

含对硝基苯丙氨酸的 B 淋巴细胞刺激因子疫苗对狼疮肾炎模型小鼠的保护作用

戴辉腾, 田 淳, 黄 捷, 陈 超, 蔡 栩, 高向东, 姚文兵*

(中国药科大学江苏省生物药物成药性研究重点实验室, 生命科学与技术学院, 南京 210009)

摘要 考察含对硝基苯丙氨酸的 B 淋巴细胞刺激因子(BAFF)治疗 BAFF 过表达的自身免疫性疾病的效果。利用本研究前期构建的工程菌, 表达纯化了 B 淋巴细胞刺激因子的可溶型突变体(smBAFF)以及在其 65 位定点引入了对硝基苯丙氨酸的改构体($p\text{NO}_2\text{Phe}^{65}\text{smBAFF}$)。通过考察 $p\text{NO}_2\text{Phe}^{65}\text{smBAFF}$ 体外促小鼠淋巴细胞增殖活性、免疫原性以及所诱导的抗血清对天然 BAFF 活性的抑制作用, 评价了其用于治疗 BAFF 过表达的自身免疫性疾病的可行性; 同时采用了 cGVHD (graft-versus-host disease) 诱导的狼疮肾炎小鼠模型评价了 $p\text{NO}_2\text{Phe}^{65}\text{smBAFF}$ 的药理活性。结果表明: 定点引入了对硝基苯丙氨酸的 $p\text{NO}_2\text{Phe}^{65}\text{smBAFF}$ 不具有促进小鼠淋巴细胞增殖的能力; 由于对硝基苯丙氨酸的引入显著增强了蛋白的免疫原性, 诱导机体产生了可以抑制天然 BAFF 活性的交叉抗体; 在 cGVHD 诱导的狼疮肾炎小鼠模型中, $p\text{NO}_2\text{Phe}^{65}\text{smBAFF}$ 可显著减轻疾病症状。定点引入了对硝基苯丙氨酸的 $p\text{NO}_2\text{Phe}^{65}\text{smBAFF}$ 可以作为治疗 BAFF 过表达的自身免疫性疾病的候选分子。

关键词 B 淋巴细胞刺激因子; 对硝基苯丙氨酸; 免疫原性; cGVHD

中图分类号 Q514 **文献标志码** A **文章编号** 1000–5048(2017)04–0483–07

doi:10.11665/j.issn.1000–5048.20170414

引用本文 戴辉腾, 田淳, 黄捷, 等. 含对硝基苯丙氨酸的 B 淋巴细胞刺激因子疫苗对狼疮肾炎模型小鼠的保护作用[J]. 中国药科大学学报, 2017, 48(4):483–489.

Cite this article as: DAI Huiteng, TIAN Hong, HUANG Jie, et al. Protective effects of *p*-nitrophenylalanine-containing BAFF vaccine on lupus nephritis model mice[J]. *J China Pharm Univ*, 2017, 48(4):483–489.

Protective effects of *p*-nitrophenylalanine-containing BAFF vaccine on lupus nephritis model mice

DAI Huiteng, TIAN Hong, HUANG Jie, CHEN Chao, CAI Di, GAO Xiangdong, YAO Wenbing*

Jiangsu Key Laboratory of Druggability of Biopharmaceuticals, School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract In order to verify whether *p*-nitrophenylalanine-containing BAFF vaccine can be used as a candidate molecule for the treatment of autoimmune diseases with BAFF over-expression, a soluble mutant of B cell activating factor belonging to the TNF Family (smBAFF) and its $p\text{NO}_2\text{Phe}$ mutant($p\text{NO}_2\text{Phe}^{65}\text{smBAFF}$), which site specific incorporated $p\text{NO}_2\text{Phe}$ at position 65 of smBAFF, were expressed and purified. In order to evaluate the feasibility of using $p\text{NO}_2\text{Phe}^{65}\text{smBAFF}$ to treat BAFF-over-expressed autoimmune diseases, we investigate its Lymphocyte-stimulating capacity, immunogenicity and inhibitory effect of serum on biological activity of natural BAFF. The pharmacological activity of $p\text{NO}_2\text{Phe}^{65}\text{smBAFF}$ was evaluated using a cGVHD (graft-versus-host disease) induced SLE mouse model. Results indicated that $p\text{NO}_2\text{Phe}^{65}\text{smBAFF}$, could bind to mouse lymphocytes but could not promote the proliferation of mouse lymphocytes. Moreover, the incorporation of $p\text{NO}_2\text{Phe}$ significantly increased the immunogenicity and induced cross-antibody, which can inhibit the biological activity of natural

BAFF. In cGVHD induced SLE mouse model, $p\text{NO}_2\text{Phe}^{65}\text{smBAFF}$ can significantly reduce the symptoms of the disease and play a therapeutic role. Therefore, $p\text{NO}_2\text{Phe}^{65}\text{smBAFF}$ can be used as a candidate molecule for the treatment of autoimmune diseases with BAFF over-expression.

