

中图分类号: R593.24

密 级: 公开

学校代码: 10599

学 号: 20211002061

右江民族医学院

硕士学位论文



学术学位

抗 CD40L-Fab 抗体对由 pristane 诱导的人源化 (hCD40/hCD40L) 小鼠狼疮活动指标的改善研 究

学位申请人: 赵雯莉

导师姓名: 李也鹏

专业名称: 内科学

研究方向: 风湿免疫方向

所在院系: 临床医学院

申请学位类别: 临床医学硕士

完成日期: 2024 年 6 月 1 日

广西·百色

目 录

摘 要	1
ABSTRACT	3
英汉缩略词对照表	6
前 言	8
1 材料与方法	14
1.1 材料	14
1.1.1 人源化 (hCD40/hCD40L) 小鼠与 C57BL/6 小鼠	14
1.2 实验方法	15
1.2.1 抗 CD40L-Fab 抗体的设计	16
1.2.2 人源化 (hCD40/hCD40L) 小鼠与 C57BL/6 小鼠的饲养	16
1.2.4 抗 CD40L-Fab 抗体的超滤	17
1.2.5 小鼠尿液标本的采集	18
1.2.7 小鼠血清的标本采集	19
1.2.8 肾脏组织的采集和保存	19
1.2.9 制作小鼠肾脏石蜡切片	20
1.2.10 小鼠肾脏组织石蜡切片 HE 染色	20
1.2.11 系统性红斑狼疮血清标志物抗 ds-DNA 抗体的检测	21
1.2.12 小鼠血清中补体蛋白 3 (C3) 的检测	23
1.2.13 小鼠血清中谷草转氨酶 (AST) 和谷丙转氨酶 (ALT) 的测定	24
1.2.14 小鼠尿蛋白定量	26
1.3 统计学分析	27
2 结果	28
2.1 各组小鼠血清中抗 ds-DNA 抗体含量比较	28

2.2 各组小鼠肾脏组织病理形态变化结果	29
2.3 各组小鼠尿蛋白含量比较	30
2.4 各组小鼠血清中 C ₃ 补体含量比较	31
2.5 人源化组小鼠血清中 AST 和 ALT 含量抗体注射前后对比	31
3 讨论	32
3.1 狼疮小鼠模型建立选择	33
3.2 各项指标在实验中测定的意义	34
3.2.1 抗 CD40L-Fab 抗体对狼疮小鼠血清中抗 ds-DNA 抗体水平的影响	34
3.2.2 抗 CD40L-Fab 抗体对狼疮小鼠肾脏组织病理学形态结构的影响	36
3.2.3 抗 CD40L-Fab 抗体对狼疮小鼠尿蛋白水平的影响	37
3.2.4 抗 CD40L-Fab 抗体对狼疮小鼠血清中补体蛋白 3 的影响	38
3.2.5 抗 CD40L-Fab 抗体对肝功能存在的影响	39
3.3 总结	40
不足与展望	41
结 论	42
参考文献	43
综 述	53

抗 CD40L-Fab 抗体对由 pristane 诱导的人源化 (hCD40/hCD40L) 小鼠狼疮活动指标的改善研究

中 文 摘 要

目的：探究抗 CD40L-Fab 抗体对人源化 (hCD40/hCD40L) 小鼠狼疮活动指标的改善研究

方法：(1) 取人源化 (hCD40/hCD40L) 小鼠 7 只, C57BL/6 小鼠 7 只, 6-8 周龄, 雌性, 每只小鼠 0.5mL pristane 腹腔注射进行 SLE 造模。造模后每两周测量一次小鼠尿蛋白, 尿蛋白试纸测量小鼠尿蛋白 4 次均呈阳性时认为造模成功, 将造模成功的人源化 (hCD40/hCD40L) 狼疮小鼠分为人源化组、造模成功的 C57BL/6 狼疮小鼠分为对照组。(2) 于尿蛋白试纸测小鼠尿蛋白初次阳性起每周收集各组小鼠尿液放入 - 80℃ 冰箱冻存。狼疮小鼠造模成功后, 取人源化组和对照组小鼠血液离心取上清, 冻存于 - 80℃ 冰箱。(3) Pristane 诱导的 SLE 模型小鼠尾静脉注射抗 CD40L-Fab 抗体 0.2mL/只。一周后复打抗体一次。第二次抗体注射 1 月后, 再次收集人源化组和对照组小鼠血液离心取上清, 颈椎脱臼法处死小鼠后酒精浸泡消毒, 无菌操作取出小鼠肾脏、脾脏、肝脏, 取肾脏做石蜡包埋处理, 其余脏器液氮冷冻后放入 - 80℃ 冰箱冻存。于尿蛋白试纸测小鼠尿蛋白初次阳性起每周收集各组小鼠尿液放入 - 80℃ 冰箱冻存。(4) 酶联免疫吸附测定 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 测量两组小鼠血清抗 ds-DNA 抗体含量, 探究人源化组和对照组在注射抗体前后血清中抗 ds-DNA 抗体含量的变化。(5) 二喹啉甲酸法 (bicinchoninic acid assay, BCA) 测量小鼠尿蛋白, 根据人源化组和对照组在注

射抗体前后尿液中蛋白含量的变化，探究抗体对两组狼疮小鼠肾脏功能的影响。(6) 石蜡包埋人源化组和对照组两组狼疮小鼠的肾脏组织，苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色后镜下观察注射抗体后对两组狼疮小鼠肾脏组织的损伤情况。(7) ELISA 法检测小鼠血清中补体蛋白 3 水平，检测人源化组和对照组两组狼疮小鼠在注射抗体前后血清中 C3 的变化。(8) 通过比色法检测人源化组狼疮小鼠在抗 CD40L-Fab 抗体注射前后血清中肝功能重要指标谷草转氨酶和谷丙转氨酶的活力，探究抗 CD40L 抗体的不良反应。

结果：(1) ELISA 法检测抗体注射前后两组狼疮小鼠血清中抗 ds-DNA 抗体含量，与对照组相比，抗体注射后人源化组小鼠血清中抗 ds-DNA 抗体表达较抗体注射前降低，且差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。(2) 对比两组狼疮小鼠肾脏组织石蜡切片 HE 染色结果显示，相比于对照组狼疮小鼠，人源化组肾脏组织石蜡切片肾组织结构轻微异常，肾脏损伤有所缓解。(3) BCA 法检测人源化组和对照组狼疮小鼠注射抗体前后尿蛋白水平变化，对照组小鼠注射抗体后尿蛋白水平逐渐升高，而人源化组狼疮小鼠尾静脉注射抗体后尿蛋白水平降低。(4) ELISA 检测两组小鼠抗体注射前后血清中 C3 补体含量，结果显示尾静脉注射抗体后，人源化组狼疮小鼠血清中补体蛋白 3 含量高于对照组狼疮小鼠，且差异具有统计学意义 ($P < 0.001$)，SLE 症状有所缓解。(5) 通过对比人源化组狼疮小鼠在抗体注射前后血清中 AST、ALT 的水平，结果显示两组数据不存在统计学差异 ($P > 0.05$)。

结论：抗 CD40L-Fab 抗体存在减少人源化 (hCD40/hCD40L) 狼疮小鼠蛋白尿症状的作用，可以减缓人源化 (hCD40/hCD40L) 狼疮小鼠肾脏症状，同时可减少人源化 (hCD40/hCD40L) 狼疮小鼠血清中抗 ds-DNA 抗体的含量，升高血清中的 C3 补体，认为抗 CD40L-Fab 抗体对于 SLE 症状存在一定的缓解作用，可以继续研究以期用于临床治疗。

关键词：系统性红斑狼疮；人源化小鼠模型；狼疮性肾炎；抗 CD40L 抗体

Improvement of lupus activity index in Pristine-induced humanized (hCD40/hCD40L) mice studied by anti-CD40L-Fab antibody

ABSTRACT

Objective:A study to investigate the improvement of lupus activity indexes in humanized (hCD40/hCD40L) mice by anti-CD40L-Fab antibody

Methods:(1) Seven humanized (hCD40/hCD40L) mice and seven C57BL/6 mice, 6-8 weeks of age, female, were injected intraperitoneally with 0.5mL of pristane per mouse for SLE modeling. The urine protein of mice was measured every two weeks after modeling, and the modeling was considered successful when the urine protein test paper was positive for four times, and the mice with successful modeling were divided into the humanized group and the control group. (2) The urine of each group of mice was collected weekly from the first positive urine protein test on urine protein paper and frozen at -80 °C . After successful modeling of lupus mice, the blood of mice in the humanized group and control group was centrifuged and the supernatant was frozen in a -80 °C refrigerator. (3) Pristane-induced SLE model mice were injected with anti-CD40L-Fab antibody 0.2mL/pupil in the tail vein. The antibody was repeated once a week. One month after the second antibody injection, the blood of mice in the humanized group and the control group was centrifuged again to obtain the supernatant, the mice were sterilized by alcohol immersion after cervical dislocation method of execution, the kidneys, spleens, and livers of the mice were removed by aseptic operation, the kidneys were taken to be paraffin embedded, and the rest of the organs were frozen by liquid nitrogen and put into the refrigerator for freezing at -80° C. The mice were then frozen at -80° C for one week. The urine of each group of mice was collected weekly from the first

positive urine protein test on urine protein test paper and frozen in -80°C refrigerator. (4) Measurement of serum anti-ds-DNA antibodies in two groups of mice by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) to investigate the changes in serum anti-ds-DNA antibodies before and after injection of antibodies in the humanized group and the control group. (5) Measurement of mouse urinary protein by bicinchoninic acid assay (BCA) to investigate the effect of antibody on the kidney function of lupus mice in two groups according to the changes of protein content in the urine of humanized group and control group before and after antibody injection. (6) Paraffin-embedded kidney tissues of lupus mice in the humanized group and the control group were stained with hematoxylin-eosin (HE) and then observed under the microscope to see the damage of kidney tissues of lupus mice in the two groups after antibody injection. (7) Detect the level of complement protein 3 in serum of mice by ELISA, and detect the changes of C3 in serum of two groups of lupus mice, the humanized group and the control group, before and after antibody injection. (8) To investigate the adverse effects of anti-CD40L antibody by colorimetrically detecting the viability of glutamic oxaloacetic aminotransferase and glutamic alanine aminotransferase, which are important indicators of hepatic function, in the serum of humanized group of lupus mice before and after anti-CD40L-Fab antibody injection.

Results: (1) ELISA method was used to detect the anti-ds-DNA antibody content in the serum of the two groups of lupus mice before and after antibody injection. Compared with the control group, the expression of anti-ds-DNA antibody in the serum of the mice in the humanized group after antibody injection was reduced compared with that before antibody injection, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). (2) Comparison of the results of HE staining of paraffin sections of kidney tissues from two groups of lupus mice showed that compared with the control group of lupus mice, the paraffin sections of kidney tissues from the humanized group showed slight abnormalities of renal tissue structure and alleviation of renal injury. (3) The BCA method was used to detect changes in urinary protein

levels before and after antibody injection in lupus mice in the humanized and control groups. Urinary protein levels gradually increased after antibody injection in control mice, and decreased after antibody injection in the tail vein of lupus mice in the humanized group. (4) ELISA detected the C3 complement content in the serum of the two groups of mice before and after antibody injection, and the results showed that after tail vein injection of the antibody, the serum content of complement protein 3 in the lupus mice of the humanized group was higher than that in the lupus mice of the control group, and the difference was statistically significant ($P < 0.001$), and the symptoms of SLE were alleviated. (5) By comparing the levels of AST and ALT in the serum of lupus mice in the humanized group before and after antibody injection, the results showed that there was no statistically significant difference between the data of the two groups ($P > 0.05$).

Conclusion: Anti-CD40L-Fab antibody has the effect of reducing proteinuria in humanized (hCD40/hCD40L) lupus mice, and can slow down renal symptoms in humanized (hCD40/hCD40L) lupus mice, and at the same time, can reduce the level of anti-ds-DNA antibody in the serum of humanized (hCD40/hCD40L) lupus mice, and can elevate the C3 complement in the serum. It is believed that anti-CD40L-Fab antibody has a certain alleviating effect on SLE symptoms and can be continued to be investigated with a view to its use in clinical treatment.

Key words: Systemic lupus erythematosus; Humanized mouse model; Lupus nephritis; Anti-CD40L antibody

英汉缩略词对照表

英文缩写	英文全称	中文全称
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay	酶联免疫吸附测定
BCA	Bicinchoninic Acid Assay	二喹啉甲酸法
HE	Hematoxylin-Eosin	苏木精-伊红
SLE	Systemic Lupus Erythematosus	系统性红斑狼疮
EULAR	European League Against Rheumatism	欧洲抗风湿病联盟
ACR	American College of Rheumatology	美国风湿病学会
LN	Lupus Nephritis	狼疮肾炎
SNECs	Secondary Necrosis Cells	继发性坏死细胞
IC	Immune Complex	免疫复合物
pDCs	Plasmacytoid Dendritic Cells	浆细胞样树突细胞
ANCA	Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibodies	抗中性粒细胞胞浆抗体
TLR	Toll-like Receptors	TOLL 样受体
MHC	Major Histocompatibility Complex	主要组织相容性复合体
HLA	Human Leukocyte Antigen	人类白细胞抗原
TCR	T Cell Receptor	T 细胞受体
APC	Antigen Presenting Cell	抗原呈递细胞
TNFR	Tumor Necrosis Factor Receptor	肿瘤坏死因子受体
TNF	Tumor Necrosis Factor	肿瘤坏死因子
DC	Dendritic Cell	树突状细胞
BCR	B Cell Receptor	B 细胞受体
Th cell	T Helper Cell	辅助性 T 细胞

mCD40	Membrane CD40	膜 CD40
sCD40	Soluble CD40	可溶性 CD40
CRD	Cysteine-Rich Domain	半胱氨酸富集区域
THD	TNF Homology Domain	TNF 同源结构域
ADAMs	A Disintegrin and Metallo-Proteinases	去整合素和金属蛋白 酶
TACE	TNF α Converting Enzyme	肿瘤坏死因子 α 转换酶
ADP	Adenosine Diphosphate	双磷酸腺苷
HPC	Hematopoietic Progenitor Cell	造血祖细胞
TE	Thrombus Embolism	血栓栓塞
SLEDAI	SLE Disease Activity Index	系统性红斑狼疮疾病 活动指数
GPT	Glutamic Pyruvic Transaminase	丙氨酸氨基转移酶
SPF	Specific Pathogen Free	健康无特定病原体
Anti ds- DNA	Anti Double -stranded-DNA Antibody	抗双链 DNA 抗体
HRP	Horseradish Peroxidase	辣根过氧化物酶
GVHD	Graft-Versus-Host Disease	移植物抗宿主病
GOT	Glutamic Oxaloacetic Transaminase	天冬氨酸氨基转移酶
ANA	Anti- Nuclear Immune Antibody	抗核抗体
CNS	Central Nervous System	中枢神经系统
NMDAR	N-Methyl-D-Aspartate Receptor	抗 N-甲基-D-天冬氨 酸受体
TLS	Tertiary Lymphoid Structures	三级淋巴结构
MAC	Membrane Attack Complex	膜攻击复合物

前 言

系统性红斑狼疮（Systemic Lupus Erythematosus, SLE）是一种慢性自身免疫性疾病,这种疾病累及全身多个系统器官组织,约有 80%的患者出现皮肤损伤,典型表现为面部蝶形红斑,几乎所有病人肾脏均有病理变化。SLE 的诊断表现为广泛的临床症状和自身免疫抗体的出现。这种疾病的临床症状和血清学标志物存在多样异质性,因此临床诊断必须同时考虑各种临床特征、血清学表现、影像学和组织病理学。系统性红斑狼疮对肾脏系统带来的影响损伤尤为严重。2012 年 ACR 狼疮肾炎（lupus nephritis, LN）管理指南将患者分为有 LN 表现组和无 LN 表现组,有临床表现者约 75%,可表现为不同病理类型的肾炎和肾病综合征,高达 30%的 LN 病例在诊断 15 年内进展为终末期肾脏疾病,肾脏功能的损害是 SLE 患者死亡的重要原因之一;除了关节和肌肉受累外,系统性红斑狼疮（SLE）还可能出现心血管和神经系统的症状。目前尚无确切证据可以证明 SLE 的病因,但众多研究表明,遗传、激素、感染以及环境等因素都与该疾病的发病有关。该疾病的特征主要包括 T、B 细胞的异常活化、自身抗体的产生,以及免疫复合物的沉积^[1]。

人体内的免疫系统分为非特异性免疫系统和特异性免疫系统,均存在失调的免疫反应,而这种失调的免疫反应正是 SLE 发病的关键^[2]。在非特异性免疫系统中,免疫系统通常无法获得核抗原,凋亡细胞由巨噬细胞和未成熟的树突细胞清除,但在环境、感染等因素下导致大量细胞凋亡时,凋亡细胞和中性粒细胞特异性死亡（NETosis）的清除率受损是 SLE 发病机制发生的主要因素^[3-4]。凋亡细胞的清除率低下会导致继发性坏死细胞（secondary necrosis cells, SNECs）的积累,循环的 SNEC 细胞被自身抗体致敏^[5],从而导致组织免疫复合物（immune complex, IC）沉积,IC 在血液中被巨噬细胞和树突状细胞清除,由于 SLE 患者血液中的树突细胞功能异常,树突细胞亚型浆细胞样树突细胞（plasmacytoid dendritic cells, pDCs）数量增多,pDCs 的独特能力是产生数量极高的 I 型干扰

素^[6]。而 I 型干扰素的 IFN- α 亚型与 SLE 存在密切关系,大量 IFN- α 的产生会抑制多种细胞增殖和器官损伤,在免疫系统中 IFN- α 的表达可引起树突状细胞活化和参与免疫调节作用。此时未清除的含 DNA 的中性粒细胞胞外陷阱(NETs)可作为自身抗原的来源,并启动抗中性粒细胞胞浆抗体 (anti-neutrophil cytoplasmic antibodies, ANCA)^[7-8]。pDCs 吞噬抗中性粒细胞胞浆抗体 (ANCA)免疫复合物导致 IFN- α 的释放增强,恶性循环导致更多 IC 的形成和沉积,导致包括肾脏在内的主要器官的损伤。

