 RhTACI-Ig 对其的影响

1: 正常组; 2: anti-CD3 10 µg/ml; 3: rhTACI-Ig 0.01 µg/ml; 4: rhTACI-Ig 0.1 µg/ml; 5: rhTACI-Ig 1 µg/ml; 6: rhTACI-Ig 10 µg/ml; 7: rhTACI-Ig 100 µg/ml; 8: rhTNFR: Fc 10 µg/ml; 9: IgG-Fc 10 µg/ml; 与正常组比较: $^{#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$; 与抗 CD3 抗体刺激组比较: $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$

($F = 19.31$, $P < 0.05$, $P < 0.01$); rhTACI-Ig(10、100 µg/ml) 可显著升高 CD4 $^{+}$ CD62L $^{+}$ 细胞比率 ($F = 12.69$, $P < 0.05$); rhTNFR : Fc 可以明显升高 CD4 $^{+}$ CD62L $^{+}$ 细胞比率 ($P < 0.05$), 但对 CD4 $^{+}$ CD69 $^{+}$ 和 CD4 $^{+}$ CD154 $^{+}$ 无影响; IgG-Fc 组对上述细胞亚群比率均无影响(图 3)。

2.4 RhTACI-Ig 对 T 淋巴细胞 BAFFR、TACI、IL-2R 表达和 NF- κ B p100/p52 蛋白表达情况活性的影响 纯化培养 T 细胞 抗 CD3 抗体体外刺激可显著升高 T 淋巴细胞 TACI、BAFFR、IL-2R 的表达;