Key words B cell activating factor belonging to the TNF family (BAFF); p -nitrophenylalanine; immunogenicity; cGVHD

This study was supported by the National Nature Science Foundation of China (No. 81273426, No. 81673343)

B 淋巴细胞刺激因子 (B cell activating factor belonging to the TNF family, BAFF) 是肿瘤坏死因子家族第 13 位成员, 含有 285 个氨基酸, 属于 II 型跨膜蛋白^[1]。其胞外区通常被弗林蛋白酶水解, 形成可溶性功能片段 (sBAFF), 通过与淋巴细胞膜上的 3 个受体 (BCMA、TACI 与 BAFF-R) 结合, 促进 B 细胞的活化、增殖与成熟^[2]。研究表明 BAFF 的异常表达在自身免疫性疾病的产生中扮演着重要的作用。在全身自身免疫性疾病患者和器官特异性自身免疫性疾病患者体内均能检查到 BAFF 的异常升高^[3–5]。在 BAFF 转基因小鼠中, 小鼠的效应 T 细胞与成熟 B 细胞数量显著上升, 出现了高滴度抗双链 DNA 自身抗体、蛋白尿和免疫复合物沉积在肾脏等红斑狼疮样表现^[6]。所以, 以 BAFF 为靶点, 阻断 B 细胞的增殖及其随后一系列细胞活动, 成为近年治疗自身免疫性疾病的一种思路^[7]。

目前, 以 BAFF 为靶点的自身免疫疾病相关药物主要分为 BAFF 单克隆抗体和 BAFF 抑制剂^[8–10]。但是这两类药物均存在用药量大、需长期反复使用、易引起超敏反应的缺陷^[10]。而与被动免疫治疗相比, 主动免疫治疗通过激发机体自身的免疫系统产生抗体而发挥治疗作用, 在安全性、疗效持续性和病人依从性等方面都具有明显的优势^[11]。尽管主动免疫疗法具有诸多优势, 但是 BAFF 属于自体蛋白, 存在自身免疫耐受现象, 采用添加佐剂等常规方法难以有效地诱导抗体产生, 使 BAFF 疫苗的开发存在较大的困难。目前设计自体蛋白疫苗的方法主要集中在筛选抗原表位构建多肽疫苗^[12]、构建 DNA 疫苗^[13]和构建融合蛋白疫苗^[14–15]等方面。虽然这些方法都能在动物模型中诱导自体蛋白抗体的产生, 并表现出一定的治疗作用, 但抗体滴度和治疗效果依然不能满足临床需求。

2004 年, 美国 Peter G. Schultz 实验室提出的一种蛋白质定点突变的技术——遗传密码扩充技

术^[16], 该技术可以模拟天然蛋白质的合成过程, 直接表达出含非天然氨基酸的蛋白质, 有助于产生治疗性抗体。研究表明, 将含有 $p\text{NO}_2\text{Phe}$ 的小鼠肿瘤坏死因子 (TNF- α) 作为抗原免疫小鼠, 产生了能够与内源性 TNF- α 发生交叉反应的中和抗体^[17–19]; 将 $p\text{NO}_2\text{Phe}$ 引入小鼠视黄醇结合蛋白 (RPB4)^[18] 和小鼠补体因子 C5a^[20], 同样诱导机体产生了能够与内源性蛋白发生交叉反应的 IgG 抗体。遗传密码扩充技术为自体蛋白疫苗的设计提供了新的思路。

可溶型 sBAFF 突变体 (smBAFF) 是将 sBAFF 序列中 217~224 位 8 个氨基酸突变为两个甘氨酸获得的 BAFF 类似物^[21]。作为 BAFF 的类似物, smBAFF 具有可以与受体结合, 同时不刺激 B 淋巴细胞增殖的特性。为了获得一种可诱导机体产生针对天然 BAFF 抗体的治疗性疫苗, 本研究采用 smBAFF 作为原型分子, 利用遗传密码扩充技术在其 65 位上定点引入 $p\text{NO}_2\text{Phe}$ 获得改构体 ($p\text{NO}_2\text{Phe}^{65}\text{smBAFF}$), 从多角度评价其用于治疗 BAFF 过表达的自身免疫性疾病的可行性; 同时考察 $p\text{NO}_2\text{Phe}^{65}\text{smBAFF}$ 对 cGVHD 诱导的狼疮肾炎小鼠模型的保护作用。

1 材 料

1.1 菌种和质粒

含有 pET28a-smBAFF 或 pET28a- $p\text{NO}_2\text{Phe}^{65}\text{smBAFF}$ 质粒的 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 菌株均为中国药科大学江苏省生物药物成药性研究重点实验室保存。

