



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110891586 A

(43)申请公布日 2020.03.17

(21)申请号 201880045681.X

(74)专利代理机构 北京市铸成律师事务所
11313

(22)申请日 2018.05.08

代理人 郝名悦 刘文娜

(30)优先权数据

62/503,108 2017.05.08 US

(51)Int.Cl.

A61K 38/06(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

A61K 45/06(2006.01)

2020.01.08

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/031622 2018.05.08

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/208793 EN 2018.11.15

(71)申请人 MUSC研究发展基金会

地址 美国南卡罗来纳州

申请人 美国退伍军人事务部

(72)发明人 I·辛格 A·K·辛格

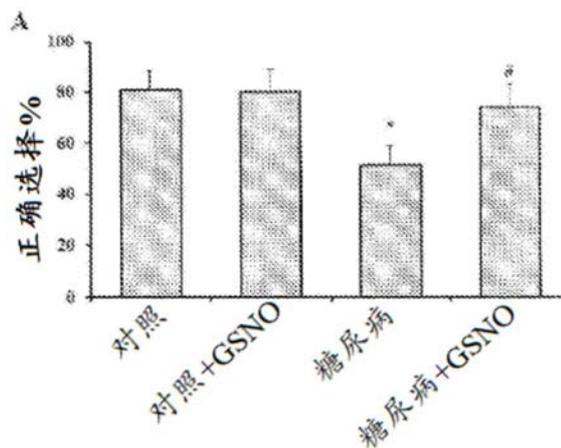
权利要求书2页 说明书37页 附图27页

(54)发明名称

用于疗法中的S-亚硝基谷胱甘肽(GSNO)和GSNO还原酶抑制剂

(57)摘要

本公开提供了通过施用GSNO或GSNO还原酶抑制剂来治疗神经缺损的方法。还提供了通过施用GSNO或GSNO还原酶抑制剂来治疗自身免疫性疾病的方法。



1. 一种治疗受试者的神经缺损的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的S-亚硝基谷胱甘肽(GSN0)和/或GSN0还原酶抑制剂。
2. 如权利要求1所述的方法,其中所述GSN0还原酶抑制剂是N6022。
3. 如权利要求1所述的方法,其中治疗神经缺损包括恢复血脑屏障(BBB)完整性、减轻神经系统炎症、减轻脑水肿、改善微血管的超微结构和/或改善认知。
4. 如权利要求3所述的方法,其中恢复BBB完整性被进一步定义为增加紧密连接蛋白的表达和/或减少细胞粘附分子的表达。
5. 如权利要求3所述的方法,其中所述BBB破坏是中风、脑缺血、创伤性脑损伤或脊髓损伤。
6. 如权利要求4所述的方法,其中所述紧密连接蛋白是ZO-1和/或封闭蛋白。
7. 如权利要求4所述的方法,其中细胞粘附分子是ICAM-1和/或VCAM-1。
8. 如权利要求4-7中任一项所述的方法,其中与施用所述GSN0和/或GSN0还原酶抑制剂之前的表达相比,表达的增加或减少是至少2倍。
9. 如权利要求8所述的方法,其中在皮质和/或海马中测量所述表达。
10. 如权利要求1所述的方法,其中所述受试者患有痴呆。
11. 如权利要求10所述的方法,其中所述糖尿病是血管性痴呆。
12. 如权利要求1所述的方法,其中所述受试者患有糖尿病。
13. 如权利要求12所述的方法,其中所述受试者患有与糖尿病相关的高血糖症。
14. 如权利要求1所述的方法,其中所述受试者患有自身免疫性疾病。
15. 如权利要求13所述的方法,其中所述自身免疫性疾病是多发性硬化症(MS)或类风湿性关节炎。
16. 如权利要求1所述的方法,其中口服、静脉内、腹膜内、气管内、肿瘤内、肌内、经内窥镜、病灶内、经皮、皮下、局部或通过直接注射或灌注施用所述GSN0和/或GSN0还原酶抑制剂。
17. 如权利要求1所述的方法,其中口服施用所述GSN0和/或GSN0还原酶抑制剂。
18. 一种治疗受试者的自身免疫性疾病的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的GSN0还原酶抑制剂。
19. 如权利要求18所述的方法,其中所述GSN0还原酶抑制剂是N6022。
20. 如权利要求18所述的方法,其中口服、静脉内、腹膜内、气管内、肿瘤内、肌内、经内窥镜、病灶内、经皮、皮下、局部或通过直接注射或灌注施用所述GSN0还原酶抑制剂。
21. 如权利要求18所述的方法,其中口服施用所述GSN0还原酶抑制剂。
22. 如权利要求18所述的方法,其中所述自身免疫性疾病是多发性硬化症、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、1型糖尿病、克罗恩病、银屑病、湿疹或皮炎。
23. 如权利要求18所述的方法,其中所述自身免疫性疾病是多发性硬化症或类风湿性关节炎。
24. 如权利要求18所述的方法,其中所述GSN0还原酶抑制剂保护免受中枢神经系统中的髓磷脂丧失和/或选择性地调节CD4+T细胞亚群。
25. 如权利要求18所述的方法,其中所述GSN0还原酶抑制剂减少Th17细胞的中枢神经系统浸润和/或增加调控性T细胞(Treg)的中枢神经系统浸润。

26. 如权利要求25所述的方法,其中所述Treg是CD4+CD25+FOXP3-T细胞。
27. 如权利要求1或权利要求18所述的方法,所述方法还包括施用至少第二疗法。
28. 如权利要求27所述的方法,其中所述第二疗法是GSNO。
29. 如权利要求27所述的方法,其中所述第二疗法是抗炎剂、免疫抑制剂或免疫调节剂。
30. 如权利要求27所述的方法,其中所述第二疗法是干扰素- β 、醋酸格拉替雷、特立氟胺、富马酸二甲酯、那他珠单抗、芬戈莫德、阿仑单抗、米托蒽醌和/或辛伐他汀。
31. 如权利要求27所述的方法,其中所述第二疗法是胰岛素或二甲双胍。
32. 如权利要求1或权利要求18所述的方法,其中所述受试者是人。

用于疗法中的S-亚硝基谷胱甘肽(GSNO)和GSNO还原酶抑制剂

[0001] 本申请要求2017年5月8日提交的美国临时专利申请号62/503,108的权益,所述临时专利申请的全部内容以引用的方式并入本文。

[0002] 本发明是在由美国国家卫生研究院授予的批准号NS037766以及由美国退伍军人事务部(U.S.Department of Veterans Affairs)授予的批准号BX002829下在政府支持下进行的。政府拥有本发明的某些权利。

[0003] 发明背景

1. 技术领域

[0004] 本发明总体上涉及医学领域。更特别地,本发明涉及通过施用S-亚硝基谷胱甘肽(GSNO)和/或GSNO还原酶抑制剂来治疗疾病的方法。

[0005] 2. 相关技术说明

[0006] 血脑屏障(BBB)将中枢神经系统(CNS)与体循环隔离开来,并且保护其免受血液中毒性剂的影响(Abbott等人,2010)。BBB由特化的内皮细胞组成,所述特化的内皮细胞的特征在于存在由膜蛋白组成的紧密连接:参与细胞间接触、从而与细胞质支架蛋白封闭小带(ZO)蛋白相互作用的封闭蛋白、密封蛋白和连接粘附分子(Citi等人,2012)。BBB破坏损害突触和神经元功能,从而在CNS病症中起重要作用(Zlokovic 2008)。BBB功能降低导致与糖尿病相关的认知功能障碍(Mogi和Horiuchi 2011)。糖尿病通过改变血流量、BBB通透性和异常内皮细胞增殖而诱导脑中的微血管并发症,从而影响糖尿病个体的认知功能(Dandona等人,1978;Hammes等人,2002;Hawkins等人,2007)。通过钆磁共振成像已在糖尿病受试者中检测到BBB通透性增加和白质高信号,从而表明BBB完整性的改变(Starr等人,2003)。与糖尿病相关的高血糖症改变脑微血管,从而导致BBB通透性增加和脑水肿,从而导致神经缺损(Aggarwal等人,2015)。

[0007] 研究发现,高血糖症经由调节MMP9/TIMP-1表达而导致BBB通透性增加(Aggarwal等人,2015)。但是,糖尿病诱导的BBB功能障碍涉及许多其他分子的相互作用。许多研究还表明,高血糖症经由紧密连接蛋白(ZO-1、封闭蛋白、密封蛋白-5)的丧失而增加BBB通透性(Hawkins等人,2007)。封闭蛋白(60kDa)是对于屏障功能而言功能上重要的四跨膜整合膜蛋白,并且其结构域含有已发现对氧化还原敏感的半胱氨酸残基(Furuse等人,1993)。密封蛋白构成20-27kDa膜蛋白的大家族,其中脑内皮细胞主要表达密封蛋白-3和密封蛋白-5(Ohtsuki等人,2007)。密封蛋白-5的外源表达增强屏障性质,并且其消减诱导BBB破坏(Nitta等人2003),因为它们经由顺式和反式同二聚化和异二聚化支持紧密连接完整性(Morita等人,2003)。在另一方面,ZO蛋白(ZO-1、ZO-2和ZO-3)与紧密连接跨膜蛋白缔合并且有助于脑内皮细胞的紧密连接完整性(Bauer等人,2010)。它们对于在紧密连接处密封蛋白和封闭蛋白的组装至关重要,从而将它们锚定至肌动蛋白细胞骨架上(Fanning和Anderson,2009)。在许多神经变性疾病中,从紧密连接组装体中封闭蛋白、ZO-1和密封蛋白-5表达的丧失一直与BBB通透性增加相关(Zlokovic,2008)。在糖尿病的动物模型中,还已经发现封闭蛋白和ZO-1在大脑和视网膜微血管两者中均降低(Harhaj和Antonetti,

2004)。糖尿病性视网膜病变中的封闭蛋白含量降低可能是由于基质金属蛋白酶(MMP)降解引起(Giebel等人,2005)。因此有可能,糖尿病经由刺激MMP活性而导致BBB紧密连接组装受损,如先前研究中所提出,已发现所述MMP活性在糖尿病脑中显著活化(Aggarwal等人,2015)。

[0008] 在BBB维持和功能中起重要作用的其他分子是细胞粘附分子。存在于BBB内皮表面上的间质细胞粘附分子1(ICAM-1)和血管细胞粘附分子1(VCAM-1)在白细胞通过血管内皮运输至CNS中起重要作用(Elices等人,1990)。在患病状态下,ICAM-1和VCAM-1的上调允许强烈白细胞浸润跨过BBB,从而加剧BBB功能障碍(Greenwood等人,2002)。在高血糖症、随后缺血再灌注期间观察到ICAM-1的上调,这对BBB完整性具有显著影响(Ennis和Keep,2007)。随后的研究还表明,在再灌注后,糖尿病大鼠中ICAM-1明显增加,同时IL-1 β 表达增加(Ding等人,2005)。此外,在许多糖尿病组织(如心脏、视网膜和肾脏)中也注意到增加的VCAM-1表达(Altannavch等人,2004;Joussen等人,2002)。因此,研究这些细胞粘附分子在糖尿病动物的脑微血管中的作用可在了解BBB破坏的机制方面提供有用的见解。

[0009] 还发现高血糖症伴随一氧化氮生物利用度降低和亚硝化应激增加,其似乎参与影响BBB通透性的血管重塑受损(Phillips等人,2005)。S-亚硝基谷胱甘肽(GSNO)(谷胱甘肽的一种S-亚硝化衍生物)充当一氧化氮和NO依赖性信号转导的储库。已发现它在许多疾病中对氧化/亚硝化应激和炎症具有保护作用(Rauhala等,2005)。据报告,在中风和创伤性脑损伤的实验模型中,GSNO调控BBB通透性、血管生成和神经修复机制(Khan等人,2011;Khan等人,2005)。还发现它减少内皮细胞活化并且防止紧密连接的丧失,从而表明GSNO作为神经保护剂的潜力(Zampolli等人,2000;Khan等人,2009)。此外,先前研究表明,GSNO降低MMP的活化,从而预防糖尿病啮齿动物模型中的认知功能障碍(Aggarwal等人,2015)。因此,迫切需要评价GSNO作为潜在保护剂的作用,其经由调节紧密连接蛋白和细胞粘附分子来防止BBB破坏,从而改善实验性高血糖条件下的认知功能。

发明内容

[0010] 本公开的实施方案涉及通过向受试者施用有效量的GSNO和/或一种或多种GSNO还原酶抑制剂来治疗疾病的方法。在一个实施方案中,本公开提供了一种治疗受试者的神经缺损的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的S-亚硝基谷胱甘肽(GSNO)和/或GSNO还原酶抑制剂。在特定方面,所述GSNO还原酶抑制剂是N6022。在特定方面,所述受试者是人。

[0011] 在一些方面,治疗神经缺损包括恢复血脑屏障(BBB)完整性、减轻神经系统炎症、减轻脑水肿、改善微血管的超微结构和/或改善认知。因此,在一些方面,所述实施方案的方法(例如,施用GSNO还原酶抑制剂如N6022)可用于治疗BBB破坏、痴呆(例如血管性痴呆)或导致BBB破坏的创伤。在某些方面,恢复BBB完整性被进一步定义为增加紧密连接蛋白的表达和/或减少细胞粘附分子的表达。在一些方面,所述紧密连接蛋白是ZO-1和/或封闭蛋白。在某些方面,细胞粘附分子是ICAM-1和/或VCAM-1。在一些方面,与施用所述GSNO和/或GSNO还原酶抑制剂之前的表达相比,表达的增加或减少是至少2倍。在特定方面,在皮质和/或海马中测量所述表达。

[0012] 在一些方面,所述受试者患有糖尿病。在特定方面,所述受试者患有与糖尿病相关

的高血糖症。在其他方面,所述受试者患有自身免疫性疾病,如多发性硬化症(MS)或类风湿性关节炎。

[0013] 在某些方面,口服、静脉内、腹膜内、气管内、肿瘤内、肌内、经内窥镜、病灶内、经皮、皮下、局部或通过直接注射或灌注施用所述GSNO和/或GSNO还原酶抑制剂。在特定方面,口服施用所述GSNO和/或GSNO还原酶抑制剂。

[0014] 在另一个实施方案中,提供了一种治疗受试者的自身免疫性疾病的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的GSNO和/或至少一种GSNO还原酶抑制剂。在一些方面,所述GSNO还原酶抑制剂是N6022。在特定方面,所述受试者是人。

[0015] 在一些方面,口服、静脉内、腹膜内、气管内、肿瘤内、肌内、经内窥镜、病灶内、经皮、皮下、局部或通过直接注射或灌注施用所述GSNO还原酶抑制剂。在特定方面,口服施用所述GSNO还原酶抑制剂。

[0016] 在某些方面,所述自身免疫性疾病是多发性硬化症、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、1型糖尿病或克罗恩病。在特定方面,所述自身免疫性疾病是多发性硬化症或类风湿性关节炎。

[0017] 在一些方面,所述GSNO还原酶抑制剂保护免受脊髓中的髓磷脂丧失和/或选择性地调节CD4⁺ T细胞亚群。在某些方面,所述GSNO还原酶抑制剂减少Th17细胞的CNS浸润和/或增加调控性T细胞(Treg)如CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺T细胞的CNS浸润。

[0018] 在以上实施方案的方面中,所述方法还包括施用至少第二疗法。在一些方面,所述第二疗法是GSNO。在某些方面,所述第二疗法是HMG-CoA还原酶的抗炎性抑制剂、免疫抑制剂或免疫调节剂。在特定方面,所述第二疗法是干扰素-β、醋酸格拉替雷、特立氟胺、富马酸二甲酯、那他珠单抗、芬戈莫德、阿仑单抗、辛伐他汀和/或米托蒽醌。在一些方面,所述第二疗法是胰岛素或二甲双胍。

[0019] 如本文所用,就指定组分而言“基本上不含”在本文中用于表示指定组分未被有目的地配制到组合物中和/或仅以污染物或痕量存在。因此,由组合物任何意外污染产生的指定组分的总量远低于0.01%。最优选的是用标准分析方法检测不到指定组分量的组合物。

[0020] 如本文在说明书中所用,“一个/种(a/an)”可指一个(种)或多个(种)。如本文在权利要求中所用,当与词语“包括/包含(comprising)”结合使用时,词语“一个/种”可指一个(种)或多于一个(种)。

[0021] 除非明确指明仅仅指代替代物,或替代物相互排斥,否则权利要求书中所用的术语“或”用于指“和/或”,尽管本公开支持仅仅指代替代物和“和/或”的定义。如本文所用,“另一”可指至少第二个(种)或更多个(种)。

[0022] 在整个本申请中,术语“约”用于指示值包括装置、用以测定所述值的方法的误差的固有变化,或研究受试者中存在的变化。

[0023] 通过以下详细描述,本发明的其他目的、特征和优点将变得显而易见。然而,应理解的是,尽管指示本发明的优选实施方案,但是详细描述和特定实施例仅通过说明的方式给出,因为从此详细描述中,本发明的精神和范围内的各种改变和修改对于本领域技术人员来说将变得显而易见。

附图说明

[0024] 以下附图形成本说明书的一部分,并且被包括以进一步说明本发明的某些方面。本发明可通过参考与本文提出的具体实施方案的详细描述结合的这些附图中的一个或多个来更好地理解。

[0025] 图1A-1C:在诱导糖尿病8周后GSNO施用对(A)正确选择百分比;(B)保留百分比;(C)辐射臂迷宫中的参考记忆错误、工作记忆错误和总记忆错误的影响。*与对照组显著不同($p < 0.05$)。#与糖尿病组显著不同($p < 0.05$)。值表示为平均值 \pm SD;n=6/组。

[0026] 图2A-2B:在诱导糖尿病8周后GSNO施用对(A)皮质和(B)海马中的ZO-1、封闭蛋白、密封蛋白-5相对mRNA表达的影响。*与对照组显著不同($p < 0.05$)。#与糖尿病组显著不同($p < 0.05$)。值表示为平均值 \pm SD;n=6/组。

[0027] 图3A-3B:在诱导糖尿病8周后GSNO施用对(A)皮质和(B)海马中的ZO-1、封闭蛋白、密封蛋白-5的相对蛋白质表达的影响。(i)条带描绘ZO-1、封闭蛋白、密封蛋白-5蛋白质表达;(ii)ZO-1、封闭蛋白、密封蛋白-5相对蛋白质表达的光密度分析。值表示为平均值 \pm SD;n=3。*与对照组显著不同($p < 0.05$);#与糖尿病组显著不同($p < 0.05$)。