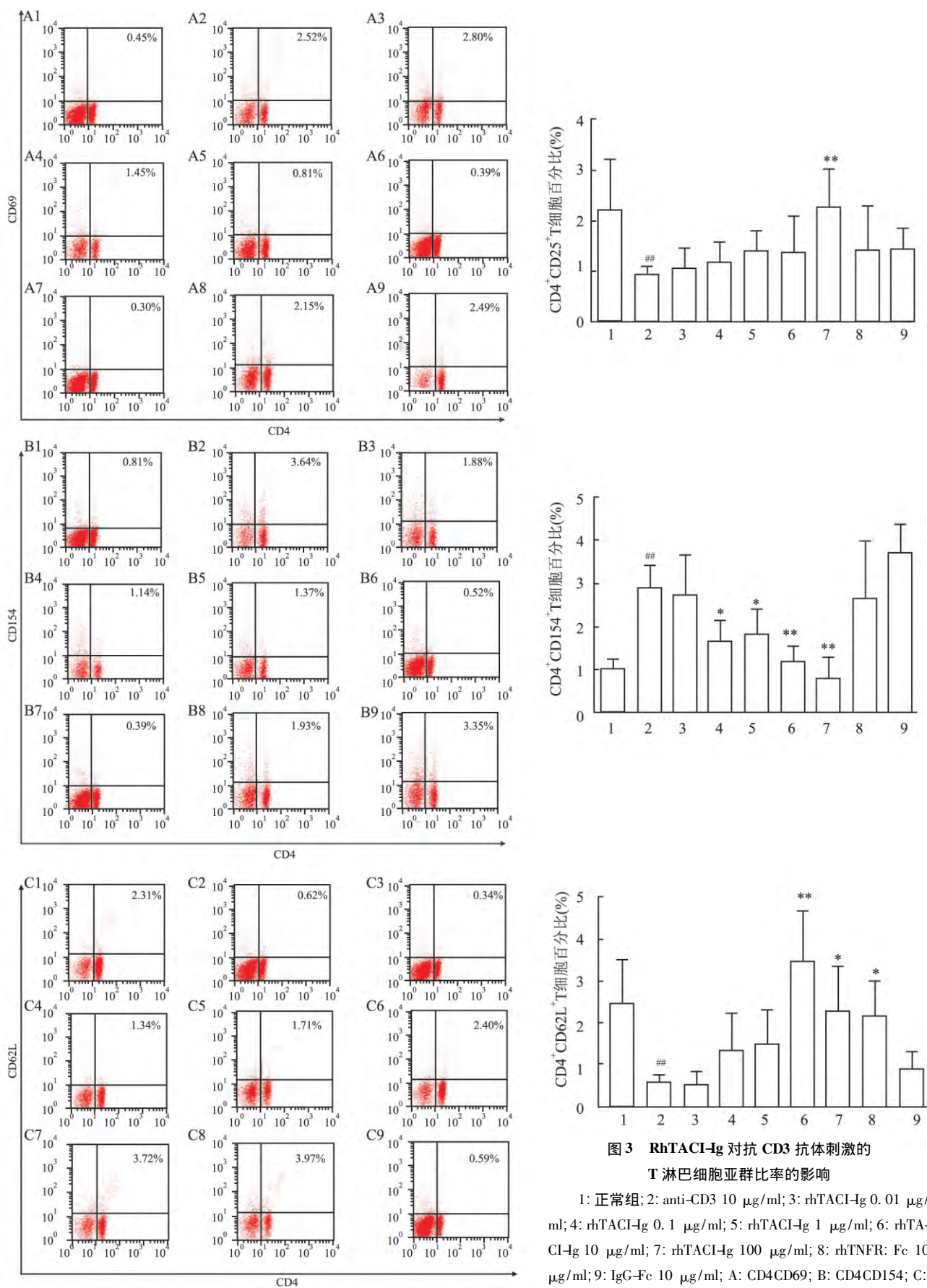


图3 RhTACI-Ig对抗CD3抗体刺激的T淋巴细胞亚群比率的影响

1: 正常组; 2: anti-CD3 10 $\mu\text{g/ml}$; 3: rhTACI-Ig 0.01 $\mu\text{g/ml}$; 4: rhTACI-Ig 0.1 $\mu\text{g/ml}$; 5: rhTACI-Ig 1 $\mu\text{g/ml}$; 6: rhTACI-Ig 10 $\mu\text{g/ml}$; 7: rhTACI-Ig 100 $\mu\text{g/ml}$; 8: rhTNFR:Fc 10 $\mu\text{g/ml}$; 9: IgG-Fc 10 $\mu\text{g/ml}$; A: CD4CD69; B: CD4CD154; C: CD4CD62L; 与正常组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与抗 CD3 抗体刺激组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

rhTACI-Ig(1、10 $\mu\text{g/ml}$) 体外给药对异常升高的 TACI($F = 562.3$, $P < 0.01$)、BAFFR($F = 1032$, $P < 0.01$)、IL-2R($F = 9.126$, $P < 0.05$) 水平有抑制作用,提示 rhTACI-Ig 抑制 BAFF 受体信号通路,并阻止 T 细胞活化。抗 CD3 抗体可促进 T 细胞 NF- κB p100/p52 位点丝氨酸磷酸化活化,不改变总 NF- κB p100/p52 水平;rhTACI-Ig(1、10 $\mu\text{g/ml}$) 阻止了抗 CD3 抗体诱导的 NF- κB p100/p52 磷酸化($F = 20.60$, $P < 0.05$)。见图 4。

