

泼尼松和 TACI-Ig 联合用药对 MRL/lpr 小鼠产生自身抗体的作用及机制

邓晓媚*, 严尚学*, 魏伟

摘要 目的 研究泼尼松和跨膜激活和钙调亲环素配体相互作用因子融合蛋白(TACI-Ig)联合用药对系统性红斑狼疮 MRL/Mpslac-lpr(MRL/lpr)小鼠的治疗作用及部分机制。方法 将 MRL/lpr 小鼠随机分为 6 组,即模型组、醋酸泼尼松(Pre)组(2.5、5.0 mg/kg)、TACI-Ig 组(15.0 mg/kg)、Pre + TACI-Ig [(2.5 + 7.5)、(2.5 + 15.0) mg/kg]联合用药组,另设 BALB/c 小鼠作为正常对照组。各给药组小鼠每日灌胃给予 Pre、TACI-Ig 隔日皮下注射给药,模型组和正常对照组给予生理盐水,共计 13 周。观察联合用药对小鼠一般体征和尿蛋白的影响,HE 染色法检测小鼠脾脏和肾脏病理学变化,ELISA 法检测小鼠血清中自身抗体和 B 细胞活化因子(BAFF)水平的变化,流式细胞术检测脾脏浆细胞亚群比例,免疫组化法检测脾脏 CD138 的变化。结果 Pre 和 TACI-Ig 联合用药可以改善 MRL/lpr 小鼠皮肤损伤,降低尿蛋白,明显减少脾脏生发中心形成和白髓增生,显著减轻小鼠肾脏肾小球系膜细胞增生和肾小球纤维化,改善炎症状态,降低脾

脏浆细胞(CD19⁻CD138⁺)的比例,降低血清 BAFF 和抗核抗体(ANA)水平,但是对抗 ds-DNA 抗体水平无明显影响。

结论 Pre 和 TACI-Ig 联合用药对 MRL/lpr 小鼠具有治疗作用,其机制可能与抑制浆细胞分化、降低自身抗体产生有关。

关键词 系统性红斑狼疮;TACI-Ig;醋酸泼尼松;联合用药;浆细胞;自身抗体

中图分类号 R 967

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)09-1262-07

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种累及多系统、多器官的自身免疫疾病,以 B 淋巴细胞异常活化、自身反应性浆细胞异常增殖以及自身抗体大量产生、免疫复合物沉积导致的组织损伤为主要特征^[1-3]。B 淋巴细胞活化因子(B cell activating factor of the TNF family, BAFF)是 B 细胞存活、成熟、分化、抗体类别转换和分泌所需的重要因子^[4]。在 SLE 患者及狼疮动物模型体内均检测到 BAFF 表达水平的升高^[5],降低 BAFF 水平可明显改善 SLE 症状。跨膜激活和钙调亲环素配体相互作用因子融合蛋白(transmembrane activator and Calcium modulator cyclophilin ligand interactor-immunoglobulin, TACI-Ig)是将 TACI 的胞外部分与人 IgG-Fc 片段结合制成的可溶性新型生物制剂,作为一种诱骗受体,可以竞争性与 BAFF 结合,降低体内游离的 BAFF 水平,抑制 BAFF 的作用^[6]。糖皮

2014-05-09 接收

基金项目:安徽高校省级自然科学研究重点项目(编号:KJ2011A177);国家自然科学基金(编号:81173075、81330081)

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,合肥 230032

作者简介:邓晓媚,女,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

* 对本文具有同等贡献

rons were insulted by hypoxia/reoxygenation (H/R), and EDHF from rat MCA segment was induced by acetylcholine (ACh) in the presence of N^G-nitro-L-argininemethyl ester (L-NAME) and indomethacin (Indo), the rate of hippocampal neuron apoptosis was detected by Hoechst staining and flow cytometry (FC) methods. **Results** Examinations of FC and Hoechst staining showed that the apoptotic rate of rat hippocampal neurons was very low in the sham group, only about 3.1% and 2.2% respectively, but H/R injury caused an obvious increase of apoptosis of rat hippocampal neurons. Co-administration of endothelium-intact MCA segment with 1 μmol/L ACh or co-administration of endothelium-intact MCA segment with 1 μmol/L ACh + 30 μmol/L L-NAME + 10 μmol/L Indo markedly inhibits H/R-induced apoptosis of rat hippocampal neurons. However, administration of ACh or MCA segment separately had not effect on H/R-induced apoptosis of rat hippocampal neurons, and neither did co-administration of endothelium-denuded MCA segment with ACh. **Conclusion** Endogenous EDHF released from ACh-induced vascular endothelial cells significantly inhibits H/R-caused apoptosis of rat primarily cultured neurons.

