论著

文章编号:1000-5404(2006)09-0964-03

腺病毒介导CTLA4Ig对舍格伦综合征小鼠涎腺分泌功能的影响

马 龙,杨 军,史文进,杨彦春 (第三军医大学西南医院口腔科,重庆 400038)

提 要:目的 检测CTLA4Ig-重组腺病毒载体(Ad-CTLA4Ig)在小鼠舍格伦综合征中的治疗作用。**方法** 采用完全弗氏佐剂+同种鼠颌下腺抗原激发诱导小鼠舍格伦综合征。实验组在激发后2 h予以Ad-CTLA4Ig腹腔注射,对照组激发后注射胸腺肽。比较各组动物颌下腺形态学改变,每周饮水量、静态唾液总流率的变化。**结果** CTLA4Ig-重组腺病毒实验组颌下腺病理学改变不明显,并且静态唾液总流率高于对照组($P<0.05$),而每周饮水量明显低于对照组($P<0.05$)。**结论** Ad-CTLA4Ig可防治小鼠舍格伦综合征的发生,并对临床治疗舍格伦综合征提供了实验基础。

关键词:CTLA4Ig-重组腺病毒载体;舍格伦综合征

中图法分类号:R373;R392.5;R593.2 **文献标识码**:A

Effect of adenovirus-mediated CTLA4Ig on excretive function of submandibular gland in Sjogren syndrome mice

MA Long, YANG Jun, SHI Wen-jin, YANG Yan-chun (Department of Stomatology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To examine the role of adenovirus cytotoxic T lymphocytic associated antigen 4 (Ad-CTLA4Ig) in treatment of induced Sjogren syndrome (SS) in mice. **Methods** SS was induced in 30 BALB/c mice by challenging with the mixture of homologous antigen from submandibular gland tissues and complete freunds adjuvant (CFA). Two hours after challenge, Ad-CTLA4Ig was intraperitoneally injected in the experimental mice ($n=10$), while thymic peptide in control mice ($n=10$). Morphological changes of submandibular gland, water intake and static total saliva flow rate of each group were observed. **Results** There was no obvious pathological change in Ad-CTLA4Ig treated group, in which the static total saliva flow rate was significantly higher than that in control groups ($P<0.05$) and the volume of water intake was less than that in control group ($P<0.05$). **Conclusion** Ad-CTLA4Ig prevents and cures SS of mice, which provides experimental foundation for clinical therapy of SS.

Key words: Ad-CTLA4Ig; Sjogren syndrome

舍格伦综合征(Sjogren syndrome,SS)是一种系统性的自身免疫性疾病,主要特征为累及唾液腺、泪腺等外分泌腺,出现淋巴细胞浸润,而不论原发性SS和继发性SS中浸润淋巴细胞多数为T淋巴细胞中的辅助/诱发(CD4)型。传统治疗除对症治疗,缓解眼干,口干以及预防逆行性感染外,一般是以细胞毒药物与皮质类固醇激素治疗为主,但治疗效果都不是十分理想,且有较强副作用。由于活化的$CD4^+$T细胞在SS中起着重要的作用,因此,调控$CD4^+$T细胞的活化增殖是SS治疗的焦点。本研究通过运用重组腺病毒载体介导CTLA4Ig在激发的SS小鼠体内表达,比较各组动物颌下腺形态学改变,每周饮水量、静态唾液总流率的变化,探讨腺病毒载体介导CTLA4Ig对SS的治疗作用,并为以后的临床治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

百日咳疫苗(百日咳死菌体浓度为1.1×10^{11}个/ml购自卫生部成都生物制品研究所)。激发用CFA(完全弗氏佐剂)购自博士德公司。CTLA4Ig-重组腺病毒载体(滴度约为5×10^{10} pfu/ml于西南医院烧伤研究所构建)。FITC标记的抗人CTLA4抗体购自BD公司。

1.2 动物模型的建立与实验分组

1.2.1 动物模型建立 选用BALB/c近交系小鼠(8周龄,质量20 g左右,雌雄不限,均为SPF级,购自第三军医大学实验动物中心)30只。将CFA+同种鼠颌下腺抗原混合,形成浓度为200 mg/ml油包水溶剂。将上述浓度的抗原分别多点注射

