

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2024.23.001

· 基础研究 ·

CyPA 抗体治疗对博来霉素诱导的小鼠系统性硬化症的影响研究*

周鹏飞¹ 李卓成¹ 朱昱蒙² 刘红娇² 冯 转^{2,3Δ}

(1 空军军医大学基础医学院学员五大队 陕西 西安 710032;

2 空军军医大学基础医学院细胞生物学教研室 陕西 西安 710032; 3 国家分子医学转化中心 陕西 西安 710032)

摘要目的:探索 CyPA 抗体治疗博来霉素诱导的小鼠系统性硬化症的效果。**方法:**通过 BLM 诱导系统性硬化症小鼠模型,生理盐水组小鼠作为对照组,系统性硬化症小鼠随机分为早期治疗组和末期治疗组,早期治疗组分别于造模第 8、15、22 天尾静脉注射 10 mg/kg CyPA 抗体 1 次,末期治疗组于造模第 22 天尾静脉注射 10 mg/kg CyPA 抗体 1 次。HE 染色和 Masson 染色观察系统性硬化症小鼠皮肤组织病变,组织化学染色法检测小鼠皮肤组织中 α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、TGF- β 以及炎症因子 CyPA、白细胞介素 1 (IL-1 β)、IL-6 的表达水平。Olink mouse exploratory panel 检测小鼠血清细胞因子 IL-17 α 、TGF- β 、整合素亚基 β 6 (ITG- β 6)、TNF 受体超家族成员 11B (TNFRSF11b)、IL-6、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-10、TNF、CC 趋化因子配体 5 (CCL5)、CXC 趋化因子配体 9 (CXCL9)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸激酶 (NADK)、促红细胞生成素 (EPO)、集落刺激因子 2 (CSF2) 水平。**结果:**与对照组相比, BLM 组小鼠注射部位皮肤真皮层增厚,皮肤胶原增多;早期治疗组小鼠上述表现有显著缓解。与对照组相比, BLM 组小鼠血浆中促炎因子 IL-1 β 、IL-6 和 CyPA 浓度明显上调,疾病早期阶段 CyPA 抗体干预治疗效果显著,早期治疗显著降低上述因子浓度水平,表明小鼠炎症明显缓解。并且早期治疗组病变组织 α -SMA 和 TGF- β 表达水平均呈下降趋势,表明胶原蛋白聚集减少,组织病变明显缓解。**结论:**早期炎症阶段, CyPA 抗体可通过减少炎症细胞因子 IL-1 β 、IL-6 分泌有效缓解小鼠系统性硬化症疾病进程。

关键词: CyPA; 系统性硬化症; 炎症细胞因子

中图分类号: R392.12; R593.25 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2024)23-4401-07

Study on the Effect of CyPA Antibody Therapy on Bleomycin-induced Systemic Sclerosis in Mice*

ZHOU Peng-fei¹, LI Zhuo-cheng¹, ZHU Yu-meng², LIU Hong-jiao², FENG Zhuan^{2,3Δ}

(1 Air Force Medical University No. 5 Cadet Regiment, School of Basic Medical Sciences, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 Department of Cell Biology, School of Basic Medical Sciences, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

3 National Translational Science Center for Molecular Medicine, Air Force Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of neutralizing CyPA antibody blocking therapy in course of systemic sclerosis induced by bleomycin (BLM) in mice, and to clarify the effects of neutralizing CyPA antibody on the process of systemic sclerosis in mice. **Methods:** Bleomycin induced systemic sclerosis model was adopted. The mice were divided into control group, BLM group, early treatment group (CyPA antibody or control IgG was used for treatment on day 1, 8, 15, 22 in the mice model of systemic sclerosis induced by BLM) and late treatment group (CyPA antibody or control IgG was used for treatment on day 22 in the mouse model of systemic sclerosis induced by BLM). HE staining and Masson staining were used to observe the skin lesions of mice with systemic sclerosis. The expression levels of α smooth muscle actin (α -SMA), TGF- β , and inflammatory factors CyPA, interleukin 1 β (IL-1 β), IL-6 in the skin tissues of mice were detected by histochemical staining. The expression levels of serum cytokines including IL-17 α , TGF- β , integrin beta 6 (ITG- β 6), TNF receptor superfamily member 11B (TNFRSF11b), IL-6, IL-1 α , IL-1 β , IL-10, TNF, CC-chemokine ligand 5 (CCL5), CXC chemokine ligand 9 (CXCL9), nicotinamide adenine dinucleotide kinase (NADK), erythropoietin (EPO), colony stimulating factor 2 (CSF2) in serum were detected by Olink mouse exploratory panel. **Results:** Compared with that in the control group, the skin dermis of BLM group was thickened, and the skin collagen increased. The pathological lesions were alleviated in the early treatment group compared with that in the BLM group. Compared with that in the control group, the plasma concentrations of pro-inflammatory factors IL-1 β , IL-6, and CyPA in BLM group significantly upregulated. In the early stage of systemic sclerosis, neutralizing CyPA antibody intervention treatment had a significant effect accompanied by decreasing the expression of IL-1 β , IL-6, and CyPA, indicating that the inflammation was significantly alleviated. In addition, the expression levels of α -SMA and TGF- β decreased

* 基金项目:陕西省创新能力支撑计划(2023-CX-PT-18)

作者简介:周鹏飞(2002-),男,本科,主要研究方向:自身免疫病发病机制研究, E-mail: zhouge2002@126.com

Δ 通讯作者:冯转(1992-),女,博士,讲师,主要研究方向:自身免疫病发病机制研究, E-mail: 15891764428@163.com

(收稿日期:2024-04-25 接受日期:2024-05-20)

significantly, which illustrated collagen aggregation and tissue lesions were significantly alleviated. **Conclusion:** In the early stage of inflammation, neutralizing CyPA antibody blocking therapy can effectively alleviate the progression of systemic sclerosis in mice by reducing the secretion of inflammatory cytokines IL-1 β and IL-6.