Key words endothelium-derived hyperpolarizing factor; hippocampal neuron; apoptosis; hypoxia/reoxygenation

质激素是临床上治疗 SLE 的基础和经典用药,长期应用具有较多的副作用,临床多以联合用药提高疗效、降低临床糖皮质激素的用量以减轻其副作用^[7]。TACI-Ig 作为一种新型生物制剂对 SLE 具有治疗作用,与糖皮质激素联合应用治疗 SLE 是否具有联合用药优势,其作用特点和机制未见报道。该研究选用自发性红斑狼疮模型小鼠 MRL/lpr 作为研究对象,观察醋酸泼尼松(prednisone, Pre)和 TACI-Ig 联合用药对 MRL/lpr 小鼠的治疗作用,探讨联合用药的治疗优势及其部分机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 MRL/lpr 小鼠,雌性,体重(31±3)g,(8±1)周龄,SPF 级,购自上海斯莱克实验动物有限公司;BALB/c 小鼠,雌性,体重(21±2)g,(8±1)周龄,SPF 级,购自安徽医科大学实验动物中心。所有动物饲养于安徽医科大学实验动物中心屏障环境中。

1.1.2 主要试剂 TACI-Ig 由烟台荣昌生物工程有限公司提供(批号:20110609);Pre 由浙江仙琚制药股份有限公司生产(批号:120419),每片含 Pre 5 mg。临用前均用无菌生理盐水配制所需浓度。

检测血清 IgG 型抗 dsDNA 抗体、IgG 型抗核抗体(anti-nuclear antibody, ANA)和 BAFF 的 ELISA 试剂盒购自武汉华美生物工程有限公司;抗小鼠 FITC-CD19、PE-CD138 流式抗体购自美国 Biolegend 公司;兔抗小鼠 CD138 一抗购自英国 Abcam 公司;免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司(货号 SP-9000)。

1.1.3 主要仪器 IX-70 荧光倒置显微镜(日本 OLIMPUS 公司);FC 500 流式细胞仪分析仪(美国 Beckman 公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组与给药方法 实验分组:MRL/lpr 小鼠随机分为 6 组,每组 8 只,分别为模型组、Pre 组(2.5、5.0 mg/kg)、TACI-Ig 组(15.0 mg/kg)、Pre + TACI-Ig [(2.5±7.5)、(2.5±15.0) mg/kg]联合用药组(给药剂量根据人的等效剂量换算^[8-9])。另设 BALB/c 小鼠作为正常对照组。

给药方法:Pre 各组按照 0.2 ml/10 g 体重灌胃给药,每日一次;TACI-Ig 各组按照 0.2 ml/10 g 体重皮下注射给药,隔日一次;模型组和正常对照组同法给予生理盐水。总计给药 13 周。

1.2.2 病理学检查

1.2.2.1 病理学组织处理 处死小鼠,取脾脏和肾组织,置于含 10% 甲醛溶液固定,石蜡包埋,HE 染色,显微镜观察各组织病理学改变情况,并按照下列标准进行分级评分^[10-11],统计评分结果。

1.2.2.2 脾脏病理评分标准 脾脏病理从动脉周围淋巴鞘的细胞密度、淋巴小结、边缘区、红髓和生发中心的总数量进行判定,按照病变从轻到重进行 0~4(0 = 正常)级病理评分。

1.2.2.3 肾脏病理评分标准 1 级(1 分):正常或病变轻微,肾脏正常;2 级(2 分):单纯系膜病变,系膜增宽但绝大多数毛细血管开放,系膜区免疫复合物沉积;3 级(3 分):局灶增生性肾小球肾炎,< 50% 的肾小球局灶节段性毛细血管内和(或)毛细血管外增生、坏死和(或)硬化;系膜区和内皮下免疫复合物沉积;4 级(4 分):弥漫增生性肾小球肾炎,> 50% 的肾小球呈球性增生性病变、坏死、新月体;不同程度的硬化,肾间质明显的炎症细胞浸润;系膜区及内皮下免疫复合物沉积;5 级(5 分):膜性肾小球肾炎,毛细血管壁弥漫性增厚,上皮下和系膜区免疫复合物沉积;6 级(6 分):进行性硬化性肾小球肾炎进展期,肾小球破坏和节段硬化,肾小管萎缩,肾间质纤维化,免疫复合物沉积少见。

1.2.3 血清中自身抗体、BAFF 水平的测定 给药 13 周后,自小鼠眼眶静脉丛取血,3 000 r/min、4 ℃ 离心 10 min,收集上层血清,按照 ELISA 试剂盒说明书操作检测抗 dsDNA 抗体、ANA 和 BAFF 的水平。

1.2.4 脾脏组织浆细胞比例检测 给药结束后处死动物,无菌取脾脏,常规制备脾细胞悬液,然后小心加于同等体积的淋巴细胞分离液上,1 500 r/min 离心 15 min。收集第 2 层环状乳白色液体,接着加入 4 倍体积的 PBS 充分混匀后,1 500 r/min 离心 10 min。得到沉淀反复洗 2 次即得所需单个核淋巴细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)。调整细胞浓度至 6×10^5 /管,加入 FITC-CD19 和 PE-CD138 标记抗体及同型,室温避光孵育 15 min,用流式细胞仪检测 CD19⁻CD138⁺细胞的百分比。

1.2.5 脾脏组织 CD138 的免疫组化检测 给药结束后处死小鼠,取脾脏置 10% 中性甲醛固定,石蜡包埋,切片。梯度脱蜡,PBS 洗 3 次,用 3% H₂O₂、37 ℃ 孵育 10 min,微波抗原修复,PBS 洗后用山羊血清工作液封闭,再以 1:500 的 CD138 一抗工作液 4 ℃ 孵育过夜,37 ℃ 复温 30 min,PBS 洗 5 次,滴加二抗

