

紫杉醇对实验性自身免疫性脑脊髓炎大鼠 CD28、CTLA-4 表达及 BAFF 的影响

张淑江, 李作孝*

(西南医科大学附属医院神经内科, 四川 泸州 646000)

【摘要】 目的 探讨紫杉醇对实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmunencephalomyelitis, EAE)大鼠脑组织中 CD28、CTLA-4 表达及脾组织上清液中 B 细胞刺激因子(BAFF)含量及其意义。**方法** 按随机数字法将 50 只 Wistar 大鼠分为 5 组:紫杉醇(PTX)小、中、大 3 个剂量组(PTX 剂量分别为 1 mg/kg, 2 mg/kg, 4 mg/kg)、正常对照组、EAE 对照组,每组 10 只。用豚鼠脊髓制成 GPSCH 并与 CFA 等体积混合制成免疫抗原,注入大鼠双足侧足垫(2 mL/kg)进行 EAE 造模,自造模后,PTX 各剂量组腹腔注射紫杉醇,连续 10 d。正常对照组及 EAE 对照组均给予腹腔注射 0.9% NaCl 2 mL。采用脑组织学评分评估实验大鼠脑组织炎症浸润情况,取大鼠脑组织采用流式细胞仪测定脑组织 CD28、CTLA-4 含量,取脾组织并制成上清液,采用 ELISA 测定脾组织中 BAFF 含量。**结果** PTX 各剂量组脑组织评分均低于 EAE 对照组,各组间差异有显著性($P < 0.01$);PTX 各剂量组大鼠脑组织中 CD28 表达均低于 EAE 对照组,各组间差异有显著性($P < 0.01$);CTLA-4 表达均高于 EAE 对照组,各组间差异有显著性($P < 0.01$);脾组织上清液中 BAFF 含量均低于 EAE 对照组,各组间差异有显著性($P < 0.01$)。**结论** PTX 可降低 EAE 大鼠神经功能障碍评分,其机制可能涉及调节大鼠脑组织中 CD28、CTLA-4 的表达及脾组织上清液中 BAFF 含量,从而发挥对 EAE 的防治作用。

【关键词】 紫杉醇;实验性自身免疫性脑脊髓炎;CD28;CTLA-4;B 细胞刺激因子

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 05-0071-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.05.016

The effects of paclitaxel on the levels of CD28, CTLA-4 and BAFF in experimental autoimmune encephalomyelitis

ZHANG Shu-jiang, LI Zuo-xiao*

(Department of Neurology, Affiliated Hospital of southwest Medical university, Luzhou 646000, China)

【Abstract】 Objective To discuss the effects of Paclitaxel (PTX) on levels of CD28 and CTLA-4, B lymphocyte stimulator (BAFF) in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). **Methods** The 50 rats were divided into 5 groups by the random number table, 10 rats in each group, the doses of small group, Middle group, High group were 1 mg/kg, 2 mg/kg, 4 mg/kg by intraperitoneal injection for 10 consecutive days, the normal group and model group were injected 0.9% NS 2 mL, Using brain tissue score to estimate the neurological dysfunctions of rats. Using flow cytometry to detect the levels of CD28 and CTLA-4, using enzyme-linked immunosorbent (ELISA) to detect the levels of BAFF. **Results** The brain tissue score in PTX experimental groups were lower than model group, the comparative differences between groups

【基金项目】 泸州市科技创新苗子项目(2016-R-70 20/24);西南医科大学附属医院院级课题。

【作者简介】 张淑江(1989-),女,医师,硕士生,研究方向:神经免疫。E-mail:939749262@qq.com

【通讯作者】 李作孝(1964-),男,主任医师,硕士生,研究方向:神经免疫。E-mail:lxz3235@sina.com

were statistically significant ($P < 0.01$); The levels of CD28 in PTX groups were lower than EAE group, the comparative differences between groups were statistically significant ($P < 0.01$). The levels of CTLA-4 in PTX groups were higher than EAE group, the comparative differences between groups were statistically significant ($P < 0.01$); the content of BAFF in all PTX groups were lower than EAE control group. **Conclusions** PTX could decrease the brain tissue score, the mechanism may adjust the express of CD28、CTLA-4 in brain and the expression of BAFF. PTX may have preventive and therapeutic effects on EAE rats.