[0028] 图4A-4C:代表在诱导糖尿病8周后GSNO施用对从进行免疫荧光的皮质和海马中获得的分离的微血管中(A)ZO-1;(B)封闭蛋白和(C)密封蛋白-5的表达的影响的图像。(放大倍数=40X;比例尺=50 μ m)。

[0029] 图5A-5B:在诱导糖尿病8周后GSNO施用对皮质和海马中(A)ICAM-1和(B)VCAM-1的相对mRNA表达的影响。*与对照组显著不同($p < 0.05$)。#与糖尿病组显著不同($p < 0.05$)。值表示为平均值 \pm SD;n=6/组。

[0030] 图6A-6B:在诱导糖尿病8周后GSNO施用对(A)皮质和(B)海马中ICAM-1和VCAM-1的相对蛋白质表达的影响。(上图)蛋白质印迹条带描述ICAM-1和VCAM-1蛋白质表达;(下图)ICAM-1和VCAM-1相对蛋白质表达的光密度分析。值表示为平均值 \pm SD;n=3。*与对照组显著不同($p < 0.05$);#与糖尿病组显著不同($p < 0.05$)。

[0031] 图7A-7B:表示在诱导糖尿病8周后GSNO施用对从经透射电子显微术的(A)皮质(i,iii-放大倍数=2550X,比例尺=1 μ m;ii,iv放大倍数=5000X,比例尺=0.5 μ m)和(B)海马(i,111,iv放大倍数=2550X,比例尺=1 μ m;ii-放大倍数=5000X,比例尺=0.5 μ m)获得的微血管的超微结构的影响的图像。黑色三角形表示毛细血管腔(Lu),黑色箭头表示基底膜(Brn),黑色虚线箭头(Ed)和白色箭头表示异染色质(He)。

[0032] 图8A-8C:外源性GSNO减弱EAE疾病。A.将用MOG肽免疫的C57BL/6小鼠在疾病发作当天(免疫后第14天)用GSNO(1mg/kg/天)处理。在免疫和GSNO处理后,每天如材料和方法中所述评估EAE疾病的临床体征。B.在EAE疾病的高峰期,通过H&E染色分析单核细胞的脊髓浸润。C.此外,通过流式细胞术分析对CD4⁺细胞(TH1、TH2、TH17、FOXP3⁺Treg和FOXP3⁻Treg)的亚群特异性浸润进行分析。

[0033] 图9A-9B:GSNO处理差异性地调节脾脏中CD4⁺T细胞的亚群特异性极化,而不会表现出淋巴细胞减少症相关的效应。A.将正常小鼠(无EAE)用盐水(Ctrl)、GSNO或FTY720(FTY)处理19天,并且分析血液中的总淋巴细胞(i)、CD3⁺T细胞(ii)、CD4⁺T细胞(iii)和CD8⁺细胞(iv)的数量。B.在疾病的高峰期,从用盐水(EAE)或GSNO处理的EAE小鼠的脾脏中分离CD4⁺T细胞,用MOG肽再刺激,并且通过荧光流式细胞术分析对谱系特异性CD4⁺T细

胞,如TH1 (i)、TH17 (ii)、总Treg (iii)、FOXP3+Treg (iv)和FOXP3-Treg (v)的数量进行计数。

[0034] 图10A-10B:CD4+/CD25+/FOXPJ-Treg在EAE疾病中的免疫调节作用。A.在疾病发作当天(免疫后第14天),将通过用GSNO离体处理诱导的MOG特异性CD4+CD25+FOXP3-Treg细胞转移至活动性EAE小鼠,并且评价其临床得分。B.在疾病的高峰期,IFN的表达。

[0035] 图11A-11C:N6022减少外周单核细胞的CNS浸润。A.在疾病高峰期(第20天),通过H&E方法(i)对脊髓切片进行组织学染色来分析单核细胞的脊髓浸润。手动计数H&E染色中的浸润细胞的数量,并且表示为每显微镜视野中的细胞数量(n=4)。(ii).B.接下来,从对照(ctrl)、EAE小鼠和用N6022处理并在离体条件下培养的EAE小鼠的脊髓中分离总淋巴细胞。在用MOG肽活化后,通过荧光流式细胞术分析对CD4+细胞亚群,如IFN- γ +TH1 (i)、IL-4+TH2 (ii)、IL-17+TH17 (iii)、CD25+FOXP3+细胞 (iv)和CD25+FOXP3-细胞 (v)的数量进行分析(n=4)。C.从培养基中,通过ELISA分析CD4+ T细胞亚群特异性细胞因子,如IFN- γ (i)、IL-4 (ii)、IL-17 (iii)和IL-10 (iv)的水平(n=4)。图示出平均值 \pm 平均值的标准误差(SEM):与对照(Ctrl)组相比,**p<0.001,***p<0.0001;与EAE组相比,+p<0.05,++p<0.001,+++p<0.0001。

[0036] 图12A-12C:N6022处理差异性地调节脾脏中CD4+ T细胞的亚群特异性极化,而不会表现出淋巴细胞减少症相关的效应。A.将正常小鼠(无EAE)用盐水(Ctrl)、GSNO或FTY720 (FTY)处理19天,并且分析血液中的总淋巴细胞(i)、CD3+ T细胞(ii)、CD4+ T细胞(iii)和CD8+细胞(iv)的数量。B.在EAE疾病的高峰期,从用盐水(EAE)或GSNO处理的EAE小鼠的脾脏中分离CD4+ T细胞,用MOG肽再刺激,并且通过荧光流式细胞术分析计数谱系特异性CD4+ T细胞,如TH1 (i)、TH17 (ii)、总Treg (iii)、CD25+FOXP3+ (iv)和CD25+FOXP3- (v)的数量。C.从培养基中,通过ELISA分析CD4+ T细胞亚群特异性细胞因子,如IFN- γ (i)、IL-4 (ii)、IL-17 (iii)和IL-10 (iv)的水平图示出平均值 \pm 平均值的标准误差(SEM):与对照(Ctrl)组相比,*p<0.05,**p<0.001,***p<0.0001;与EAE组相比,+p<0.05,++p<0.001,+++p<0.0001;n.s.=不显著。

[0037] 图13:在EAE小鼠中使用不同给药途径(腹膜内处理对比口服处理)N6022(1mg/kg/天)的药物功效的比较。

[0038] 图14A-14C:从EAE或GSNO处理的EAE小鼠中分离的T细胞的过继转移对被动性EAE疾病发展的影响。将从EAE小鼠或GSNO处理的EAE小鼠的脾脏和淋巴结分离的PLP139-151特异性T细胞离体培养,并且在TH0条件(IL-2)下用PLP139-151(10 μ g/ml)再刺激。(A)为了表征TH1对比TH17分化,分析来自GSNO处理和未处理的EAE小鼠的培养的CD4+细胞的培养基中的IFN- γ 或IL-17。(B)将用PLP139-151刺激的培养的T细胞过继转移至初次接受实验的宿主SJL小鼠,并且由不知情的研究者每天监测被动性EAE疾病的发展。(C)在EAE疾病的高峰期,从脊髓分离T细胞,并且在存在或不存在离体PLP139-151刺激的情况下通过ELISA分析IFN- γ 和IL-17的释放。

[0039] 图15A-15B:通过过继转移TH1或TH17发展被动性EAE疾病使从GSNO处理或未处理的EAE小鼠中分离的T细胞偏斜。将从GSNO处理或未处理的EAE小鼠的脾脏和淋巴结分离的T细胞在存在或不存在PLP139-151肽的情况下在TH1(IL 12p35、抗IL-4和抗IL-17) (A)或TH17 IL 12/23p40 (B)偏斜条件下培养。然后,通过ELISA(A-i和B-i)分析IFN- γ 、IL-17、IL-10和GM-CSF的释放。然后将TH1和TH17偏斜的T细胞过继转移至初次接受实验的宿主小

鼠,以诱导被动性EAE疾病,并且如所描述的实验程序(A-ii和B-ii)每天分析临床疾病得分。

[0040] 图16A-16B:GSNO处理在过继转移EAE疾病中的T细胞分化和效应子功能的影响。将来自EAE小鼠或GSNO处理的EAE小鼠的脾脏和淋巴结的PLP免疫的T细胞转移至初次接受实验的SJL小鼠。在被动免疫当天,在疾病过程中将接受者小鼠用媒介物(盐水)或GSNO进一步处理(A)。在免疫后,如材料和方法中所述分析EAE疾病的严重程度(B)。每组表示用来自盐水处理的EAE小鼠的T细胞免疫的盐水处理的接受者小鼠(具有实心菱形的线)、用来自盐水处理的EAE小鼠的T细胞免疫的GSNO处理的接受者小鼠(具有空心正方形的线)、用来自GSNO处理的EAE小鼠的T细胞免疫的盐水处理的接受者小鼠(具有实心三角形的线)或用来自GSNO处理的EAE小鼠的T细胞免疫的GSNO处理的接受者小鼠(具有十字标记的线)。

[0041] 图17A-17D:凝血酶诱导培养的hBMVEC中的内皮屏障破坏的细胞信号传导。用凝血酶(0.1单位/ml)处理人脑微血管内皮细胞(hBMVEC),并且分析RhoA活性的时间依赖性活化(左图)。如方法部分所述,还用各种浓度的凝血酶处理细胞并且在处理后5分钟分析RhoA活化的剂量依赖性活化(A)。如方法部分所述,用各种浓度的凝血酶处理hBMVEC,并且通过荧光测定分析细胞内 Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) 流入(B-i)。凝血酶处理后二十五秒,柱状图表示增加的 $[Ca^{2+}]_i$ 流入(B-ii)。在另一组实验中,通过蛋白质印迹分析在hBMVEC中分析了凝血酶时间和肌球蛋白轻链(Ser19)的浓度依赖性磷酸化。 β -肌动蛋白用于蛋白质印迹分析的内部负载对照(C)。用凝血酶(0.1单位/ml持续30分钟)处理hBMVEC,并且通过用鬼笔环肽(红色)和磷酸化的MLC(p-MLC;绿色)对F-肌动蛋白束进行免疫荧光染色来分析F-肌动蛋白应力纤维的发育。将细胞核用DAPI(蓝色)染色(D-i)。对于内皮屏障研究,在不存在或存在凝血酶(0.1单位/ml持续30分钟)处理的情况下分析在transwell板上培养的hBMVEC的跨内皮电阻(TEER)(D-ii)。竖直条(B-ii)和点(D-ii)是单独数据集的平均值($n=3$),并且T形条是标准误差平均值。与对照组相比,*** $p \leq 0.001$ 。所有实验重复至少三次,并且示出代表性数据。

[0042] 图18A-18C:凝血酶对hBMVEC中的内皮eNOS活性和NO代谢的影响。(A)用凝血酶(0.1单位/ml)处理人脑微血管内皮细胞(hBMVEC),并且使用对磷酸化(Ser1177)eNOS具有特异性的抗体通过蛋白质印迹分析来对eNOS的时程活化进行分析。 β -肌动蛋白用于内部负载对照。将hBMVEC用凝血酶处理,并且分别通过生物素转换测定或ELISA分析蛋白质相关的S-亚硝基硫醇(B)或蛋白质相关的3-硝基酪氨酸(N-Tyr)(C)的时间和浓度依赖性累积。竖列表示单独数据集的平均值,并且T形条是标准误差平均值。与对照组相比,** $p \leq 0.01$ 和*** $p \leq 0.001$ 。所有实验重复至少三次,并且示出代表性数据。

[0043] 图19A-19E:eNOS抑制剂和过氧化亚硝酸盐清除剂对凝血酶诱导的hBMVEC中的内皮屏障破坏的细胞信号传导的影响。(A)在存在或不存在NOS抑制剂L-NIO(10 μ M;预处理30分钟)的情况下,将人脑微血管内皮细胞(hBMVEC)用凝血酶(0.1单位/ml持续5分钟)处理,并且使用 β -肌动蛋白作为内部负载对照通过蛋白质印迹分析对MLC磷酸化(Ser19)进行分析。B.在存在或不存在L-NIO(10 μ M;预处理30分钟)或ONOO⁻清除剂FeTTPS(10 μ M;预处理30分钟)的情况下用凝血酶(0.1单位/ml持续20分钟)处理hBMVEC,并且通过ELISA分析蛋白质相关的3-硝基酪氨酸(由ONOO⁻形成的蛋白质加合物)的细胞水平。在存在或不存在FeTTPS或L-NIO的情况下,用凝血酶(0.1单位/ml持续5分钟)处理hBMVEC,并且分析MLC磷酸化(C)、RhoA活性(D)和细胞内 Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) 流入(E)。垂直条是单独数据的平均值,并且T形条是标

准误差平均值。与对照组相比,*** $p \leq 0.001$ 。与凝血酶处理的组相比,⁺⁺⁺ $p \leq 0.001$ 。所有实验重复至少三次,并且示出代表性数据。

[0044] 图20A-20D:GSNO对比ONOO⁻在凝血酶诱导的hBMVEC中的内皮屏障破坏的细胞信号传导中的相反作用。用各种浓度的GSNO或SIN-1(ONOO⁻供体)处理人脑微血管内皮细胞(hBMVEC),孵育2小时,并且如方法部分中所述分析S-亚硝基化蛋白和RhoA(A-i)以及酪氨酸硝化蛋白和RhoA(A-ii)的细胞水平。在存在或不存在各种浓度的GSNO或SIN-1(预处理2小时)的情况下,用凝血酶(0.1单位/ml持续5分钟)处理hBMVEC,并且如方法部分(B)中所述分析RhoA活性。在存在或不存在各种浓度的GSNO或SIN-1的情况下,用凝血酶(0.1单位/ml)处理hBMVEC,并且分析细胞内Ca²⁺([Ca²⁺]_i)流入(C)。在存在或不存在各种浓度的GSNO或SIN-1的情况下,用凝血酶(0.1单位/ml持续5分钟)处理hBMVEC,并且通过蛋白质印迹分析(D)分析MLC磷酸化。 β -肌动蛋白用于蛋白质印迹分析的内部负载对照。垂直条是单独数据的平均值,并且T形条是标准误差平均值。与对照组相比,*** $p \leq 0.001$ 。与凝血酶处理的组相比,⁺ $p \leq 0.05$ 和⁺⁺ $p \leq 0.01$ 。所有研究重复至少三次。

[0045] 图21A-21C:GSNO对比ONOO⁻在凝血酶诱导的hBMVEC中的内皮屏障破坏的细胞信号传导中的相反作用。(A)在存在或不存在GSNO(100 μ M;预处理2小时)或SIN-1(100 μ M;预处理2小时)的情况下,用凝血酶(0.1单位/ml持续30分钟)处理人脑微血管内皮细胞(hBMVEC),并且通过用鬼笔环肽(红色-i)和磷酸化的MLC(p-MLC;绿色-ii)对F-肌动蛋白束进行免疫荧光染色来分析F-肌动蛋白应力纤维的发育。将细胞核通过DAPI(蓝色)染色。(B)所得的数字图像用于荧光定量,并且数据由RFU(相对荧光单位)表示。(C)将hBMVEC在transwell板上培养,并且分析跨内皮电阻(TEER)。在不存在或存在GSNO(100 μ M;预处理2小时)或SIN-1(500 μ M;预处理2小时)的情况下,用凝血酶(0.1单位/ml持续5分钟)处理细胞。垂直条和虚线是单独数据的平均值,并且T形条是标准误差平均值。与对照组相比,** $p \leq 0.01$ 和*** $p \leq 0.001$ 。与凝血酶处理的组相比,⁺ $p \leq 0.05$,⁺⁺ $p \leq 0.01$ 并且⁺⁺⁺ $p \leq 0.001$ 。所有研究重复至少三次。

[0046] 图22A-22C:在TBI大鼠模型中GSNO和FeTPPS对BBB渗漏、水肿和3-NT表达的作用。(A)示出在TBI后第4小时,脑中伊文思蓝(EB)外渗的照片。在第24小时处死动物,对脑拍照(i),并且通过荧光分光光度法估计确定EB的强度(ii)。在假脑中未观察到EB外渗。(B)在TBI后第24小时测量水肿(组织含水量)。(C)使用蛋白质印迹法在创伤半影区中在第24小时还测量了硝基酪氨酸(N-Tyr)作为ONOO⁻的指标的水平,以及其通过光密度测定的定量。数据表示为各自来自针对伊文思蓝和浮肿的五个不同实验以及针对蛋白质印迹的三个不同实验的平均值 \pm SD。对比假,* $p \leq 0.05$,*** $p \leq 0.001$,并且对比TBI⁺ $p \leq 0.05$,⁺⁺ $p \leq 0.01$ 且⁺⁺⁺ $p \leq 0.001$ 。

[0047] 图23A-23E:在小鼠EAE模型中GSNO和FeTPPS对临床疾病、3-硝基酪氨酸的表达、BBB渗漏和脊髓脱髓鞘的作用。(A)如材料和方法中所述每天测定对照C57BL/6小鼠(Ctrl:n=8)、用MOG₃₅₋₅₅肽免疫的C57BL/6小鼠(EAE:n=8)、用1mg/kg/天GSNO(EAE+GSNO:n=12)或30mg/kg/天的FeTPPS(EAE+FeTPPS:n=8)处理的EAE小鼠的临床得分(i)。从疾病发作当天(免疫后第13天)开始,经由腹膜内途径施用所有药物。计算了免疫后第14天和第24天之间总体疾病严重程度的曲线下面积(AUC),并以条形图表示(ii)。(B)在免疫后24天,处死小鼠(n=4),并且通过蛋白质印迹(i)和光密度分析(ii)测量作为ONOO⁻的指标的3-硝基酪氨酸

(N-Tyr)的水平。(C)此外,将另一组小鼠($n=4$)注射伊文思蓝以分析BBB渗漏。(D)通过石蜡包埋的脊髓切片的H&E染色来分析单核细胞的脊髓浸润(i)。手动计数单核细胞的数量(由黄色三角形表示的暗褐色细胞核聚集体),并且由条形图表示(ii)。(E)还使脊髓切片和组织溶解产物经受免疫荧光染色(i)和MBP的蛋白质印迹分析(ii和iii)以获得脱髓鞘程度。数据显示为平均值 \pm 平均值的标准误差(SEM)。对比对照, $*p\leq 0.05$, $**p\leq 0.01$, $***p\leq 0.001$,并且对比EAE, $^+p\leq 0.05$, $^{++}p\leq 0.01$ 且 $^{+++}p\leq 0.001$ 。