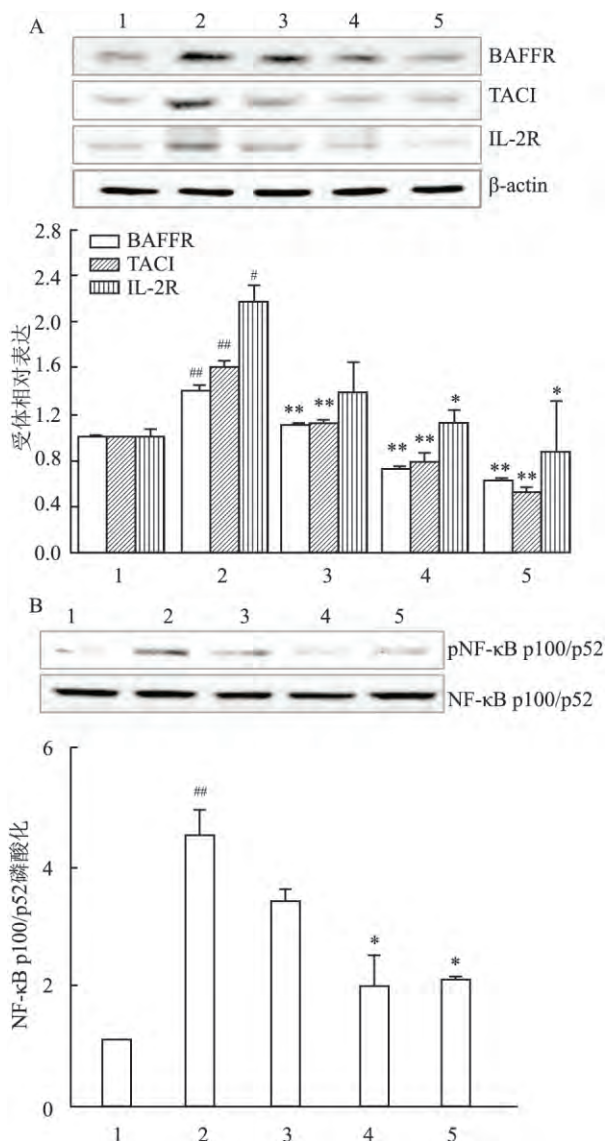


图4 RhTACI-Ig对T淋巴细胞BAFFR、TACI、IL-2R表达和NF- κB 活性的影响

1: 正常组; 2: anti-CD3 10 $\mu\text{g/ml}$; 3: rhTACI-Ig 0.1 $\mu\text{g/ml}$; 4: rhTACI-Ig 1 $\mu\text{g/ml}$; 5: rhTACI-Ig 10 $\mu\text{g/ml}$; 与正常组比较: $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$; 与抗 CD3 抗体刺激组比较: $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$

2.5 T 淋巴细胞 BAFFR 或 TACI 受体对抗 CD3 抗体诱导细胞增殖的影响

用电转法将 BAFFR 或 TACI siRNA 分别转染入分离纯化的小鼠 T 淋巴细胞内,转染 48 h 后用 Western blot 法检测转染效率,筛选最佳 siRNA 序列。实验表明 BAFFR siRNA 的最高沉默率为 58.3% ($F = 64.05$),TACI siRNA 的最高沉默率为 63.4% ($F = 41.35$) (图 5)。沉默 BAFFR 后,抗 CD3 抗体虽然仍能刺激 T 细胞轻度增殖,但增殖程度显著低于对照组($F = 51.49$, $P < 0.01$);沉默 TACI 也对抗 CD3 抗体诱导的 T 细胞增殖有抑制作用($F = 57.63$, $P < 0.001$) (图 6),提示抗 CD3 抗体体外促进 T 细胞增殖和活化的作用部分通过分泌 BAFF,激活 BAFFR 和 TACI 受体及下游信号通路来实现。

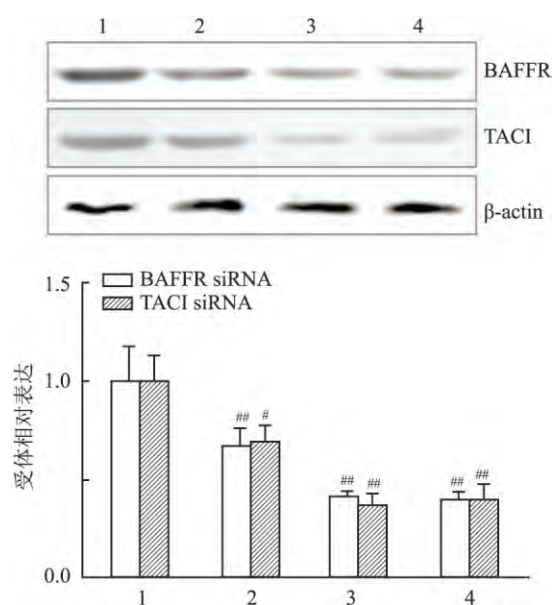


图5 沉默BAFFR或TACI对抗CD3抗体受体表达水平的影响

1: 阴性对照; 2: siRNA 沉默 24 h; 3: siRNA 沉默 48 h; 4: siRNA 沉默 72 h; 与阴性对照比较: $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$

