

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.03.007

芪参地黄颗粒对实验性自身免疫性重症肌无力大鼠 B 细胞介导的免疫机制研究*

蒋 荔¹ 徐 鹏² 吕志国² 张冬梅² 卢 靖¹ 黄清霞¹ 张艺缤¹ 单慧毓² 王 健^{2△}

(1 长春中医药大学中医学院 吉林 长春 130117; 2 长春中医药大学附属医院脑病中心 吉林 长春 130021)

摘要 目的:探讨芪参地黄颗粒对实验性自身免疫性重症肌无力(EAMG)大鼠 B 细胞介导的免疫机制。**方法:**通过 Rα97-116 肽段和完全弗氏佐剂免疫,成功将 30 只 Lewis 大鼠构建 EAMG 模型,将 EAMG 大鼠随机分为模型组、芪参地黄颗粒低、中、高剂量组和阳性药组,每组 6 只。进一步观察大鼠体重及临床症状,检测血清中乙酰胆碱受体抗体(AChR-Ab)含量、脾脏组织 CD19 和 CD27 的蛋白表达、B 淋巴细胞刺激因子(BAFF)、B 细胞趋化因子 CXC 配体 13(CXCL13)、C-X-C 趋化因子受体 5 型(CXCR5) mRNA 表达。**结果:**经给药治疗后芪参地黄颗粒低、中、高剂量组和阳性药组与模型组相比体重增加($P<0.05$),临床症状评分均下降($P<0.05$)。经给药治疗后,与模型组相比,芪参地黄颗粒低、中、高剂量组血清中 AChR-Ab 含量均降低($P<0.05$),芪参地黄颗粒中、高剂量组脾脏组织 CD27 蛋白表达、CD19 蛋白表达和 BAFF mRNA 表达降低($P<0.05$),芪参地黄颗粒高剂量组脾脏组织 CXCL13 和 CXCR5 mRNA 表达降低($P<0.05$),且芪参地黄颗粒中、高剂量组脾脏组织 CD19 蛋白表达较阳性药组下降($P<0.05$)。**结论:**芪参地黄颗粒通过降低 EAMG 大鼠 CD19 和 CD27 蛋白、BAFF、CXCL13 和 CXCR5 mRNA 的表达,减少 B 细胞的分化增殖,抑制 B 细胞产生 AChR-Ab,减少对乙酰胆碱受体的破坏,使 EAMG 大鼠体重增加,临床症状得到改善。

关键词:芪参地黄颗粒;实验性自身免疫性重症肌无力;免疫;B 细胞

中图分类号:R746.1;R243 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2022)03-432-05

Study of Qishendihuang Granule on B Cell-Mediated Immune Mechanism of Experimental Autoimmune Myasthenia Gravis Rats*

JIANG Li¹, XU Peng², LÜ Zhi-guo², ZHANG Dong-mei², LU Jing¹, HUANG Qing-xia¹, ZHANG Yi-bin¹,SHAN Hui-yu², WANG Jian^{2△}

(1 College of Traditional Chinese medicine, Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun, Jilin, 130117, China;

2 Brain Disease Center, Affiliated Hospital of Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun, Jilin, 130021, China)

ABSTRACT Objective: To explore the immune mechanism of Qishendihuang granule on B cell-mediated of experimental autoimmune myasthenia gravis (EAMG) rats. **Methods:** By immunizing with Rα97-116 peptide and complete Freund's adjuvant, 30 Lewis rats were successfully constructed EAMG model. EAMG rats were randomly divided into model group, Qishendihuang granule low, medium and high dose groups and positive drug group, 6 rats in each group. The weight and clinical symptoms of the rats were further observed, and the serum acetylcholine receptor antibody (AChR-Ab) content, the protein expression of CD19 and CD27 in the spleen and the expression of B lymphocyte stimulating factor (BAFF), B cell chemokine CXC ligand 13 (CXCL13) and C-X-C chemokine receptor type 5 (CXCR5) mRNA were detected. **Results:** After administration of drug treatment, the weight of low, medium and high dose groups and positive drug group of Qishendihuang granule increased compared with that in the model group($P<0.05$), and the clinical symptom scores all decreased ($P<0.05$). After administration of drug treatment, compared with the model group, the serum AChR-Ab content of the Qishendihuang granule low, medium and high dose groups all decreased ($P<0.05$), and the expression of CD27 protein, CD19 protein and BAFF mRNA in the spleen of Qishendihuang granule medium and high dose groups decreased ($P<0.05$), and the expression of CXCL13 and CXCR5 mRNA in the spleen of Qishendihuang granule high dose group decreased ($P<0.05$), moreover, the expression of CD19 protein in spleen tissues of Qishendihuang granule medium and high dose groups decreased compared with that of positive drug group ($P<0.05$). **Conclusions:** Qishendihuang granule can reduce the expression of D19 and CD27, BAFF, CXCL13 and CXCR5 in EAMG rats, reduce the differentiation and proliferation of B cells, inhibit the production of AChR-Ab by B cells, reduce the damage to acetylcholine receptor, and increase the weight of EAMG rats, and improve the clinical symptoms.

