

阻断 B7/CD28 通路对类风湿关节炎小鼠的影响

刘颖, 黄艳艳, 詹宇威, 詹锋

摘要 目的 探讨阻断 B7/CD28 通路对类风湿关节炎小鼠的影响及可能机制。方法 40 只 DBA/1 小鼠随机分正常对照组、模型组、细胞毒性淋巴细胞抗原 4 免疫球蛋白(CTLA4-Ig) 低剂量组和 CTLA4-Ig 高剂量组,除正常对照组外,其余三组小鼠均制备类风湿关节炎模型。在二次免疫结束后第 0、5、10 天 CTLA4-Ig 低、高剂量组分别腹腔注射 50、100 mg/kg CTLA4-Ig,正常对照组和模型组注射等量生理盐水。游标卡尺测定小鼠同侧后足掌厚度,进行关节炎评分;ELISA 法检测血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)和白细胞介素-17(IL-17)的水平, Micro-CT 扫描采集图像并测量骨组织形态计量学参数, HE 染色观察膝关节病理形态变化, TRAP 染色检测膝关节组织内破骨细胞, 实时荧光定量 PCR 和 Western blot 检测骨保护素(OPG)、核因子 κ B 受体活化因子(RANK)、核因子 κ B 受体活化因子配体(RANKL) mRNA 及蛋白表达情况, 免疫组织化学染色检测核因子 κ B(NF- κ B) 表达, Western blot 检测 NF- κ B 信号通路相关蛋白表达。结果 与模型组比较, 经过 CTLA4-Ig 高剂量治疗后, RA 小鼠足肿胀和关节炎评分均降低, 血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 及 IL-17 水平均降低, 膝关节受损程度减小, 骨密度(BMD)、骨小梁厚度(Tb.Th)、骨体积(BV)及骨体积分数(BV/TV)升高, 抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)阳性细胞数目减少, 组织内 OPG mRNA 与蛋白相对表达量上调, 而 RANK、RANKL mRNA 与蛋白相对表达量均下调, 同时, p-p65、p-I κ B α 蛋白相对表达量降低, NF- κ B 阳性表达面积减少, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 通过 CTLA4-Ig 低剂量治疗后, RA 小鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 以及 IL-17 水平较模型组下降, 组织内 NF- κ B 阳性表达面积减少, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 CTLA4-Ig 阻断 B7/CD28 通路, 对小鼠类风湿关节炎具有明显的治疗作用, 可抑制炎症反应, 减少骨破坏, 并阻止 NF- κ B 信号途径激活。

关键词 类风湿关节炎; CTLA4-Ig; B7/CD28 共刺激通路; 炎症; 骨破坏

中图分类号 R 593.22

2022-03-17 接收

基金项目: 海南省自然科学基金青年基金项目(编号: 819QN347)

作者单位: 海南省人民医院(海南医学院附属海南医院)风湿免疫科, 海口 570000

作者简介: 刘颖, 女, 博士研究生, 主治医师;

詹锋, 男, 本科, 主任医师, 责任作者, E-mail: apollo200107@163.com

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)04-0515-08
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.04.003

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种慢性自身免疫性炎症疾病,其典型特征是滑膜炎、关节破坏和全身性炎症。RA 不仅影响了患者的日常生活,而且还给家庭和社会带来了沉重负担^[1-3]。B7/CD28 共刺激通路是主要的 T 细胞共刺激途径之一,在多种自身免疫性疾病中发挥作用,能够影响共刺激信号分子之间的相互作用和细胞免疫应答反应。细胞毒性淋巴细胞抗原 4 免疫球蛋白(cytotoxic T lymphocyte antigen-4 immunoglobulin, CTLA-4Ig)是一种融合蛋白,由 CTLA-4 与 IgG Fc 段基因重组而成,能够通过 B7 结合来阻断 B7/CD28 共刺激通路,从而诱导 T 细胞失能^[4],目前已用于自身免疫性疾病和排斥反应的研究中,并取得了显著成效^[5-6]。该研究在构建 RA 小鼠模型基础上,应用 CTLA4-Ig 阻断 B7/CD28 以探讨其在 RA 中的作用,以期临床诊疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 DBA/1 小鼠 40 只,雄性 6~8 周龄,体质量 18~20 g,由海南医学院实验动物中心饲养于 SPF 环境,温度为(20±3)℃,相对湿度为 45%,明暗交替 12 h/12 h,期间自由饮水饮食。本实验通过海南省人民医院动物伦理委员会批准。

1.2 主要材料 CTLA4-Ig 购自美国 BD Pharmingen 公司,II 型胶原、弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂购自美国 Chondrex 公司,ELISA 检测试剂盒购自南京建成生物研究所,HE 染色试剂盒购自北京索莱宝生物公司,TRAP 染色试剂盒购自美国 Sigma 公司,TRIZol 试剂盒购自南京诺维赞生物公司,Prime Script™ RT reagent Kit 和 SYBR Premix Ex Taq™ II 购自日本 Takara 公司,BCA 蛋白检测试剂盒、ECL 化学发光液和免疫组织化学染色试剂盒购自上海碧云天生物研究所,抗体骨保护素(osteoprotegerin, OPG)、核因子 κ B 受体活化因子(receptor activator of NF- κ B, RANK)、核因子 κ B 受体活化因子配体(re-

ceptor activator of NF- κ B ligand, RANKL)、p65、p-p65、p-I κ B α 、I κ B α 以及核因子 κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B) 均购自英国 Abcam 公司,肌动蛋白(β -actin)和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 购自北京中杉金桥生物公司。其他试剂均为国内市售分析纯。

