

托法替布对 EAE 大鼠的疗效观察及机制探讨

李玲, 李作孝

(西南医科大学附属医院 神经内科, 泸州 646000)

摘要: 为观察托法替布对 EAE 大鼠的疗效, 探讨相关机制, 揭示托法替布对 EAE 大鼠的防治作用, 将 50 只 Wistar 大鼠分为正常对照组, EAE 对照组, 小、中、大剂量托法替布组, 10 只/组。用豚鼠脊髓匀浆制备抗原诱导 EAE 模型。自造模之日起 EAE 对照组及小、中、大剂量托法替布组分别以生理盐水和托法替布 1、2、4 mg/(kg·d)灌胃, 连续 10 d。于发病高峰期行神经功能障碍评分(neurological dysfunction score, NDS)并处死大鼠, 留取血清及脑组织。采用 ELISA 测定血清 IL-21 及 IL-10 水平; 苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色观察脑组织病理改变; 免疫组化法检测脑白质脱髓鞘及星形胶质细胞活化情况。结果显示, 正常对照组均未发病, EAE 对照组出现精神萎靡、肢体瘫痪甚至死亡; 各剂量托法替布组大鼠 NDS、血清 IL-21 水平、脑组织炎性细胞浸润程度及抗胶质原纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)抗体阳性细胞平均光密度(D)均降低($P < 0.05$), 而 IL-10 水平及髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein, MBP)染色阳性表达平均 D 则升高($P < 0.05$), 且均呈剂量依赖关系。提示托法替布对 EAE 大鼠具有治疗作用, 且呈剂量依赖关系, 可能的机制为托法替布通过降低 IL-21 水平、升高 IL-10 水平, 明显减轻脑组织炎性细胞浸润程度及脑白质脱髓鞘病变, 抑制脑组织内星形胶质细胞活化, 从而减轻 EAE 临床表现, 降低 NDS。

关键词: 托法替布; 实验性变态反应性脑脊髓炎; 自身免疫; 中枢神经系统; 炎症; 大鼠

中图分类号: R979.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-2478(2019)06-0470-06

多发性硬化(multiple sclerosis, MS)是中枢神经系统的自身免疫性疾病, 以白质炎性脱髓鞘为特点^[1]。EAE 与 MS 有类似的免疫应答及病理改变, 是公认研究 MS 的理想模型。有研究表明, MS 的发生与细胞内多条信号通路的异常有关, 而 Janus 激酶/信号转导及转录激活因子(janus kinase/signal transducer and activator of transcription, JAK/STAT)通路异常对 MS 发病有着重要作用^[2]。托法替布是一种新型 JAK 抑制剂, 其可通过阻断 JAK/STAT 通路抑制异常免疫反应。目前托法替布已批准为治疗 RA 的临床用药^[3], 除此之外, 它对其他多种免疫性疾病如炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)、银屑病、肾移植排斥反应等均显示了明显的治疗作用^[4-5], 但托法替布用于治疗 MS 的报道较少。为此, 本研究用托法替布干预 EAE 大鼠模型, 观察托法替布对 EAE 大鼠的疗效, 并探讨相关机制, 以期对托法

替布治疗 MS 奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要实验动物、药物与试剂 清洁级健康豚鼠(体质量 0.25~0.30 kg)10 只及雌性 Wistar 大鼠(体质量 0.20~0.25 kg)50 只, 均购于西南医科大学实验动物中心, 均为一级合格动物[生产许可证号: SCXK(川)2013-17], 饲养于西南医科大学附属医院动物实验中心(温度约为 24℃, 湿度约为 50%左右)。托法替布(美国辉瑞公司); 鼠抗髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein, MBP)抗体(1:200)(上海安研生物试剂销售公司); 兔抗胶质原纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)抗体(1:160)(上海雅吉生物科技有限公司); IL-21、IL-10 ELISA 试剂盒(上海桥社生物科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 免疫抗原的制备 用 100 mg/kg 苯巴比妥过量致死豚鼠后, 在无菌条件下迅速分离出脊髓, 除去脊髓, 称重后移入玻璃匀浆器, 与等量的 0℃生理盐水混合后研磨成 50%的全脊髓匀浆(whole spinal cord homogenate, WSCH)。将完全弗氏佐剂与 WSCH 等体积混合, 用玻璃注射器抽打至油