【Key words】 Paclitaxel; Experimental autoimmune encephalomyelitis; CD28; CTLA-4; B lymphocyte stimulator

实验性自身免疫性脑脊髓炎是多发性硬化 (multiple sclerosis, MS) 的理想动物模型, 临床上使用的药物对 MS 都疗效欠佳, 且不能发挥防治作用, 故探讨新的治疗药物显得尤其必要, 紫杉醇 (Paclitaxel, PTX) 在临床上用于各种恶性肿瘤的化疗, 且价格低廉。其作用机制可能与调节免疫细胞含量及相关细胞因子含量有关, 而 MS 属于自身免疫性疾病, 免疫系统功能的紊乱在此病的发生发展过程中发挥重要作用^[1], 国外已有数位学者将 PTX 用于 EAE 大鼠的研究。比如 Frequin 等^[2]研究发现 PTX 通过其抗炎及免疫调节功能对 EAE 大鼠发挥着防治作用, 其可降低 EAE 大鼠的发病率, 延长 EAE 大鼠发病的潜伏期, 缩短 EAE 大鼠疾病的进展期, 改善 EAE 大鼠临床症状, 降低神经功能障碍评分。本试验采用 wistar 大鼠建立 EAE 模型, 应用不同剂量的 PTX 进行干预, 观察 PTX 对大鼠发病情况脑组织病理改变的影响, 并测定脑组织中 CD28、CTLA-4 表达水平及脾组织上清液中 B 细胞刺激因子含量 (B lymphocyte stimulator, BAFF), 从而探讨其对 EAE 及 MS 的防治作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

雌性 Wistar 大鼠 50 只, 6 周龄, 体重 (210~230) g, 成年 8 周龄雌性豚鼠 5 只, 体重 (350~400) g, 所有动物均为清洁级, 均购自四川大学华西实验动物中心 [SCXK (川) 2013-026], 实验均在西南医科大学中心实验室完成 [SYXK (川) 2013-185]。将 Wistar 大鼠及豚鼠分开饲养 (普通环境), 保持饲养条件恒温、恒湿, 定时定量给予饲料、水, 并定期更换垫料, 保持生存环境清洁, 1 周后观察大鼠及豚鼠活动情况, 死亡及活动度差的大鼠予以剔除, 并及时补足同等数量大鼠及豚鼠。

1.2 主要试剂和药物

紫杉醇注射液 (哈药集团生物工程有限公司, 5 mL/支), CFA (美国 Chondrex 公司); BCG 冻干粉; 每

支 60 mg (上海生物制品研究所), PE 标记的小鼠抗大鼠 CD28 和 CD152 抗体及相应荧光素标记的小鼠 IgG1 抗体 (美国 Caltag 实验室), BAFF 酶联免疫吸附法试剂盒 (北京博奥森生物技术有限公司), PBS 缓冲液 (天津市灏洋生物制品科技有限责任公司); 淋巴细胞分离液, 称量瓶、显微镜、一次性流式管、显微镜、流式细胞仪 (美国 Becton-Dickinson 公司) 等。

1.3 实验方法

1.3.1 抗原制作及动物模型建立

参照 Hoehlig K 等^[3]制作 EAE 模型的方法进行造模, 用豚鼠脊髓制成 GPSCH 并与 CFA 等体积混合制成免疫抗原, 注入大鼠双足侧足垫 (2 mL/kg) 进行 EAE 造模; 正常对照组大鼠于相同部位注射等量 CFA, 所有动物均在同等条件下饲养。

1.3.2 实验动物的分组及干预处理

将 50 只 Wistar 大鼠随机分为 5 组: PTX 小、中、大剂量组, 正常对照组, EAE 对照组, PTX 小、中、大剂量组腹腔注射 PTX 剂量分别为 1 mg/kg, 2 mg/kg, 4 mg/kg, 连续 10 d。正常对照组及 EAE 对照组均给予腹腔注射 0.9% NS 2 mL, 所有动物均在同等条件下饲养, 均在 1 月后抽取血清, 处死并取脑组织。

