

甲强龙对实验性变态反应性脑脊髓炎小鼠的协同刺激分子 CD80 和 CD86 的影响

李吕力, 韦俊杰, 李晓峰, 李燕华, 陈渊, 范秉林,
张丽香, 陈志, 肖继东, 韦旋, 王夏薇, 封浑

基金项目: 广西医疗卫生重点科研课题项目(编号:重2010028); 广西自然科学基金项目(编号:2011GXNSFA018185); 国家自然科学基金资助项目(编号:81460192)

作者单位: 530021 南宁,广西壮族自治区人民医院神经内科

作者简介: 李吕力(1959-),男,大学本科,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:脑血管病及神经免疫疾病的诊治。E-mail:lilvli13579@163.com

[摘要] 目的 探讨甲强龙对实验性变态反应性脑脊髓炎小鼠的协同刺激分子 CD80 和 CD86 的影响。方法 实验性变态反应性脑脊髓炎(EAE)模型通过以髓鞘少突胶质细胞糖蛋白多肽 35-55(MOG35-55)为抗原诱导。将 30 只雌性 C57BL/6J 小鼠随机分为甲强龙组、EAE 组和正常组,每组 10 只。采用蛋白质印迹法检测大脑的 CD80 和 CD86 表达水平。结果 甲强龙组神经功能缺损症状轻于 EAE 组,大脑 CD80 表达水平明显低于 EAE 组($P < 0.05$),而 CD86 表达明显高于 EAE 组($P < 0.05$)。结论 甲强龙能改善 EAE 小鼠的症状,其作用机制之一是抑制 CD80 表达并上调 CD86 的表达。

[关键词] 甲强龙; 实验性变态反应性脑脊髓炎; 多发性硬化; CD80; CD86

[中图分类号] R 742 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2015)05-0416-03

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2015.05.09

Effect of methylprednisolone on the levels of CD80 and CD86 in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis Li Lv-li, WEI Jun-jie, LI Xiao-feng, et al. Department of Neurology, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China

[Abstract] **Objective** To explore the effect of methylprednisolone on the levels of cluster of differentiation (CD)80 and CD86 in the central nervous system of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). **Methods** The EAE model was induced in mice by immunized with myelin oligodendrocyte glycoprotein peptides (MOG35-55). 30 female C57BL/6J mice were randomly divided into 3 groups; methylprednisolone-treated group, EAE group and normal group. The brain tissues were collected and their expressions of CD80 and CD86 were detected using western blot. **Results** The neurological deficits of the methylprednisolone-treated mice were lighter than those of the EAE mice ($P < 0.05$), while the methylprednisolone-treated mice displayed the lower expression of CD80 and the higher expression of CD86 than the EAE mice did ($P < 0.05$). **Conclusion** Methylprednisolone can protect against EAE in mice by the inhibition of CD80 and upregulation of CD86.

[Key words] Methylprednisolone; Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE); Multiple sclerosis; CD80; CD86

多发性硬化(multiple sclerosis, MS)是一种累及中枢神经系统(CNS)的自身免疫性疾病。实验性变态反应性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)作为 MS 经典的动物模型,其免疫反应主要由髓鞘特异性 CD4⁺T 细胞介导。CD4⁺T 淋巴细胞的活化与增殖需要协同刺激分子的作用,其中抗原提呈细胞表面表达的 CD80 和 CD86 是最重要的两种协同刺激分子^[1]。MS 发作期的常

用治疗药物之一甲基强的松龙(又称甲强龙),其对 MS 急性期的疗效已经得到临床证实^[2],然而其免疫抑制作用机理尚未完全明了,需进一步研究明确甲强龙是否对协同刺激分子 CD80 和 CD86 有调节作用。本研究于 2013 年分别在华中科技大学同济医学院和广西壮族自治区人民医院实验中心进行,使用甲强龙对 EAE 小鼠进行干预,通过蛋白质印迹法(western blot)检测干预后小鼠大脑的 CD80 和