收稿日期: 2019-03-20

基金项目: 泸州市科技局项目(2018-RCM-60); 西南医科大学校级课题(2018-ZRQN-064)

作者简介: 李玲(1986-), 女, 硕士, 住院医师, 主要从事神经免疫学研究

通信作者: 李作孝(E-mail: lzx3235@sina.com)

包水乳状,以滴在水面5 min不散为合格抗原。

1.2.2 模型制备、动物分组及药物干预 将50只Wistar大鼠分为正常对照组,EAE对照组,小、中、大剂量托法替布组,10只/组。将制作的免疫抗原(0.2 mL/100 g)注入EAE对照组及各剂量托法替布组大鼠双侧后肢足掌皮下建立EAE模型,正常对照组注入无菌生理盐水与完全弗氏佐剂。建模当天及第2天,将百日咳素注入各组大鼠腹腔,0.2 mL/只,加强免疫反应。小、中、大剂量托法替布组自造模之日起连续10 d分别灌胃托法替布1、2和4 mg/(kg·d),而对照组均灌胃等量生理盐水。

1.2.3 模型动态观察及评价 由同一人按照Konó's评分标准^[6]对大鼠进行神经功能障碍评分(neurological dysfunction score, NDS)。于发病高峰期(症状连续3 d无加重、四肢全瘫或死亡)处死大鼠。

1.2.4 血清采集及IL-21、IL-10水平测定 处死大鼠后经下腔静脉取血5 mL,样本置于肝素抗凝管内,以111.9×g离心20 min,留取上清液用于检测血清IL-21、IL-10水平。采用ELISA(按说明书操作)对血清IL-21、IL-10水平进行测定。

1.2.5 神经病理组织的制备 在无菌条件下,用组织剪剖开大鼠头顶部皮肤,暴露枕骨大孔及顶骨,沿枕骨大孔用镊子去除颅盖骨,暴露脑组织,用PBS反复冲洗除去血迹后轻柔取出脑组织。将脑组织在4%多聚甲醛液中固定48 h后,分别给予70%、80%、95%酒精及无水酒精脱水,送西南医科大学附属医院病理科进行脑组织苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色及脑组织免疫组化法检查。

1.2.6 脑组织病理学观察 脑组织经甲醛固定、石蜡包埋、切片(厚度10 μm)、HE染色后,观察中枢神经系统中炎性细胞浸润程度。根据Okuda等标准^[7]进行评分:0分,无炎症改变;1分,浸润的炎性细胞限于血管周围和脑脊膜周围;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,脑实质内浸润的炎性细胞>100个/片。

1.2.7 脑组织中髓鞘脱失、星形胶质细胞活化情况检测 脑组织切片经过脱蜡、水化、封闭后逐次滴加抗MBP抗体及抗GFAP抗体,常规二氨基联苯胺

(3, 3'-diaminobenzidine, DAB)显色、复染、脱水、封片。用Nikon & Spot系统采集图像,测定MBP免疫组化阳性表达、GFAP阳性细胞的平均光密度(D)。

1.3 统计学处理 采用SPSS 20.0软件进行统计分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间样本均数比较采用 t 检验,当方差齐时多组计量资料均数比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠发病情况 正常对照组均未发病,EAE对照组出现精神萎靡、肢体瘫痪甚至死亡。与EAE对照组比较,各剂量托法替布组症状均明显减轻,发病高峰期NDS降低,且剂量越大,症状减轻越明显($P < 0.05$)。(图1)

2.2 各组大鼠血清IL-21、IL-10水平的变化 EAE对照组与正常对照组比较,IL-21水平明显升高,IL-10水平明显降低($P < 0.01$),而各剂量托法替布组较EAE对照组IL-21水平明显降低,IL-10水平明显升高($P < 0.01$)。(图2、图3)。

