



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102861331 A

(43) 申请公布日 2013.01.09

(21) 申请号 201110188035.9 *A61P 29/00* (2006.01)
(22) 申请日 2011.07.06 *A61P 25/28* (2006.01)
(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所 *A61P 19/02* (2006.01)
地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号 *A61P 9/10* (2006.01)
(72) 发明人 阎锡蕴 罗永挺 段红霞 冯立群
卢迪 杨东玲 冯静
(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021
代理人 王旭
(51) Int. Cl.
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)

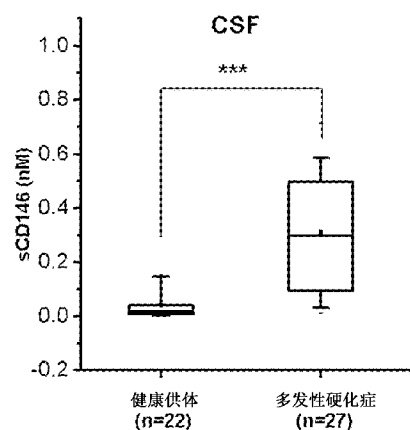
权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 8 页

(54) 发明名称

CD146 及其抗体诊断和治疗自身免疫病等炎症性疾病的应用

(57) 摘要

本发明涉及 CD146 及其抗体诊断和治疗自身免疫病等炎症性疾病的应用。本发明首次提出 CD146 是包括自身免疫疾病等炎症性疾病的新靶标, 抗 CD146 抗体是治疗这类疾病的新型靶向药物。因此, 本发明提供 CD146 或抗 CD146 的抗体或该抗体的功能形式在制备用于诊断和 / 或治疗炎症性疾病的药物中的应用。CD146 抗体治疗炎症性疾病 (如多发性硬化症) 的作用机理主要是阻断炎症性细胞穿越血脑屏障及其他血管内皮细胞屏障, 进而抑制活化淋巴细胞对中枢神经系统髓鞘及其他相关组织的损伤, 从而延缓多发性硬化症的进程和复发及相关组织的损伤, 并减轻多发性硬化的症状及相关炎症的发展。与常规治疗自身免疫疾病的糖皮质激素类药物相比, 抗 CD146 抗体的副作用小, 不会引起全身范围的免疫功能的损伤。



1. CD146 或抗 CD146 的抗体或该抗体的功能形式在制备用于诊断和 / 或治疗炎症性疾病的药物中的应用。
2. 根据权利要求 1 所述的应用,其中所述的炎症性疾病是自身免疫疾病。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的应用,其中所述炎症性疾病包括多发性硬化症、类风湿性关节炎、急性腹膜炎、动脉粥样硬化。
4. 根据权利要求 1-3 中任意一项所述的应用,其中所述抗 CD146 的抗体或该抗体的功能形式包括抗 CD146 的单克隆抗体、基因工程抗体和人源化抗体。
5. 根据权利要求 1-4 中任意一项所述的应用,其中所述抗 CD146 的抗体或该抗体的功能形式是抗 CD146 的抗体的功能耦合物,其中与抗体结合的物质可以是药物、毒素、放射活性剂、酶、细胞因子或另一种抗体。
6. 根据权利要求 1-5 中任意一项所述的应用,其中所述抗 CD146 的抗体是单克隆抗体 AA98。
7. 根据权利要求 1-6 中任意一项所述的应用,其中所述应用是在制备诊断多发性硬化症的药物中的应用,其特征在于检测受试者脑脊液中可溶性 CD146 的水平。
8. 抗 CD146 的抗体或该抗体的功能形式在制备用于人体炎症细胞和血管损伤定位以及导向治疗的药物中的应用。
9. 根据权利要求 8 所述的应用,其中所述抗 CD146 的抗体或该抗体的功能形式包括抗 CD146 的单克隆抗体、基因工程抗体和人源化抗体。
10. 根据权利要求 8 或 9 所述的应用,其中所述抗 CD146 的抗体是单克隆抗体 AA98。

CD146 及其抗体诊断和治疗自身免疫病等炎症性疾病的应用

技术领域

[0001] 本发明属于免疫诊断和生物治疗领域。具体地说,本发明涉及 CD146 分子及其抗体在诊断和治疗炎症性疾病的应用。更具体地,本发明涉及的 CD146 单克隆抗体 AA98 及其功能形式的功能在于能够阻断自身免疫性细胞及炎症性细胞与血管内皮细胞的粘附、迁移及穿越到组织部位,进而阻断自身免疫性细胞及炎症细胞对中枢神经系统及相关组织的杀伤,从而延缓并阻断自身免疫性疾病及炎症性疾病的发生和发展。

背景技术

[0002] 多发性硬化症 (multiple sclerosis, MS) 是一种累及大脑和脊髓的自身免疫性疾病,也是一种炎症性疾病,可引起神经脱髓鞘和轴突损伤。目前认为,活化的淋巴细胞越过血脑屏障是 MS 炎性损伤的早期重要步骤。活化的炎性细胞穿过功能失常的血脑屏障,浸润到中枢神经系统,引起脱髓鞘和其它炎性损伤。正常情况下,血脑屏障对炎性细胞的通透性低,极少或很少有炎性细胞进入到中枢神经系统。但在多发性硬化症中,血脑屏障功能失调,其通透性在炎性因子的刺激下大大增加,导致炎性细胞轻易进入到中枢神经系统,引起炎性损伤。因此,血脑屏障的通透性在这一过程中扮演着重要的角色。

[0003] 大量研究报道,粘附分子对血脑屏障的通透性起着重要的调节作用,如 ICAM-1、整联蛋白 (integrin) 等等。已有的研究报道, $\alpha 4 \beta 1$ 整联蛋白是一种淋巴细胞表面膜分子,其配体 VCAM-1 在大脑和脊髓血管内皮细胞上表达,介导淋巴细胞与血管内皮细胞的粘附和迁移,阻断 $\alpha 4 \beta 1$ 整联蛋白与 VCAM-1 的相互作用可以减轻 MS 的炎性损伤。那他珠单抗 (Natalizumab) (抗- $\alpha 4 \beta 1$ 整联蛋白) 是第一个被批准用于治疗 MS 的单克隆抗体。它通过阻断白细胞与血管内皮细胞的粘附从而减少白细胞对中枢神经系统的浸润而延缓 MS 的发展。目前,阻断炎性细胞与血管内皮细胞的粘附和迁移已经成为治疗 MS 及其它炎症性疾病的新方法。

[0004] 目前临床上治疗 MS 主要是糖皮质激素类药物,这类药物有明显的抗炎效果和免疫抑制功能,然而其广泛的副作用限制了它的使用,如肾上腺功能抑制,心血管功能失调等。另外使用较为普遍的是生物类制剂,诸如多种单克隆抗体的使用。除了那他珠单抗 (抗- $\alpha 4 \beta 1$ 整联蛋白) 外,目前已在临床上使用或进入临床试验的单克隆抗体还有利妥昔单抗 (Rituximab) (抗-CD20),阿仑单抗 (Alemtuzumab) (抗-CD52),达克珠单抗 (Daclizumab) (抗-IL2R),这些均是针对免疫细胞本身的抗体,这些抗体直接导致的副作用主要是免疫细胞的功能缺陷,进而引起其他免疫相关的疾病。