Key words: CyPA; Systemic sclerosis; Inflammatory cytokine

Chinese Library Classification(CLC): R392.12; R593.25 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2024)23-4401-07

前言

系统性硬化症(systemic sclerosis, SSc)是一种以皮肤和肺组织纤维化为特征的复杂的慢性免疫系统疾病,病理特点包括受累组织广泛的血管病变、胶原增殖,最显著的特征为细胞外基质异常和过度沉积导致多脏器受累引起纤维化^[1],过程中涉及包括成纤维细胞过度活化,纤维化信号异常传导,细胞外基质产生和交联增加^[2-4]。SSc 目前是所有自身免疫性疾病里面死亡率最高的疾病之一,常造成多脏器受累^[5-7]。临床中,改善 SSc 临床症状和延缓该病进展的治疗选择有限。虽然甲氨蝶呤、环磷酰胺和吗替麦考酚酯等具有广泛作用的免疫抑制剂对 SSc 患者有治疗效果,但仍存在部分不反应者^[8]。越来越多的研究表明,特定的免疫细胞及其介质是延缓 SSc 疾病进展的具有潜力且安全的靶点^[9]。CyPA(cyclophilin A)是一种由 PPIA 基因编码的在各种组织中广泛存在的肽基脯氨酰顺反异构酶^[10],具有多种重要的生物学功能,主要参与炎症、免疫等病理生理过程^[11]。CyPA 是原核细胞和真核细胞中含量最高的亲环蛋白,约占细胞总蛋白的 0.1%~0.4%,在所有组织中广泛表达^[12]。有研究者提出 CyPA 可作为多种疾病的新治疗靶点,CyPA 能够调控 RIG-I/MAVS/NF- κ B 信号通路和 IL-6 反式信号通路促进 IL-1 β 等炎性因子表达^[11,13-15],但 CyPA 在炎症的不同阶段发挥的作用仍未可知。因此本研究通过博来霉素(bleomycin, BLM)诱导 SSc 小鼠模型分别在 SSc 早期、末期治疗接受 CyPA 抗体治疗,检测病变组织胶原沉积情况及纤维化程度,探究不同疾病进展阶段阻断 CyPA 对 BLM 诱导小鼠 SSc 疾病的影响,为靶向 CyPA 防治系统性硬化症提供基础实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 雌性 C57BL/6 小鼠,8 周龄~10 周龄,平均体重(21 \pm 1)g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,饲养于 SPF 级空军军医大学基础医学院细胞工程研究中心,所有程序均通过空军军医大学伦理委员会批准(IACUC-20191012),并按照国家规定执行。环境适应本实验需求,通风性好,环境温度为(22 \pm 2) $^{\circ}$ C,相对湿度为 40%~70%,每日更换水与食物,每日清洗笼具。

1.1.2 主要试剂 BLM 粉针剂(15 mg/支,日本化药株式会社);戊巴比妥钠(西安科昊,中国);苏木素染色液(索莱宝,中国);通用二步法检测试剂盒(中杉金桥,中国);DAB 显色试剂盒(中杉金桥,中国);抗小鼠 TGF- β 单抗(华安 HA721143,1:500,中国),抗小鼠 α -SMA 单抗(Abcam ab124964,1:500,美国),抗小鼠 IL-1 β 单抗(华安 ET1701-39,1:500,中国),抗小鼠 IL-6 单抗(华安 EM1701-45,1:500,中国),抗小鼠 CyPA 单抗

(华安 ET1703-33,1:200,中国)。

1.2 方法

1.2.1 系统性硬化症小鼠模型的建立 将 C57BL/6 小鼠随机分为生理盐水组($n=5$)和 BLM 组($n=5$)。腹腔注射 8.0 g/L 戊巴比妥钠(80 mg/kg)麻醉小鼠,将其俯卧固定在实验台上,将小鼠背部毛发剔除,选取 5 个注射位点(4 个注射点为 4 个角,第 5 个点注射于中心),每隔一天注射一次 BLM(浓度 1 mg/mL,100 μ L/day),对照组注射等量生理盐水。待动物自然清醒后放置恒温净化饲养系统内常规饲养,并在第 28 天各处死 5 只小鼠进行病理分析。对于治疗组小鼠,BLM 造模 SSc 小鼠随机分为早期 CyPA 抗体治疗组($n=4$),晚期 CyPA 抗体治疗组($n=4$),IgG 对照组($n=4$),早期 CyPA 抗体治疗组分别于造模第 8、15、22 天尾静脉注射 10 mg/kg CyPA 抗体 1 次,晚期 CyPA 抗体治疗组于造模第 22 天尾静脉注射 10 mg/kg CyPA 抗体 1 次,IgG 对照组小鼠给予相同浓度的 IgG。

1.2.2 组织病理形态观察 剪取小鼠皮肤组织块,锡纸包好,置于 40 mL/L 多聚甲醛中固定 24 h,经脱水、石蜡包埋后,制作石蜡切片(厚度 3 μ m),HE 染色观察皮肤组织炎症改变。

1.2.3 Masson 染色 将已经用石蜡包埋好的皮肤组织切成 3 μ m 的切片,切片常规脱蜡置水,加入适量苏木精染色液 30 s~60 s,弃去,清洗液冲洗 30 s,加适量磷钼酸分色液 6 min~8 min,弃去,加适量苯胺蓝复染液 5 min,弃去,无水乙醇冲洗干净,吹干后中性树脂封固,显微镜下观察。染色结果:胶原纤维呈蓝色,肌纤维呈红色,细胞核呈黑色。

1.2.4 免疫组织化学染色 将已经用石蜡包埋好的皮肤组织切成 3 μ m 的切片,切片脱蜡置水,用柠檬酸盐修复液修复,根据购自北京中杉金桥生物技术有限公司的免疫组化试剂盒中的使用说明书进行实验操作,30%的 H₂O₂ 室温孵育 10 min 去除内源性过氧化物酶,血清封闭 20 min,分别孵育一抗 CyPA、IL-1 β 、IL-6 等抗体 4 $^{\circ}$ C 过夜,加入结合辣根过氧化物酶的二抗室温孵育 20 min,最后逐级脱水透明并用中性树脂封片,于 Nikon 正置显微镜下观察。

