

网络出版时间:2016-4-19 11:04:48 网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160419.1104.016.html

# BAFF-BAFFR 及信号转导分子参与 佐剂性关节炎的免疫反应及芍药苷-6'-O-苯磺酸酯的作用

徐 澍,魏 芳,贾晓益,孙晓静,杨雪枝,赵英杰,常 艳,魏 伟

**摘要** 目的 观察佐剂性关节炎(AA)大鼠炎症不同时期脾脏B淋巴细胞刺激因子(BAFF)及其受体(BAFFR)表达变化以及芍药苷-6'-O-苯磺酸酯(CP-25)对其的影响。方法 采用完全弗氏佐剂制备大鼠AA模型,随机分为正常组、AA组、CP-25(25、50、100 mg/kg)组、甲氨蝶呤(0.5 mg/kg)组、白芍总苷(50 mg/kg)组、芍药苷(50 mg/kg)组,造模后第17~31天给药。ELISA法检测外周血BAFF水平;免疫组织化学法、流式细胞术、Q-PCR和Western blot法检测CP-25对脾脏BAFFR表达的影响;Western blot法检测脾脏肿瘤坏死因子相关因子2(TRAF2)蛋白的表达。结果 与正常组比较,炎症反应期(D9)、炎症初期(D16)、炎症高峰期(D23)及炎症缓解期(D30)模型大鼠血清BAFF水平和脾脏BAFFR mRNA及蛋白表达均增加。与AA组比较,CP-25(25、50、100 mg/kg)体内给药明显下调AA大鼠脾脏BAFFR mRNA及蛋白表达。体外BAFF刺激后,大鼠脾脏细胞TRAF2及BAFFR蛋白表达显著增加,CP-25( $1 \times 10^{-6}$  mol/L)明显降低TRAF2及BAFFR蛋白的表达。结论 CP-25发挥炎症免疫调节作用可能与其抑制AA大鼠BAFFR受体及TRAF2信号分子表达有关。

**关键词** 类风湿性关节炎;佐剂性关节炎;CP-25;BAFF;BAFFR;TRAF2

**中图分类号** R 967

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2016)05-0643-07

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以关节的慢性炎症为特征,以滑膜炎为病理基础,最终导致软骨基质和软骨下骨的侵蚀。B淋巴细胞刺激因子(B cell activating factor, BAFF)是肿瘤坏死因子超家族成员之一,主要来源于树突状细胞、单

核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞等。BAFF对于B淋巴细胞是一个重要的体内平衡的细胞因子,有助于调节固有免疫和适应性免疫应答<sup>[1]</sup>。在RA患者的血清和滑液中已检测到BAFF水平增高;实验室前期研究<sup>[2-4]</sup>表明,BAFF过表达促进T细胞应答,提示BAFF过表达可能促进RA的发生发展。肿瘤坏死因子相关因子2(tumor necrosis factor receptor-associated factor, TRAF2)是TRAF家族中主要成员之一。研究<sup>[5]</sup>表明,RA患者外周血单核细胞或实验性关节炎免疫组织中BAFFR和TRAF2 mRNA表达均明显增加,提示RA的发生发展可能与高表达的BAFFR通过TRAF2参与调控下游抗凋亡信号通路有关。安徽医科大学临床药理研究所对白芍总苷(total glucosides of paeony, TGP)中的活性成分芍药苷(paeoniflorin, Pae)进行了结构修饰,合成了新型活性单体药物-芍药苷-6'-O-苯磺酸酯(CP-25)。该实验通过建立大鼠佐剂性关节炎(adjvant-induced arthritis, AA)模型,明确BAFF和BAFFR在AA大鼠病程中的变化以及CP-25对BAFFR和TRAF2表达的作用。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** SD大鼠,雄性,( $180 \pm 20$ ) g, 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。卡介苗(成都生物制品研究所有限责任公司,批号:20123007);TGP(提取自芍药根部,是本所研发的第一个被批准上市的抗炎免疫调节药);Pae;CP-25(本所药化室提供,纯度大于98%);CD45R 荧光抗体(美国eBioScience公司);兔来源BAFFR一抗(美国Santa Cruz公司);FITC-小鼠抗兔二抗(美国Proteintech公司);PV6000通用两步法试剂盒、DAB显色液、苏木精(中国中杉金桥生物技术有限公司);超敏ECL发光显色试剂盒、逆转录试剂盒(美国Thermo Scientific公司);扩增试剂盒(美国Promega公司)。PCR引物序列:BAFFR F:5'-ACCCAGCAG AACCAGACACTAC-3', R:5'-AACGACCTCAAAAAT-

2016-02-22 接收

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81330081、81573443、31200675)

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:徐 澍,男,硕士研究生;

常 艳,女,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: yychang@ahmu.edu.cn;

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

GGAATGT-3'; GAPDH F: 5'-ACAGCAACAGGGTG-GTGGAC-3', R: 5'-TTTGAGGGTGCAGCGAACIT-3'.