Key words: Qishendihuang granule; Experimental autoimmune myasthenia gravis; Immune; B cells

Chinese Library Classification(CLC): R746.1; R243 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2022)03-432-05

* 基金项目:吉林省科技发展计划项目(20190905005SF, 20180311025YY);吉林省中医药科技项目(2020164);

吉林省卫生健康技术创新项目(20191056, 2019ZC004)

作者简介:蒋荔(1990-),女,博士研究生,研究方向:脑病急症研究, E-mail: jianglimimi2021@163.com

△ 通讯作者:王健(1970-),男,博士,主任医师,研究方向:中医药治疗中风病及重症肌无力, E-mail: jian-w222@163.com

(收稿日期:2021-05-06 接受日期:2021-05-31)

前言

重症肌无力(MG)是一种抗体与乙酰胆碱受体或神经肌肉连接处突触后膜上的功能相关分子结合而导致骨骼肌无力的自身免疫性疾病^[1-3]。目前有关MG的治疗无统一方案,多进行激素治疗以控制症状为主,但长期应用副作用较多,疗效存在局限性^[4,5]。中医学认为MG发病主要是脾、胃、肝、肾四个脏腑气血阴阳亏虚为主,并加以论治^[6]。中医学并无“重症肌无力”这一病名,因临床特征表现,归入痿病范畴。《黄帝内经》最早讨论痿病,提出“治痿独取阳明”理论,治疗多以补益脾胃为主。李东垣创制的“补中益气汤”治疗MG疗效显著,广泛应用至今^[7]。本研究通过在补中益气汤基础上加减小剂量黄芪颗粒,方拟黄芪、人参、炒白术、当归、地龙、钩藤、升麻、陈皮、山药、巴戟天、熟地、狗脊、枸杞子、炙甘草、柴胡、葛根、黄精,共奏“健脾益气补髓”之效。B细胞被认为是大多数自身免疫性疾病的致病细胞,在体液免疫反应中发挥重要作用^[8,9]。本研究以实验性自身免疫性重症肌无力(EAMG)大鼠为研究对象,通过观察其体重和临床症状,检测其外周血清中乙酰胆碱受体抗体(AChR-Ab)含量和B细胞免疫相关蛋白表达水平,初步揭示芪参地黄颗粒治疗MG的免疫学机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物与饲养 45只SPF级健康雌性Lewis大鼠,周龄6-8周,体重160-180g,饲养于吉林大学基础动物实验中心SPF级屏障实验室。由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,许可证号:SCXK(京)2016-0006。

1.1.2 药物与试剂 芪参地黄颗粒由长春中医药大学附属医院中药药研究中心药学实验室提供;醋酸泼尼松片(天津天药药业股份有限公司,国药准字H12020689,规格5mg)。大鼠来源的AChR α 亚基97-116肽段(R α 97-116)DGDFAIWK-FTKVLLDYTGHI(苏州强耀生物科技有限公司),完全福氏佐剂(complete freund's adjuvant,CFA)(美国Sigma-Aldrich公司),H37RA干粉(美国Difco Bacto公司),AChR-Ab ELISA试剂盒(英国Abbexa Ltd公司),CD19抗体(英国Abcam公司),CD27抗体(美国Novus Biologicals公司), β -actin抗体(美国CST公司),PCR抗体[生工生物工程(上海)股份有限公司],PBS(武汉赛维尔生物科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 EAMG模型建立 EAMG大鼠模型参考Li N等^[10]和Baggi F等^[11]人的方法建立,CFA乳剂充分混匀200 μ L(含AChR α 97-116多肽50 μ g,H37RA干粉1mg),第0d首次免疫注射于大鼠尾部、双后肢足垫和背部两侧,佐剂对照组注射等量CFA与PBS混合乳剂;第30d和45d进行加强免疫,以相同位点和剂量注射IFA乳剂200 μ L含AChR α 97-116多肽50 μ g,佐剂对照组注射IFA与PBS混合乳剂。