1.2.5 Olink 蛋白组技术检测小鼠血清细胞因子表达水平 收集小鼠全血在室温下凝固 30 min,在制冷离心机(4 $^{\circ}$ C)中以 4000 rpm/min 转速离心 10 min,将血清转移到干净的离心管中,取 50 μ L 体积血清寄送至北京斑马鱼科技有限公司进行 Mouse Exploratory Panel 免疫炎症因子检测,共检测到 14 种,其中有差异的细胞因子以归一化蛋白表达量(normalized protein expression,NPX)表示,指 Olink 蛋白质组学的 log₂ 量表中使用的归一化蛋白表达水平。

1.2.6 统计学分析 采用 Graphpad Prism 7.0 软件对所测的数据进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,非配对 t 检验用于两组间比较, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 BLM 诱导的系统性硬化症小鼠模型的建立

SSc 模型的建立流程见图 1A。石蜡切片通过 HE 染色显示 BLM 组小鼠真皮层增厚, 炎性细胞浸润, 皮肤附属器减少(图

1B); Masson 染色结果显示正常对照组小鼠皮肤组织胶原纤维很少, BLM 组皮肤中胶原纤维大量聚积, 平行于表皮的胶原纤维束增加, 并延伸至皮肤组织深处(图 1B), 同 HE 染色结果相同, BLM 组较对照组真皮层增厚显著($P<0.01$, 图 1C)。

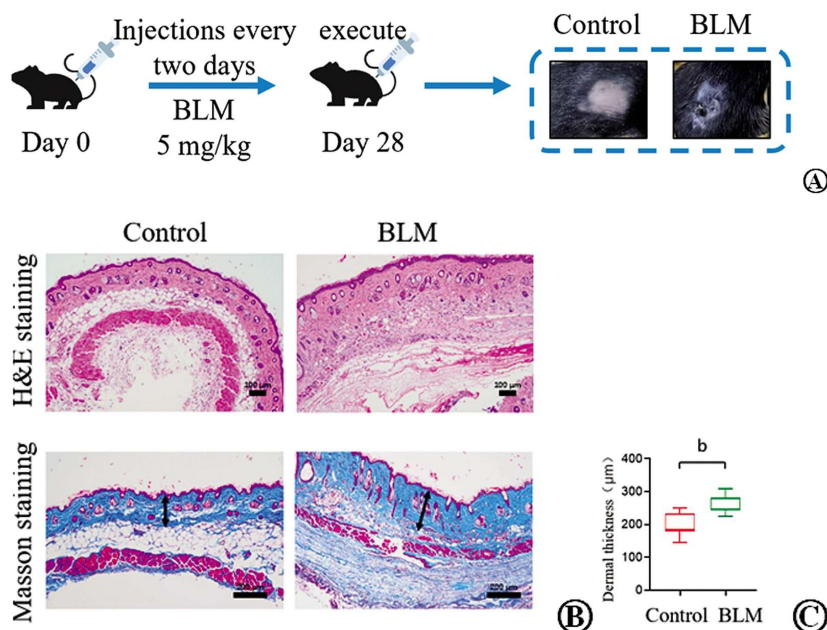


图 1 BLM 诱导后的小鼠皮肤组织 HE 染色和 Masson 染色

Fig.1 HE staining and Masson staining of mouse skin tissue after BLM induction

A: BLM 诱导 SSc 模型流程示意图; B: 第 28 天小鼠皮肤组织 HE 染色及 Masson 染色 ($\times 100$);

C: 小鼠皮肤组织真皮层厚度统计图。^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 对照组。

Note: A: Schematic diagram of BLM-induced SSc model; B: HE staining and Masson staining ($\times 100$) of mouse skin tissue on day 28;

C: Statistical diagram of dermal thickness of mouse skin tissue. ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs control.

2.2 SSc 小鼠皮肤纤维化明显, 炎症显著

为观察小鼠 SSc 疾病过程中的组织变化, 本研究在 BLM 诱导 SSc 后, 收集小鼠皮肤组织, 使用免疫组织化学染色检测已被广泛接受的成纤维细胞活化标志物 α -SMA。免疫组织化学染色显示与对照组相比, BLM 组小鼠 α -SMA 表达水平上升 ($P<0.01$, 图 2), 表明皮肤组织纤维化病变显著。通过对对照组、BLM 组两组小鼠皮肤组织 IL-1 β 、IL-6 和 CyPA 3 种常见炎症因子进行免疫组织化学染色, 发现 BLM 组小鼠皮肤组织 3 种

炎症因子表达显著上调 ($P<0.01$, 图 3)。CyPA 是一种重要的促炎因子, 主要分布于细胞质中, 在缺氧、感染和氧化应激等刺激下 CyPA 还能分泌到细胞外, 是免疫应答的重要调节因子。CyPA 可通过调节 NF- κ B 中的 phospho-I κ B 促进促炎因子的表达, 而且 IL-1 β 和 TNF- α 均能诱导 IL-6 的合成及分泌。提示, CyPA 在系统性硬化症炎症进展中具有关键作用, 靶向 CyPA 可能是治疗细胞因子介导的炎症疾病的潜在手段。

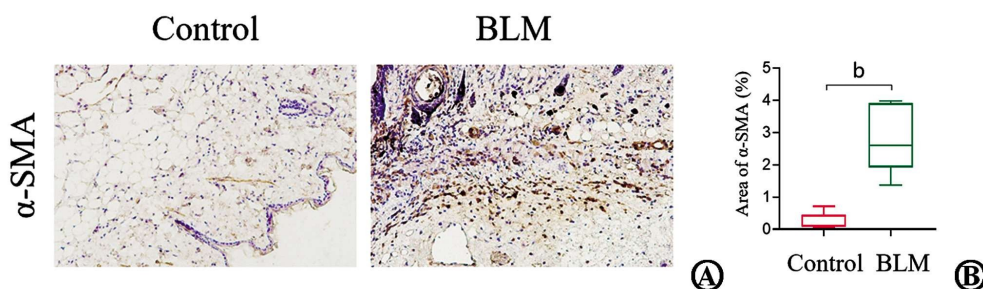


图 2 免疫组化检测小鼠皮肤组织 α -SMA 表达水平

Fig.2 Immunohistochemistry was used to detect the expression level of α -SMA in mouse skin tissue

A: 小鼠皮肤组织 α -SMA 表达水平代表性图片 ($\times 200$); B: 皮肤组织 α -SMA 表达水平统计分析。^b $P<0.01$ vs 对照组。

Note: A: Representative picture of α -SMA expression level in mouse skin tissue ($\times 200$);

B: Statistical analysis of α -SMA expression level in skin tissue. ^b $P<0.01$ vs control.