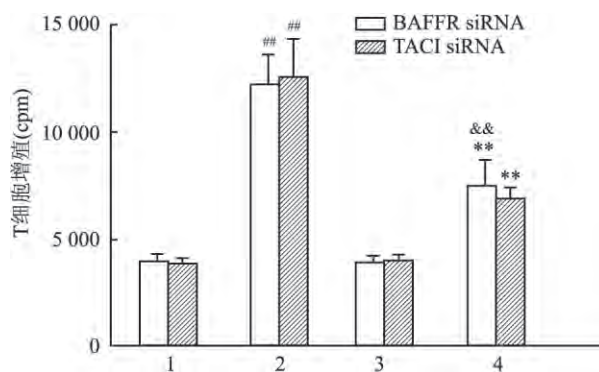


图6 沉默BAFFR或TACI对抗CD3抗体诱导T淋巴细胞增殖的影响

1: 阴性对照; 2: 阴性对照 + anti-CD3 10 $\mu\text{g/ml}$; 3: SiRNA; 4: SiRNA + anti-CD3 10 $\mu\text{g/ml}$; 与阴性对照比较: $^{\#\#}P < 0.01$; 与阴性对照 + anti-CD3 组比较: $^{**}P < 0.01$; 与 SiRNA 组比较: $^{\&\&}P < 0.01$

3 讨论

免疫调节的异常在自身免疫病的发病机制中起着关键作用,涉及到多种免疫性细胞,其中 T 淋巴细胞的异常增殖与活化在自身免疫性疾病的发生发展及病理损伤起着重要的作用^[4]。CD3 分子作为分布于所有 T 淋巴细胞膜上的重要分化抗原,是 T 淋巴细胞共有的分子表面标志物。当 CD3 与 T 淋巴细胞上的 T 淋巴细胞受体(TCR)特异性识别结合后,CD3 通过 TCR-CD3 复合体将信号转导到 T 淋巴细胞胞质内,在诱导 T 淋巴细胞活化过程中起着关键的作用,从而促进 T 淋巴细胞的增殖以及各种细胞因子的分泌^[5]。因此,抗 CD3 抗体能够模拟抗原与 TCR 结合,向 T 淋巴细胞传递有效的信号模拟 CD3 与 TCR 结合后产生的效应。静息 T 细胞不表达 IL-2R,一旦被活化,T 细胞分泌大量 IL-2 并迅速表达 IL-2R^[6]。本实验显示,抗 CD3 抗体促进 T 淋巴细胞高表达 IL-2R,活化 NF- κ B p100/p52,产生大量 BAFF,进一步促进 T 细胞的增殖活化。抑制 BAFF 受体 BAFFR 或 TACI 表达可减弱抗 CD3 抗体对 T 细胞的刺激作用,提示 BAFF 通路是除 TCR 信号外,抗 CD3 抗体活化 T 细胞的重要通路之一。

目前,在 B 淋巴细胞中作为 BAFF 的竞争性拮抗剂 rhTACI-Ig 对其作用以及相关的作用机制的研究^[7]已较深入,但在 T 淋巴细胞中 rhTACI-Ig 的影响及相关作用机制尚未清楚。然而在 RA、SLE 等自身免疫病中,CD4⁺ T 淋巴细胞对于炎症免疫反应的诱发和持续起重要作用。CD4⁺ T 细胞被自身抗原或细胞因子刺激活化后,分化为不同的功能亚群,如 Th1、Th2 细胞或调节性 T 细胞。这些 CD4⁺ T 细胞通过与其他免疫细胞的相互作用,形成复杂的功能网络,释放 Th1(IL-2、IFN- γ)、Th2(IL-4)、Treg(TGF- β) 型细胞因子^[8]。本实验表明,经抗 CD3 抗体刺激的 T 淋巴细胞上清中上述细胞因子均出现了不同程度的升高,而在 rhTACI-Ig 体外用药时发现其能不同程度地降低其水平。

CD62L 表达于初始 T 淋巴细胞,在相关特异性细胞因子或趋化因子激活淋巴细胞后,可使其细胞表面 CD62L 表达迅速下调^[9]。CD69 在 T 淋巴细胞活化后很短时间即可表达并迅速达到高峰,也是最早表达的分子表面标志,其作为细胞共刺激信号可进一步增强 T 淋巴细胞的活化或增殖分化^[10]。CD154(CD40L) 与 B 淋巴细胞表面的 CD40 结合,CD154 与 CD40 这对共刺激分子在 B 淋巴细胞中产