具体实施方式

[0048] 糖尿病与血脑屏障(BBB)通透性增加、从而导致神经缺损相关。本研究调查了紧密连接蛋白[封闭小带-1(ZO-1)、封闭蛋白、密封蛋白-5]和细胞粘附分子[细胞间细胞粘附分子(ICAM)-1、血管细胞粘附分子(VCAM)-1]在异常BBB的通透性中的作用并且评估了S-亚硝基谷胱甘肽(GSNO)在糖尿病模型中的作用。在小鼠中通过腹膜内注射链脲霉素(40mg/kg体重)持续5天来诱导糖尿病。在诱导糖尿病后8周,每日口服施用GSNO(100 μ g/kg体重)。在通过辐射臂迷宫测试计量的糖尿病小鼠中观察到学习和记忆的显著下降。发现ZO-1和封闭蛋白的相对mRNA和蛋白质表达在从糖尿病皮质和海马获得的分离的微血管中显著降低,而密封蛋白-5保持不变。

[0049] 此外,紧密连接蛋白的免疫荧光表明,ZO-1和封闭蛋白两者的荧光强度似乎在糖尿病脑中降低。另外,在糖尿病动物中观察到ICAM-1和VCAM-1的mRNA和蛋白表达的显著上调。此外,发现来自糖尿病脑的微血管的超微结构异常,从而表明BBB损伤。但是,向糖尿病动物施用GSNO能够改善ZO-1和封闭蛋白的丧失以及ICAM-1和VCAM-1的上调,从而恢复BBB完整性并改善认知。这些发现结果清楚地表明,GSNO可通过保护BBB呈现治疗潜力,从而预防糖尿病神经并发症。

[0050] 因此,本公开提供了通过施用GSNO和/或GSNO还原酶抑制剂来治疗神经缺损的方法。GSNO和/或还原酶抑制剂的施用可通过降低BBB通透性来恢复BBB完整性。此外,所述疗法可减轻脑中的炎症和/或水肿以及改善认知。可从所述疗法中受益的受试者包括患有糖尿病和多发性硬化症(MS)的患者。

[0051] 本公开的其他实施方案涉及通过施用GSNO和/或一种或多种GSNO还原酶抑制剂来治疗免疫相关疾病、特别是自身免疫性疾病的方法。研究表明,与来自未处理的EAE小鼠的T细胞相比,TH1和TH17两者的过继转移使来自GSNO处理的EAE小鼠的T细胞偏斜,产生较轻的EAE疾病,从而表明IL-10和IL-17介导的机制在GSNO介导的免疫调节中的作用。此外,在疾病过程中,用GSNO处理来自GSNO处理的EAE小鼠或未处理的EAE小鼠的T细胞过继免疫的小鼠以研究GSNO在调控T细胞的效应子功能中的作用。GSNO处理降低了由来自GSNO处理的EAE小鼠的T细胞和来自未处理的EAE小鼠的T细胞的过继转移诱导的被动性EAE疾病。这些研究首次描述GSNO介导的TH1和TH17极化细胞诱导IL-10的机制,并且进而减轻EAE疾病。

[0052] 进一步的研究涉及N6022,其是非常有效、特异性和可逆的GSNO抑制剂的一流化合物。GSNO和N6022处理选择性地抑制EAE诱导的促炎性TH17的分化、扩增和CNS浸润,并且诱导抗炎性CD4+CD25+FOXP3-Treg(调控性T细胞(Treg)亚型中的一种)的分化、扩增和CNS浸润。此外,N6022处理而非GSNO处理另外抑制促炎性TH1并且诱导CD4+CD25+FOXP3+Treg(Treg的另一种亚型)。总之,此研究中的数据表明,N6022作为提供CD4+细胞(TH1/TH17对比

TH21 Treg) 的促炎性和抗炎性亚群的选择性调节而不会引起淋巴细胞减少作用的MS/EAE的新型药物。总体而言,这些数据证明GSNO介导的机制在T细胞极化和效应子功能(例如IL-17和IL-10)的谱系特异性调节中的作用。因此,本公开的某些实施方案提供了GSNO和/或GSNO还原酶抑制剂作为多发性硬化症(MS)和其他自身免疫性疾病如类风湿性关节炎、1型糖尿病、皮炎、湿疹和银屑病的潜在预防性和治疗性干预的用途。

[0053] I. 使用方法

[0054] 本公开的实施方案涉及通过向受试者施用有效量的GSNO和/或一种或多种GSNO还原酶抑制剂来治疗疾病的方法。

[0055] S-亚硝基谷胱甘肽(GSNO)是在一氧化氮(NO)信号传导中起关键作用并且是生物可利用NO的来源的内源性S-亚硝基硫醇(SNO)。酶GSNO还原酶(GSNOR)将S-亚硝基谷胱甘肽(GSNO)还原为不稳定的中间体S-羟基氨基谷胱甘肽,其然后重排以形成谷胱甘肽磺酰胺,或在GSH存在下形成氧化型谷胱甘肽(GSSG)和羟胺。通过这种分解代谢过程,GSNOR调控GSNO的细胞浓度,并且在调控内源性S-亚硝基硫醇的水平和控制基于蛋白质S-亚硝基化的信号传导中起着核心作用。S-亚硝基谷胱甘肽还原酶(GSNOR)通过S-亚硝基谷胱甘肽(GSNO)的分解代谢在体内调控S-亚硝基硫醇(SNO)和一氧化氮(NO)。GSNOR以及SNO、GSNO和NO的抗炎和平滑肌松弛活性在肺、心血管和胃肠道功能中起重要作用。

[0056] 在一些方面,向受试者施用GSNO还原酶的抑制剂(GSNOR)。例如,N6022是有效且可逆的GSNO还原酶抑制剂,其可用于本公开的方法中(Sun等人,2011;Green等人,2012;两者均以引用的方式并入本文)。可在本公开中使用的其他GSNO还原酶抑制剂包括但不限于取代的吡咯类似物(例如,在美国专利号8,642,628中描述;所述专利以引用的方式并入本文)和GSNOR的色酮抑制剂,如4-(2-(二氟甲基)-7-羟基-4-氧代-4H-色烯-3-基)苯甲酸,如美国专利号8,669,381中所公开;所述专利以引用的方式并入本文。

[0057] 在一些实施方案中,GSNO和/或一种或多种GSNO还原酶抑制剂用于治疗神经缺损、神经炎症、脑水肿、微血管超微结构和/或认知受损。神经缺损可能血脑屏障的通透性增加的结果,如与糖尿病相关的高血糖症所致。在一些方面,神经炎症可与免疫相关病症,如自身免疫性病症,包括多发性硬化症和类风湿性关节炎相关。

[0058] “免疫病症”、“免疫相关病症”或“免疫介导的病症”是指其中免疫应答在疾病的发展或进展中起关键作用的病症。免疫介导的病症包括自身免疫性病症、同种异体移植物排斥、移植物抗宿主疾病以及炎性和过敏性疾患。

[0059] “自身免疫性疾病”或“自身免疫性病症”是指免疫系统产生针对为正常宿主的一部分的抗原(即,自身抗原)的免疫应答(例如,B细胞或T细胞应答)、对组织造成随之损伤的疾病。自身抗原可来源于宿主细胞,或者可来源于通常定殖在粘膜表面的共生生物体,如微生物(称为共生生物体)。

[0060] 所述病症可包括与低氧血症和/或肺中的平滑肌收缩和/或肺部感染和/或肺损伤相关的肺部病症(例如,肺动脉高压、ARDS、哮喘、肺炎、肺纤维化/间质性肺病、囊性纤维化COPD);心血管疾病和心脏病,包括诸如高血压、缺血性冠状动脉综合征、动脉粥样硬化、心力衰竭、青光眼、以血管生成为特征的疾病(例如,冠状动脉疾病)的疾患;存在发生血栓形成的风险的病症;存在发生再狭窄的风险的病症;慢性炎症性疾病(例如,AID痴呆和银屑病);存在发生细胞凋亡的疾病(例如,心力衰竭、动脉粥样硬化、退行性神经系统病症、关节炎和

肝损伤(缺血性或酒精性));阳痿;由响应于对食物的渴望而进食引起的肥胖症;中风;再灌注损伤(例如,心脏或肺部的外伤性肌肉损伤、挤压伤、脊髓损伤或外伤性脑损伤);以及针对NO对心脏或脑的预处理保护免受随后的局部缺血事件为有益的病症。

[0061] 本公开的某些实施方案提供了用于治疗或预防免疫介导的病症的方法。在一个实施方案中,所述受试者患有自身免疫性疾病。自身免疫性疾病的非限制性实例包括:斑秃、强直性脊柱炎、抗磷脂综合征、自身免疫性阿狄森氏病、肾上腺自身免疫性疾病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、自身免疫性卵巢炎和睾丸炎、自身免疫性血小板减少症、白塞病、大疱性类天疱疮、心肌病、口炎性腹泻-皮炎、慢性疲劳免疫功能障碍综合症(CFIDS)、慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病、Churg-Strauss综合征、瘢痕性类天疱疮、CREST综合征、冷凝集素病、克罗恩病、盘状狼疮、原发性混合型冷球蛋白血症、纤维肌痛-纤维肌炎、肾小球肾炎、格雷夫斯病、格林-巴利、桥本氏甲状腺炎、特发性肺纤维化、特发性血小板减少性紫癜(ITP)、IgA神经病、幼年型关节炎、扁平苔藓、红斑狼疮、美尼尔氏病、混合性结缔组织病、多发性硬化症、1型或免疫介导的糖尿病、重症肌无力、肾病综合征(如微小病变、局灶性肾小球硬化或膜性肾病)、寻常天疱疮、恶性贫血、结节性多动脉炎、多软骨炎、多腺体综合征、风湿性多肌痛、多发性肌炎和皮肌炎、原发性丙种球蛋白血症、原发性胆汁性肝硬化、银屑病、银屑病性关节炎、雷诺氏现象、莱特尔综合征、类风湿性关节炎、类肉瘤病、硬皮病、斯耶格伦综合征、僵人综合征、系统性红斑狼疮、红斑狼疮、溃疡性结肠炎、葡萄膜炎、血管炎(如结节性多动脉炎、高安氏动脉炎、颞动脉炎/巨细胞动脉炎或皮炎型疱疹性血管炎)、白癜风以及韦格纳氏肉芽肿。因此,可使用本文公开的方法治疗的自身免疫性疾病的一些实例包括但不限于多发性硬化症、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、1型糖尿病、克罗恩病、溃疡性结肠炎、重症肌无力、肾小球性肾炎、强直性脊柱炎、血管炎或银屑病。受试者还可患有过敏性病症,如哮喘。

[0062] 考虑可将GSNO和/或至少一种GSNO还原酶抑制剂与一种或多种另外的疗法组合施用。另外的疗法可包括抗炎药、免疫调节剂和/或免疫遏制疗法。另外的疗法可以是本领域已知的用于治疗糖尿病或自身免疫性疾病如多发性硬化症的疗法。

[0063] 如本文所用,“治疗”描述出于对抗疾病、疾患或病症的目的对患者的管理和护理,并且包括施用本发明的化合物以预防症状或并发症的发作、减轻症状或并发症或消除疾病、疾患或病症。更具体地,“治疗”包括逆转、减弱、减轻、最小化、遏制或阻止疾病(病症)状态、疾病进展、疾病致病物(例如细菌或病毒)或其他异常疾患的至少一种有害症状或效应。只要症状和/或病理改善,就继续治疗。

[0064] 患者可以是任何动物,家养、家畜或野生动物,包括但不限于猫、狗、马、猪和牛,并且优选人患者。如本文所用,术语患者和受试者可互换使用。

[0065] GSNO或GSNO还原酶抑制剂可以任何药学上可接受的剂型使用,所述剂型包括但不限于可注射剂型、液体分散剂、凝胶、气雾剂、软膏、乳膏、冻干制剂、干粉、片剂、胶囊、控制释放制剂、快速融化制剂、延迟释放制剂、延长释放制剂、脉冲释放制剂、混合立即释放和控制释放制剂等。具体地,本文描述的GSNO还原酶抑制剂可被配制:(a)用于选自由以下组成的组的施用:口服、肺部、静脉内、动脉内、鞘内、关节内、直肠、眼、结肠、胃肠外、脑池内、阴道内、腹膜内、局部、经颊、鼻腔和局部施用;(b)成选自由以下组成的组的剂型:液体分散剂、凝胶、气雾剂、软膏、乳膏、片剂、囊剂以及胶囊;(c)成选自由以下组成的组的剂型:冻干

制剂、干粉、快速熔化制剂、控制释放制剂、延迟释放制剂、延长释放制剂、脉冲释放制剂和混合立即释放和控制释放制剂；或 (d) 它们的任何组合。

[0066] 经口组合物通常包含惰性稀释剂或可食用载体。它们可例如封装在明胶胶囊中或被压制成片剂。出于口服治疗性施用的目的，可将GSNOR抑制剂与赋形剂一起并入并且以片剂、锭剂或胶囊的形式使用。也可使用流体载体制备用作漱口剂的经口组合物，其中于流体载体中的化合物经口施用且漱口并吐出或吞咽。可包含药学上相容的粘合剂和/或佐剂物质作为组合物的一部分。

[0067] 特别有利的是以剂量单位形式配制口服或胃肠外组合物以便于施用和剂量统一。如本文使用的剂量单位形式是指适合作为用于待治疗的受试者的单一剂量的物理上离散单位；各单位含有经计算在与所需药物载体缔合的情况下产生所需治疗作用的预定量的GSNO或GSNOR抑制剂。本发明的剂量单位形式的规格由如下决定并且直接依赖于：GSNO或GSNOR抑制剂的独特特征和待实现的特定治疗作用，和本领域中混配用于治疗个体的这种活性剂的固有局限性。

[0068] 包含GSNO和/或至少一种GSNOR抑制剂的根据本公开的药物组合物可包含一种或多种药物赋形剂。此类赋形剂的实例包括但不限于粘合剂、填充剂、润滑剂、悬浮剂、甜味剂、调味剂、防腐剂、缓冲剂、润湿剂、崩解剂、泡腾剂以及其他赋形剂。此类赋形剂是本领域中已知的。示例性赋形剂包括：(1) 粘合剂，其包括各种纤维素和交联聚乙烯吡咯烷酮、微晶纤维素（如 **Avicel®** PH101和 **Avicel®** PH102）、硅化微晶纤维素（ProSolv SMCC™）、黄芪胶和明胶；(2) 填充剂，如各种淀粉、乳糖、乳糖一水合物和无水乳糖；(3) 崩解剂，如海藻酸、Primogel、玉米淀粉、轻度交联的聚乙烯吡咯烷酮、马铃薯淀粉、玉米淀粉和改性淀粉、交联羧甲基纤维素钠、交联聚维酮、羟基乙酸淀粉钠以及其混合物；(4) 润滑剂，包括作用于待压缩粉末的流动性的剂，包括硬脂酸镁、胶体二氧化硅，如 **Aerosil®** 200、滑石、硬脂酸、硬脂酸钙和硅胶；(5) 助流剂，如胶体二氧化硅；(6) 防腐剂，如山梨酸钾、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯甲酸及其盐、对羟基苯甲酸的其他酯如对羟基苯甲酸丁酯、醇类如乙醇或苄醇、酚类化合物如苯酚或季铵化合物如苯扎氯铵；(7) 稀释剂，如药学上可接受的惰性填充剂，如微晶纤维素、乳糖、磷酸氢钙、糖类和/或任何前述物质的混合物；稀释剂的实例包括微晶纤维素，如 **Avicel®** PH101和 **Avicel®** PH102；乳糖，如乳糖一水合物、无水乳糖和 **Pharmatose®** DCL21；磷酸氢钙如 **Emcompress®**；甘露醇；淀粉；山梨糖醇；蔗糖；以及葡萄糖；(8) 甜味剂，包括任何天然或人造甜味剂，如蔗糖、糖精蔗糖、木糖醇、糖精钠、甜蜜素、阿斯巴甜和安赛蜜；(9) 调味剂，如薄荷、水杨酸甲酯、橙子调味剂、**Magnasweet®** (MAFCO的商标)、泡泡糖调味剂、水果调味剂等；以及(10) 泡腾剂，包括泡腾剂对，如有机酸和碳酸盐或碳酸氢盐。合适的有机酸包括，例如，柠檬酸、酒石酸、苹果酸、富马酸、己二酸、琥珀酸和海藻酸以及酸酐和酸式盐。合适的碳酸盐和碳酸氢盐包括，例如，碳酸钠、碳酸氢钠、碳酸钾、碳酸氢钾、碳酸镁、碳酸甘氨酸钠、L-赖氨酸碳酸盐和精氨酸碳酸盐。

[0069] 短语“药物或药理学上可接受的”包括视情况而定应当向动物如人施用时不产生副作用、过敏或其他不良反应的分子实体和组合物。根据本公开，包含抗体或另外的活性成分的药物组合物的制备将是本领域技术人员已知的。此外，对于动物（例如人）施用，应该理解，制剂应满足FDA生物标准局要求的无菌性、致热原性、一般安全性和纯度标准。

[0070] 如本文所用,“药学上可接受的载体”包括任何和所有水性溶剂(例如,水、醇/水溶液、盐水溶液、胃肠外媒介物,如氯化钠、林格氏葡萄糖等)、非水性溶剂(例如,丙二醇、聚乙二醇、植物油和可注射的有机酯,如油酸乙酯)、分散介质、包衣、表面活性剂、抗氧化剂、防腐剂(例如,抗菌或抗真菌剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体)、等渗剂、吸收延迟剂、盐、药物、药物稳定剂、凝胶、粘合剂、赋形剂、崩解剂、润滑剂、甜味剂、调味剂、染料、流体和营养补充剂,此类类似材料以及它们的组合,如本领域普通技术人员将已知的。药物组合物中的各种组分的pH和精确浓度根据熟知的参数进行调节。

[0071] 如贯穿本申请中使用的术语“治疗益处”或“治疗有效的”是指促进或增强受试者关于此病状的医学治疗的福祉的任何物质。这包括但不限于疾病的体征或症状的频率或严重程度降低。