1.3 方法

1.3.1 小鼠胶原诱导性关节炎模型的制备 采用 II 型胶原诱导法建立小鼠 CIA 模型,用固定器固定小鼠尾根部,取 100 μ l 浓度为 1 mg/ml 的混合牛 II 型胶原和弗氏完全佐剂的乳化剂,在小鼠尾根部皮下进行注射,进行初次免疫;在第一次免疫后 21 d 将 100 μ l 浓度为 1 mg/ml 的混合牛 II 型胶原与弗氏不完全佐剂的乳化剂再次于小鼠尾根部皮下进行注射,进行二次免疫。

1.3.2 小鼠分组与治疗 40 只 DBA/1 小鼠采用随机数字表法分为 4 组,包括正常对照组、模型组、CTLA4-Ig 低剂量组和 CTLA4-Ig 高剂量组,除正常对照组外,其余三组小鼠均制备胶原诱导性关节炎模型。在二次免疫结束后第 0、5、10 天,CTLA4-Ig 低剂量组和 CTLA4-Ig 高剂量组的小鼠分别以 50、100 mg/kg 的剂量进行腹腔注射 CTLA4-Ig 溶液,同时给予正常对照组和模型组的小鼠腹腔注射等量生理盐水。

1.3.3 足肿胀度测量与关节炎评分 在二次免疫结束后第 0、10、20 天,采用游标卡尺测定各组小鼠的同侧后足掌厚度,每次重复测量 3 次。同时,二次免疫结束后第 0、5、10、15、20 天进行关节炎评分,评分标准为:0 分,正常,无红肿;1 分,小趾关节轻微肿胀,有红斑;2 分,趾关节、足趾中度肿胀;3 分,踝关节以下的足爪肿胀,红肿明显;4 分,包括踝关节在内的全部足爪严重肿胀,四肢评分和计为关节炎指数。

1.3.4 ELISA 法检测各组小鼠血清中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 和白细胞介素-17 (interleukin-17, IL-17) 的水平 在二次免疫结束后第 20 天,测量完足肿胀度和关节炎评分后,通过各组小鼠眼球取血,收集 2 ml 血液,室温静置 2 h,再以 3 000 r/min 离心 10 min,留取上清液,保存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱。ELISA 法分别检测各组小鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 IL-17 的水平,操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。

1.3.5 Micro-CT 扫描小鼠膝关节 采血结束后脱

颈处死各组小鼠,取两侧膝关节,剔除周围软组织,使用高分辨显微 CT SkyScan 1076 对小鼠膝关节进行扫描,获得图片后,CT Analyzer 软件分析骨组织形态计量学参数,包括骨密度(bone mineral density, BMD)、骨小梁厚度(trabecular thickness, Tb. Th)、骨体积(bone volume, BV)和骨体积分数(bone volume fraction, BV/TV)。

1.3.6 HE 染色观察组织病理形态学改变 将分离的各组小鼠膝关节组织置于 4% 多聚甲醛,于室温下固定 24 h 后,放入 10% EDTA 溶液(pH = 8.0)中脱钙 1 个月。梯度乙醇溶液脱水后,常规石蜡包埋,并切成 5 μ m 厚的切片,进行 HE 染色。通过二甲苯脱蜡和梯度乙醇溶液脱水,加入苏木精染色 5 min,0.1% 氨水中分色数秒钟,放入伊红染液中染色 2 min,切片经乙醇溶液脱水、二甲苯透明后,滴加中性树胶进行封片,在光学显微镜下观察组织病理形态学改变。

1.3.7 TRAP 染色检测各组小鼠膝关节骨质破坏区破骨细胞表达 取制备的各组小鼠膝关节组织切片,置于 60 $^{\circ}$ C 烘箱中烘烤 30 min,经过脱蜡脱水后,加入 2.5% 的戊二醛于 4 $^{\circ}$ C 固定 10 min,双蒸水清洗干净,加入 TRAP 染液,置于暗盒中,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 1 h,双蒸水清洗后,苏木精复染 2 min,自然条件下晾干,中性树胶进行封片,在光学显微镜下观察并计数破骨细胞数目,TRAP 阳性细胞染色呈紫红色。

1.3.8 实时荧光定量 PCR 取各组小鼠膝关节组织敲碎,加预冷的 TRIzol 试剂研磨,提取总 RNA。利用反转录试剂盒进行逆转录反应,获得 cDNA,通过实时荧光定量 PCR 实验检测组织中骨保护素(osteoprotegerin, OPG)、核因子 κ B 受体活化因子(receptor activator of NF- κ B, RANK)、核因子 κ B 受体活化因子配体(receptor activator of NF- κ B ligand, RANKL) mRNA 表达情况,具体按照 SYBR Premix Ex TaqTM II 说明书操作,以 GAPDH 为内参基因。扩增条件为:95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环。引物由上海生工生物工程公司合成,序列见表 1。 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法来计算各基因 mRNA 的相对表达量。

1.3.9 Western blot 法检测各蛋白相对表达量 取各组小鼠膝关节组织敲碎并研磨,加入 RIPA 裂解液提取组织总蛋白,BCA 法定量。取等量各组蛋白样品上样,通过 10% SDS-PAGE 凝胶分离蛋白质,电转印至硝酸纤维素膜上,置于 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h 后, TBST 洗膜,接着加入稀释后的 OPG、

表1 各基因引物序列

基因	引物序列
OPG	F: 5'-CAGCCTGCACCAGCATCT-3'
	R: 5'-GCGTTCCTGTTCCACTCATAG-3'
RANK	F: 5'-ATGCGTTGCAGTTCTTCTC-3'
	R: 5'-ACTCCTTATCTCCACTTAGG-3'
RANKL	F: 5'-CTGATGAAGGAGGGAGCAC-3'
	R: 5'-GCAGGAGGCAGAAGAATGG-3'
GAPDH	F: 5'-GAGTGAAGCTCGGACTC-3'
	R: 5'-GAAGATGCTGATGGATTTC-3'