1.3.3 脑组织学评分

脑组织学评分标准如下^[4]: 0 分, 无炎症改变; 1 分, 浸润的炎性细胞限于血管周和脑脊膜周围; 2 分, 炎性细胞脑实质内轻度浸润, 1~20 个/片; 3 分, 炎性细胞脑实质内中等程度浸润, 21~100 个/片; 4 分, 脑实质内浸润的炎细胞达 100 个/片以上。每张切片随机选取 5 个视野计数后取均值, 每只大鼠取 2 张切片作计数, 将 2 张切片计数后的平均值作为该只大鼠的评分结果。

1.3.4 脑组织 CD28、CTLA-4 测定

用 PBS 缓冲液去除大鼠的延髓组织血迹, 使用研磨器将延髓组织制成匀浆, 以 3000 r/min 离心 15 min 后取上清液, 采用流式细胞仪测定脑组织 CD28、CTLA-4 含量。

1.3.5 脾组织上清液 BAFF 含量测定

无菌取出脾脏后,剪碎脾组织,并用玻璃注射器针芯进行研磨,后用无菌生理盐水进行冲洗,经铜网进行过滤以除去结缔组织被膜,然后将脾细胞悬液收集于无菌细胞培养皿内,取与脾细胞悬液等体积的淋巴细胞分离液加入至离心管,将脾细胞悬液慢加入至淋巴细胞分离液上;室温 300 g 离心 20 min,吸取单个核细胞层,转入至新的离心管中,加入缓冲液,300 g 离心 10 min,弃上清后,再洗涤一次;弃上清,用细胞培养液重悬,台盼蓝染色计数活细胞率大于 95%,调整细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 。采用 ELISA 法测定 BAFF 含量,具体操作步骤按试剂盒说明操作。

1.4 统计学方法

本文数据均属计量资料,采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 描述。多组间比较先进行方差齐性检验和正态性检验,当方差齐及符合正态分布时,采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-t 检验。方差不齐或不符正态分布时采用 Kruskal-Wallis H 检验,两两比较用 Mann-Whitney U 检验,以上数据均使用 SPSS17.0 统计软件进行统计分析,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 模型大鼠的表现及相关评分

EAE 大鼠造模成功表现:早期表现为活动及进食量减少、精神萎靡、反应迟钝、体重下降,后期出现抬尾无力、后肢无力,严重者表现为尾巴及四肢瘫痪拖地,后肢双足跖面向上,抬头无力。

EAE 对照组评分最高,PTX 各剂量组评分均较 EAE 对照组评分下降,差异有显著性 ($P < 0.05$),且 EAE 大鼠脑组织病理学评分随 PTX 剂量增加而依次降低,各剂量组间差异有显著性 ($P < 0.05$)。(见表 1)

2.2 脑组织中 CD28、CTLA-4 含量变化

EAE 对照组 CD28 含量较正常对照组高,CTLA-4 含量较正常对照组低,差异有显著性 ($P < 0.01$),PTX 各剂量组脑组织 CD28 含量皆较 EAE 对照组降低,差异有显著性 ($P < 0.01$);脑组织 CD28 含量随 PTX 剂量增加而明显降低,各组间差异有显著性 ($P < 0.01$)。PTX 各剂量组脑组织 CTLA-4 含量均较 EAE 对照组升高,差异有显著性 ($P < 0.01$);脑组织 CTLA-4 含量随 PTX 剂量增加

表 1 各组大鼠脑组织学评分 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 1 The scores of pathological changes in the brain of all the groups

组别 Groups	脑组织学评分 Brain tissue score
正常对照组 Normal group	0
EAE 对照组 Model group	2.67 ± 0.52
PTX 小剂量组 Small dose group	1.61 ± 0.24^a
PTX 中剂量组 Middle dose group	1.44 ± 0.22^{ab}
PTX 大剂量组 High dose group	1.23 ± 0.31^{abc}