2.3 各组大鼠脑组织病理学变化 正常对照组脑组织无炎性细胞浸润,EAE对照组及各剂量托法替布组脑组织内可见大量炎性细胞,典型者呈“袖套”样改变。各剂量托法替布组炎性细胞浸润程度及病理评分均较EAE对照组轻,以大剂量托法替布组最明显,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。(图4、图5)

2.4 各组大鼠脑组织脱髓鞘情况 与正常对照组比较,EAE对照组、各剂量托法替布组脑组织中抗MBP抗体阳性表达平均 D 显著降低($P < 0.01$)。各剂量托法替布组脑组织抗MBP抗体阳性表达平均 D 较EAE对照组显著升高,呈剂量依赖关系($P < 0.01$)。(图6、图7)。

2.5 各组大鼠脑组织星形胶质细胞活化情况 正常对照组脑组织内无抗GFAP抗体阳性细胞表达,EAE对照组脑组织内弥漫分布活化的抗GFAP抗体阳性细胞。与EAE对照组比较,各剂量托法替布组脑组织抗GFAP抗体阳性细胞平均 D 显著减少,呈剂量依赖关系($P < 0.01$)。(图8、图9)

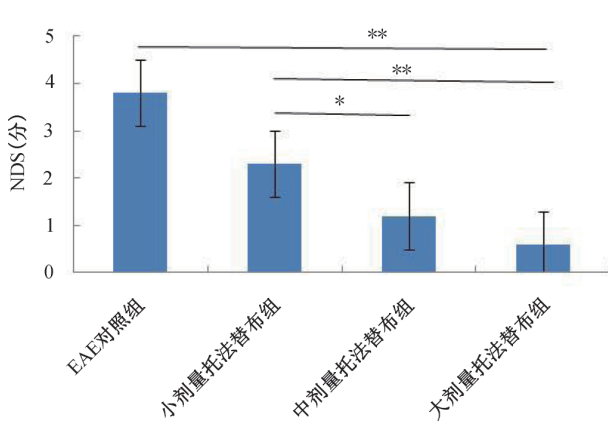


图1 各组大鼠发病高峰期 NDS 的比较

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

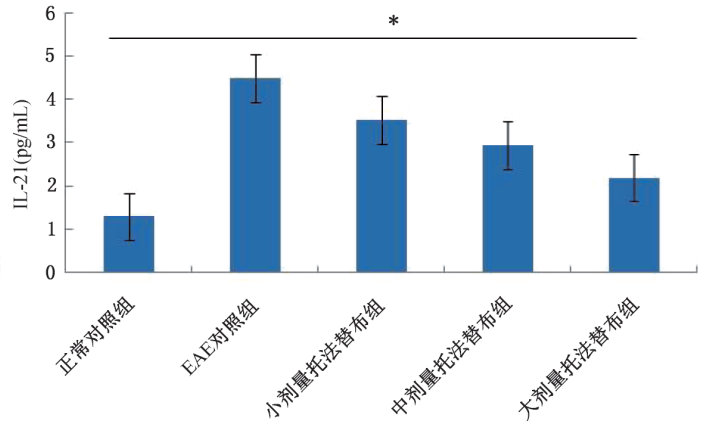


图2 各组大鼠血清 IL-21 水平的变化

注: * $P < 0.01$

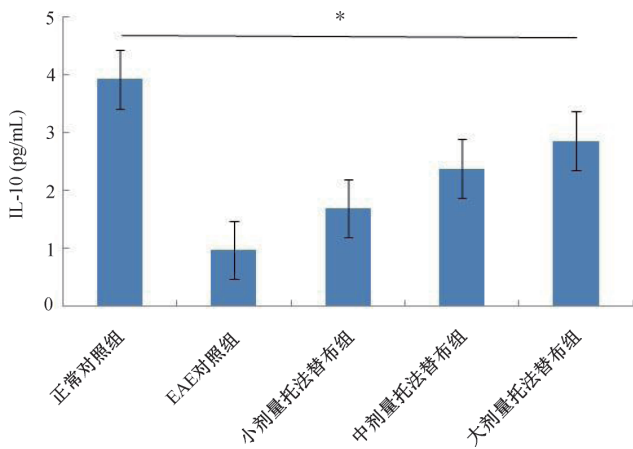


图3 各组大鼠血清 IL-10 水平的变化

注: * $P < 0.01$

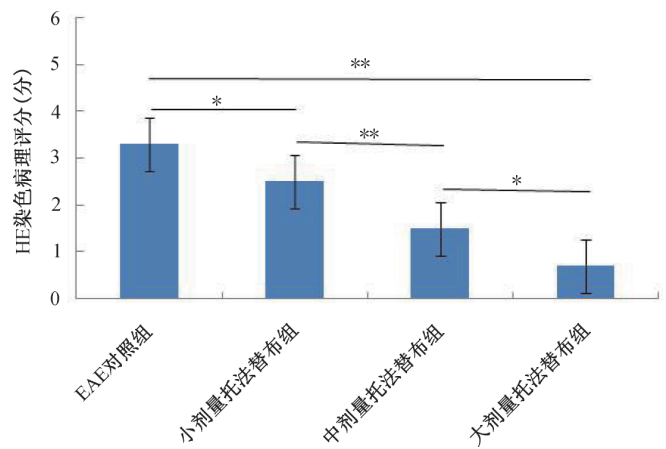


图4 各组大鼠 HE 染色病理评分的比较

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

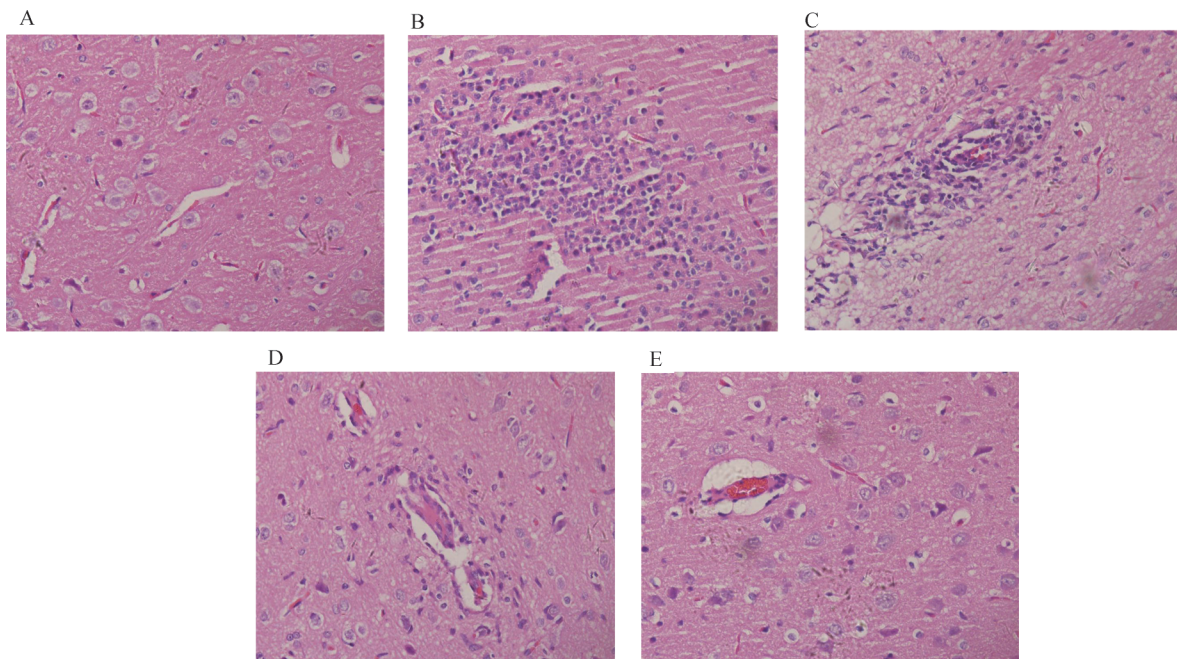


图5 各组大鼠脑组织 HE 染色结果 (×400)