**1.2 大鼠 AA 模型的制备及分组** 将卡介苗 80 °C 水浴灭活 1 h, 与高压灭菌的石蜡充分研磨混匀, 制成 10 g/L 完全弗氏佐剂 (complete freund adjuvant, CFA), 于每只 SD 大鼠右后足跖皮内注射 CFA 0.1 ml 致炎, 造模当天为 D0。造模成功大鼠随机分为模型组、CP-25 (25、50、100 mg/kg) 组、甲氨蝶呤 (methotrexate, MTX) (0.5 mg/kg) 组、TGP (50 mg/kg) 组、Pae (50 mg/kg) 组, 另设正常组。CP-25、TGP、Pae 按照 10 ml/kg 体重灌胃给药, 每天 1 次; MTX 按照 10 ml/kg 体重灌胃给药, 每 3 d 1 次。

### 1.3 指标观察及方法

**1.3.1 AA 大鼠临床表现** 观察大鼠致炎后, 根据其关节局部的炎症反应以及全身表现症状, 将 AA 模型分为炎症反应期 (D9)、炎症初期 (D16)、炎症高峰期 (D23) 以及炎症缓解期 (D30)<sup>[6]</sup>。

**1.3.2 AA 大鼠外周血 BAFF 水平** 采用 ELISA 法分别在炎症不同时期 (D9、D16、D23、D30) 检测 AA 大鼠外周血 BAFF 水平变化。在炎症不同时期 AA 大鼠股静脉取血, 静置 1 h 后离心 (3 000 r/min 离心 15 min), 取外周血上清液, -80 °C 保存待测。采用 ELISA 试剂盒测定其 BAFF 水平。

**1.3.3 AA 大鼠脾脏 BAFFR 表达** 采用流式细胞术分别在炎症不同时期 (D9、D16、D23、D30) 检测 AA 大鼠脾脏 BAFFR 表达。在炎症不同时期, 将 AA 大鼠麻醉后颈部脱臼处死, 取脾脏常规制备脾脏悬液、室温 2 000 r/min 离心 10 min 即得脾脏细胞。每管加入 100  $\mu$ l 细胞悬液, 加入 CD45R、BAFFR 一抗, 并设阴性组和同型组。37 °C 孵育 30 min 后, 2 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 加入 100  $\mu$ l PBS 重悬, 加入 FITC 标记的山羊抗兔荧光二抗, 37 °C 孵育 30 min。加入 300  $\mu$ l PBS 重悬, 上机检测。

**1.3.4 AA 大鼠脾脏 BAFFR 蛋白免疫组织化学分析** 按照聚合物免疫组化检测系统中的相关要求检测各组大鼠脾脏 BAFFR 蛋白表达。取大鼠脾脏组织, 常规制备组织切片。脱蜡、水化、组织抗原修复后, 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 去离子水孵育 5 min 阻断内源性过氧化物酶。滴加 BAFFR 一抗, 4 °C 孵育过夜; PBS 洗涤后滴加通用型 IgG 抗体-HRP 多聚体, 37 °C 孵育 15 min; PBS 洗涤; 应用 DAB 溶液显色。苏木精复染、脱水、透明、封片、镜检。阳性物质呈棕褐色颗粒状。另设阴性对照实验。采集 200 倍视野图像, 利用 Image-Pro Plus 分别对各切片中免疫组化染色阳

性表达进行半定量分析, 测定脾脏组织中 BAFFR 蛋白染色平均光密度 (mean optical density, MOD) 值后进行统计学分析。

**1.3.5 AA 大鼠脾脏 BAFFR mRNA 水平变化分析** 常规步骤抽提脾脏总 RNA, 根据逆转录试剂盒及扩增试剂盒中的相关步骤, 利用 Q-PCR 法检测脾脏 BAFFR mRNA 水平变化, 内参蛋白为 GAPDH。对所得结果采用  $\Delta\Delta C_t$  法进行分析。

**1.3.6 AA 大鼠脾脏 BAFFR 蛋白及 TRAF2 蛋白表达分析** 常规裂解脾脏组织 (RIPA: PMSF = 99:1), 提取总蛋白。取 15  $\mu$ l 蛋白样品上样, SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白, 湿法转移蛋白至 PVDF 膜, 在含 5% 脱脂牛奶的 TPBS 中室温封闭 2 h。放入含 BAFFR、TRAF2 一抗的稀释液中 (浓度 1:400) 4 °C 过夜, 次日加入 1:40 000 释度的辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 2 h。ECL 试剂盒显影, 结果用 Image Quant Las Mini 凝胶成像系统扫描存盘, 采用 ImageJ 软件进行分析。