且当含有核抗原的细胞凋亡碎片无法被迅速清除,这些凋亡碎片就可以通过激活核酸识别受体来刺激炎症反应,如 TOLL 样受体 (Toll-like receptors, TLR) 家族^[9]。机体发生炎症反应时,高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group box-1 protein, HMGB1) 释放,刺激 T 细胞和树突细胞的激活。另一方面, HMGB1 作为一种核蛋白,又可以刺激核酸抗体的生成^[10],核酸抗体与 pDCs 表面的 FC 受体结合,由位于细胞内囊泡的 TLR7 和 TLR9 识别后^[11-13],激活 pDCs 分泌大量 I 型干扰素,刺激细胞表面存在主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) 表达分子的树突状细胞活化,干扰素可增强各种细胞对 MHC I 类和 II 类分子的表达^[14]。人类的 MHC 被称为人类白细胞抗原 (human leukocyte antigen, HLA),HLA I 类分子的重要生理功能是向 CD8+ T 细胞呈递内源性抗原的过程,HLA II 类分子的重要生理功能是向 CD4+ T 细胞呈递外源性抗原的过程^[15]。在识别过程中, T 细胞受体 (T cell receptor, TCR) 特异性识别抗原呈递细胞 (antigen presenting cell, APC) 呈递的抗原时,必须同时识别与抗原肽结合成复合物的 MHC 分子,才能产生 T 细胞激活信号,称为 MHC 的限制性^[16]。TCR+抗原+MHC 分子复合物为 T 细胞活化的第一信号,第二信号是共刺激信号,CD40 是肿瘤坏死因子受体(tumor necrosis factor receptor, TNFR) 家族的成员,CD40 在抗原提呈细胞如 B 细胞、树突状细胞(dendritic cells, DC) 和单核细胞以及许多非免疫细胞和各种类型的癌细胞上表达。可由 T 细胞表达的 CD40L 一种共刺激分子,其与 B 细胞表达的 CD40 相互作用作为二级信号^[17]。

第三信号是细胞因子信号，T 细胞通过 CD40-CD40L 结合激活 APC，激活后的抗原呈递细胞通过增强白介素 2、白介素 4 和白介素 12（IL-2、IL-4、IL-12）等细胞因子的分泌，促进 T 细胞分化，引发有效的细胞毒性 T 淋巴细胞反应^[18]。同时，T 细胞表面的 CD40L 与 APC 表面的 CD40 的结合也使 MHC、共刺激和粘附分子的表达增加，诱导促炎趋化因子和细胞因子的增强，进一步活化 T 细胞。B 细胞激活需要 T、B 细胞间发生相互作用。抗原与 B 细胞受体（B cell receptor, BCR）结合是 B 细胞激活的第一信号。B 细胞活化所需的第二信号^[19]通常由辅助性 T 细胞提供（T helper cell, Th 细胞），是 B 细胞和 Th 细胞间直接的相互作用，当激活的 Th 细胞表面存在的 CD40L 识别连接到 B 细胞表面上的 CD40 蛋白时，就开始输送共刺激信号。活化的 T 细胞分泌的细胞因子与共刺激信号共同影响 B 细胞的活化。B 细胞活化后可以激活自身反应性 T 细胞发挥抗原呈递功能，分泌细胞因子和抗体激活体内的炎症反应，还能通过分泌自身抗体形成免疫复合物对多器官造成损伤^[20]。

CD40，也称为 Bp50，是一种 I 型膜糖蛋白。CD40 在细胞中有两种形式存在：膜单体 CD40（membrane CD40, mCD40）和可溶性单体 CD40（soluble CD40, sCD40）。CD40 的胞外结构域的特征在于存在 4 个半胱氨酸富集区域（cysteine-rich domains, CRDs）^[21]。免疫细胞处于静息状态中，在没有 CD40L 的情况下，一部分 mCD40 和 sCD40 在细胞外结构域中的 CRD1 的作用下自组装成非共价同源二聚体^[22]。CD40L 也称为 CD154，是一种 II 型膜糖蛋白，CD40L 具有与 CD40 结合的能力。CD40L 在免疫细胞中同样存在可溶性单体 CD40L（soluble CD40L, sCD40）和膜单体 CD40L（membrane CD40L, mCD40L）。CD40L 在细胞外区域包含一个保守的 TNF 同源结构域（TNF homology domain, THD），可实现三聚体化和受体结合^[23]。在静息条件下，CD40L 表达为膜单体 CD40L，其可自组装成非共价同源三聚体并储存在细胞内。细胞活化后，膜 CD40 会转运到细胞表面，一部分 mCD40 与 mCD40L 结合后被去整合素和金属蛋白酶（A Disintegrin and Metallo-proteinases, ADAMs）蛋白水解，生成可溶性 CD40L 三

聚体。其余一部分膜 CD40L 先被去整合素和金属蛋白酶蛋白水解后,再与 mCD40 结合。mCD40 作为三聚体的重要组成部分,无论与 mCD40L 还是 sCD40L 结合,均诱导 mCD40 三聚体化,上调信号分子,进行随后的信号转导,最后导致细胞的活化,产生多种下游效应。三聚体连接后,部分 mCD40 三聚体还可被细胞表面的肿瘤坏死因子 α 转换酶 (TNF α converting enzyme,TACE) 分解为 sCD40。通过裂解 CD40 与 CD40L 形成的三聚体来拮抗 CD40 与 CD40L 相互作用^[24]。CD40L 由多种免疫细胞表达,与其受体 CD40 结合,CD40 可由免疫细胞和非免疫细胞表达,两者相互作用、共同参与机体内 T 细胞、B 细胞活化以及血小板活化等功能。对于 B 细胞的多种影响主要包括 B 细胞增殖^[25]和增强 B 细胞对细胞因子的反应^[26]、高亲和力抗体产生、B 细胞记忆反应等,这些影响对于体液反应是必不可少的。T 细胞和抗原呈递细胞之间的 CD40-CD40L 相互作用会触发双向信号传导,包括正向和反向信号。反向信号介导抗原呈递细胞的激活和分化,正向信号介导 T 细胞、B 细胞的活化和分化^[27,28]。对于 T 细胞的影响主要在于 CD4⁺T 细胞的分化,T 细胞上的 CD40L 与 DC 上的 CD40 结合诱导 DC 产生 IL-12,导致 T 细胞倾向 Th1 方向分化^[29]。超过 90% 的循环 sCD40L 来自活化的血小板。活化的血小板可表达高水平的 CD40L。CD40-CD40L 相互作用调节血小板活化。凝血酶、胶原蛋白和双磷酸腺苷 (adenosine diphosphate, ADP) 等多种血小板激活剂可诱导血小板聚集体的形成^[30]。CD40-CD40L 相互作用还可参与血小板-白细胞聚集体 (PLA) 的形成,在炎症部位,血管内贴壁的血小板通过 CD40-CD40L 相互作用捕获白细胞,导致白细胞浸润。它们与心血管疾病、类风湿性关节炎等多种炎症和血栓形成疾病有关^[31]。此外 CD40-CD40L 相互作用还可影响造血祖细胞 (hematopoietic progenitor cells,HPC) 向髓系分化,髓系细胞在广义上包括粒细胞、红细胞、巨噬细胞和单核细胞等免疫细胞。CD40-CD40L 相互作用还可对肿瘤细胞的功能变化进行调节,例如肿瘤细胞的存活和增殖,有时还与细胞凋亡和生长停滞有关,具体取决于肿瘤细胞类型和免疫微环境。

上述 CD40 与 CD40L 相互作用的功能印证了 CD40-CD40L 通路对自身免疫

性疾病和对多种炎症细胞的影响,CD40-CD40L 通路已成为调节自身免疫性疾病和移植排斥反应的一个有吸引力的靶点。因此,本研究选定 CD40-CD40L 刺激分子作为靶点,研究阻断 CD40-CD40L 相互作用的药物以期缓解 SLE 患者症状及预后。

许多试验都曾就 CD40-CD40L 的相互作用进行阻断试验,试验证明抗 CD40L 抗体及 CD40 拮抗剂确实可以缓解 SLE 小鼠的疾病症状^[32,33]。临床研究抗 CD40L 抗体主要以 hu5c8 (抗 CD40L IgG1, Biogen 公司)和 IDEC-131 (抗 CD40L IgG1, Idec 公司)为对象,研究取得了有意义的结果,并且 hu5c8 抗体在狼疮肾炎患者身上产生了积极的临床效果。然而,这些早期临床试验出现的血栓栓塞 (thrombus embolism, TE) 事件,从而阻碍了这些抗体的进一步开发^[34]。在抗 CD40L 抗体的一项二期研究中,五名患者接受了 2 至 4 个剂量的抗 CD40L 抗体药物与标准护理相结合的治疗,观察到患者自身抗体滴度、蛋白尿和系统性红斑狼疮疾病活动指数 (SLE Disease Activity Index, SLEDAI) 下降,所有这些都在停止治疗后得以维持。然而,由于这些患者的血栓栓塞事件增加,试验被终止^[34-36]。第一代抗 CD40L 抗体相关的血栓栓塞事件可能是由可溶性 CD40L 和抗 CD40L 抗体组成的免疫复合物引起的,通过 Fc γ 受体激活血小板后引起了聚集^[37,38]。与 FC γ 受体结合的区域为免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG) 上的 FC 片段, IgG 是血清中存在的主要抗体,一种大分子免疫球蛋白,主要由两条相同的重链 (H 链) 和两条分子量相对较小的相同的轻链 (L 链) 组成,这些链通过链间二硫键连接,呈现为 Y 字型的结构。经氨基酸序列分析,不同抗体分子 N 端约 110 个氨基酸序列变化较大,而其他区域的氨基酸序列相对恒定。因此,将抗体分子轻链和重链靠近 N 端氨基酸变化较大的区域称为 V 区,分别占重链和轻链的 1/4 (VH) 和 1/2 (VL); 将靠近 C 端氨基酸序列相对恒定的区域称为 C 区,分别占重链和轻链的 3/4 (CH) 和 1/2 (CL)。IgG 可以被蛋白水解酶裂解成较小的片段, Fab 片段和 Fc 片段^[39]。Fab 片段含有完整的轻链和重链的上端,主要发挥特异性结合抗原的功能。而 Fc 片段含有两个重链的下端,不与

抗原结合，但与补体结合，参与凝集、组织致敏等反应。

综合以往论文观点，本实验针对 CD40-CD40L 的相互作用自主改造抗 CD40L 抗体，尝试在不出现其他不良反应的情况下改善 SLE 小鼠的狼疮症状，为临床治疗系统性红斑狼疮提供一个新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 人源化 (hCD40/hCD40L) 小鼠与 C57BL/6 小鼠

健康无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级人源化 (hCD40/hCD40L) 小鼠 7 只, 6-8 周龄, 雌性, 体重 ($20 \pm 1\text{g}$), 购自中国上海南方模式生物科技股份有限公司, 许可证号: SCXK (粤) 2022-0062。

健康无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级 C57BL/6 小鼠 7 只, 6-8 周龄, 雌性, 体重 ($20 \pm 1\text{g}$), 购自中国长沙天勤生物技术有限公司, 许可证号: SCXK (湘) 2014-0011。两组小鼠均饲养于右江民族医学院实验动物中心 (NO.SYXK 2017-0004)。按照昼夜节律 12h 光亮/12h 黑暗交替, 实验动物饲养房室内相对湿度为 40-60%, 温度为 22-25℃, 实验动物自由摄取食物和水。适应性饲养一周后观察动物状态良好、行为无异常, 即可开始进行实验。使用高压灭菌过的垫料以及高脂肪低蛋白的饲料, 采用高压灭菌的纯水作为饮用水饲养。所有动物研究均获得右江民族医学院动物实验伦理委员会的批准。

1.1.2 主要试剂与耗材

试剂名称	公司名称
Pristane 试剂	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
1mL 注射器	浙江康乐药业股份有限公司
尿蛋白试纸	广州高尔宝生物技术有限公司
0.9%生理盐水	浙江康乐药业股份有限公司
无水乙醇	广州市科玛化学技术有限公司
1.5mLEP 管	百赛生物
4%多聚甲醛	Biosharp 生物科技有限公司
小动物手术器械	上海玉研科学仪器有限公司
刀片	赛默飞世尔科技
载玻片	江苏世泰实验器材有限公司
盖玻片	江苏世泰实验器材有限公司
HE 染色试剂盒	北京索莱宝生物科技有限公司
中性树脂	北京索莱宝生物科技有限公司
抗 ds-DNA 测量试剂盒	上海酶联生物科技有限公司
磷酸盐缓冲液 PBS	北京索莱宝生物科技有限公司
200μL EP 管	上海依科赛生物制品有限公司

10mL、15mL 和 50mL 离心管	上海依科赛生物制品有限公司
DEPC 水	北京索莱宝生物科技有限公司
BCA 蛋白定量试剂盒	苏州博奥龙生物科技有限公司
96 孔板	美国 Corning 公司
二甲苯	西陇科学股份有限公司
石蜡	上海华永石蜡有限公司
各种规格移液枪枪头	上海依科赛生物制品有限公司
丙氨酸氨基转移酶（谷丙转氨酶/ALT）测试盒	南京建成生物工程研究所
天门冬氨酸氨基转移酶（谷草转氨酶/AST）测试盒	南京建成生物工程研究所
小鼠（Mouse）补体蛋白 3（C3）ELISA 检测试剂盒	上海酶联生物科技有限公司
Amicon Ultra 10K 超滤离心管	德国默克密理博公司
氢氧化钠	上海阿拉丁生化科技股份有限公司

1.1.3 主要实验仪器

实验仪器名称	公司名称
微型混匀器	INTLLAB
低温高速离心机	德国 Sigma 公司
-80℃冰箱	赛默飞世尔科技（中国）有限公司
4℃、-20℃冰箱	青岛海尔股份有限公司
脱水机	英国 Thermo Shandon Limited
石蜡包埋机	英国 Thermo Shandon Limited
石蜡切片机	赛默飞世尔科技（中国）有限公司
反渗透超纯水机	四川沃特尔水处理设备有限公司
多功能酶标仪	美国珀金埃尔默仪器有限公司
烤片机	常州国华仪器制造有限公司
烘箱	赛默飞世尔科技（中国）有限公司
超净工作台	苏州苏信净化设备厂
立式圆形压力蒸汽灭菌锅	中国松下冷链（大连）有限公司
显微镜	日本 OLYMPUS 公司
制冰机	宁波新芝生物科技股份有限公司
荧光显微镜	日本 OLYMPUS 公司
电子天平	上海天美天平仪器有限公司
液氮罐	成都华能低温设备制造有限公司
移液器	德国 Eppendorf 公司
恒温金属浴	上海净信实业发展有限公司

1.2 实验方法

1.2.1 抗 CD40L-Fab 抗体的设计

为研究治疗 SLE 的靶向药物,本课题小组设计了抗 CD40L-Fab 抗体,抗 CD40L-Fab 抗体表达是由含轻链和重链的 Fab 序列通过 GGGGS linker 连接表达载体,不表达 Fc 片段,构建重组质粒,在其转化入 E.coli 菌株后,诱导其在宿主菌内表达目的蛋白质,通过分析表达样品的 SDS-PAGE 检测方法筛选出最佳表达条件后进一步扩大培养,制备重组表达菌株蛋白提取物,纯化目的蛋白。

1.2.2 人源化 (hCD40/hCD40L) 小鼠与 C57BL/6 小鼠的饲养

南方模式生物科技股份有限公司与长沙天勤生物技术有限公司将小鼠以 SPF 级防护水平包装运送至右江民族医学院实验动物中心,接收后首先使用稀释过的次氯酸钠溶液擦拭包裹表面,随后放入实验动物中心消毒室紫外线照射灭菌 30min,随后穿戴好口罩、帽子和防护服风淋后进入 SPF 实验室内,取消毒过的鼠笼、笼盖、垫料、饲料以及小鼠饮水瓶进入检疫室,着人于消毒室中将小鼠通过传递窗传递入检疫室中,检查小鼠状态及性别,无误后按每笼 3-4 只小鼠喂养,写好每笼标签,小鼠饲养需要每 2-3 天检查小鼠饲料及饮水情况,一周左右更换垫料及鼠笼,在检疫室观察一周无特殊情况后将小鼠移入实验室中。

1.2.3 人源化 (hCD40/hCD40L) 小鼠与 C57BL/6 小鼠的分组、狼疮小鼠模型建立

(1) 将 7 只 C57BL/6 小鼠(人源化(hCD40/hCD40L)小鼠亲本小鼠)分为对照组,7 只人源化(hCD40/hCD40L)小鼠作为人源化组,共两组进行狼疮小鼠模型的制备。

(2) 将建立狼疮小鼠模型所用的冰盒、1mL 注射器、酒精、棉球、微型震荡器、pristane 试剂、尿蛋白试纸喷洒 75%酒精后放入传递窗紫外线照射 30min 消毒,随后穿戴好口罩、帽子和防护服风淋后进入 SPF 实验室内,经传递窗拿取物品,按 0.5mL/只 pristane 的剂量进行腹腔注射,穿戴好厚手套抓取小鼠,固定好小鼠的头部,以防被咬。小鼠体位应为腹部向上,头呈低位。在使用酒精棉球消毒小鼠腹部皮肤后,右手应握紧注射器,在小鼠后肢根部连线处的任一侧 1.5cm 处注射。在缓慢以 45 度左右角度进针的同时,进针深度应小于 1cm。当感受到局部皮肤凹陷消失和落空感后,再进行注射。最后,为了防止漏液,应轻微旋转针头并缓缓拔出,同时用碘伏棉球擦拭。注射后,应