发明内容

[0005] 本发明首次提出 CD146 是包括自身免疫疾病等炎症性疾病的新靶标,抗 CD146 抗体是治疗这类疾病的新型靶向药物。与糖皮质激素类药物相比,抗 CD146 抗体的副作用小,不会引起全身范围的免疫功能的损伤。CD146 及其抗体在包括自身免疫疾病等炎症性

疾病诊断和治疗中的应用是基于以下重要的科学发现：(1) 可溶性 CD146 在多发硬化症病人的脑脊液中显著增加。(2) 细胞粘附分子 CD146 在人和小鼠的血脑屏障内皮细胞上过度表达, 能被 TNF- α 和 IFN- γ 等炎性因子诱导上调表达；(3) CD146 在许多炎症疾病的血管内皮上过度表达, 例如类风湿性关节炎滑膜组织的新生血管、动脉粥样硬化血管内层新生血管和炎症性肠病的新生血管上都可以检测到 CD146 的过度表达；(4) 血管内皮细胞上过度表达的 CD146 与发病机制相关, 在介导淋巴细胞穿越血管内皮屏障起着重要的作用；(5) 在 MS 的小鼠动物模型实验性自身免疫性脑脊髓膜炎 (Experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) 实验中, 我们发现抗 CD146 抗体 AA98 显著减缓实验性自身免疫性脑脊髓膜炎小鼠的发病和症状。机理研究表明, CD146 抗体能够阻止炎性细胞的浸润, 减少神经轴突损伤点和损伤面积；(6) CD146 抗体同样能够治疗类风湿性关节炎 (Rheumatoid arthritis, RA), 减缓疾病进展, 减轻关节炎症状和关节损伤。

[0006] CD146 在调节炎症细胞与血管内皮细胞的粘附和迁移方面起着重要的作用。我们自主研制的抗 CD146 功能性单抗 AA98 在体外细胞功能实验迁移测定中能较好地抑制活化淋巴细胞穿越脑血管内皮细胞形成的单层细胞层。因此, 我们认为血脑屏障内皮细胞上 CD146 可能作为一种靶标, 其抗体 AA98 可以阻断炎症细胞与内皮细胞的粘附, 从而进一步阻断炎症细胞浸润到中枢神经系统导致脱髓鞘性损伤。抗 CD146 抗体可应用于 MS 的诊断和治疗。相似的, CD146 也可以作为其他炎症性疾病诊断和治疗的新靶标, 抗 CD146 抗体可以阻断炎症细胞与血管内皮细胞的粘附, 以及阻断炎症细胞浸润到局部组织引起炎症损伤。该种抗体的特异性较好, 不会引起全身范围的免疫功能性的损伤。

[0007] 因此, 本发明一方面涉及 CD146 在制备用于诊断和 / 或治疗炎症性疾病的药物中的应用。

[0008] 本发明再一方面涉及抗 CD146 的抗体或该抗体的功能形式在制备用于诊断和 / 或治疗炎症性疾病的药物中的应用。

[0009] 在本发明中, 炎症性疾病可以是自身免疫疾病。

[0010] 在本发明中, 炎症性疾病可包括多发硬化症、类风湿性关节炎、急性腹膜炎、动脉粥样硬化。根据本发明的一个实施方案, 诊断和 / 或治疗炎症性疾病是多发硬化症。根据本发明的又一个实施方案, 诊断和 / 或治疗炎症性疾病是类风湿性关节炎。根据本发明的又一个实施方案, 诊断和 / 或治疗炎症性疾病是急性腹膜炎。根据本发明的又一个实施方案, 诊断和 / 或治疗炎症性疾病是动脉粥样硬化。

[0011] 在本发明中, 抗 CD146 的抗体或该抗体的功能形式可包括抗 CD146 的单克隆抗体、基因工程抗体和人源化抗体。

[0012] 在本发明中, 抗 CD146 的抗体或该抗体的功能形式是抗 CD146 的抗体的功能耦合物, 其中与抗体结合的物质可以是药物、毒素、放射活性剂、酶、细胞因子或另一种抗体。

[0013] 在本发明中, 抗 CD146 的抗体优选地是单克隆抗体 AA98。

[0014] 本发明又一方面涉及 CD146 或抗 CD146 的抗体或该抗体的功能形式在制备诊断多发硬化症的药物中的应用, 其特征在于检测受试者脑脊液中可溶性 CD146 的水平。在本发明的这一方面, 药物可制备成试剂盒的形式。

[0015] 本发明又一方面涉及抗 CD146 的抗体或该抗体的功能形式在制备用于人体炎症细胞和血管损伤定位以及导向治疗的药物中的应用。优选地, 所述抗 CD146 的抗体或该抗

体的功能形式包括抗 CD146 的单克隆抗体、基因工程抗体和人源化抗体。更优选地,所述抗 CD146 的抗体是单克隆抗体 AA98。

[0016] 为了更全面地理解和应用本发明,提供下列实施例。

附图说明

[0017] 从下面结合附图的详细描述中,本发明的上述特征和优点将更明显,其中:

[0018] 图 1. 临床标本:多发性硬化症病人脑脊液中可溶性 CD146 显著增加(病人 VS 正常: $0.31 \pm 0.206 \text{ nM}$ vs $0.04 \pm 0.047 \text{ nM}$, $p < 0.0001$)。

[0019] 图 2. 临床标本:多发性硬化症病人血脑屏障内皮细胞上 CD146 分子过度表达,在正常人血脑屏障内皮细胞低表达。(CD31 为血管内皮细胞的标志分子)。

[0020] 图 3. CD146 的表达,其中,A:正常小鼠脊髓组织血管上 CD146 低表达,而 B:小鼠多发性硬化症:脊髓组织血管上皮 CD146 高表达。

[0021] 图 4. CD146 的表达,其中,A-B:正常的大鼠关节组织血管上 CD146 较少,而 C-F:大鼠类风湿性关节炎滑膜组织的新生血管上高表达 CD146。

[0022] 图 5. 临床标本免疫组化显示,其中,A:正常人颈动脉的内膜上 CD146 低表达(抗体 AA4),B:动脉粥样硬化颈动脉的内膜上 CD146 高表达。

[0023] 图 6. 临床标本免疫组化显示,CD146(抗体:AA4)在动脉粥样硬化颈动脉外膜区的新生血管上高表达。

[0024] 图 7. 细胞迁移实验表明,TNF- α 能够明显增加白细胞的迁移,抗 CD146 抗体 AA98($50 \mu \text{g/ml}$) 显著抑制人外周血白细胞(包括 CD3^+ , CD4^+ , CD8^+ , CD19^+ 等)穿越血脑内皮屏障。

[0025] 图 8. 抗 CD146 抗体 AA98 显著减轻多发性硬化症模型小鼠的:A,平均临床评分和 C,严重程度,减缓发病时间但不影响 B,疾病的发病率。