CD86 的表达,研究甲强龙对 EAE 小鼠 CD80 和 CD86 的影响,以阐明甲强龙治疗 MS 的作用机制。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 6~8 周 SPF 级雌性的健康 C57BL/6J 小鼠 30 只,体重 16~20 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,饲养于华中科技大学同济医学院实验动物中心。动物实验程序严格遵照华中科技大学同济医学院实验动物管理委员会相关规定执行。

1.2 主要试剂 MOG35-55(序列 MEVGWYRSPFS-RVVHLYRNGK)由上海强耀生物科技有限公司合成,纯度 >97%。百日咳毒素购自美国 Enzo 公司。完全弗氏佐剂(CFA)购自美国 Sigma 公司。卡介苗购自石家庄伟天科学仪器设备有限公司。CD80 单克隆抗体和 CD86 单克隆抗体均购自美国 Epitomics 公司,甲泼尼松龙琥珀酸钠注射液购自辉瑞制药比利时公司。

1.3 方 法

1.3.1 制模及分组 用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)将少突胶质细胞糖蛋白(MOG35-55)稀释成 3 mg/ml,与等体积的含 10 mg/ml 卡介苗的 CFA 充分混合,用全玻璃注射器反复推拉形成油包水乳剂。通过随机数表法将 C57BL/6J 小鼠随机分为甲强龙组、EAE 组和正常组,每组 10 只。甲强龙组、EAE 组于小鼠背部皮下多点注射 MOG35-55 乳剂抗原 0.2 ml/只。正常组用等量生理盐水代替 MOG35-55,其余步骤相同。免疫当天计为第 1 天,分别于第 1、2 天给每只小鼠腹腔注射百日咳毒素 400 ng/次。第 7 天,甲强龙组、EAE 组小鼠再次于背部皮下多点注射 MOG35-55 乳剂抗原 0.2 ml/只,正常组则皮下注射等量生理盐水。

1.3.2 给药 甲强龙组在发病当天开始腹腔注射甲强龙 40 mg/kg,每天上午 10:00 注射一次,连用 3 d。EAE 组和正常组均以等体积生理盐水腹腔注射,其余方法同甲强龙组。

1.3.3 神经功能评分 免疫后每天上午由同一人采用 Benson 评分标准对小鼠进行神经功能评分并记录:0 分为不发病,1 分为尾部无力或蹒跚步态伴尾部有力,2 分为蹒跚步态伴尾部无力(共济失调),2.5 分为共济失调伴部分单肢麻痹,3 分为单肢完全麻痹或双肢部分麻痹且部分麻痹肢体尚能爬行,3.5 分为单肢完全麻痹伴另一肢体部分麻痹或双肢部分麻痹且不能爬行,4 分为双肢完全麻痹,4.5 分为四肢麻痹,5 分为濒死状态或死亡。

1.3.4 解剖及样品制备 于疾病高峰期将小鼠麻

醉后,在冰上迅速解剖分离出大脑和脊髓,于大脑基底节处取少许组织置于匀浆器中,尽量剪碎,加单去污剂裂解液裂后匀浆器中匀浆,然后置于冰上裂解 30 min 后,用移液器将裂解液移至离心管中,然后于 4 ℃ 下 12 000 rpm 离心 5 min 后取上清分装置于 -20 ℃ 保存备用。