工作液 37 °C 孵育 30 min ,PBS 洗 5 次 ,接着加入辣根过氧化物酶标记链霉素卵蛋白 50 μl ,37 °C 孵育 30 min ,PBS 洗 3 次 ,DAB 显色 ,苏木精复染 ,返蓝 ,最后脱水、透明、封片、镜检。细胞呈棕色为阳性。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 10.0 统计软件分析 ,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示 ,组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA)。

2 结果

2.1 联合用药对 MRL/lpr 小鼠一般体征的影响

MRL/lpr 模型小鼠在第 8 周龄开始出现尿蛋白 ,第 13 周龄时嘴部两边出现部分脱毛现象 ,并随着饲养时间延长被毛光泽下降 ,部分出现脱毛现象 ,动物尿蛋白程度逐渐加重。各给药组与模型组相比 ,动物虽然也有类似现象 ,但是个体数和严重程度均较模型组低。

2.2 联合用药对 MRL/lpr 小鼠组织病理的影响

2.2.1 联合用药对 MRL/lpr 小鼠脾脏病理的影响

对 MRL/lpr 模型小鼠脾脏进行病理组织学检查发现 脾脏白髓弥漫性增生 ,中央动脉管壁纤维性增厚 ,生发中心形成数量增多。Pre (2.5、5.0 mg/kg) 可显著抑制脾脏白髓增生 ,降低淋巴鞘密度 ,减少生发中心形成 ;TACI-Ig (15.0 mg/kg) 给药可减少生发中心形成和边缘区 ($F = 22.144$) ;联合用药较 Pre 单独用药可更有效改善 MRL/lpr 小鼠脾脏白髓增生 ($F = 15.822$) ,减少生发中心形成 ($F = 21.113$) 和淋巴鞘数量 ($F = 23.873$) ,红髓区域明显 ($F = 27.853$) ;与 TACI-Ig 单独用药相比 ,联合用药优势主要体现在减少白髓增生 ,见图 1、表 1。

2.2.2 联合用药对 MRL/lpr 小鼠肾脏病理的影响

给药结束时对小鼠肾脏进行组织病理学检查 ,镜下可见 MRL/lpr 小鼠具有明显的间质性肾炎特征 ,肾小球体积显著增大 ,系膜细胞增生 ,系膜基质增多 ,毛细血管基底膜增厚 ,肾小球纤维化 ,局部中性

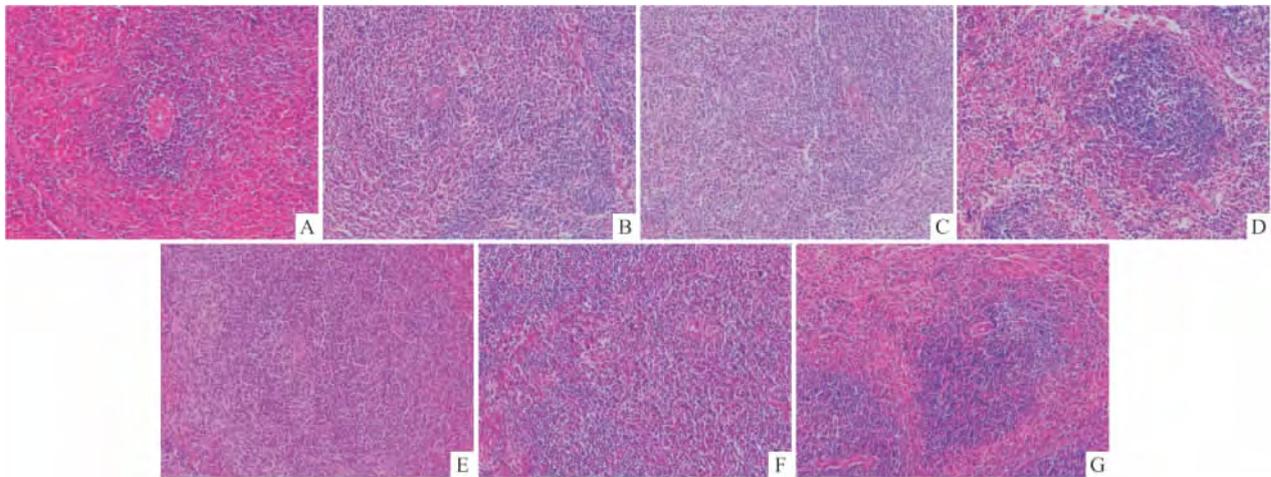


图 1 联合用药对 MRL/lpr 小鼠脾脏组织病理的影响 ×100

A: 正常对照组; B: 模型组; C: Pre 2.5 mg/kg 组; D: Pre 5.0 mg/kg 组; E: TACI-Ig 15.0 mg/kg 组; F: Pre 2.5 mg/kg + TACI-Ig 7.5 mg/kg 组; G: Pre 2.5 mg/kg + TACI-Ig 15.0 mg/kg 组

