

PU.1 抑制剂对 MRL/lpr 小鼠免疫功能的作用

郭婷婷¹,徐 诺¹,王 康¹,李 颖¹,魏 伟¹,严尚学^{1,2}

(¹ 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,安徽省抗炎免疫药物协同创新中心,合肥 230032;² 安徽医科大学实验动物中心,合肥 230032)

摘要 目的 探讨 PU.1 抑制剂 DB2313 对 MRL/lpr 小鼠免疫功能的影响及可能机制。方法 30 只 MRL/lpr 狼疮小鼠随机均分为 3 组:Model 组、PU.1 抑制剂 DB2313 组(17 mg/kg)和阳性对照药泰它西普(TACI-Ig)组(7.5 mg/kg),另设 10 只 BALB/c 小鼠为 Normal 组。DB2313 组腹腔注射用药,每周 3 次;TACI-Ig 组隔日皮下注射用药,均给药 5 周。Normal 组、Model 组腹腔注射等量的生理盐水。给药结束后,眶静脉取血并脱臼处死小鼠,称量胸腺、脾脏质量,计算胸腺指数和脾脏指数;流式细胞仪检测小鼠脾脏 T 淋巴细胞亚群比例;ELISA 法检测血清中抗核抗体(ANA)水平和抗双链 DNA 抗体水平;CBA 法检测炎症细胞因子白细胞介素(IL-6)、肿瘤坏死因子(TNF- α)、干扰素(IFN- γ)水平;HE 染色观察小鼠脾脏病理情况;免疫组化检测脾脏组织中的 PU.1、IL-9 表达水平;Western blot 法检测脾脏组织中的 PU.1 蛋白表达水平。结果 DB2313 给药可明显改善 MRL/lpr 小鼠脾脏病变,降低抗 ds-DNA、ANA、TNF- α 、IL-6、IFN- γ 水平;降低小鼠脾脏中总 T 细胞、TFH 细胞、Th17 细胞、Th9 细胞比例,升高 Treg 细胞比例;降低脾脏 PU.1 蛋白水平。免疫组化结果显示,DB2313 治疗可明显降低脾脏组织中 PU.1 和 IL-9 的表达。结论 PU.1 抑制剂 DB2313 可改善 MRL/lpr 小鼠的脾脏病变,延缓病情进展,其机制与调节免疫细胞功能有关。

关键词 系统性红斑狼疮;PU.1 抑制剂;TACI-Ig;PU.1;MRL/lpr 小鼠;免疫功能

中图分类号 R 593.24 + 1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)08-1498-08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.08.019

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种以自身抗体与自身抗原结合形成免疫复合物为特征,沉积在皮下、肾脏等部位,引起全身多器官损害的复杂性自身免疫性疾病^[1]。PU.1 由 Spi-1 基因编码,作为 E26 转化特异性家族的转录因子成员,参与调控多种免疫细胞的功能^[2]。近年来,研究人员发现转录因子 PU.1 在多种自身免疫性疾病中也发挥着重要作用,如类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)、系统性红斑狼疮(SLE)等^[3]。SLE 患者 PBMC 中 CD4⁺PU.1⁺T 细胞的比例增加,有研究^[4]首次评估了 PU.1 在 SLE 患者 CD4⁺T 细胞中的表达模式。提示 PU.1 可能成为 SLE 治疗的一个重要靶点。

MRL/lpr 小鼠淋巴细胞异常增生,淋巴结肿大,

其体内抗双链 DNA 和 ANA 的水平显著提升,这与临床 SLE 患者疾病特征颇为相似,因此,常被用作研究 SLE 的动物模型^[5]。基于此,该实验拟深入探究 PU.1 在 MRL/lpr 小鼠免疫病理中的作用,并评价 PU.1 抑制剂 DB2313 对 MRL/lpr 小鼠的免疫功能的作用,为 PU.1 作为治疗 SLE 的潜在治疗靶点提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF 级雌性 MRL/lpr 小鼠 30 只,8 周龄,体质量(30 $\pm$ 5)g;SPF 级雌性 BALB/c 小鼠 10 只,8 周龄,体质量(21 $\pm$ 2)g,均购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,合格证号 SCXK(京)2019-0010。该实验已通过安徽医科大学临床药理研究所动物实验伦理审查委员会批准(批号:PZ-2023-003)。

1.2 主要试剂 PU.1 抑制剂 DB2313(HY-124629)购自上海皓元生物医药技术有限公司;注射用泰它西普(TACI-Ig)购自荣昌生物制药(烟台)股份有限公司;抗小鼠 CD4 抗体(货号:561833)、抗小鼠 IL-17A 抗体(货号:560224)、抗小鼠 PD-1 抗体

2025-05-10 接收

基金项目:安徽省高校自然科学研究重大项目(编号:KJ2020ZD15)

作者简介:郭婷婷,女,硕士研究生;