[0072] II. 实施例

[0073] 包括以下实施例以展示本发明的优选实施方案。本领域的技术人员应理解的是,在以下实施例中公开的技术代表由本发明人发现的在本发明的实践中起良好作用的技术,并且因此可被认为构成本发明实践的优选模式。然而,根据本公开,本领域的技术人员应理解,在不脱离本发明的精神和范围的情况下可在已公开并仍获得类似或相似结果的特定实施方案中做出许多改变。

[0074] 实施例1-GSNO的影响

[0075] GSNO补充对认知行为的影响:辐射臂迷宫用于评估特殊记忆和学习。糖尿病小鼠在辐射八臂迷宫任务中显示出显著空间认知缺陷,如通过与对照组相比较低正确选择百分比(25%)、较低保留百分比和较高的工作和参考记忆错误数量(接近2倍)所指示(图1)。100 μg/kg体重剂量的GSNO引起正确选择百分比的显著增加(30%)并且显著降低错误的数量(44%),从而暗示认知的提高。GSNO处理的对照小鼠的参数与对照小鼠无显著差异。

[0076] GSNO补充对紧密连接蛋白(ZO-1、封闭蛋白、密封蛋白-5)的mRNA表达的影响:紧密连接蛋白(ZO-1、封闭蛋白、密封蛋白-5)在糖尿病脑中的作用就它们的mRNA表达进行了研究,以确定可能是BBB通透性增加的原因的在转录水平下的变化。据发现与对照组相比,ZO-1和封闭蛋白的相对mRNA表达在糖尿病动物的皮质和海马中显著降低近2倍。在另一方面,向糖尿病动物补充GSNO能够使ZO-1和封闭蛋白的mRNA表达在两个区域中显著正常化(2倍),几乎与对照水平相当。然而,在糖尿病和GSNO处理的糖尿病动物中,未观察到密封蛋白-5的mRNA表达的显著变化(图2)。

[0077] GSNO补充对紧密连接蛋白(ZO-1、封闭蛋白、密封蛋白-5)的蛋白质表达的影响:为了研究与BBB组装相关的紧密连接蛋白的变化,已通过蛋白质印迹确定了来自糖尿病小鼠的皮质和海马的分离的微血管中ZO-1、封闭蛋白、密封蛋白-5的蛋白质表达。与对照组相比,ZO-1和封闭蛋白的表达在STZ诱导的糖尿病动物的皮质(分别30%、36%)和海马中显著降低。而GSNO施用能够使两个区域中ZO-1和封闭蛋白的蛋白质表达显著增强近70%和60%。然而,在糖尿病和GSNO处理的糖尿病动物中,不存在密封蛋白-5的蛋白质表达的显著变化变化(图3)。

[0078] GSNO补充对紧密连接蛋白(ZO-1、封闭蛋白、密封蛋白-5)的免疫荧光的影响:进行紧密连接蛋白的免疫荧光以研究紧密连接蛋白在来自糖尿病动物的皮质和海马的分离的微血管中的区域定位并确定与BBB相关的变化。针对ZO-1、封闭蛋白和密封蛋白-5染色的分

离的微血管在脑微血管中显示出不同的荧光模式,表明这些蛋白在内皮细胞接点处的浓度(图4)。在从糖尿病动物获得的皮质和海马的微血管中,未观察到ZO-1、封闭蛋白或密封蛋白-5的连接定位的变化。然而,ZO-1和封闭蛋白两者的荧光强度似乎均降低,与蛋白质印迹数据一致。相比之下,与未处理的糖尿病组相比,从GSNO补充的糖尿病动物的脑组织中获得的微血管显示出ZO-1和封闭蛋白两者的荧光强度增加(图4A、4B)。在糖尿病和GSNO处理的糖尿病动物中,未观察到密封蛋白-5荧光强度变化(图4C)。

[0079] GSNO补充对细胞粘附分子(ICAM-1和VCAM-1)mRNA表达的影响:研究细胞粘附分子(ICAM-1和VCAM-1)mRNA的表达,以了解它们在糖尿病疾患中在转录水平下介导BBB功能障碍中的作用。观察到,与对照组相比,发现ICAM-1和VCAM-1的mRNA表达在糖尿病动物的皮质和海马中显著增加2倍。然而,向糖尿病动物补充GSNO能够使两个区域中ICAM-1的mRNA表达正常化,与对照水平相当(图5)。

[0080] GSNO补充对细胞粘附分子(ICAM-1和VCAM-1)的蛋白质表达的影响:确定来自皮质和海马的分离的微血管中ICAM-1和VCAM-1的蛋白质表达的变化,以解释其与糖尿病中BBB通透性调控的关联。与对照组相比,ICAM-1和VCAM-1的蛋白质表达在糖尿病动物的皮质和海马中显著增加2倍。与未处理的糖尿病组相比,GSNO施用能够显著减轻其在两个区域中的蛋白质表达(图6)。

[0081] GSNO补充对微血管的超微结构的影响:CNS中的微血管超微结构由内皮细胞层、源自细胞外基质(ECM)的基层、包裹在由星形胶质细胞脚板包围的ECM中的平滑肌细胞层组成(deI Zoppo和Mabuchi 2003)。研究微血管的超微结构提供对由高血糖症对BBB的损伤程度的深入了解。采用透射电子显微术(TEM)来检测糖尿病实验模型中大脑微血管的变化。

[0082] 表1:实时PCR中使用的引物对的序列。

基因	登录号	正向序列(5'-3')	反向序列(3'-5')	扩增子(bp)
ICAM-1	NM_010493	CCGCAGGTCCAATTCACACT	CAGAGCGGCAGAGCAAAAG	72
VCAM-1	NM_011693	GGGAAGCTGGAACGAAGTATCC	TCTGGAGCCAAACACTTGACTGT	119
ZO-1	NM_009386	AAGCCAGCCTCTCAACAGAAAGCAG	AGGCTGTGATGCGTGCGAGC	168
封闭蛋白	NM_008756	GCTGTGATGTGTGTTGAGCT	GACGGTCTACCTGGAGGAAC	71
密封蛋白-5	NM_013805	CTGGACCACAACATCGTGAC	GCCGGTCAAGGTAACAAAGA	198
GAPDH	NM_00804	ATGACATCAAGAAGGTGGTG	CATACCAGGAAATGAGCTTG	176

[0084] 从皮质和海马获得的对照和GSNO补充的对照组小鼠的微血管表现出平滑且完整的管腔(黑色三角形),其中RBC穿过它们和具有均匀电子密度的连续基底膜。此外,发现内皮细胞层(虚线黑色箭头)紧密附着至基底膜(图7Ai,Bi)。在另一方面,在糖尿病诱导8周后,皮质和海马的微血管似乎显示出内皮细胞固缩、管腔狭窄(黑色三角形)、基底膜增厚(黑色箭头)、血管周围水肿(灰色箭头)和异染色质(白色箭头)。此外,发现内皮细胞层(虚线黑色箭头)松散地附着至基底膜,从而表明紧密连接蛋白的降解(图7Aiii,Biii)。然而,在补充GSNO的糖尿病动物中,大脑皮质微血管的超微结构表现出非常牢固地附着至内皮层

的相对畅通的毛细血管腔、透明周皮细胞、连续基底膜(图7Aiv,Biv)。这些发现结果清楚地表明,发现糖尿病动物的皮质和海马中微血管的超微结构异常,从而表明由BBB组成的神经血管单元受损。GSNO施用至糖尿病动物改善受损微血管的超微结构,从而改善BBB破坏。

[0085] 因此,可得出结论,糖尿病小鼠中的STZ诱导引起皮质和海马区域中紧密连接蛋白(ZO-1和封闭蛋白)的显著丧失以及细胞粘附分子(ICAM-1,VCAM-1)的上调,从而形成异常BBB。GSNO补充能够通过防止这些紧密连接蛋白的丧失并下调细胞粘附分子的表达来保持BBB结构。这些发现结果表明,GSNO的施用具有针对高血糖症相关的CNS缺损的保护作用,从而表明其在慢性糖尿病中的治疗潜力。

[0086] 实施例2-材料和方法

[0087] 化学品:所有化学品均购自Sigma Chemical Co. (St.Louis,USA)、Merck (Mumbai, India)、Himedia (Mumbai, India)和Sisco Research Laboratories Pvt.Ltd. (Mumbai, India)。链脲霉素(STZ)和GSNO获自Sigma Chemical Company, St Louis, USA和World Precision Instruments (Sarasota, USA)。引物获自IDT (Coralville, USA), 并且SYBR Green获自Roche Diagnostics (Mannheim, Germany)。RevertAid®H minus第一链cDNA合成试剂盒从Thermo Scientific Inc. (Waltham, USA) 获得。聚偏二氟乙烯(PVDF)膜从Immobilon™-P, Millipore (Darmstadt Germany) 获得。针对VCAM-1、ICAM-1、iNOS、封闭蛋白、ZO-1、密封蛋白-5和 β -肌动蛋白的第一抗体购自Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)。第二抗体HRP连接的抗小鼠IgG、抗山羊和抗兔IgG购自Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)。

[0088] 实验设计:称重28-32g之间的雄性laca小鼠从Central Animal House, Panjab University, Chandigarh获得。使动物适应环境并随意饲喂标准颗粒饲料和水。实验方案由机构伦理委员会批准,并且根据印度国家科学院(INSA)使用和护理实验动物指南进行。将动物分成四组:(i)在整个研究过程中,对照动物接受磷酸盐缓冲盐水(PBS);(ii)在每24小时后向对照+GSNO动物口服施用溶于PBS中的GSNO 100 μ g/kg体重持续8周;(iii)在诱导糖尿病后向糖尿病动物腹腔内注射溶于0.1mol/L柠檬酸盐缓冲液(pH 4.5)中的剂量为40mg/kg体重的STZ持续5天,并且在每24小时后向糖尿病+GSNO小鼠口服施用溶于PBS中的GSNO 100 μ g/kg体重持续8周。就记忆缺损而言,每周评估动物的糖尿病性脑病的发展。在研究结束时,对小鼠进行所有实验程序。

[0089] 辐射臂迷宫:辐射臂迷宫用于评估辐射臂迷宫中的特定学习和记忆(Veena等人, 2009)。它的装置由从八边形中央平台辐射的等距臂(35x9x5 cm)组成,并且迷宫保持在距地面80cm的高度。在采集之前,将所有臂加诱饵,并且允许小鼠探索迷宫10分钟并在连续几天内进行两次这样的适应训练。在采集期间,将小鼠置于八边形的中心,并且允许其在四个交替加诱饵的臂中找到奖励。当动物到达臂末端时,记录臂选择。当所有四个爪都进入臂时,计数臂进入。试验持续直到小鼠进入所有四个加诱饵的臂或过去5分钟为止。在试验结束时,将小鼠放回家笼,并在间隔1小时后进行第二次试验。继续训练直到小鼠达到80%正确选择的标准(5次进入中至少4次正确进入)。在采集期后,评价动物对任务的保留。对小鼠进行两次试验,并且取得两次试验的平均值用于分析。分析数据的参考记忆错误的数量(探索从未加诱饵的臂)、工作记忆错误(探索已访问的加诱饵的臂)、错误总数、记忆保留和正确选择%。

[0090] 微血管分离:通过Brooks等人,(2005)描述的方法分离微血管。将脑组织在微量分离缓冲液(103mM NaCl、4.7mM KCl、2.5mM CaCb、1.2mM KH₂PO₄、1.2mM MgSO₄、15mM HEPES、2.5mM NaHCO₃、10mM D-葡萄糖、1mM丙酮酸钠和10g/L-葡聚糖(64,000mol wt),pH 7.4)中均质化,并且添加等量的26% (w/v) 葡聚糖。然后将样品以5600g离心10分钟,并且将获得的团块重新悬浮于微量分离缓冲液中。然后将悬浮液通过70 μ m过滤器(BD Biosciences, Gurgaon,India)过滤。然后将过滤的匀浆在4 $^{\circ}$ C下以3000g离心10分钟,并且获得团块。

[0091] 蛋白质印迹:在从脑的皮质和海马区获得的微血管中研究紧密连接蛋白和细胞粘附分子,即ZO-1、封闭蛋白、密封蛋白-5、ICAM-1和VCAM-1的蛋白质表达(Towbin等人,1992)。用6M尿素溶解缓冲液(6M尿素、0.1%Triton X-100、10mM Tris-HCl pH 8.0、1mM二硫苏糖醇、5mM MgCb、5mM EGTA和150mM NaCl)与蛋白酶抑制剂混合物萃取微血管团块。将含有50 μ g蛋白质的样品与预先染色的蛋白质标记物一起在10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶上分离。将来自凝胶的蛋白质转移至冰冷缓冲液(25mM Tris HCl、192mM甘氨酸和20%甲醇)中的聚偏二氟乙烯膜2小时。通过将膜与PBS中的5%脱脂乳一起在25 $^{\circ}$ C孵育2小时来阻断抗体的非特异性结合。用PBS和PBS-Tween连续洗涤三次后,用PBS中的2.5%脱脂乳中的针对ICAM-1(1:1000)、VCAM-1(1:1000)、ZO-1(1:500)、封闭蛋白(1:500)、密封蛋白-5(1:1000)和P-肌动蛋白(1:2000)的第一抗体探测膜,轻轻摇动3小时。将所述膜再次洗涤并与PBS中的2.5%脱脂乳中的相应辣根过氧化物酶缀合的第二抗体(1:5000)一起孵育1小时。使用化学发光试剂盒(Bio-Rad Laboratories,Hercules,CA,USA)将蛋白质可视化。最后,使用Gel文档系统可视化蛋白质条带,并使用Image J软件进行光密度分析。

[0092] 免疫荧光:将分离的微血管重悬于PBS中,并且使其在37 $^{\circ}$ C附着至聚赖氨酸包被的载玻片30分钟,并在95 $^{\circ}$ C固定10分钟。然后,随后将其用PBS中的4%甲醛固定10分钟,并用PBS中的0.1%Triton X-100透化5分钟。然后,将载玻片在含2%BSA的PBS中封闭2小时,并用PBS和PBS-Tween洗涤3次。然后将载玻片与含1%BSA的PBS中的第一抗体ZO-1(1:200)、封闭蛋白(1:100)和密封蛋白-5(1:200)在4 $^{\circ}$ C孵育过夜,并且再次用PBS和PBS-Tween洗涤3次。然后将载玻片与PBS中的1%BSA中的FITC缀合的抗兔(1:1000)或抗小鼠IgG(1:1000)一起孵育1小时。在盖玻片放置和密封后,在带有荧光素过滤器的Nikon TE-300荧光显微镜上用40X物镜拍摄照片(Schulze和Firth 1993)。

[0093] 实时PCR:使用TriReagent[®]从获自脑组织的微血管提取总RNA。为了消除基因组DNA污染,用DNA酶处理RNA样品。向每个样品中添加1 μ L DNA酶和1 μ L反应缓冲液。使用Nanodrop[™]分光光度计(Nanodrop[™] 1000,ThermoScientific[®],Waltham,USA)以260/280nm比率测定获得的RNA的浓度。使用琼脂糖凝胶电泳评价RNA的完整性和总体质量。此外,使用cDNA合成试剂盒(ThermoScientific[®] RevertAid[®]H Minus第一链cDNA合成试剂盒),从纯化的总RNA(1 μ g)进行cDNA合成。将获得的cDNA储存在-20 $^{\circ}$ C,以通过实时PCR进行扩增。对于qRT-PCR,使用引物-BLAST工具(NCBI)选择并由IDT[®](Coralville,Iowa,USA)定制合成各种基因的引物,如表1中所提供。对于实时PCR,将10ng cDNA与基因特异性引物、SYBR Green 1 Master (2X)(快速启动Taq DNA聚合酶,反应缓冲液,dNTP混合物,SYBR green 1染料,MgCl₂)混合并进行PCR扩增(在50 $^{\circ}$ C下1个循环2分钟,在95 $^{\circ}$ C下一个循环10分钟,在95 $^{\circ}$ C下10秒、59 $^{\circ}$ C下10秒、72 $^{\circ}$ C下10秒和60 $^{\circ}$ C下1分钟的40个循环)。通过LightCycler 480软件

(版本1.5)分析获得的数据。为了验证PCR反应的大小和特异性,将所得扩增子产物在琼脂糖凝胶上可视化。使用甘油醛-3-磷酸脱氢酶作为参考基因,并使用如Pfaffl等人,(2002)所述的 $\Delta - \Delta Ct$ 方法测定相对基因表达。

[0094] 透射电子显微术:通过Gao等人,(2005)描述的方法进行透射电子显微术。解剖大脑皮质和海马,并且切割约1mm³的小块并在4℃将其在Karnovsky固定剂[0.1M磷酸盐缓冲液(pH 7.4)中的2.5% (v/v) 戊二醛和2% (v/v) 多聚甲醛]中固定24小时。在0.1M磷酸盐缓冲液(pH 7.4)中的1%四氧化锇中在4℃下进行样品的后固定2小时。之后,将样品在0.1M磷酸盐缓冲液中洗涤以除去额外痕量的四氧化1小时,随后在升级的丙酮(30%、50%、70%、90%和100%)中脱水并用甲苯洗涤。然后使用CY212 Araldite通过使样品通过一系列介质[Araldite:甲苯(1:3)持续1小时;Araldite:甲苯(1:1)持续1小时;Araldite:甲苯(3:1)持续1小时]来加工样品用于包埋。使用束囊在araldite介质中进行组织包埋。为了确保完全聚合,将液态araldite包埋介质在烘箱中在50℃聚合18小时,随后将温度升至60℃持续36小时。使用非常锋利的玻璃刀切割约1 μ m厚度的半薄切片,并用0.5% (w/v) 在1% (w/v) 硼砂溶液中制备的ludine蓝染色以便在光学显微镜下检查。选择目标区域,并使用超薄切片机(Ultracut E, Reichert Jung, Austria)进一步修整所述块以形成60-80nm厚度的超薄切片。将超薄切片安装在100-300目大小的铜载网上,并在醇乙酸双氧铀(10分钟)以及乙酸铅(10分钟)中进行两次染色。最后将这些获得的切片在透射电子显微镜(FEI MorgagniTM 268d, The Netherlands)下进行观察,所述透射电子显微镜在Electron microscopy facility, All India Institute of Medical Science (AIIMS), New Delhi, India以100KV操作。

[0095] 蛋白质估计:根据Lowry等人(1951)的方法估计蛋白质含量。

[0096] 统计分析:所有值表示为平均值 \pm SD。使用SPSS 16软件,通过单向方差分析、随后纽曼-科伊尔斯(Newman-Keuls)检验进行多重成对比较来对数据进行分析。 $p < 0.05$ 的值被认为是统计上显著的。