表 1 联合用药对 MRL/lpr 小鼠脾脏病理评分的影响 ($n = 8 \bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (mg/kg)	动脉周围淋巴鞘的细胞密度	淋巴小结	边缘区	红髓	生发中心数量	总评分
正常对照	-	0	0	0	0	0	0
模型	-	3.75 ± 0.46**	3.63 ± 0.52**	3.50 ± 0.53**	3.75 ± 0.46**	3.13 ± 0.35**	17.75 ± 1.75**
Pre	2.5	2.63 ± 0.74##	2.25 ± 0.71##	2.50 ± 0.76##	2.50 ± 0.76##	2.75 ± 0.71	12.63 ± 1.06##
Pre	5.0	1.50 ± 0.53###&	2.13 ± 0.83##	2.00 ± 0.53##	2.00 ± 0.53##	2.00 ± 0.76##&	9.63 ± 2.13###&
TACI-Ig	15.0	2.38 ± 0.92##	2.38 ± 0.92##	1.88 ± 0.64##	1.50 ± 0.76###&	2.13 ± 0.64###&	10.25 ± 2.12###&
Pre + TACI-Ig	2.5 + 7.5	2.25 ± 0.89##	2.25 ± 1.04##	2.13 ± 0.83##	2.13 ± 0.64##Δ	2.00 ± 0.53##&	10.75 ± 1.49##&
Pre + TACI-Ig	2.5 + 15.0	1.88 ± 0.64###&	1.88 ± 0.83##	1.63 ± 0.74###&	1.75 ± 0.71###&	1.88 ± 0.83###&	9.00 ± 1.93###&

与正常对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与 Pre 2.5 mg/kg 组比较: & $P < 0.05$, && $P < 0.01$; 与 TACI-Ig 15.0 mg/kg 组比较: Δ $P < 0.05$

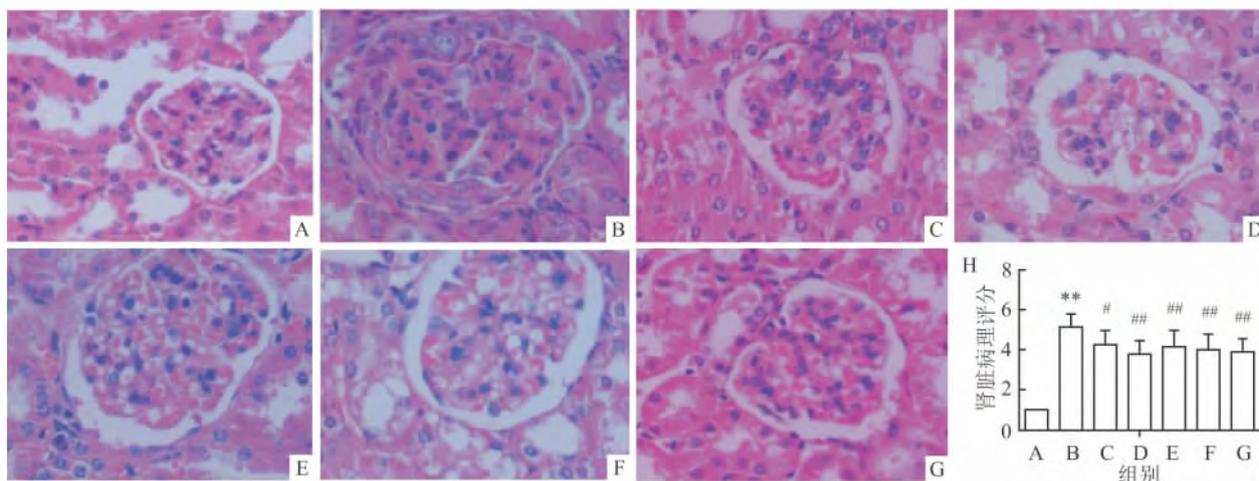


图2 联合用药对 MRL/lpr 小鼠肾脏组织病理的影响 ×400

A:正常对照组;B:模型组;C:Pre 2.5 mg/kg 组;D:Pre 5.0 mg/kg 组;E:TACI-Ig 15.0 mg/kg 组;F:Pre 2.5 mg/kg + TACI-Ig 7.5 mg/kg 组;G:Pre 2.5 mg/kg + TACI-Ig 15.0 mg/kg 组;H:肾脏病理统计图;与正常对照组比较: ** $P < 0.01$;与模型组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

粒细胞浸润。Pre (2.5、5.0 mg/kg)、TACI-Ig (15.0 mg/kg) 给药均可不同程度减轻肾小球系膜细胞增生,减轻肾小球纤维化,改善炎症状态;联合用药也能显著改善小鼠肾脏病理变化,但与 Pre、TACI-Ig 单独给药组相比差异无统计学意义 ($F = 29.969$), 见图 2。

2.3 联合用药对 MRL/lpr 小鼠自身抗体产生的影响 与正常小鼠相比, MRL/lpr 模型小鼠的血清抗 dsDNA 抗体和 ANA 水平均明显升高。Pre、TACI-Ig 单独和联合给药均能显著降低模型小鼠血清 ANA 的水平。与 Pre 小剂量 (2.5 mg/kg) 单独给药相比, 联合用药降低 ANA 的水平更显著;联合用药组与大剂量 Pre (5.0 mg/kg) 组、TACI-Ig 单独用药组相比, ANA 水平虽然有所降低,但是差异无统计学意义 ($F = 16.682$)。各给药组对于模型小鼠血清中显著升高的抗 dsDNA 抗体水平均未见明显的影响 ($F = 71.151$), 见表 2。