仔细观察小鼠腹部皮肤，若有鼓包出现则为皮下注射。

(3) 腹腔注射 pristane 后每周使用尿蛋白试纸进行小鼠尿蛋白粗略检测，尿蛋白试纸检测小鼠尿蛋白阳性 4 次即证明狼疮小鼠模型建立成功。

1.2.4 抗 CD40L-Fab 抗体的超滤

(1) 超滤离心管预清洗：根据厂家提供的超滤离心管说明书，Amicon Ultra 10K 超滤离心管中的超滤膜中含有痕量甘油成分。该成分可能对抗体超滤效果产生不利影响，同时对后续分析可能产生一定干扰。因此，在使用前，建议使用 0.1 mol/L 的 NaOH 配制液对离心管进行清洗处理。实验中，我们选用定角转子低温超速离心机，并根据超滤离心管说明书中的规定，每个超滤离心管可加入的液体不超过 12mL。在实验过程中，我们向两个超滤离心管分别加入 12mL NaOH 溶液，于室温下静置 10min 后，采用离心机以 4000xg 的离心速度进行离心 10min，倒掉废液，并用超纯水清洗后甩干。需要注意的是，Amicon Ultra 10K 超滤离心管的超滤膜在湿润过后应避免变干，以避免超滤膜损坏而带来的对超滤效果的影响，预清洗后需尽快使用，否则应留存液体在超滤离心管中，保持湿润直至使用。预清洗使用过的 NaOH 溶液应按规定倒入废液缸。

(2) 首先穿戴好白大褂、口罩、帽子，一次性乳胶手套，使用酒精擦拭超净工作台台面 2-3 次，将准备好的各种规格枪头、移液枪、试管架、15mL Amicon Ultra 10K 超滤离心管、震荡器、一次性乳胶手套、黑色记号笔、冰盒及 24 管 1mL/管未超滤的抗 CD40L-Fab 抗体、废液缸等物品使用酒精棉球擦拭后放入超净工作台，打开超净工作台紫外线灯定时照射灭菌 30min。

(3) 超净工作台灭菌结束后，用酒精喷壶喷洒酒精至双手后，移入超净工作台，将 24 管未超滤的抗 CD40L-Fab 抗体使用震荡器依次震荡，混匀后使用移液枪转移至超滤离心管中，每个超滤离心管各加入 12mL 未超滤的抗 CD40L-Fab 抗体，根据超滤离心管说明书中提供的实验室数据，使用定角转子离心机的 10K 超滤离心管以 12mL 的起始体积、4000xg 的离心力，4℃ 情况下，离心时间 20min 超滤效果较佳。将超滤离心管放入离心机时，注意使超滤内管的膜面朝上。

(4) 离心结束后，取出超滤离心管，关闭离心机电源，打开盖子。

(5) 用酒精棉球擦拭双手及超滤离心管，移入超净工作台，使用 200 μ L 枪头插入超滤离心管内管中，左右移动吸取过滤后抗体，确保抗体完全回收，注意不要损坏超滤离心管滤过膜。

(6) 将所有收集到的抗体使用震荡器混匀后以 200 μ L/管分装，保存于-80℃冰箱中。

(7) 收拾超净工作台台面，喷洒酒精并擦拭，关闭通风，紫外线照射 30min，并将废液缸及垃圾带至污物处理间分类处理。

1.2.5 小鼠尿液标本的采集

通过腹腔注射 pristane 对 C57BL/6 小鼠以及人源化 (hCD40/hCD40L) 小鼠进行狼疮造模，每周使用尿蛋白试纸对小鼠进行蛋白尿的粗略测量，于尿蛋白试纸测小鼠尿蛋白初次阳性起每周收集各组小鼠尿液于 200 μ L EP 管中，收集小鼠尿液时，可用手抓起小鼠，固定好小鼠后，轻按小鼠外生殖部位上方，刺激膀胱排尿；或将小鼠放置于桌面上，固定前肢，将小鼠尾巴向上方牵拉刺激排尿；也可使用 200 μ L EP 管轻刮小鼠外生殖部位刺激排尿，收集好尿液后，做好标记放入 - 80℃冰箱冻存。

1.2.6 针对人源化组 and 对照组狼疮小鼠尾静脉注射给药。

(1) 准备好冰盒、1mL 注射器、75%酒精、棉球、微型震荡器、小鼠固定器、抗体喷洒 75%酒精后放入传递窗紫外线照射 30min 消毒，随后穿戴好口罩、帽子和防护服风淋后进入 SPF 实验室内，经传递窗拿取物品。

(2) 在进行小鼠静脉穿刺时，应优先选取小鼠尾巴背侧的两侧静脉进行操作，而两侧静脉中粗细程度以侧面静脉为佳，且其走向清晰明了，建议在距离鼠尾远端 1/3 处的侧面静脉进行穿刺。

(3) 首先，将小鼠固定在固定器上，使得其尾部充分暴露，接着通过将小鼠尾部置于温水中浸泡三十秒或者用酒精擦拭的方式扩张血管并让其充盈，从而使得小鼠尾部更加适合于进针操作。

(4) 针对鼠尾静脉的注射，采用 1mL 注射器针头斜面朝上进针，将左手拇指、食指和无名指从下方托起其尾巴，用无名指和小指夹住其末梢，右手持药物注射器的姿势，使针头在距离鼠尾尖 1/4 处（约距离尾尖 2-3 厘米的位置）与静脉平行后，缓慢注射药

液。如果注射过程推药时无阻力，且血管整条会立即由红色变为白色，同时无白色皮丘出现，那么表示针头已经进入静脉，可以正式注入药物。完成药物注射后，血管又将立即变为红色。针尖刺入后，平行进针，推针不应过快，推针太快小鼠容易休克甚至死亡。

(5) 用干的棉球或纱布止血。

(6) 观察小鼠状态。

对照组以及人源化组狼疮小鼠各自尿蛋白测量阳性 4 次后，进行尾静脉注射抗 CD40L-Fab 抗体 0.2mL/只，一周复打抗体一次，过程中仍为每周一测尿蛋白并收集尿液样本。

1.2.7 小鼠血清的标本采集

(1) 准备好冰盒、2mL 注射器、做好标记的 1.5mL EP 管和 200 μ L EP 管。

(2) 托起小鼠躯干使身体与地面平行。使用 2mL 注射器，用左手食指触摸到心搏动处，右手持注射器垂直刺入心脏，抽取所需血量。

(3) 将抽取到的血液转移到 1.5mL EP 管中，将 EP 管室温静置 20min，在 4℃ 条件下的低速冷冻离心机离心，设置转速为 3500 rpm/min，离心 5min。

(4) 离心结束后，取出 EP 管，可见血液分为三层（上层为淡黄色血清，中间层为白色膜状物，下层为血细胞沉淀）。

(5) 用 100 μ L 移液器将上层血清转移至对应标记好的 200 μ L EP 管中，放置在 -80℃ 冰箱保存以备后续检测使用。

1.2.8 肾脏组织的采集和保存

(1) 准备好冰盒、提前高压灭菌好的小鼠手术器械、有齿镊、无齿镊、培养皿、纱布、手术单、记号笔、75%酒精、生理盐水、4%多聚甲醛、标记好的 1.5mL EP 管、液氮罐、巴氏吸管、液氮。

(2) 将心脏取血结束的小鼠处死后放入培养皿 75%酒精浸泡消毒 5min，消毒后将小鼠呈仰卧状放置于手术单上，使用小鼠手术器械于腹中线剖开小鼠腹腔，充分暴露，在腹后壁找到小鼠左右两肾，分离后于生理盐水中清洗残留血液、去除肾包膜和肾蒂组织。

(3) 取材于冰盒上进行, 将每只小鼠的一个肾液氮冻存后放入-80℃保存, 另一肾放入 4%多聚甲醛中固定用于后续制成石蜡切片后 HE 染色, 对每个小鼠肾脏做好标记。

1.2.9 制作小鼠肾脏石蜡切片

(1) 小鼠肾组织固定: 小鼠处死后取一肾, 于生理盐水中对肾组织未摘除干净的肾蒂及周围包膜和结缔组织进行修剪, 操作后用生理盐水清洗多余的血液, 置于 4%多聚甲醛中 24 小时。

(2) 将固定好的小鼠肾组织放置于包埋盒里, 盒上用铅笔标记小鼠组织编号, 盖上包埋框, 置于提前设置好程序的脱水机中; 程序如下:70%酒精 55min--80%酒精 55min--95%酒精 50min--95%酒精 1h--100%酒精 1h--100%酒精 1h--二甲苯 I 30min--二甲苯 II 30min--二甲苯 III 30min--石蜡 40min--石蜡 50min--石蜡 50min。

(3) 提前预热生物组织包埋机, 充分融化机器内的石蜡。将脱水完成的小鼠肾脏组织放入包埋模具中间缓慢倒入石蜡, 避免在蜡块中产生气泡影响后续切片染色实验, 加入适量石蜡后, 将包埋模具迅速置于-20℃冷冻台降温定型, 待蜡块完全凝固为固体后, 小心拆卸模具, 取出成型的蜡块, 使用刀片修剪后-20℃存放蜡块。

(4) 切片制作: 将预冷的蜡块固定在石蜡切片机上, 使蜡块的切面与刀口成平行方向, 刀的倾斜度通常 15℃, 转动轮转推进器, 调节切片厚度为 4 μm, 切成厚度均匀的切片。左手持毛笔, 右手旋动切片机转把, 切片带出来之后, 用毛笔轻轻托起, 再用镊子轻镊蜡片, 以正面放入展片箱中, 其水温 45℃左右依靠水的张力将组织切片展平。待摊平整后捞片。贴附切片左手持载玻片之一端, 垂直入水去附贴切片, 右手用镊子辅助推动, 附贴至玻片上的三分之二处。切片贴附后, 先倚靠展片箱沥干水分, 放在空气中稍晾干, 后放置 65℃烤片机上烤 1h, 再放置烘箱内烘烤 2h, 常温保存备用。

1.2.10 小鼠肾脏组织石蜡切片 HE 染色

HE 染色 (hematoxylin-eosin staining) 亦称为苏木精-伊红染色, 是一种应用最为广泛的组织病理染色方式。该染色方法的原理在于利用细胞组织结构酸性和碱性之间的互补作用, 使细胞器和细胞核等物质在显微镜下清晰可见。所谓苏木精, 则是一种带正电荷的碱性染料, 主要与细胞核内主要成分脱氧核糖核酸相结合呈现出蓝紫色。而伊红则

是一种带负电荷的酸性染料，主要与带正电荷的蛋白质结合，从而使得细胞浆、基底膜、胶原纤维、肌纤维等呈现出粉红色染色效果。且 HE 染色不含有毒物质，不会对组织造成不良影响，是一种非常安全的组织病理学染色技术。

(1) 石蜡切片脱蜡：依次将石蜡切片放入二甲苯 I 10min-二甲苯 II 10min-二甲苯 III 10min-无水乙醇 I 5min-无水乙醇 II 5min-90%酒精 5min-80%酒精 5min-70%酒精 5min-50%酒精 5min 梯度脱蜡。

(2) 苏木素染细胞核 0.5-1min，结束后流水冲洗 1min。

(3) 用 1%盐酸酒精溶液分化数秒，流水冲洗。

(4) 然后 1%氨水水溶液返蓝 1min，流水冲洗数秒。

(5) 放入伊红染液中染色数秒，流水漂洗。

(6) 脱水封片：石蜡切片依次放入 75%乙醇 2min -85%乙醇 2min-无水乙醇 5min -无水乙醇 5min -二甲苯 5min 透明。

(7) 透明步骤结束后，将玻片从二甲苯中拿出来自然风干。

(8) 在切片中间滴加中性树脂，从边缘轻轻盖上盖玻片直至封片。

(9) 显微镜下观察：HE 染色中，可见蓝色的细胞核，以及红色的细胞质。

1.2.11 系统性红斑狼疮血清标志物抗 ds-DNA 抗体的检测

抗双链 DNA 抗体 (anti double -stranded-dna antibody, anti -ds-dna antibody) 是一类抗 DNA 抗体，其中，抗 ds-DNA 抗体作为抗体亚型之一，表现出对系统性红斑狼疮的特异性反应。此外，该种抗体的水平还可作为系统性红斑狼疮的疾病活动度判断指标，特别是与活动性狼疮性肾炎密切相关，进一步确定了其在系统性红斑狼疮的诊断和疗效观察中的重要作用。这一指标的检测原理是通过酶联免疫吸附测定 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 小鼠血清中抗 ds-DNA 抗体，购于上海酶联生物科技有限公司的 ELISA 试剂盒应用间接法测定小鼠血清中抗 ds-DNA 抗体水平。采用纯化后的抗原包被微孔板，制备固相抗原。在微孔孔洞中加入小鼠血清和辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP)，经过严格的洗涤后再加入底物 TMB (化学成分名为 3,3',5,5'-四甲基联苯胺) 进行显色。TMB 在 HRP 的催化下转化成蓝色，并在酸作用下

最终转化成黄色。通过对 450nm 波长下测定得出的吸光度 (OD 值), 根据标准曲线计算出样品中小鼠抗 ds-DNA 抗体的含量。

(1) 准备好冰盒、各种规格移液器枪头、各种规格移液器、蒸馏水、纸巾、75% 酒精、1.5mL EP 管、抗 ds-DNA 抗体检测试剂盒。将放置于-80℃的血清于冰盒内溶解, 使用前使用微型震荡器震荡。

(2) 将 ELISA 测定小鼠抗 ds-DNA 抗体试剂盒从冷藏环境中取出, 在室温下平衡 60 分钟后方可使用。

(3) 标准品的稀释与加样: 在酶标包被板上设标准品孔 12 孔, 首先向第一、第二空孔中加入标准品 50 μ L, 并分别加入 50 μ L 标准品稀释液, 之后充分混合。接下来, 从第一、第二孔中各取 50 μ L 的混合物加入第三和第四的空孔中, 再向第三、第四孔中加入 50 μ L 标准品稀释液, 混合均匀; 然后在第三孔和第四孔中各取 50 μ L 分别加到第五、第六孔中, 再在第五、第六孔中分别加标准品稀释液 50 μ L, 混匀; 分别向第五和第六的空孔中加入 50 μ L 的混合物, 再向它们中加入 50 μ L 标准品稀释液, 再度混合均匀。混合好之后, 从第五和第六容器中分别各取 50 μ L 的混合物加入第七和第八空孔中, 接着再向第七、第八孔中加入 50 μ L 标准品稀释液, 混合均匀后将第七、第八容器中分别取出 50 μ L 的混合物加入第九和第十个空孔中。再在第九第十孔分别加标准品稀释液 50 μ L, 混匀后从第九第十孔中各取 50 μ L 弃掉。第十一第十二孔个加入 50 μ L 蒸馏水。(稀释后各孔加样量都为 50 μ L, 标准品浓度依次为: 48、24、12、6、3、0 IU/mL)。

(4) 加样: 分别设空白孔 (空白对照孔不加样品及酶标试剂) 及待测样品孔, 空白对照孔其余各步操作与待测样品孔相同。在酶标包被板上待测样品孔中先加样品稀释液 40 μ L, 然后再加待测样品 10 μ L (样品最终稀释度为 5 倍)。加样将样品加于酶标板孔底部, 尽量不触及孔壁, 轻轻晃动混匀。

(5) 加酶: 每孔加入酶标试剂 100 μ L, 空白孔除外。

(6) 温育: 用封板膜封板后置 37℃恒温箱温育 60 分钟。

(7) 配液: 将 20 倍浓缩洗涤液用蒸馏水 20 倍稀释后备用。

(8) 洗涤: 小心揭掉封板膜, 弃去液体, 甩干, 每孔加满洗涤液, 静置 30 秒后弃

去，如此重复 5 次，拍干。

(9) 显色：每孔先加入显色剂 A50 μ L，再加入显色剂 B50 μ L，轻轻震荡混匀，37℃避光显色 15 分钟。

(10) 终止：每孔加终止液 50 μ L，终止反应（此时蓝色立转黄色）。

(11) 测定：以空白孔调零，450nm 波长依序测量各孔的吸光度（OD 值）。测定应在加终止液后 15 分钟以内进行。

1.2.12 小鼠血清中补体蛋白 3（C3）的检测

购于上海酶联生物科技有限公司的小鼠补体蛋白 3 ELISA 试剂盒使用双抗体一步夹心法酶联免疫吸附试验。往预先包被好 C3 抗体的包被微孔中，依次加入血清样本、标准品、辣根过氧化物酶标记的检测抗体，经过温育并彻底洗涤后，用底物 TMB 进行显色，TMB 在辣根过氧化物酶的催化下转变为蓝色，并在酸的作用下转变为最终的黄色。颜色的深浅和样品中的 C3 呈正相关。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度，并计算样品浓度。

(1) 准备好冰盒、各种规格移液器枪头、各种规格移液器、蒸馏水、纸巾、75% 酒精、1.5mL EP 管、50ml 离心管、小鼠补体蛋白 3 检测试剂盒。将放置于-80℃的血清于冰盒内溶解，使用前使用微型震荡器震荡。

(2) 将 ELISA 测定小鼠 C3 补体试剂盒从冷藏环境中取出，在室温下平衡 20 分钟后方可使用。

(3) 标准品的加样：在酶标包被板上设标准品孔 12 孔，标准品孔各加入不同浓度的标准品 50 μ L，标准品（S0、S1、S2、S3、S4、S5）浓度依次为 0、10、20、40、80、160 μ g/mL）。

(4) 加样：分别设空白孔（空白对照孔不加样品及酶标试剂）及待测样品孔，空白对照孔其余各步操作与待测样品孔相同。在酶标包被板上待测样品孔中先加样品稀释液 40 μ L，然后再加待测样品 10 μ L（样品最终稀释度为 5 倍）。加样将样品加于酶标板孔底部，尽量不触及孔壁，轻轻晃动混匀。