1.2.2 分组及给药 45只大鼠随机选取6只作为佐剂对照组,剩余39只造模,以下三个条件同时满足则说明EAMG模型成功建立^[12]:①体重下降;②临床症状评分>1分;③大鼠外周血清AChR-Ab含量升高,与佐剂对照组比较有统计学差异。

第二次免疫后7d进行评估,确定共30只大鼠符合EAMG标准,随机分为模型组、芪参地黄颗粒低、中、高剂量组和阳性药(醋酸泼尼松片)组各6只。造模成功后连续给药30d,芪参地黄颗粒低、中、高剂量组、阳性药组按芪参地黄颗粒3.87g/(kg·d)、7.74g/(kg·d)和11.7g/(kg·d)、醋酸泼尼松片5.4mg/(kg·d)灌胃,模型组与佐剂对照组20mL/kg生理盐水灌胃。

1.2.3 评估及标准 于给药治疗前(0d)、治疗第10d、20d、30d、40d、50d、60d、70d后进行体重测量和临床症状评估。临床症状:依据Lennon临床症状分级法^[13]评估,标准如下:无疲劳现象,肌力正常为0级;易疲劳,活动减少,抓握力或叫声减弱为1级;动作不协调,隆背,无力,前肢弯曲,抓握力或叫声明显减弱为2级;无叫声,全身严重无力,肌肉震颤,濒死或死亡为3级。根据分级相应记为0、1、2、3分。

1.2.4 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清AChR-Ab含量 第二次免疫后7d尾基部静脉取血,治疗结束后腹主动脉取血检测,取血后3000r/min,4℃下离心10min,取上清液,检测AChR-Ab含量,操作严格按照试剂盒说明书进行。

1.2.5 免疫印迹法(Western blot)检测脾脏组织CD19和CD27蛋白表达 将取出的脾脏组织剪碎后放入RIPA裂解液,冰上裂解40min,12000r/min,4℃下离心10min,取上清,BCA法测蛋白浓度,将样本蛋白浓度调整相同,SDS-PAGE凝胶电泳分离,转膜90min,封闭1h,4℃下孵育CD19、CD27和 β -actin抗体过夜,TBST洗膜,孵育山羊抗兔二抗1h,TBST洗膜,加入ECL化学发光液显色曝光拍照。

1.2.6 RT-PCR检测基因表达 脾脏组织匀浆后,Trizol提取组织总RNA。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,见表1。反应条件95℃,10min;95℃,15s;60℃,30s;40个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法计算B淋巴细胞刺激因子(BAFF)、B细胞趋化因子CXCL13(CXCL13)、C-X-C趋化因子受体5型(CXCR5)mRNA相对表达水平。

表1 检测基因的引物序列

Table 1 Primer sequence of detection gene

Primer name	Direction	Primer sequence(5'-3')
BAFF	F	TTCCATGGCTTCTCAGCTTT
	R	GGAATTGTTGGGCAGTGTTT
CXCL13	F	TGAGGCTCAGCACAGCAA
	R	ATGGGCTTCCAGAATACCG
CXCR5	F	ATGGCCTTAATGTGCCTGTC
	R	CTTCTGGAAGTTGCCCTCAG
Gapdh	F	AACCTTGGCATTGTGGAAGG
	R	ACACATTGGGGGTAGGAACA

1.3 统计学分析

应用Graph PadPrism 5.0软件进行统计分析。体重、临床症状评分等计量资料经检验符合正态分布均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用t检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠体重比较

给药治疗第 30 d、40 d、50 d、60 d、70 d 后, 模型组大鼠体重低于佐剂对照组大鼠($P<0.05$); 给药治疗第 50 d、60 d、70 d

后, 芪参地黄颗粒低、中、高剂量组和阳性药组与模型组相比体重增加($P<0.05$), 见表 2。表明芪参地黄颗粒与醋酸泼尼松片均可增加体重。

表 2 各组大鼠体重变化($\bar{x} \pm s$, g)
Table 2 Weight change of rats in each group($\bar{x} \pm s$, g)