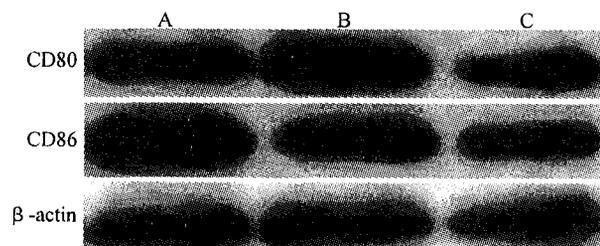
1.3.5 蛋白质印迹法检测 取上述样品溶液经考马斯亮蓝法对样品蛋白质定量,含 50 mg 蛋白的溶液经蛋白变性后加入 SDS 聚丙烯酰胺凝胶每个点样孔中电泳,确定片段大小后,电印迹转染到硝酸纤维素膜,5% 的脱脂奶粉封闭 1 h,继之用目的蛋白 CD80、CD86、 β -actin 的一抗 4 ℃ 过夜孵育,PBS 冲洗后加入结合辣根过氧化物酶的二抗孵育。化学发光法显现蛋白带,照像,用 BandScan V5.0 分析目标条带的灰度值(A 值),用 CD80/ β -actin 和 CD86/ β -actin 分别表示 CD80 和 CD86 的相对表达水平。

1.4 统计学方法 应用 SPSS16.0 软件进行统计分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两样本均数比较采用成组 *t* 检验,多样本均数比较采用单因素方差分析,多样本的两组间比较当方差齐时采用 SNK 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组神经功能评分比较 评分 ≥ 1 分表示小鼠发病,甲强龙组、EAE 组各有 80% (8/10) 小鼠发病,均无死亡。两组小鼠多在免疫第 13 天后开始陆续发病,出现尾部失张力,蹒跚步态,翻身困难及肢体瘫痪,临床症状最严重者表现为双后肢完全麻痹伴左前肢部分麻痹。正常组无一只发病。甲强龙组的峰值评分明显低于 EAE 组 [(3.75 \pm 1.48) vs (2.50 \pm 1.22), $P < 0.05$]。

2.2 各组大脑的 CD80 和 CD86 表达比较 CD80 在 EAE 小鼠的大脑中表达明显升高 ($P < 0.05$),甲强龙组大脑的 CD80 表达较 EAE 组明显下降 ($P < 0.05$)。甲强龙组和 EAE 组大脑的 CD86 表达均高于正常组 ($P < 0.05$),甲强龙组大脑的 CD86 表达明显高于 EAE 组。见图 1,表 1。



A:甲强龙组; B:EAE 组; C:正常组(Western Blot)

图 1 各组大脑 CD80 和 CD86 表达比较图

表1 各组大脑的 CD80 和 CD86 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	CD80/ β -actin	CD86/ β -actin
正常组	10	0.95 \pm 0.12	0.97 \pm 0.11
EAE组	10	1.38 \pm 0.07 [▲]	1.28 \pm 0.05 [▲]
甲强龙组	10	1.14 \pm 0.08 [*]	1.41 \pm 0.09 ^{*▲}
F	-	4.470	5.162
P	-	0.046	0.032

注:与 EAE 组比较, * $P < 0.05$;与正常组比较, [▲] $P < 0.05$

3 讨论

3.1 甲强龙是一种人工合成的中效糖皮质激素,是在泼尼松龙的 6 α 位引入甲基,其抗炎作用增强(为氢化可的松的 7 倍)、水盐代谢作用减弱。由于其静脉注射起效快,作用持久,副作用少等优点,其在临床中应用广泛。目前已知甲强龙具有抑制 T 细胞活化、促进 T 细胞凋亡、下调炎性因子生成等一系列抑制免疫的作用,但其对协同刺激分子的作用研究甚少,国内未见有相关报道。