(5) 加酶：除空白孔外，标准品孔和样本孔中每孔加入辣根过氧化物酶标记过的

检测抗体 100 μ L,。

(6) 温育: 用封板膜封板后, 37℃水浴锅或恒温箱温育 60min。

(7) 配液: 将 20 倍浓缩洗涤液用蒸馏水 20 倍稀释后备用。

(8) 洗涤: 小心揭掉封板膜, 弃去液体, 吸水纸上拍干, 每孔加满洗涤液, 静置 1min 后弃去, 如此重复 5 次, 拍干。

(9) 显色: 每孔先加入显色剂 A50 μ L, 再加入显色剂 B50 μ L, 轻轻震荡混匀, 37℃避光孵育显色 15 分钟。

(10) 终止: 每孔加终止液 50 μ L, 终止反应 (此时蓝色立转黄色)。

(11) 测定: 以空白孔调零, 450nm 波长依序测量各孔的吸光度 (OD 值)。测定应在加终止液后 15 分钟以内进行。

1.2.13 小鼠血清中谷草转氨酶 (AST) 和谷丙转氨酶 (ALT) 的测定

谷草转氨酶能使 α -酮戊二酸和天门冬氨酸移换氨基和酮基, 生成谷氨酸和草酰乙酸, 草酰乙酸在反应过程中可以自行脱羧形成丙酮酸, 丙酮酸与 2,4 二硝基苯肼 (DNPH) 反应生成 2,4 二硝基苯腙, 该物质在碱性溶液中呈现红棕色, 比色后, 带入标准曲线可求得酶的活力单位。同样的, 谷丙转氨酶在 37℃以及 PH7.4 条件下, 作用于 α -酮戊二酸和丙氨酸组合成的底物, 生成丙酮酸及谷氨酸。反应 30min 后, 加入 2,4 二硝基苯肼盐酸溶液, 既可终止反应, 同时 2,4 二硝基苯肼与酮酸中羧基加成, 生成丙酮酸苯腙。丙酮酸苯腙在碱性溶液中呈现红棕色, 于 505nm 处读出吸光值并计算酶的活力。

(1) 准备好冰盒、各种规格移液器枪头、各种规格移液器、蒸馏水、75%酒精、15ml 离心管、96 孔板、谷草转氨酶 (AST/GOT) 测试盒以及谷丙转氨酶 (ALT/GPT) 测试盒。将放置于 -80℃的血清于冰盒内溶解, 使用前使用微型震荡器震荡。

(2) 首先将谷草转氨酶 (AST/GOT) 测试盒以及谷丙转氨酶 (ALT/GPT) 测试盒从冷藏环境中取出, 在室温下平衡 60 分钟后方可使用。

(3) 谷草转氨酶标准品的加样: 谷草转氨酶标准品的加样根据说明书, 按以下流程进行操作。

表 1-1 谷草转氨酶标准品的加样流程

Table 1-1 Spiking Procedure for Glutamic Acid Transaminase Standards

	0	1	2	3	4
0.1mol/L 磷酸缓冲液 (μL)	5	5	5	5	5
2μmol/mL 丙酮酸钠标准液 (μL)	0	2	4	6	8
谷草转氨酶基质液 (μL)	20	18	16	14	12
2,4-二硝基苯胍液 (μL)	20	20	20	20	20
轻轻震荡孔板混匀, 37℃反应 20 分钟					
0.4mol/L 氢氧化钠液 (μL)	200	200	200	200	200
轻轻震荡孔板混匀, 室温下放置 15 分钟, 波长 510nm 下, 酶标仪测定各孔 OD 值, 各孔吸光度减去空白孔吸光度, 所得差值即为该孔绝对 OD 值, 绝对 OD 值作为横坐标, 相应卡门氏单位作为纵坐标, 作坐标图拟合公式, 从而计算样本中谷草转氨酶活性。					

(4) 谷草转氨酶加样: 待测样品分为测定孔以及对照孔, 首先将谷草转氨酶基质液 37℃预温, 然后待测样品测定孔及对照孔每孔均加入 20 μL 谷草转氨酶基质液, 然后加入 5 μL 待测小鼠血清, 此时样品仅加入测定孔中。轻轻震荡孔板混匀后, 37℃下反应 30 分钟。此时向所有待测样品孔中加入 20 μL 2,4-二硝基苯胍液, 再向对照孔中加入 5 μL 待测小鼠血清, 轻轻震荡孔板混匀后, 37℃下反应 20 分钟。最后将 4mol/L 的氢氧化钠溶液稀释成 0.4mol/L 后, 每样品孔中加入 200 μL 该液体, 轻轻震荡孔板混匀后, 室温放置 15 分钟。波长 510nm 下, 酶标仪测定各孔 OD 值, 各孔吸光度减去空白孔吸光度, 所得差值即为该孔绝对 OD 值, 带入标准曲线计算, 求出相应的谷草转氨酶活力。

(5) 谷丙转氨酶标准品的加样: 谷丙转氨酶标准品的加样根据说明书, 按以下流程进行操作。

表 1-2 谷丙转氨酶标准品的加样流程

Table 1-2 Spiking Procedure for Glutathione Standards

	0	1	2	3	4	5
0.1mol/L 磷酸缓冲液 (μL)	5	5	5	5	5	5
2μmol/mL 丙酮酸钠标准液 (μL)	0	2	4	6	8	10
谷丙转氨酶基质液 (μL)	20	18	16	14	12	10
2,4-二硝基苯肼液 (μL)	20	20	20	20	20	20
轻轻震荡孔板混匀, 37°C反应 20 分钟						
0.4mol/L 氢氧化钠液 (μL)	200	200	200	200	200	200

轻轻震荡孔板混匀, 室温下放置 15 分钟, 波长 505nm 下, 酶标仪测定各孔 OD 值, 各孔吸光度减去空白孔吸光度, 所得差值即为该孔绝对 OD 值, 绝对 OD 值作为横坐标, 相应卡门氏单位作为纵坐标, 作坐标图拟合公式, 从而计算样本中谷丙转氨酶活性。

(6) 谷丙转氨酶加样: 待测样品同样分为测定孔以及对照孔, 首先将谷丙转氨酶基质液 37°C 预温, 然后待测样品测定孔及对照孔每孔加入 20 μL 谷丙转氨酶基质液, 然后加入 5 μL 待测小鼠血清, 此时样品仅加入测定孔中。轻轻震荡孔板混匀后, 37°C 下反应 30 分钟。此时向所有待测样品孔中加入 20 μL 2,4-二硝基苯肼液, 再向对照孔中加入 5 μL 待测小鼠血清, 轻轻震荡孔板混匀后, 37°C 下反应 20 分钟。最后将 4mol/L 的氢氧化钠溶液稀释成 0.4mol/L 后, 每样品孔中加入 200 μL 该液体, 轻轻震荡孔板混匀后, 室温放置 15 分钟。波长 510nm 下, 酶标仪测定各孔 OD 值, 各孔吸光度减去空白孔吸光度, 所得差值即为该孔绝对 OD 值, 带入标准曲线计算, 求出相应的谷草转氨酶活力。

(7) 样本计算方法: 将 OD 值带入标准曲线后得到的 AST/ALT 活力 (卡门氏单位) $\times 0.482 \times$ 样本测试前的稀释倍数, 即可得到 AST/ALT 活力 (U/L)。

注: 其中 0.482 是卡门氏单位到 U/L 的换算。

1.2.14 小鼠尿蛋白定量

检测原理: 二喹啉甲酸法 (bicinchoninic acid assay, BCA) 是如今世界上最常用的蛋白浓度检测方法之一, 购于苏州博奥龙公司的 BCA 蛋白定量试剂盒就是使用这种方法进行蛋白浓度的测量。二价铜离子在碱性的条件下, 可以被蛋白质还原成为一价铜离子, 一价铜离子和独特的 Solution A (含有 BCA) 相互作用下可产生敏感的颜色反应。

两分子的 BCA 螯和成为一个铜离子，形成紫色的反应复合物。这种复合物在 562nm 处显示强烈的吸光性，吸光度和蛋白浓度在广泛范围内有良好的线性关系，因此根据吸光值可以推算出蛋白浓度。

(1) 准备好冰盒、各种规格移液器枪头、各种规格移液器、蒸馏水、纸巾、75% 酒精、1.5mL EP 管、96 孔板、PBS 溶液、BCA 试剂盒。将放置于-80℃的小鼠尿液于冰盒内溶解，使用前使用微型震荡器震荡。

(2) 使用 PBS 溶液完全溶解蛋白标准品(5mg/mL BSA)稀释至终浓度为 0.5mg/mL。

(3) 使用时首先将 Solution A 以及 Solution B 溶液在震荡器上混匀，根据样品数量，按 50 体积 BCA 试剂 A 加 1 体积 BCA 试剂 B(50:1)配制适量 BCA 工作液，充分混匀。BCA 工作液室温 24 小时内稳定。

(4) 将稀释后的标准品按 0、1、2、4、8、12、16、20 μ L 分别加到 96 孔板的标准品孔中，加标准品稀释液补足到 20uL。

(5) 加适当体积样品到 96 孔板的样品孔中，加标准品稀释液到 20uL。

(6) 各孔加入 200 μ L BCA 工作液，加样枪轻轻吹打，注意不要弄出气泡，以免影响后续读数，37℃放置 30 分钟。

(7) 用酶标仪测定 A562 的吸光度，根据标准曲线计算出样品的蛋白浓度。

1.3 统计学分析

本文使用 Image-Pro Plus 6.0 软件对组织切片进行分析，并使用 Graphpad Prism 8.0 软件制备了数据图片。所有的计量数据以 ($\bar{x} \pm s$) 形式进行了表示，并使用 SPSS27.0 软件进行统计学分析和处理。在进行两组数据间的差异比较时，我们采用了 t 检验，并认为当 $P < 0.05$ 时，二组数据的差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠血清中抗 ds-DNA 抗体含量比较

本研究采用 ELISA 法检测各组小鼠血清内抗 ds-DNA 抗体的表达变化，并且收集了各组小鼠血清进行检测。结果表明，人源化组狼疮小鼠的血清抗 ds-DNA 抗体表达水平较抗体注射前明显降低，此差异具有显著的统计学意义 ($P<0.05$)，表明人源化小狼疮小鼠注射抗体后能够有效地降低狼疮性肾炎的特异性抗体指标，从而在一定程度上缓解疾病的严重程度及其活动度。相反地，对照组狼疮小鼠的血清抗 ds-DNA 抗体表达水平与抗体注射前相比并无明显降低。前后差异不具有统计学意义 ($P>0.05$)，表明该抗体特异性针对人 CD40-CD40L 起作用。

表 2-1 各组小鼠血清抗 ds-DNA 含量抗体注射前后比较 ($\bar{x}\pm s$, ng/mL)

Table 2-1 Comparison of serum anti-ds-DNA content antibody before and after injection in each group

人源化组	抗体注射前	抗体注射后	<i>P</i>
	9.76±0.55	8.96±0.30	<0.05
对照组	抗体注射前	抗体注射后	<i>P</i>
	9.56±1.21	9.53±0.91	>0.05

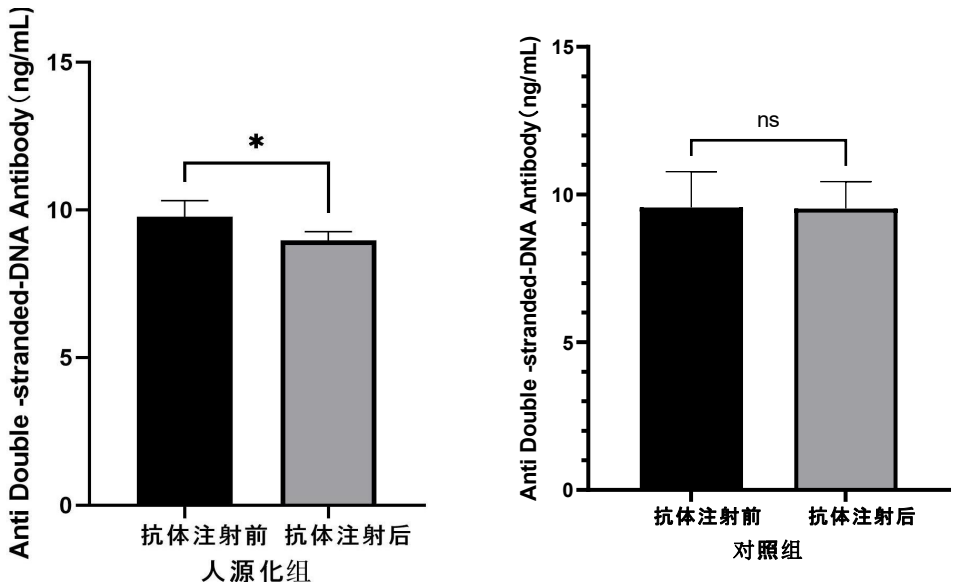


图 2-1 各组小鼠血清抗 ds-DNA 抗体含量注射前后比较

Figure2-1 Serum anti-ds-DNA antibody contents of each group

2.2 各组小鼠肾脏组织病理形态变化结果

HE 染色结果显示,对照组狼疮小鼠肾脏组织石蜡切片:可以看到肾组织结构异常,可见淋巴细胞的浸润,可见由于肾小球基底膜增厚导致的肾小囊的狭窄甚至消失。人源化组狼疮小鼠肾脏组织石蜡切片:可见部分肾小球基底膜增厚但肾小囊形态与对照组狼疮小鼠肾脏组织石蜡切片相比更加清晰,肾组织结构轻微异常,肾小管水肿情况及淋巴细胞浸润表现对比处理前小鼠肾脏石蜡切片均有所好转。由狼疮小鼠肾脏 HE 染色石蜡切片病理观察结果可知抗体对于系统性红斑狼疮引发的狼疮性肾炎所产生的肾脏损伤具有缓解作用。

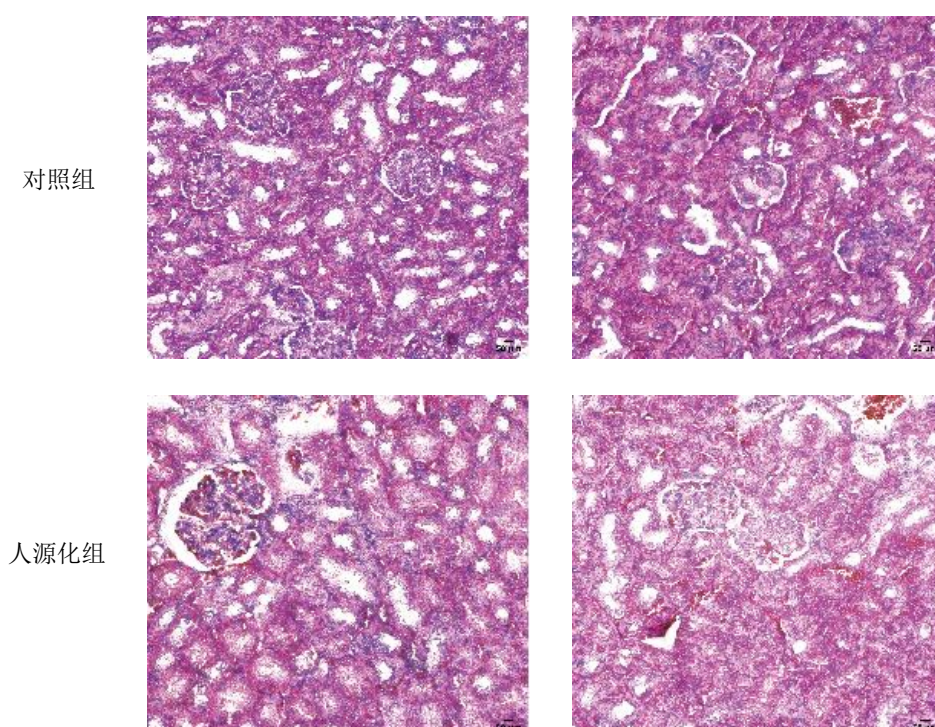


图 2-2 狼疮小鼠肾脏组织 HE 染色 (Scale bar=50 μ m, 40x)

Figure 2-2 HE staining of kidney tissue of lupus mice (Scale bar=50 μ m, 40x)

2.3 各组小鼠尿蛋白含量比较

收集各组小鼠尿液，BCA 法检测各组尿蛋白含量。对照组狼疮小鼠注射抗体后，可见尿蛋白水平逐渐升高，而人源组狼疮小鼠尾静脉注射抗体后可见尿蛋白水平明显降低。人源化组与对照鼠组狼疮小鼠尿蛋白作对比，该结果提示抗体对人源化组狼疮小鼠出现的由于狼疮性肾炎所引发的肾功能损伤具有缓解作用。

表 2-2 各组小鼠尿蛋白含量 ($\bar{x} \pm s$, mg/mL)
Table 2-2 Urine protein content in each group of mice

	人源化组	对照组
W1	1.833±0.679	2.418±0.679
W2	2.224±0.624	2.634±0.531
W3	2.498±0.524	2.768±0.465
W4	2.66±0.485	3.084±0.211
W5	3.109±0.443	3.388±0.230
W6	2.238±0.493	3.463±0.265
W7	1.927±0.396	3.721±0.192