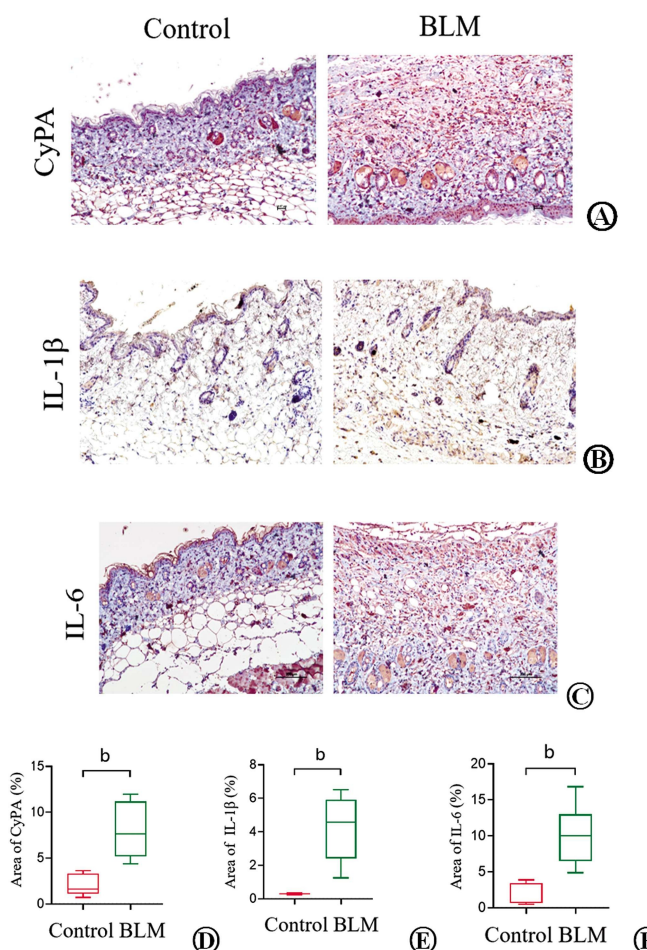


图3 免疫组化检测小鼠皮肤组织 CyPA、IL-1β 及 IL-6 表达水平

Fig.3 Immunohistochemistry was used to detect the expression levels of CyPA, IL-1β and IL-6 in mouse skin tissues

A: 小鼠皮肤组织 CyPA 代表性组织化学染色 (×200);

B: 小鼠皮肤组织 IL-1β 代表性组织化学染色 (×200);

C: 小鼠皮肤组织 IL-6 代表性组织化学染色 (×200);

D: 小鼠皮肤组织 CyPA 统计图; E: 小鼠皮肤组织 IL-1β 统计图; F: 小鼠皮肤组织 IL-6 统计图。*P<0.05, ^bP<0.01 vs 对照组。

Note: A: CyPA representative histochemical staining of mouse skin tissue (×200); B: Representative histochemical staining of mouse skin tissue IL-1β (×200); C: Representative histochemical staining of mouse skin tissue IL-6 (×200); D: CyPA statistical chart of mouse skin tissue; E: Statistical chart of mouse skin tissue IL-1β; F: Statistical chart of mouse skin tissue IL-6. *P<0.05, ^bP<0.01 vs control.

2.3 CyPA 抗体治疗小鼠系统性硬化症

为观察 CyPA 抗体对小鼠系统性硬化症不同炎症阶段的治疗效果, 设置早期治疗组 BLM 诱导后次日即尾静脉注射给药, 末期治疗组 BLM 诱导后第 22 天尾静脉注射给药, 具体流程见图 4A, 同时对照组给予同浓度的 IgG; 第 28 天进行皮肤组织收集固定切片。对照组、BLM 组、早期治疗组及末期治疗组四组小鼠皮肤组织进行 HE 及 Masson 染色, 同时使用免疫组织化学染色检测已被广泛接受的成纤维细胞活化标志物 α-SMA 及纤维化的标志物 TGF-β。HE 染色发现, 同 BLM 组相比, HE 染色显示早期治疗组小鼠真皮层变薄, 炎性细胞浸润减少, 皮肤附属器增加 (图 4B); Masson 染色结果显示早期治疗

组胶原纤维聚积减少, 平行于表皮的胶原纤维束减少, 同 HE 染色结果相同, 早期治疗组真皮层增厚情况有效缓解 (P<0.05, 图 4C), 而末期治疗组缓解效果不显著。免疫组织化学染色显示早期治疗组 α-SMA 和 TGF-β 表达均呈下降趋势 (P<0.01, 图 5), 表明皮肤组织纤维化病变得到显著改善。提示: 在 SSc 早期, CyPA 抗体治疗有效缓解皮损组织胶原沉积情况及纤维化程度。