RANK、RANKL、p65、p-p65、p-I κ B α 、I κ B α 抗体(1:1 000稀释)以及内参 β -actin抗体(1:5 000稀释)置于摇床上4℃下孵育过夜;第2天,TBST洗膜,加入对应辣根过氧化物酶标记的二抗,室温下于摇床上继续孵育1h,TBST再次洗膜,滴加ECL化学发光液显色曝光,凝胶成像系统拍照,Image Pro Plus软件分析各条带灰度值,计算各蛋白相对表达量。

1.3.10 免疫组织化学染色 取制备的各组小鼠膝关节组织切片,将切片分别用梯度乙醇溶液和二甲苯进行脱蜡脱水处理,接着置于柠檬酸盐缓冲液(95℃)煮沸15min以修复抗原,加入3% H₂O₂去除内源性过氧化物酶后,5%山羊血清室温封闭2h,将切片与抗体NF- κ B(1:200稀释)在4℃下共同孵育过夜;第2天,PBS冲洗切片,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG(1:1 000稀释),在室温下孵育1h,PBS冲洗后,DAB显色液,苏木精复染,中性树胶进行封片,在光学显微镜下观察组织中的阳性表达情况,胞质染成黄色至棕色即为阳性,随机选择6个视野,Image-Pro Plus软件统计阳性表达面积。

1.4 统计学处理 采用SPSS 23.0统计软件分析实验数据,GraphPad Prism 8.3制作统计图,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)来表示,多组间数据比较采用ANOVA法,组间两两比较采用LSD- t 检验,以

$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠足肿胀度与关节炎评分比较 小鼠初次免疫后21d时开始发病,CIA模型成功率达到93.33%,筛选各组具有相似病程的小鼠各8只进行后续的研究。通过检测各组小鼠足肿胀度发现,二次免疫后小鼠开始发病,四组小鼠足肿胀之间差异有统计学意义($F = 346.72$),在第10、20天时,模型组小鼠足肿胀较正常对照组增加($P < 0.01$),而与模型组比较,CTLA4-Ig高剂量组小鼠足肿胀降低($P < 0.01$)。四组小鼠关节炎评分结果表明,组间差异有统计学意义($F = 234.02$),与正常对照组比较,模型组小鼠在二次免疫后关节炎评分升高($P < 0.01$),经过CTLA4-Ig高剂量治疗后,小鼠的关节炎评分较模型组下降($P < 0.01$);而CTLA4-Ig低剂量组和模型组小鼠的足肿胀和关节炎评分之间的差异无统计学意义($P > 0.05$),见图1。

2.2 各组小鼠血清TNF- α 、IL-1 β 、IL-6及IL-17水平比较 ELISA法检测结果显示TNF- α 、IL-1 β 、IL-6及IL-17在不同组间差异均有统计学意义($F = 402.45、512.07、398.77、402.72$),与正常对照组比较,模型组小鼠血清中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6及IL-17水平均增加($P < 0.01$);与模型组比较,CTLA4-Ig低剂量组和CTLA4-Ig高剂量组小鼠血清中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6及IL-17水平均减少($P < 0.01$),见表2。

2.3 各组小鼠Micro-CT扫描结果 Micro-CT扫描各组小鼠膝前关节显示:正常对照组小鼠关节结构完整,骨质表面光滑,关节间隙正常;模型组可观察到关节明显受损,骨质表面凹凸不平;经过CTLA4-Ig高剂量治疗的小鼠关节骨质表面凹凸不平的现象较模型组有了明显改善,骨破坏程度减小,而相较于模型组,CTLA4-Ig低剂量治疗的小鼠关节受损程度也稍有改善,但没CTLA4-Ig高剂量组明显,见图2。四组小鼠的BMD、Tb.Th、BV及BV/TV差

表2 各组小鼠血清TNF- α 、IL-1 β 、IL-6及IL-17水平比较(pg/ml $\bar{x} \pm s$)

组别	TNF- α	IL-1 β	IL-6	IL-17
正常对照	62.45 \pm 5.67	38.33 \pm 3.90	35.02 \pm 3.29	30.34 \pm 3.11
模型	223.57 \pm 20.21**	120.28 \pm 11.54**	160.56 \pm 15.89**	89.45 \pm 8.37**
CTLA4-Ig低剂量	190.34 \pm 18.69##	101.64 \pm 9.87##	143.91 \pm 14.16##	71.67 \pm 7.08##
CTLA4-Ig高剂量	105.73 \pm 10.05##	69.27 \pm 7.11##	77.04 \pm 7.52##	47.93 \pm 5.14##
P值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
F值	402.45	512.07	398.77	402.72

与正常对照组比较:** $P < 0.01$;与模型组比较:## $P < 0.01$

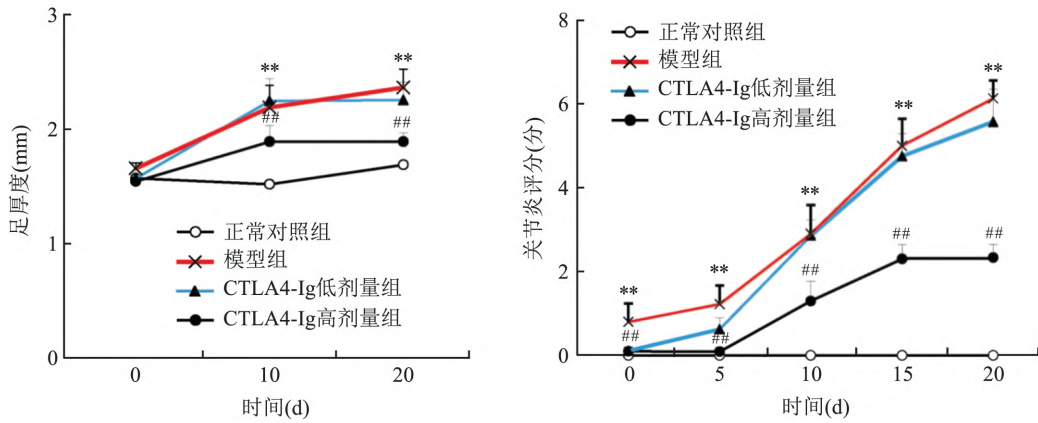


图1 各组小鼠不同时间点足肿胀厚度和关节炎评分统计与正常对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$