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

严尚学,男,研究员,硕士生导师,通信作者,E-mail: yan-shx@163.com

(货号:562584)、抗小鼠 CXCR5 抗体(货号:560617)、抗小鼠 CD25 抗体(货号:561065)、抗小鼠 FOXP3 抗体(货号:560402)、抗小鼠 CD3 抗体(货号:557596)、BD cytometric bead array(CBA) Mouse Th1/Th2/Th7 Cytokine Kit 试剂盒(货号:560485)均购自美国 BD 公司;anti-dsDNA 酶联免疫吸附试验 ELISA 试剂盒(货号:CSB-E11194m)购自武汉华美生物有限公司;ANA ELISA 试剂盒(货号:5210)购自美国 Alpha Diagnostic International 公司; β -actin 抗体(货号:T0022)购自美国 Affinity Biosciences 公司;PU.1 抗体(货号:ab230336)购自美国 Abcam 公司;IL-9 抗体(货号:66144-1-Ig)购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 实验分组及给药 30 只 MRL/lpr 小鼠随机均分为 3 组:Model 组、PU.1 抑制剂 DB2313 组和阳性对照药泰它西普(TACI-Ig)组,另取 10 只 BALB/c 小鼠为 Normal 组。动物饲养在 SPF 级动物实验室,提供标准的饮食和饮水条件,每周采用尿蛋白试纸测量小鼠的尿蛋白水平,当尿蛋白含量大于 300 mg/mL 尿液时开始给药,DB2313 组采用腹腔注射,每周 3 次,剂量为 17 mg/kg;TACI-Ig 组采用皮下注射,隔日给药,剂量为 7.5 mg/kg,Normal 组和 Model 组均腹腔注射等量的生理盐水,连续给药 5 周。

1.3.2 胸腺指数和脾脏指数的测定 称量小鼠体重,脱颈处死小鼠。在无菌条件下,取出小鼠胸腺和脾脏,分别称重与记录。根据所得数据,计算出胸腺指数与脾脏指数。

1.3.3 组织病理学检查 取出小鼠脾脏,置于含有 4% 多聚甲醛的溶液中,于室温环境下固定 24 h。采用石蜡对固定后的脾脏进行包埋处理,并切片。HE 染色后利用玻片扫描仪扫描切片,细致观察并分析其病理改变情况。

1.3.4 流式细胞术检测 T 细胞亚群比例 制备小鼠脾细胞悬液,调节至适宜浓度。先加入表面抗体 anti-mouse APC-Cy7-CD3、anti-mouse FITC-CD4,4 °C 孵育 30 min,固定破膜后再加入胞内抗体 anti-mouse APC-IL-17A、anti-mouse BV421-PD-1、anti-mouse PE-CY7-CXCR5、anti-mouse PE-CD25、anti-mouse APC-FOXP3、anti-mouse PE-IL-9,4 °C 孵育 30 min,上机检测相对应的总 T($CD3^+T$)、TFH($CD4^+CXCR5^+PD-1^+$)、Th17($CD4^+IL-17A^+$)、Treg($CD4^+CD25^+Foxp3^+$)、Th9($CD4^+IL-9^+$)细胞亚群比例。

1.3.5 ELISA 法检测血清中自身抗体水平 按照

ELISA 试剂盒说明书检测小鼠血清中抗双链 DNA 和 ANA 抗体水平。

1.3.6 Th1、Th2、Th17 细胞因子检测 采用 BD Cytometric Bead Array(CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 试剂盒检测相关的细胞因子,如白细胞介素(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)、干扰素(interferon- γ , IFN- γ),按照 CBA 试剂盒说明书进行实验操作。

1.3.7 免疫组织化学检测 PU.1、IL-9 在脾脏组织中的表达水平 脾脏组织包埋处理后切片,在 60 °C 的烘箱中烘烤直至蜡块完全融化。将切片置于二甲苯、无水乙醇、95%乙醇、85%乙醇、75%乙醇中,进行脱蜡和水化;使用 Triton X-100 进行通透处理,室温孵育 30 min;使用柠檬酸盐溶液进行热修复;滴加内源性过氧化物酶阻断剂,室温孵育 10 min;使用 5% 山羊血清进行封闭,孵育 15 min;同时滴加一抗 PU.1 抗体(1:400)和 IL-9 抗体(1:200),置于 4 °C 冰箱孵育过夜。次日,将切片复温 30 min,用 PBS 溶液冲洗;加入一抗增强液孵育 30 min,加入二抗室温孵育 30 min;DAB 染色 3 min;用苏木精复染后梯度乙醇脱水,中性树胶封片,玻片扫描仪扫描观察结果。

1.3.8 Western blot 检测脾脏组织中 PU.1 的表达水平 去除小鼠脾脏的多余脂肪组织,加入组织裂解液 RIPA、磷酸酶抑制剂 I 和 II 及 PMSF,研磨仪中充分研磨,冰上裂解 30 min 后,静置 5~10 min,高速离心取上清液,加入上样缓冲液变性后备用;电泳、转膜,快速封闭液室温封闭 15 min;分别加入一抗 PU.1(1:1 000)、 β -Actin(1:1 000),4 °C 孵育过夜;次日后加入二抗(兔抗,1:10 000)室温孵育 2 h;洗膜,显影。采用 ImageJ 软件进行灰度值检测并进行统计分析。

1.4 统计学处理 使用 GraphPad(9.0 版)进行统计分析。数值结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间采用独立样本 t 检验,多组间均数比较采用 ANOVA 单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DB2313 给药对 MRL/lpr 小鼠胸腺指数和脾脏指数的影响 与 Normal 组小鼠相比,Model 组小鼠的胸腺与脾脏体积呈现出显著的增大趋势。如图 1 所示,MRL/lpr 小鼠的胸腺指数及脾脏指数均呈现出明显上升($P < 0.01$);而通过 DB2313 给药以及 TACI-Ig 给药,均能有效地降低 MRL/lpr 小鼠体内