**1.3.7 CP-25 体外对 BAFF 刺激的大鼠脾脏细胞 BAFFR 和 TRAF2 蛋白的表达的影响** 将正常大鼠麻醉后颈部脱臼致死取脾脏常规制备脾脏悬液、室温 2 000 r/min 离心 10 min 即得脾脏细胞。用含 10% 胎牛血清的 DMEM 重悬细胞, 调整细胞数为  $5 \times 10^7$  个/ml。铺 6 孔板, 每孔加 1 ml 细胞悬液。分别用 LPS 及 BAFF 刺激脾脏细胞 (LPS 终浓度 4  $\mu$ g/ml, BAFF 终浓度 500 ng/ml), 同时给予 CP-25 (终浓度  $1 \times 10^{-6}$  mol/L), 在 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 无菌环境下培养 72 h, 取脾脏细胞进行 Western blot 实验, 检测其 BAFFR 和 TRAF2 蛋白的表达。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS 19.0 软件进行分析, 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 炎症不同时期 AA 大鼠的临床表现** 大鼠致炎后约 1 d, 致炎侧足爪明显肿胀; D7 ~ D9 时致炎侧足爪肿胀明显, D14 ~ D16 出现继发病变: 对侧足爪及前肢发生多发性关节肿胀, 大鼠出现活动障碍, 鼻部开始充血, 双耳炎症结节出现, 尾部炎症结节出现; D21 ~ D23 继发性炎症达到高峰, 大鼠足爪肿胀度达峰值, 鼻部充血严重, 双耳及尾部出现大量炎症结节; 致炎 D28 ~ D30, 足爪及关节肿胀开始消退, 鼻部充血减轻, 双耳及尾部严重结节消退。CP-25 (50、100 mg/kg) 能显著减轻大鼠继发侧足爪肿胀

程度,减少双耳及尾部炎症结节数量。见图1。



图1 炎症高峰期AA大鼠足爪肿胀及CP-25的影响

A:正常组;B、C:AA组;D:CP-25(25 mg/kg);E:CP-25(50 mg/kg);F:CP-25(100 mg/kg)

**2.2 炎症不同时期AA大鼠外周血上清液BAFF水平变化** ELISA法结果显示,与正常组比较,炎症反应期(D9)AA大鼠外周血上清液BAFF水平明显增高( $F=1.990, P<0.05$ ),炎症初期(D16)、高峰期(D23)、及缓解期(D30)大鼠外周血上清液BAFF水平高于正常大鼠,但差异无统计学意义。见图2。

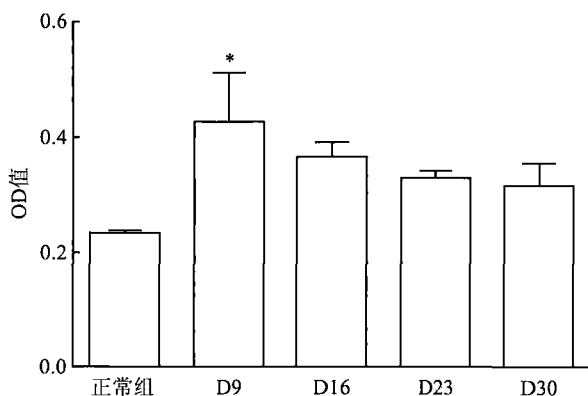


图2 炎症不同时期AA大鼠外周血上清液BAFF水平变化  
与正常组比较: \* $P<0.05$

**2.3 炎症不同时期AA大鼠脾脏BAFFR表达变化** 流式细胞术结果显示,与正常组比较,炎症初期(D16)、炎症高峰期(D23)及炎症缓解期(D30)AA大鼠脾脏BAFFR表达明显增高[ $F(D16)=23.350, F(D23)=5.502, F(D30)=82.285, P<0.05$ ];炎症

反应期(D9)AA大鼠脾脏BAFFR表达有升高趋势,但差异无统计学意义。见图3。

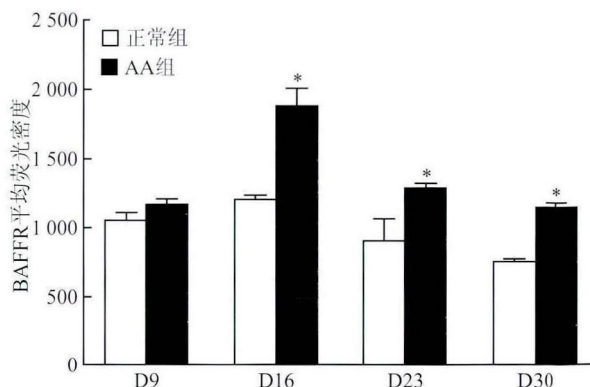
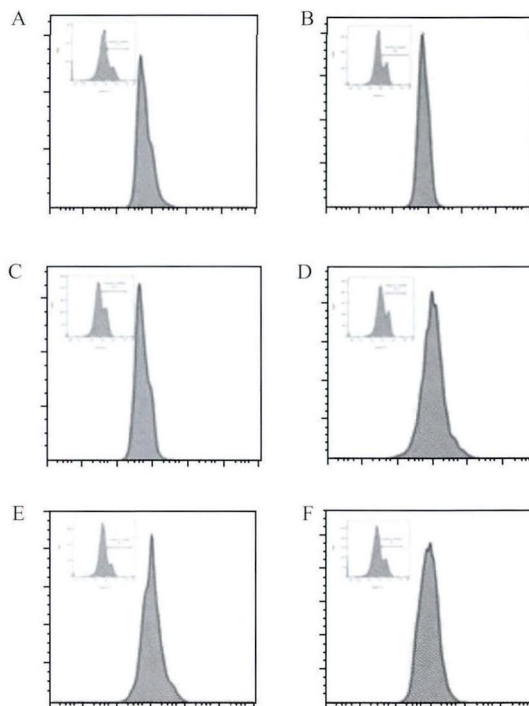