注: A. 正常对照组; B. EAE 对照组; C. 小剂量托法替布组; D. 中剂量托法替布组; E. 大剂量托法替布组

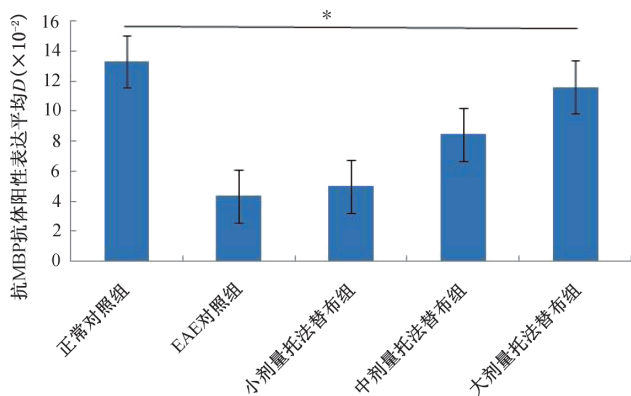


图6 各组大鼠脑组织抗MBP抗体阳性表达平均D的比较

注: * $P < 0.01$

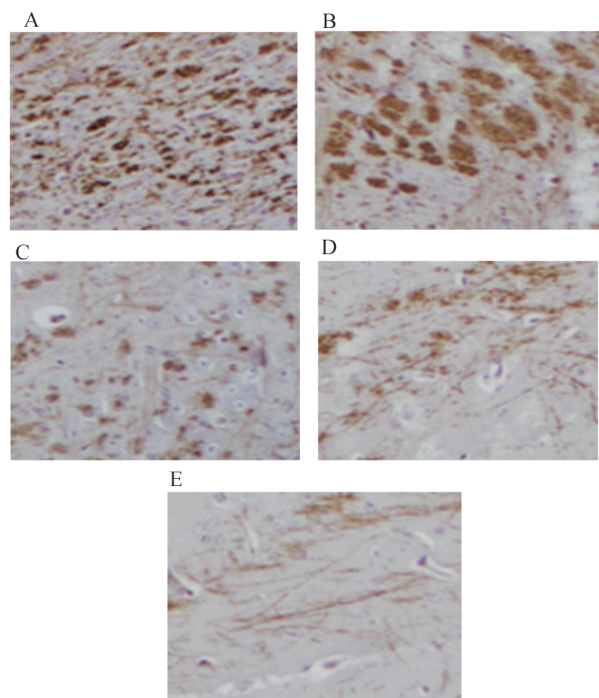


图7 各组大鼠脑组织髓鞘免疫组化结果(抗MBP抗体阳性表达, ×400)