[0026] 图 9. 抗 CD146 抗体 AA98 显著抑制炎症细胞(包括 CD45^+ , CD4^+ , CD8^+ , CD19^+ , F4/80^+ 及 Gr-1^+ 细胞)在多发性硬化症模型小鼠脊髓组织中的浸润,其中 A:免疫组化;B:统计结果。

[0027] 图 10. 抗 CD146 抗体 AA98 显著减少多发性硬化症小鼠脊髓髓鞘神经轴突的损伤,其中 A:免疫组化;B:统计结果。

具体实施方式

[0028] 实施例一:可溶性 CD146 在多发性硬化症病人的脑脊液中显著增加

[0029] 粘附分子在炎性因子的刺激下可以从内皮细胞上脱落下来,为了检测脑脊液中可溶性 CD146 水平与多发性硬化症的关系,我们用 ELISA 的方法发现检测了多发性硬化症病人与正常人脑脊液中可溶性 CD146,我们发现可溶性 CD146 在多发性硬化症病人脑脊液中显著增加。

[0030] 主要材料:活动期多发性硬化症病人的脑脊液(26 例),正常人脑脊液(22 例),本说明书中使用的抗体 AA98、AA4、AA1 等可根据中国专利申请号 99107586.2、中国专利申请号 200810057260.7 的描述获得。

[0031] 主要试剂: 0.02 M PB(pH 7.25),抗 CD146 抗体 AA1,生物素标记的抗 CD146 抗体

AA98, 链亲和素 -HRP, TMB 底物 (200ng/ml TMB, 0.03% H₂O₂, pH4.5)

[0032] 主要方法:

[0033] 1) 将抗体 AA1 以 0.02M PB(pH 7.25) 稀释至 1 μg/ml, 50 μl/孔加入 96 孔板, 4℃ 包被过夜。

[0034] 2) 每孔加入 200 μl 2% BSA 室温封闭 2h。

[0035] 3) 每孔加入病人或正常人脑脊液样品 50 μl/孔, 室温孵育 2h。PBST 洗 5 次, 洗去非特异性结合。

[0036] 4) 检测抗体生物素标记的 AA98 以 2% BSA/PB 稀释至 0.5 μg/ml, 50ml/孔室温孵育 2h。

[0037] 5) 洗去抗体, 加入合适浓度的链亲和素 -HR, 50 μl/孔, 室温孵育 1h。

[0038] 6) 洗去抗体, 用 TMB 底物 (200ng/ml TMB, 0.03% H₂O₂, pH4.5) 显色, 硫酸终止, 450nm 读数。

[0039] 结果显示 (图 1): 多发性硬化症病人脑脊液中的可溶性 CD146 显著高于正常人脑脊液水平 (0.31±0.206nM vs 0.04±0.047nM, p < 0.0001), 脑脊液中可溶性 CD146 高于 0.134nM 可认为是异常的。

[0040] 实施例二: CD146 在炎症性疾病新生血管上过度表达

[0041] 在慢性炎症性疾病中, 血管新生是一个重要的病理过程, 大量的粘附分子均涉及到血管新生这一过程。CD146 是一个重要的血管生成相关的粘附分子, 我们在多种炎症性疾病组织中均观察到 CD146 的高表达。

[0042] 主要材料: 多发性硬化症模型小鼠的脊髓组织, 类风湿性关节炎模型大鼠的关节炎组织。临床标本来自于正常人及多发性硬化症病人脑组织, 人的动脉粥样硬化症剥脱内膜组织

[0043] 主要试剂: OCT, 4% 多聚甲醛, 二甲苯, 无水乙醇, 无水甲醇, 过氧化氢, PBS, 抗 CD146 抗体 (兔抗 CD146, 小鼠抗 CD146 单克隆抗体 AA4)

[0044] 主要方法: (1) 冰冻切片制作: 用 OCT 直接包埋多发性硬化症小鼠的脊髓组织、类风湿性关节炎模型的关节炎组织及人的动脉粥样硬化症剥脱内膜组织, 冻于 -80℃ 冰箱; (2) 石蜡切片制作: 用 4% 多聚甲醛固定新鲜组织 24 小时后, 石蜡包埋, 以下为石蜡切片的免疫组化过程:

[0045] 1) 取出片子, 入二甲苯溶液 37℃ 脱蜡两次, 每次 30 分钟;

[0046] 2) 入无水乙醇 ×2-95% -80% -70% -50% -30% 和蒸馏水中水化, 室温每次 5 分钟;

[0047] 3) 0.3% 过氧化氢 / 甲醇溶液 37℃ 避光处理 30 分钟, 消除内源性过氧化物酶的活性, PBS 洗三次;

[0048] 4) pH6.0 柠檬酸修复液 100℃ 水浴 30 分钟抗原热修复, 自然冷却;

[0049] 5) 5% 的正常羊血清 37℃ 封闭 1 小时;

[0050] 5) 加入 PBS 稀释的一抗 (兔抗 CD146 多抗或 AA4), 4℃ 孵育过夜;

[0051] 6) PBS 洗三次; 山羊抗 - 兔 - 生物素或山羊 - 抗 - 小鼠 - 生物素二抗 (1:1000) 在 37℃ 孵育 1 小时, PBS 洗三次;

[0052] 7) 亲和素 -HRP (1:1000) 在 37℃ 孵育 45 分钟;

[0053] 7) 用现配的 DAB 避光显色 2-7 分钟, 再进行苏木素复染。

[0054] 8) 逐级脱水 :50-70-80-90-100-100%乙醇 - 二甲苯, 晾干, 中性树脂封片。

[0055] 9) 显微成像系统中拍片。

[0056] 实验结果 :如图 2-6 所示, 无论是临床标本 (多发性硬化症病人脑组织和人的动脉粥样硬化内膜组织), 还是动物模型 (多发性硬化症小鼠脊髓组织和类风湿性关节炎大鼠关节滑膜组织), 我们都观察到 CD146 分子在炎症部位的新生血管上过度表达。

[0057] 实施例三 :CD146 抗体抑制炎性细胞穿越人血脑屏障

[0058] 炎症性细胞的浸润在炎症性疾病的发生和发展过程中扮演着非常重要的作用, 这些炎症性细胞主要包括 T 细胞、B 细胞, 巨噬细胞, 中性粒细胞等等。这些细胞在组织局部发挥着抗炎和致炎作用。组织的损伤主要是由于致炎作用引起的。阻断炎症性细胞的浸润对缓解组织的损伤有重要的作用。炎症性细胞的迁移和浸润涉及大量粘附分子的调节。CD146 在血管内皮细胞上的高表达对炎症性细胞的粘附和滚动以及迁移起着非常重要的作用。抗 CD146 抗体 AA98 可以在很大程度上抑制 CD146 对炎症性细胞迁移的作用。