Groups	n	0 d	10 d	20 d	30 d	40 d	50 d	60 d	70 d
Control	6	173.6 $\pm$ 2.1	198.4 $\pm$ 7.6	215.2 $\pm$ 6.2	224.6 $\pm$ 6.1	229.4 $\pm$ 4.5	240.0 $\pm$ 9.0	242.8 $\pm$ 6.5	251.8 $\pm$ 6.8
Model	6	174.1 $\pm$ 3.9	195.4 $\pm$ 6.8	207.8 $\pm$ 9.9	206.4 $\pm$ 10.9 ^a	192.5 $\pm$ 10.2 ^a	181.0 $\pm$ 9.6 ^a	176.1 $\pm$ 9.8 ^a	169.5 $\pm$ 8.2 ^a
QSDH-L	6	175.2 $\pm$ 3.6	177.4 $\pm$ 7.3 ^{ab}	193.0 $\pm$ 6.1 ^{ab}	193.4 $\pm$ 8.8 ^{ab}	189.2 $\pm$ 9.3 ^a	206.8 $\pm$ 9.9 ^{ab}	217.2 $\pm$ 10.1 ^{ab}	225.2 $\pm$ 11.3 ^{ab}
QSDH-M	6	175.0 $\pm$ 3.2	178.8 $\pm$ 5.8 ^{ab}	193.2 $\pm$ 5.4 ^{ab}	198.4 $\pm$ 6.7 ^a	192.2 $\pm$ 6.7 ^a	209.6 $\pm$ 9.2 ^{ab}	219.6 $\pm$ 9.5 ^{ab}	229.4 $\pm$ 10.9 ^{ab}
QSDH-H	6	172.0 $\pm$ 6.7	181.2 $\pm$ 8.1 ^{ab}	191.8 $\pm$ 8.4 ^{ab}	197.0 $\pm$ 9.3 ^a	190.2 $\pm$ 8.2 ^a	206.8 $\pm$ 7.9 ^{ab}	221.8 $\pm$ 8.6 ^{ab}	238.8 $\pm$ 7.9 ^{ab}
Prednisone	6	172.8 $\pm$ 4.1	177.0 $\pm$ 9.6 ^{ab}	194.2 $\pm$ 10.6 ^{ab}	204.2 $\pm$ 11.3 ^a	198.0 $\pm$ 11.4 ^a	214.8 $\pm$ 10.3 ^{ab}	222.8 $\pm$ 8.4 ^{ab}	230.6 $\pm$ 9.2 ^{ab}

Note: compared with the control group, ^a $P<0.05$; compared with the model group, ^b $P<0.05$.

2.2 各组大鼠临床症状评分比较

给药治疗第 0 d、10 d、20 d、30 d、40 d、50 d、60 d、70 d 后, 与佐剂对照组相比, 模型组临床症状评分升高($P<0.05$); 给药

治疗第 50 d、60 d、70 d 后, 芪参地黄颗粒低、中、高剂量组和阳性药组与模型组相比, 临床症状评分均下降($P<0.05$), 见表 3。表明芪参地黄颗粒与醋酸泼尼松片均可改善临床症状。

表 3 各组大鼠临床症状评分比较($\bar{x} \pm s$, 分)
Table 3 Clinical scores of rats in each group($\bar{x} \pm s$, scores)

Groups	n	0 d	10 d	20 d	30 d	40 d	50 d	60 d	70 d
Control	6	0	0	0	0	0	0	0	0
Model	6	0	1.20 $\pm$ 0.27 ^a	1.60 $\pm$ 0.42 ^a	1.60 $\pm$ 0.22 ^a	1.90 $\pm$ 0.22 ^a	2.20 $\pm$ 0.27 ^a	1.90 $\pm$ 0.42 ^a	2.20 $\pm$ 0.45 ^a
QSDH-L	6	0	1.20 $\pm$ 0.45 ^a	1.50 $\pm$ 0.35 ^a	1.40 $\pm$ 0.24 ^a	1.70 $\pm$ 0.45 ^a	1.70 $\pm$ 0.27 ^{ab}	1.20 $\pm$ 0.27 ^{ab}	0.90 $\pm$ 0.65 ^{ab}
QSDH-M	6	0	1.30 $\pm$ 0.27 ^a	1.60 $\pm$ 0.22 ^a	1.40 $\pm$ 0.22 ^a	1.70 $\pm$ 0.27 ^a	1.60 $\pm$ 0.22 ^{ab}	1.20 $\pm$ 0.27 ^{ab}	0.60 $\pm$ 0.22 ^{ab}
QSDH-H	6	0	0.90 $\pm$ 0.22 ^a	1.30 $\pm$ 0.27 ^{ab}	1.40 $\pm$ 0.23 ^a	1.70 $\pm$ 0.27 ^a	1.50 $\pm$ 0.30 ^{ab}	0.90 $\pm$ 0.22 ^{ab}	0.70 $\pm$ 0.27 ^{ab}
Prednisone	6	0	1.10 $\pm$ 0.55 ^a	1.60 $\pm$ 0.22 ^a	1.50 $\pm$ 0.20 ^a	1.50 $\pm$ 0.30 ^{ab}	1.40 $\pm$ 0.42 ^{ab}	1.10 $\pm$ 0.42 ^{ab}	0.80 $\pm$ 0.45 ^{ab}

Note: compared with the control group, ^a $P<0.05$; compared with the model group, ^b $P<0.05$.