1.2 试 剂

IPTG、HRP 偶联山羊抗鼠 IgG (南京鼎国生物技术有限公司); OPD、小鼠脾脏淋巴细胞分离液 (天津市灏洋生物制品科技有限责任公司); RPMI 1640 培养基、胎牛血清 (美国 Gibco 公司); 弗氏佐剂、MTT、甲基化 BSA、小牛胸腺 DNA、小鼠抗人

BAFF抗体(美国Sigma公司);山羊抗人IgM μ 链抗体(英国Abcam公司);sBAFF(北京义翘神州科技有限公司)。

1.3 动物

清洁级BALB/c雌性小鼠(6~8周龄)购自扬州大学比较医学中心,合格证号:SCXK(苏)2012-0004;SPF级DBA/2雌性小鼠(6~8周龄)、SPF级B6D2F1雌性小鼠(6~8周龄)购自北京维通利华实验动物有限公司,合格证号:SCXK(京)2012-0001。

2 方法

2.1 smBAFF与 $p\text{NO}_2\text{Phe}^{65}\text{smBAFF}$ 诱导表达与分离纯化

2.1.1 smBAFF诱导表达与分离纯化 将含有pET28a-smBAFF质粒的工程菌加入到含有卡那霉素的液体LB培养基中,37℃,220 r/min,振荡培养4 h。然后用终浓度1 mmol/L的IPTG诱导蛋白表达,5 h后离心收取菌体沉淀。超声裂解菌体,离心取上清液。首先使用Q-Sepharose Fast Flow阴离子交换柱进行粗品纯化:0.10 mol/L NaCl缓冲液洗脱杂蛋白,0.18 mol/L NaCl色谱缓冲液收集目的蛋白。随后使用Ni-Sepharose Fast Flow亲和色谱柱进行精品纯化:使用浓度梯度为0 mol/L~500 mmol/L咪唑缓冲液梯度洗脱,检测合并含目的蛋白的洗脱液。透析将置换体系为PBS缓冲液,置于-80℃保存。

2.1.2 $p\text{NO}_2\text{Phe}^{65}\text{smBAFF}$ 诱导表达与分离纯化 将含有pET28a- $p\text{NO}_2\text{Phe}^{65}\text{smBAFF}$ 质粒的工程菌加入到含有卡那霉素、氯霉素的M9培养基中,37℃,220 r/min振荡培养7.5 h。加入终浓度为0.1 mol/L的L-对硝基苯丙氨酸后继续振荡培养0.5 h。然后用终浓度1 mmol/L IPTG诱导蛋白表达,18 h后离心收取菌体沉淀。超声裂解菌体,离心取上清。纯化方法同smBAFF。透析置换体系为PBS缓冲液,置于-80℃保存。

2.2 $p\text{NO}_2\text{Phe}^{65}\text{smBAFF}$ 体外促小鼠淋巴细胞增殖活性

无菌分离健康BALB/c小鼠的脾脏,采用小鼠淋巴细胞分离液分离小鼠淋巴细胞。按每孔 2×10^5 的密度将细胞接种至96孔板中。加入终浓度为2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 山羊抗人IgM μ 链抗体作为共刺激

剂。加入终浓度为200 ng/mL sBAFF、smBAFF及 $p\text{NO}_2\text{Phe}^{65}\text{smBAFF}$ 。以终浓度为2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 山羊抗人IgM μ 链抗体为对照组,以10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS溶液作为阳性对照。置于37℃,5% CO₂培养箱中培养48 h后进行MTT检测。在细胞板中加入5 mg/mL MTT 10 μL ,作用4 h后,加入三联液100 μL ,置于脱色摇床上振荡16 h,于570与630 nm处检测吸收度。

2.3 ELISA法检测小鼠血清抗smBAFF抗体滴度

将6~8周龄的雌性BALB/c小鼠分为PBS佐剂组、smBAFF佐剂给药组和 $p\text{NO}_2\text{Phe}^{65}\text{smBAFF}$ 佐剂给药组。将弗氏佐剂与相应蛋白溶液按体积比1:1混合,制备乳浊液腹腔免疫小鼠。第1次免疫时使用完全弗氏佐剂与蛋白溶液混匀后的乳浊液,其后每次均用不完全弗氏佐剂与蛋白溶液混匀的乳浊液。每周免疫1次,共免疫5周,给药剂量为每只每次20 g。将第1次给药时间记为0周,于第5周眼眶取血,6 000 r/min,10 min。分离上层血清。利用ELISA方法检测血清中抗smBAFF抗体产生情况。