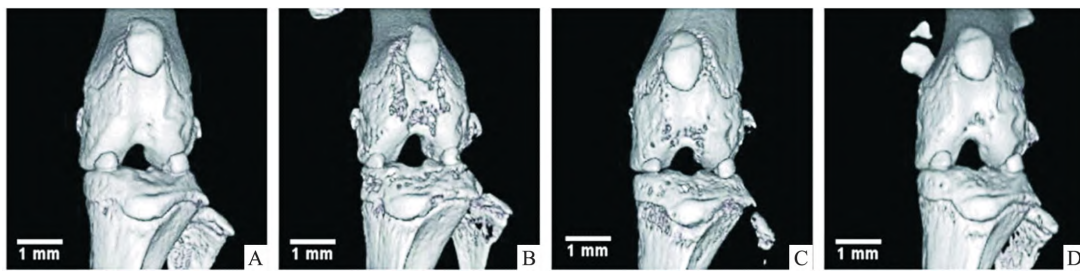


图2 Micro-CT 扫描各组小鼠膝前关节

A: 正常对照组; B: 模型组; C: CTLA4-Ig 低剂量组; D: CTLA4-Ig 高剂量组

异均有统计学意义 ($F = 376.92、56.33、102.49、230.54$) 与正常对照组比较 模型组小鼠 BMD 降低 ($P < 0.01$) ,Tb、Th、BV 及 BV/TV 也下降 ($P < 0.01$) ; 而相较于模型组 经过 CTLA4-Ig 高剂量治疗的小鼠 , BMD 增高 ,同时 ,Tb、Th、BV 及 BV/TV 也升高 ,差异均有统计学意义 ($P < 0.01$) 而 CTLA4-Ig 低剂量治疗的小鼠 ,BMD、Tb、Th、BV 及 BV/TV 变化较模型组差异均无统计学意义 ($P > 0.05$) 见图 3。

2.4 各组小鼠膝关节组织病理改变 HE 染色结果显示 ,正常对照组小鼠膝关节结构完整 ,无滑膜增生变厚和炎性细胞浸润现象; 模型组小鼠膝关节面破坏 ,关节间隙变窄或消失 ,滑膜增生 ,并伴随大量炎性细胞浸润; CTLA4-Ig 低剂量组和 CTLA4-Ig 高剂量组小鼠膝关节面破坏程度较模型组均有所减轻 ,CTLA4-Ig 高剂量组小鼠滑膜组织轻度炎症 ,有少量炎症细胞浸润 ,组织病变改善较 CTLA4-Ig 低剂量组更为明显 ,见图 4。

2.5 各组小鼠膝关节破骨细胞活化状态比较 TRAP 染色检测结果显示 ,四组 TRAP 阳性细胞数目差异有统计学意义 ($F = 267.43$) ,正常对照组小鼠膝关节内可见很少量紫红染色 ,TRAP 阳性表达水

平低; 模型组可见较多紫红染色 ,TRAP 阳性细胞数目较正常对照组增加 ($P < 0.01$) ,说明有大量成熟破骨细胞存在; CTLA4-Ig 低剂量组和 CTLA4-Ig 高剂量组仍可见紫红染色 ,与模型组比较 ,CTLA4-Ig 低剂量组 TRAP 阳性细胞数目有所减少但差异无统计学意义 ($P > 0.05$) ,CTLA4-Ig 高剂量组 TRAP 阳性细胞数目减少 ($P < 0.01$) ,见图 5。

2.6 各组小鼠膝关节组织 OPG、RANK、RANKL mRNA 和蛋白表达变化 实时荧光定量 PCR 和 Western blot 检测结果显示 ,四组小鼠膝关节组织 OPG、RANK、RANKL 的 mRNA 和蛋白表达差异均有统计学意义 ($F = 88.45、57.94、74.42; F = 62.48、34.50、52.66$) ,与正常对照组比较 模型组小鼠膝关节组织中 OPG mRNA 和蛋白相对表达量下调 ,RANK、RANKL mRNA 和蛋白相对表达量均上调 ($P < 0.01$) ; 与模型组比较 ,CTLA4-Ig 高剂量组 OPG mRNA 和蛋白相对表达量上调 ,同时 ,RANK、RANKL mRNA 和蛋白相对表达量下调 ($P < 0.01$) ; 而 CTLA4-Ig 低剂量组和模型组 OPG、RANK 及 RANKL mRNA 和蛋白表达之间差异均无统计学意义 ($P > 0.05$) ,见图 6、7。