注: A. 正常对照组; B. EAE对照组; C. 小剂量托法替布组; D. 中剂量托法替布组; E. 大剂量托法替布组

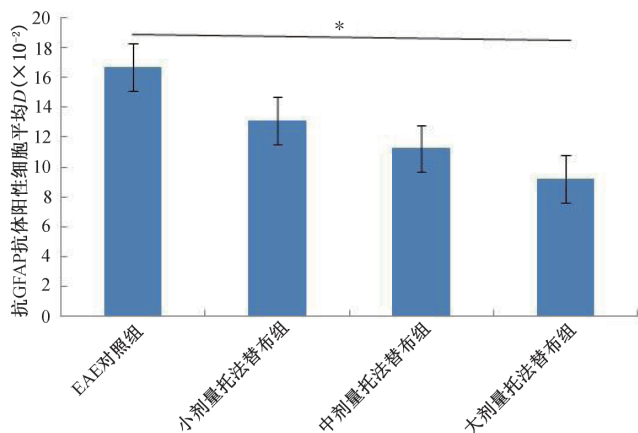


图8 各组大鼠脑组织抗GFAP抗体阳性细胞平均D的比较

注: * $P < 0.01$

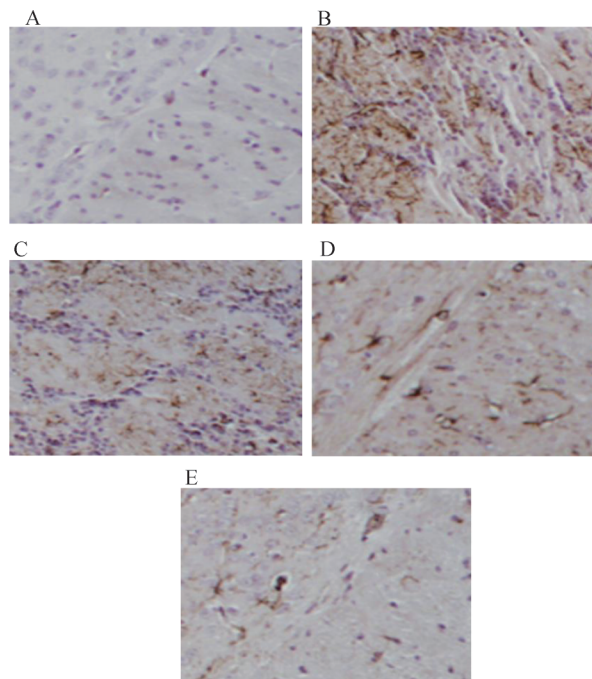


图9 各组大鼠脑组织免疫组化结果(抗GFAP抗体阳性细胞表达, ×400)

注: A. 正常对照组; B. EAE对照组; C. 小剂量托法替布组; D. 中剂量托法替布组 E. 大剂量托法替布组

3 讨论

托法替布是一种新型 JAK 抑制剂, 以细胞内 JAK/STAT 信号转导通路为靶点, 通过抑制 JAK 磷酸化, 阻止 STAT 磷酸化, 使下游炎症细胞因子合成减少, 进而抑制 CD4⁺T 细胞增殖, 阻断多种炎症因子(IL-2、IL-7、IL-9、IL-15、IL-21 等)的合成和分泌, 减少活化 T 细胞及炎症因子对血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)的破坏; 另外, 有研究证明在 EAE 早期就存在 BBB 破坏, 通透性增加^[8], 托法替布是小分子制剂(相对分子质量为 312.37), 更易透过病变 BBB 进入脑组织, 发挥抗炎、调节免疫的作用^[7]。Benveniste 等^[2]及 Zhou 等^[9]实验证明, 托法替布能在一定程度上抑制 EAE 恶化, 并提出其可能是未来临床治疗 MS 的新药。本研究显示, 给予托法替布干预后, 大鼠发病高峰期 NDS 降低, 脑组织炎症细胞浸润程度减轻, 提示托法替布对 EAE 具有治疗作用。

IL-21 是一种致炎因子, 可诱导滤泡辅助性 T 细胞(follicular helper T cell, T_{fh})高表达 CXCR5、诱导性共刺激分子(inducible costimulatory molecule, ICOS), 促使 T_{fh} 向生发中心(germinal center, GC)迁移, 辅助 B 细胞活化产生抗体, 从而

诱导异常免疫反应^[10-11]。MBP对稳定髓鞘板层结构和发挥正常神经功能有重要作用^[12-13]。研究证实,IL-21还可诱导EAE大鼠脑组织CD4⁺T细胞明显增殖、激活,攻击髓鞘中MBP,导致脱髓鞘改变^[14-15]。同时,星形胶质细胞的活化是EAE重要的发病机制之一^[16]。当IL-21表达增加时,可辅助B细胞活化产生自身抗体,诱导抗GFAP抗体过度表达及星形胶质细胞异常增生与活化^[17],诱发中枢神经系统炎症反应^[18]。研究已表明,IL-21可促进MS、SLE等自身免疫性疾病的发展^[19-21]。IL-10是一种重要的抗炎和免疫抑制细胞因子,可抑制NK细胞和巨噬细胞产生细胞因子^[22]。近年国外研究表明,IL-10也是Treg及滤泡调节性T细胞(follicular regulatory T cell, Tfr)发挥免疫抑制功能的关键因子,对抑制自身免疫性疾病有重要作用^[23]。有研究发现,以IL-10干预接受免疫的EAE模型时,可防止EAE的发生,提示IL-10升高可使EAE得到缓解。