注:与 EAE 对照组相比,^a $P < 0.05$;与 PTX 小剂量组相比,^b $P < 0.05$;与 PTX 中剂量组相比,^c $P < 0.05$ 。

Note. The doses of small, middle, high group were 1 mg/kg, 2 mg/kg, 4 mg/kg; Compared with model group, ^a $P < 0.05$; compared with small dose group, ^b $P < 0.05$; compared with middle dose group, ^c $P < 0.05$ 。

表 2 各组大鼠脑组织内 CD28、CTLA-4 变化 ($\bar{x} \pm s, \%, n = 10$)

Tab. 2 The levels of CD28 and CTLA-4 in the brain of all the groups

组别 Groups	CD28	CTLA-4
正常对照组 Normal group	15.3 ± 3.77	9.7 ± 2.16
EAE 对照组 Model group	41.2 ± 4.09^a	3.6 ± 1.32^a
PTX 小剂量组 Small dose group	33.9 ± 4.49^{ab}	4.3 ± 1.42^{ab}
PTX 中剂量组 Middle dose group	26.4 ± 4.14^{abc}	5.8 ± 1.81^{ab}
PTX 大剂量组 High dose group	20.7 ± 4.21^{abcd}	6.4 ± 1.68^{abc}

注:与正常对照组相比,^a $P < 0.01$;与 EAE 对照组相比,^{b1} $P < 0.05$ 、^{b2} $P < 0.01$;与 PTX 小剂量组相比,^c $P < 0.01$;与 PTX 中剂量组相比,^d $P < 0.01$ 。

Note. Compared with normal group, ^a $P < 0.01$; compared with model group, ^{b1} $P < 0.05$ 、^{b2} $P < 0.01$; compared with small dose group, ^c $P < 0.01$; compared with middle dose group, ^d $P < 0.01$ 。

而明显增加,PTX 大、小剂量组差异有显著性 ($P < 0.01$),PTX 大与中剂量组、中与小剂量组差异无显著性 ($P > 0.05$)。(见表 2)

2.3 各实验组大鼠脾组织上清液 BAFF 含量测定结果

与正常对照组相比,EAE 对照组及 PTX 各剂量组脾组织上清液中 BAFF 含量均增加 ($P < 0.01$)。与 EAE 对照组比较,PTX 各剂量组脾组织上清液中 BAFF 含量均减少 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。随着 PTX 剂量的增加,BAFF 含量依次减少,各组间差异有显著性 ($P < 0.01$)。(见表 3)

表 3 各实验组大鼠脾组织上清液 BAFF 含量($\bar{x} \pm s, n=10$)
Tab. 3 The levels of BAFF in the splenic tissue fluid of all the groups

组别 Groups	BAFF/pg/mL
正常对照组 Normal group	50.2 ± 6.42
EAE 对照组 Model group	110.3 ± 10.29 ^a
PTX 小剂量组 Small dose group	101.5 ± 6.49 ^{ab1}
PTX 中剂量组 Middle dose group	87.1 ± 7.88 ^{ab2c}
PTX 大剂量组 High dose group	62.7 ± 6.11 ^{ab2cd}

注:与正常对照组相比,^a $P < 0.01$;与 EAE 对照组相比,^{b1} $P < 0.05$ 、^{b2} $P < 0.01$;与 PTX 小剂量组相比,^c $P < 0.01$;与 PTX 中剂量组相比,^d $P < 0.01$ 。

Note. Compared with normal group, ^a $P < 0.01$; compared with model group, ^{b1} $P < 0.05$ 、^{b2} $P < 0.01$; compared with small dose group, ^c $P < 0.01$; compared with middle dose group, ^d $P < 0.01$.