图3 炎症不同时期AA大鼠脾脏BAFFR表达变化

A:阴性对照组;B:正常组;C:D9;D:D16;E:D23;F:D30;与正常组比较: \* $P<0.05$

**2.4 CP-25体内给药对AA大鼠脾脏BAFFR表达的影响**

**2.4.1 免疫组化结果分析** 免疫组化染色切片中,细胞核呈蓝紫色,BAFFR呈浅黄至棕褐色。结果显示,正常组大鼠脾脏BAFFR低表达;与正常组大鼠比较,AA组大鼠脾脏BAFFR表达明显增高,CP-25(25、50、100 mg/kg)给药后降低脾脏BAFFR表达( $F=40.570, P<0.01$ )。见图4。

**2.4.2 Q-PCR结果分析** Q-PCR结果显示,与正常组比较,AA组大鼠脾脏BAFFR mRNA水平显著

增高 ( $P < 0.01$ ); CP-25 (25、50、100 mg/kg) 给药均不同程度降低大鼠脾脏 BAFFR mRNA 水平 ( $F = 39.342, P < 0.01$ )。见图 5。

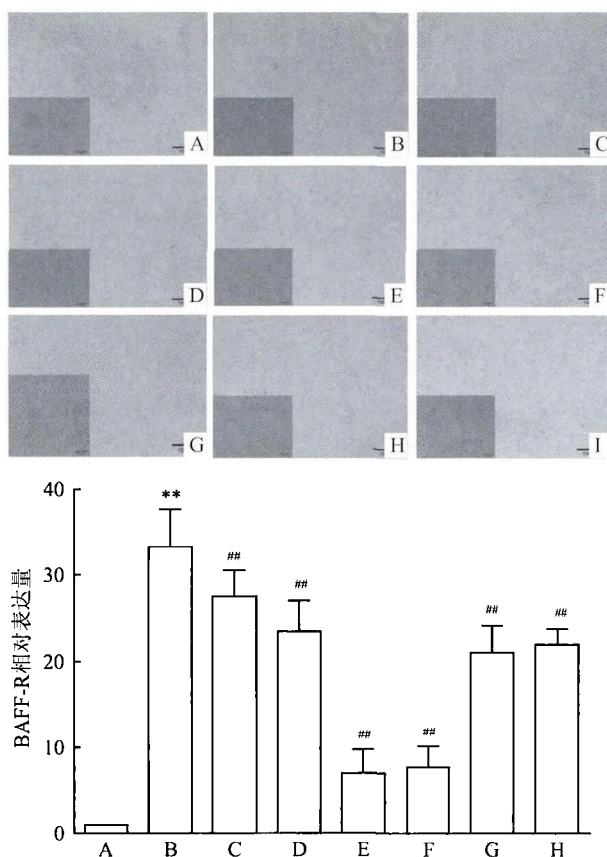


图 4 CP-25 对 AA 大鼠脾脏组织 BAFFR 表达的影响 ×200

A: 正常组; B: AA 组; C: CP-25 (25 mg/kg) 组; D: CP-25 (50 mg/kg) 组; E: CP-25 (100 mg/kg) 组; F: MTX (0.5 mg/kg) 组; G: TGP (50 mg/kg) 组; H: Pae (50 mg/kg) 组; I: 阴性对照组; 与正常组比较: \*  $P < 0.01$ ; 与 AA 组比较: #  $P < 0.01$

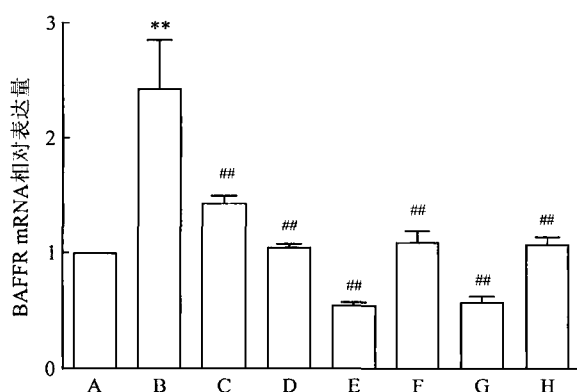


图 5 CP-25 对 AA 大鼠脾脏 BAFFR mRNA 表达的影响

A: 正常组; B: AA 组; C: CP-25 (25 mg/kg) 组; D: CP-25 (50 mg/kg) 组; E: CP-25 (100 mg/kg) 组; F: MTX (0.5 mg/kg) 组; G: TGP (50 mg/kg) 组; H: Pae (50 mg/kg) 组; 与正常组比较: \*  $P < 0.01$ ; 与 AA 组比较: #  $P < 0.01$