[0097] 实施例3-用于治疗多发性硬化症的GSNO还原酶抑制剂

[0098] GSNO治疗经由抑制TH17细胞的中枢神经系统浸润、同时诱导CD4+CD25+FOXP3-Treg细胞的中枢神经系统浸润来减轻EAE疾病:据先前报告,GSNO治疗通过抑制TH17信号传导途径(STAT3/ROR γ t)、但不影响TH1(STAT4/T-bet)和TH2(STAT6/GATA3)信号传导途径而减轻EAE疾病(Langrish等人,2005)。因此,图8A示出GSNO治疗EAE小鼠显著降低EAE疾病严重程度,如通过它们的临床得分所示[未治疗的EAE小鼠:3.5 \pm 0.5,GSNO治疗的EAE小鼠:在疾病高峰期(免疫后第21天)3.1 \pm 0.76;未治疗的EAE小鼠:2.5 \pm 0.5,GSNO治疗的EAE小鼠:在疾病缓解时(免疫后第41天)1.3 \pm 0.76。因此,如H&E染色所示,GSNO治疗还减少单核细胞浸润(图8B)。

[0099] 接下来检查EAE小鼠中CD4+ T细胞的每个亚群的中枢神经系统浸润程度。图8C中的荧光流式细胞术分析显示GSNO治疗对EAE动物脊髓中CD4+IFN- γ +(TH1)细胞的数量没有明显影响,但显著降低CD4+IL-17(TH17)细胞的数量,如先前所报告(Langrish等人,2005)。此外,GSNO处理显著增加可能代表'NO-Treg'的CD4+CD25+FOXP3-Treg细胞的数量(Neidbala等人,2007),而不改变代表天然和/或诱导型Treg(nTreg和iTreg)的CD4+CD25+FOXP3+Treg细胞的数量(Curotto de Lataille和Lataille,2009)。因此,与未治疗的EAE小鼠相比,总Treg

细胞(CD4+CD25+)的数量在用GSNO治疗的EAE小鼠中增加。这些数据表明,GSNO治疗经由抑制TH17细胞的CNS浸润、同时诱导CD4+CD25+FOXP3-Treg细胞的CNS浸润来减轻EAE疾病。

[0100] GSNO治疗减轻脾脏中TH17和CD4+CD25+FOXP3-Treg的亚群特异性极化和扩增,而不表现出与总体淋巴细胞减少症相关的效应:为了评估GSNO的任何潜在淋巴细胞减少作用,用盐水(Ctrl)、GSNO(1mg/kg/天/口服)或FTY720(1mg/kg/天/口服)作为阳性药物对照处理正常C57BL/6小鼠19天,并且分析血液中的总淋巴细胞、CD3+T细胞、CD4+ T细胞和CD8+细胞的数量。图9A示出GSNO处理对血液中这些细胞的数量没有明显影响,而FTY720(FTY)显著减少血液中那些淋巴细胞的数量,从而表明GSNO介导单核细胞(图8B)和TH17(图8C-ii)的脊髓浸润的减少与淋巴细胞减少症相关的效应不相关。接下来,在EAE小鼠的脾脏中研究GSNO处理对CD4+ T细胞的极化/扩增的影响。根据脊髓浸润的数据(图8C),GSNO处理对EAE动物脾脏中TH1细胞的极化/增没有明显影响,但显著降低TH17细胞的极化/扩增。此外,GSNO处理显著增加CD4⁺CD25⁺FOXP3⁻Treg细胞的极化/扩增,而不改变CD4+CD25+FOXP3+Treg细胞的数量。因此,与未处理的EAE小鼠相比,总Treg细胞(CD4+CD25+)的极化/扩增在用GSNO处理的EAE小鼠中增加。这些数据表明,GSNO处理经由抑制TH17细胞和/或诱导CD4+CD25+FOXP3-Treg细胞的极化、扩增和CNS浸润来减轻EAE疾病。

[0101] CD4+/CD25+/FOXP3-Treg在EAE疾病中的免疫调节作用:已知NO诱导型CD4+CD25+FOXP3-Treg(NO-Treg)细胞经由诱导IL-10产生来减轻EAE疾病(Niedbala等人,2007)。为了研究GSNO诱导型CD4+CD25+FOXP3-Treg在EAE动物的免疫调节中的参与,在疾病发作当天(免疫后第14天),将通过用GSNO处理在体外诱导的CD4+CD25+FOXP3-Treg细胞转移至活动性EAE小鼠。图10A示出GSNO诱导型CD4+CD25+FOXP3-Treg细胞的转移显著减弱EAE疾病的临床体征。如所预期,与未处理的EAE小鼠相比,用GSNO诱导型CD4+CD25+FOXP3-Treg细胞处理的EAE小鼠在脊髓中表达更高的IL-10水平、更低的IL-17水平和相当水平的IFN- γ (图10),CD4+CD25+FOXP3-Treg是在EAE条件下参与GSNO介导的抗炎作用的效应CD4+ T细胞之一。总之,这些数据表明GSNO作为EAE中CD4+CD25+FOXP3-Treg介导的抗炎应答的潜在诱导剂和TH17介导的促炎性应答的抑制剂。GSNO是基于硫醇的NO载体分子,但它不能有效释放游离NO分子(He等人,2016)。相反,它经由修饰蛋白质硫醇来发挥其生物学作用,其是称为S-亚硝基化的过程(Gaston等人,2003)。GSNO的细胞水平不仅受到其合成的调控,而且受到酶GSNOR介导的降解的调控(Gaston等人,2003)。

[0102] N6022是非常有效、特异性和可逆的GSNOR抑制剂的一流化合物。在这项研究中,观察到GSNO调节EAE动物脾脏中CD4+ T细胞(TH17和Treg)的极化和扩增,因此接下来评估外源性GSNO处理和通过N6022处理诱导内源性GSNO累积对EAE动物脾脏中蛋白质相关的S-亚硝基硫醇水平的影响。观察到,诱导EAE疾病对脾脏中蛋白质相关的S-亚硝基硫醇的水平没有明显影响。如所预期,与对照和EAE小鼠相比,用GSNO处理EAE小鼠增加蛋白质相关的S-亚硝基硫醇的脾脏水平。此外,用N6022处理EAE小鼠也使蛋白质相关的S-亚硝基硫醇的脾脏水平增加至与GSNO处理的EAE小鼠相当的水平。这些数据表明,在EAE疾病病状下,GSNO和N6022两者似乎在诱导脾细胞中蛋白质S-亚硝基化方面均有效。

[0103] GSNOR抑制剂(N6022)减轻EAE疾病:尽管外源性GSNO处理在EAE疾病中显示出显著改善,但GSNO在临床使用中具有一些缺点。GSNO是光不稳定化合物,并且与其他S-亚硝基硫醇化合物一样在水溶液中具有短的半衰期(Ramsay等人,1995)。其次,GSNO的分布和清除在

很大程度上受GSNOR的细胞/组织表达的影响(Liu等人,2004;Benhar等人,2009)。第三,GSNO引起GSNOR活性的前馈诱导(Brown-Steinke等人,2010),并且因此长期GSNO处理可引起GSNO抗性。观察到通过用N6022处理抑制GSNOR可有效增加EAE小鼠中S-NO蛋白的水平。因此,评价了N6022对EAE疾病的功效。观察到,N6022(1mg/kg/天/腹膜内)处理EAE小鼠显著降低EAE疾病严重程度,如通过其临床得分所示[未处理的EAE小鼠:3.5±0.5,N6022处理的EAE小鼠:在疾病高峰期(免疫后第21天)2.67±0.29;未处理的EAE小鼠:2.5±0.5,GSNO处理的EAE小鼠:在疾病缓解时(免疫后第41天)0.3±0.29]。在此实验中,评价了相同剂量的FTY720(1mg/kg/天/口服)作为阳性药物对照的功效。用FTY720处理EAE小鼠也减弱EAE疾病的进展(在疾病高峰时临床得分3.0±0.87,并且在疾病缓解时临床得分1.67±0.58),但与相同剂量的N6022处理相比不太有效。评价了用N6022(1mg/kg/天)口服处理对EAE疾病的功效。令人感兴趣的是,观察到N6022显示出在口服途径处理情况下比腹膜内途径处理更大的功效(图13)。

[0104] 接下来,在用盐水、N6022或FTY720处理的EAE小鼠的脊髓中评估髓磷脂状态。用于M8P的脊髓切片的免疫荧光染色的数据以及用于M8P和PLP的蛋白质印迹分析数据表明,与FTY720处理相比,N6022处理更大地保护免于EAE小鼠的脊髓中的髓磷脂丧失。这些数据表明N6022用于减轻EAE的临床疾病以及神经系统疾病的治疗潜力。

[0105] N6022减少外周促炎性免疫细胞的CNS浸润:接下来通过H&E染色分析外周单核细胞的脊髓浸润。图11A和11B示出用N6022处理EAE小鼠显著减少脊髓中单核细胞的浸润数量。为了评估N6022处理对EAE动物中CD4⁺ T细胞的每个亚群浸润至脊髓中的影响,对CD4⁺IFN- γ +(TH1)、CD4⁺IL-4+(TH2)、CD4⁺IL-17+(TH17)、CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺Treg和CD4⁺CD25⁺FOXP3⁻Treg细胞进行了荧光流式细胞术分析。图11B-i和-iii示出N6022处理减少EAE诱导的TH1和TH17细胞的脊髓浸润。因此,如CNS来源的淋巴细胞的培养基中IFN- γ 和IL-17的水平降低所示,N6022处理降低了EAE动物的CNS中Th1和Th17细胞的效应子功能(图11C-i和iii)。与对照小鼠相比,EAE小鼠不具有CNS中Th2细胞数量的明显改变,但是N6022处理增加Th2细胞的数量(图11B-ii)以及其效应子功能(图11C-ii中的IL-4释放)。EAE小鼠显示出CNS中CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺Treg细胞和CD4⁺CD25⁺FOXP3⁻Treg细胞的数量减少(图11B-iv和v)以及其IL-10表达的降低(图11B-iv)。然而,用N6022处理小鼠增加了Treg细胞的数量,以及其IL-10的表达超过对照水平。这些数据表明,N6022处理EAE小鼠抑制CD4⁺ T细胞的促炎性亚群(Th1和Th17)的浸润和效应子功能,同时恢复/诱导CD4⁺ T细胞的抗炎性亚群(Th2和Treg)的浸润和效应子功能。

[0106] N6022处理差异性地调节脾脏中CD4⁺ T细胞的亚群特异性极化,而不会表现出淋巴细胞减少症相关的效应:外源性GSNO处理减轻EAE疾病,而不影响循环淋巴细胞的数量(图9)。因此,N6022处理也抑制EAE疾病,但是它不影响循环总淋巴细胞(图12A-i)以及CD3⁺总T淋巴细胞(图12A-ii)、CD3⁺、CD4⁺TH细胞(图12A-iii)和CD3⁺、CD8⁺细胞毒性T细胞(图12A-iv)的数量,其在正常免疫监视中起关键作用。这些数据表明,N6022处理因此增加内源性GSNO水平并且选择性地抑制CNS中TH1和TH17的浸润和效应子功能(图11)而不引起FTY720处理的小鼠中观察到的任何明显的淋巴细胞减少作用(图9A)。

[0107] 接下来,检查了N6022对EAE小鼠脾脏中CD4⁺ T细胞的极化/扩增的影响。根据脊髓浸润的模式(图11),N6022处理响应于离体MOG再刺激而减少EAE诱导的脾脏来源的TH1和

TH17细胞的极化/扩增(图12B-i和-iii)。因此,N6022处理降低来自这些细胞的IFN- γ 和IL-17的产生(图12C-i和-iii)。另外,N6022处理使EAE诱导的TH2极化/扩增的减少(图12B-ii)以及其IL-4产生(图12C-ii)完全恢复至对照水平。用N6022处理EAE小鼠使CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺Treg细胞的减少的极化/扩增恢复至对照水平(图12B-iv)并且使CD4⁺CD25⁺FOXP3⁻Treg细胞的极化/扩增增加超过对照水平(图12B-iv)。因此,N6022处理增强从这些细胞产生IL-10(图12C-iv)。这些数据表明,N6022处理减弱促炎性TH1和TH17细胞的中枢浸润和效应子功能,但经由调节其在脾脏中的极化而升高抗炎性TH2和Treg细胞,而不产生在GSNOR基因敲除小鼠中观察到的任何明显的淋巴细胞减少作用(Yang等人,2010)。总体而言,上述研究表明,用GSNOR的抑制剂处理EAE动物下调促炎性T细胞应答,同时上调抗炎性T细胞应答以及针对EAE的中枢疾病的保护。

[0108] 总而言之,这项研究描述GSNO介导的机制用于治疗EAE和MS的自身免疫性疾病的治疗优点。以前,据报告,GSNO处理在EAE模型中选择性地调节TH17,但不调节TH1和TH2介导的促炎性应答(Nath等人,2010)。在此,评价了N6022(一种具有临床证明的安全性的可逆GSNOR抑制剂)对EAE疾病的作用,并且将其功效与外源性GSNO和FTY720(一种非特异性免疫抑制剂)进行了比较。N6022、GSNO和FTY720(1mg/kg/天)对进行性EAE疾病的作用的单次剂量比较显示N6022在抑制EAE疾病方面最有效。在相同剂量下,N6022和GSNO处理两者均提高脾脏中蛋白质相关的S-亚硝基硫醇的可比较水平,其反映GSNO的组织水平,并且似乎抑制TH17并诱导CD4⁺CD25⁺/FOXP3⁻Treg。但是,N6022进一步抑制TH1并诱导TH2和CD4⁺CD25⁺/FOXP3⁺Treg。与外源性GSNO处理相比,N6022在诱导细胞GSNO累积中可具有不同的药代动力学、药效学和细胞类型特异性活性。因此,如本研究中所观察到,预期外源性GSNO和N6022对EAE/MS疾病具有不同的功效。如在FTY720处理中观察到,N6022处理未引起任何明显的淋巴细胞减少作用,但是在相同剂量下表现出对EAE疾病的优异功效。总体而言,这项研究中的数据表明,作为MS/EAE的新型药物的N6022选择性地下调CD4⁺细胞的促炎性亚群(TH1和TH17),并且上调CD4⁺细胞的抗炎性亚群(TH2和Treg)。

[0109] 实施例4-材料和方法

[0110] 活动性EAE和药物治疗的诱导:向从Jackson Laboratory购买的8-12周龄的雌性C57BL/6小鼠随意提供食物和水,并且在整个研究过程中被保存在南卡罗莱纳医科大学(MUSC)的无病原体的动物护理设施中。所有程序均按照由机构动物护理和使用委员会批准的公认人道护理标准进行(批准编号:AR#1644)。如先前所述(Nath等人,2009)诱导EAE。简言之,在第0天和第7天,用100 μ l完全弗氏佐剂(CFA)中乳化(1:1)的MOG3s-ss肽(MOG;200 μ g;Peptide International)在侧腹区域中皮下免疫小鼠。另外,通过腹膜内注射在第0天和第2天给予300ng的百日咳毒素(Sigma-Aldrich,St Louis,MO)。按照我们和其他研究者报告的用于诱导EAE的标准化方案使用百日咳毒素(Nath等人,2009)。类似地,健康对照组在第0天和第7天接受皮下注射PBS和CFA乳液。由对实验处理不知情的检查员使用以下量表对EAE的临床体征进行评分:0=没有疾病的临床体征;1=立毛和迟滞;2=尾部瘫软(共济失调);2.5=共济失调伴部分后肢麻痹;3=后肢完全麻痹;3.5=后肢完全麻痹伴一个前肢麻痹;4=两肢完全麻痹;4.5=垂死阶段;5=死亡。在疾病发作后(其中临床得分在1-2之间),向动物每天给予用GSNO(1mg/kg体重口服)、N6022(1mg/kg体重腹膜内;Axon Medchem,Reston,VA)或FTY720(1mg/kg体重;Cayman Chemical,Ann Arbor,MI)处理。药物处理持续

直到研究结束(免疫后第41天)。未经药物处理的EAE动物接受PBS。同样,健康对照接受媒介物。

[0111] GSN0诱导型MOG特异性Treg细胞过继转移至活动性EAE小鼠:在EAE疾病的高峰期,处死小鼠,并且通过CD4⁺ T细胞分离试剂盒(Miltenyi Biotec, Auburn, CA)从脾脏中纯化CD4⁺ T细胞。将纯化的T细胞(2.5×10^6 细胞/ml)在96孔圆底微培养板(Falcon Labware, Oxnard, CA)中在含有RPMI 1640(Life Technologies, Gaithersburg, MD)、10%FBS(GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, PA, USA)和100 μ g/ml链霉素和青霉素(Atlanta Biologicals Norcross, GA)、1mM谷氨酰胺、1mM非必需氨基酸和50 μ M 2-巯基乙醇(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)的“完全RPMI培养基”中培养。为了扩增CD4⁺/CD25⁺/FOXP3⁻Treg细胞,将细胞用100 μ M GSN0处理72小时,每24小时更新一次。接下来,在疾病发作当天将收集在300 μ L PBS中的细胞($20\text{--}30 \times 10^6$)转移至EAE小鼠。

[0112] 组织学分析:在EAE疾病缓解后(免疫后第41天),将对照小鼠、EAE小鼠和用GSNO或N6022处理的EAE小鼠麻醉,并且首先用盐水且然后用4%多聚甲醛灌注,如先前Nath等人(2004)所述。将组织样品包埋在石蜡块中,并且横向切片(5 μ m厚)。进行苏木精和曙红(H&E)染色以评估白细胞浸润和炎症。对于浸润物的定量,通过ImageJ(NIH, Bethesda, MD)对数字图像进行分析。为了评估髓磷脂的状态,将切片用对髓磷脂碱性蛋白(MBP)具有特异性的抗体染色,并且通过免疫荧光分析进行检测。所有数字图像均使用配备有DP70摄像机单元(Olympus, Tokyo, Japan)的BX-60显微镜拍摄。