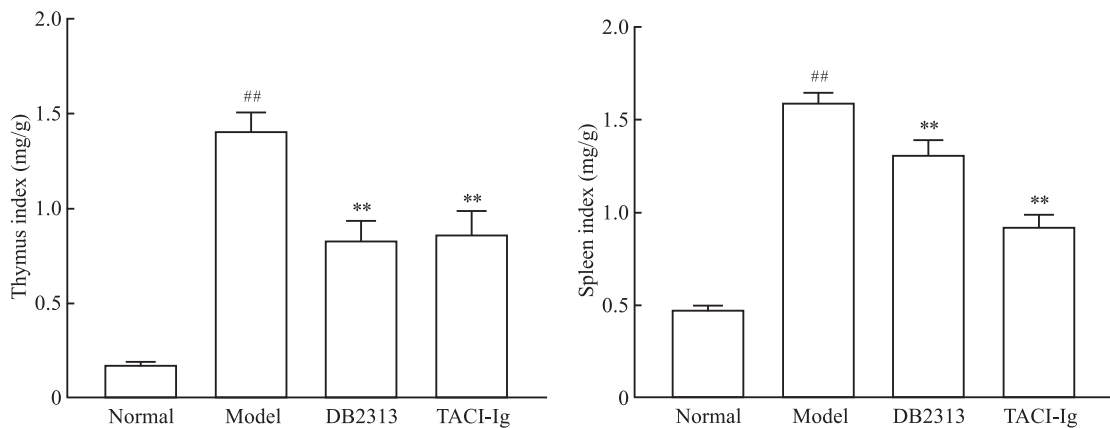


图1 DB2313 给药对 MRL/lpr 小鼠胸腺指数和脾脏指数的影响

Fig. 1 The effects of DB2313 administration on thymus index and spleen index in MRL/lpr mice

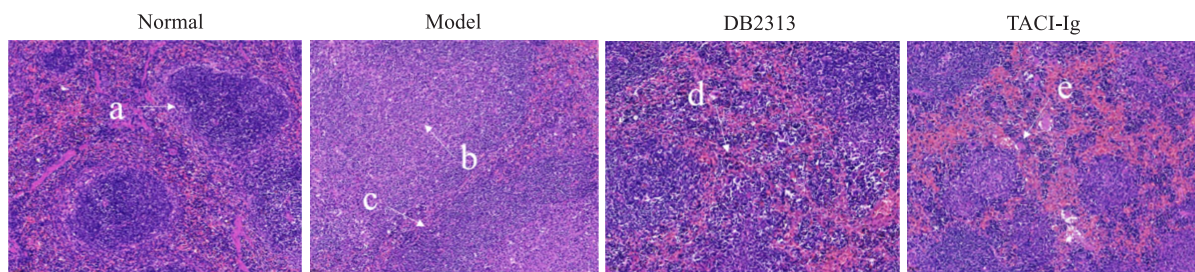
$P < 0.01$ vs Normal group; * $P < 0.01$ vs Model group.

图2 DB2313 给药对 MRL/lpr 小鼠脾脏组织病理学的影响 HE × 200

Fig. 2 The effects of DB2313 administration on spleen histopathology in MRL/lpr mice HE × 200

异常升高的胸腺指数和脾脏指数,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.2 DB2313 给药对 MRL/lpr 小鼠脾脏组织病理学的影响 图2结果显示,Normal 组小鼠脾脏结构清晰(a)、大小正常,Model 组小鼠脾脏白髓弥漫性增生(b),淋巴滤泡显著增生,生发中心数量明显增多,红髓白髓边界模糊(c)。DB2313 给药组能明显减轻小鼠脾脏病变,抑制淋巴滤泡增生和白髓增生,减少生发中心的形成(d)。TACI-Ig 治疗也可明显改善小鼠脾脏病理(e)。

2.3 DB2313 给药对 MRL/lpr 小鼠脾脏 T 淋巴细胞亚群的影响 流式细胞术检测结果如图3所示,相比正常小鼠,MRL/lpr 小鼠的总 T 细胞、TFH 细胞、Th17 细胞及 Th9 细胞亚群的比例均显著上升,而经过 DB2313 药物治疗后,这些细胞亚群的比例出现了明显下降($P < 0.05$)。同时,MRL/lpr 小鼠脾脏中的 Treg 细胞百分比相较于正常小鼠显著降低($P < 0.01$),DB2313 给药后,Treg 细胞亚群的比例有了明显提升($P < 0.01$),且差异有统计学意义。

2.4 DB2313 给药对 MRL/lpr 小鼠 anti-dsDNA

(IgG)、ANA、IFN- γ 、TNF- α 、IL-6 的影响 MRL/lpr 狼疮小鼠血清中的 anti-dsDNA 与 ANA 自身抗体水平显著上升,而 DB2313 给药后能有效抑制 MRL/lpr 小鼠血清中 anti-dsDNA 与 ANA 的升高趋势($P < 0.05$)。利用 CBA 技术测定血清炎症因子水平显示,MRL/lpr 小鼠血清中的 TNF- α 、IL-6 及 IFN- γ 水平相较 BALB/c 小鼠显著升高;DB2313 给药能明显下调 MRL/lpr 小鼠血清中的 TNF- α ($P < 0.01$)、IL-6 ($P < 0.05$) 及 IFN- γ ($P < 0.05$) 水平,且差异有统计学意义。见表1。