[0059] 应用 Transwell 技术 (Leukocyte transmigration through vascular endothelium. An in vitro method. Allavena P, Del Maschio A. Methods Mol Biol. 1999; 96 :171-6), 我们检测了 CD146 抗体 AA98 在对炎症性细胞穿越血管内皮细胞屏障的作用。该技术简述如下 :将人脑血管内皮细胞铺于 96 孔 transwell 孔上室内, 培养在 5% 血清的培养基中, 孵育 24 小时, 让其形成紧密的单层细胞 (人工血脑屏障)。之后, 在下室加入 10% 血清的培养基。在上室加入人外周血淋巴细胞, 每孔 2×10^4 个, 同时加入抗体 (mIgG 或 AA98), 每孔 $50 \mu\text{g/ml}$ 。每组各 3 个复孔。培养 10 小时后, 收集下室穿越的淋巴细胞, 用流式细胞术分析各个淋巴细胞亚群的数目。另外, 我们还观察了细胞因子 TNF- α (每孔 50ng/ml) 对淋巴细胞穿越血脑屏障的影响以及 CD146 抗体的抑制作用。

[0060] 实验结果如图 7 所示, TNF- α 能够增加血脑屏障的渗透性, 促进炎症性细胞穿过血管内皮细胞层 (包括 CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺T 细胞及 CD19⁺B 细胞), 与 mIgG 对照组相比, CD146 抗体 AA98 能明显降低炎症性细胞对炎症部位的渗透, 抑制率约为 :总白细胞 :35.5%; CD3 :42.9%; CD4 :37.5%; CD8 :66.3%; CD19 :39.9%。

[0061] 实施例四 :CD146 抗体治疗小鼠多发性硬化症

[0062] 多发性硬化症的重要病理特征是大量的炎症性细胞浸润中枢神经组织, 通过阻断炎症性细胞的浸润可延缓和减轻其症状。我们通过动物实验, 发现 CD146 抗体 AA98 能够减缓症状, 治疗多发性硬化症。

[0063] 实验方法 :构建小鼠多发性硬化症模型 (Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. Stromnes IM, Goverman JM. Nat Protoc. 2006; 1(4) : 1810-9.)。用抗原肽 MOG35-55 免疫 C57BL/6J 小鼠, 在免疫后的第 7 天将小鼠随机分为两组, 对照组用无关抗体 mIgG 和治疗组用 CD146 抗体 AA98。每组 10 只小鼠, 每只小鼠腹腔注射抗体 $200 \mu\text{g}$, 隔日给药, 总计四次。隔日观察小鼠的疾病发展情况, 并对小鼠的发病情况进行评分。具体的评分标准如下 :

[0064] 0.5 分 :尾尖不能卷曲或卷曲无力

[0065] 1.0 分 :尾部完全下垂

[0066] 2.0 分 :尾部完全下垂, 后肢一只或两只无力

- [0067] 3.0分:尾部完全下垂,双后肢瘫痪
- [0068] 4.0分:尾部完全下垂,双后肢瘫痪,前肢无力
- [0069] 5.0分:濒临死亡
- [0070] 观察至免疫后第25天结束。统计学分析采用 T-test 检验。
- [0071] 实验结果:根据临床评分,我们发现与 mIgG 对照组相比,抗体 AA98 明显减轻了小鼠多发性硬化症的症状与发展(图8)。减缓发病时间但不影响其发病率。通过组化和神经轴突特殊染色可以发现 AA98 处理组的脊髓组织有较少的炎性细胞浸润和较少的神经轴突损伤。
- [0072] 实施例五:CD146 抗体抑制多发性硬化症小鼠机制研究 I
- [0073] 一 抑制炎性细胞的浸润
- [0074] 为了观察 CD146 抗体对多发性硬化症小鼠脊髓组织中炎性细胞的浸润的影响,我们建立多发性硬化症小鼠模型,分离小鼠的脊髓组织,制成冰冻切片或者石蜡切片,用于免疫组化。
- [0075] 多发性硬化症小鼠的脊髓组织中浸润大量炎性细胞,包括 T、B 细胞,巨噬细胞等等。
- [0076] 实验结果:在实验性自身免疫性脑脊髓膜炎小鼠脊髓组织中观察炎症细胞的浸润情况,主要是 CD45⁺ 细胞的浸润,包括 CD4⁺、CD8⁺T 细胞、CD19⁺B 细胞及 Gr-1⁺ 粒细胞及 F4/80⁺ 的巨噬细胞。结果发现(图9),与 mIgG 处理组相比,AA98 治疗组的脊髓白质区有较少的炎性细胞浸润(mIgG vs AA98, Mean±SD) (CD45:47±17.2 vs 202.2±78.1; CD4:25±4.5 vs 134±19.2; CD8:27±8.5 vs 98.7±19.1; CD19:29.3±6.7 vs 55.3±17.3; Gr-1:15±7 vs 66.3±24.2; F4/80:10.7±6.2 vs 41.8±15.8)。
- [0077] 实施例六:CD146 抗体抑制多发性硬化症小鼠机制研究 II
- [0078] 一 减少脊髓神经轴突的损伤
- [0079] 多发性硬化症小鼠另一个重要的病理特征是炎性细胞浸润导致神经轴突的损伤,我们利用 Luxol Fast Blue 方法检测多发性硬化症小鼠神经轴突的损伤情况。其原理是 Luxol Fast Blue 染料在乙醇溶液中,能够内与髓鞘磷脂结合。正常神经轴突外包裹着完整的髓鞘,因此染色深,损失后髓鞘被破坏,着色浅。分离抗体治疗后小鼠脊髓组织,用4%多聚甲醛固定24小时后石蜡包埋,制成石蜡切片,Luxol Fast Blue 染色,具体方法如下:
- [0080] 1) 将切片二甲苯溶液 37℃脱蜡两次,每次 10 分钟;
- [0081] 2) 将切片置入 100%乙醇 5 分钟、95%乙醇溶液中 5 分钟;
- [0082] 3) 0.1% Luxol Fast Blue 液中 56℃过夜;
- [0083] 4) 95%乙醇溶液 5 分钟;
- [0084] 5) 70%乙醇溶液 3 分钟;
- [0085] 6) 双蒸水 3 分钟;
- [0086] 7) 0.05%碳酸锂溶液分化 1 分钟,70%乙醇溶液继续分化 30 秒;
- [0087] 8) 双蒸水 3 分钟;
- [0088] 9) 镜下观察脊髓灰、白质分界是否清晰,若分界不清晰,则需重复(6)、(7)两步骤,直至分化清晰为止;
- [0089] 10) 70%乙醇溶液 3 分钟;