2.4 联合用药对 MRL/lpr 小鼠血清 BAFF 水平的影响 与正常小鼠相比, MRL/lpr 模型小鼠血清 BAFF 水平显著升高。Pre 2.5 mg/kg 和 5.0 mg/kg 单独给药后可显著降低血清 BAFF 水平;Pre 和 TACI-Ig (2.5 + 15.0) mg/kg 联合给药组的 BAFF 水平比单独应用 Pre 小剂量 (2.5 mg/kg) 降低更明显;但与 Pre 大剂量 (5.0 mg/kg) 单独用药以及 TACI-Ig 大剂量单独用药相比差异无统计学意义 ($F = 7.609$), 见表 2。

2.5 联合用药对 MRL/lpr 小鼠脾脏浆细胞比例的影响 与正常小鼠相比, MRL/lpr 模型小鼠脾脏浆

表 2 联合用药对小鼠血清自身抗体和 BAFF 水平的影响 ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (mg/kg)	Anti-dsDNA 抗体 (ng/ml)	ANA (ng/ml)	BAFF (pg/ml)
正常对照	-	5.46 ± 3.97	26.85 ± 2.97	28.29 ± 4.90
模型	-	30.35 ± 2.06**	50.35 ± 9.19**	43.87 ± 4.11**
Pre	2.5	30.08 ± 0.54	33.33 ± 8.50##	36.01 ± 5.13##
Pre	5.0	30.51 ± 0.80	18.73 ± 3.67###&	32.36 ± 3.39##
TACI-Ig	15.0	27.85 ± 4.57	32.27 ± 10.54##	32.42 ± 6.84##
Pre + TACI-Ig	2.5 + 7.5	29.62 ± 2.81	23.85 ± 0.83###&	31.94 ± 6.56##
Pre + TACI-Ig	2.5 + 15.0	28.80 ± 4.22	25.00 ± 5.75###&	27.93 ± 6.87###&

与正常对照组比较: ** $P < 0.01$;与模型组比较: ## $P < 0.01$;与 Pre 2.5 mg/kg 组比较: & $P < 0.05$, && $P < 0.01$

细胞 (CD19⁻ CD138⁺) 比例明显升高 (2.82 ± 0.35 vs 52.70 ± 7.81)。Pre 2.5 mg/kg 和 5.0 mg/kg 给药后可降低浆细胞的比例 (37.80 ± 6.52 & 30.53 ± 4.60); TACI-Ig 15.0 mg/kg 给药后也可显著降低浆细胞比例 (37.98 ± 4.00); Pre 和 TACI-Ig 不同剂量的联合用药均可显著降低浆细胞比例 (29.20 ± 3.65 & 25.40 ± 5.12)。Pre 和 TACI-Ig 联合用药相较于 Pre 小剂量 (2.5 mg/kg) 单独给药, 浆细胞水平降低更显著;相较于 Pre 大剂量 (5.0 mg/kg) 单独给药, 未出现显著差异;相较于 TACI-Ig 大剂量单独用药, 浆细胞水平下降更显著 ($F = 28.012$), 见图 3、4。

2.6 联合用药对 MRL/lpr 小鼠脾脏浆细胞表面标志 CD138 的影响 CD138 特异性地表达在浆细胞表面, 可作为浆细胞的标志性分子。与正常小鼠相比, MRL/lpr 模型小鼠脾脏浆细胞阳染比例明显升高。Pre 2.5 mg/kg 和 5.0 mg/kg 给药、TACI-Ig 15.0 mg/kg 给药、Pre 和 TACI-Ig 不同剂量的联合用药均可显著降低浆细胞比例, 见图 5。