2.5 DB2313 给药对 MRL/lpr 小鼠脾脏组织中的 PU.1、IL-9 表达的影响 免疫组织化学染色以进一步确认 PU.1 和 IL-9 在脾脏组织中的表达情况。免疫组化结果显示,4 组脾脏组织中 PU.1、IL-9 的表达水平差异有统计学意义。与 Normal 组相比,Model 组 PU.1 和 IL-9 蛋白表达水平明显升高($P < 0.01$)。与 Model 组相比,DB2313 给药可降低 PU.1 和 IL-9 的表达($P < 0.01$)。见图4。

2.6 DB2313 给药对 MRL/lpr 小鼠脾脏中 PU.1 的蛋白表达的影响 给药结束后,取 MRL/lpr 小鼠脾脏组织,Western blot 检测 PU.1 蛋白水平。实验

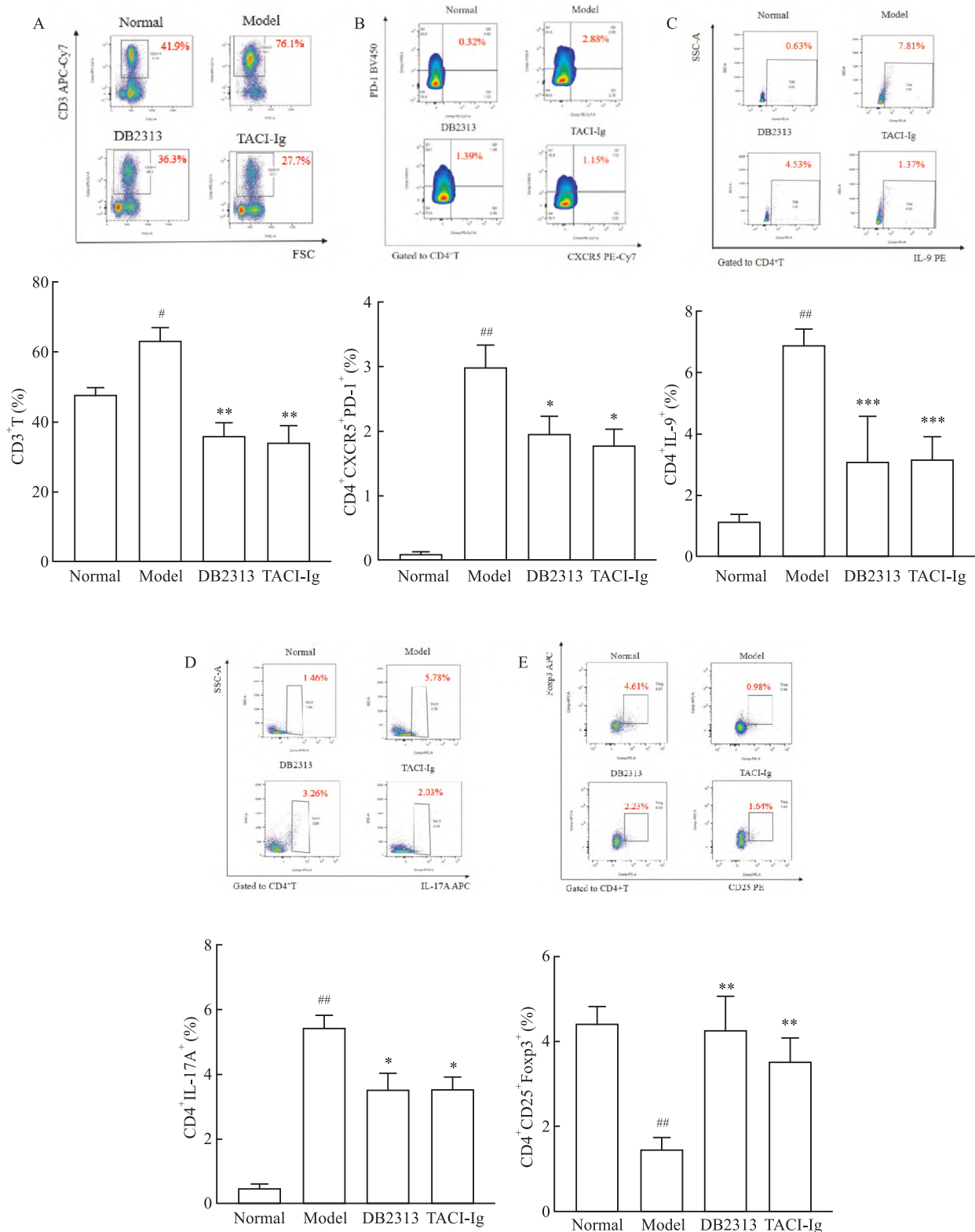


图3 DB2313给药对MRL/lpr小鼠脾脏T淋巴细胞亚群的影响

Fig. 3 The effects of DB2313 administration on T lymphocyte subsets in the spleen of MRL/lpr mice

A: CD3⁺ T cells; B: TFH cells; C: Th9 cells; D: Th17 cells; E: Treg cells; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs Normal group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Model group.