2.4 系统性硬化症小鼠经 CyPA 抗体治疗后炎症因子 IL-1β、IL-6 的变化

通过对对照组、BLM 组、早期治疗组及末期治疗组四组小鼠皮肤组织 IL-1β、IL-6 2 种常见炎症因子进行免疫组织化学染色, 发现 BLM 组小鼠皮损部位炎症因子表达显著上调; 经 CyPA 抗体早期治疗后, IL-1β、IL-6 表达均下降 (P<0.01, 图 6A、B、C、D)。进一步使用 Olink mouse exploratory panel 检测小鼠血清细胞因子水平, 共检测到 14 种, 分别为: IL-17α、TGF-β、整合素亚基 β6 (ITG-β6)、TNF 受体超家族成员 11B (TNFRSF11b)、IL-6、IL-1α、IL-1β、IL-10、TNF、CC 趋化因子配体 5 (CCL5)、CXC 趋化因子配体 9 (CXCL9)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸激酶 (NADK)、促红细胞生成素 (EPO)、集落刺激因子 2 (CSF2)。相较 BLM 组, 早期治疗组中炎症因子 IL-1β 表达水平下降、抑炎因子 IL-10 表达水平显著上升, 差异有统计学意义 (P<0.01, 图 6E), 表明 BLM 小鼠中炎症起始阶段干预治疗不仅可缓解皮损部位纤维化症状, 所累及的全身炎症也得到改善。

3 讨论

SSc 是一种自身免疫病, 发病机制复杂, 迄今尚无确切发病机制。其临床表现繁杂多样, 使得诊断和治疗更加困难, 死亡率是所有风湿免疫病中最高的。虽然 SSc 的发病机制已被广泛研究, 但寻找新的治疗干预策略对于防止极早期系统性硬化症患者器官受累的发展至关重要。CyPA 是一种广泛表达的肽基脯氨酰顺反异构酶, 是免疫抑制剂环孢素 A 的结合靶蛋白^[10]。诸多生物学研究表明, CyPA 因其多功能性参与各种细胞功能, 并且研究者普遍认为 CyPA 表达增加可促进多种病理情况, 包括癌症、心血管疾病、动脉粥样硬化等, 且与炎症性疾病的不良预后相关^[11, 16-18]。

CyPA 主要与 CD147 分子结合发挥类似细胞因子功能, 诱导细胞表达多种炎症因子, 并趋化单核细胞、中性粒细胞及粒细胞至炎症部位, 在介导炎症反应中起重要作用^[10]。大部分文献报道 CyPA 在病毒感染及细胞损伤的炎症反应中的作用, 部分实验表明 CyPA 与类风湿关节炎, 自身免疫性心肌炎的发展有重要联系^[19], 但其参与自身免疫疾病中的炎症机制研究较少, 尤其是 SSc。本课题组前期研究发现在新冠病毒感染时 "S 蛋白 -CD147-CyPA" 信号轴诱导细胞因子风暴产生, 证明了 CyPA 在 SARS-CoV-2 引发炎症反应中的关键作用^[20], 在本实验炎症反应中也得到验证。有研究表明根据 CyPA 的临床相关性, 可通过开发 CyPA 抑制剂或阻断 CyPA 信号通路达到治疗疾病目的^[15]。有文献表明 CyPA 不仅促进炎症激活, 还能促进炎症消退^[21]。在 LPS 诱导的小鼠肺部炎症中, 中和性 cCyPA 抗体治疗可显著降低小鼠肺损伤^[19]; 抑制细胞外 CyPA 可有效缓解心脏纤维化进展^[22]。在不同类型的肾损伤中, CyPA 促进急性肾

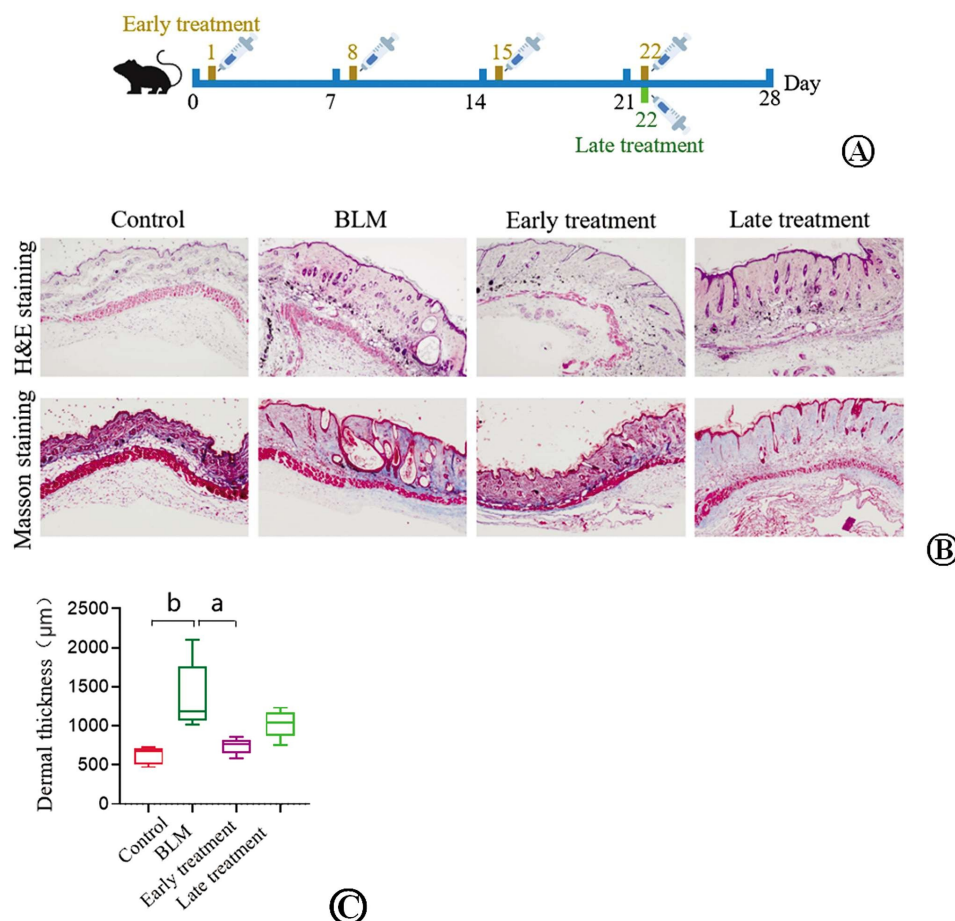


图4 CyPA 抗体治疗组的小鼠皮肤组织 HE 染色和 Masson 染色

Fig.4 HE staining and Masson staining of mouse skin tissue in the CyPA antibody treatment group