3 讨论

CD28 或 CTLA-4/B7 协同刺激分子在 EAE 中起重要的作用。CD28 及 CTLA-4(又称 CD152)均是参与 T 细胞识别抗原与活化的重要 CD 分子,CD28 与 CTLA-4 在 T 细胞上表达的多少与免疫反应密切相关。研究已证实,给予 EAE 大鼠 CD28 抗体治疗可以特异性地阻断 Th 介导的 B 细胞分泌免疫球蛋白(Ig)过程^[5,6],特别是 EAE 大鼠发病开始时,从而阻断疾病的进展。CTLA-4 可产生负向调节信号和抑制细胞周期的进程,涉及的主要机制为抑制 TCR 和 CD28 介导 IL-2 产生^[7],导致免疫反应的终止。CTLA-4 与 CD28 具有相反的免疫作用,给予抗 CTLA-4 抗体可加重 EAE 大鼠发病症状或导致其复发^[8]。CTLA-4 还可阻止缓解复发型的 EAE 的进程。以上研究均表明 CD28 或 CTLA-4/B7 协同刺激分子在 EAE 中发挥重要的作用。

BAFF 是 1998 年发现的肿瘤坏死因子家族的新成员,主要由单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞合成、中性粒细胞产生。已有研究证实,在有些 MS 病人 T 细胞或者单核细胞分泌的 BAFF 含量增加^[8]。对 BAFF 受体缺乏的大鼠及未缺乏大鼠同时给予抗原建立 EAE 模型,BAFF 受体缺乏的大鼠临床症状提前,且较未缺乏的大鼠临床症状重、神经功能障碍评分更高,发病潜伏期较对照组短,脑脊髓的炎症范围更大,中枢神经系统内 BAFF 含量较对照组增加,中枢神经系统浸润的炎症细胞更多,而外周

的促炎性细胞因子的数量增多。在猴的 EAE 模型实验中,不管是在造模前还是造模后使用抗 BAFF 的抗体均有助于减少外周血、脾组织淋巴器官中 CD20⁺ B 细胞数量、抑制 Ig 的产生,还能抑制 T 细胞活化,减少 CD4⁺ T 细胞数量。在造模前使用抗 BAFF 的抗体能显著降低 EAE 的发病率。使用抗 BAFF 抗体的猴猴症状出现时间较未使用抗 BAFF 抗体的 EAE 对照组迟,神经功能障碍评分、脊髓炎症浸润程度及髓鞘脱失程度较对照组低,进展较对照组慢。使用抗 BAFF 的抗体的猴猴外周血单个核细胞、脾组织及外周淋巴结 IL-17 含量较对照组低,而 IFN- γ 、TNF- α 、IL-2、IL-6 含量减少,TGF- β 含量增加,对 EAE 猴猴继续使用抗 BAFF 的抗体还能使已经出现的症状具有改善作用^[9,10]。

PTX 因其良好的抗肿瘤作用广泛应用于临床,新近的研究表明,PTX 除了具有抗肿瘤作用外还具有广泛的免疫调节作用,新近的研究表明 PTX 能调节肿瘤宿主体内调节性 T 细胞(Regulatory T cells, Treg)的数量,具有免疫调节作用。在 PTX 治疗乳腺癌的研究中就发现,PTX 能下调内皮细胞间粘附分子-1 的表达,而 ICAM-1 具有保护血脑屏障受损、减少巨噬细胞进入血脑屏障的作用^[11,12],其还能刺激 T 淋巴细胞活化的能力、使 IL-2、INF- γ 等细胞因子分泌减少,而 IL-2、INF- γ 已被证实,是具有加重 EAE 病情的细胞因子^[13]。PTX 还可使 CD3⁺ T 细胞的杀伤活性降低,发挥其免疫抑制作用。

因此我们认为 PTX 可能通过诱导淋巴细胞凋亡及抑制淋巴细胞分裂使免疫活性细胞处于高凋亡低增值状态,从而抑制机体的免疫功能。以上研究证实,PTX 具有广泛的免疫调节作用,而 MS 的主要发病机制就是免疫功能紊乱导致的,PTX 通过其免疫调节作用可能治疗 MS 有效。基于以上假设,并查阅了相关文献发现,国外已有研究者将 PTX 用于 EAE 大鼠模型,发现 PTX 通过其抗炎及免疫调节功能对 EAE 大鼠发挥着防治作用,而且 PTX 还能抑制骨髓未成熟 B 细胞向外周淋巴器官迁移,减轻 MS 患者的炎症反应。