3.2 本次实验发现,甲强龙组的峰值评分均低于 EAE 组,说明甲强龙可减缓 EAE 病情进展。国外 EAE 制模多采用人结核分枝杆菌的 H37Ra 菌种,但人结核分枝杆菌在国内受到严格管制,不易获得^[3],限制了其在本研究中的应用,因此本实验采用卡介苗作为免疫佐剂。本次实验虽然采用卡介苗的 EAE 发病率在 80% 左右,略低于目前国外 EAE 研究的发病率水平^[4],但能满足本研究的条件。本研究还进一步发现,EAE 发病后 CD80/CD86 显著上调;甲强龙治疗能改善 EAE 的临床症状,同时显著下调 CD80 的表达,升高 CD86 的表达水平,与国外 Vanderheyde 等^[5]研究结果相符合。CD4⁺T 淋巴细胞的活化、增殖及分化除了抗原提呈细胞(APCs)释放细胞因子提供的一个合适细胞因子微环境之外,还需要两个必须因素:其一是由 APCs-MHC 分子-抗原肽与 TCR 结合传导第一信号,其二是协同刺激分子传导的第二信号,如果共刺激信号不足,可造成 T 细胞死亡或无反应^[1]。其中,APCs 表面表达的 CD80/CD86 与 T 淋巴细胞表面的 CD28/细胞毒性 T 细胞相关抗原 4(CTLA-4)是目前发现的最重要的协同刺激分子。CD80/CD86 主要表达在 APCs 表面,CD80 表达在活化的 APCs 表面,而正常情况下 CD86 呈低水平表达,APCs 激活后表达显著上调^[6]。CD28/CTLA-4

均为 T 细胞表面的跨膜受体,CD28 在所有 CD4⁺T 细胞表面均有表达,而 CTLA-4 则在活化后期的 CD4⁺T 细胞表面表达,且表达水平低于 CD28^[7]。CTLA-4 表达上调能终止 T 细胞的过度活化,这在一定程度上起抑制免疫进展的作用^[8]。抗 CD80 抗体干预可显著改善 EAE 的临床症状,而抗 CD86 抗体则致使 EAE 的病情恶化^[9]。CD80 对 T 细胞免疫有正向调节作用,而 CD86 具有抑制 T 细胞的作用,通过调控 CD80/CD86 能对 T 细胞免疫为主的自身免疫疾病发挥抑制免疫的作用。再结合本研究可知,甲强龙能通过抑制 CD80 并上调 CD86 进而对 T 细胞产生负向调节的作用。

总之,甲强龙能改善 EAE 的临床症状,其治疗作用之一是通过调控协同刺激分子 CD80/CD86 的表达。由于协同刺激分子除了 CD80/CD86 还有 CD28/CTLA-4 等分子存在,还需进一步研究这些分子以阐明甲强龙对协同刺激分子的调节作用,并由此发现甲强龙治疗 MS/EAE 的靶点。

参考文献

- Chastain EM, Duncan DS, Rodgers JM, et al. The role of antigen presenting cells in multiple sclerosis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1812(2): 265-274.
- Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, et al. Multiple sclerosis [J]. *N Engl J Med*, 2000, 343(13): 938-952.
- 陈玉社, 公丕欣, 杨明峰, 等. 实验性变态反应性脑脊髓炎模型研究进展 [J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2005, 32(6): 533-536.
- Hart BA, Gran B, Weissert R. EAE: imperfect but useful models of multiple sclerosis [J]. *Trends Mol Med*, 2011, 17(3): 119-125.
- Vanderheyde N, Verhasselt V, Goldman M, et al. Inhibition of human dendritic cell functions by methylprednisolone [J]. *Transplantation*, 1999, 67(10): 1342-1347.
- Chen L. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity [J]. *Nat Rev Immunol*, 2004, 4(5): 336-347.
- Ceeraz S, Nowak EC, Noelle RJ. B7 family checkpoint regulators in immune regulation and disease [J]. *Trends Immunol*, 2013, 34(11): 556-563.
- Fife BT, Bluestone JA. Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways [J]. *Immunol Rev*, 2008, 224: 166-182.
- Miller SD, Vanderlugt CL, Lenschow DJ, et al. Blockade of CD28/B7-1 interaction prevents epitope spreading and clinical relapses of murine EAE [J]. *Immunity*, 1995, 3(6): 739-745.

[收稿日期 2015-02-13][本文编辑 黄晓红]