2.3 各组大鼠血清 AChR-Ab 含量的比较

治疗前检测, 模型组大鼠血清 AChR-Ab 含量明显高于佐剂对照组($P<0.05$), 如图 1-A 所示。治疗结束检测, 模型组血

清 AChR-Ab 含量高于佐剂对照组($P<0.05$), 芪参地黄颗粒各剂量组和阳性药组与模型组相比, 血清 AChR-Ab 含量均降低($P<0.05$), 如图 1-B 所示。

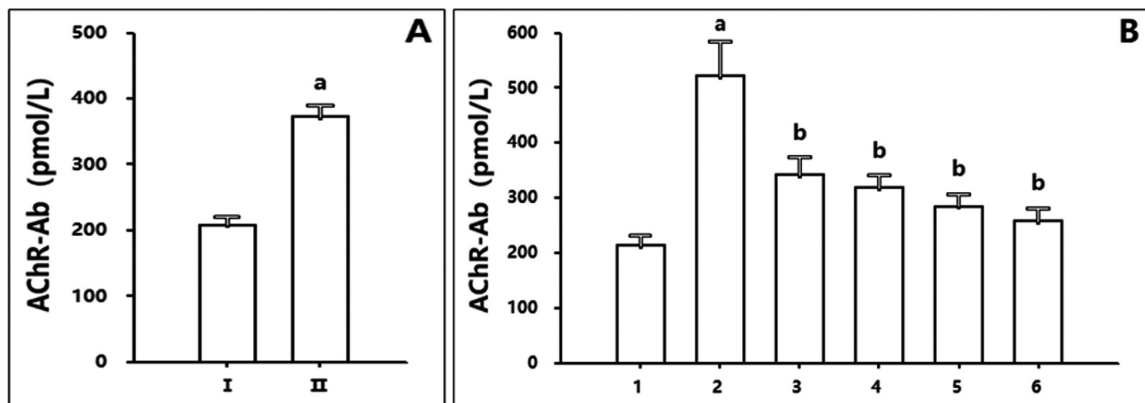


图 1 各组大鼠血清 AChR-Ab 含量

Fig.1 Serum AChR-Ab content of rats in each group

Note: I : Control, II : Model, 1: Control, 2: Model, 3: QSDH-L, 4: QSDH-M, 5: QSDH-H, 6: Prednisone.compared with the control group, ^a $P<0.05$; compared with the model group, ^b $P<0.05$.

2.4 各组大鼠脾脏组织 CD19 和 CD27 蛋白表达水平比较

与佐剂对照组相比,模型组大鼠脾脏组织 CD19 和 CD27 蛋白表达水平显著升高($P<0.05$);与模型组相比,芪参地黄颗粒

粒中、高剂量组和阳性药组脾脏组织 CD19、CD27 蛋白表达水平均降低($P<0.05$),且芪参地黄颗粒中、高剂量组脾脏组织 CD19 蛋白表达水平低于阳性药组($P<0.05$),见图 2A、B、C。

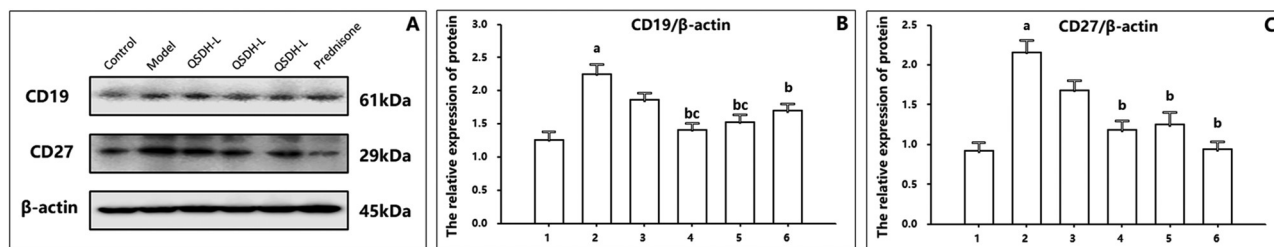


图2 各组大鼠脾脏组织 CD19 和 CD27 蛋白的表达

Fig.2 Expression of CD19 and CD27 in spleen of rats in each group

Note: 1: Control, 2: Model, 3: QSDH-L, 4: QSDH-M, 5: QSDH-H, 6: Prednisone.compared with the control group, ^a $P<0.05$; compared with the model group, ^b $P<0.05$; compared with the prednisone group, ^c $P<0.05$.