表1 小鼠血清中 anti-dsDNA、ANA、TNF- α 、IL-6、IFN- γ 水平 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
 Tab.1 Levels of anti-dsDNA, ANA, TNF- α , IL-6, IFN- γ in the serum of mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Group	Anti-dsDNA (ng/mL)	ANA (U/L)	TNF- α (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	IFN- γ (pg/mL)
Normal	13.4 $\pm$ 6.1	2.50 $\pm$ 1.06	118.0 $\pm$ 6.6	8.32 $\pm$ 1.82	0.5 $\pm$ 0.3
Model	158.1 $\pm$ 32.5 ^{##}	18.78 $\pm$ 5.42 ^{##}	173.8 $\pm$ 15.8 ^{##}	17.99 $\pm$ 5.37 [#]	5.4 $\pm$ 2.2 ^{##}
DB2313	83.9 $\pm$ 25.1 [*]	11.90 $\pm$ 2.92 [*]	112.8 $\pm$ 32.0 [*]	8.50 $\pm$ 1.33 [*]	2.0 $\pm$ 0.8 [*]
TACI-Ig	90.5 $\pm$ 19.9 [*]	10.95 $\pm$ 2.09 [*]	80.5 $\pm$ 23.5 [*]	10.26 $\pm$ 1.56 [*]	2.5 $\pm$ 1.3 [*]
<i>F</i> value	20.50	24.64	24.30	7.91	10.00
<i>P</i> value	0.000 2	<0.000 1	<0.000 1	0.002 9	0.000 6

[#]*P* < 0.05, ^{##}*P* < 0.01 vs Normal group; ^{*}*P* < 0.05, ^{**}*P* < 0.01 vs Model group

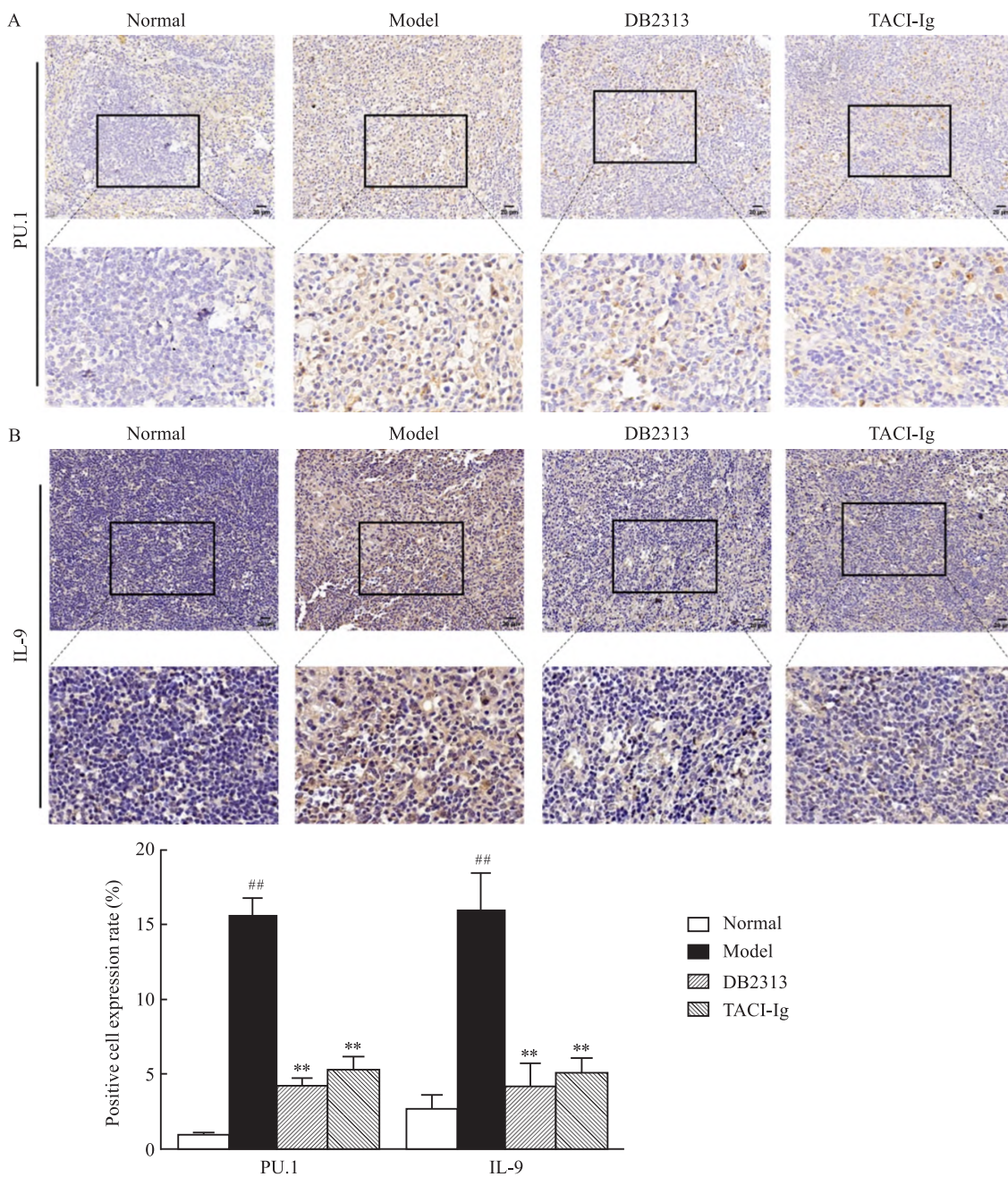


图4 DB2313 给药对 MRL/lpr 小鼠脾脏组织中的 PU.1 (A)、IL-9 (B) 表达的影响 ×40

Fig. 4 The effects of DB2313 administration on PU.1 (A) and IL-9 (B) expression in spleen tissue of MRL/lpr mice ×40

^{##}*P* < 0.01 vs Normal group; ^{*}*P* < 0.01 vs Model group.