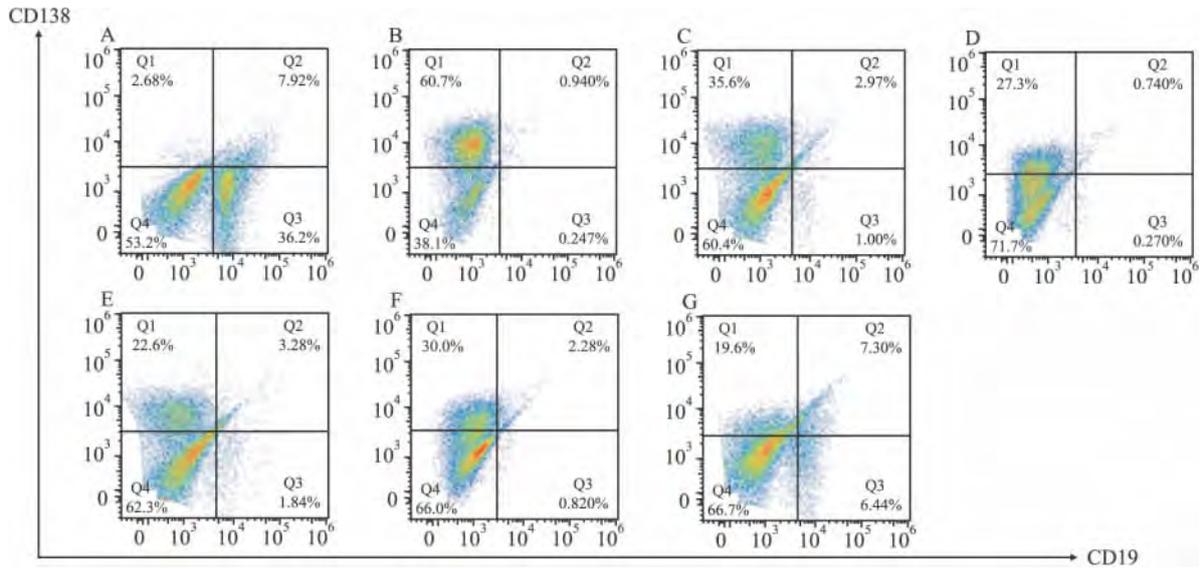


图3 流式细胞术检测联合用药对 MRL/lpr 小鼠脾脏组织浆细胞亚群的影响

图中所示 Q1 区域即 CD19⁻CD138⁺; A: 正常对照组; B: 模型组; C: Pre 2.5 mg/kg 组; D: Pre 5.0 mg/kg 组; E: TACI-Ig 15.0 mg/kg 组; F: Pre 2.5 mg/kg + TACI-Ig 7.5 mg/kg 组; G: Pre 2.5 mg/kg + TACI-Ig 15.0 mg/kg 组

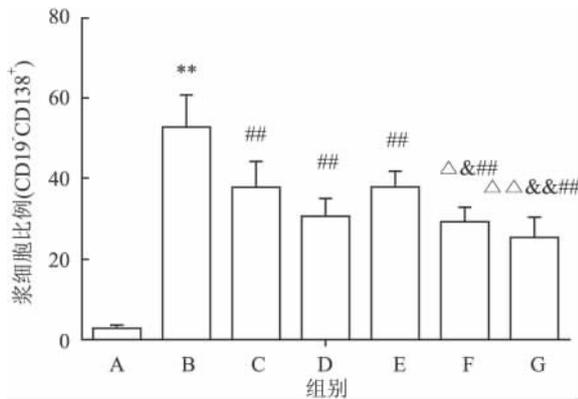


图4 联合用药对 MRL/lpr 小鼠脾脏组织浆细胞亚群的影响 (n=3)

A: 正常对照组; B: 模型组; C: Pre 2.5 mg/kg 组; D: Pre 5.0 mg/kg 组; E: TACI-Ig 15.0 mg/kg 组; F: Pre 2.5 mg/kg + TACI-Ig 7.5 mg/kg 组; G: Pre 2.5 mg/kg + TACI-Ig 15.0 mg/kg 组; 与正常组比较: ** P < 0.01; 与模型组比较: ## P < 0.01; 与 Pre 2.5 mg/kg 组比较: & P < 0.05, && P < 0.01; 与 TACI-Ig 15.0 mg/kg 组比较: Δ P < 0.05, ΔΔ P < 0.01

3 讨论

浆细胞的异常发育产生大量自身抗体,在 SLE 发病过程中具有重要作用。自发性红斑狼疮模型小鼠 MRL/lpr 体内 B 细胞的异常活化增殖导致一系列病理改变如皮肤损伤、淋巴结肿大、脾脏肿大等与人类 SLE 症状相类似。前期研究^[12-13]显示, TACI-Ig (7.5 mg/kg 和 15.0 mg/kg) 皮下注射用药可显著

改善 MRL/lpr 小鼠狼疮性肾炎的症状,显著降低脾脏早期和成熟 B 淋巴细胞的比例。Pre 5.0 mg/kg 给药也可显著改善小鼠狼疮性肾炎。本实验以此为基础,探讨联合给药是否比单独用药具有优势,以减少激素用量,提高疗效,减少不良反应。

脾脏病理学检查分项统计结果显示, Pre 给药可以抑制脾脏骨髓增生,降低淋巴鞘密度,改善脾脏组织中的淋巴细胞浸润现象;而 TACI-Ig 对于 MRL/lpr 模型小鼠脾脏组织病理的改善作用主要集中在减少骨髓和生发中心形成,对淋巴细胞弥漫性增生的抑制作用却不明显,这可能是因为 TACI-Ig 可以中和 BAFF 而抑制生发中心 B 细胞的发育和分化、影响生发中心形成所致。Pre 和 TACI-Ig 联合给药作用效果优于 Pre 小剂量单独用药,与 Pre 大剂量单独给药效果相似,提示联合给药可以降低激素用量。但是 Pre 和 TACI-Ig 联合用药对于肾脏肾小球肾炎的改善程度与单独用药相比无明显优势。

Pre 和 TACI-Ig 联合给药后可明显降低模型小鼠血清中自身抗体 ANA 的水平,降低模型小鼠浆细胞的比例,且这种作用比单独应用 Pre 2.5 mg/kg 或 TACI-Ig 15.0 mg/kg 更明显,提示联合药物治疗 SLE 的机制可能与抑制 B 细胞向浆细胞发育、降低浆细胞产生自身抗体有关。Pre 对于 B 细胞以及浆细胞的形成具有强大的抑制作用,可明显降低脾脏组织中浆细胞的比例,从而降低自身抗体的产生; TACI-Ig 有较好地免疫调节作用,可以竞争性结合 BAFF,