2.5 各组大鼠脾脏组织 BAFF、CXCL13 和 CXCR5 mRNA 表达比较

实验结果表明,与佐剂对照组相比,模型组脾脏组织 BAFF、CXCL13 和 CXCR5 mRNA 表达水平平均升高($P<0.05$);

与模型组相比,芪参地黄颗粒中、高剂量组和阳性药组脾脏组织 BAFF mRNA 表达水平降低($P<0.05$),芪参地黄颗粒高剂量组和阳性药组脾脏组织 CXCL13 和 CXCR5 mRNA 表达水平平均降低($P<0.05$),见图 3A、B、C。

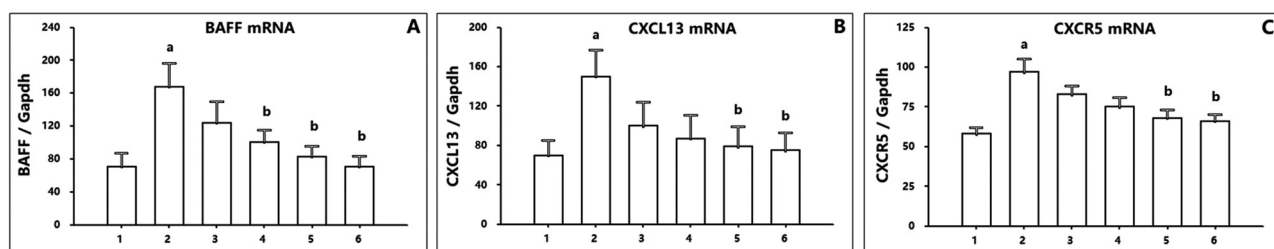


图3 各组大鼠脾脏 BAFF、CXCL13 和 CXCR5 mRNA 的表达水平

Fig.3 Expression levels of BAFF, CXCL13 and CXCR5 mRNA in spleen of rats in each group

Note: 1: Control, 2: Model, 3: QSDH-L, 4: QSDH-M, 5: QSDH-H, 6: Prednisone.compared with the control group, ^a $P<0.05$; compared with the model group, ^b $P<0.05$.

3 讨论

MG 的症状主要是由针对烟碱型乙酰胆碱受体(AChR)的致病抗体所介导,导致神经肌肉接头(NMJ)突触后终板 AChR 分子数量减少^[13,14]。本研究中,与佐剂对照组相比,模型组大鼠血清 AChR-Ab 含量明显升高,并伴有体重持续性减轻,临床症状加重的表现,说明本实验采用的 AChR α 97-116 肽段能够刺激 MG 的抗原决定簇,实现特异性免疫应答,成功构建 EAMG 大鼠模型。给药后,芪参地黄颗粒各剂量组和阳性药组大鼠血清 AChR-Ab 含量均降低,且芪参地黄颗粒各剂量组略低于阳性药组,不具有统计学差异。说明芪参地黄颗粒和醋酸泼尼松片均可降低 AChR-Ab 含量,缓解 MG 症状,具有治疗 MG 的作用。

自身反应性 T 细胞克隆性增殖可引起 MG 的发病,T 细胞通过补体介导的作用激活能够产生 AChR 抗体的 B 细胞,破坏 NMJ 处的 AChR。而抗体主要由 B 细胞分泌,B 细胞的失调又可导致抗体生成异常。CD19 抗原仅在 B 细胞上表达,属于免疫球蛋白 Ig 超家族^[15,16]。CD19 通过调节非抗原依赖的 B 细胞发育和免疫球蛋白诱导的 B 淋巴细胞活化来建立优化免疫应答^[17-19]。本研究中,相比于佐剂对照组,模型组 CD19 蛋白表

达显著升高,提示 EAMG 大鼠体内免疫应答失衡。同时在给药后,芪参地黄颗粒纠正免疫应答能力强于醋酸泼尼松片。初始性 B 细胞、记忆性 B 细胞、浆母细胞和 Breg 细胞等表型,是 B 细胞分化发育过程中形成的不同亚群^[20]。记忆 B 细胞的诱导和维持是体液免疫长期保护的关键之一^[21,22]。近几年,CD27 已成为 MG 临床研究的重要记忆性 B 细胞的阳性标志物^[23]。本研究中,相比于佐剂对照组,模型组 CD27 蛋白表达明显升高($P<0.001$),经治疗后,芪参地黄颗粒中、高剂量组和阳性药组脾脏组织 CD19、CD27 蛋白表达水平均显著降低,说明芪参地黄颗粒和醋酸泼尼松片都参与了免疫调节。