生关键的作用,可以活化 B 淋巴细胞、刺激抗体产生以及免疫球蛋白类型转换等,同时,对于 T 淋巴细胞活化与增殖及调节其所分泌的细胞因子等过程中也起重要的作用。未活化 Th 细胞(CD4⁺ CD62L⁺)、表达活化诱导分子 Th 细胞(CD4⁺ /CD69⁺) 和表达 CD40L 的 Th 细胞(CD4⁺ /CD154⁺) 比例及其所分泌的细胞因子在 RA、SLE 等自身免疫疾病的发病机制中起着关键作用,其比例变化可反映机体的免疫功能状态及药物的作用疗效^[11]。RhTACI-Ig 可调节 T 细胞表面活化标志分子的表达。

TACI 和 BAFFR 与肿瘤坏死因子受体相关因子(TNF receptor-associated factor, TRAF) 偶联,活化核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B) p52,降解促凋亡蛋白 Bim,介导细胞活化^[12]。RhTACI-Ig 作为一种诱骗受体,可作为竞争性拮抗剂结合 BAFF 和 APRIL,阻止它们与其表达在细胞上的相应受体结合,从而阻断其下游信号通路,减少炎症免疫细胞因子的产生^[13]。在一些自身免疫病的报道中,使用 rhTACI-Ig 后病情可以得到一定的缓解,体内的血清中免疫球蛋白和自身抗体水平快速降低,并且能使病人体内表达水平升高的 BAFF/APRIL 同源三聚体及异源三聚体降低^[14-15]。本研究显示, rhTACI-Ig 可以通过中和抗 CD3 抗体刺激 T 细胞产生的 BAFF,抑制 BAFF 受体信号和 NF- κ B 活性,减少 T 细胞表达 IL-2R,阻止 T 细胞增殖,显著抑制 Th1 型细胞因子产生,明显降低活化 Th 细胞(CD4⁺ /CD69⁺ 和 CD4⁺ /CD154⁺) 比例,升高未活化 T 细胞(CD4⁺ CD62L⁺) 比例。综上, rhTACI-Ig 对治疗 T 细胞反应依赖的自身免疫病有良好前景。

参考文献

- [1] Hirsch R, Gress R E, Pluznik D H, et al. Effects of *in vivo* administration of anti-CD3 monoclonal antibody on T cell function in mice. II. *In vivo* activation of T cells [J]. *J Immunol*, 1989, 142 (3): 737-43.
- [2] Boyman O, Kolios A G, Raeber M E. Modulation of T cell responses by IL-2 and IL-2 complexes [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2015, 33 (4 Suppl 92): 54-7.
- [3] Wei F, Chang Y, Wei W. The role of BAFF in the progression of rheumatoid arthritis [J]. *Cytokine*, 2015, 76(2): 537-44.
- [4] Burmester G R, Feist E, Dörner T. Emerging cell and cytokine targets in rheumatoid arthritis [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2014, 10 (2): 77-88.
- [5] Masopust D, Schenkel J M. The integration of T cell migration, differentiation and function [J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13 (5): 309-20.