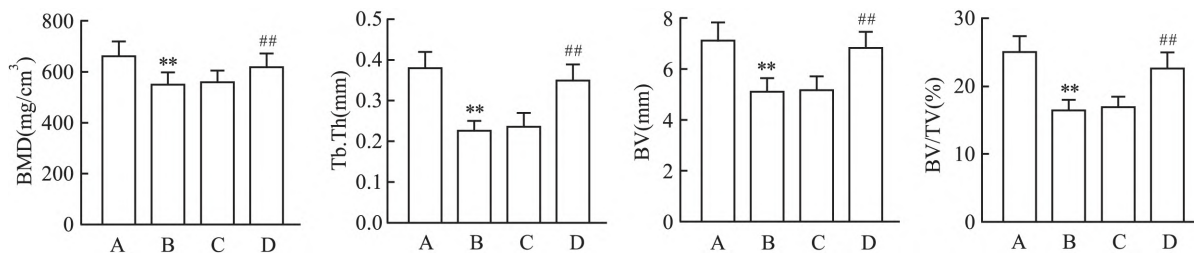


图3 各组小鼠骨组织形态计量学参数检测

A: 正常对照组; B: 模型组; C: CTLA4-Ig 低剂量组; D: CTLA4-Ig 高剂量组; 与正常对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$

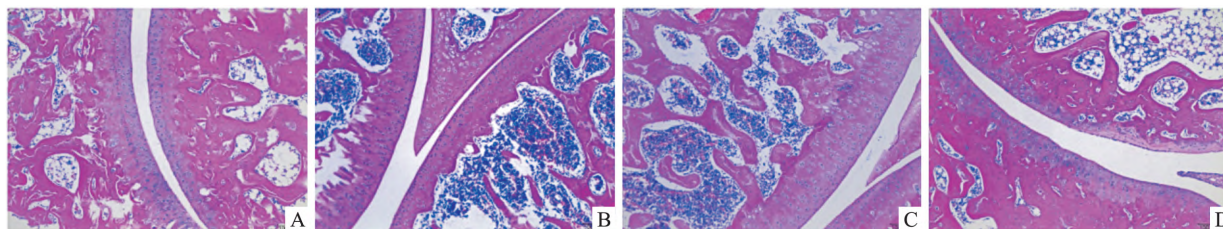


图4 各组小鼠膝关节组织病理变化 HE × 100

A: 正常对照组; B: 模型组; C: CTLA4-Ig 低剂量组; D: CTLA4-Ig 高剂量组

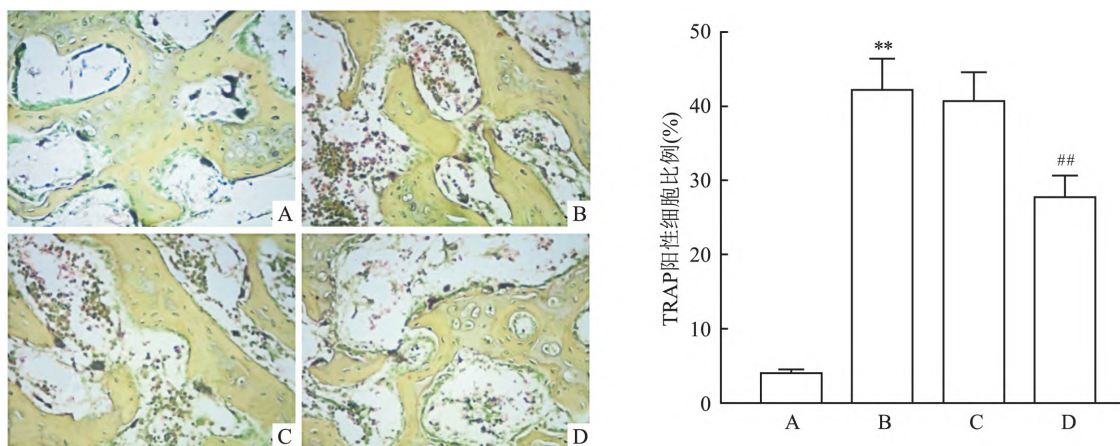


图5 各组小鼠破骨细胞数目 TRAP × 200

A: 正常对照组; B: 模型组; C: CTLA4-Ig 低剂量组; D: CTLA4-Ig 高剂量组; 与正常对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$

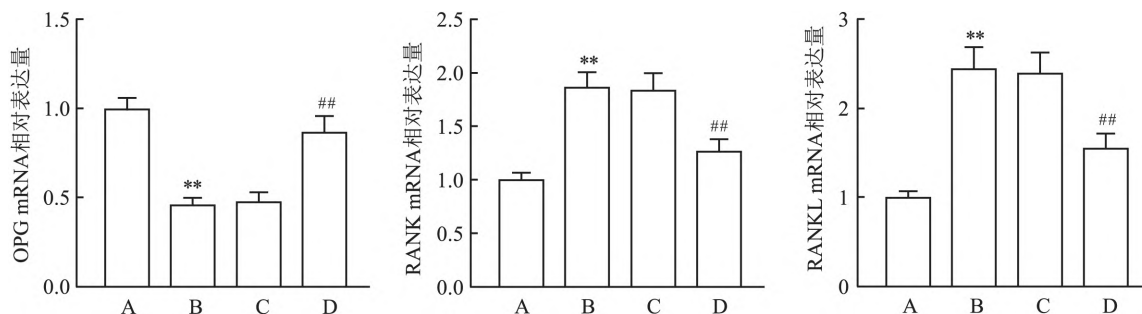


图6 实时荧光定量 PCR 检测膝关节组织 OPG、RANK、RANKL mRNA 表达

A: 正常对照组; B: 模型组; C: CTLA4-Ig 低剂量组; D: CTLA4-Ig 高剂量组; 与正常对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$

2.7 各组小鼠膝关节组织 NF- κ B 信号通路相关蛋白表达检测 Western blot 检测结果显示, 四组小鼠膝关节组织 p-p65、p-I κ B α 蛋白表达差异均有统计学意义 ($F = 37.65, 27.82$) 模型组小鼠膝关节组织