[0090] 11) 95%乙醇溶液 5 分钟；

[0091] 12) 常规脱水透明、中性树胶封片。显微成像系统中拍片。

[0092] 实验结果如图 10 所示, 与 mIgG 处理组相比, AA98 治疗组的小鼠脊髓神经轴突损伤点很少 (2 ± 1 vs 8.7 ± 0.58)。

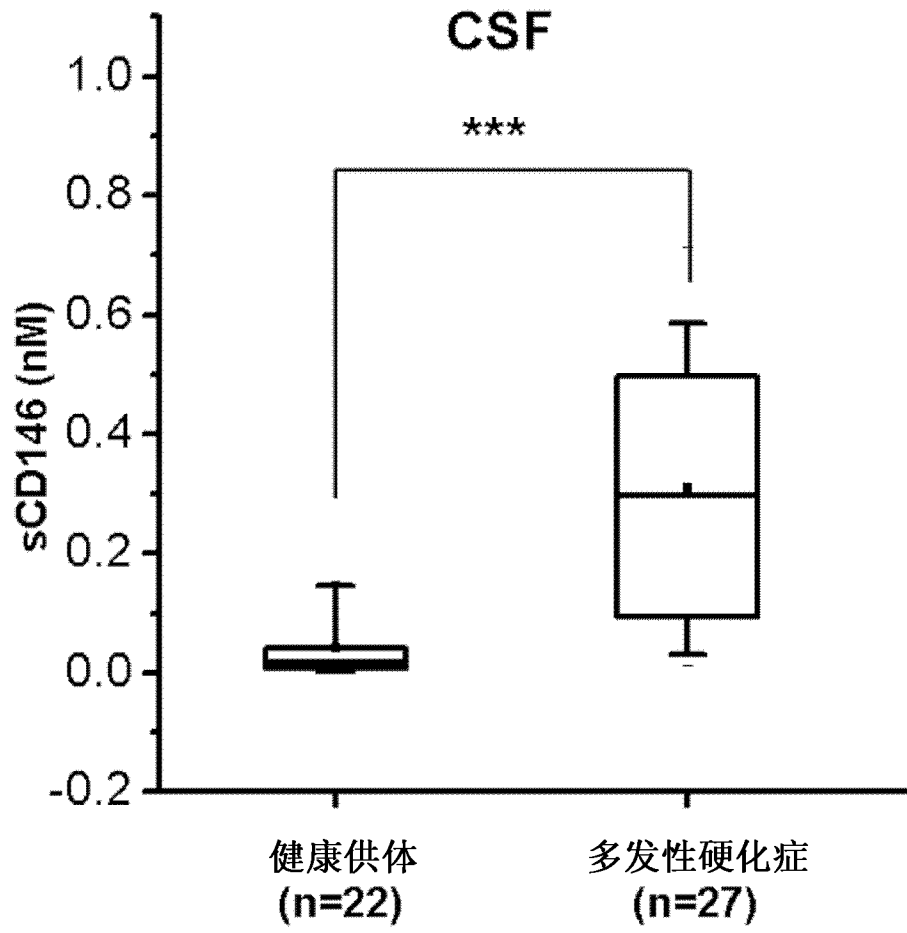


图 1

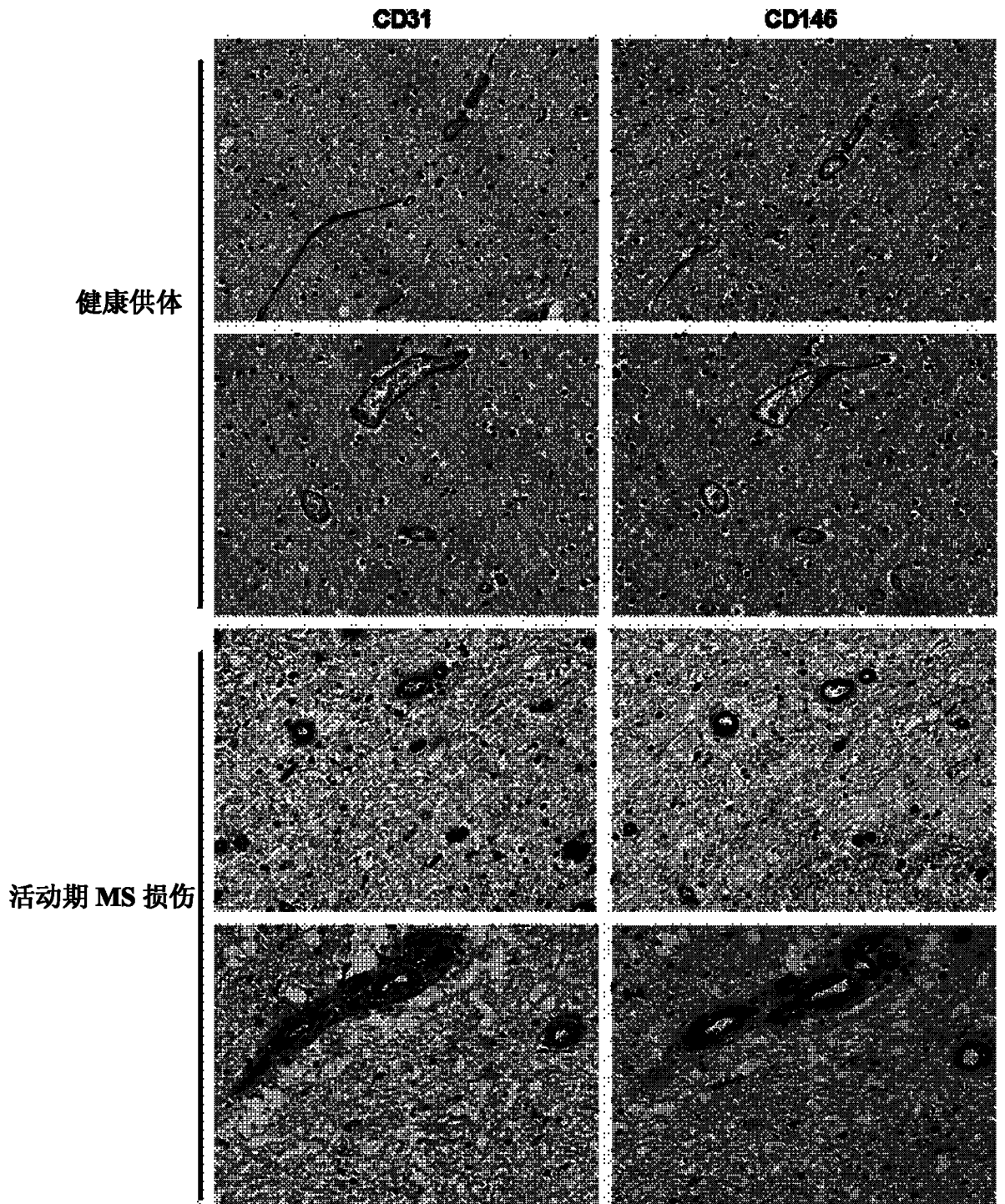


图 2

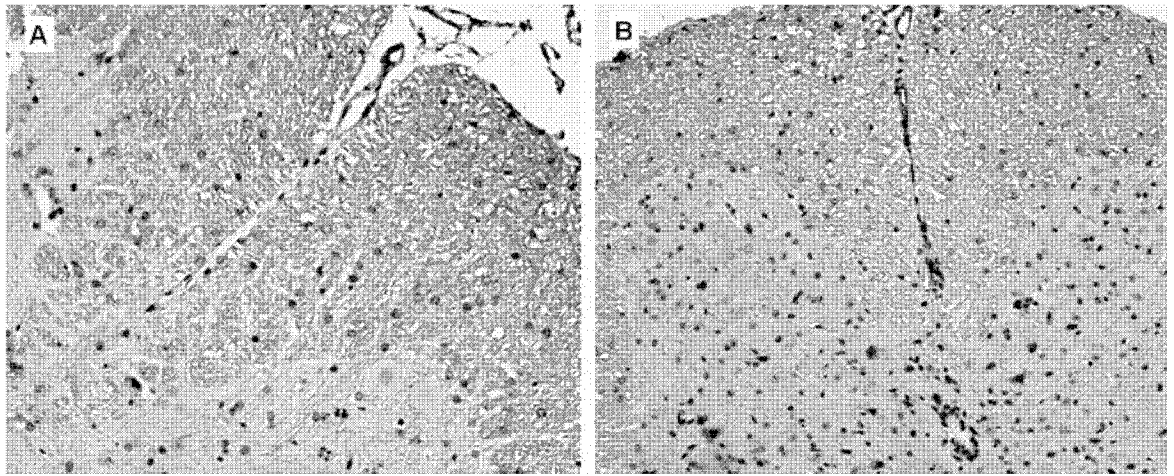


图 3

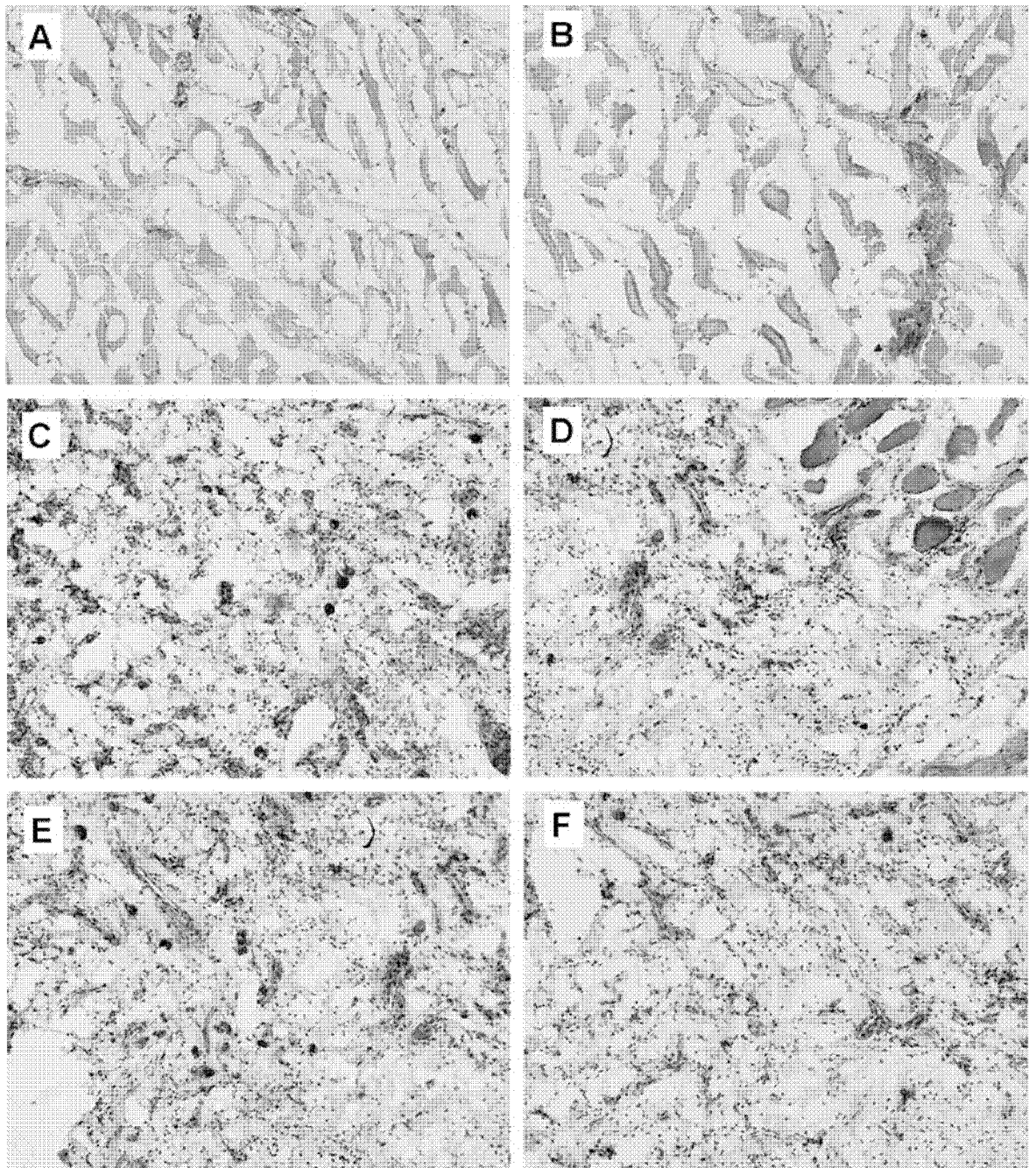