作者简介:马 龙(1976-),男,北京市人,硕士研究生,医师,主要从事口腔颌面外科方面研究。电话:(023)68754439

通讯作者:杨 军,电话:(023)68754406

收稿日期:2005-11-08;修回日期:2006-01-20

于小鼠的足垫、背部皮下，总量为 0.5 ml，背部注射百日咳疫苗 0.05 ml，加强免疫。

1.2.2　实验分组　　分为 3 组，每组 10 只，实验组于动物模型激发后 2 h 给予腹腔注射 Ad-CTLA4Ig 2 ml，每日 1 次，共 7 次；良性对照组腹腔注射胸腺肽 2 ml（浓度为 0.01 mg/ml），每日 1 次，共 7 次；阴性对照不予治疗。

1.3　腺病毒转染后相关指标检测

1.3.1　静态唾液总流率的测定　　小鼠常规 2% 戊巴比妥（30 mg/kg）麻醉后，肌注毛果芸香碱 0.01 mg（溶于 100 μl 生理盐水），15 min 开始收集混合唾液 10 min，保留小鼠正常卧位，头朝下用毛细管置于小鼠口底，让唾液顺毛细管流出，收集于小管。小管测量前后称重得出唾液量。

1.3.2　饮水量的测定　　记录杀鼠前 1 周的总饮水量，观察各组间的变化。

1.3.3　标本取材与处理　　第 7 周杀小鼠，取各组动物部分颌下腺组织冰冻切片，HE 染色，观察腺体淋巴细胞浸润情况。部分切片用 FITC-抗 CTLA4 抗体行免疫组化染色：①冰冻切片用冷丙酮固定 10 min，滴加经稀释至染色效价 1∶8 的 FITC-抗 CTLA4 荧光抗体，37 ℃ 染色 30 min，切片置入湿盒内，防止干燥。②洗片：倾去荧光抗体，将切片浸入 pH 7.2 PBS 中洗 2 次，电磁震动，每次 5 min，再用蒸馏水洗 1 min，除去盐结晶。③50% 缓冲甘油封固，荧光显微镜观察并照相。

1.4　统计学处理

实验数据均采用 SPSS 11.5 统计软件进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　饮水量

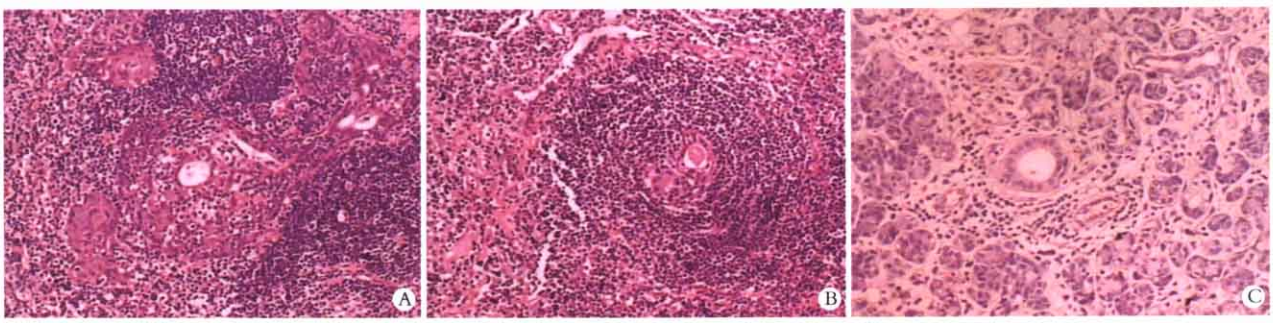
测定每组最后 1 周的饮水量，与胸腺肽组（14.51 ± 9.86）ml 及 SS 组（15.24 ± 0.63）ml 比较，Ad-CTLA4Ig 组（10.88 ± 1.02）ml 小鼠周饮水量明显减少（$P < 0.05$），说明有效的改善了小鼠的口渴症状。