2.4 小鼠抗血清对天然BAFF活性的抑制能力测定

将免疫后的小鼠血清按照1:10 000的体积比与sBAFF在37℃共孵育2 h。

分离小鼠的脾脏,淋巴细胞分离液分离其淋巴细胞。以每孔 2×10^5 的密度将细胞接种至96孔板中。加入终浓度为2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的山羊抗人IgM μ 链抗体作为共刺激剂。除去对照组每孔加入终浓度为200 ng/mL的sBAFF或sBAFF与血清混合物。以终浓度为2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的山羊抗人IgM μ 链抗体为对照组,以10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的LPS溶液作为阳性对照。置于37℃,5% CO₂培养箱中培养48 h后进行MTT检测。在细胞板中加入5 mg/mL MTT 10 μL ,作用4 h后,加入三联液100 μL ,置于脱色摇床上振荡16 h,于570与630 nm处检测吸收度。

2.5 $p\text{NO}_2\text{Phe}^{65}\text{smBAFF}$ 对cGVHD诱导的狼疮肾炎小鼠的治疗活性评价

将6~8周龄的B6D2F1小鼠共分5组:对照组、模型组、3种不同剂量的 $p\text{NO}_2\text{Phe}^{65}\text{smBAFF}$ 治疗组。模型组和治疗组按照cGVHD诱导的狼疮肾炎小鼠模型的方法进行造模,分别于第0周和第

1周对B6D2F1小鼠尾静脉注射 6×10^7 个DBA/2小鼠脾淋巴细胞。治疗组于第0周开始腹腔免疫

$p\text{NO}_2\text{Phe}^{65}\text{smBAFF}$

,第1次免疫时使用完全弗氏佐剂与蛋白溶液混匀后的乳浊液,其后每次均用不完全弗氏佐剂与蛋白溶液混匀的乳浊液。每周免疫1次,共免疫5周,低、中、高组给药剂量分别为每只每次6.7、20、60g。

此后每周取小鼠血清,使用间接ELISA方法检测ssDNA抗体滴度。在第10周时处死小鼠,取对照组、模型组和中剂量

$p\text{NO}_2\text{Phe}^{65}\text{smBAFF}$

给药组小鼠肾脏进行免疫荧光切片检测与组织病理学检测。

2.6 统计学分析

数据应用软件GraphPad Prism 6进行统计学分析。数据采用Student's *t*-test进行显著性比较, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 smBAFF与 $p\text{NO}_2\text{Phe}^{65}\text{smBAFF}$ 诱导表达与分离纯化

smBAFF、

$p\text{NO}_2\text{Phe}^{65}\text{smBAFF}$

在相应的培养基中发酵,IPTG诱导蛋白表达后,菌体超声破碎。将超声上清利用Q-Sepharose Fast Flow离子交换色谱与Ni-Sepharose Fast Flow亲和色谱进行分离纯化后,采用12% SDS-PAGE检测目的蛋白纯度,结果见图1。

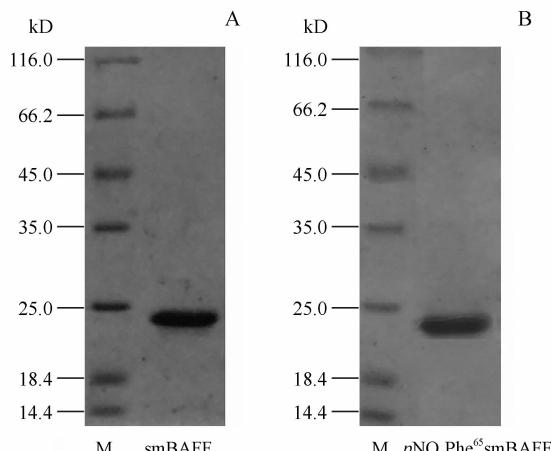


Figure 1 12% SDS-PAGE analysis of purified target protein
A: SDS-PAGE analysis of purified smBAFF; B: SDS-PAGE analysis of purified $p\text{NO}_2\text{Phe}^{65}\text{smBAFF}$; M: Marker; smBAFF: Soluble mutant of B cell activating factor belonging to the TNF family

3.2 $p\text{NO}_2\text{Phe}^{65}\text{smBAFF}$ 体外促小鼠淋巴细胞增殖活性

以小鼠淋巴细胞为模型检测所构建的smBAFF及

$p\text{NO}_2\text{Phe}^{65}\text{smBAFF}$

改构体促进B细胞增殖的生物活性,结果如图2所示。相比于阳性蛋白sBAFF($129.99 \pm 5.72\%$),smBAFF($92.78 \pm 4.63\%$)

$p\text{NO}_2\text{Phe}^{65}\text{smBAFF}$ ($97.62 \pm 4.86\%$)均丧失了促进B细胞增殖的活性($P < 0.001$)。

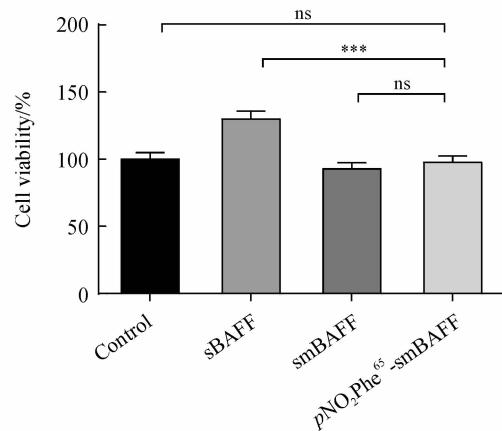


Figure 2 Lymphocyte-stimulating potential of $p\text{NO}_2\text{Phe}^{65}\text{smBAFF}$ ($\bar{x} \pm s, n=5$). *** $P < 0.001$