图 4

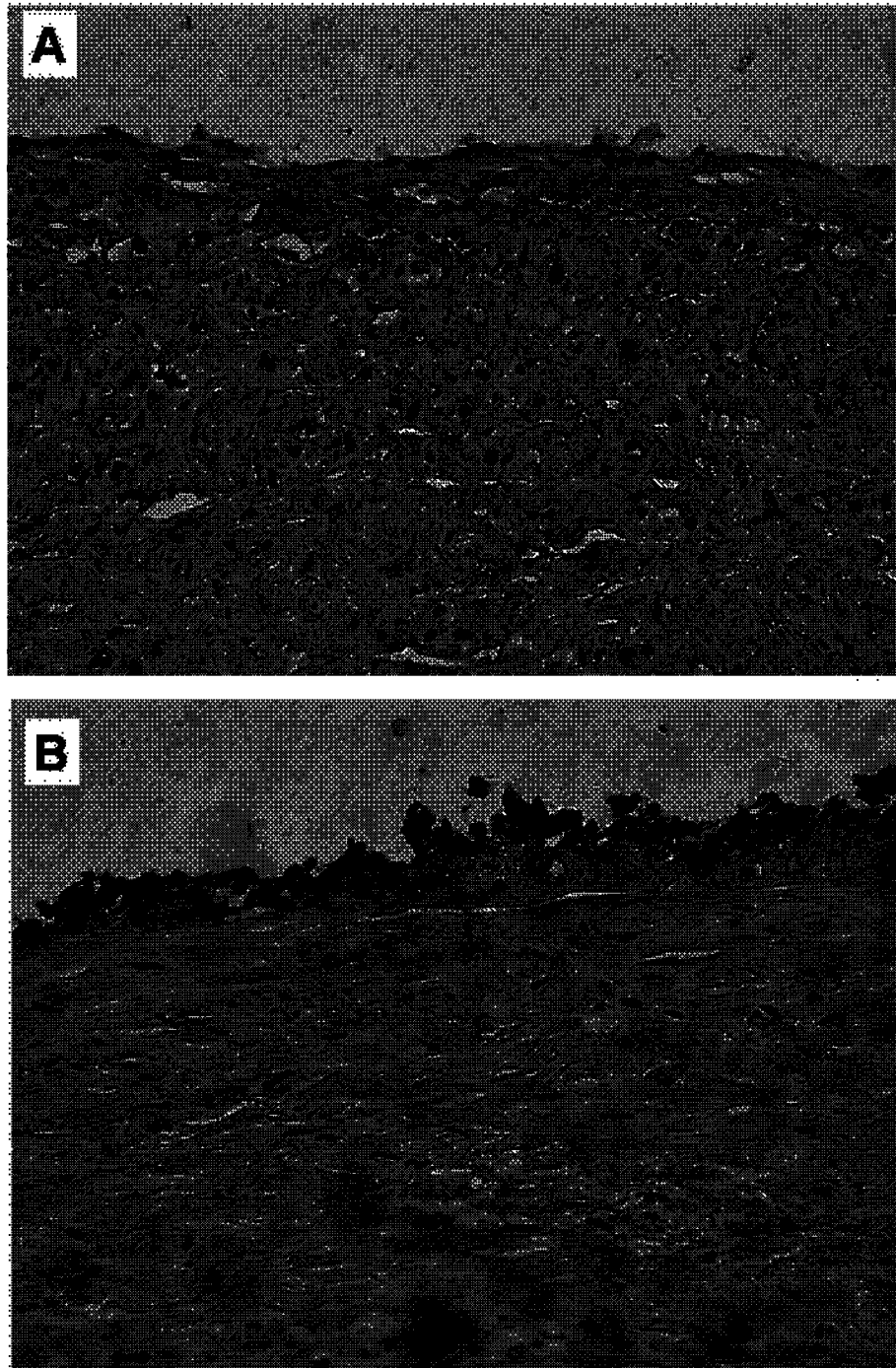


图 5

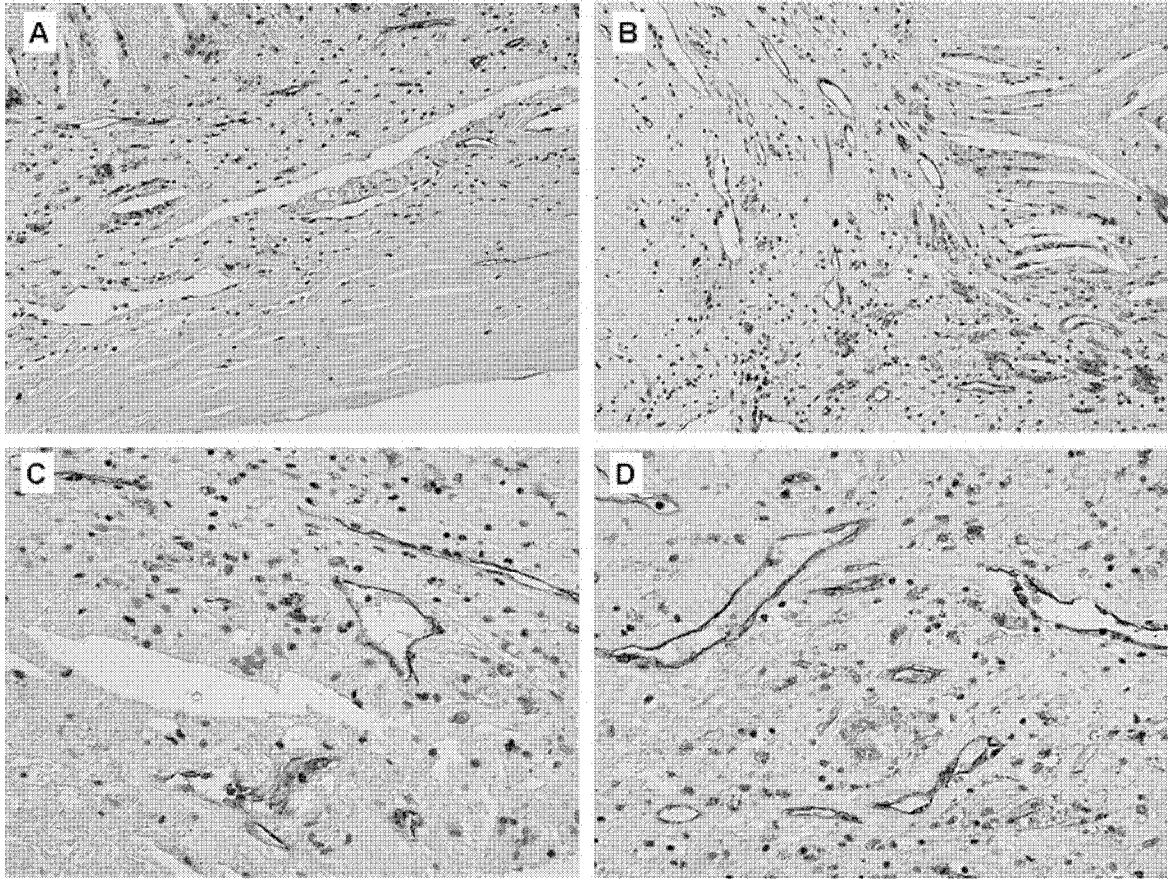


图 6

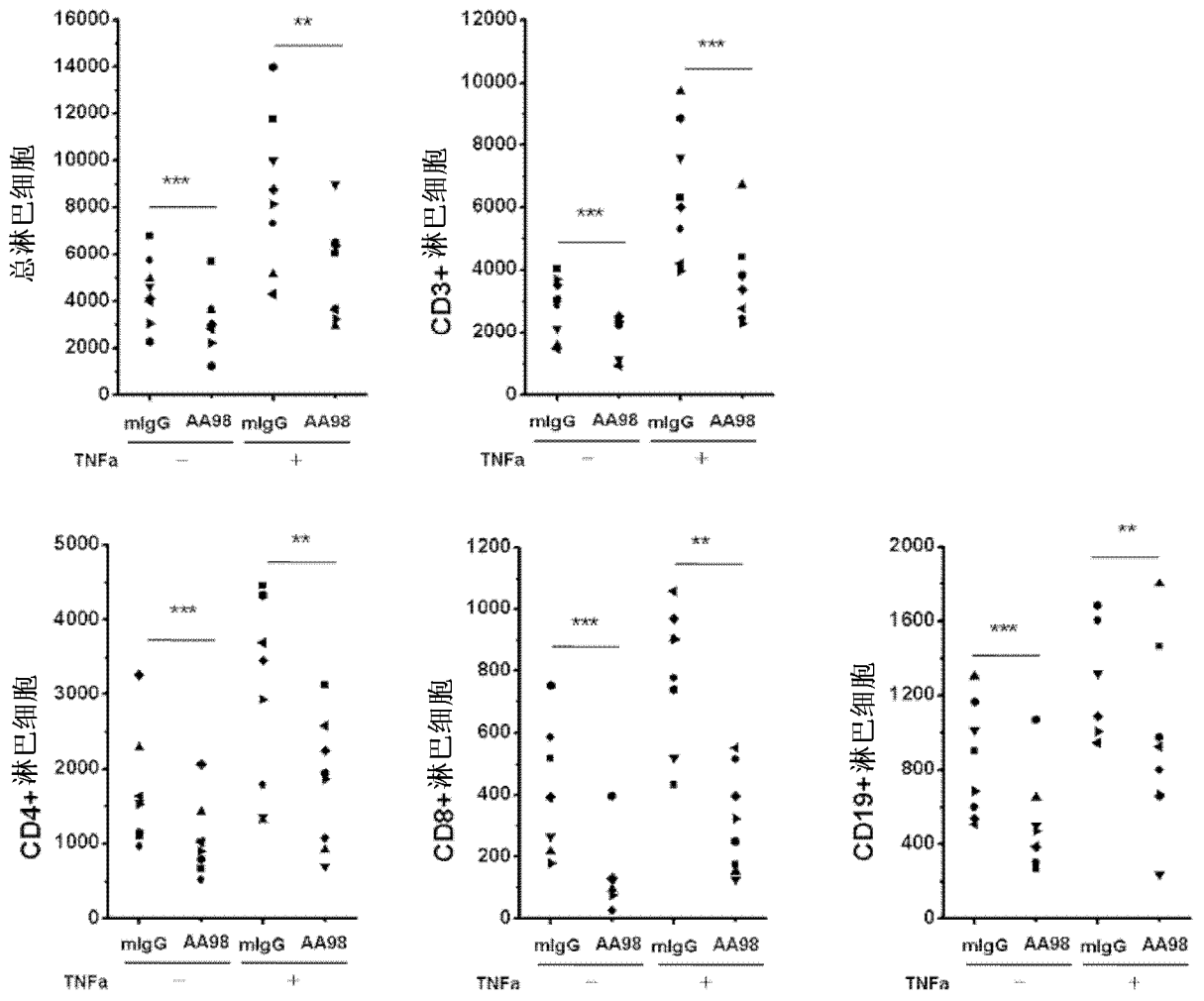


图 7