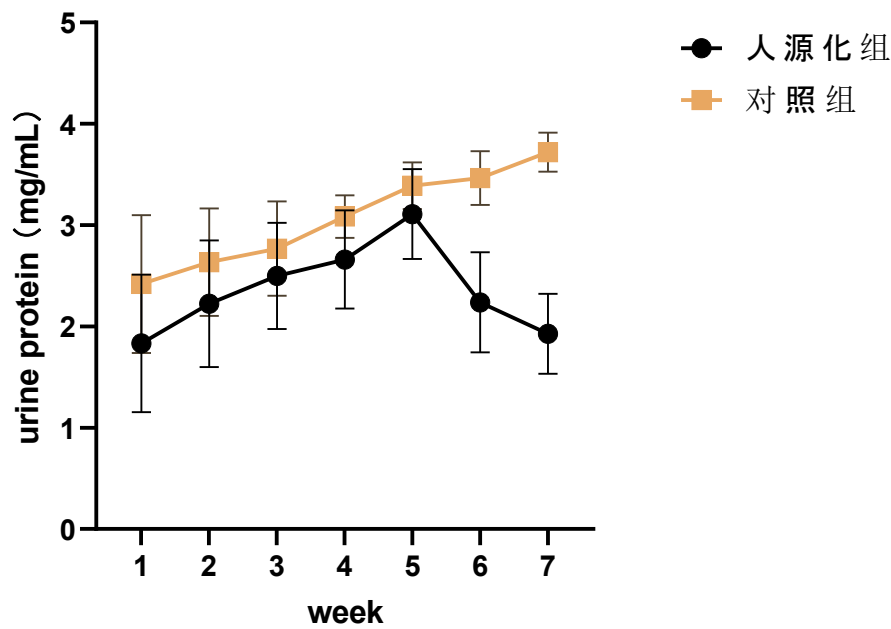


图 2-3 各组小鼠尿蛋白含量

Figure2-3 Urine protein content in each group of mice

2.4 各组小鼠血清中 C₃ 补体含量比较

本研究采用 ELISA 法检测各组小鼠血清内 C₃ 的表达变化。结果表明，人源化组狼疮小鼠血清中补体蛋白 3 含量高于对照组狼疮小鼠，且差异具有统计学意义($P<0.001$)，该结果提示尾静脉注射抗体后，小鼠血清中补体蛋白 3 增高，提示 SLE 症状有所缓解。

表 2-3 各组小鼠血清中 C₃ 补体含量比较 ($\bar{x}\pm s$, $\mu\text{g/mL}$)

Table 2-3 Comparison of C3 complement levels in the serum of mice in various groups			
C ₃ 补体 ($\mu\text{g/mL}$)	人源化组	对照组	<i>P</i>
	296.05±5.97	230.13±9.29	<0.001

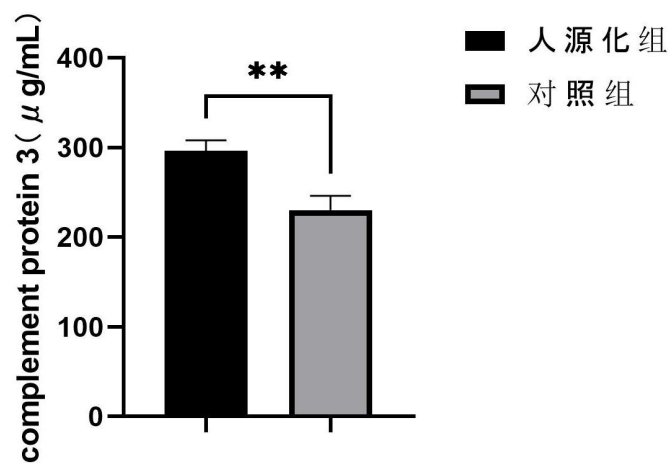


图 2-4 各组小鼠血清中 C₃ 补体含量比较

Figure2-4 Comparison of C3 complement levels in the serum of mice in various groups

2.5 人源化组小鼠血清中 AST 和 ALT 水平抗体注射前后对比

收集人源化组小鼠血清，进行该组小鼠血清中 AST 和 ALT 在抗 CD40L-Fab 抗体注射前后的检测，结果表明，人源化组狼疮小鼠血清中 AST 及 ALT 水平在抗体注射前后并无显著差异 ($P>0.05$)，由于 SLE 本身也有可能造成狼疮小鼠肝损伤，因此并不能明确抗 CD40L-Fab 抗体对肝功能存在显著影响。

表 2-4 人源化组小鼠血清 AST 及 ALT 水平抗体注射前后比较 ($\bar{x} \pm s$, U/L)

Table 2-4 Comparison of serum AST and ALT contents of mice in humanized group before and after antibody injection

	人源化组抗体注射前	人源化组抗体注射后	<i>P</i>
AST	114.74±5.62	126.25±9.28	>0.05
ALT	65.50±7.62	77.23±5.41	>0.05

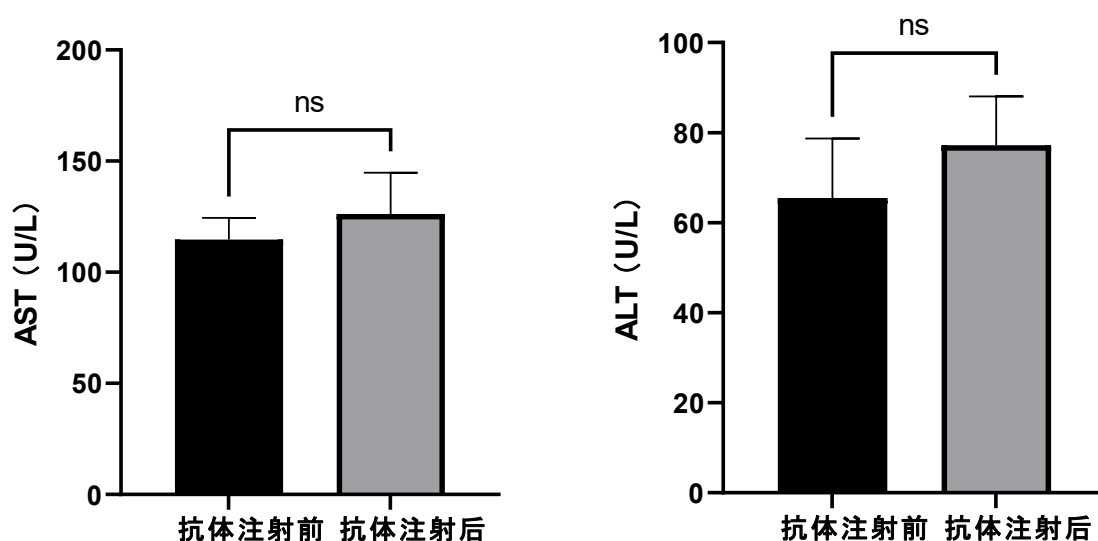


图 2-5 人源化组小鼠血清 AST 及 ALT 水平抗体注射前后比较

Figure2-5 Comparison of serum AST and ALT contents of mice in humanized group before and after antibody injection

3 讨论

本研究中通过腹腔注射 pristane 0.5mL/只建立小鼠狼疮模型, 探讨经过改造的抗体在通过抑制 CD40-CD40L 相互作用减缓系统性红斑狼疮带来的免疫系统症状的同时, 尽量少的出现其他不良反应的可能。本次实验研究结果表明, 尾静脉注射过抗体的人源化组狼疮小鼠血清中抗 ds-DNA 抗体的水平较注射抗体前呈下降趋势, 对各组小鼠肾脏组织病理学形态观察, 发现尾静脉注射过抗体的小鼠组减轻肾小管水肿情况及淋巴细胞浸润表现肾小球形态较另一组更加清晰明显。尾静脉注射抗体处理还降低了小鼠尿蛋白水平, 同样反映尾静脉注射抗体对狼疮小鼠肾脏存在积极影响。结合本研究结果, 说明经改造的抗体对人源化 (hCD40/hCD40L) 狼疮小鼠的免疫系统疾病症状具有良好作用。

这些实验结果为该经改造的抗体用于临床治疗系统性红斑狼疮，缓解系统性红斑狼疮带来的免疫系统疾病症状提供实验基础。

3.1 狼疮小鼠模型建立选择

系统性红斑狼疮是一种典型的自身免疫性疾病，可影响全身的各种组织和器官。系统性红斑狼疮的特征是免疫系统过度激活，导致自身抗体和免疫复合物增加以及器官功能障碍^[40]。狼疮性肾炎是自身免疫性疾病系统性红斑狼疮最严重和最常见的器官表现之一^[41]。但系统性红斑狼疮发病机制目前尚不明确，因此，建立一个合适的狼疮动物模型对于探索系统性红斑狼疮的病因、发病机制及治疗具有重要的意义。为了更贴合人体免疫系统反应，本实验选择中国上海南方模式生物科技股份有限公司的人源化（hCD40/hCD40L）小鼠以及人源化（hCD40/hCD40L）小鼠亲本品系 C57BL/6 小鼠作为对照组进行本次实验，人源化小鼠是携带功能性人类基因、细胞、组织和/或器官、免疫系统或微生物的小鼠，由于人类基因与动物基因高度相似性，在动物身上建立合适的人类疾病动物模型是用于生物医学研究和临床治疗方案开发的重要工具，与体外培养的细胞模型相比，动物模型提供的实验结果更加可靠且更易于操作和改变，所以小鼠可以方便地模拟人类的生物学特性^[42,43]。

建立小鼠狼疮模型存在多种方法，过去几十年间，国内外许多学者建立了多种 SLE 小鼠模型，总体上可分为自发型小鼠狼疮模型和诱发型小鼠狼疮模型。自发型小鼠狼疮模型是通过不同品系小鼠经过杂交配种后，经过筛选得到的小鼠品系，自发型小鼠狼疮模型会自发发展为严重的蛋白尿和狼疮性肾炎，部分品系还可出现血清狼疮标志物，而随着年龄增长，还可能会表现出严重的脾脏肿大和淋巴结病，与人类系统性红斑狼疮的病变存在相似之处^[44]。诱发型小鼠狼疮模型是通过药物等化学或物理手段诱导小鼠出现狼疮症状。常用的几种诱发型小鼠狼疮模型为 **Pristane** 诱导的狼疮小鼠模型、药物性狼疮小鼠模型、凋亡胸腺细胞诱导的狼疮小鼠模型、移植物抗宿主病（**graft-versus-host disease, GVHD**）诱发的狼疮小鼠模型等^[45]。诱发型小鼠狼疮模型在进行操作后的几个月内会出现不同程度的免疫系统反应，可有自身抗体产生、免疫复合物沉积和蛋白尿的出现。

出于小鼠狼疮模型建立的易操作性，本实验选择腹腔注射 **pristane** 进行狼疮小鼠模

型的建立。Pristane, 中文为降植烷、姥鲨烷、鲨肝油烷等(2, 6, 10, 14-四甲基十五烷, TMPD), 是一种类异戊二烯的烷烃。主要从鲨鱼肝脏中提取。1995 年, Satoh 等人首先应用 pristane 诱导 BALB/c 小鼠出现类似于人类系统性红斑狼疮症状, 建立了 pristane 诱导的狼疮小鼠模型 (pristane-induced lupus, PIL 模型) [46]。BALB/c、SJL/J 和 C57BL/6 等品系小鼠经腹腔注射 pristane 后会产生富含单克隆抗体的腹水。注射 pristane 数月后可出现 SLE 特异性自身抗体, 包括抗 ds-DNA 抗体、抗 Sm 抗体、抗 RNP 抗体等。腹腔注射 pristane 小鼠还会产生严重的肾炎, 其特征是蛋白尿, 系膜增生和肾小球免疫复合物沉积, 肾炎严重程度随注射 pristane 时间延长逐渐加重[47-49]。Pristane 诱导自身抗原形成的机制仍有待明确, 但现有的一些研究表明, pristane 对于小鼠 B 淋巴细胞系具有细胞毒性[50]。推测机制为 pristane 具有的细胞毒性诱导细胞程序性死亡, 触发了免疫和组织损伤, 从而导致与系统性红斑狼疮类似的自身免疫性疾病的发生[51]。Pristane 诱导的狼疮小鼠模型制备方法简便且对狼疮自身抗体存在的广泛易感性, 因此该方法已成为诱导狼疮模型最常用方法。使用尿蛋白试纸以周为单位检测造模小鼠尿蛋白, 当造模小鼠尿蛋白试纸测量尿蛋白阳性 4 次时即判断狼疮小鼠造模成功。

3.2 各项指标在实验中测定的意义

生物标志物在 SLE 的诊断、疾病活动性评估、并发症分类以及疾病对治疗干预的反应中起着至关重要的作用。然而, 临床症状异质性和 SLE 复杂的发病机制使得单一生物标志物难以准确反映疾病状态。因此, 结合不同方面的疾病表现和生物标志物可能会更有效地评估 SLE[52]。

3.2.1 抗 CD40L-Fab 抗体对狼疮小鼠血清中抗 ds-DNA 抗体水平的影响

系统性红斑狼疮通常累及全身, 患者血清中存在多种自身抗体, 这些自身抗体是免疫复合体与相应的抗原结合形成抗原-抗体复合物, 然后沉积在肾脏、血管、皮下组织甚至神经系统中, 促进多器官和组织损伤[53]。抗核抗体 (anti- nuclear immune antibody, ANA) 是针对各种核组分的自身抗体的总称[54]。正常情况下, 核抗原不参与免疫系统反应, 因为正常状态下核抗原仅见于细胞核和线粒体, 并且会很快被细胞质和体内的 DNA 酶降解。然而, 在暴露于紫外线、感染和药物后, 核物质从凋亡细胞中被释放出来, 释放的 DNA 可以被抗 DNA 抗体识别并组成免疫复合物。ANA 同样可见于

其他常见免疫系统疾病^[55]，可用于疾病筛查以及诊断，判断疾病预后。作为 SLE 的生物标志物，ANA 具有 95% - 97% 的高灵敏度和 20% 的低特异性。目前公认的用于诊断 SLE 的自身抗体标志物是抗双链 DNA（ds-DNA）抗体，因为高浓度的抗 ds-DNA 抗体几乎只存在于 SLE 患者中，因此抗 ds-DNA 抗体具有 SLE 特异性^[56]。同时，抗 ds-DNA 抗体的存在与肾脏受累有关，在系统性红斑狼疮的受累器官中，肾脏受累表明 SLE 患者存在严重内损伤。近 80% 的 LN 患者的血清中存在抗 ds-DNA 抗体。抗 ds-DNA 抗体直接或间接地与肾抗原相互作用，从而产生免疫复合物^[57]。然而，肾损伤并非仅仅是由染色质片段的复合物和沉积在系膜基质或肾小球基底膜中的抗 ds-DNA 抗体引发。一些研究数据表明，从增殖性 LN 患者中提取的所有样本中并非仅存在抗 ds-DNA 抗体的富集，其中 C1q（C1q 是固有免疫补体经典途径的始动因子补体蛋白 1（C1）的组成成分，抗 C1q 抗体与 C1q 分子结合，可使免疫复合物清除存在障碍，凋亡的细胞清除缓慢，刺激机体免疫系统产生更多抗体，同样是导致系统性红斑狼疮活动的因素）、Sm（anti-Smith antibody, anti-Sm）、SSA（anti-SSA antibody, SSA, 又称抗 RO 抗体）和 SSB（anti-SSB antibody, SSB 又称抗 La 抗体）抗体的过表达同样也是 LN 形成过程的原因^[58]。这些数据证实，LN 的起始是由多种自身抗体促进的，而不是由体内的单一抗体类型促进。但大量数据仍强调了抗 ds-DNA 抗体和免疫复合物在加速 LN 过程中的关键作用。

细胞在受到外界因素干扰凋亡后，可被自身免疫细胞捕获，产生炎症反应。炎症细胞因子的积累可以加速免疫细胞的聚集和诱导促进肾损伤的炎症和纤维化过程。且在抗 ds-DNA 抗体刺激后，肾脏系膜细胞中的内质网应激上调，相关炎症细胞因子表达增加^[59]，这种现象可能是系膜细胞凋亡的原因。在没有有效干预情况下，持续的慢性炎症反应总是伴随着组织纤维化，从而导致肾脏结构异常和功能障碍。

抗 ds-DNA 抗体的存在不仅与 LN 有关，系统性红斑狼疮引发的临床症状中，皮肤损伤和中枢神经系统的损伤也与抗 ds-DNA 抗体相关。皮肤可受到系统性红斑狼疮的影响，有研究表明，在体外观察到抗 ds-DNA 抗体与皮肤角质形成细胞存在特异性结合，紫外线照射可促进这种特异性，从而通过抗体依赖性和细胞介导的细胞毒性导致角质形成细胞凋亡，且两者形成的免疫复合物可在真皮表皮交界处沉积，形成系统性红斑狼疮

特征性的面部蝶形红斑^[60]。中枢神经系统（central nervous system, CNS）疾病主要与 SLE 患者的不良预后有关，一些研究表明，30-40%的 SLE 患者会出现神经精神并发症。抗 N-甲基-D-天冬氨酸受体（N-methyl-D-aspartate receptor, NMDAR）抗体和抗 ds-DNA 抗体是中枢神经系统疾病进展的原因^[61]。抗 ds-DNA 抗体可以与神经元上的 NMDAR 发生交叉反应，位于突触后膜上的 N-甲基-D-天冬氨酸受体的自身抗体，也可引起自身免疫性脑炎，从而导致进一步的神经元疾病，例如认知和记忆异常。血清中抗 ds-DNA 抗体和抗 NMDAR 抗体富集与神经精神狼疮症状的出现有关^[62,63]。

抗 ds-DNA 抗体与疾病活动密切相关，特别是在系统性红斑狼疮活动期。本实验研究对狼疮小鼠血清中抗 ds-DNA 抗体水平进行检测，对照组中狼疮小鼠血清抗 ds-DNA 抗体浓度在抗 CD40L-Fab 抗体注射前后无明显差异；而人源化组狼疮小鼠在注射抗 CD40L-Fab 抗体后抗 ds-DNA 抗体较注射前有明显降低，说明抗 CD40L-Fab 抗体对 SLE 症状有明显的改善作用。