2.4.3 Western blot 结果分析 采用 Image J 软件对 Western blot 结果进行分析。实验结果显示, AA 模型大鼠脾脏 BAFFR 表达较正常组显著增加 ( $P < 0.01$ ); CP-25 (25、50、100 mg/kg) 给药不同程度降低大鼠脾脏 BAFFR 表达 ( $F = 928.337, P < 0.01$ )。见图 6。

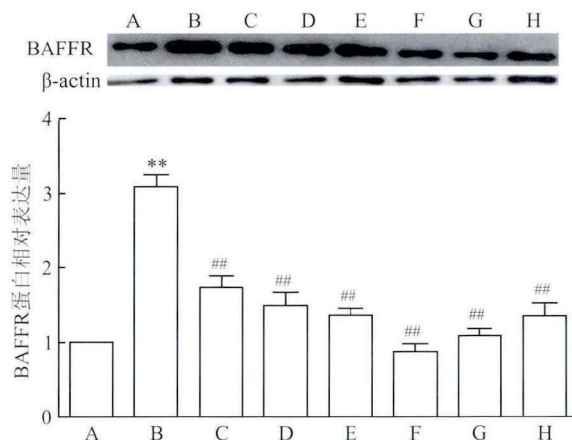


图 6 CP-25 对 AA 大鼠脾脏组织 BAFFR 蛋白表达的影响

A: 正常组; B: AA 组; C: CP-25 (25 mg/kg) 组; D: CP-25 (50 mg/kg) 组; E: CP-25 (100 mg/kg) 组; F: MTX (0.5 mg/kg) 组; G: TGP (50 mg/kg) 组; H: Pae (50 mg/kg) 组; 与正常组比较: \*  $P < 0.01$ ; 与 AA 组比较: #  $P < 0.01$

2.5 CP-25 体外对 BAFF 刺激的大鼠脾脏细胞 TRAF2 和 BAFFR 蛋白表达的影响 Western blot 结果显示, BAFF 刺激后, 脾脏细胞 TRAF2 及 BAFFR 蛋白表达明显增高; CP-25 ( $1 \times 10^{-6}$  mol/L) 给药后, TRAF2 蛋白表达显著降低 ( $F = 355.522, P < 0.01$ ); BAFFR 蛋白表达显著降低 ( $F = 9.801, P < 0.01$ )。见图 7。

### 3 讨论

RA 是一种主要以慢性炎性滑膜炎为主的自身免疫病, 其发病机制尚不清楚。研究<sup>[7]</sup>表明, 以 T、B 淋巴细胞为主的淋巴细胞在 RA 的发生发展中起到重要作用。TGP 是从芍药根部提取的有效部位, 其主要成分为 Pae。TGP 可以抑制丝裂原活化蛋白激酶信号通路活化, 影响成纤维滑膜细胞 (fibroblast-like synoviocytes, FLS) 的 EP 受体-G 蛋白-cAMP 信号转导<sup>[8]</sup>, 抑制 FLS 增殖, 抑制白细胞介素-1、肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、前列腺素 E2 等细胞因子产生, 抑制抗体分泌, 调节 AA 大鼠辅助性 T 细胞 1/辅助性 T 细胞 2 和辅助性 T 细胞 17/调节性 T 细胞平衡<sup>[9]</sup>; Pae 能够调节 G 蛋白-AC-cAMP 信号转导通路, 下调促



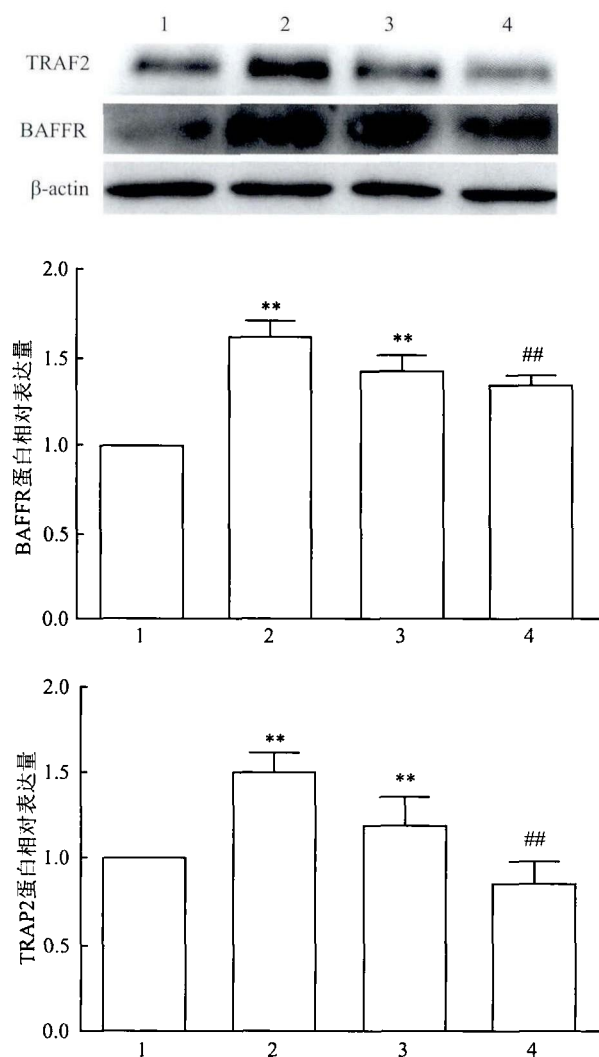


图7 体外 CP-25 对 BAFF 刺激的

大鼠脾脏细胞 TRAF2 和 BAFFR 蛋白表达的影响

1: 对照组; 2: LPS (4 μg/ml); 3: BAFF (500 ng/ml); 4: BAFF + CP-25 (1 × 10<sup>-6</sup> mol/L); 与对照组比较: \* P < 0.01; 与 LPS 组比较: ## P < 0.01