中 p-p65、p-I κ B α 蛋白相对表达量较正常对照组升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, CTLA4-Ig 高剂量组 p-p65、p-I κ B α 蛋白相对表达量下降 ($P < 0.01$); 而 CTLA4-Ig 低剂量组和模型组 p-p65、p-I κ B α 蛋白相

对表达量之间以及各组 p65 与 IκBα 蛋白相对表达量之间差异均无统计学意义 ($P > 0.05$) ,见图 8。免疫组织化学染色实验结果显示 ,四组小鼠膝关节组织 NF-κB 阳性表达差异有统计学意义 ($F = 172.46$) ,正常对照组小鼠膝关节组织中未见明显

染色 ,NF-κB 阳性表达率低;模型组内可见明显的黄棕色染色区域 ,NF-κB 阳性表达率较正常对照组升高 ($P < 0.01$) ;与模型组比较 ,CTLA4-Ig 低剂量组和 CTLA4-Ig 高剂量组染色均变少变浅 ,NF-κB 阳性表达率降低 ($P < 0.01$) ,见图 9。

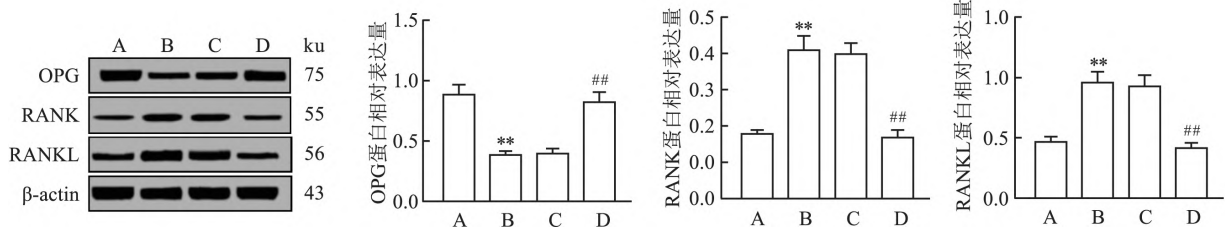


图7 Western blot 检测膝关节组织 OPG、RANK、RANKL 蛋白表达

A: 正常对照组; B: 模型组; C: CTLA4-Ig 低剂量组; D: CTLA4-Ig 高剂量组; 与正常对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$

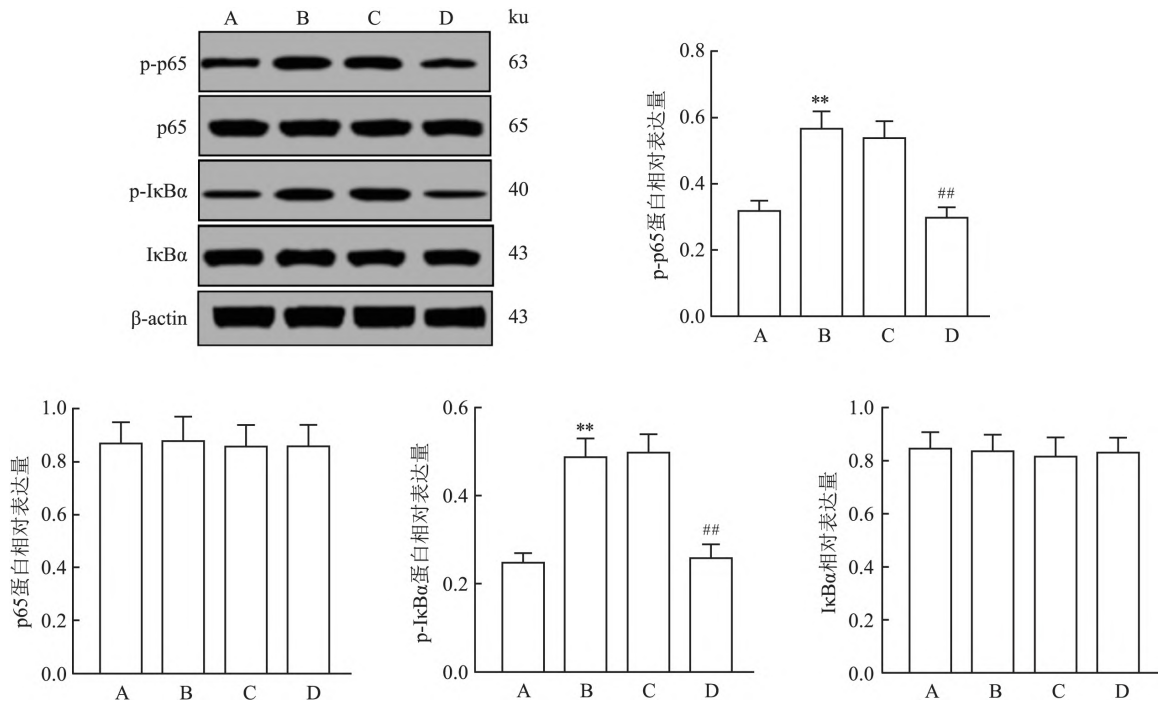


图8 Western blot 检测膝关节组织 NF-κB 信号通路蛋白表达

A: 正常对照组; B: 模型组; C: CTLA4-Ig 低剂量组; D: CTLA4-Ig 高剂量组; 与正常对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$