本实验结果亦证实,PTX 对 CD28、CTLA-4、BAFF 均具有调节作用,与 EAE 对照组比较,PTX 各剂量组能降低脑组织内 CD28、脾组织上清液中 BAFF 含量,升高脑组织中 CTLA-4 含量,结合大鼠脑组织学评分结果,可推断 PTX 可能对 EAE 具有防治作用。

但本实验仍具有不足之处,本实验研究在 EAE 大鼠疾病高峰期即处死发病大鼠测定以上细胞因子,故无法动态观察 CD28、CTLA-4、BAFF 等细胞因子的动态改变;因经费原因只测定了 CD28、CTLA-4、BAFF 含量,未检测更多免疫细胞及细胞因子含量,未能很好的阐述紫杉醇对 EAE 大鼠免疫网络的影响,且仍有实验涉及动物数量较少等局限性存在,仍需后续的研究完善有关机制的阐述。

参考文献:

- [1] 杨元,袁正洲,吕志宇,等. 血管活性肠肽(VIP)对实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)大鼠脑组织 IL-17A 含量的影响[J]. 中国比较医学杂志,2016,26(10):32-35.
- [2] Frequin ST, Lamers KJ, Borm GF, *et al.* T-cell subsets in the cerebrospinal fluid and peripheral blood of multiple sclerosis patients treated with high-dose intravenous methylprednisone[J]. *Acta Neurol Scand*,1993,88(2):80-86.
- [3] Hoehlig K, Shen P, Lampropoulou V, *et al.* Activation of CD4⁺ Foxp⁺ regulatory T cells proceeds normally in the absence of B cells during EAE [J]. *Eur J Immunol*, 2012, 42 (5): 1164-1173.
- [4] Yin JX, Tu JL, Lin HJ, *et al.* Centrally administered pertussis toxin inhibits microglia migration to the spinal cord and prevents dissemination of disease in an EAE mouse model[J]. *PLoS One*, 2010,5(8):e12400.
- [5] Perrin PJ, June CH, Maldonado JH, *et al.* Blockade of CD28 during in vitro activation of encephalitogenic T cells or after disease onset ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *J Immunol*,1999,163(3):1704-1710.
- [6] McHugh RS, Ratnoff WD, Gilmartin R, *et al.* Detection of a soluble form of B7-1 (CD80) in synovial fluid from patients with arthritis using monoclonal antibodies against distant epitopes of human B7-1 [J]. *Clin Immunol Immunopathol*,1998,87(1):50-59.
- [7] Krummel MF, Allison JP. CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells [J]. *J Exp Med*,1996,183(6):2533-2540.
- [8] Zhou X, Xia Z, Lan Q, *et al.* BAFF promotes Th17 cells and aggravates experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *Plos one*,2011,6(8):e23629.
- [9] Jagessar SA, Heijmans N, Oh L, *et al.* Antibodies against human BLyS and APRIL attenuate EAE development in marmoset monkeys [J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2012,7(3):557-570.
- [10] Huntington ND, Tomioka R, Clavarino C, *et al.* A BAFF antagonist suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis by targeting cell-mediated and humoral immune responses [J]. *Int Immunol*,2006,18(10):1473-1485.
- [11] 杨兆华,洪涛,王春生,等. 紫杉醇对大鼠心脏移植急性排斥反应的免疫抑制作用[J]. 中国胸心血管外科临床杂志, 2006,13(6):401-404.
- [12] Stefan T, Marcus N, Scherer S, *et al.* The antineoplastic drug paclitaxel has immunosuppressive properties that call effectively promote all ograft survival in a rat heart transplant model [J]. *Transplantation*,2002,73(2):216-223.
- [13] Millán J, Hewlett L, Glyn M, *et al.* Lymphocyte transcellular migration occurs through recruitment of endothelial ICAM-1 to caveola-and F-actin-rich domains [J]. *Nat Cell Biol*, 2006,8(2):113-123.

[收稿日期] 2016-06-27