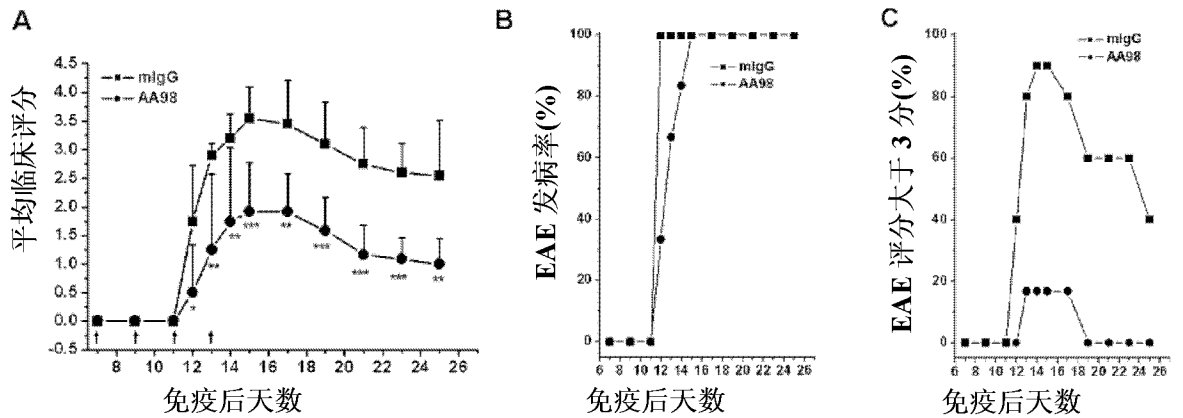


图 8

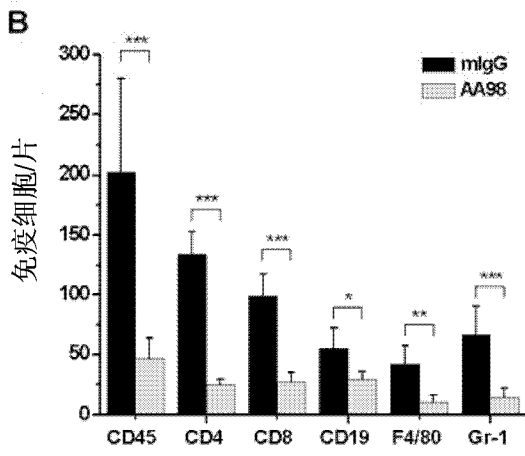
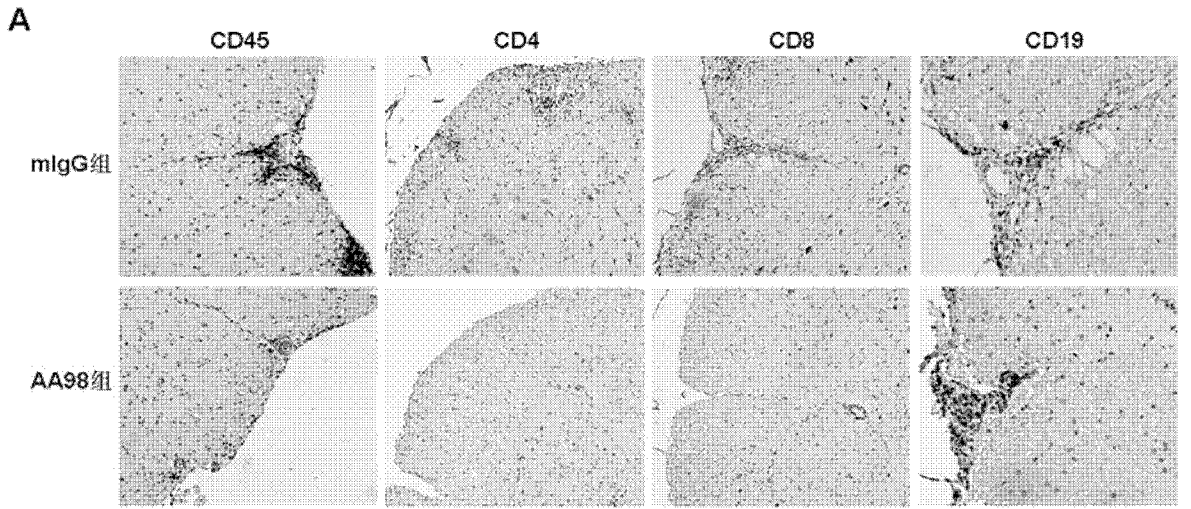


图 9

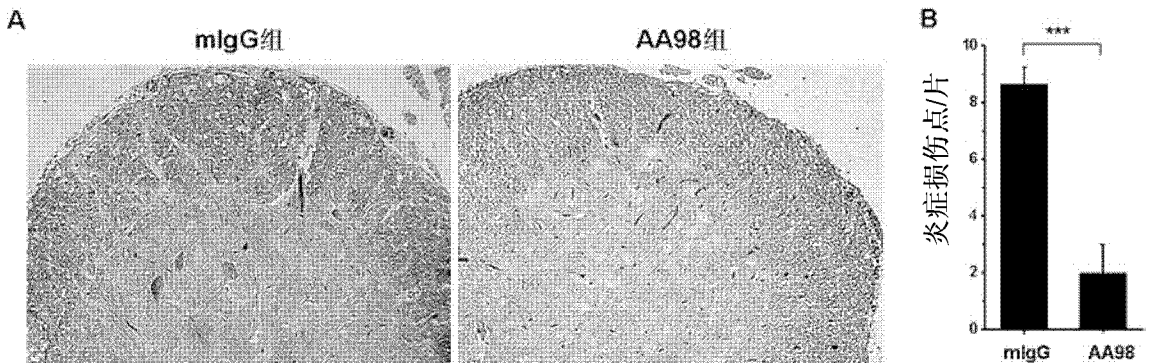


图 10