2.2　静态唾液总流率

静态唾液总流率可通过 10 min 的唾液总量来表示，Ad-CTLA4Ig 组（0.93 ± 0.08）mg/min 小鼠静态唾液总流率大于胸腺肽组（0.70 ± 0.05）mg/ml 及 SS 组（0.68 ± 0.05）mg/ml，说明小鼠唾液腺分泌功能得到明显改善（$P < 0.05$）。

2.3　病理检查

病理切片显示胸腺肽组与 SS 组小鼠在 6 周后开始出现程度不一的淋巴细胞浸润，颌下腺导管扩张，腺泡破坏，上皮岛形成。而 Ad-CTLA4Ig 组小鼠颌下腺病理改变明显减轻（图 1）。



A：SS 组；B：胸腺肽组；C：Ad-CTLA4Ig 组

图 1　3 组小鼠颌下腺病理改变　（HE × 400）

2.4　CTLA4Ig 局部表达的检测

在荧光显微镜下，通过绿色荧光激发后，抗 CTLA4 抗体的 FITC 标记受激发，细胞发出明亮的绿色，此时可见 Ad-CTLA4Ig 组小鼠颌下腺腺泡细胞呈强阳性（图 2）。说明 Ad-CTLA4Ig 已高效表达至实验组小鼠颌下腺中。

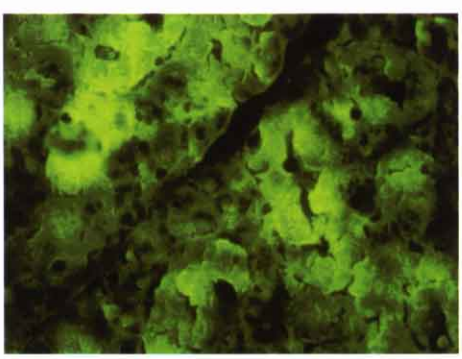


图 2　Ad-CTLA4Ig 组颌下腺腺泡　（荧光显微镜 × 400）

3　讨论

细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4（cytotoxic T lymphocytic associated antigen，CTLA4）是活化 T 细胞表面表达的一种跨膜糖蛋白分子，与 B7 和 CD28 同属免疫球蛋白超家族成员，虽然在活化 T 细胞膜上的表达量仅为 CD28 的 1/30 ~ 1/50，但它与 B7 的亲和力是 CD28 与 B7 的 20 倍以上，是 T 细胞活化中重要的负调节分子[1,2]。1991 年由 Linsley 等采用基因重组的方法构建了 CTLA4Ig，它包括人 CTLA4 膜外部分和人 IgGFC 段，是一种可溶性的嵌合蛋白。由于 CTLA4Ig 在治疗自身免疫性疾病和抗移植排斥反应中的重要作用，及其特异、低毒、高效的特点，它作为一种有效的治疗手段显示了其广阔的应用前景。

舍格伦综合征(Sjogren's syndrome,SS)确切的病因和发病机制尚不明确,一般认为与遗传、免疫异常、病毒感染有关。SS是在遗传、病毒感染和性激素异常等多种因素共同作用下,导致机体细胞免疫和体液免疫的异常反应,通过各种细胞因子和炎症递质造成组织损伤。作为一种自身免疫性疾病,主要有二个特征:①外分泌腺的淋巴细胞浸润,主要为T淋巴细胞;其中2/3为CD4辅助T淋巴细胞[3],1/3为CD8细胞毒细胞,即主要为辅助/诱导(CD4)亚型并形成淋巴滤泡样结构。②B淋巴细胞的高反应性,表现为血液循环中发现多种多样的自身抗体。而B细胞的激活需要T细胞的参与,随着病变的加重,则自身抗体亦随之增高。有研究表明随着淋巴细胞浸润灶数的增多,抗SS自身抗体的阳性率亦随之上升,呈正相关。因此,目前对SS治疗研究的重点是调控CD4T细胞的增殖活化。T细胞激活需要两个信号:第一信号是T细胞受体(TCR)同抗原递呈细胞(APC)上的抗原多肽MHC分子复合物结合;第二信号是T细胞表面分子CD28/细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4(CTLA4)与APC表面B7分子相互作用产生的共刺激信号,为抗原非特异性的[4]。其中,CTLA4对T细胞激活有较强的抑制作用[5]。