3.3 ELISA法检测小鼠血清抗smBAFF抗体滴度

将BALB/c小鼠分为PBS佐剂组、smBAFF佐剂给药组和

$p\text{NO}_2\text{Phe}^{65}\text{smBAFF}$

佐剂给药组。每周免疫1次,共5周。于第5周眼眶取血,离心取上清液,利用间接ELISA方法检测血清抗BAFF抗体滴度。结果如图3所示。smBAFF免疫小鼠之后,不能诱导机体分泌高滴度的抗smBAFF抗体,在第5周时抗体滴度与PBS组之间不存在显著差异($P > 0.05$)。而定点引入了对硝基苯丙氨酸的

$p\text{NO}_2\text{Phe}^{65}\text{smBAFF}$

免疫BALB/c小鼠后可以诱导小鼠产生高滴度的抗smBAFF抗体,与PBS组、smBAFF组均存在显著差异($P < 0.001$)。

3.4 小鼠抗血清对天然BAFF活性的抑制能力测定

以小鼠淋巴细胞为模型检测

$p\text{NO}_2\text{Phe}^{65}\text{smBAFF}$

免疫小鼠的抗血清对天然BAFF活性的抑制作用,结果如图4所示:

$p\text{NO}_2\text{Phe}^{65}\text{smBAFF}$

免疫小鼠的抗血清对天然BAFF活性存在显著的抑制作用,细胞活性相比于sBAFF组从($136.92 \pm 5.74\%$)下降至($109.44 \pm 3.99\%$)($P < 0.001$)。

而 PBS、smBAFF 免疫小鼠的抗血清对天然 BAFF 活性不存在显著的抑制作用 ($P > 0.05$)。

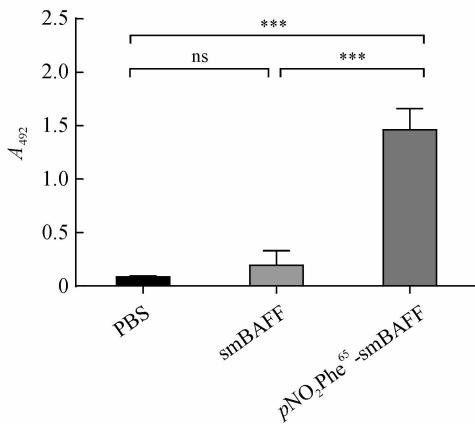


Figure 3 Serum titers for BALB/c mice immunized PBS, smBAFF or $p\text{NO}_2\text{Phe}^{65}\text{smBAFF}$ in 5th week ($\bar{x} \pm s, n=5$). *** $P < 0.001$

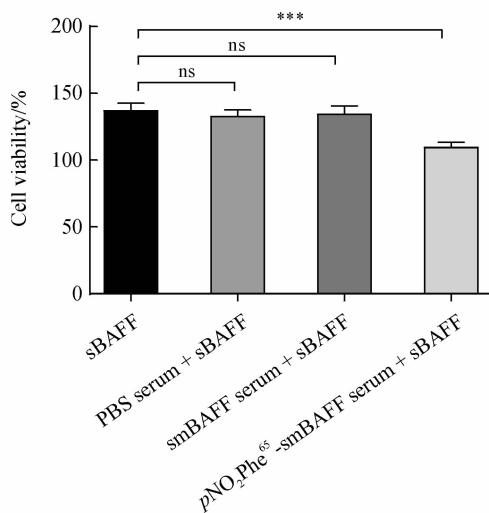


Figure 4 Determination of the inhibitory effect of serum on biological of sBAFF ($\bar{x} \pm s, n=5$). *** $P < 0.001$

3.5 $p\text{NO}_2\text{Phe}^{65}\text{smBAFF}$ 对 cGVHD 诱导的狼疮肾炎小鼠的抗单链 DNA 抗体滴度的影响

以 cGVHD 诱导的狼疮肾炎小鼠模型评价 $p\text{NO}_2\text{Phe}^{65}\text{smBAFF}$ 的治疗活性。在造模成功后的 10 周内检测小鼠血清抗单链 DNA 抗体, 如图 5 所示: 在 8~10 周时, $p\text{NO}_2\text{Phe}^{65}\text{smBAFF}$ 中、高剂量给药组血清中的抗单链 DNA 抗体与 cGVHD 造模组存在显著性差异 ($P < 0.05$), 与对照组不存在显著性差异 ($P > 0.05$)。而 $p\text{NO}_2\text{Phe}^{65}\text{smBAFF}$ (低剂量组) 给药组血清中的抗单链 DNA 抗体与 cGVHD