本研究显示,与EAE对照组比较,各剂量托法替布组血清IL-21水平明显降低,IL-10水平明显升高,脑组织抗GFAP抗体阳性细胞平均D明显减少,抗MBP抗体阳性表达平均D明显增加($P < 0.01$)。表明托法替布对EAE大鼠具有治疗作用,且呈剂量依赖关系,可能的机制为托法替布通过降低大鼠血清IL-21水平、升高IL-10水平,使脑组织炎性细胞浸润程度、脱髓鞘病变及星形胶质细胞活化受到抑制,从而减轻EAE的临床表现,降低NDS。

参考文献

- [1] Arrambide G, Espejo C, Yarden J, *et al.* Serum biomarker gMS-classifier2: Predicting conversion to clinically definite multiple sclerosis[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e59953.
- [2] Benveniste EN, Liu Y, McFarland BC, *et al.* Involvement of the janus kinase/signal transducer and activator of transcription signaling pathway in multiple sclerosis and the animal model of experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2014, 34(8): 577-588.
- [3] Ortiz-Ibáñez K, Alsina MM, Muñoz-Santos C. Tofacitinib and other kinase inhibitors in the treatment of psoriasis[J]. *Actas Dermosifiliogr*, 2013, 104(4): 304-310.
- [4] Sandborn WJ, Ghosh S, Panes J, *et al.* Tofacitinib, an oral janus kinase inhibitor, in active ulcerative colitis[J]. *N Engl J Med*, 2012, 367(7): 616-624.
- [5] Vincenti F, Tedesco Silva H, Busque S, *et al.* Randomized phase 2b trial of tofacitinib (CP-690,550) in de novo kidney transplant patients: Efficacy, renal function and safety at 1 year[J]. *Am J Transplant*, 2012, 12(9): 2446-2456.
- [6] Stromnes IM, Goverman JM. Active induction of experimental allergic encephalomyelitis[J]. *Nat Protoc*, 2006, 1(4): 1810-1819.
- [7] Waksman BH. Current trends in multiple sclerosis research[J]. *Immunol Today*, 1981, 2(5): 87-93.
- [8] Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Kraus J, *et al.* Localization of claudin-3 in tight junctions of the blood-brain barrier is selectively lost during experimental autoimmune encephalomyelitis and human glioblastoma multiforme[J]. *Acta Neuropathol*, 2003, 105(6): 586-592.
- [9] Zhou Y, Leng X, Luo S, *et al.* Tolerogenic dendritic cells generated with tofacitinib ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis through modulation of Th17/Treg balance[J]. *J Immunol Res*, 2016, 2016: 5021537.
- [10] Ozaki K, Kikly K, Michalovich D, *et al.* Cloning of a type I cytokine receptor most related to the IL-2 receptor beta chain[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(21): 11439-11444.
- [11] Cannons JL, Qi H, Lu KT, *et al.* Optimal germinal center responses require a multistage T cell; B cell adhesion process involving integrins, SLAM-associated protein, and CD84[J]. *Immunity*, 2010, 32(2): 253-265.
- [12] Gonsette RE. Neurodegeneration in multiple sclerosis: The role of oxidative stress and excitotoxicity[J]. *J Neurol Sci*, 2008, 274(1/2): 48-53.
- [13] Yamazaki Y, Yada K, Morii S, *et al.* Diagnostic significance of serum neurospecific endase and myelin basic protein assay in patients with acute head injury[J]. *Surg Neurol*, 1997, 43(3): 2672-2721.
- [14] Lutsik MA, Esualenko IE. Oxidant stress in the pathogenesis of multiple sclerosis[J]. *Neurosci Behav Physiol*, 2007, 37(3): 209-213.
- [15] Duzhak T, Emerson MR, Chakrabarty A, *et al.* Analysis of protein induction in the CNS of SJL mice with experimental allergic encephalomyelitis by proteomic screening and immunohistochemistry[J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2003, 49(5): 723-732.
- [16] Volterra A, Meldolesi J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: The revolution continues[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2005, 6(8): 626-640.
- [17] 厉芳, 郑荣远, 朱振国, 等. 2-(2-苯并咪唑基)-2-咪唑啉对实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠脊髓胶质纤维酸性蛋白表达的影响[J]. *临床神经病学杂志*, 2012, 25(4): 282-284.
- [18] Gabryel B, Trzeciak HI. Role of astrocytes in pathogenesis of ischemic brain injury[J]. *Neurotox Res*, 2001, 3(2): 205-221.
- [19] Sweet RA, Lee SK, Vinuesa CG. Developing connections amongst key cytokines and dysregulated germinal centers in autoimmunity[J]. *Curr Opin Immunol*, 2012, 24(6): 658-664.