结果显示,DB2313 给药组可下调小鼠脾脏 PU.1 水平;TACI-Ig 给药组也可抑制 PU.1 水平。见图 5。

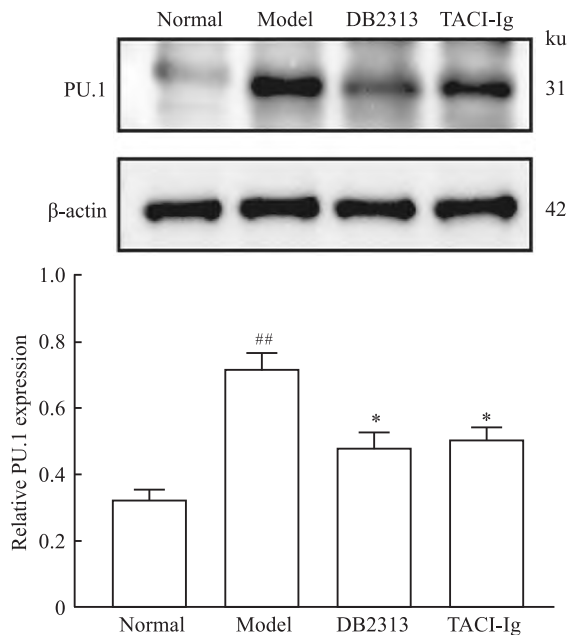


图 5 DB2313 给药对 MRL/lpr 小鼠脾脏中 PU.1 的蛋白表达的影响

Fig. 5 The effects of DB2313 administration on protein expression of PU.1 in spleens of MRL/lpr mice

^{##} $P < 0.01$ vs Normal group; ^{*} $P < 0.05$ vs Model group.

3 讨论

SLE 临床表现复杂多样,异质性强,其中几乎所有器官系统,包括皮肤、肾脏、脑、心脏和关节都受损,大多数 SLE 患者会出严重甚至危及生命的并发症^[6]。然而 SLE 的确切机制尚未完全阐明,目前治疗 SLE 的药物和手段仍有限,因此探究更多新的 SLE 治疗靶点,是 SLE 未来的主要研究方向^[7]。

PU.1 是成红细胞转化特异性 (erythroblast transformation-specific, EST) 家族的转录因子,在各种免疫细胞 (如 T 细胞和树突状细胞) 的发育和分化以及艾滋病中发挥着重要作用^[8]。PU.1 在多种疾病中表达异常,那么靶向抑制 PU.1 是否可以阻断系统性红斑狼疮疾病的发展。DB2313 作为潜在的药物,是一种小分子化合物,能够抑制 PU.1 与其靶基因的結合,从而影响 PU.1 的下游转录因子活性。前期研究^[9]表明,PU.1 可通过调控 FLT3 参与 RA 的发病过程,其抑制剂 DB2313 在鼠 CAIA 和 CIA 两种关节炎模型中均有显著疗效。该研究中, DB2313 给药能明显减小 MRL/lpr 小鼠的脾脏与胸

腺体积,同时降低其异常升高的胸腺指数及脾脏指数,并有效减少生发中心的形成。表明 PU.1 抑制剂 DB2313 可显著改善 MRL/lpr 小鼠的脾脏病变。

在 SLE 发病过程中,免疫系统的异常反应尤为显著^[5]。在本实验中,MRL/lpr 小鼠脾脏中 T 细胞亚群紊乱,总 T 细胞、TFH 细胞和 Th17 细胞亚群比例显著增加,而 DB2313 给药可明显降低这些细胞亚群比例,升高 MRL/lpr 小鼠减少的 Treg 细胞亚群比例;然而,PU.1 在 SLE 发病中的功能尚不明确,而 PU.1 在 Th9 细胞中的作用近来在炎症及肿瘤等疾病中已逐渐受到关注^[10]。已有文献^[11]证明 PU.1 能够与 IL-9 启动子区直接结合,并促进 Th9 细胞的分化。此外,与健康对照组相比,SLE 患者的外周血中 IL-9 及其 mRNA 水平均显著上升,同时 CD4⁺IL-9⁺ T 细胞 (即 Th9 细胞) 的比例也有所增加。血清 IL-9 浓度与 Th9 细胞百分比均与 SLE 疾病活动指数呈正相关。采用甲基强的松龙进行治疗后,能够有效降低 Th9 细胞的比例及血清 IL-9 水平^[12]。这意味着 IL-9 和 Th9 水平升高可能引发 SLE 的炎症过程。在本研究中,DB2313 给药可显著下调 MRL/lpr 小鼠 Th9 细胞比例,并降低脾脏组织中 PU.1 和 IL-9 的表达及 PU.1 蛋白表达水平。提示 PU.1 抑制剂 DB2313 治疗 SLE 可能的机制与抑制 PU.1 介导的 Th9 分化有关。