A: BLM 诱导 SSc 模型后 CyPA 抗体早期治疗及末期治疗流程示意图; B: BLM 诱导 SSc 模型第 28 天, IgG 对照组、BLM 组、早期治疗组及末期治疗组小鼠皮肤组织 HE 染色及 Masson 染色($\times 100$); C: BLM 诱导 SSc 模型第 28 天, IgG 对照组、BLM 组、早期治疗组及末期治疗组小鼠皮肤组织真皮层厚度统计图。^a $P < 0.05$ vs BLM 组, ^b $P < 0.01$ vs 对照组。

Note: A: Schematic diagram of the process of early treatment and late treatment of CyPA antibody after BLM-induced SSc model;

B: HE staining and Masson staining ($\times 100$) of mouse skin tissue in IgG control group, BLM group, early treatment group and late treatment group on the 28th day of BLM-induced SSc model; C: Statistical diagram of skin tissue dermal thickness in IgG control group, BLM group, early treatment group and

late treatment group on the 28th day of BLM-induced SSc model. ^a $P < 0.05$ vs BLM, ^b $P < 0.01$ vs control.

损炎症却不促进肾纤维化^[23]。我们猜测在炎症疾病中中断 CyPA 活性还需综合考虑疾病病理损伤情况及病程差异等因素。因此本研究采用 CyPA 中和抗体降低 CyPA 活性探究 CyPA 在 SSc 炎症进展不同阶段的潜在作用。

SSc 治疗的总体原则在于减少炎症,对早期标准的验证为识别患有非常早期疾病的患者以研究预防性疗法提供了机会。因此,我们为了探究中和 CyPA 抗体在疾病早期及末期的治疗作用,我们设置早期治疗组及末期治疗组,早期治疗组于造模第 8、15、22 天尾静脉注射 10 mg/kg CyPA 抗体 1 次,晚期治疗组于造模第 22 天尾静脉注射 10 mg/kg CyPA 抗体 1 次。实验结果表明,BLM 诱导组皮肤组织表现为明显的纤维化改变,纤维化标志物 α -SMA 及 TGF- β 表达水平明显升高,血清及皮肤组织炎症因子 IL-1 β 、IL-6 明显升高;早期治疗组小鼠的皮肤组织病理学染色、纤维化特征及炎症因子表达水平均下降,而末期治疗组小鼠并未有明显治疗效果,以上结果提示在系统性硬化症炎症激活阶段,使用中和 CyPA 抗体阻断可以减轻 BLM 诱导的小鼠皮肤组织损伤。

CyPA 在炎症不同阶段的双面作用主要与 IL-1 β 的产生相关。在炎症起始阶段,CyPA 可增强 pro-IL-1 β 的 K63 连接泛素化,促进 IL-1 β 成熟,IL-1 β 可诱导 IL-6 和 TNF- α 产生,并可与其受体结合后激活 NF- κ B 中的 p65、c-Jun 等转录因子促进促炎因子的表达^[24,25]。在炎症末期,CyPA 增强 pro-IL-1 β 的 K48 连接泛素化及蛋白酶体途径降解^[21]。在本实验中,相较于 BLM 组,早期治疗组 NF- κ B 活化明显降低,提示炎症起始阶段中和阻断 CyPA 可减少 IL-1 β 、IL-6 等炎性因子表达,缓解疾病进展。然而除 NF- κ B 外其他信号通路是否也参与 CyPA 中和阻断对于系统性硬化症的治疗作用仍需探索。

综上所述,本研究通过 BLM 诱导的小鼠 SSc 模型,设置中和 CyPA 抗体阻断早期治疗组及末期治疗组,验证了疾病起始阶段中和 CyPA 阻断可以减轻 BLM 诱导的小鼠皮肤损伤,缓解皮肤组织炎症细胞浸润及炎症因子表达,同时首次在 SSc 中探究不同炎症阶段中和阻断 CyPA 的治疗作用,我们的实验结果也提示针对 CyPA 在炎症早期促进炎症,而在炎症后期抑制炎症的特点,中和 CyPA 阻断 IL-1 β 及下游信号通路发挥其对

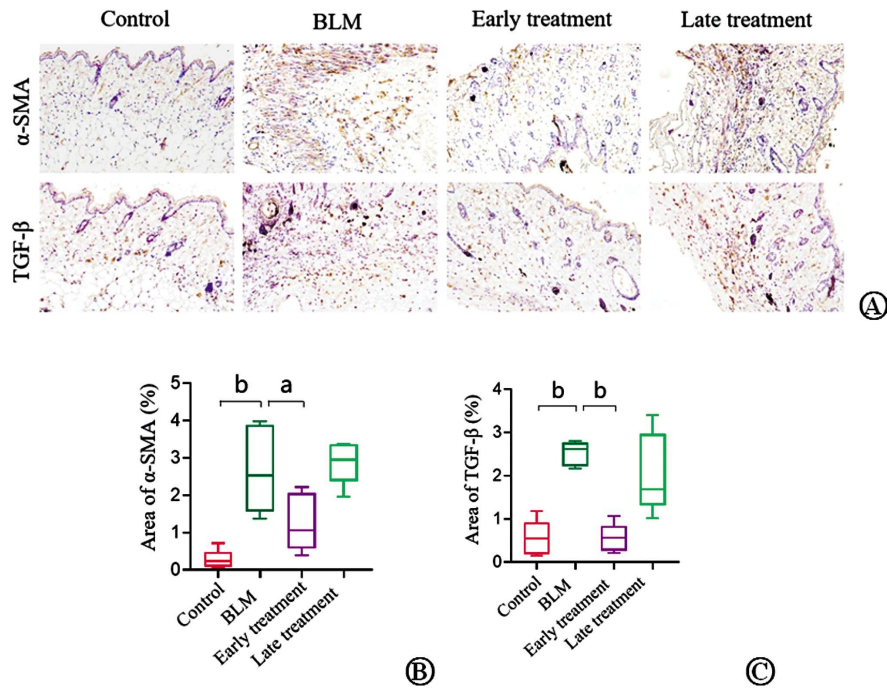


图 5 免疫组化检测小鼠皮肤组织 α -SMA 及 TGF- β 表达水平

Fig.5 Immunohistochemistry was used to detect the expression levels of α -SMA and TGF- β in mouse skin tissues