造模组则不存在显著性差异 ($P > 0.05$)。而 $p\text{NO}_2\text{Phe}^{65}\text{smBAFF}$ (低组) 血清中的抗单链 DNA 抗体仅在第 9 周与 cGVHD 造模组则存在显著性差异 ($P < 0.05$)

3.6 $p\text{NO}_2\text{Phe}^{65}\text{smBAFF}$ 缓解 cGVHD 诱导的狼疮肾炎小鼠肾脏的炎症损伤

在造模成功 10 周后处死小鼠, 做肾脏免疫荧光切片、HE 染色切片、Masson 染色切片、PAM 染色切片以及 PAS 染色切片。结果如图 6~7 所示: 免疫荧光结果显示, cGVHD 造模小鼠肾脏由于产生大量抗自身抗体并沉积于肾小球细胞表面形成免疫复合物, 而被荧光标记的羊抗鼠二抗结合现出大量荧光, 治疗组小鼠与正常小鼠相似, 荧光强度较低。小鼠肾脏 HE 染色切片显示 cGVHD 造模小鼠出现纤维样坏死, 治疗组小鼠为轻度系膜增厚; 小鼠肾脏 Masson 染色切片显示 cGVHD 造模小鼠有免疫复合物沉积, 治疗组小鼠为轻度免疫复合物沉积; 小鼠肾脏 PAM 染色切片显示, cGVHD 造模小鼠肾小球系膜增厚, 治疗组小鼠显示轻度系膜增厚; 小鼠肾脏 PAS 染色切片显示 cGVHD 造模小鼠有新月体形成, 治疗组小鼠为轻度系膜增厚。

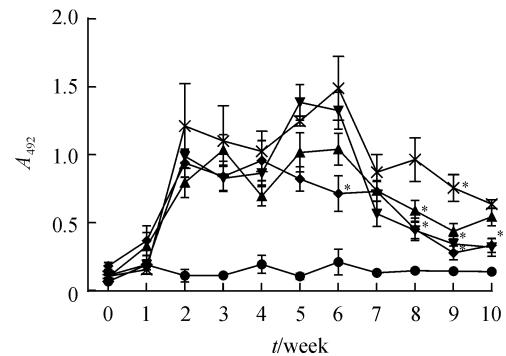


Figure 5 Serum anti-ssDNA antibody titer ($\bar{x} \pm s, n=3\sim 5$ mice per group). * $P < 0.05$ vs cGVHD group

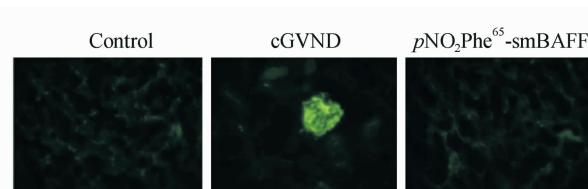


Figure 6 Determination of renal immune complexes by immunofluorescence ($\times 200$)

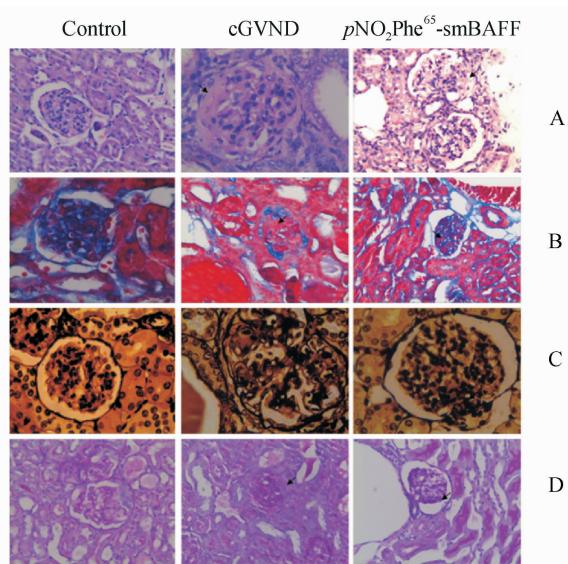


Figure 7 Representative photomicrographs of histopathological studies of kidney stained with HE (A), Masson (B), PAM (C) and PAS (D) ($\times 200$)