3.2.2 抗 CD40L-Fab 抗体对狼疮小鼠肾脏组织病理学形态结构的影响

狼疮性肾炎（LN）是 SLE 患者中可发生的一种肾小球肾炎，是 SLE 最常见和最严重的器官表现之一，影响大部分 SLE 的患者^[64,65]。因此本实验通过观察狼疮性肾炎这一有代表性的系统性红斑狼疮疾病症状的改变探究抗体对系统性红斑狼疮存在的作用。系统性红斑狼疮发病的关键在于一系列失调的免疫反应，狼疮性肾炎是由免疫复合物介导的炎症驱动的，可通过自身抗体与肾小球抗原结合或肾小球内原位免疫复合物形成而发生肾损伤，也可由于预先形成的循环免疫复合物沉积在肾小球中并引起炎症^[66,67]。有研究表明，部分抗 ds-DNA 抗体可以与 DNA 包裹的核小体形成 IC，形成的免疫复合物可以直接沉积在肾小球中^[68]。在系统性红斑狼疮中，B 细胞对于全身和局部的免疫炎症都有主要作用。除了在全身免疫系统中的作用外，有研究表明肾脏组织内的 B 细胞浸润也逐渐被认为是作用在局部自身免疫和炎症的重要因素^[69]。对于长期慢性的炎症，部分 LN 患者会出现 B 细胞浸润，并在肾小管间质中形成一些有组织的 B 细胞聚集体^[70]。这些聚集体被称为三级淋巴结构（Tertiary Lymphoid Structures, TLS），三级淋巴结构是指在某些非淋巴组织中发现的类似淋巴的结构，三级淋巴结构的形成过程被称为淋巴新生（lymphoid neogenesis）。淋巴新生现象可见于自身免疫和炎症性疾病过程，以及器官移

植和恶性肿瘤中。这些三级淋巴结构的存在与肾小球和肾小管间质病变的严重程度相关，其致病机制为增强局部免疫应答，包括局部抗体产生、抗原呈递以及促炎细胞因子产生^[71,72]。

补体系统在 SLE 的发病机制存在双重作用。首先，补体可以去除凋亡碎片，一定程度上限制自身免疫反应的发展，对机体存在保护作用^[73]。相反的是，抗 C1q 抗体与 C1q 分子结合后，可使免疫复合物清除存在障碍，激活补体经典途径^[74]，导致肾脏损伤。

HE 染色是观察组织细胞结构的最基本、最常用方法，本次研究进行狼疮小鼠肾脏组织病理切片 HE 染色观察，发现处理后狼疮小鼠肾脏组织的石蜡切片中肾间质存在充血情况，并且肾间质可见淋巴细胞的浸润，肾小球系膜基质增多，肾小球形态较正常肾小球模糊，肾小囊的狭窄甚至消失；而处理前狼疮小鼠的肾脏组织石蜡切片中，肾小球形态更加清晰，肾小管水肿情况及淋巴细胞浸润表现对比另外两组实验小鼠均处于良好水平。这些结果说明，抗体能够减轻狼疮小鼠肾脏组织的炎症反应。

3.2.3 抗 CD40L-Fab 抗体对狼疮小鼠尿蛋白水平的影响

在狼疮性肾炎中，由于机体的一系列免疫反应，肾脏炎症反应以及肾脏组织结构和功能的改变，这些损伤和变化使得肾小球滤过屏障通透性增加，正常情况下，血液中的白蛋白等大分子物质难以通过肾小球滤过膜，但在肾小球滤过屏障通透性增加的情况下，白蛋白等大分子物质能够漏出，且随着狼疮性肾炎的进展，蛋白尿症状会更加严重^[75]。由于狼疮性肾炎的临床表现通常不明显，因此最常见的检查即为尿液检查，出现蛋白尿即考虑肾脏受累^[76]。极少数情况下，系统性红斑狼疮患者可表现为“无症状”狼疮性肾炎，患者没有任何临床泌尿系统症状，但肾活检的组织学改变可与 LN 一致^[77]。但在出现临床肾脏疾病症状的狼疮性肾炎患者中，几乎所有 LN 患者存在蛋白尿，50% 的狼疮性肾炎患者存在肾病范围蛋白尿（即 24h 尿蛋白定量 $\geq 3.5\text{g}$ ，大量蛋白尿的情况）。LN 患者尿液分析中同样可以发现的其他异常症状包括镜下血尿、颗粒管型、细胞管型和肉眼血尿等^[76,78]。尿液分析可以作为狼疮性肾炎有力的筛查工具，但只能作为辅助标准，更准确的分析仍旧是肾脏组织的活检结果。肾活检可提供有关 SLE 患者肾脏以及炎症程度损伤程度的信息，并排除其他原因导致蛋白尿或肾功能不全，如 IgA 肾病、抗磷

脂抗体相关性肾病、高血压肾硬化等^[79]。

因此本研究通过对比尾静脉注射抗 CD40L 抗体前后狼疮小鼠尿蛋白水平来评价抗体对系统性红斑狼疮症状的缓解效果。通过 BCA 法测量注射抗体前后收集的狼疮小鼠尿液中蛋白含量，发现对照组中狼疮小鼠尿液中蛋白含量在注射抗体前后变化不明显；而人源化组狼疮小鼠的尿液中，蛋白含量在注射抗体后明显降低。这些结果说明抗体对于狼疮小鼠肾脏损伤有缓解作用。

3.2.4 抗 CD40L-Fab 抗体对狼疮小鼠血清中补体蛋白 3 的影响

补体系统是先天免疫系统中非常重要的一部分，参与机体特异性以及非特异性的免疫机制，补体系统可以识别并清除外来病原体、凋亡细胞以及细胞碎片，进行免疫调节。补体由 9 种成分组成，分别命名为 C1-C9，绝大多数由肝脏合成，少数由巨噬细胞等产生^[80]。在正常生理条件下，绝大多数补体成分以无活性酶前体形式存在于血液中，在不同激活物作用下发生一系列级联酶促反应后被激活，表现出多种生物学活性。补体系统的调控主要存在三个途径：经典途径，旁路途径和凝集素途径，不同的调控途径会影响不同的补体蛋白，并发挥不同的作用。补体系统需经过抗原-抗体复合物或其他因子激活后，补体固有成分以 C1、C4、C2、C3、C5-C9 顺序发生酶促级联反应，产生一系列生物学效应的补体活化途径，这叫做补体的经典激活途径。而旁路途径是非特异性的，无须通过特异性免疫反应产生抗原抗体复合物来激活，激活物为细菌或外源性异物直接激活 C3 继而完成 C5-C9 各成分的连锁反应。C1q 是补体系统经典通路 C1 的三个亚型之一，在清除免疫复合体和凋亡小体中发挥重要作用，抗 C1q 抗体与 C1q 分子结合，可使免疫复合物清除存在障碍，且清除凋亡细胞反应变缓，从而刺激机体免疫系统产生更多抗体，是系统性红斑狼疮活动发病机制的因素之一^[81]。在补体系统的各种成分中，C3 属于最核心的成分，人体内大多数细胞类型都表达一定量的 C3。它在循环、组织甚至细胞内都丰富。在这些位置中，一般以非激活状态存在，并且不同部位的补体蛋白 3 可以具有不同的功能。补体被激活后经过一系列反应最终形成膜攻击复合物（membrane attack complex, MAC），溶解靶细胞。除了用膜攻击复合物靶向入侵病原体外，补体系统还具有一系列其他的免疫调节作用以促进免疫复合物从循环中清除。因此，补体作用

于 IC 有助于减少与体内可能沉积在健康组织中并造成损害的抗原抗体复合物^[82]。

因此,各种补体成分的缺乏对自身免疫存在很大的影响。在补体缺乏的情况下,血液内补体含量的降低极大程度影响补体途径的激活、调控以及微生物入侵者外膜上 MAC 的形成,导致病原体杀灭能力降低,使免疫倾向于促炎反应,从而导致自身免疫性疾病中炎症和免疫反应性的增加^[83]。

在系统性红斑狼疮疾病活动期间,C3 水平低的患者,同时结合抗核抗体检测阳性时,低补体血症也可看作 SLE 的诊断标准之一^[84]。SLE 患者血清中 C3 水平可随疾病活动而波动,C3 水平高,抗 ds-DNA 抗体水平低时,提示系统性红斑狼疮疾病有所缓解。因此,C3 为监测疾病活动性和治疗反应的有效生物标志物。

本研究对各组小鼠血清内 C3 水平进行检测。结果表明,人源化组狼疮小鼠血清中补体蛋白 3 含量高于 C57BL/6 狼疮小鼠组小鼠,且差异具有统计学意义 ($P<0.001$),说明抗 CD40L-Fab 抗体对于 SLE 症状具有一定的缓解作用。

3.2.5 抗 CD40L-Fab 抗体对肝功能存在的影响

实验过程中,将抗 CD40L 抗体尾静脉注射入小鼠体内,抗体跟随血液循环在生物体内与表达在细胞表面的 CD40L 结合,阻碍 CD40-CD40L 结合引发后续一系列的免疫反应,抗原抗体相结合形成稳定的复合物,产生沉淀或者凝集,随后被吞噬细胞清除。未与抗原结合的抗体会被逐渐代谢掉,药物代谢变化过程一般又称为生物转化,抗体在体内经酶催化或非酶作用下所发生化学变化过程,使外来化合物灭活这一过程即称为生物转化。肝脏是生物转化作用的主要器官,其它组织如胃肠道、肾脏等器官也可进行一定的生物转化,但以肝脏最为重要,其生物转化功能最强。肝脏作为人体最大的实质性脏器,发挥着多种重要功能,其中代谢功能即包含生物转化过程。除此之外,肝脏的再生功能非常强大,肝脏还能够合成和分泌胆汁,对人体代谢过程中所产生的一些有害废物及外来的毒物、毒素进行处理,同时大部分的凝血因子都由肝脏合成,肝脏在凝血系统发挥重要的调节作用^[85]。肝毒性药物是指药物在代谢过程中药物本身或其代谢产物对肝脏造成损害比较大的,能引起肝功能异常的药物。本实验意在探究抗 CD40L-Fab 抗体是否存在肝毒性,因此对小鼠进行肝功能检查,检查样本首选血清样本,肝功能检查

通常包括丙氨酸氨基转移酶（又称谷丙转氨酶，glutamic pyruvic transaminase，GPT 又称 ALT）和天冬氨酸氨基转移酶（又称谷草转氨酶，glutamic oxaloacetic transaminase，GOT 又称 AST）、碱性磷酸酶（alkaline phosphatase，ALP）、 γ -谷氨酰转肽酶（ γ -glutamyl transpeptidase，GGT）、总胆红素、总蛋白和白蛋白等检查。检查指标选择天冬氨酸氨基转移酶以及丙氨酸氨基转移酶，这两种酶是肝细胞损伤的标志物^[86]。天冬氨酸氨基转移酶以胞质和线粒体同工酶的形式存在，主要分布在心肌，其次分布于肝脏、骨骼肌、肾脏的细胞质和线粒体中。正常时血清中的天冬氨酸氨基转移酶含量较低，在急性病毒性肝炎时，相应肝脏细胞受损，细胞膜通透性增加，胞浆内的天冬氨酸氨基转移酶释放入血，故其血清浓度可升高，它对肝脏的敏感性或特异性不如 ALT，天冬氨酸氨基转移酶升高也可能存在于非肝脏原因。由于 AST 主要分布在心肌，临床还可作为心肌梗死和心肌炎的辅助检查。当谷草转氨酶明显升高，谷草转氨酶/谷丙转氨酶（AST/ALT）大于 1 即当血清 AST 活性增高持续超过 ALT 活性时，提示有肝实质的广泛损害，肝炎病变呈慢性化和进展性，预后不良。丙氨酸氨基转移酶是一种胞质酶，存在于各种细胞中，在肝脏细胞中以高浓度存在。在大多数类型的肝病中，ALT 通常高于 AST，与 AST 相同的是，正常情况下，血清中谷丙转氨酶含量远小于肝脏细胞中谷丙转氨酶含量，因此一旦肝脏细胞出现急性损伤，血清中丙氨酸氨基转移酶活性就会增高，提示急性肝细胞损害。但在各种病毒性肝炎的急性期、肝毒性药物对肝脏细胞出现影响时，ALT 可大量释放入血，因此它是诊断病毒性肝炎、中毒性肝炎的重要指标^[87]。因此本实验对比人源化组狼疮小鼠抗体注射前后血清中 AST 以及 ALT 含量，数据显示该组小鼠抗体注射前后血清中 AST 及 ALT 含量差异不显著，没有统计学意义，并且由于 SLE 本身也有可能造成狼疮小鼠肝损伤，因此并不能明确抗 CD40L-Fab 抗体对肝功能存在显著影响。

3.3 总结

本实验中通过对人源化（hCD40/hCD40L）小鼠进行狼疮造模，通过不同实验对改造的抗 CD40L 抗体的治疗效果及不良反应进行验证，进一步证实抗 CD40L 抗体对于 SLE 症状的缓解效果。在了解疾病的分子致病机制基础上，对于改造抗 CD40L 抗体治疗 SLE 症状可能为今后临床治疗 SLE 提供新的方向。

不足与展望

(1) 系统性红斑狼疮除抗 ds-DNA 抗体外，免疫系统中仍存在其他重要的狼疮检测指标，本实验仅进行了特异性指标的监测；。

(2) 实验过程中，每只小鼠尾静脉注射抗体剂量相同，未进行抗体最小作用药量实验。

(3) 由于实验条件存在局限性，未验证抗体对于血小板聚集的影响。虽然实验仍存在一些不足之处，但本实验改造的抗体仍为系统性红斑狼疮的治疗提供了一定的方向。

结 论

1. 本研究针对系统性红斑狼疮发病机制免疫反应中起重要作用的 CD40-CD40L 相互作用改造抗 CD40L 抗体,以达到拮抗 CD40-CD40L 相互作用、缓解 SLE 症状的目的。
2. 本研究经过对比用药前后狼疮相关指标变化判断经过改造的抗 CD40L 抗体对于系统性红斑狼疮症状缓解存在积极影响。

参考文献

- [1] 曹平, 赵玉, 王静. 系统性红斑狼疮分子病因研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2013, 29(6): 657-661,664.
- [2] Tsokos G C, Lo M S, Costa Reis P, et al. New insights into the immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus[J]. Nature Reviews. Rheumatology, 2016, 12(12): 716-730.
- [3] Jin O, Kavikondala S, Sun L, et al. Systemic lupus erythematosus patients have increased number of circulating plasmacytoid dendritic cells, but decreased myeloid dendritic cells with deficient CD83 expression[J]. Lupus, 2008, 17(7): 654-662.
- [4] Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin?[J]. The Journal of Cell Biology, 2012, 198(5): 773-783.
- [5] Biermann M H C, Boeltz S, Pieterse E, et al. Autoantibodies Recognizing Secondary NEcrotic Cells Promote Neutrophilic Phagocytosis and Identify Patients With Systemic Lupus Erythematosus[J]. Frontiers in Immunology, 2018, 9: 989.
- [6] Mitchell D, Chintala S, Dey M. Plasmacytoid dendritic cell in immunity and cancer[J]. Journal of Neuroimmunology, 2018, 322: 63-73.
- [7] Niewold T B, Clark D N, Salloum R, et al. Interferon alpha in systemic lupus erythematosus[J]. Journal of Biomedicine & Biotechnology, 2010, 2010: 948364.
- [8] Lindau D, Mussard J, Rabsteyn A, et al. TLR9 independent interferon α production by neutrophils on NETosis in response to circulating chromatin, a key lupus autoantigen[J]. Annals of the Rheumatic Diseases, 2014, 73(12): 2199-2207.
- [9] Theofilopoulos A N, Kono D H, Beutler B, et al. Intracellular nucleic acid sensors and autoimmunity[J]. Journal of Interferon & Cytokine Research: The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research, 2011, 31(12): 867-886.
- [10] Mahajan A, Herrmann M, Muñoz L E. Clearance Deficiency and Cell Death Pathways: A

- Model for the Pathogenesis of SLE[J]. *Frontiers in Immunology*, 2016, 7: 35.
- [11] Pawar R D, Ramanjaneyulu A, Kulkarni O P, et al. Inhibition of Toll-like receptor-7 (TLR-7) or TLR-7 plus TLR-9 attenuates glomerulonephritis and lung injury in experimental lupus[J]. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 2007, 18(6): 1721-1731.
- [12] Pawar R D, Patole P S, Zecher D, et al. Toll-like receptor-7 modulates immune complex glomerulonephritis[J]. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 2006, 17(1): 141-149.
- [13] Subramanian S, Tus K, Li Q Z, et al. A Tlr7 translocation accelerates systemic autoimmunity in murine lupus[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(26): 9970-9975.
- [14] Chen Y, Cuda C, Morel L. Genetic determination of T cell help in loss of tolerance to nuclear antigens[J]. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 2005, 174(12): 7692-7702.
- [15] Calis J J A, Maybeno M, Greenbaum J A, et al. Properties of MHC class I presented peptides that enhance immunogenicity[J]. *PLoS computational biology*, 2013, 9(10): e1003266.
- [16] Kochan G, Escors D, Breckpot K, et al. Role of non-classical MHC class I molecules in cancer immunosuppression[J]. *Oncoimmunology*, 2013, 2(11): e26491.
- [17] Guerder S, Flavell R A. T-cell activation. Two for T[J]. *Current biology: CB*, 1995, 5(8): 866-868.
- [18] Croft M, Dubey C. Accessory Molecule and Costimulation Requirements for CD4 T Cell Response[J]. *Critical Reviews in Immunology*, 2017, 37(2-6): 261-290.
- [19] Granato A, Hayashi E A, Baptista B J A, et al. Correction: IL-4 Regulates Bim Expression and Promotes B Cell Maturation in Synergy with BAFF Conferring Resistance to Cell Death at Negative Selection Checkpoints[J]. *Journal of Immunology*

(Baltimore, Md.: 1950), 2018, 201(8): 2520.