炎细胞因子 IL-2 和 TNF-α, 上调抗炎细胞因子 IL-4 和 TGF-β, 抑制 CIA 大鼠 B 淋巴细胞增殖, 降低血清中免疫球蛋白水平, 降低 BAFF/BAFFR 表达<sup>[10]</sup>, 并通过调节 BAFF/BAFFR 介导的 PI3K/Akt/mTOR 信号通路以抑制 B 淋巴细胞功能<sup>[11]</sup>。CP-25 是在 Pae 结构上 6 位羟基与苯磺酰基缩合成酯而得到的新型活性单体药物。实验室前期研究显示: CP-25 绝对生物利用度较 Pae 有明显提高, CP-25 的吸收高于 Pae, 消除慢于 Pae, 分布广于 Pae (实验数据待发表)。本实验成功建立 AA 模型, 结果显示, CP-25 整体给药显著改善 AA 大鼠整体和关节的炎症免疫反应 (实验数据待发表)。在此基础上, 探讨 CP-25 对 AA 大鼠的治疗作用以及可能机制。本研究表

明, 体内、外给予 CP-25 明显降低 AA 大鼠 BAFFR 的 mRNA 及蛋白表达, 降低 TRAF2 信号分子的蛋白表达, 提示 CP-25 可能通过抑制 BAFFR 及 TRAF2 信号分子发挥免疫调节作用。

BAFF 是肿瘤坏死因数家族成员之一。作为 B 淋巴细胞存活因子, BAFF 适当的表达可以促进自身反应性 B 淋巴细胞的存活<sup>[12]</sup>。BAFF 在 RA 患者关节中异常表达, 并且关节中 BAFF 水平高于血清中 BAFF 水平。AA 大鼠的巨噬细胞和树突状细胞中 BAFF 高表达, 提示 BAFF 可能与淋巴细胞上相应的受体结合, 介导了抗原提呈细胞诱导 T 淋巴细胞的活化和功能<sup>[4]</sup>。BAFFR 主要表达于幼稚和记忆 B 细胞, 并通过启动选择性核因子-κB (nuclear factor-κB, NF-κB) 途径, 通过上调抗凋亡蛋白增强 B 淋巴细胞存活。本实验结果表明: 与正常大鼠比较, AA 大鼠在炎症的不同时期 (D9、D16、D23、D30), 外周血 BAFF 水平增高, 脾脏 BAFFR mRNA 及蛋白表达增加, 提示 BAFF/BAFFR 的异常表达可能参与了 AA 大鼠炎症的发生发展。体内给予 CP-25 明显降低 AA 大鼠脾脏 BAFFR mRNA 及蛋白的表达, 提示 CP-25 抑制炎症反应可能与调节 BAFFR 的表达有关。

TRAF 家族在肿瘤坏死因子诱导的细胞存活信号通路中作为核心分子, 可以调节 NF-κB 及 JNK 信号通路, 在细胞增殖、分化、凋亡, 骨重建以及对细胞因子的激活/抑制方面起到重要作用<sup>[13]</sup>。TRAF2 作为 TRAF 家族重要成员之一, 参与 NF-κB 非经典通路的调控及负反馈环节, 与 B 淋巴细胞增殖、存活、分化和抗体产生有密切联系。当肿瘤坏死因子受体 2 激活时, TRAF2 大量募集下游 NF-κB 转录因子, 激活非经典 NF-κB 信号通路, 促进细胞抗凋亡, 从而诱导免疫反应, 促进自身免疫疾病的发展<sup>[14]</sup>。研究<sup>[15]</sup>表明, TRAF2 在 BAFF-BAFFR 及下游信号通路的调控, 特别是在 B 细胞的存活、活化及功能方面发挥重要作用。实验结果显示, 与正常组比较, 体外 BAFF 刺激后, 脾脏细胞 TRAF2 蛋白表达显著增加; CP-25 (10<sup>-6</sup> mol/L) 给药后, TRAF2 蛋白表达明显降低。提示 CP-25 可能通过抑制 BAFF-BAFFR-TRAF2 分子信号调节免疫细胞功能, 发挥抗炎免疫调控作用。

综上所述, T、B 淋巴细胞功能异常与 RA 发生发展密切相关。BAFF 在促进淋巴细胞存活、活化、增殖过程中具有重要作用。CP-25 作为一种新型活性单体药物, 对大鼠 AA 有明显治疗作用, 其机制可