4 讨 论

本研究以 BAFF 类似物 smBAFF 作为原型蛋白,利用遗传密码扩充技术在其 65 位上定点引入 $p\text{NO}_2\text{Phe}$ 获得改构体—— $p\text{NO}_2\text{Phe}^{65}\text{smBAFF}$,并评价其用于治疗 BAFF 过表达的自身免疫性疾病的可行性。结果表明: $p\text{NO}_2\text{Phe}^{65}\text{smBAFF}$ 具有与 smBAFF 相同的性质,可以与 BAFF 受体结合,同时不刺激 B 淋巴细胞的增殖。这可能是由于定点引入 $p\text{NO}_2\text{Phe}$ 只改变了原型蛋白的一个氨基酸,加之同源建模分析可知 smBAFF 的 65 位位于蛋白三维结构的表面,所以在 smBAFF 的 65 位上定点引入 $p\text{NO}_2\text{Phe}$ 可能对其空间构象的影响较小。这些独特的性质防止了由于给药导致的 BAFF 下游通路激活,从而避免了由于 B 细胞过度增殖与活化所导致的自身免疫性疾病的症状加深,安全性得以保证。

同时,本研究的目的是获得一种可诱导机体产生针对天然 BAFF 抗体的治疗性疫苗。因此,确认免疫 $p\text{NO}_2\text{Phe}^{65}\text{smBAFF}$ 后能否产生与 BAFF 发生交叉反应的中和抗体,并且所产生的抗血清能否在体外抑制天然 BAFF 的活性至关重要。由于 BAFF 具有刺激小鼠淋巴细胞增殖的生物活性,所以考察了抗血清是否可以在体外抑制天然 BAFF 促淋巴细胞增殖的生物活性。结果表明:在 $p\text{NO}_2\text{Phe}^{65}$

smBAFF 组小鼠的血清中检测到了可与 BAFF 发生交叉反应的高滴度 IgG 抗体,并且所产生的抗体可以抑制天然 BAFF 促淋巴细胞增殖的生物活性;而使用 smBAFF 免疫小鼠之后,则不能诱导机体分泌高滴度的抗 BAFF 抗体。原因可能在于 $p\text{NO}_2\text{Phe}$ 为非天然氨基酸,定点引入蛋白后形成了新的 T 细胞表位^[17–19],刺激 T 细胞增殖分化从而起到了增强免疫原性的作用。所以, $p\text{NO}_2\text{Phe}^{65}\text{smBAFF}$ 用于治疗 BAFF 过表达的自身免疫性疾病的有效性得以保证。

cGVHD 方法诱导的 SLE 小鼠模型是最常用的 SLE 小鼠模型。因其发病症状与人类 SLE 相似度高,实验周期不超过 16 周,实验条件容易控制,已成为国际公认的 SLE 动物模型。该模型采用同种异体的亲代小鼠脾细胞注射入 F1 代小鼠,使 F1 小鼠产生免疫排斥反应,症状包括抗单链 DNA 抗体的产生、尿蛋白浓度升高、免疫复合物沉积型肾小球肾炎等。本研究以 cGVHD 方法诱导的 SLE 小鼠模型评价了 $p\text{NO}_2\text{Phe}^{65}\text{smBAFF}$ 对 SLE 疾病的治疗活性。结果表明,在 8~10 周时, $p\text{NO}_2\text{Phe}^{65}\text{smBAFF}$ 中、高剂量给药组血清中的抗单链 DNA 抗体与 cGVHD 造模组存在显著性差异,并且与对照组不存在显著性差异;形态学数据表明, $p\text{NO}_2\text{Phe}^{65}\text{smBAFF}$ 给药后肾脏的免疫复合物堆积减少,相应的肾脏炎症损伤也减少。这说明 $p\text{NO}_2\text{Phe}^{65}\text{smBAFF}$ 给药后可以有效地改善 SLE 小鼠的症状。

综上所述, $p\text{NO}_2\text{Phe}^{65}\text{smBAFF}$ 可以与淋巴细胞结合但是不能促进淋巴细胞增殖;并且由于 $p\text{NO}_2\text{Phe}$ 的引入显著增加了蛋白的免疫原性,诱导机体产生了可以抑制天然 BAFF 活性的交叉抗体,并在 cGVHD 诱导的 SLE 小鼠模型中具有明显的保护作用。因此,定点引入了 $p\text{NO}_2\text{Phe}$ 的 $p\text{NO}_2\text{Phe}^{65}\text{smBAFF}$ 可能作为治疗 BAFF 过表达的自身免疫性疾病候选分子。

参 考 文 献

- [1] Mackay F, Schneider P. Cracking the BAFF code [J]. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9(7):491–502.
- [2] Pieper K, Grimbacher B, Eibel H. B-cell biology and development [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2013, 131(4):959–971.
- [3] Campi I, Tosi D, Rossi S, et al. B Cell activating factor (BAFF) and BAFF receptor expression in autoimmune and nonautoim-