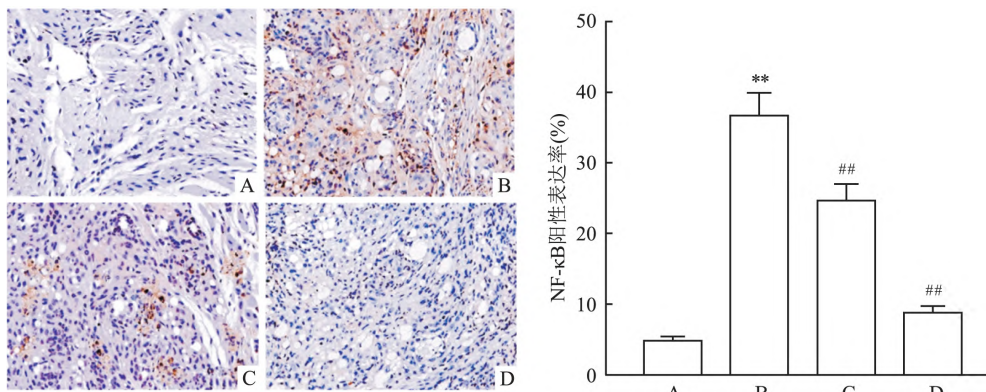


图9 各组小鼠膝关节组织 NF-κB 表达 SP × 400

A: 正常对照组; B: 模型组; C: CTLA4-Ig 低剂量组; D: CTLA4-Ig 高剂量组; 与正常对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$

3 讨论

T 细胞上的 CD28 与辅助细胞上的 B7 (CD80、CD86) 的相互作用是调节 T 细胞活化的重要第二信号-协同刺激信号之一。B7/CD28 相互作用可降低 T 细胞活化的阈值,增强抗原刺激细胞因子的产生,T 细胞的克隆扩增以及 T 细胞向效应细胞的分化。在自身免疫性疾病的进展中,T 细胞的募集是该过程中的一个重要现象,这些 T 细胞可以识别更多的抗原决定簇^[7]。阻断 CD28 可能会阻止天然 T 细胞的进一步募集和激活,并干扰表位扩散的过程。CTLA4-Ig 是由 CTLA-4 细胞外功能区和人 IgG1Fc 段组成的融合蛋白,其通过阻断共刺激分子 CD28 和 CD80/CD86 活化 T 细胞的第二刺激信号,从而抑制 T 细胞活化,目前,其作为一种生物制剂,已在国内外研究中广泛运用。采用 CTLA4-Ig 可成功预防或治疗多种自身免疫性疾病及肿瘤,这种治疗方法已被广泛用于阻断 T 细胞上 CD28 与 APC 上的配体 CD80 或 CD86 的结合,从而抑制了 B7/CD28 共刺激信号通路。Romo-Tena et al^[8] 报道指出 CTLA4-Ig 在鼠狼疮肾炎的治疗中具有良好效果; Bassi et al^[9] 研究发现在 DN 大鼠模型中,CTLA4-Ig 能够修复足细胞结构与细胞活性,并抵抗高糖环境、减少蛋白尿,以改善肾脏血液灌注现象。此外,CTLA-4 Ig 已被证明具有治疗多发性关节炎的效果,并且耐受性良好,免疫原性低^[10],但其作用功效和耐受性的潜在机制仍有待充分阐明。本研究结果显示,经 100 mg/kg CTLA4-Ig 治疗 RA 小鼠后,其足肿胀和关节炎评分均下降,骨组织破坏得到明显缓解。由此进一步说明了通过 CTLA4-Ig 阻断 B7/CD28 共刺激通路可达到治疗小鼠 RA 的效果。

随着 RA 的发生发展,促炎性介质如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 IL-17 由驻留在关节中的炎性细胞所释放,驱使各种炎性细胞渗入关节,加剧了促炎性物质的分泌。而这些促炎性物质能够激活成纤维样滑膜细胞,导致滑膜增生,而激活的成纤维样滑膜细胞分泌局部血管生长因子导致内皮细胞活化并刺激血管生成,从而间接诱导破骨细胞分化来加速骨吸收,降解关节软骨组织^[11]。此外,活化的巨噬细胞和破骨细胞通过产生金属蛋白酶也促进了骨骼和软骨的降解。本研究结果显示,经过 CTLA4-Ig 治疗后,RA 小鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 及 IL-17 水平均降低,说明炎症反应得到抑制。同时,高剂量 CTLA4-Ig (100 mg/kg) 作用下破骨细胞数目明显减少,OPG

表达升高而 RANK、RANKL 表达下降。OPG、RANK 与 RANKL 均是破骨细胞分化的关键细胞因子,参与调节破骨细胞分化过程。OPG 可抑制破骨细胞的生成与骨吸收,而 RANK 与 RANKL 结合可促进破骨细胞活化^[12]。

在炎症信号传导途径中,已有多项研究^[13]表明 NF- κ B 介导了 RA 的炎症反应,该通路的激活将导致大量促炎介质释放进而触发炎症级联反应,加速 RA 恶化。本研究结果显示,在 RA 小鼠中 NF- κ B 表达增加,p-p65、p-I κ B α 蛋白表达升高,经过高、低剂量 CTLA4-Ig 治疗后 NF- κ B 表达降低,且在高剂量 CTLA4-Ig 治疗下 p-p65、p-I κ B α 蛋白表达下降。由此可见,低剂量 CTLA4-Ig 作用下可能对 RA 小鼠 NF- κ B 相关通路作用效果不显著,只是影响了该通路中的部分靶标,或者有其他分子机制参与其中。而相对较高剂量 CTLA4-Ig 能够抑制 NF- κ B 信号通路的激活,可以推断出 CTLA4-Ig 可能通过抑制 NF- κ B 炎症信号通路来减轻 RA 的炎症进程。