与此同时,MRL/lpr 小鼠中 Fas 基因的缺失阻断了 TFH 细胞通过 Fas-FasL 信号通路诱导的 B 细胞凋亡过程,进而促使 B 细胞异常活化,并向浆细胞分化^[13]。该研究中,MRL/lpr 小鼠血清中 TNF- α 、IFN- γ 、IL-6 炎症细胞因子水平和 anti-dsDNA、ANA 自身抗体水平表达明显升高,DB2313 给药后其水平显著下降,提示 DB2313 可能通过调控 T 细胞亚群比例和功能,从而减轻炎症反应。此外,SLE 的疾病活动阶段,特征性的自身抗体包括抗 anti-dsDNA 和 ANA。SLE 的发病机制中,伴随着 B 细胞向浆细胞的分化过程加剧,同时观察到 B 细胞总数的减少。这一变化与 SLE 活动期的 B 细胞亚群失衡现象密切相关,具体表现为 CD19⁺ B 细胞的比例有所下降,而浆细胞的数量则呈现上升趋势^[13]。

综上所述,PU.1 抑制剂 DB2313 可明显改善 MRL/lpr 小鼠的脾脏病变,提示 PU.1 可能是 SLE 的治疗靶点,其机制可能与抑制 PU.1 介导的 Th9 分化有关。

参考文献

[1] Ali A, Sayyed Z, Ameer M A, et al. Retraction: systemic lupus

- erythematosus: an overview of the disease pathology and its management[J]. *Cureus*, 2019, 11(4): r13. doi:10.7759/cureus.r13.
- [2] Li G, Hao W, Hu W. Transcription factor PU.1 and immune cell differentiation (Review) [J]. *Int J Mol Med*, 2020, 46(6): 1943–50. doi:10.3892/ijmm.2020.4763.
- [3] Fang Y, Chen W, Li Z, et al. The role of a key transcription factor PU.1 in autoimmune diseases[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1001201. doi:10.3389/fimmu.2022.1001201.
- [4] Xiang N, Fang X, Sun X G, et al. Expression profile of PU.1 in CD4 + T cells from patients with systemic lupus erythematosus[J]. *Clin Exp Med*, 2021, 21(4): 621–32. doi:10.1007/s10238-021-00717-9.
- [5] 黄李娜, 王盛付, 王 祥, 等. CP-25 抑制 Th17 细胞分化改善 MRL/lpr 狼疮小鼠肾损伤[J]. *中国药理学通报*, 2021, 37(7): 965–72.
- [5] Huang L N, Wang S F, Wang X, et al. CP-25 inhibits Th17 cell differentiation and improves kidney injury in MRL/lpr lupus mice [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2021, 37(7): 965–72.
- [6] 达古拉, 王 静, 王 勇, 等. miR-7 抑制剂治疗 MRL/lpr 小鼠的实验性研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2024, 40(4): 680–5. doi:10.3969/j.issn.1000-484X.2024.04.002
- [6] Da G L, Wang J, Wang Y, et al. Experimental study of miR-7 inhibitor treatment in MRL/lpr mice [J]. *Chin J Immunol*, 2024, 40(4): 680–5. doi:10.3969/j.issn.1000-484X.2024.04.002
- [7] Fanouriakis A, Tziolos N, Bertsias G, et al. Update on the diagnosis and management of systemic lupus erythematosus[J]. *Ann Rheum Dis*, 2021, 80(1): 14–25. doi:10.1136/annrheumdis-2020-218272.
- [8] Yang Y, Han X, Sun L, et al. ETS transcription factors in immune cells and immune-related diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(18): 10004. doi:10.3390/ijms251810004.
- [9] Tu J, Chen W, Fang Y, et al. PU.1 promotes development of rheumatoid arthritis via repressing FLT3 in macrophages and fibroblast-like synoviocytes[J]. *Ann Rheum Dis*, 2023, 82(2): 198–211. doi:10.1136/ard-2022-222708.
- [10] Angkasekwinai P, Dong C. IL-9-producing T cells: potential players in allergy and cancer[J]. *Nat Rev Immunol*, 2021, 21(1): 37–48. doi:10.1038/s41577-020-0396-0.
- [11] Tu J, Chen W, Huang W, et al. Positive feedback loop PU.1-IL9 in Th9 promotes rheumatoid arthritis development [J]. *Ann Rheum Dis*, 2024, 83(12): 1707–21. doi:10.1136/ard-2024-226067.
- [12] Ouyang H, Shi Y, Liu Z, et al. Increased interleukin-9 and CD4 + IL-9 + T cells in patients with systemic lupus erythematosus [J]. *Mol Med Rep*, 2013, 7(3): 1031–7. doi:10.3892/mmr.2013.1258.
- [13] 江 丽, 黄李娜, 王盛付, 等. MRL/lpr 小鼠 B 淋巴细胞活化的免疫病理特征[J]. *安徽医科大学学报*, 2020, 55(4): 487–91. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.04.001.
- [13] Jiang L, Huang L N, Wang S F, et al. Immunopathological characteristics of B lymphocyte activation in MRL/lpr mice [J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2020, 55(4): 487–91. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.04.001.