A: 小鼠皮肤组织 α -SMA、TGF- β 表达水平代表性图片 ($\times 200$); B: 皮肤组织 α -SMA 表达水平统计分析。^b $P < 0.01$ vs 对照组, ^a $P < 0.05$ vs BLM 组; C: 皮肤组织 TGF- β 表达水平统计分析。 ^b $P < 0.01$ vs 对照组, ^b $P < 0.05$ vs BLM 组。

Note: A: Representative pictures of α -SMA and TGF- β expression levels in mouse skin tissues ($\times 200$);

B: Statistical analysis of α -SMA expression levels in skin tissues. ^b $P < 0.01$ vs control, ^b $P < 0.05$ vs BLM;

C: Statistical analysis of TGF- β expression levels in skin tissues. ^b $P < 0.01$ vs control, ^b $P < 0.05$ vs BLM.

小鼠皮肤组织损伤的保护作用,为开发更好的系统性硬化症防治策略打下坚实基础,但是阐明 CyPA 在疾病末期过程中发挥的作用仍需进一步探索。

参考文献(References)

- [1] Cutolo M, Soldano S, Smith V. Pathophysiology of systemic sclerosis: current understanding and new insights[J]. Expert Rev Clin Immunol, 2019, 15(7): 753-764.
- [2] Soldano S, Trombetta AC, Contini P, et al. Increase in circulating cells coexpressing M1 and M2 macrophage surface markers in patients with systemic sclerosis[J]. Ann Rheum Dis, 2018, 77(12): 1842-1845.
- [3] Truchetet ME, Brembilla NC, Chizzolini C. Current Concepts on the Pathogenesis of Systemic Sclerosis [J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2023, 64(3): 262-283.
- [4] Cutolo M, Gotelli E, Montagna P, et al. Nintedanib downregulates the transition of cultured systemic sclerosis fibrocytes into myofibroblasts and their pro-fibrotic activity[J]. Arthritis Res Ther, 2021, 23(1): 205.
- [5] Denton CP, Khanna D. Systemic sclerosis [J]. Lancet, 2017, 390(10103): 1685-1699.
- [6] Furue M, Mitoma C, Mitoma H, et al. Pathogenesis of systemic sclerosis-current concept and emerging treatments [J]. Immunol Res, 2017, 65(4): 790-797.
- [7] Bukiri H, Volkmann ER. Current advances in the treatment of systemic sclerosis[J]. Curr Opin Pharmacol, 2022, 64: 102211.
- [8] Pope JE, Denton CP, Johnson SR, et al. State-of-the-art evidence in the treatment of systemic sclerosis [J]. Nat Rev Rheumatol, 2023, 19(4): 212-226.
- [9] Fang D, Chen B, Lescoat A, et al. Immune cell dysregulation as a mediator of fibrosis in systemic sclerosis [J]. Nat Rev Rheumatol, 2022, 18(12): 683-693.
- [10] Handschumacher RE, Harding MW, Rice J, et al. Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A[J]. Science, 1984, 226(4674): 544-7.
- [11] Nigro P, Pompilio G, Capogrossi MC. Cyclophilin A: a key player for human disease[J]. Cell Death Dis, 2013, 4(10): e888.
- [12] Galat A, Metcalfe SM. Peptidylproline cis/trans isomerases [J]. Prog Biophys Mol Biol, 1995, 63(1): 67-118.
- [13] Sun S, Guo M, Zhang JB, et al. Cyclophilin A (CypA) interacts with NF-kappaB subunit, p65/RelA, and contributes to NF-kappaB activation signaling[J]. PLoS One, 2014, 9(8): e96211.
- [14] Luan X, Yang W, Bai X, et al. Cyclophilin A is a key positive and negative feedback regulator within interleukin-6 trans-signaling pathway[J]. FASEB J, 2021, 35(11): e21958.
- [15] Chen L, Zeng Z, Luo H, et al. The effects of CypA on apoptosis: potential target for the treatment of diseases [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2024, 108(1): 28.
- [16] Seizer P, Gawaz M, May AE. Cyclophilin A and EMMPRIN (CD147) in cardiovascular diseases[J]. Cardiovasc Res, 2014, 102(1): 17-23.
- [17] Dawar FU, Xiong Y, Khattak MNK, et al. Potential role of cyclophilin A in regulating cytokine secretion [J]. J Leukoc Biol, 2017, 102(4): 989-992.
- [18] Satoh K, Nigro P, Matoba T, et al. Cyclophilin A enhances vascular