- [20] Schell S L, Rahman Z S M. miRNA-Mediated Control of B Cell Responses in Immunity and SLE[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 683710.
- [21] Mallett S, Fossum S, Barclay A N. Characterization of the MRC OX40 antigen of activated CD4 positive T lymphocytes--a molecule related to nerve growth factor receptor[J]. *The EMBO journal*, 1990, 9(4): 1063-1068.
- [22] Smulski C R, Beyrath J, Decossas M, et al. Cysteine-rich domain 1 of CD40 mediates receptor self-assembly[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(15): 10914-10922.
- [23] Hsu Y M, Lucci J, Su L, et al. Heteromultimeric complexes of CD40 ligand are present on the cell surface of human T lymphocytes[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(2): 911-915.
- [24] Tang T, Cheng X, Truong B, et al. Molecular basis and therapeutic implications of CD40/CD40L immune checkpoint[J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2021, 219: 107709.
- [25] Saeland S, Duvert V, Moreau I, et al. Human B cell precursors proliferate and express CD23 after CD40 ligation[J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 1993, 178(1): 113-120.
- [26] Barrett T B, Shu G, Clark E A. CD40 signaling activates CD11a/CD18 (LFA-1)-mediated adhesion in B cells[J]. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 1991, 146(6): 1722-1729.
- [27] Dai J, Fang P, Saredy J, et al. Metabolism-associated danger signal-induced immune response and reverse immune checkpoint-activated CD40+ monocyte differentiation[J]. *Journal of Hematology & Oncology*, 2017, 10(1): 141.
- [28] Sun L, Yang X, Yuan Z, et al. Metabolic Reprogramming in Immune Response and Tissue Inflammation[J]. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2020, 40(9):

1990-2001.

- [29] Frentsch M, Stark R, Matzmohr N, et al. CD40L expression permits CD8⁺ T cells to execute immunologic helper functions[J]. *Blood*, 2013, 122(3): 405-412.
- [30] André P, Nannizzi-Alaimo L, Prasad S K, et al. Platelet-derived CD40L: the switch-hitting player of cardiovascular disease[J]. *Circulation*, 2002, 106(8): 896-899.
- [31] Finsterbusch M, Schrottmaier W C, Kral-Pointner J B, et al. Measuring and interpreting platelet-leukocyte aggregates[J]. *Platelets*, 2018, 29(7): 677-685.
- [32] Perper S J, Westmoreland S V, Karman J, et al. Treatment with a CD40 Antagonist Antibody Reverses Severe Proteinuria and Loss of Saliva Production and Restores Glomerular Morphology in Murine Systemic Lupus Erythematosus[J]. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 2019, 203(1): 58-75.
- [33] Shock A, Burkly L, Wakefield I, et al. CDP7657, an anti-CD40L antibody lacking an Fc domain, inhibits CD40L-dependent immune responses without thrombotic complications: an in vivo study[J]. *Arthritis Research & Therapy*, 2015, 17(1): 234.
- [34] Boumpas D T, Furie R, Manzi S, et al. A short course of BG9588 (anti-CD40 ligand antibody) improves serologic activity and decreases hematuria in patients with proliferative lupus glomerulonephritis[J]. *Arthritis and Rheumatism*, 2003, 48(3): 719-727.
- [35] Huang W, Sinha J, Newman J, et al. The effect of anti-CD40 ligand antibody on B cells in human systemic lupus erythematosus[J]. *Arthritis and Rheumatism*, 2002, 46(6): 1554-1562.
- [36] Grammer A C, Slota R, Fischer R, et al. Abnormal germinal center reactions in systemic lupus erythematosus demonstrated by blockade of CD154-CD40 interactions[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2003, 112(10): 1506-1520.
- [37] Sidiropoulos P I, Boumpas D T. Lessons learned from anti-CD40L treatment in systemic lupus erythematosus patients[J]. *Lupus*, 2004, 13(5): 391-397.

- [38] Robles-Carrillo L, Meyer T, Hatfield M, et al. Anti-CD40L immune complexes potently activate platelets in vitro and cause thrombosis in FCGR2A transgenic mice[J]. Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950), 2010, 185(3): 1577-1583.
- [39] Xie J H, Yamniuk A P, Borowski V, et al. Engineering of a novel anti-CD40L domain antibody for treatment of autoimmune diseases[J]. Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950), 2014, 192(9): 4083-4092.
- [40] Pons-Estel G J, Alarcón G S, Scofield L, et al. Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus erythematosus[J]. Seminars in Arthritis and Rheumatism, 2010, 39(4): 257-268.
- [41] Anders H J, Saxena R, Zhao M H, et al. Lupus nephritis[J]. Nature Reviews. Disease Primers, 2020, 6(1): 7.
- [42] Fujiwara S. Humanized mice: A brief overview on their diverse applications in biomedical research[J]. Journal of Cellular Physiology, 2018, 233(4): 2889-2901.
- [43] 安凌波, 张茂森, 栾晶. 人源化小鼠模型的研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2022, 38(22): 2809-2816,封 3-封 4.
- [44] East J, Prosser P R. Autoimmunity and malignancy in New Zealand black mice[J]. Proceedings of the Royal Society of Medicine, 1967, 60(8): 823-825.
- [45] Halkom A, Wu H, Lu Q. Contribution of mouse models in our understanding of lupus[J]. International Reviews of Immunology, 2020, 39(4): 174-187.
- [46] Satoh M, Treadwell E L, Reeves W H. Pristane induces high titers of anti-Su and anti-nRNP/Sm autoantibodies in BALB/c mice. Quantitation by antigen capture ELISAs based on monospecific human autoimmune sera[J]. Journal of Immunological Methods, 1995, 182(1): 51-62.
- [47] Satoh M, Richards H B, Shaheen V M, et al. Widespread susceptibility among inbred mouse strains to the induction of lupus autoantibodies by pristane[J]. Clinical and Experimental Immunology, 2000, 121(2): 399-405.

- [48] Satoh M, Hamilton K J, Ajmani A K, et al. Autoantibodies to ribosomal P antigens with immune complex glomerulonephritis in SJL mice treated with pristane[J]. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 1996, 157(7): 3200-3206.
- [49] Satoh M, Kumar A, Kanwar Y S, et al. Anti-nuclear antibody production and immune-complex glomerulonephritis in BALB/c mice treated with pristane[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995, 92(24): 10934-10938.
- [50] Janz S, Shacter E. A new method for delivering alkanes to mammalian cells: preparation and preliminary characterization of an inclusion complex between beta-cyclodextrin and pristane (2,6,10,14-tetramethylpentadecane)[J]. *Toxicology*, 1991, 69(3): 301-315.
- [51] Yang F, He Y, Zhai Z, et al. Programmed Cell Death Pathways in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus[J]. *Journal of Immunology Research*, 2019, 2019: 3638562.
- [52] Liu C C, Kao A H, Manzi S, et al. Biomarkers in systemic lupus erythematosus: challenges and prospects for the future[J]. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*, 2013, 5(4): 210-233.
- [53] Zhao P, Xu L, Wang P, et al. Increased expression of human T-cell immunoglobulin- and mucin-domain-containing molecule-4 in peripheral blood mononuclear cells from patients with system lupus erythematosus[J]. *Cellular & Molecular Immunology*, 2010, 7(2): 152-156.
- [54] Muratori P, Muratori L, Ferrari R, et al. Characterization and clinical impact of antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis[J]. *The American Journal of Gastroenterology*, 2003, 98(2): 431-437.
- [55] Xu X F, Zhang J, Cui L, et al. [The value of different antibodies detection in diagnosis of rheumatism with uveitis][J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2017, 97(4): 285-290.
- [56] Song X Y, Huang H, Liu Y Z, et al. [Coexistence of sarcoidosis and primary Sjögren

- syndrome: a clinical analysis and literature review][J]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*, 2017, 56(5): 375-377.
- [57] Yung S, Chan T M. Mechanisms of Kidney Injury in Lupus Nephritis - the Role of Anti-dsDNA Antibodies[J]. *Frontiers in Immunology*, 2015, 6: 475.
- [58] Mannik M, Merrill C E, Stamps L D, et al. Multiple autoantibodies form the glomerular immune deposits in patients with systemic lupus erythematosus[J]. *The Journal of Rheumatology*, 2003, 30(7): 1495-1504.
- [59] Zhang H, Zhao C, Wang S, et al. Anti-dsDNA antibodies induce inflammation via endoplasmic reticulum stress in human mesangial cells[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2015, 13: 178.
- [60] Dong Y, Zhang Y, Xia L, et al. The deposition of anti-DNA IgG contributes to the development of cutaneous lupus erythematosus[J]. *Immunology Letters*, 2017, 191: 1-9.
- [61] Selmi C, Barin J G, Rose N R. Current trends in autoimmunity and the nervous system[J]. *Journal of Autoimmunity*, 2016, 75: 20-29.
- [62] Höftberger R. Neuroimmunology: an expanding frontier in autoimmunity[J]. *Frontiers in Immunology*, 2015, 6: 206.
- [63] Kowal C, Diamond B. Aspects of CNS lupus: mouse models of anti-NMDA receptor antibody mediated reactivity[J]. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2012, 900: 181-206.
- [64] Hanly J G, O’Keeffe A G, Su L, et al. The frequency and outcome of lupus nephritis: results from an international inception cohort study[J]. *Rheumatology (Oxford, England)*, 2016, 55(2): 252-262.
- [65] Singh S, Saxena R. Lupus nephritis[J]. *The American Journal of the Medical Sciences*, 2009, 337(6): 451-460.
- [66] Rekvig O P. The dsDNA, Anti-dsDNA Antibody, and Lupus Nephritis: What We Agree on, What Must Be Done, and What the Best Strategy Forward Could Be[J]. *Frontiers in*

Immunology, 2019, 10: 1104.

- [67] Lood C, Blanco L P, Purmalek M M, et al. Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease[J]. Nature Medicine, 2016, 22(2): 146-153.
- [68] Fenton K A, Tømmerås B, Marion T N, et al. Pure anti-dsDNA mAbs need chromatin structures to promote glomerular mesangial deposits in BALB/c mice[J]. Autoimmunity, 2010, 43(2): 179-188.
- [69] Robson K J, Kitching A R. Tertiary lymphoid tissue in kidneys: understanding local immunity and inflammation[J]. Kidney International, 2020, 98(2): 280-283.
- [70] Steinmetz O M, Velden J, Kneissler U, et al. Analysis and classification of B-cell infiltrates in lupus and ANCA-associated nephritis[J]. Kidney International, 2008, 74(4): 448-457.
- [71] Chang A, Henderson S G, Brandt D, et al. In situ B cell-mediated immune responses and tubulointerstitial inflammation in human lupus nephritis[J]. Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950), 2011, 186(3): 1849-1860.
- [72] Shen Y, Sun C Y, Wu F X, et al. Association of intrarenal B-cell infiltrates with clinical outcome in lupus nephritis: a study of 192 cases[J]. Clinical & Developmental Immunology, 2012, 2012: 967584.
- [73] Bao L, Cunningham P N, Quigg R J. Complement in Lupus Nephritis: New Perspectives[J]. Kidney Diseases (Basel, Switzerland), 2015, 1(2): 91-99.
- [74] Ion O, Obrișcă B, Ismail G, et al. Kidney Involvement in Hypocomplementemic Urticarial Vasculitis Syndrome-A Case-Based Review[J]. Journal of Clinical Medicine, 2020, 9(7): 2131.
- [75] D'Amico G, Bazzi C. Pathophysiology of proteinuria[J]. Kidney International, 2003, 63(3): 809-825.
- [76] Almaani S, Meara A, Rovin B H. Update on Lupus Nephritis[J]. Clinical journal of the

- American Society of Nephrology: CJASN, 2017, 12(5): 825-835.
- [77] Wakasugi D, Gono T, Kawaguchi Y, et al. Frequency of class III and IV nephritis in systemic lupus erythematosus without clinical renal involvement: an analysis of predictive measures[J]. The Journal of Rheumatology, 2012, 39(1): 79-85.
- [78] Ding J Y C, Ibañez D, Gladman D D, et al. Isolated hematuria and sterile pyuria may indicate systemic lupus erythematosus activity[J]. The Journal of Rheumatology, 2015, 42(3): 437-440.
- [79] Fanouriakis A, Kostopoulou M, Cheema K, et al. 2019 Update of the Joint European League Against Rheumatism and European Renal Association-European Dialysis and Transplant Association (EULAR/ERA-EDTA) recommendations for the management of lupus nephritis[J]. Annals of the Rheumatic Diseases, 2020, 79(6): 713-723.
- [80] Porter R R. Complement polymorphism, the major histocompatibility complex and associated diseases: a speculation[J]. Molecular Biology & Medicine, 1983, 1(1): 161-168.
- [81] Arason G J, Jorgensen G H, Ludviksson B R. Primary immunodeficiency and autoimmunity: lessons from human diseases[J]. Scandinavian Journal of Immunology, 2010, 71(5): 317-328.
- [82] Elkon K B, Santer D M. Complement, interferon and lupus[J]. Current Opinion in Immunology, 2012, 24(6): 665-670.
- [83] Lood C, Gullstrand B, Truedsson L, et al. C1q inhibits immune complex-induced interferon-alpha production in plasmacytoid dendritic cells: a novel link between C1q deficiency and systemic lupus erythematosus pathogenesis[J]. Arthritis and Rheumatism, 2009, 60(10): 3081-3090.
- [84] Petri M, Orbai A M, Alarcón G S, et al. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus[J]. Arthritis and Rheumatism, 2012, 64(8): 2677-2686.

- [85] Almazroo O A, Miah M K, Venkataramanan R. Drug Metabolism in the Liver[J]. Clinics in Liver Disease, 2017, 21(1): 1-20.
- [86] Chinnappan R, Mir T A, Alsalameh S, et al. Aptasensors Are Conjectured as Promising ALT and AST Diagnostic Tools for the Early Diagnosis of Acute Liver Injury[J]. Life (Basel, Switzerland), 2023, 13(6): 1273.
- [87] Guarino M, Cossiga V, Morisco F. The interpretation of liver function tests in pregnancy[J]. Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology, 2020, 44-45: 101667.
- [88] Jamasbi J, Ayabe K, Goto S, et al. Platelet receptors as therapeutic targets: Past, present and future[J]. Thrombosis and Haemostasis, 2017, 117(7): 1249-1257.
- [89] Xie Z, Tian Y, Ma L, et al. Developments in inhibiting platelet aggregation based on different design strategies[J]. Future Medicinal Chemistry, 2019, 11(14): 1757-1775.
- [90] Asakura H. [Pathophysiology and classification of thrombosis][J]. Nihon Rinsho. Japanese Journal of Clinical Medicine, 2014, 72(7): 1184-1190.
- [91] Langer F, Ingersoll S B, Amirkhosravi A, et al. The role of CD40 in CD40L- and antibody-mediated platelet activation[J]. Thrombosis and Haemostasis, 2005, 93(6): 1137-1146.

综 述

抗 CD40L 抗体在系统性红斑狼疮中作用机制的研究进展

作者姓名：赵雯莉 导师姓名：李也鹏

[摘要] 系统性红斑狼疮（Systemic Lupus Erythematosus, SLE）是一种累及多系统的复杂的自身免疫性疾病，其发病因素涉及表观遗传、生态和环境因素等多种因素。其发病机制主要是触发自身免疫反应，导致组织和器官损伤。这种疾病具有广泛的临床特征，从轻度皮肤受累到严重的危及生命的器官损伤，如肾衰竭、肺动脉高压和心力衰竭等。临床上多使用糖皮质激素和羟氯喹来治疗系统性红斑狼疮，但对于安全和更有效的治疗方法仍有很大的未满足需求。因此探究缓解对于系统性红斑狼疮症状的治疗仍是一个重要的课题。有研究发现一系列免疫反应中 CD40 与其配体 CD40L 的相互作用在系统性红斑狼疮的发病机制中存在重要作用，因此使用抗 CD40L 抗体阻断 CD40-CD40L 相互作用理论上可用于缓解系统性红斑狼疮的症状，本文通过归纳概括抗 CD40L 抗体通过阻断 CD40 与 CD40L 的相互作用从而影响系统性红斑狼疮的作用机制的研究进展。

[关键词] 系统性红斑狼疮；抗 CD40L 抗体；

系统性红斑狼疮(SLE)是一种多系统慢性自身免疫性疾病，多发于 15-44 岁的育龄期女性^[1]，是性别分化程度最高的自身免疫性疾病之一^[2]。该疾病病因尚不明确，但近些年的研究表明，系统性红斑狼疮发病因素可涉及自身组织抗原变异、紫外线照射、药物化学物质、病原感染等多种因素，均可暴露组织隐蔽抗原或使正常组织抗原结构改变，激发机体自身免疫损伤，继而触发一系列自身免疫反应，失调的免疫反应导致组织和器官损伤^[3]。SLE 表现出广泛的临床症状，从轻微的皮肤症状到严重的危及生命的疾病。因此对系统性红斑狼疮疾病的治疗存在重大挑战，治疗的目标是达到疾病症状的控制和疾病的缓解，改善患者的长期预后，防止终末器官损伤，提高患者的生活质量^[4]。临床

上对于系统性红斑狼疮的治疗主要使用羟氯喹、糖皮质激素和免疫抑制剂等药物，糖皮质激素主要用于疾病的急性期，用于疾病的突然发作^[5]；羟氯喹属于 SLE 患者维持期最常使用的药物，然而，长期使用该药物会出现治疗相关的视网膜毒性风险。一旦治疗持续时间超过 5 年或剂量超过每天 100 毫克，相应的视网膜毒性风险就会增加^[6]。治疗 SLE 还存在非药物治疗，其中包括静脉注射免疫球蛋白(intravenous immunoglobulin, IVIG)和血浆置换。有研究表明 IVIG 可抑制 B 细胞的活化，中和 B 细胞产生的抗体，有效治疗皮肤和神经系统 SLE 症状^[7,8]。血浆置换是一种通过体外分离血液成分，用于分离自身抗体和免疫复合物，从而减少对靶器官损害的治疗手段。目前已经成为一种常见的体外循环血液净化疗法。然而，相比于药物治疗系统性红斑狼疮，非药物治疗的并发症以及治疗成本仍旧是一个问题^[9]。近些年来，一些研究将目光转向开发靶向治疗，在系统性红斑狼疮发病过程中一系列失控的免疫反应中寻找关键的靶点，试图通过阻止靶点间的相互作用阻止下游免疫反应的发生。CD40-CD40L 的相互作用在人体液免疫应答中的作用已被广泛研究，并已被证明对产生原发性和继发性体液免疫应答至关重要。本文将概括 CD40-CD40L 在系统性红斑狼疮发病机制中的相关研究内容，以及抗 CD40L 抗体在缓解系统性红斑狼疮症状方面的研究进展，以期为该病在治疗药物方面提供新的见解。