- [20] Spolski R, Leonard WJ. IL-21 and T follicular helper cells [J]. *Int Immunol*, 2010, 22(1): 7-12.
- [21] Hu YL, Metz DP, Chung J, *et al.* B7RP-1 blockade ameliorates autoimmunity through regulation of follicular helper T cells[J]. *J Immunol*, 2009, 182(3): 1421-1428.
- [22] 詹福寿,李霞,万艳,等. IL-10 基因启动子区-592 位点单核苷酸多态性在宁夏回、汉族人群中的分布[J]. *宁夏医学杂志*, 2011, 31(4):289-291;284.
- [23] Cai G, Nie X, Zhang W, *et al.* A regulatory role for IL-10 receptor signaling in development and B cell help of T follicular helper cells in mice[J]. *J Immunol*, 2012, 189(3): 1294-1302.

Curative effect of tofacitinib on EAE rats and its mechanism

LI Ling, LI Zuo-xiao(*Department of Neurology, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China*)

Abstract: To study the curative effect of tofacitinib on EAE rats and its mechanism, fifty Wistar rats were assigned into normal control group, EAE control group, low-dose, median-dose and high-dose tofacitinib group (10 for each). The spinal cord homogenate of guinea pig was used as antigen to induce EAE model. The control group was fed saline, and low-dose, median-dose and high-dose tofacitinib group were fed tofacitinib 1, 2 and 4 mg / (kg · d) for 10 days. The neurological dysfunction score (NDS) of the onset of the peak was recorded, and rats were executed to collect serum and brain tissue. The levels of IL-10 and IL-21 in serum were evaluated by ELISA. The pathologic changes of rat brain tissue were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The degree of demyelination and active astrocytes in brain tissues were detected via immunohistochemistry. The results showed that the normal control group had no disease. In the EAE control group, mental depression, limb paralysis and even death occurred. After intervention with tofacitinib, the NDS of the onset of the peak were shortened, the level of IL-21 declined, the inflammatory cell infiltration and the average optical density (*D*) of anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) antibody positive cells decreased ($P < 0.05$). The degree of myelin basic protein (MBP) and active astrocytes were enhanced significantly, while the level of IL-10 increased in each tofacitinib group ($P < 0.05$), and in a dose-dependent manner. So tofacitinib has therapeutic effects in rats with EAE in a dose-dependent manner, and the mechanism could be that tofacitinib inhibits the inflammatory cells infiltration, myelinoclasts and activation of astrocytes by decreasing IL-21 and increasing IL-10.

Key words: tofacitinib; experimental autoimmune encephalomyelitis; autoimmunity; central nervous system; inflammation; rat