B 细胞活化因子 BAFF 是调节免疫反应的 TNF 超家族的成员,能促进 B 细胞存活和成熟^[24],是 B 细胞生存所必需的因子^[25]。BAFF 水平异常则影响 B 细胞自身抗体的产生,从而诱发疾病^[26],有研究表明,BAFF 对系统性红斑狼疮、MG、类风湿关节炎、干燥综合征等自身免疫疾病的发病有重要影响^[27]。与佐剂对照组相比,模型组脾脏 BAFF mRNA 表达明显升高,治疗结束后,芪参地黄颗粒中、高剂量组和阳性药组 BAFF mRNA 表达水平均较模型组降低,提示芪参地黄颗粒抑制 BAFF 的表达,参与了免疫调节。CXCL13 是一种趋化因子,主要表达于次级淋巴组织,如淋巴结、脾脏、胸腺和肠道相关淋巴组织^[28]。

CXCL13 对 B 细胞和一小部分 CD4 T 细胞、次级淋巴器官和炎症组织有强大归巢作用^[29]。已有报道表明 CXCL13 参与了 MG 的发病过程,并可能影响 MG 的临床症状^[30]。CXCL13 有一个独特的受体 CXCR5,二者相互作用可趋化 B 淋巴细胞的迁移和聚集,促使 B 淋巴细胞分化浆细胞从而产生抗体^[31]。本研究中,与佐剂对照组相比,模型组脾脏组织 CXCL13 和 CXCR5 mRNA 表达水平升高,给药治疗后,芪参地黄颗粒高剂量组和阳性药组脾脏组织 CXCL13 和 CXCR5 mRNA 表达水平均降低。说明芪参地黄颗粒和醋酸泼尼松片都参与了免疫调节,降低 CXCL13 和 CXCR5 的表达,减少 B 细胞分化、减少 B 细胞分泌 AChR-Ab。

综上所述,芪参地黄颗粒通过下调 B 细胞相关因子 CD19、记忆 B 细胞 CD27、B 细胞活化因子 BAFF、B 细胞趋化因子 CXCL13 和受体 CXCR5 的表达,从而减少 B 细胞的增殖分化,降低 AChR-Ab 分泌量,减少对 AChR 和 NMJ 的损害,改善 EAMG 大鼠 MG 的症状,对 MG 发挥治疗作用。本研究为探究芪参地黄颗粒治疗 MG 的 B 细胞免疫介导机制的研究提供了免疫学证据。

参考文献(References)