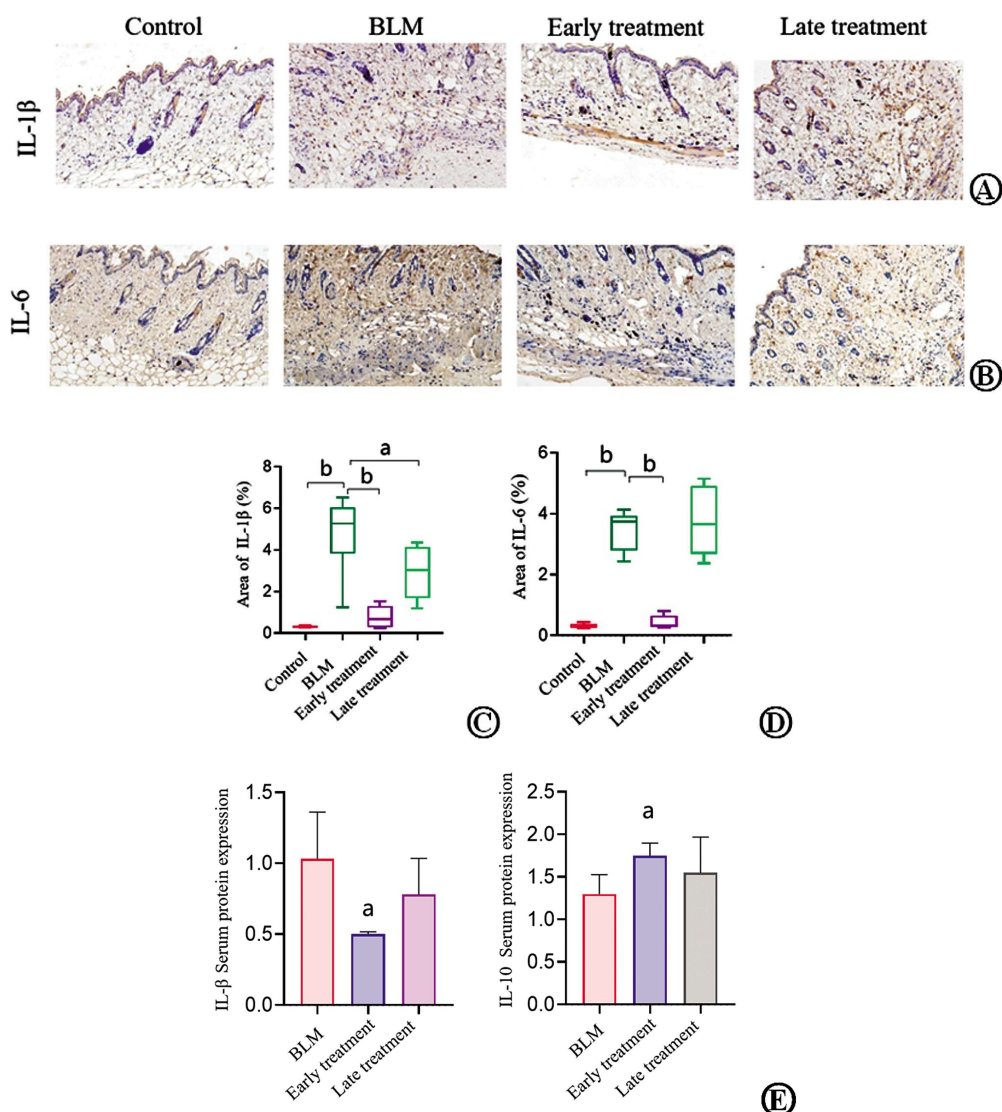


图 6 CyPA 抗体治疗对小鼠皮肤组织 IL-1 β 、IL-6 表达水平及血清 IL-1 β 、IL-10 表达水平的影响

Fig.6 Effect of CyPA antibody treatment on the expression levels of IL-1 β and IL-6 in skin tissues and serum levels of IL-1 β and IL-10 in mice

A: 各组小鼠皮肤组织 IL-1 β 表达水平代表性图片 ($\times 200$); B: 各组小鼠皮肤组织 IL-6 表达水平代表性图片 ($\times 200$); C: 皮肤组织 IL-1 β 表达水平统计分析; ^b $P < 0.01$ vs 对照组, ^b $P < 0.01$ vs BLM 组, ^a $P < 0.05$ vs BLM 组; D: 皮肤组织 IL-6 表达水平统计分析。 ^b $P < 0.01$ vs 对照组, ^b $P < 0.01$ vs BLM 组;

E: Olink mouse exploratory panel 检测各组小鼠 IL-1 β 及 IL-10 蛋白表达水平。 ^a $P < 0.05$ vs BLM 组。

Note: A: Representative pictures of IL-1 β expression level in skin tissues of mice in each group ($\times 200$); B: Representative pictures of IL-6 expression level in skin tissues of mice in each group ($\times 200$); C: Statistical analysis of IL-1 β expression level in skin tissues, ^b $P < 0.01$ vs control group, ^b $P < 0.01$ vs BLM group, ^a $P < 0.05$ vs BLM group; D: Statistical analysis of IL-6 expression levels in skin tissues. ^b $P < 0.01$ vs control, ^b $P < 0.01$ vs BLM;

E: Olink mouse exploratory panel was used to detect the protein expression levels of IL-1 β and IL-10 in each group, ^a $P < 0.05$ vs BLM group.

oxidative stress and the development of angiotensin II-induced aortic aneurysms[J]. Nat Med, 2009, 15(6): 649-56.

- [19] Li W, Liu W, Chen C, et al. Effect of extracellular cyclophilin A on inflammatory response and anti-inflammatory activity of antibody against cyclophilin A [J]. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao, 2018, 34(1): 90-101.
- [20] Geng J, Chen L, Yuan Y, et al. CD147 antibody specifically and effectively inhibits infection and cytokine storm of SARS-CoV-2 and its variants delta, alpha, beta, and gamma[J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1): 347.
- [21] Yang W, Bai X, Luan X, et al. Delicate regulation of IL-1 β -mediated inflammation by cyclophilin A [J]. Cell Rep, 2022, 38(11):

110513.

- [22] Su H, Yang Y. The roles of CyPA and CD147 in cardiac remodelling [J]. Exp Mol Pathol, 2018, 104(3): 222-226.
- [23] Leong KG, Ozols E, Kanellis J, et al. Cyclophilin A Promotes Inflammation in Acute Kidney Injury but Not in Renal Fibrosis[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(10): 3667.
- [24] Xie Y, Li X, Ge J. Cyclophilin A-FoxO1 signaling pathway in endothelial cell apoptosis[J]. Cell Signal, 2019, 61: 57-65.
- [25] Guo M, Shen J, Kwak JH, et al. Novel role for cyclophilin A in regulation of chondrogenic commitment and endochondral ossification[J]. Mol Cell Biol, 2015, 35(12): 2119-30.