- [6] Ruiz-Medina B E , Ross J A , Kirken R A. Interleukin-2 receptor β Thr-450 phosphorylation is a positive regulator for receptor complex stability and activation of signaling molecules [J]. *J Biol Chem* , 2015 , 290(34) : 20972 – 83.
- [7] Wada K , Maeda K , Tajima K , et al. Expression of BAFF-R and TACI in reactive lymphoid tissues and B-cell lymphomas [J]. *Histopathology* , 2009 , 54(2) : 221 – 32.
- [8] Chen L , Flies D B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition [J]. *Nat Rev Immunol* , 2013 , 13(4) : 227 – 42.
- [9] Ivanova I , Seledtsova G , Mamaev S , et al. Immune responses induced by T-cell vaccination in patients with rheumatoid arthritis [J]. *Hum Vaccin Immunother* , 2014 , 10(5) : 221 – 7.
- [10] Schoenberger S P. CD69 guides CD4⁺ T cells to the seat of memory [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 2012 , 109(22) : 8358 – 9.
- [11] 吴华勋,陈镜宇,汪庆童,等. 重组人肿瘤坏死因子受体融合蛋白体外对佐剂性关节炎大鼠淋巴细胞功能的影响 [J]. 安徽医科大学学报, 2012 , 47(11) : 1324 – 8.
- [12] Stohl W. Therapeutic targeting of the BAFF/APRIL axis in systemic lupus erythematosus [J]. *Expert Opin Ther Targets* , 2014 , 18(4) : 473 – 89.
- [13] Wang Q T , Ma Y K , Wei W , et al. Effect of rhTACI-Ig fusion protein on antigen-specific T cell responses from keyhole limpet haemocyanin challenged mice [J]. *Mol Immunol* , 2011 , 49(1–2) : 380 – 6.
- [14] Zhang L , Li P , Wei W , et al. Comparative efficacy of TACI-Ig with TNF- α inhibitor and methotrexate in DBA/1 mice with collagen-induced arthritis [J]. *Eur J Pharmacol* , 2013 , 708(1–3) : 113 – 23.
- [15] Yang Z , Fujii H , Mohan S V. Phosphofructokinase deficiency impairs ATP generation , autophagy , and redox balance in rheumatoid arthritis T cells [J]. *Nat Rev Rheumatol* , 2013 , 210(10) : 2119 – 34.

Inhibitory effect of rhTACI-Ig on anti-CD3 antibody induced T lymphocytes proliferation and activation

Yang Simin , Wang Qingtong , Liu Kangkang et al

(*Institute of Clinical Pharmacology , Anhui Medical University , Key Laboratory of Anti-inflammatory and Immune Medicine of Education Ministry of China , Collaborative Innovation Center of Anti-inflammatory and Immune Medicine , Hefei 230032*)

Abstract Objective To investigate the molecular mechanism of anti-CD3 antibody induced T lymphocytes proliferation and activation and observe the effect of recombination human TACI-Ig (rhTACI-Ig) . **Methods** T lymphocytes were purified from the spleens of mice by immunomagnetic beads and treated with anti-CD3 antibody with or without different concentrations of rhTACI-Ig , recombinant human tumor necrosis factor- α receptor II: IgG Fc (rhTNFR: Fc) or IgGFc. The proliferation of T lymphocytes was determined by [³H]-TdR incorporation , the percentages of T lymphocytes subsets were tested by flow cytometry. Western blot was applied to evaluate the expression of B cell activating factor receptor(BAFFR) , transmembrane activator or calcium-modulating cyclophilin ligand-interactor (TACI) , IL-2 receptor (IL-2R) and the phosphorylation of NF- κ B. Small interfering RNAs were used to block BAFFR or TACI expression. **Results** Anti-CD3 obviously induced the activation of T lymphocytes , upregulated BAFF , interleukin-2 (IL-2) , interferon- γ (IFN- γ) and transforming growth factor- β (TGF- β) secretion , promoted BAFFR , TACI and IL-2R expression , activated NF- κ B ($P < 0.05$) . The administration of rhTACI-Ig (0.1 , 1 , 10 , 100 μ g/ml) inhibited the proliferation of T lymphocytes induced by anti-CD3 antibody ($P < 0.05$) . RhTACI-Ig(1 , 10 , 100 μ g/ml) significantly decreased the production of cytokines ($P < 0.05$, $P < 0.01$) , markedly down-regulated the percentage of CD4⁺ CD69⁺ and CD4⁺ CD154⁺ T lymphocytes , elevated the proportion of CD4⁺ CD62L⁺ T lymphocytes ($P < 0.05$, $P < 0.01$) . Meanwhile , rhTACI-Ig (10 , 100 μ g/ml) treatment decreased the level of BAFFR , TACI , IL-2 on T lymphocytes , as well as attenuated the activation of NF- κ B ($P < 0.05$) . Depletion of BAFFR or TACI markedly blocked anti-CD3 antibody dependent T cell proliferation ($P < 0.05$, $P < 0.01$) . **Conclusion** Anti-CD3 antibody promotes T lymphocytes activation partially through BAFF production and BAFF receptors signaling. RhTACI-Ig neutralizes BAFF , inhibits BAFF signaling and therefore attenuates T lymphocytes activation.

Key words B-cell activating factor; recombination human TACI-Ig; T lymphocytes; immunological therapy; autoimmune diseases