本实验结果分析:病理切片显示载体对照组、SS组小鼠颌下腺均出现了明确的淋巴细胞浸润,类似于人类SS的病理表现,与本室建立的BALB/c小鼠诱导型舍格伦综合征动物模型表现相符合[6]。在镜下主要表现为大量淋巴细胞浸润,颌下腺导管扩张,腺泡细胞萎缩、变性并被淋巴细胞取代,并有上皮岛的形成。而Ad-CTLA4Ig组小鼠颌下腺病理改变明显减轻。说明本实验成功模拟了SS动物模型,并且采用腺病毒介导的CTLA4Ig来阻断第二信号的通路,抑制$CD4^+$T细胞的增殖活化来治疗SS,有一定的可行性。腺病毒载体可高效地传递和表达基因的能力,已经得到充分的证明和记载。实验中,我们通过CTLA4免疫荧光染色,证实了CTLA4Ig-腺病毒载体腹腔注射后可高效转染至小鼠颌下腺。

静态唾液总流率是评价口干症状较为敏感的指标。静态总流率在轻、重度口干患者中均明显下降[7]。而1周饮水量则直接反应动物口干症状。为此本实验选用静态唾液总流率和周饮水量作为疗效观察指标。实验结果证实CTLA4Ig-腺病毒载体组小鼠静态唾液总流率明显增加,周饮水量则明显减少,与相应的颌下腺形态学观察吻合。同时亦证明CTLA4Ig-腺病毒载体可防治小鼠舍格伦综合征。而CTLA4Ig仅抑制T细胞活化,可诱导特异性免疫耐受而不影响机体全身的免疫功能。现已有许多报道利用CTLA4Ig治疗自身免疫性疾病以及移植排斥反应都有一定的效果[8-10]。所以,CTLA4Ig-腺病毒载体在治疗小鼠舍格伦综合征中具有特异性和安全性。因此干预T细胞B7/CD28共刺激途径,诱导特异性免疫耐受,成为治疗免疫性疾病的新思路,而CTLA4Ig是该途径最有效的免疫抑制剂。

参考文献:

[1] 郭小黉,邓宇斌,李树浓. CTLA4Ig诱导免疫耐受的机制及应用研究[J]. 国外医学:内科学分册, 2002, 29(3): 111-114.

[2] MENGES M, ROSSNER S, VOIGTLANDER C, *et al*. Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity[J]. Exp Med, 2002, 195(1): 15-21.

[3] KOK M R, BAUM B J, TAK P P, *et al*. Use of localised gene transfer to develop new treatment strategies for the salivary component of Sjogren's syndrome[J]. Ann Rheum Dis, 2003, 62(11): 1038-1046.

[4] 周 倩,钱卫珠,寇 庚,等. 重组人CTLA4Ig融合蛋白体外对人T淋巴细胞功能的影响[J]. 中国药理学通报, 2002, 18(2): 165-168.

[5] UGURLU M M, GRIFFIN M D, TAZELAAR H D, *et al*. Synergistic effects of CTLA-4Ig and sirolimus on orthotopic lung-allograft survival and histology[J]. Transplantation, 2003, 76(3): 489-495.

[6] 肖 林,杨 军,暨兴华,等. 舍格伦综合征动物模型的建立[J]. 重庆医学, 2003, 32(3): 306-307,309.

[7] 王松灵,赵竹陶,李 钧,等. 唾液总流率的临床意义探讨[J]. 中华口腔医学杂志, 1998, 33(6): 360-362.

[8] GUO L, LI X, ENOSAWA S, *et al*. Prolongation of liver xenograft survival by adenovirus vector-mediated CTLA-4Ig gene transfer[J]. Transpl Immunol, 2003, 11(2): 155-162.

[9] GUO L, FUJINO M, KIMURA H, *et al*. Simultaneous blockade of costimulatory signals, CD28 and ICOS, induced a stable tolerance in rat heart transplantation[J]. Transpl Immunol, 2003, 12(1): 41-48.

[10] MASRI M A. The mosaic of immunosuppressive drugs[J]. Mol Immunl, 2003, 39(17-18): 1073-1077.

(编辑 王 红)