The effect of PU.1 inhibitors on the immune function of MRL/lpr mice

Guo Tingting¹, Xu Nuo¹, Wang Kang¹, Li Ying¹, Wei Wei¹, Yan Shangxue^{1,2}

(¹*Institute of Clinical Pharmacology, Key Laboratory of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Ministry of Education, Anhui Collaborative Innovation Center of Anti-inflammatory and Immuno Drugs, Anhui Medical University, Hefei 230032;* ²*Experimental Animal Center, Anhui Medical University, Hefei 230032)*

Abstract Objective To explore the impacts and fundamental mechanisms of the PU.1 inhibitor DB2313 on the immune function in MRL/lpr mice. **Methods** A total of thirty MRL/lpr lupus mice were randomly distributed into three separate groups: the model control group, the PU.1 inhibitor DB2313 treatment group (administered at a dose of 17 mg/kg), and the positive drug control Telitacicept (TACI-Ig) group (administered at a dose of 7.5 mg/kg). Furthermore, a group of ten BALB/c mice were assigned as the normal group. The DB2313 administration group was treated with intraperitoneal injections of the drug on three occasions per week, while the TACI-Ig group received subcutaneous injections every second day; both treatment protocols were maintained for a duration of five weeks. Both the control group and the model group were administered intraperitoneal injections of a volume of saline that was equivalent across groups. After the drug was given, mice were sacrificed by dislocation after orbital vein blood collection. The thymus and spleen were aseptically excised, individually weighed, and subsequently utilized to compute the thymus index and spleen index. The relative distribution of T lymphocyte subsets within the spleen was ascertained through flow cytometry. Serum concentrations of anti-nuclear antibodies (ANA) and anti-double-stranded DNA antibodies were quantified using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The levels of inflammatory factors interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ) were meas-

ured by CBA method. Hematoxylin and eosin (HE) staining was employed to examine pathological alterations in the spleen. The expression of PU.1 and IL-9 in spleen tissue was detected using immunohistochemistry. Additionally, the expression level of PU.1 protein in the spleen tissue was ascertained through Western blot analysis. **Results** The administration of DB2313 significantly ameliorated spleen lesions in MRL/lpr mice and decreased the levels of anti-ds-DNA, ANA, TNF- α , IL-6, and IFN- γ . It also reduced the proportion of total T cells, TFH cells, Th17 cells, and Th9 cells in the mouse spleen, while increasing the proportion of Treg cells. Furthermore, it lowered the level of PU.1 protein in the spleen. Immunohistochemistry results demonstrated that DB2313 treatment significantly diminished the expression of PU.1 and IL-9 in spleen tissue. **Conclusion** The PU.1 inhibitor DB2313 can improve spleen lesions in MRL/lpr mice and slow the progression of the disease, and its mechanism is related to the regulation of immune cell functions.

Key words systemic lupus erythematosus; PU.1 inhibitor; TACI-Ig; PU.1; MRL/lpr mice; immune function

Fund program Natural Science Research Project of Anhui Educational Committee (No. KJ2020ZD15)

Corresponding authors Wei Wei, E-mail: wwei@ahmu.edu.cn; Yan Shangxue, E-mail: yan-shx@163.com

(上接第 1497 页)

Benvitimod attenuates atopic dermatitis by regulating the NRF2/ROS/NLRP3 signaling pathway

Lu Yun^{1,2}, Dong Liping^{1,2}, Huang Maoxin^{1,2}, Wang Yu^{1,2}, Deng Tingyue^{1,2}, Xiao Fengli^{1,2,3}

(¹Dept of Dermatology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Institute of Dermatology, Key Laboratory of Dermatology, Anhui Medical University, Ministry of Education, Hefei 230032; ³Inflammation and Immune Mediated Diseases Laboratory of Anhui Province, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the mechanism of action of benvitimod (BVM) in the treatment of atopic dermatitis (AD). **Methods** HaCaT cells were stimulated by TNF- α and IFN- γ , and the cells were grouped into NC group, TNF- α /IFN- γ group, TNF- α /IFN- γ BVM group, and TNF- α /IFN- γ BVM ML385 group. The AD model of DNCB-induced Balb/c mice was divided into CON group, DNCB group, DNCB + BVM group, and DNCB + TAC group. The efficacy of BVM and its roles in antioxidant and pyroptosis regulation were evaluated. **Results** Compared with the control group, BVM inhibited the inflammatory response of HaCaT cells stimulated by TNF- α and IFN- γ , and ameliorated the skin lesions and inflammation in the DNCB-induced AD mouse model; at the same time, it significantly increased the expression of nuclearfactorerythroid-2-relatedfactor2 (NRF2)-related anti-oxidative stress proteins, and significantly reduced the expression of cellular reactive oxygen species (ROS) levels and pyroptosis proteins. At the same time, the levels of NRF2-related anti-oxidative stress proteins significantly increased, and the levels of ROS and pyroptosis proteins significantly decreased. **Conclusion** BVM activates the NRF2/ROS/NLRP3 pathway to inhibit pyroptosis, thereby reducing the inflammatory response in AD.

Key words benvitimod; atopic dermatitis; pyroptosis; NLRP3; NRF2; ROS

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 82373481); Natural Science Research Project of Anhui Educational Committee (No. 2023AH053302)

Corresponding author Xiao Fengli, E-mail: xiaofengli@126.com