- mune thyroid diseases [J]. *Thyroid*, 2015, **25**(9): 1043–1049.
- [4] Wei F, Chang Y, Wei W. The role of BAFF in the progression of rheumatoid arthritis [J]. *Cytokine*, 2015, **76**(2): 537–544.
- [5] Boneparth A, Woods M, Huang W, et al. The effect of BAFF inhibition on autoreactive B cell selection in murine SLE [J]. *Mol Med*, 2016, **22**: 173–182.
- [6] Mackay F, Woodcock SA, Lawton P, et al. Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations [J]. *J Exp Med*, 1999, **190**(11): 1697–1710.
- [7] Stohl W. Inhibition of B cell activating factor (BAFF) in the management of systemic lupus erythematosus (SLE) [J]. *Exp Rev Clin Immunol*, 2017, **13**(6): 623–633.
- [8] Zouali M, Uy EA. Belimumab therapy in systemic lupus erythematosus [J]. *Biol Drugs*, 2013, **27**(3): 225–235.
- [9] Scheinberg MA, Hislop CM, Martin RS. Blisibimod for treatment of systemic lupus erythematosus: with trials you become wiser [J]. *Exp Opin Biol Ther*, 2016, **16**(5): 723–733.
- [10] Richez C, Truchetet M-E, Schaeverbeke T, et al. Atacicept as an investigated therapy for rheumatoid arthritis [J]. *Exp Opin Investig Drugs*, 2014, **23**(9): 1285–1294.
- [11] Deng DN, Tian H, Yao WB. Advances in therapeutic B-cell vaccines against chronic diseases [J]. *J China Pharm Univ (中国药科大学学报)*, 2013, **44**(5): 470–475.
- [12] Zhao Z, Sun HQ, Wei SS, et al. Multiple B-cell epitope vaccine induces a *Staphylococcus enterotoxin* B-specific IgG1 protective response against MRSA infection [J]. *Sci Rep*, 2015, **5**: 12371.
- [13] Kobiyama K, Aoshi T, Narita H, et al. Nonagonistic Dectin-1 ligand transforms CpG into a multitask nanoparticulate TLR9 ago-
- nist [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, **111**(8): 3086–3091.
- [14] Bohnen C, Wangorsch A, Schulke S, et al. Vaccination with recombinant modified vaccinia virus Ankara prevents the onset of intestinal allergy in mice [J]. *Allergy*, 2013, **68**(8): 1021–1028.
- [15] Martins KA, Steffens JT, van Tongeren SA, et al. Toll-like receptor agonist augments virus-like particle-mediated protection from Ebola virus with transient immune activation [J]. *PLoS ONE*, 2014, **9**(2): e89735.
- [16] Xie J, Schultz PG. An expanding genetic code [J]. *Methods*, 2005, **36**(3): 227–238.
- [17] Grunewald J, Tsao ML, Perera R, et al. Immunochemical termination of self-tolerance [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, **105**(32): 11276–11280.
- [18] Grunewald J, Hunt GS, Dong L, et al. Mechanistic studies of the immunochemical termination of self-tolerance with unnatural amino acids [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, **106**(11): 4337–4342.
- [19] Gauba V, Grunewald J, Gorney V, et al. Loss of CD4 T-cell-dependent tolerance to proteins with modified amino acids [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, **108**(31): 12821–12826.
- [20] Kessel C, Nandakumar KS, Peters FB, et al. A single functional group substitution in C5a breaks B cell and T cell tolerance and protects against experimental arthritis [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2014, **66**(3): 610–621.
- [21] Liu Y, Xu L, Opalka N, et al. Crystal structure of sTALL-1 reveals a virus-like assembly of TNF family ligands [J]. *Cell*, 2002, **108**(3): 383–394.

· 校园信息 ·

本刊编委张灿教授课题组 在 Nature Nanotechnology 发表高水平研究论文

中国药科大学张灿教授课题组的论文“Neutrophil-mediated anticancer drug delivery for suppression of postoperative malignant glioma recurrence”于2017年6月19日在线发表于Nature子刊“Nature Nanotechnology”(doi:10.1038/nano.2017.54, IF 38.986)。

该论文立足于脑胶质瘤的术后化疗。脑胶质瘤是颅内最常见的恶性侵袭性生长肿瘤,具有高死亡率、高复发率和低治愈率等特征。临床治疗常采用手术结合放、化疗的方法。一线脑胶质瘤化疗药物替莫唑胺可以透过血脑屏障,术后结合疗效尽管高于放疗,但5年生存率仅达9.8%。其他抗肿瘤疗效好的药物如紫杉醇等则难以透过血脑屏障在临幊上不被应用。为了将药物高效富集至术后肿瘤残留区域,张灿教授课题组研究以自体中性粒细胞作为载体,无损荷载抗肿瘤药物紫杉醇的脂质体,静脉回输治疗原位脑胶质瘤术后模型小鼠,利用中性粒细胞对炎症因子的趋向性及变形穿越血脑屏障的特点,实现了高效的自主引导的药物靶向递送,有效抑制了模型鼠原位脑胶质瘤术后的复发和发展。该项研究基于特定疾病及其病理因子的靶向思路突破了传统的受体-配体结合靶向的局限,为脑部疾病治疗和药物透过血脑屏障建立了新的技术平台,有望推广用于其他炎症相关性疾病等的治疗。