能与其抑制 AA 大鼠淋巴细胞 BAFFR 表达以及 TRAF2 信号蛋白表达有关。

### 参考文献

- [1] Moisini I, Davidson A. BAFF: a local and systemic target in autoimmune diseases[J]. *Clin Exp Immunol*, 2009, 158(2):155 - 63.
- [2] Wei F, Chang Y, Wei W. The role of BAFF in the progression of rheumatoid arthritis[J]. *Cytokine*, 2015, 76(2):537 - 44.
- [3] Chang Y, Jia X, Sun X, et al. APRIL promotes proliferation, secretion and invasion of fibroblast-like synoviocyte from rats with adjuvant induced arthritis[J]. *Mol Immunol*, 2015, 64(1):90 - 8.
- [4] Chang Y, Sun X, Jia X, et al. Expression and effects of B-lymphocyte stimulator and its receptors in T cell-mediated autoimmune arthritis[J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 24(2):451 - 7.
- [5] Raghav S K, Gupta B, Agrawal C, et al. Expression of TNF-alpha and related signaling molecules in the peripheral blood mononuclear cells of rheumatoid arthritis patients[J]. *Mediators Inflamm*, 2006, 2006(3):12682.
- [6] 宋珊珊, 张玲玲, 魏伟. 实验性关节炎动物模型建立及病理机制研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2011, 27(12):1648 - 53.
- [7] Moulin V, Andris F, Thielemans K, et al. B lymphocytes regulate dendritic cell(DC) function *in vivo*: increased interleukin 12 production by DCs from B cell-deficient mice results in T helper cell type 1 deviation[J]. *J Exp Med*, 2000, 192(4):475 - 82.
- [8] Chen J Y, Wu H X, Chen Y, et al. Paeoniflorin inhibits proliferation of fibroblast-like synoviocytes through suppressing G-protein-coupled receptor kinase 2[J]. *Planta Med*, 2012, 78(7):665 - 71.
- [9] 张玲玲, 魏伟, 汪庆童, 等. 芍药苷对胶原性关节炎大鼠滑膜细胞 G 蛋白偶联信号的调节作用[J]. *中国药理学通报*, 2008, 24(3):330 - 5.
- [10] Chang Y, Wu Y, Wang D, et al. Therapeutic effects of TACI-Ig on rats with adjuvant-induced arthritis *via* attenuating inflammatory responses[J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2011, 50(5):862 - 70.
- [11] Li P P, Liu D D, Liu Y J, et al. BAFF/BAFFR involved in antibodies production of rats with collagen-induced arthritis *via* PI3K-Akt-mTOR signaling and the regulation of paeoniflorin[J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 141(1):290 - 300.
- [12] Fabienne Mackay, Jennifer L, Gommerman. The Role of the BAFF and Lymphotoxin Pathways in B Cell Biology[M]. *Molecular Biology of B Cells (Second Edition)*, 2015:251 - 76.
- [13] Wang Y, Zhang P, Liu Y, et al. TRAF-mediated regulation of immune and inflammatory responses[J]. *Sci China Life Sci*, 2010, 53(2):159 - 68.
- [14] 李影, 陈镜宇, 张玲玲, 等. 肿瘤坏死因子受体相关因子参与炎症免疫调节的研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2015, 31(9):1206 - 10.
- [15] Gardam S, Siervo F, Basten A, et al. TRAF2 and TRAF3 signal adapters act cooperatively to control the maturation and survival signals delivered to B cells by the BAFF receptor[J]. *Immunity*, 2008, 28(3):391 - 401.

## Paeoniflorin -6'-O- tosylate ameliorate the immune response in adjuvant arthritis rat through BAFF-BAFFR downstream signal molecule

Xu Shu, Wei Fang, Jia Xiaoyi, et al

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

**Abstract Objective** To observe the expression profile of splenic B lymphocyte stimulating factor receptor(BAFFR) in adjuvant arthritis(AA) rats during the inflammation course of arthritis and the effects of Paeoniflorin -6'-O-tosylate(code: CP-25). **Methods** AA rats were prepared using complete freund's adjuvant and were divided into 8 groups randomly, including normal, AA, CP-25(25, 50, 100 mg/kg), methotrexate(0.5 mg/kg), total glucosides of paeony(TGP)(50 mg/kg), and paeoniflorin(Pae) group(50 mg/kg), and treated these groups from d17 to d31 after preparation of AA model. BAFF levels in peripheral blood were detected by ELISA; the expression of BAFFR during the inflammation course of AA rat in spleen was detected by flow cytometry. The effect of CP-25 on BAFFR in spleen was investigated through immunohistochemistry, Q-PCR and Western blot. The expression of tumor necrosis factor receptor associated factor(TRAF2) in rat spleen were detected by Western blot. **Results** Compared with the normal, the levels of BAFF in serum were increased in d9, d16, d23 and d30 AA model and the expressions of BAFFR mRNA and protein also increased obviously. CP-25(25, 50, 100 mg/kg) could decrease the expression of BAFFR mRNA. *In vitro*, with the stimulation of BAFF, the expressions of TRAF2 and BAFFR in splenocyte were increased apparently, and CP-25( $1 \times 10^{-6}$  mol/L) could decrease their expression significantly.