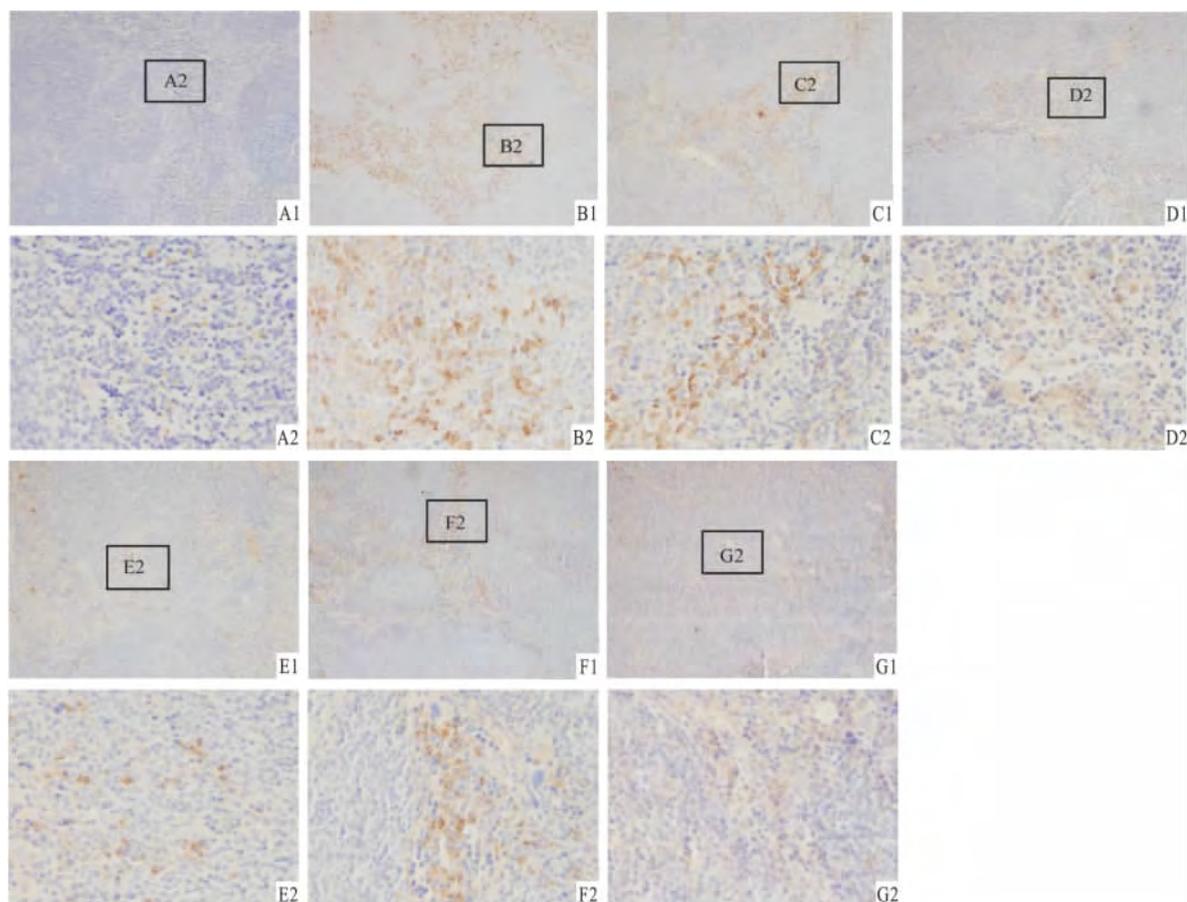


图5 联合用药对 MRL/lpr 小鼠脾脏 CD138 标志的影响

棕黄色细胞即为免疫组化阳染的细胞; A: 正常对照组; B: 模型组; C: Pre 2.5 mg/kg 组; D: Pre 5.0 mg/kg 组; E: TACI-Ig 15.0 mg/kg 组; F: Pre 2.5 mg/kg + TACI-Ig 7.5 mg/kg 组; G: Pre 2.5 mg/kg + TACI-Ig 15.0 mg/kg 组; 1: $\times 100$; 2: $\times 400$

降低体内游离的 BAFF 水平,从而抑制 BAFF 的作用,阻断 B 细胞的发育以及浆细胞的分化,降低浆细胞分泌自身抗体;因此,联合用药明显降低了 MRL/lpr 模型小鼠浆细胞的比例和 ANA 抗体的水平,更明显改善了病理表现。但是给药对于 ds-DNA 的水平并未有明显的影 响,这种现象在其他药物(如英夫利昔、环磷酰胺和利妥昔单抗的联合用药)治疗 SLE 的病例中也有类似发现^[14]。推测可能由于糖皮质激素对于免疫细胞具有选择性促凋亡作用,导致自身核抗原的产生,会引起大量抗核抗体如抗 dsDNA 抗体的产生。另有研究^[15]显示,不同部位的浆细胞对糖皮质激素治疗具有不同的敏感性,虽然糖皮质激素可有效清除脾脏 IgG 型抗体分泌细胞,但在骨髓和炎性肾脏中,分泌 IgG 型抗 dsDNA 抗体的浆细胞对于糖皮质激素治疗具有抵抗性。