[0113] 总淋巴细胞计数:将正常雌性C57BL/6小鼠用GSNO、N6022或FTY720处理19天,且然后处死以收集血液。通过自动血液分析仪分析在EDTA血液收集管(BD Biosciences)中收集的血液,以计数总淋巴细胞。为了计数淋巴细胞的每个亚群,将50 μ l血液与含有荧光标记的抗体的染色缓冲液(20 μ l)混合,并且在荧光流式细胞分析之前,用FACS溶解溶液(BD Biosciences)溶解红细胞。对于CD3⁺、CD4⁺和CD8⁺细胞的染色,别甲藻蓝蛋白(APC)标记的抗小鼠CD3(eBioscience克隆17A2)、异硫氰酸荧光素(FITC)标记的抗小鼠CD4(eBioscience克隆RM4-5)、APC标记的抗小鼠CD8(eBioscience克隆53-6.7)和适当的同种型匹配的对照。

[0114] 脊髓和脾脏中TH1、TH2、TH17和Treg细胞的荧光流式细胞术分析:根据先前的报告伴随修改(Nath等人,2004)进行CD4⁺ T细胞的每个亚群(TH1、TH2、TH17、CD4⁺CD25⁺FOXP3⁻Treg和CD4⁺CD25⁺FOXP3⁻Treg)的荧光流式细胞术分析。简言之,将在疾病高峰期(免疫后第16天至第19天)的对照小鼠、EAE小鼠、用GSNO、N6022或FTY720处理的EAE小鼠处死以收集脊髓和脾脏。在制备单细胞悬浮液后,用Pharma溶解缓冲液(BD PharmingenTM)溶解红细胞,并且用RPMI 1640洗涤剩余的脾细胞。然后将分离的CD4⁺ T细胞与完全RPMI培养基一起重悬于含有MOG肽(25 μ g/ml)的12孔板(每孔 5×10^6 个细胞/2ml)中48小时。在离心后,收集所得上清液用于CD4⁺亚群特异性细胞因子的ELISA(参见下文)。将细胞团块用细胞染色溶液(ebioscience, Waltham, MA, USA)洗涤,并且用对于TH1对IFN- γ 具有特异性、对于TH2对IL-4具有特异性、对于TH17对IL-17具有特异性、对于总Treg对CD25⁺具有特异性和对于FOXP3⁻Treg对CD25⁺和FOXP3⁺具有特异性以及对于FOXP3⁻Treg对CD25⁺和FOXP3⁻具有特异性的荧光标记的抗体(ebioscience, Waltham, MA, USA)染色。使用Beackman Coulter仪器(Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA)对细胞进行计数和分析。

[0115] 脊髓中亚群特异性CD4⁺ T细胞细胞因子的ELISA:进行ELISA测定以分析从培养的细胞或脊髓组织释放的CD4⁺ T细胞亚群特异性细胞因子。为了提取脊髓溶解产物,将在EAE疾病高峰期从动物分离的脊髓在含有完全蛋白酶抑制剂混合物(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)的PBS中均质化。在离心(10,000xg)后,使用DC蛋白质测定试剂盒(Bio-Rad, Hercules, CA)通过Lowry测定来估计上清液中蛋白质的水平。对等量的蛋白质进行IFN- γ 、IL-4、IL-17和IL-10的ELISA分析。用于IFN- γ 、IL-17和IL-10的ELISA试剂盒购自R&D系统(Minneapolis, MN),并且用于IL-4的ELISA试剂盒购自Biolegend(San Diego, CA)。

[0116] 蛋白质印迹分析:在EAE疾病缓解(免疫后第41天)后,将脊髓组织在1x SOS-PAGE样品缓冲液(5x:0.25M Tris-Cl (pH 6.8)、50% (v/v)甘油、5% (w/v)SDS、0.05% (w/v)溴酚蓝、0.25M DTT)中均质化。在离心(10,000xg)后,使用DC蛋白质测定试剂盒(Bio-Rad)通过Lowry测定来估计上清液中蛋白质的水平。将等量的蛋白质溶解在4%-20%梯度SDS-PAGE(BioRad)中,并且转移至硝酸纤维素膜。然后用封闭缓冲液(5%脱脂乳粉、20mM Tris、500mM NaCl和0.1%Tween20, pH 7.6)封闭膜,并且在含有髓磷脂碱性蛋白(MBP; Santa Cruz Biotech, Delaware Avenue, CA)、蛋白脂质蛋白(PLP; Santa Cruz Biotech)或f3-肌动蛋白(Cell Signaling, Danvaers, MA)具有特异性的第一抗体的封闭缓冲液中孵育。在洗涤后,将膜与1:10,000稀释的辣根过氧化物酶(HRP)缀合的第二抗体(Jackson Immunoresearch Lab, West Grove, PA)一起孵育、洗涤,且然后与ECL试剂(Amersham Life Science, Pittsbrugh, PA)一起孵育,并且然后暴露于ECL薄膜。

[0117] 蛋白质S-亚硝基化和硝基酪氨酸形成的分析:如先前研究(Kim等人,2014)中所述,使用生物素转换方法伴随轻微修改检测到蛋白S-亚硝基化。将脾脏在250mM HEPES (pH 7.7)、1mM EDTA、0.1mM新铜试剂、1%Nonidet P-40、150mM NaCl、1mM PMSF、20 μ M甲烷硫代磺酸甲酯(MMTS)、80 μ M卡莫司汀、蛋白酶抑制剂混合物(Sigma)中均质化,并且与等体积的25mM HEPES (pH 7.7)、0.1mM EDTA、10 μ M新铜试剂、5% SOS、20 μ M MMTS混合,并在50 $^{\circ}$ C下孵育20分钟。在丙酮沉淀后,将沉淀物重悬于25mM HEPES (pH 7.7)、0.1mM EDTA、10 μ M新铜试剂、1% SOS中,并确与两体积的20mM HEPES (pH 7.7)、1mM EDTA、100mM NaCl、0.5% Triton X-100混合。然后用在25mM HEPES (pH 7.7)、0.1mM EDTA、1% SOS、10 μ M新铜试剂、10mM抗坏血酸钠盐和0.2mM N-[6-(生物素酰胺基)己基]-3'-(2'-吡啶基二硫代)丙酰胺(生物素-HPDP, Pierce)中的生物素修饰S-亚硝基化蛋白。在丙酮沉淀后,通过SOS-PAGE解析生物素化的蛋白质,并且使用对生物素具有特异性的抗体(Cell Signaling)通过蛋白质印迹分析将其可视化。

[0118] 统计分析:临床疾病评分为治疗过程内的平均最大得分(平均值 \pm SD),并且使用Kruskal-Wallis检验进行分析。使用Graph Pad Prism 3.0软件通过单向多重范围分析来分析增殖和细胞因子应答的统计数据。使用纽曼-科伊尔斯(Newman-Keul)检验确定组之间的显著性(p值)。p<0.05*或更高的值被认为是显著的。

[0119] 实施例5-EAE模型中的GSNO

[0120] 先前,据报告GSNO在活动性EAE的进行性和复发-缓解模型中具有预防性和治疗功效(Nath等人,2010)。在两种模型中,据告GSNO通过抑制STAT3/ROR γ t且由此抑制TH17特异性免疫应答来减轻EAE疾病,但不改变TH1(STAT4/T-bet)和TH2(STAT6/GATA3)特异性免疫应答。此外,在离体和体外T细胞培养研究中,GSNO处理特异性地抑制IL-6和TGF- β 诱导的由

IL-23诱导的TH17细胞的极化和扩增以及其效应功能(IL-17产生)(Nath等人,2010),从而表明GSNO介导的机制在调节TH17细胞的分化、扩增和效应子功能中的作用。

[0121] 在本研究中,通过使用EAE的鼠被动免疫模型,提供了进一步的证据支持GSNO在抑制TH17细胞分化和效应子功能中的作用。SJL小鼠中PLP139-151肽诱导的EAE模型是通过实验方式解决引起MS患者的缓解-复发自身免疫病理的机制的非常合适的工具。使用这种模型,研究了GSNO在与EAE疾病相关的T细胞的分化和效应子功能中的调控作用。用PLP139-151肽免疫SJL小鼠,并且从免疫当天开始每天用1.0mg/kg GSNO(下文称为“GSNO+EAE组”)或相同体积的PBS(下文称为“EAE组”)处理。在EAE疾病的高峰期(免疫后第10天),从两组(EAE和GSNO+EAE)中小鼠的引流淋巴结和脾脏中分离CD4⁺ T细胞。将分离的T细胞在存在或不存在PLP139-151肽的情况下离体培养,然后通过TH1(IFN- γ)和TH17(IL-17)细胞因子的培养基水平来分析T细胞(TH17对比TH1)的谱系特异性活化。图14A示出,从EAE组或GSNO+EAE组分离的T细胞响应于PLP139-151刺激而产生可比较水平的IFN- γ 。然而,与来自EAE组分离的T细胞的那些相比,从GSNO+EAE组分离的T细胞产生显著更低水平的IL-17。

[0122] 为了评价GSNO介导的机制在EAE免疫应答中的作用,用PLP139-151肽再刺激离体培养的T细胞,并且然后将其过继转移至初次接受实验的SJL小鼠作为被动免疫。通过平均临床得分的每日评价来评估EAE疾病的发展。图14B示出与来自EAE组的T细胞被动免疫的小鼠相比,来自GSNO+EAE组的T细胞被动免疫的小鼠表现出显著延迟且较轻的疾病。接下来,在被动免疫的EAE小鼠的脊髓中研究了IL-17对比IFN- γ 的TH17对比TH1谱系特异性表达。图14C示出来自EAE组和GSNO+EAE组的T细胞被动免疫的小鼠在脊髓中表达课比较水平的IFN- γ 。然而,与来自EAE组的T细胞被动免疫的小鼠相比,来自GSNO+EAE组的T细胞被动免疫的小鼠表达显著更低水平的IL-17(图14C)。这些数据以及来自主动免疫的EAE模型(21)的数据表明,GSNO经由调节TH17分化减轻EAE疾病,而不改变TH1谱系细胞功能(IFN- γ)。

[0123] 为了进一步评价在免疫期间GSNO在TH1对比TH17分化的谱系特异性抑制中的作用,对于在存在或不存在PLP139-151肽的情况下的谱系特异性扩增,从EAE或GSNO+EAE组小鼠分离的T细胞在TH1(IL-2、rhIL-12p35和抗IL-4)或TH17(IL-2、rhIL-12/23p40、抗IFN- γ 和抗IL-4)细胞因子条件下偏斜。图15A-i示出从EAE和GSNO+EAE组的小鼠分离的T细胞在TH1偏斜条件下产生可比较量的IFN- γ ,但不产生IL-17。在另一方面,从EAE组分离的T细胞在TH17倾斜条件下比从GSNO+EAE组分离的T细胞产生更高水平的IL-17,而在相同TH17偏斜条件下,来自两组的T细胞均不产生任何IFN- γ (图15B-i)。在TH1和TH17偏斜条件下,从EAE和GSNO+EAE组两者分离的T细胞产生类似增加水平的GM-CSF(一种非谱系特异性细胞因子)(图15A-i和B-i)。再次,这些数据表明GSNO对EAE疾病发展过程中TH17分化的谱系特异性抑制作用。令人感兴趣的是,在TH1和TH17偏斜条件下,从GSNO+EAE组分离的T细胞比从EAE组分离的T细胞产生显著更高量的IL-10(图15A-i和B-i)。因此,与来自未处理的EAE小鼠的T细胞相比,来自表达高水平的IL-10的GSNO处理的EAE小鼠的TH1和TH17偏斜的T细胞的过继转移产生显著更轻的EAE疾病(图15A-ii和15B-ii)。IL-10是一种抗炎性细胞因子并且其对减轻EAE疾病的潜力在T细胞中表达IL-10的转基因小鼠中显示(Bettelli等人,1998)。因此,本研究首次报告GSNO介导的机制在TH1和TH17偏斜条件下诱导IL-10表达中的作用以及其潜在参与EAE疾病的减轻。已知IL-10抑制由TH1和TH17细胞介导的免疫应答(Florentino

等人,1991;Huber等人,2011)。因此,在TH1和TH17偏斜条件下GSNO诱导的IL-10产生应抑制TH1和TH17细胞的效应子功能。然而,GSNO仅抑制TH17途径而不影响TH1途径(图15A-i和B-i),并且目前尚不充分了解GSNO介导的TH17的选择性抑制的潜在机制。

[0124] 先前(Niedbala等人,2007)已经描述了经由诱导调控性T(Treg)细胞的特定谱系的NO诱导的IL-10产生。这些细胞表达Treg(例如CD4和CD25)而非FOXP3的细胞表面标记物,并且因此区别于中性和诱导型Treg(nTreg和iTreg;CD4+/CD25+/FOXP3+)。此外,这些细胞在其诱导中是IL-10非依赖性的,并且因此区别于TH1(CD4+/CD25+/FOXP3-)(22)。这些NO诱导型CD4+/CD25+/FOXP3-细胞(造词为“NO-Treg”)通过在活动性EAE小鼠模型中产生抗炎性IL-10而具有强效免疫调节作用(22)。根据此报告,GSNO介导的机制可有助于经由诱导NO-Treg来抑制TH17免疫应答和EAE疾病(Niedbala等人,2007)。然而,在TH1和TH17偏斜条件下,观察到的来自GSNO处理的EAE小鼠的T细胞诱导高水平的IL-10(图15A-i和B-i)也表明TH1/TH17细胞产生的IL-10在EAE的免疫调节中的作用。GSNO以其在各种疾病病状中的抗炎活性而闻名(关于综述,参见Corti等人,2014)。在EAE条件下,据报告GSNO经由抑制促炎性粘附分子(例如ICAM和VCAM)的内皮表达来抑制周围免疫细胞的CNS浸润(Prasad等人,2007)。在分子水平下,已知GSNO经由S-亚硝基化机制抑制一系列转录因子(例如NF- κ B、AP-1、GREB和STAT3)的活性(Corti等人,2014;Prasad等人,2007;Won等人,2013)。值得注意的是,这些转录因子中的一些在IL-23介导的TH17效应子功能(例如STAT3)(Cho等人,2008)以及IL-17介导的炎症反应(例如NF κ B和AP-1)(Song等人,2013)中也起关键作用。因此,GSNO不仅可经由调控T细胞分化、而且经由调控极化的T细胞的效应子功能且因此调控神经炎症来发挥其对EAE疾病的功效。为了进一步研究GSNO对EAE疾病中TH17细胞效应子功能的功效,通过从EAE或GSNO+EAE组分离的T细胞的过继转移被动免疫S/JL初次接受实验的小鼠,并且进一步在疾病过程期间每天接受GSNO处理(图16A)。图16B示出用从GSNO处理的EAE小鼠分离的T细胞、但在疾病期间未接受GSNO的被动免疫小鼠表现出较轻的疾病(实心三角形),并且在疾病期间用GSNO处理这些小鼠时疾病严重程度进一步降低(十字标记)。在另一方面,用来自未处理的EAE小鼠的T细胞被动免疫的小鼠表现出最严重的EAE疾病(实心菱形),并且在疾病期间对这些小鼠的GSNO处理也减轻EAE疾病(空白正方形)。这些观察结果表明,GSNO介导的T细胞分化以及T细胞效应子功能的调节参与EAE疾病的减轻。然而,GSNO诱导EAE疾病中IL-10的机制(图15A和15B)目前尚未充分了解。

[0125] 本研究证明GSNO在EAE疾病的发展过程中选择性地调节TH17细胞分化,但不改变T细胞的其他谱系(例如TH1和TH2)的诱导。除了记录GSNO在抑制TH17扩增和效应子功能中的作用的先前细胞培养研究(Nath等人,2010)之外,此研究还提供GSNO通过抑制T细胞的效应子功能(例如T细胞产生IL-17和IL-10)来减轻EAE疾病的体内证据。此研究首次报告GSNO介导的机制在TH1和TH17偏斜条件下诱导IL-10表达中的作用以及其潜在参与EAE疾病的减轻。总体而言,这些研究记录GSNO用于治疗由TH17细胞介导的自身免疫性疾病(如MS和类风湿性关节炎)的预防和治疗潜力。

[0126] 实施例6-材料和方法

[0127] 小鼠:将购自Jackson Laboratory(股票#000686;Bar Harbor,ME)的7只雌性S/JL和C57BU6小鼠圈养在南卡罗来纳医科大学的动物护理设施中,并且随意接受标准实验室食物和水。向麻痹的小鼠提供Transgel(Charles River Laboratories,Wilmington,MA)作为

替代食物/水源。所有动物方案均根据南卡罗来纳医科大学和国立卫生研究院的动物实验指南。

[0128] EAE疾病的诱导:在8至10周龄的雌性SJL小鼠中通过用蛋白脂质蛋白肽(PLP139-151;Peptide International,Louisville,KY)的乳液(100 μ l,皮下)和200 μ g杀死的结核分枝杆菌H37Ra(Difco,Detroit,M1,USA)免疫、然后如前所述(Nath等人,2010)在第7天加强来诱导EAE疾病。在免疫后第0天和第3天,小鼠另外接受百日咳毒素(Sigma-Aldrich,St.Louis,MO;200ng/300 μ l PBS,静脉内)。在免疫当天,一组小鼠接受100 μ l磷酸盐缓冲盐水(PBS),并且第二组小鼠经由口服途径每天接受GSNO(1.0mg/kg,100 μ l/PBS)。GSNO购自World Precision Instruments(Sarasota,FL),并且其浓度用分光光度法在334nm处调节。每天由对实验处理不知情的研究人员以如下的0-5量表每天观察个体动物的临床疾病严重程度:0=无异常;1=立毛,迟滞,2=尾部瘫软;2.5=后肢无力(双腿滑过笼顶);3=后肢麻痹;4=后肢和前肢麻痹;以及5=垂死。

[0129] PLP139-151免疫的T细胞的离体培养和CD4⁺ T细胞谱系的表征:在EAE疾病高峰期,将小鼠处死并且通过CD4⁺ T细胞分离试剂盒(Miltenyi,Auburn,CA)从引流淋巴结(DLN)和脾脏中纯化CD4⁺ T细胞。将纯化的T细胞(2.5x 10⁶个细胞/ml)在96孔圆底微培养板(Falcon Labware,Oxnard,CA)中在含有RPMI 1640(Life Technologies,Gaithersburg,MD)、10%FBS和100 μ g/ml链霉素和青霉素(Atlanta Biologicals Norcross,GA)、1mM谷氨酰胺、1mM非必需氨基酸和50 μ M 2-巯基乙醇(Sigma-Aldrich)的RPMI完全培养基中培养。为了使不同的CD4⁺ T细胞亚群倾斜及其扩增,将分离的CD4⁺ T细胞对于TH0用PLP139-151(5 μ g/ml)和IL-2(10ng/ml)、对于TH1用IL-2(10ng/ml)、rhIL-12p35(10ng/ml)和抗IL-4(1 μ g/ml)或对于TH17用重组小鼠IL-12/23p40同二聚体(10ng/ml)、抗IFN- γ 1(μ g/ml)、抗IL-4(1 μ g/ml)刺激。所有细胞因子和抗体均购自BD Biosciences(San Diego,CA)。在刺激后,收获细胞用于过继转移EAE疾病,并且收集培养上清液以通过ELISA(Biolegend目录#430802、432505和431411;San Diego,CA)分析IFN- γ 、IL-17和IL-10表达。