- [1] Gilhus NE. Myasthenia Gravis [J]. N Engl J Med, 2016, 375 (26): 2570-2581
- [2] Ke L, Li Q, Song J, et al. The mitochondrial biogenesis signaling pathway is a potential therapeutic target for myasthenia gravis via energy metabolism (Review)[J]. Exp Ther Med, 2021, 22(1): 702
- [3] 吕麦扣, 李建, 侯瑞华, 等. 甲基强的松龙联合中剂量环磷酰胺治疗重症肌无力危象的临床效果 [J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(7): 1318-1320
- [4] Menon D, Barnett C, Bril V. Novel Treatments in Myasthenia Gravis [J]. Front Neurol, 2020, 11(538): 1-12
- [5] 姚舒洋, 李小雪, 农靖颖, 等. 免疫检查点抑制剂相关性重症肌无力: 从诊断到治疗[J]. 中国肺癌杂志, 2020, 23(8): 685-688
- [6] 李美娟, 陈少玫. 中医药治疗重症肌无力简况 [J]. 实用中医内科杂志, 2018, 32(7): 75-77
- [7] 刘馨雁, 樊蕾. 补中益气汤对老年重症肌无力患者 Treg 细胞、淋巴细胞亚群及疗效的影响[J]. 世界中医药, 2020, 15(21): 3336-3339
- [8] Zhang Y, Zhang X, Xia Y, et al. CD19+ Tim-1+ B cells are decreased and negatively correlated with disease severity in Myasthenia Gravis patients[J]. Immunol Res, 2016, 64(5-6): 1216-1224
- [9] Jiang R, Hoehn KB, Lee CS, et al. Thymus-derived B cell clones persist in the circulation after thymectomy in myasthenia gravis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020, 117(48): 30649-30660
- [10] Li N, Wang G, Yao X, et al. Adenosine receptor expression in a rat model of experimental autoimmune myasthenia gravis [J]. Cell Immunol, 2014, 290(2): 217-225
- [11] Baggi F, Annoni A, Ubiali F, et al. Breakdown of tolerance to a self-peptide of acetylcholine receptor alpha-subunit induces experimental myasthenia gravis in rats [J]. J Immunol, 2004, 172 (4): 2697-2703
- [12] Lennon VA, Lindstrom JM, Seybold ME. Experimental autoimmune myasthenia: A model of myasthenia gravis in rats and guinea pigs[J]. J Exp Med, 1975, 141(6): 1365-1375
- [13] Barrantes FJ. Possible implications of dysregulated nicotinic acetylcholine receptor diffusion and nanocluster formation in myasthenia gravis[J]. Neural Regen Res, 2021, 16(2): 242-246
- [14] Paz ML, Barrantes FJ. Autoimmune Attack of the Neuromuscular Junction in Myasthenia Gravis: Nicotinic Acetylcholine Receptors and Other Targets[J]. ACS Chem Neurosci, 2019, 10(5): 2186-2194
- [15] Xu Y, Fairfax K, Light A, et al. CD19 differentially regulates BCR signalling through the recruitment of PI3K [J]. Autoimmunity, 2014, 47(7): 430-437
- [16] Haque S, Vaiselbuh SR. CD19 Chimeric Antigen Receptor-Exosome Targets CD19 Positive B-lineage Acute Lymphocytic Leukemia and Induces Cytotoxicity[J]. Cancers (Basel), 2021, 13(6): 1401
- [17] Forsthuber TG, Cimborra DM, Ratchford JN, et al. B cell-based therapies in CNS autoimmunity: differentiating CD19 and CD20 as therapeutic targets[J]. Ther Adv Neurol Disord, 2018, 2(11): 1-13
- [18] Zhou B, Mei F, Wu C, et al. Protective effect of trichostatin A on CD19+CD5+CD1dhigh regulatory B cells in heart transplantation[J]. Mol Med Rep, 2021, 23(5): 339
- [19] Zhang Z, Chen X, Tian Y, et al. Point mutation in CD19 facilitates immune escape of B cell lymphoma from CAR-T cell therapy [J]. J Immunother Cancer, 2020, 8(2): e001150
- [20] 蒋建华, 薛群, 刘翠平, 等. 重症肌无力患者外周血具有 CD27 和 CD38 表型的 B 细胞亚群表达变化 [J]. 中国现代神经疾病杂志, 2019, 19(11): 883-890
- [21] Lettau M, Wiedemann A, Schrezenmeier EV, et al. Human CD27+ memory B cells colonize a superficial follicular zone in the palatine tonsils with similarities to the spleen. A multicolor immunofluorescence study of lymphoid tissue[J]. PLoS One, 2020, 15(3): 1-17
- [22] 张莉芳, 廖焕金, 蔡璐, 等. 记忆性 B 细胞体外扩增影响因素的研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2017, 33(1): 144-147
- [23] Muto K, Matsui N, Unai Y, et al. Memory B cell resurgence requires repeated rituximab in myasthenia gravis [J]. Neuromuscul Disord, 2017, 27(10): 918-922
- [24] Yilmaz V, Tuzun E, Durmus H, et al. The treatment effect on peripheral B cell markers in antibody positive myasthenia gravis patients[J]. J Neuroimmunol, 2020, 349(15): 577402
- [25] Thangaraj M, Kisiswa L, Pirskanen R, et al. The expression of BAFF-binding receptors is not altered in multiple sclerosis or myasthenia gravis[J]. Scand J Immunol, 2007, 65(5): 461-466
- [26] Cancro MP, D'Cruz DP, Khamashta MA. The role of B lymphocyte stimulator (BLyS) in systemic lupus erythematosus[J]. J Clin Invest, 2009, 119(5): 1066-1073
- [27] 杨芬, 黄德晖, 吴卫平. B 淋巴细胞活化因子在视神经脊髓炎患者血清及脑脊液中的表达及意义[J]. 南方医科大学学报, 2015, 35(3): 380-383
- [28] Weiss JM, Robinet M, Aricha R, et al. Novel CXCL13 transgenic mouse: inflammation drives pathogenic effect of CXCL13 in experimental myasthenia gravis[J]. Oncotarget, 2016, 7(7): 7550-7562
- [29] Jin K, Cao Y, Gu Y, et al. Poor clinical outcomes and immunoevasive contexture in CXCL13+CD8+ T cells enriched gastric cancer patients [J]. Oncoimmunology, 2021, 10(1): 1915560
- [30] Zhang M, Guo J, Li H, et al. Expression of immune molecules CD25 and CXCL13 correlated with clinical severity of myasthenia gravis[J]. J Mol Neurosci, 2013, 50(2): 317-323
- [31] 张鑫, 杨春晓. CXCL-13 抗体对自身免疫疾病治疗的研究进展[J]. 实用药物与临床, 2016, 19(8): 1046-1049