综上所述,Pre 和 TACI-Ig 联合用药对自发性红斑狼疮小鼠具有明显治疗作用,在降低浆细胞比例

和自身抗体水平、改善脾脏病理等方面优于 Pre 小剂量(2.5 mg/kg)或者 TACI-Ig(15.0 mg/kg)单独用药,与 Pre 大剂量(5.0 mg/kg)单独用药相比差异无统计学意义。

参考文献

- [1] Azevedo P C, Murphy G, Isenberg D A. Pathology of systemic lupus erythematosus: the challenges ahead[J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1134:1-16.
- [2] DiLillo D J, Horikawa M, Tedder T F. B-lymphocyte effector functions in health and disease[J]. *Immunol Res*, 2011, 49(1-3):281-92.
- [3] McQueen F. A B cell explanation for autoimmune disease: the forbidden clone returns[J]. *Postgrad Med J*, 2012, 88(1038):226-33.
- [4] Vincent F B, Saulep-Easton D, Figgett W A, et al. The BAFF/APRIL system: emerging functions beyond B cell biology and autoimmunity[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2013, 24(3):203-15.

- [5] Stohl W. Therapeutic targeting of the BAFF/APRIL axis in systemic lupus erythematosus [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2014, 18(4):473–89.
- [6] Pena-Rossi C, Nasonov E, Stanislav M, et al. An exploratory dose-escalating study investigating the safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous atacicept in patients with systemic lupus erythematosus [J]. *Lupus*, 2009, 18(6):547–55.
- [7] Ziemer M, Milkova L, Kunz M. Lupus erythematosus. Part II: Clinical picture, diagnosis and treatment [J]. *J Dtsch Dermatol Ges*, 2014, 12(4):285–302.
- [8] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2004, 9(9):1069–72.
- [9] 赵振宇, 张韵慧, 杨新建, 等. 中药复方狼疮颗粒 3 方对 BXSB 狼疮小鼠的治疗作用 [J]. *中国医院药学杂志*, 2007, 27(3):303–6.
- [10] Yu D, Rao S, Tsai L M, et al. The transcriptional repressor Bcl-6 directs T follicular helper cell lineage commitment [J]. *Immunity*, 2009, 31(3):457–68.
- [11] Zhu J, Paul W E. CD4 T cells: fates, functions, and faults [J]. *Blood*, 2008, 112(5):1557–69.
- [12] 王杰, 严尚学, 张小丹, 等. TACI-Ig 对 MRL/lpr 小鼠的治疗作用及其对小鼠肾组织 JAK1-STAT1 信号通路的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2011, 27(4):487–92.
- [13] 王晶晶, 严尚学, 张小丹, 等. TACI 融合蛋白对 MRL/lpr 小鼠免疫功能的作用及其部分机制 [J]. *安徽医科大学学报*, 2011, 46(9):865–70.
- [14] Ale'ed A, AlSonbul A, Al-Mayouf S M. Safety and efficacy of combined cyclophosphamide and rituximab treatment in recalcitrant childhood lupus [J]. *Rheumatol Int*, 2014, 34(4):529–33.
- [15] Mumtaz I M, Hoyer B F, Panne D, et al. Bone marrow of NZB/W mice is the major site for plasma cells resistant to dexamethasone and cyclophosphamide: implications for the treatment of autoimmunity [J]. *J Autoimmun*, 2012, 39(3):180–8.

Effects and mechanism of prednisone and TACI-Ig combination on auto-antibody production in MRL/lpr mice

Deng Xiaomei, Yan Shangxue, Wei Wei

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

Abstract *Objective* To investigate the effects and partial mechanism of prednisone and TACI-Ig combination on MRL/Mpslac-lpr (MRL/lpr) mice. *Methods* MRL/lpr mice were randomly divided into 6 groups, which included model group, prednisone (2.5, 5.0 mg/kg) group, TACI-Ig (15.0 mg/kg) group, prednisone and TACI-Ig combination [(2.5 + 7.5) mg/kg, (2.5 + 15.0) mg/kg] group. BALB/c mice were set as normal group. Prednisone was given intragastrically everyday and TACI-Ig was given subcutaneously every two days for 13 weeks. In the meantime, the normal and model group were treated with an equal volume of normal saline. The general sign and proteinuria level were observed in the treatment period. The sections of spleen and kidney tissues for pathological analysis were stained with HE. Serum levels of auto-antibodies and BAFF were detected by ELISA kit. The percentage of plasma cells and CD138 expression in the spleen were detected by flow cytometry analysis and immunohistochemistry, respectively. *Results* The skin damage and the proteinuria level were improved and decreased by prednisone and TACI-Ig combination treatment. The spleen and kidney pathology were also improved including reducing germinal center formation and alleviating the glomerular fibrosis, mesangial cell hyperplasia and inflammatory cell infiltration, respectively. What was more, the percentage of splenic plasma cells (CD19⁻CD138⁺) was reduced significantly, which maybe resulted in the decrease in ANA. However the high level of anti-dsDNA antibody was not influenced by the combination treatment. The serum level of BAFF was also reduced by the combination treatment. *Conclusion* Prednisone and TACI-Ig combination treatment has a beneficial effect on murine SLE, which may be associated with the inhibition of plasma cell differentiation and the secretion of auto-antibody.

Key words systemic lupus erythematosus; TACI-Ig; prednisone; combination treatment; plasma cell; auto-antibody