[0130] EAE培养的T细胞的过继转移模型 经由腹膜内途径将(每只小鼠300 μ l RPMI培养基中的20-30x 10⁶个T细胞)注射至初次接受实验的SJL雌性小鼠(8-10周龄)。在免疫后第0天和第2天,还向接受者小鼠给予两个剂量的百日咳毒素(200ng/300 μ l的PBS/腹膜内)。如上所述测量临床EAE疾病。

[0131] 统计分析 临床疾病得分被呈现为处理期内的平均最大得分(平均值+SD),并且使用非参数Kruskal-Wallis检验进行分析。统计显著性设定为0.05。用单向多重范围方差分析(ANOVA)对增殖和细胞因子应答的统计数据进行分析。所有分析均使用Graph Pad Prism 3.0软件进行。使用纽曼-科伊尔斯检验确定组之间的显著性(p-值)。p<0.05*和更高的值被认为是显著的。

[0132] 实施例7-通过氧化还原依赖性一氧化氮信号传导调控内皮屏障完整性

[0133] 凝血酶诱导的培养的hBMVEC中的内皮F-肌动蛋白应力纤维形成和屏障破坏的细胞信号传导。导致MLC磷酸化的RhoA/ROCK活化和[Ca²⁺]_i流入是内皮细胞中凝血酶诱导的F-肌动蛋白应力纤维形成和肌动球蛋白收缩的关键事件(van Nieuw Amerongen等人,2000)。图17A示出在hBMVEC中通过凝血酶处理对RhoA的时间和浓度依赖性活化,其中0.1单位的凝血酶在处理5分钟后增加RhoA的最大活性。图17B示出[Ca²⁺]_i流入的时间流逝(i)和累积值

(ii), 其中在hBMVEC中凝血酶以浓度依赖性方式增加 $[Ca^{2+}]_i$ 流入。连同诱导 $[Ca^{2+}]_i$ 流入和RhoA活化, 凝血酶还以时间和浓度依赖性方式诱导磷酸化-MLC (Ser¹⁹) 的细胞水平(图17C)。因此, 凝血酶处理诱导形成稳健的长F-肌动蛋白丝(鬼笔环肽染色), 其含有更高量的磷酸化-MLC, 所谓的应力纤维(图17D-i) 和降低的跨内皮电阻 (TEER), 从而表明内皮屏障破坏(图17D-ii)。

[0134] 凝血酶活化的eNOS引起hBMVEC中蛋白质硝化(3-硝基酪氨酸)增加, 但不引起蛋白质相关的S-亚硝基硫醇增加。已知凝血酶活化人脐静脉内皮细胞中的eNOS活性(Thors等人, 2004)。因此, 对hBMVEC的凝血酶处理也经由增加Ser¹¹⁷⁷处的磷酸化而引起eNOS活化(图18A)。NO是短寿命的分子, 并且其更长的作用可通过形成次级氧化还原代谢产物(如GSNO和ONOO⁻)以及随后修饰蛋白质硫醇(S-亚硝基化)或酪氨酸(酪氨酸硝化)来实现(Gaston等人, 2003; Pacher等人, 2007)。图17示出0.1单位的凝血酶对于活化用于内皮屏障破坏的细胞信号传导有效。然而, 相同浓度的凝血酶处理对蛋白质相关的S-亚硝基硫醇(Pr-SNO)的细胞水平没有影响(其与GSNO的细胞水平处于动态平衡)(Broniowska等人, 2013), 而较高浓度的凝血酶(0.5单位)略微降低Pr-SNO的细胞水平(图18B)。在另一方面, 凝血酶处理导致通过ONOO⁻对蛋白质酪氨酸残基的硝化形成的蛋白质相关的3-硝基酪氨酸(图18C)的细胞水平升高。因此, 这些数据表明, 凝血酶诱导eNOS活化以用于从头合成ONOO⁻而不是GSNO。

[0135] 凝血酶诱导的ONOO⁻产生的eNOS活化参与hBMVEC中的内皮屏障破坏。接下来, 研究了凝血酶诱导的eNOS活化和ONOO⁻产生在MLC磷酸化的细胞信号传导途径中的作用。图19A示出通过NOS抑制剂L-NIO (10 μ M) 抑制凝血酶诱导的eNOS活化抑制了凝血酶诱导的MLC磷酸化的诱导。此外, L-NIO处理也减弱了凝血酶诱导的3-硝基酪氨酸的产生(图19B)。接下来, 评估了通过用ONOO⁻清除剂FeTPPS (10 μ M) 处理细胞, ONOO⁻在凝血酶诱导的MLC磷酸化中的作用。如图19B和19C中所示, FeTPPS处理抑制凝血酶诱导的3-硝基酪氨酸水平(ONOO⁻)和MLC磷酸化的增加, 从而表明eNOS介导的ONOO⁻产生在凝血酶诱导的MLC磷酸化中的作用。接下来, 检查了L-NIO和FeTPPS对凝血酶诱导的RhoA活化和 $[Ca^{2+}]_i$ 流入的影响。图19D示出用L-NIO或FeTPPS处理hBMVEC降低凝血酶诱导的RhoA活化。然而, L-NIO和FeTPPs处理对凝血酶诱导的细胞内 Ca^{2+} 流入没有影响, 其是用于活化eNOS的关键步骤(Fleming和Busse, 1999)。这些数据表明, 凝血酶诱导的 Ca^{2+} 流入是eNOS活化和ONOO⁻合成、RhoA活化和随后MLC磷酸化的上游事件。

[0136] GSNO对比ONOO⁻在凝血酶诱导的hBMVEC中的内皮屏障破坏的细胞信号传导中的相反作用。接下来, 评估了GSNO对比ONOO⁻处理对内皮屏障破坏的凝血酶诱导的细胞信号转导的作用。图20A示出GSNO处理hBMVEC增加了蛋白质相关的S-亚硝基硫醇的细胞水平, 而SIN-1 (ONOO⁻的供体) 处理增加了蛋白质相关的3-硝基酪氨酸的细胞水平。此外, GSNO还增加了RhoA S-亚硝基化, 而SIN-1增加了RhoA酪氨酸硝化。据报告RhoA活性以相反的方式受到S-亚硝基化(抑制)和3-硝基酪氨酸(增加)的调控(Chen等人, 2017; Di Lorenzo等人, 2013; Rafikov等人, 2014)。因此, GSNO处理抑制凝血酶诱导的RhoA活化(图20B-i), 而SIN-1处理增强凝血酶诱导的RhoA活化(图20B-ii)。令人感兴趣的是, 凝血酶诱导的hBMVEC中的 $[Ca^{2+}]_i$ 流入也受GSNO处理抑制, 而它通过SIN-1处理增强(图20C)。因此, 凝血酶诱导的MLC磷酸化通过GSNO处理减弱, 但通过SIN-1处理增强(图20D)。

[0137] 接下来, 研究了GSNO对比SIN-1 (ONOO⁻) 对凝血酶诱导的F-肌动蛋白应力纤维形成

和内皮屏障破坏的影响。图21A和21B描述GSNO处理抑制凝血酶诱导的F-肌动蛋白应力纤维形成(鬼笔环肽染色和MLC-磷酸化)的发展以及凝血酶诱导的TEER的丧失(图21C)。在另一方面,SIN-1(ONOO^-)处理增强凝血酶诱导的F-肌动蛋白应力纤维形成的发展和TEER的丧失。综上所述,这些数据证明在相反的信号传导机制中,不同的氧化还原依赖性NO代谢产物(GSNO对比 ONOO^-)对内皮屏障的调控。

[0138] 在TBI模型中GSNO对比 ONOO^- 在调控内皮屏障功能中的作用。TBI通常涉及产生各种形式的出血的血管损伤(Chodobski等人,2011)。凝血酶控制TBI部位的血液丧失(Xi等人,2003),但它也诱导血管炎症和内皮屏障破坏,从而导致BBB渗漏、水肿形成以及神经元和组织损伤(Popovic等人,2012)。基于观察到的GSNO对比 ONOO^- 在凝血酶诱导的内皮屏障破坏中的相反作用,研究了在TBI大鼠模型中GSNO对比 ONOO^- 在调控导致水肿的血管病理学中的作用。

[0139] TBI由成年雄性大鼠的受控皮质撞击诱导。在撞击后立即施用GSNO(0.05mg/kg/静脉内/天)或FeTPPS(ONOO^- 清除剂;3mg/kg/静脉内/天)。第二天,通过伊文思蓝外渗和脑含水量评估BBB渗漏和水肿程度。图22A和22B示出,TBI诱导的伊文思蓝外渗和脑含水量的增加在GSNO以及FeTPPS处理的情况下降低,从而表明不同的氧化还原依赖性NO代谢物(GSNO对比 ONOO^-)在创伤后BBB渗漏和水肿形成中的相反作用。值得注意的是,除FeTTP处理外,GSNO处理还降低在TBI情况下大鼠脑中3-硝基酪氨酸的脑水平(图22C),从而表明GSNO介导的机制还保护TBI条件下的脑血管亚硝化应激。

[0140] 在EAE模型中GSNO对比 ONOO^- 在调控内皮屏障功能中的作用:MS由髓磷脂特异性自身反应性淋巴细胞的外周活化以及它们的CNS浸润穿过BBB诱导,从而导致致脑炎的炎症疾病(Compston和Coles,2002)。越来越多的证据表明凝血酶活化参与MS的发病过程(Brass,2003;Langer等人,2012;Shapiro,1991)。此外,BBB破坏被认为是MS和EAE中凝血酶活化的关键结果之一(Davalos等人,2014;Stolz等人,2017)。为了研究GSNO对比 ONOO^- 在内皮屏障破坏中的作用,在发病时用每日剂量的GSNO(1mg/kg/腹腔内/天)或FeTPPS(30mg/kg/腹腔内/天)处理EAE小鼠,临床得分在1与2之间(免疫后第13天)(图23A)。与先前的研究类似(Nath等人,2010),GSNO处理提供针对EAE的临床疾病的巨大功效(图23A-i和-ii)。FeTPPS处理也提供显著功效,但程度低于GSNO处理(图23A-i和-ii)。

[0141] 接下来,对 ONOO^- 的组织水平(图23B中的蛋白质硝基酪氨酸水平)、BBB渗漏(图23C中的伊文思蓝外渗测定)、外周单核细胞浸润(图23D-i和ii中的H&E染色)以及脊髓脱髓鞘(图23E-i中的髓磷脂碱性蛋白/MBP染色以及图23E-ii和iii中的蛋白质印迹分析)的程度进行了分析。与对临床疾病的影响一致,GSNO和FeTPPS处理还显著降低EAE诱导的脊髓中的硝基酪氨酸水平,以及伊文思蓝染料和外周单核细胞外渗至CNS中。因此,两种处理还保护脊髓中的髓磷脂免受EAE疾病。

[0142] 总之,使用TBI和EAE的动物模型进行的体外细胞培养研究和体内研究证明,eNOS的氧化还原依赖性代谢产物产生的NO(GSNO对比 ONOO^-)在内皮屏障完整性的细胞信号传导途径(例如RhoA/ROCK,细胞内 Ca^{2+} 流入和MLC磷酸化)且因此在创伤性和炎症神经系统疾病病状下的BBB破坏中起关键作用。

[0143] BBB破坏(许多神经系统疾病病状的特征之一)(Neuwelt等人,2011)导致脑水肿以及血源性细胞和物质大量流入脑实质,从而加剧神经炎症和脑损伤(Nishikawa和Suzuki,

2017)。虽然目前对BBB破坏的潜在确切机制知之甚少,但(1) Ca^{2+} 流入和RhoA/ROCK介导的MLC磷酸化对F-肌动蛋白应力纤维形成的诱导,(2)以及随后内皮细胞收缩和紧密连接复合物的分解,(3)和基质金属蛋白酶(MMP)进一步破坏弱化的内皮屏障已被认为是关键顺序过程(Shi等人,2016)。最近的研究报告,早期BBB渗透性可能是部分可逆的(Kaur等人,2009; Neumann-Haefelin等人,2000;Olah等人,2000),从而使BBB渗透性的早期事件(例如F-肌动蛋白应力纤维形成和连接蛋白重新分布)成为治疗干预的合理靶标(Kaur等人,2009)。在此,据报告,BBB渗透性的早期事件、尤其是内皮F-肌动蛋白应力纤维形成以相反的方式受到eNOS来源的NO代谢产物(ONOO^- 和GSNO)的调控,从而突出氧化还原依赖性NO代谢对于BBB保护的潜在治疗重要性。这些结论通过体外机制研究以及使用TBI和MS动物模型的研究得到支持。

[0144] 在此研究中,凝血酶处理的hBMVEC被用作BBB破坏中的早期事件的体外疾病模型。凝血酶在血液凝固中起着至关重要的作用,并且还已知其诱导参与BBB破坏以及随后水肿形成和神经炎症的非止血细胞信号传导(Bogatcheva等人,2002;Xi等人,2003)。最近,凝血酶一直牵涉于各种神经系统疾病病状中,如TBI、MS、阿尔茨海默病、帕金森病和中风(Cannon等人,2007;Chen等人,2010;Chodobski等人,2011;Davalos等人,2014;Grammas和Martinez,2014)。凝血酶经由活化 PAR_1 和随后诱导细胞内 Ca^{2+} 流入以及活化RhoA/ROCK来诱导非止血细胞信号传导途径(van Nieuw Amerongen等人,2000)。结果,活化的MLC激酶和失活的MLC磷酸酶增加MLC的磷酸化并且诱导肌球蛋白应力纤维的形成(van Nieuw Amerongen等人,2000)并且因此诱导内皮细胞形状、粘附和细胞间渗透性的改变(Bogatcheva等人,2002)。因此,观察到在hBMVEC培养物中凝血酶诱导的RhoA活性、细胞内 Ca^{2+} 流入和MLC磷酸化以及因此内皮F-肌动蛋白应力纤维形成和内皮屏障的丧失(图17)。凝血酶处理还诱导eNOS活性,并且导致 ONOO^- 的从头合成增加,如通过蛋白质相关的3-硝基酪氨酸的细胞水平升高所观察到(图18A和18B)。还报告了凝血酶通过活化NADPH氧化酶诱导 O_2^- 产生(Holland等人,1998)。因此,这些观察结果表明,凝血酶诱导的NADPH氧化酶的活化用于 O_2^- 合成使由eNOS产生的NO的代谢朝向 ONOO^- 合成转换。在另一方面,凝血酶处理对GSNO的细胞合成没有影响,如通过蛋白质相关的S-亚硝基硫醇的细胞水平不变/降低所观察到(图18C)。这些数据表明,凝血酶活性通过在hBMVEC中诱导 ONOO^- 合成而阻碍GSNO从头合成。

[0145] 先前的研究报告,RhoA^{Tyr34}的酪氨酸硝化增强RhoA活性并且加速内皮屏障破坏(Rafikov等人,2014)。在另一方面,据报告RhoA(Cys16、20和159)的S-亚硝基化抑制其在内皮细胞中的活性(Chen等人,2017)。因此,使用hBMVEC,观察到外源性GSNO处理增加RhoA的S-亚硝基化并且抑制其凝血酶诱导的活化(图20A和20B)。此外,用SIN-1(ONOO^- 供体)处理hBMVEC增加RhoA的酪氨酸硝化,并且增强其凝血酶诱导的活化(图20A和20B)。凝血酶诱导的细胞内 Ca^{2+} 流入不受L-NIO的eNOS抑制或FeTTPS的 ONOO^- 清除的影响(图19E)。然而,凝血酶诱导的细胞内 Ca^{2+} 流入通过SIN-1(ONOO^- 供体)预处理得到增强,而通过GSNO预处理得到抑制(图20C)。目前,对于细胞内 Ca^{2+} 流入的 ONOO^- 或GSNO依赖性调控的潜在机制知之甚少,但是在另一项研究中使用平滑肌细胞进行了类似的观察(Pan等人,2004)。在平滑肌细胞中,据报告 ONOO^- 经由作用于L型电压门控钙通道而诱导细胞内 Ca^{2+} 流入(Pan等人,2004),而据报告GSNO经由抑制肌醇-1,4,5-三磷酸(IP_3)来抑制细胞内 Ca^{2+} 流入(Nalli等人,2014)。除了RhoA活性和细胞内 Ca^{2+} 流入外,凝血酶诱导的MLC磷酸化(图20D)和内皮F-肌动

蛋白应力纤维形成和屏障破坏(图21)也通过SIN-1处理增加,而被GSNO处理抑制。这些数据描述了在病理条件下,对于脑内皮屏障破坏,凝血酶介导的非止血细胞信号传导途径中氧化还原介导的NO代谢平衡(ONOO⁻对比GSNO)的重要性。

[0146] 脑水肿、尤其是由BBB破坏引起的血管性水肿是在疾病急性期期间管理TBI的临床医生面临的重大挑战。如果水肿达到临界点,则不治疗将导致严重的发病或死亡。当前,用于管理创伤后水肿形成的疗法包括渗透疗法、利尿剂、皮质类固醇、巴比妥类药物、丙泊酚和/或换气过度。然而,血管源性脑水肿的潜在内皮机制仍然难以捉摸,并且因此目前尚无基于特定机制的疗法。我们的实验室报告了在大鼠模型中,在中风和TBI急性疾病期间GSNO处理减轻脑内皮屏障破坏、异常BBB通透性、水肿形成和血管炎症的功效(Khan等人,2012;Khan等人,2009)。后来,还据报告,GSNO处理减轻神经变性并加速新血管形成和神经修复,并且因此改善TBI动物的功能结局(Khan等人,2016a;Khan等人,2016b;Khan等人,2011)。这项研究证明了氧化还原依赖性NO代谢产物(ONOO⁻对比GSNO)在调控RhoA活化和细胞内Ca²⁺流入且因此调控导致hBMVEC中的内皮应力纤维形成和屏障破坏的MLC磷酸化中的相反作用。因此,观察到用GSNO或ONOO⁻清除剂(FeTPP)处理TBI动物(其使NO代谢产物(GSNO对比ONOO⁻)的内皮平衡转向GSNO)改善了TBI诱导的BBB渗漏和水肿形成(图22)。