参考文献

- [1] Weyand C M, Goronzy J J. Immunometabolism in the development of rheumatoid arthritis [J]. Immunol Rev, 2020, 294(1): 177-87.
- [2] Xiao M, Fu X, Ni Y, et al. Protective effects of Paederia scandens extract on rheumatoid arthritis mouse model by modulating gut microbiota [J]. J Ethnopharmacol, 2018, 226: 97-104.
- [3] 柳晓,徐涛. SIRT1 与类风湿关节炎的研究进展 [J]. 安徽医科大学学报, 2019, 54(9): 1496-500.
- [4] Hosseini A, Gharibi T, Marofi F, et al. CTLA-4: From mechanism to autoimmune therapy [J]. Int Immunopharmacol, 2020, 80: 106221.
- [5] Rochman Y, Yukawa M, Kartashov A V, et al. Functional characterization of human T cell hyporesponsiveness induced by CTLA4-Ig [J]. PLoS One, 2015, 10(4): e0122198.
- [6] Li X L, Sluijter M, Doorduyn E M, et al. Limited density of an antigen presented by RMA-S cells requires B7-1/CD28 signaling to enhance T-cell immunity at the effector phase [J]. PLoS One, 2014, 9(11): e108192.
- [7] Ganesan A, Moon T C, Barakat K H. Revealing the atomistic details behind the binding of B7-1 to CD28 and CTLA-4: A comprehensive protein-protein modelling study [J]. Biochim Biophys Acta Gen Subj, 2018, 1862(12): 2764-78.
- [8] Romo-Tena J, Gómez-Martín D, Alcocer-Varela J. CTLA-4 and autoimmunity: new insights into the dual regulator of tolerance [J]. Autoimmun Rev, 2013, 12(12): 1171-6.
- [9] Bassi R, Fornoni A, Doria A, et al. CTLA4-Ig in B7-1-positive diabetic and non-diabetic kidney disease [J]. Diabetologia, 2016, 59(1): 21-9.

- [10] Siggs O M , Russell A , Singh-Grewal D , et al. Preponderance of CTLA4 variation associated with autosomal dominant immune dysregulation in the MYPPPY motif [J]. *Front Immunol* ,2019 ,10: 1544.
- [11] Veale D J , Orr C , Fearon U. Cellular and molecular perspectives in rheumatoid arthritis [J]. *Semin Immunopathol* ,2017 ,39(4) : 343 - 54.
- [12] 彭丽萍,徐胜前,齐 姍,等. 血清 RANKL、OPG 联合 MRI 在早期 RA 诊断与骨关节损伤中的价值 [J]. *安徽医科大学学报* ,2016 ,51(2) : 272 - 6.
- [13] 商 玮,徐子涵,郭郡浩,等. 姜黄素对类风湿关节炎破骨细胞分化中 NF- κ B p65 和 NFATc1 表达的影响 [J]. *中国骨质疏松杂志* ,2018 ,24(4) : 467 - 72.

The effect of blocking B7/CD28 pathway on mice with rheumatoid arthritis

Liu Ying , Huang Yanyan , Zhan Yuwei , Zhan Feng

[Dept of Rheumatology and Immunology , Hainan Provincial People's Hospital (Hainan Hospital Affiliated to Hainan Medical College) Haikou 570000]

Abstract Objective To investigate the effect of blocking the B7/CD28 pathway on rheumatoid arthritis mice and its possible mechanism. **Methods** 40 DBA/1 mice were randomly divided into normal control group , model group , CTLA4-Ig low-dose group and cytotoxic T lymphocyte antigen-4 immunobulin (CTLA4-Ig) high-dose group. Except for the normal control group , the other three groups were prepared for rheumatoid arthritis models. At 0 , 5 and 10 days after the second immunization , the CTLA4-Ig low-dose group and CTLA4-Ig high-dose group were intraperitoneally injected with 50 mg/kg and 100 mg/kg CTLA4-Ig , respectively , the normal control group and the model group were injected with the same amount of saline. Vernier calipers were used to measure the thickness of the ipsilateral hindfoot of the mouse for arthritis score; the serum levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) , interleukin-1 β (IL-1 β) , interleukin-6 (IL-6) and interleukin-17 (IL-17) were detected by ELISA , images were acquired and bone tissue morphometric parameters were measured through Micro-CT scanning , HE staining observed the pathological changes of the knee joint , TRAP staining detected osteoclasts in knee joint tissues , real-time fluorescent quantitative PCR and Western blot detected osteoprotegerin (OPG) , receptor activator of NF- κ B (RANK) , receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) mRNA and protein expression , immunohistochemical staining detected nuclear factor κ B (NF- κ B) expression. Western blot was used to detect the expression of related proteins in the NF- κ B signaling pathway. **Results** Compared with the model group , after high-dose CTLA4-Ig treatment , RA mouse foot swelling and arthritis scores were reduced , the levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-17 in serum were reduced , the knee joint damage was significantly reduced , bone mineral density (BMD) , trabecular thickness (Tb. Th) , bonevolume (BV) and bone volume fraction (BV/TV) increased , the number of TRAP positive cells decreased , the relative expression of OPG mRNA and protein in the tissue was up-regulated , while the relative expression of RANK , RANKL mRNA and protein were down-regulated. At the same time , the relative expression of p-p65 and p-I κ B α protein decreased , the positive expression area of NF- κ B decreased , and the difference were statistically significant ($P < 0.01$) ; After CTLA4-Ig low-dose treatment , the serum levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-17 in RA mice were significantly lower than those in the model group , and the area of NF- κ B positive expression in the tissue was reduced , the difference were statistically significant ($P < 0.01$) . **Conclusion** CTLA4-Ig to block the B7/CD28 pathway has a significant therapeutic effect on mouse rheumatoid arthritis , which can inhibit the inflammatory response , reduce bone destruction and prevent the activation of the NF- κ B signaling pathway.

Key words rheumatoid arthritis; CTLA4-Ig; B7/CD28 costimulatory pathway; inflammation; bone destruction