## Kv1.3 在 LPS 诱导的小鼠急性肝损伤模型中表达变化

周群<sup>1,2,3</sup>, 吴宝明<sup>1,2,3</sup>, 孟晓明<sup>1,2,3</sup>, 黄成<sup>1,2,3</sup>, 李俊<sup>1,2,3</sup>

**摘要** 目的 探讨脂多糖(LPS)诱导的小鼠急性肝损伤模型中钾离子通道蛋白 Kv1.3 的表达水平。方法 选取 C57BL/6 小鼠,建立 LPS 诱导的急性肝损伤模型,采用组织病理学检查,观察肝损伤病变,相关试剂盒检测血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)水平,免疫组化、荧光实时定量反转录-聚合酶链反应(qRT-PCR)及 Western blot 检测 Kv1.3 表达变化;选取原位灌注的方法分离原代肝脏枯否细胞(KCs),检测 Kv1.3 的表达变化。体外培养 RAW264.7 细胞,使用 LPS 刺激,进一步检测 Kv1.3 的表达变化;使用 Kv1.3 特异性阻断剂玛格毒素(MgTx)预处理 RAW264.7 细胞,再加 LPS 刺激,采用 qRT-PCR 和 Western blot 检测细胞因子的表达变化。结果 组织病理学检查证实急性肝损伤模型建立成功,模型组的 ALT 和 AST 含量均高于正常组( $P < 0.01$ ),模型组组织和原代肝脏 KCs 中 Kv1.3 表达均低于正常组( $P < 0.01$ ),体外实验 LPS 刺激 RAW264.7 细胞后,Kv1.3 表达降低( $P < 0.05$ );Kv1.3 特异性阻断剂 MgTx 减少 LPS 诱导的细胞因子的分泌。结论 Kv1.3 在急性肝损伤模型中的表达降低,阻断 Kv1.3 能减少 LPS 诱导巨噬细胞炎症因子的分泌,Kv1.3 可能在治疗肝脏疾病过程中发挥着重要的作用。

**关键词** 离子通道;急性肝损伤;细胞因子;枯否细胞;T 淋巴细胞

中图分类号 R 967;R 965.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)05-0649-07

急性肝损伤是多种病因(病毒、化学药品、乙醇、免疫反应等)引起的急性肝脏损害的一种疾病,也可继发于某些全身性疾病,其发病率较高,目前尚

无特效的防治方法。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的免疫性急性肝损伤模型,是目前常用的研究肝脏损伤机制模型。在免疫性肝损伤中,免疫细胞如巨噬细胞、T 淋巴细胞在机体的发病过程中起着重要作用。钾离子通道蛋白 Kv1.3 在 T 淋巴细胞、巨噬细胞活化过程中发挥重要作用,参与多种疾病的发生和发展。该研究通过建立 LPS 诱导的急性肝损伤模型,观察急性肝损伤模型 Kv1.3 的表达变化,体外采用 LPS 刺激小鼠巨噬细胞 RAW264.7,检测 Kv1.3 的表达变化,同时采用特异性阻断剂阻断 Kv1.3,检测对 LPS 诱导的炎症细胞因子分泌的影响,探讨 Kv1.3 通道在免疫性急性肝损伤进程中的潜在作用。

### 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 40 只健康雄性 C57BL/6 小鼠,18~22 g,购于安徽医科大学实验动物中心。饲养于安徽医科大学药学院动物房。

**1.2 细胞株和细胞培养** 小鼠巨噬细胞株 RAW264.7 购自美国 ATCC 细胞库。用 DMEM 高糖混合培养基(含 10% FBS 及 100 U/ml 青霉素、100 g/ml 链霉素)于 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 环境中培养,细胞为贴壁生长,当细胞生长融合达到 80% 时,用 0.25% 胰酶消化液消化传代或按浓度接种培养瓶培养板,实验细胞均处于对数生长期。

**1.3 主要药品与试剂** LPS 购自美国 Sigma 公司;丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(aspartateaminotransferase, AST)测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所;RIPA 裂解液(强)、非变性 PAGE 蛋白上样缓冲液(5X)、HRP-羊抗兔 IgG、HRP-羊抗小鼠 IgG、BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天生物技术研究所;ECL 发光试剂盒购自美国 Thermo 公司;肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、Kv1.3、诱生型一氧化氮合

2016-02-22 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81273526,81473268,81500473);安徽省科技攻关计划项目(编号:1301042212);安徽省自然科学基金(编号:1308085MH145)

作者单位:安徽医科大学<sup>1</sup>药学院、<sup>2</sup>肝病研究所、<sup>3</sup>安徽省创新药物产业共性研究院,合肥 230032

作者简介:周群,男,硕士研究生;

李俊,男,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: lj@ahmu.edu.cn

**Conclusion** CP-25 play important roles in immune regulation in AA rats through reducing the expression of BAF-1 and TRAF2 in spleen.

**Key words** rheumatoid arthritis; adjuvant-induced arthritis; CP-25; BAFF; BAFFR; TRAF2