1 CD40-CD40L 在系统性红斑狼疮发病机制中的作用

在启动免疫反应的过程中，需要多个信号介导。主要信号是 T 细胞抗原受体(T cell receptor, TCR)与抗原呈递细胞(antigen presenting cell, APC)表面主要组织相容性复合物 II(major histocompatibility complex, MHC II)中呈递的蛋白多肽结合，以及天然抗原与 B 细胞表达的 B 细胞受体(B cell receptor, BCR)复合物的结合。随后的次级信号涉及 T 细胞和 APC 之间以及 B 细胞和 T 细胞之间的结合；活化的 T 细胞表达的 CD40 配体(CD40 ligand, CD40L)与 B 细胞和 APC 表达的 CD40 结合^[10]。

CD40 及其配体 CD40L(也叫 CD154)属于肿瘤坏死因子/肿瘤坏死因子受体((tumor necrosis factor, TNF)/(tumor necrosis factor receptor, TNFR)家族^[11]。CD40 是一种 48-kDa 的 I 型跨膜蛋白，不仅是 B 细胞的表面标志物，也在抗原呈递细胞(APC)上表达，包

括单核细胞, 巨噬细胞和树突细胞的亚群, 甚至一些肿瘤细胞也可表达 CD40。CD40 的配体称为 CD154 或 CD40L, 是一种 II 型跨膜蛋白, 分子量在 32 到 39kDa 之间^[12]。其特征在于夹心细胞外结构, 该结构由 β 折叠、 α 螺旋环和 β 折叠组成。这种结构允许 CD40L 的三聚化, 这也是 TNFR 家族的一个特征^[13]。在多种细胞类型上表达, 主要表达于 CD4⁺ T 细胞, 同时也在记忆 CD8 T 细胞、激活的自然杀伤细胞细胞、粒细胞、内皮细胞、平滑肌细胞、巨噬细胞和活化血小板上表达^[14]。CD40-CD40L 是一对共刺激分子, 它们在细胞表面相互作用后, 促进细胞内信号传导, 激活不同的信号通路, 参与机体的体液免疫和细胞免疫反应。在 B 细胞的活化、增殖与分化、抗体产生中起关键作用, 在 T 细胞活化以及效应性细胞因子的分泌过程中起重要调节作用^[15]。

在胸腺依赖性 (thymus dependent, TD) 体液免疫反应的启动过程中, 在抗原活化的 B 细胞表面表达的 CD40 与活化的 CD4⁺T 细胞上表达的 CD40L 的结合对于 TD 体液免疫反应的启动和进展至关重要^[16]。CD40-CD40L 的结合是生发中心 (germinal center, GC) 形成和进展以及抗体亲和力成熟所必需的, 这些过程对于记忆 B 细胞和浆细胞的生成同样至关重要^[17]。胸腺依赖性体液免疫反应过程中的 CD40-CD40L 结合可以通过使用阻断抗体、CD40L 的基因消融或 CD40 的基因消融来阻断, CD40-CD40L 相互作用阻断后即消除 TD 体液免疫^[18]。CD40 或 CD40L 缺乏的个体会出现高 IgM 综合征 (hyper-IgM, HIGM), 这是一种异质性疾病, 其特征是循环 IgM 浓度正常至高浓度, 而 IgG、IgA 和 IgE 浓度异常低^[19]。HIGM 患者对免疫反应不佳, 更容易受到呼吸系统、胃肠道和中枢神经系统的机会性感染^[20], 该疾病作为例子被认为与有缺陷的体液反应有关, 侧面证明了 CD40-CD40L 相互作用在体液免疫中的作用。

CD40-CD40L 相互作用在细胞免疫的发展中也同样重要, 有研究表明 CD40-CD40L 相互作用是某些细胞免疫反应发展中必需的^[21]。CD40-CD40L 相互作用可以影响 CD4⁺ T 细胞的分化。当 CD4⁺T 细胞上的 CD40L 与树突状细胞 (dendritic cells, DC) 上的 CD40 结合时, 可诱导树突状细胞产生以白细胞介素-12 (IL-12) 为主的细胞因子, 进而引导 CD4⁺T 细胞向 Th1 方向 (介导细胞免疫反应为主) 分化。随后静息 CD8⁺T (Naive CD8⁺T) 细胞能够扩增和分化为细胞毒性效应细胞, CD8⁺T 细胞功能失调也可能引发过度的免

疫反应，从而导致免疫反应介导的机体损伤或病理反应^[22]。

上述这些研究结果表明，CD40-CD40L 相互作用在机体发生免疫反应时，在体液免疫及细胞免疫的发展过程中均存在重要作用。

2 抗 CD40L 抗体的研究进展

由于 CD40-CD40L 信号分子对免疫反应存在广泛影响，一些实验已经产生了几种靶向分子，早期试验为靶向该途径提供了生物学验证，但也揭示了该靶向药物带来的相关风险。

2002 年 Huang 等人首次针对抗 CD40L 治疗在人类自身免疫性疾病中的作用进行机制研究。该实验通过检测狼疮患者在用药过程中用流式细胞术检测 B 细胞表型来验证药物是否存在抑制免疫反应的作用。结果表明短时间的抗 CD40L 治疗也可降低 B 细胞的分化，证明 CD40L 阻断的进一步研究对于免疫性疾病的治疗是有必要的^[23]。

Boumpas 等人在 2003 年提出了 CD40-CD40L 通路的靶向分子即特异性人源化抗 CD40L 抗体 BG9588，该实验使用 BG9588 治疗活动性增殖性狼疮性肾炎患者，实验证明特异性人源化抗 CD40L 抗体 BG9588 可降低狼疮肾炎患者血清抗 ds-DNA 抗体水平，减小血尿，增加血清 C3 浓度。这项实验研究表明阻断 CD40-CD40L 通路可以调节狼疮的重要临床指标。不幸的是，由于使用 BG9588 方案的患者发生血栓栓塞事件，BG9588 的临床评估被暂停^[24]。

Kalunian 等人针对该通路提出了另一种抗 CD40L 抗体 IDEC-131，IDEC-131 也在许多早期临床试验中进行了评估，包括 SLE、多发性硬化症等免疫系统疾病的 II 期研究。这项 II 期、双盲、安慰剂对照、多剂量研究的目的是评估抗 CD40L 抗体 IDEC-13 轻至中度狼疮患者用于治疗的安全性、有效性和免疫原性。然而，在实验终末期 IDEC-131 治疗组和安慰剂组之间的 SLEDAI 评分没有统计学差异，因此 IDEC-131 在一组轻中度 SLE 患者中的疗效尚未得到证实。且在涉及 IDEC-131 的两项独立试验中，也有三名患者观察到血栓栓塞并发症，治疗效果不明以及药物引发的不良反应导致该分子的开发停止^[25,26]。

这些早期临床实验证明抗 CD40L 抗体对于系统性红斑狼疮症状确实存在缓解作用，

但这些抗 CD40L 抗体引发的特异性的血栓栓塞并发症问题之后,许多研究集中在了解抗 CD40L 抗体治疗过程中发生血栓栓塞事件的发病机制上,血栓形成过程主要分为三个阶段:血小板的聚集、凝血因子的激活和纤维蛋白形成。目前接受度较高的解释为与 FC γ R 相关,该受体表达于人类血小板中,不表达于小鼠血小板,FC γ RIIA 是在循环中广泛表达的 FC γ R,可在血小板、单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞、中性粒细胞中检测到^[27]。细胞表面的免疫复合物与 FC γ RIIA 的结合后最终导致血小板活化,产生致密颗粒分泌和血栓形成^[28]。

因此后续针对抗 CD40L 抗体的研究不只是局限于开发抗 CD40L 抗体,同样需要针对抗 CD40L 抗体携带的功能性 Fc 区进行改造。

抗 CD40L 抗体 AT-1501 首次免疫抑制研究中对疾病的症状存在缓解作用,仍由于血栓栓塞并发症,临床开发被暂停;后对该抗体进行改造,减少与血小板上表达的 FC γ 受体的相互作用,但同时保持与 CD40L 结合力不变,提出了 AT-1501 (Tegoprubart) 这一抗 CD40L 特异性抗体,将血栓栓塞并发症出现的风险降到最低。Anwar 等人使用非人灵长类动物模型进行胰岛和肾脏同种异体移植物测试,该实验证明抗 CD40L 抗体 AT-1501 存在免疫原性,但抗体用于治疗的安全性还需进一步测试^[29]。

高亲和力抗 CD40L 抗体片段 CDP7657 同样也是在抗体 Hu5C8 的基础上经过抗体片段修改提出的新一种降低血栓栓塞并发症的抗 CD40L 抗体,Hu5C8 抗 CD40L 抗体在经过一系列自身免疫性疾病的临床试验中进行评估,数据显示疾病生物标志物显著降低,但治疗中血栓栓塞并发症的发生率增加,故该抗体的进一步开发被停止^[30]。研究组设计抗 CD40L 抗体缺乏功能性 Fc 区并通过化学连接剂偶联了 40 kDa 聚乙二醇 (polyethylene glycol,PEG) 部分,并将该新分子命名为 CDP7657。研究人员通过一系列试验首先证明该抗体与 CD40 的高亲和力,并证明抗体存在免疫原性,可调节系统性红斑狼疮重要的临床指标,对于狼疮肾炎产生的肾脏损害也有一定的缓解作用,重要的是该抗原用于治疗后血栓栓塞并发症的发生率大大降低,证明高亲和力抗 CD40L 抗体片段 CDP7657 的设计思路正确,进行后续测试后有望用于临床治疗人类 SLE 和其他自身免疫性疾病^[31]。

3 总结与展望

系统性红斑狼疮可引发全身不同程度的临床症状，其临床症状的治疗仍是需要研究的重要课题。许多研究已经表明 CD40-CD40L 相互作用在免疫反应发展过程中具有重要作用，从最初对于抗 CD40L 抗体研究开始，不同研究者设计了多种不同的抗 CD40L 抗体，相同的是研究者对于阻断 CD40-CD40L 通路以降低机体发生后续一系列免疫反应这一观点的认可。证明抗 CD40L 药物对于免疫系统疾病存在缓解临床症状效果后，进一步讨论药物用于治疗的安全性，实验初期发现特异性抗人源化抗 CD40L 抗体出现严重的血栓栓塞事件，随后多个研究表明抗 CD40L 抗体治疗过程中发生血栓栓塞事件，在血栓栓塞事件的发病机制上主要是由于表达在人类血小板上的 FC 受体片段，与抗 CD40L 抗体上的 FC 片段结合后发生血小板聚集反应，最后形成血栓。后续对于抗 CD40L 抗体研究中，研究人员通过对抗 CD40L 抗体 FC 片段进行不同程度的修改，在保证抗 CD40L 抗体用于人体免疫系统疾病的过程中，不仅存在免疫原性，同时降低治疗过程中出现的血栓栓塞事件的发生率。因此，对于抗 CD40L 抗体的研究，尽力提高系统性红斑狼疮治疗效果的同时，进一步探究抗体 FC 片段的编辑修改，为提高系统性红斑狼疮患者治疗的有效性以及安全性提供一些新的思路。

参考文献

- [1] McCarty D J, Manzi S, Medsger T A, et al. Incidence of systemic lupus erythematosus. Race and gender differences[J]. Arthritis and Rheumatism, 1995, 38(9): 1260-1270.
- [2] Weckerle C E, Niewold T B. The unexplained female predominance of systemic lupus erythematosus: clues from genetic and cytokine studies[J]. Clinical Reviews in Allergy & Immunology, 2011, 40(1): 42-49.
- [3] Karrar S, Cunninghame Graham D S. Abnormal B Cell Development in Systemic Lupus Erythematosus: What the Genetics Tell Us[J]. Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.), 2018, 70(4): 496-507.
- [4] Doria A, Gatto M, Zen M, et al. Optimizing outcome in SLE: treating-to-target and definition of treatment goals[J]. Autoimmunity Reviews, 2014, 13(7): 770-777.
- [5] Ruiz-Irastorza G, Danza A, Khamashta M. Glucocorticoid use and abuse in SLE[J]. Rheumatology (Oxford, England), 2012, 51(7): 1145-1153.
- [6] Ponticelli C, Moroni G. Hydroxychloroquine in systemic lupus erythematosus (SLE)[J]. Expert Opinion on Drug Safety, 2017, 16(3): 411-419.
- [7] Mok C C. Therapeutic options for resistant lupus nephritis[J]. Seminars in Arthritis and Rheumatism, 2006, 36(2): 71-81.
- [8] Muangchan C, van Vollenhoven R F, Bernatsky S R, et al. Treatment Algorithms in Systemic Lupus Erythematosus[J]. Arthritis Care & Research, 2015, 67(9): 1237-1245.
- [9] Jones J V. Plasmapheresis in SLE[J]. Clinics in Rheumatic Diseases, 1982, 8(1): 243-260.
- [10] Bretscher P A. A two-step, two-signal model for the primary activation of precursor helper T cells[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United

States of America, 1999, 96(1): 185-190.

- [11] Croft M, Benedict C A, Ware C F. Clinical targeting of the TNF and TNFR superfamilies[J]. Nature Reviews. Drug Discovery, 2013, 12(2): 147-168.
- [12] van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand[J]. Journal of Leukocyte Biology, 2000, 67(1): 2-17.
- [13] Karpusas M, Hsu Y M, Wang J H, et al. 2 A crystal structure of an extracellular fragment of human CD40 ligand[J]. Structure (London, England: 1993), 1995, 3(10): 1031-1039.
- [14] Hollenbaugh D, Grosmaire L S, Kullas C D, et al. The human T cell antigen gp39, a member of the TNF gene family, is a ligand for the CD40 receptor: expression of a soluble form of gp39 with B cell co-stimulatory activity[J]. The EMBO journal, 1992, 11(12): 4313-4321.
- [15] Kawabe T, Naka T, Yoshida K, et al. The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation[J]. Immunity, 1994, 1(3): 167-178.
- [16] Clark E A, Ledbetter J A. Activation of human B cells mediated through two distinct cell surface differentiation antigens, Bp35 and Bp50. Proc. Natl. Acad. Sci. 1986. 83: 4494-4498[J]. Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950), 2012, 188(9): 4130-4134.
- [17] Tm F, Dm S, Fh D, et al. In vivo CD40-gp39 interactions are essential for thymus-dependent humoral immunity. II. Prolonged suppression of the humoral immune response by an antibody to the ligand for CD40, gp39[J]. The Journal of experimental medicine, 1993, 178(5).
- [18] Banchereau J, Bazan F, Blanchard D, et al. The CD40 antigen and its ligand[J]. Annual Review of Immunology, 1994, 12: 881-922.
- [19] Conley M E, Larché M, Bonagura V R, et al. Hyper IgM syndrome associated with

defective CD40-mediated B cell activation[J]. The Journal of Clinical Investigation, 1994, 94(4): 1404-1409.

- [20] Cabral-Marques O, Schimke L F, Pereira P V S, et al. Expanding the clinical and genetic spectrum of human CD40L deficiency: the occurrence of paracoccidioidomycosis and other unusual infections in Brazilian patients[J]. Journal of Clinical Immunology, 2012, 32(2): 212-220.
- [21] D' Orlando O, Gri G, Cattaruzzi G, et al. Outside inside signalling in CD40-mediated B cell activation[J]. Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents, 2007, 21(3-4): 49-62.
- [22] Kelsall B L, Stüber E, Neurath M, et al. Interleukin-12 production by dendritic cells. The role of CD40-CD40L interactions in Th1 T-cell responses[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 1996, 795: 116-126.
- [23] Huang W, Sinha J, Newman J, et al. The effect of anti-CD40 ligand antibody on B cells in human systemic lupus erythematosus[J]. Arthritis and Rheumatism, 2002, 46(6): 1554-1562.
- [24] Boumpas D T, Furie R, Manzi S, et al. A short course of BG9588 (anti-CD40 ligand antibody) improves serologic activity and decreases hematuria in patients with proliferative lupus glomerulonephritis[J]. Arthritis and Rheumatism, 2003, 48(3): 719-727.
- [25] Davis J C, Totoritis M C, Rosenberg J, et al. Phase I clinical trial of a monoclonal antibody against CD40-ligand (IDEC-131) in patients with systemic lupus erythematosus[J]. The Journal of Rheumatology, 2001, 28(1): 95-101.
- [26] Kalunian K C, Davis J C, Merrill J T, et al. Treatment of systemic lupus erythematosus by inhibition of T cell costimulation with anti-CD154: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial[J]. Arthritis and Rheumatism, 2002, 46(12): 3251-3258.

- [27] Nimmerjahn F, Ravetch J V. Fc-receptors as regulators of immunity[J]. *Advances in Immunology*, 2007, 96: 179-204.
- [28] Yanaga F, Poole A, Asselin J, et al. Syk interacts with tyrosine-phosphorylated proteins in human platelets activated by collagen and cross-linking of the Fc gamma-IIA receptor[J]. *The Biochemical Journal*, 1995, 311 (Pt 2)(Pt 2): 471-478.
- [29] Anwar I J, Berman D M, DeLaura I, et al. The anti-CD40L monoclonal antibody AT-1501 promotes islet and kidney allograft survival and function in nonhuman primates[J]. *Science Translational Medicine*, 2023, 15(711): eadf6376.
- [30] Kawai T, Andrews D, Colvin R B, et al. Thromboembolic complications after treatment with monoclonal antibody against CD40 ligand[J]. *Nature Medicine*, 2000, 6(2): 114.
- [31] Shock A, Burkly L, Wakefield I, et al. CDP7657, an anti-CD40L antibody lacking an Fc domain, inhibits CD40L-dependent immune responses without thrombotic complications: an in vivo study[J]. *Arthritis Research & Therapy*, 2015, 17(1): 234.