[0147] 在MS中,髓磷脂特异性自身反应性淋巴细胞跨过破坏的BBB的CNS浸润是导致炎症性脱髓鞘的关键病理事件(Compston和Coles,2002)。脑成像研究表明,患有复发-缓解型MS(RRMS)(最常见类型的MS)(>80%)的患者的BBB通透性通常升高(Cramer等人,2014;Stone等人,1995)。值得注意的是,MS患者和EAE动物也具有增加的凝血酶活性(Brass,2003;Langer等人,2012;Shapiro,1991),其在疾病过程中参与BBB破坏(Davalos等人,2014;Stolz等人,2017)。在这项研究中,观察到用GSNO或ONOO⁻清除剂(FeTPP)处理EAE动物改善EAE诱导的BBB渗漏和单核细胞的CNS浸润(图23),从而记录GSNO对比ONOO⁻在EAE疾病过程期间在BBB通透性中的作用。

[0148] 总之,本研究证明了在创伤性和炎症性神经系统疾病病状下,基于氧化还原的NO代谢产物(ONOO⁻对比GSNO)在导致血管性水肿形成和外周免疫细胞浸润的内皮屏障破坏中的作用。ONOO⁻经由增强针对MLC磷酸化和内皮应力纤维形成的细胞信号传导(例如RhoA活化和细胞内Ca²⁺流入)而加速内皮屏障破坏,而GSNO经由抑制这些细胞信号传导机制而抑制内皮屏障破坏。这项研究证明,ONOO⁻和GSNO水平在内皮屏障破坏方面在机制上相互拮抗。凝血酶经由诱导ONOO⁻合成的eNOS活性来诱导内皮屏障破坏。因此,调节氧化还原依赖性内皮NO代谢(减少ONOO⁻合成且增加GSNO合成)对于在创伤性和炎症性脑损伤的脑病理学中保护内皮屏障至关重要。凝血酶介导的内皮屏障破坏也一直牵涉于多种神经系统病症中,如阿尔茨海默病、帕金森病和中风(Cannon等人,2007;Chen等人,2010;Grammas和Martinez,2014)。因此,氧化还原依赖性NO代谢(ONOO⁻对比GSNO)的调控也与其他神经系统病症的治疗靶标有关。

[0149] 本研究表明,凝血酶诱导的NO合成和ONOO⁻合成的内皮eNOS活化增强凝血酶诱导的细胞内Ca²⁺流入、RhoA活化,并且因此增强与内皮屏障破坏相关的内皮应力纤维形成的MLC磷酸化。在另一方面,外源性GSNO抑制凝血酶诱导的MLC磷酸化和内皮应力纤维形成且因此屏障破坏的细胞信号传导。这些观察结果强调了氧化还原依赖性NO代谢(ONOO⁻对比GSNO)在内皮屏障完整性的细胞信号传导中的重要性。因此,这项研究还表明,TBI和EAE动

物模型中的BBB破坏通过ONOO⁻清除剂(FeTPPS)或GSNO处理得到抑制,并且因此将氧化还原依赖性NO代谢物(ONOO⁻对比GSNO)鉴定为神经系统病症中神经血管完整性的潜在治疗靶标。

[0150] 实施例8-材料和方法

[0151] 试剂:凝血酶购自Sigma-Aldrich(目录#:T4393,St.Louis,MO)。L-NIO[N⁵-(1-亚氨基乙基)-L-鸟氨酸二盐酸盐]和SIN-1(3--吗啉代斯德酮亚胺氯化物)购自Tocris(目录#:分别0546和0756,Minneapolis,MN)。FeTPPS[5,10,15,20-四(4-磺酰基苯基)卟啉合铁(III),Cl]购自Millipore-Calbiochem(目录#:341492,Billerica,MA)。S-亚硝基谷胱甘肽(GSNO)购自World precision instruments(目录#:GSNO-100,Sarasota,FL)。GSNO的有效浓度由338nm处的吸光度和报告的摩尔消光系数计算,如先前所述(Gordge等人,1998)。

[0152] 细胞培养:原代人脑微血管内皮细胞(hBMVEC)购自Angio-Proteomie目录#:cAP-0002,Atlanta,GA)。将细胞在预先涂有快速涂覆溶液(Angio-Proteomie;目录#:cAP-01)的细胞培养瓶或板中培养,并在37°C在5%CO₂/95%空气下维持在内皮生长培养基(Angio-Proteomie;目录#:cAP-02)中。当细胞几乎汇合时,在实验之前约8-12小时,用含有0.5%胎牛血清(FBS;Life Technologies,Grand Island,NY)的内皮基础培养基(Angio-Proteomie;目录#:cAP-03)更换培养基。这项研究不需要机构批准。所述研究尚未预先登记。

[0153] 跨内皮电阻(TEER)的测定:为了评价内皮屏障功能,将hBMVEC接种在含有内皮生长培养基(Angio-Proteomie目录#:cAP-02)的纤连蛋白包被的聚碳酸酯过滤器(Transwell system,Corning,Midland,NC)上。每隔一天更新培养基。在接种后五天,用含有0.5%FBS的内皮基础培养基(Angio-Proteomie目录#:cAP-03)更换培养基并孵育2天。在药物处理后,如前所述通过EVOM2(Word Precision Instruments)测量跨内皮电阻(TEER)(Li等人,2006)。

[0154] RhoA活性测定:通过RhoA活化测定试剂盒(Abcam目录#:ab211164,Cambridge,MA)分析hBMVEC中的RhoA活性。简言之,在药物处理后,用试剂盒中提供的1X测定缓冲液溶解细胞。将溶解产物离心(14,000x g持续10秒),并且将上清液与偶联至GST-Rhotekin-Rho结合结构域(RBD)的琼脂糖珠一起在4°C孵育2小时。然后用1X测定缓冲液洗涤珠粒,并且用2X SDS-PAGE样品缓冲液洗脱GTP结合的RhoA。使用对RhoA具有特异性的抗体(Abcam)通过蛋白质印迹分析确定活性(GTP结合的)RhoA的量。

[0155] F-肌动蛋白应力纤维发育和内皮细胞收缩的测定:将hBMVEC在纤连蛋白包被的腔式载玻片(BD Bioscience)上进行培养。在药物处理后,将细胞用4%(wt/vol)多聚甲醛固定,通过添加0.25%Triton X-100透化,并且通过磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的2%牛血清白蛋白(BSA)封闭。将载玻片针对磷酸化-MLC(Ser¹⁹)进行免疫染色,并且针对F-肌动蛋白用鬼笔环肽染色(F-actin Visualization Biochem kit,Cytoskeleton,Inc,目录#:BK005,Denver,CO)且针对细胞核用DAPI染色(4',6-二脒基-2-苯基吡啶;ThermoFisher Scientific,Houston,TX)。通过配备有DP-70数码相机(Olympus,Tokyo,Japan)的BX60 Olympus荧光/光学显微镜对细胞成像。通过ImageJ(NIH,Bethesda,MD)分析荧光的密度。

[0156] 细胞内Ca²⁺流入的测定:用Fluo-4直接钙测定试剂盒(Thermo Fisher Scientific,目录#:F10471,Grand Island,NY)测量细胞内Ca²⁺浓度([Ca²⁺]_i)。简言之,将96

孔板中的培养基用内皮基础培养基中的Ca²⁺敏感性染料Fluo-4更换。在30分钟孵育后,除去染料,并且将细胞与原始培养基一起在37°C下在有或没有药物的情况下孵育15分钟。在凝血酶处理后,使用CLARIOstar多孔荧光计(BMG Labtech, Cary, NC)定量荧光强度的时程变化。

[0157] 蛋白质印迹分析:使用50μg细胞溶解产物,通过标准方法进行蛋白质免疫印迹分析。在SDS-PAGE电泳后,将蛋白质从凝胶转移至聚偏二氟乙烯膜(GE Healthcare Life Sciences, Marlborough, MA)上。用脱脂乳粉(Santa Cruz Biotechnology)或I-Block™(ThermoFisher Scientific, Waltham, MA)封闭膜以检测磷酸化-蛋白,并且与第一抗体如MBP(Santa Cruz Biotech目录#:sc13914;RRID:AB_648798)、磷酸化-(Ser¹⁹)MLC(Abcam, 目录#:ab2480;RRID:AB_303094)、MLC(Abcam, 目录#:ab79935;RRID:AB_1952220)、β-肌动蛋白(Santa Cruz Biotechnology, 目录#:sc-47778;RRID:AB_2714189)、磷酸化-eNOS(Ser¹¹⁷⁷)(Cell Signaling, 目录#:9571;RRID:AB_329837, Danvers, MA)、eNOS(Cell Signaling, 目录#:32027)、RhoA(Santa Cruz Biotechnology; 目录#:sc418;RRID:AB_628218)或3-硝基酪氨酸(Abcam, 目录#:ab61392;RRID:AB_942087)一起孵育。在洗涤后,将膜与辣根过氧化物酶缀合的第二抗体(Jackson ImmunoResearch Lab, West Grove, PA)一起孵育、洗涤,且然后与ECL试剂(Amersham Life Science, Pittsbrugh, PA)一起孵育,并且暴露于Amersham HyperfilmECL薄膜。

[0158] 用于蛋白质相关的硝基酪氨酸的测定:通过ELISA试剂盒(Abcam, 目录#:ab116691)分析蛋白质相关的3-硝基酪氨酸的细胞水平,并且使用对3-硝基酪氨酸具有特异性的抗体(Abcam, 目录#:ab61392)进行蛋白质印迹分析。对于ELISA,将hBMVEC溶解于与试剂盒一起提供的提取缓冲液中,然后在16,000x g 4°C下离心。用Bio-Rad DC蛋白质测定试剂盒(Bio-Rad, Hercules, CA)对细胞溶解产物上清液进行蛋白质定量,并且将等量的蛋白质(500μg)负载至涂有3-硝基酪氨酸捕获抗体的96孔微板上,且然后与生物素缀合的3-硝基酪氨酸检测抗体一起孵育。在洗涤后,将板与HRP缀合的链霉亲和素一起孵育,并且通过与3,3',5,5'-四甲基联苯胺溶液一起孵育并使用SpectraMax 190 Microplate Reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)在600nm处进行比色分析来测量3-硝基酪氨酸的水平。为了分析RhoA酪氨酸硝化的程度,将细胞溶解产物用对3-硝基酪氨酸具有特异性的抗体(Abcam)进行免疫沉淀,并且通过蛋白质印迹分析针对RhoA对酪氨酸硝化的RhoA的水平进行分析。

[0159] 用于蛋白质相关的S-亚硝基化的测定:如先前的报告中所述(Kim等人,2014; Prasad等人,2007),通过使用生物素转换方法分析蛋白质S-亚硝基化。将hBMVEC溶解于250mM HEPES(pH 7.7)、1mM EDTA、0.1mM新铜试剂、1%Nonidet P-40、150mM NaCl、1mM苯基甲磺酰氟、20mM甲烷硫代磺酸甲酯(MMTS)、80μM卡莫司汀、蛋白酶抑制剂混合物(Sigma-Aldrich)中,并且与等体积的25mM HEPES(pH 7.7)、0.1mM EDTA、10μM新铜试剂、5%SDS、20mM MMTS混合,并在50°C下孵育20分钟。在丙酮沉淀后,将沉淀物重悬于25mM HEPES(pH 7.7)、0.1mM EDTA、10μM新铜试剂、1%SDS中,并且与两体积的20mM HEPES(pH 7.7)、1mM EDTA、100mM NaCl、0.5%Triton X-100混合。然后用在25mM HEPES(pH 7.7)、0.1mM EDTA、1%SDS、10μM新铜试剂、10mM抗坏血酸钠盐和0.2mM N-[6-(生物素酰胺基)己基]-30-(20-吡啶基二硫代)丙酰胺(生物素-HPDP, Pierce)中的生物素修饰S-亚硝基化蛋白。在丙酮沉

淀后,通过蛋白质印迹分析对生物素化的(S-亚硝基化)蛋白进行分析。为了检测S-亚硝基化的RhoA,将生物素化的蛋白质与中性抗生物素蛋白-琼脂糖一起下拉,且然后进行RhoA的蛋白质印迹分析。

[0160] 局灶性TBI的受控皮质撞击(CCI)大鼠模型:这项研究中使用的所有动物都接受了符合南卡罗来纳医科大学(MUSC)指导和国家研究委员会的人性化护理标准的人性化护理。动物程序由MUSC的机构动物护理和使用委员会批准(AR#2703)。为了生成TBI的CCI模型,将称重260-300g之间的幼龄成年雄性(约3-4个月大)的Sprague Dawley大鼠随机分为四组:1)用媒介物处理的TBI动物(TBI;n=13),2)使用GSNO(0.05mg/kg体重/静脉内)处理(TBI+GSNO;n=13)的TBI,3)使用FeTPPS(3mg/kg体重,静脉内)处理(TBI+FeTPPS;n=13)的TBI,4)使用媒介物的假手术处理(假手术;n=13)。基于先前的数据通过幂分析确定组大小(Khan等人,2016b;Khan等人,2009)。腹膜内施用氯胺酮(90mg/kg体重)和甲苯噻嗪(10mg/kg体重)作为手术麻醉剂。先行施用镇痛丁丙诺啡以减轻手术后疼痛。利用无菌技术,如先前所述从我们的实验室(Khan等人,2016b;Khan等人,2009)和其他(Kline等人,2008;Kline等人,2007)产生了CCI损伤。如先前的TBI研究所述,使用受控的撞击器装置在暴露的皮质上产生了皮质挫伤(Khan等人,2016b;Khan等人,2009)。在损伤后,立即用尼龙缝线缝合皮肤切口。将利多卡因胶状物(2%)施加至病变部位,以最大程度地减少任何可能的感染/不适。假手术动物没有皮质撞击,但经历在其他方面相同的步骤。

[0161] 通过伊文思蓝(EB)外渗评价BBB破坏:如我们实验室先前所述评估BBB渗漏(Khan等人,2016b;Khan等人,2009)。大鼠在CCI后接受4小时静脉内施用的100 μ l的盐水中的5%EB溶液。在24小时,在深度麻醉下用200ml盐水进行心脏灌注,以清除EB的脑循环。除去脑,拍照并切片。将脑组织在750 μ l的N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中均质化,并且以10,000x g离心25分钟,且对上清液中的EB含量进行荧光分析(λ_{ex} 620nm, λ_{em} 680nm)。

[0162] 水肿的测量(脑含水量):在CCI后第24小时,对动物实施安乐死以确定脑含水量(水肿),如先前所述(Hoda等人,2009;Khan等人,2009)。除小脑外,将皮质快速除去,并且分开称重对侧和同侧半球。将每个半球在60 $^{\circ}$ C下干燥72小时,并测定干重。同侧半球中的含水量计算为:含水量(%)=(湿重-干重)/湿重 \times 100。

[0163] EAE诱导:如先前所述诱导EAE(Nath等人,2009)。动物程序由MUSC的机构动物护理和使用委员会批准(AR#1644)。简言之,将8-12周龄、称重18-22g的雌性C57BL/6J小鼠(The Jackson Laboratory,Bar Harbor,ME,USA)随机分为四组:1)用媒介物处理的EAE动物(EAE;n=8),2)使用GSNO(1mg/kg体重/天;腹膜内)处理(EAE+GSNO;n=12)的EAE,3)使用FeTPPS(30mg/kg体重/天;腹膜内)处理(EAE+FeTPPS;n=8)的EAE,4)使用媒介物的对照(Ctrl;n=8)。基于先前的数据通过幂分析确定组大小(Nath等人,2009)。然后,在第0天和第7天,用100 μ l完全弗氏佐剂(CFA)中乳化(1:1)的MOG₃₅₋₅₅肽(MOG;200 μ g;Peptide International)在侧腹区域中皮下免疫小鼠。另外,通过腹膜内注射在第0天和第2天给予200ng的百日咳毒素(PTX;Sigma-Aldrich,St Louis,MO)。按照我们和其他研究者报告的用于诱导EAE的标准化方案使用PTX(Nath等人,2009)。类似地,对照组接受皮下注射CFA乳剂和PTX。由对实验处理不知情的检查者使用以下量表以对实验者不知情的方式在每天2与4pm之间在动物设施中对EAE的临床体征进行评分:0=没有疾病的临床体征;1=尾部瘫软或蹒跚步态伴尾巴紧张性;2=蹒跚步态伴随尾部瘫软(共济失调);2.5=共济失调伴部分

肢体麻痹;3=一只肢体完全麻痹;3.5=一只肢体完全麻痹伴第二肢体部分麻痹;4=两肢完全麻痹;4.5=垂死阶段;5=死亡。从疾病发作当天开始(临床评分在1与2之间),每天向动物给予使用药物和媒介物(磷酸盐缓冲盐水)的处理。

[0164] 组织学和免疫组织学分析:将动物麻醉并通过心脏灌注4%多聚甲醛固定(Nath等人,2004)。将组织样品(腰椎脊髓)石蜡包埋并横向切片(4- μm 厚)。进行苏木精和曙红(H&E)染色以评估单核细胞的浸润。为了评估髓磷脂的状态,将切片用对MBP具有特异性的抗体染色,并且用与免疫荧光分析缀合的第二抗体进行检测。DAPI(4',6-二脒基-2-苯基吡啶二盐酸盐)用于细胞核的染色。所有数字图像均使用配备有DP70摄像机单元(Olympus,Tokyo,Japan)的BX-60显微镜拍摄。

[0165] 统计分析:使用Graphpad Prism5进行统计分析。值表示为平均值 \pm 标准误差平均值(SEM)。组平均值之间的比较使用未配对变量的双尾学生t检验进行。使用ANOVA、随后Bonferroni检验进行多重比较。 $p < 0.05$ 的值被认为是统计上显著的。

[0166] ***

[0167] 根据本公开,本文公开且要求保护的所有方法可在无需过度实验的情况下进行和实施。尽管本发明的组合物和方法已经根据优选实施方案进行了描述,但对本领域技术人员显而易见的是可使本文所述的方法和本文所述方法的步骤或步骤的顺序发生变化,而不偏离本发明的概念、精神和范围。更具体地说,显而易见的是在化学上和生理学上相关的某些试剂可取代本文所述的试剂,同时达到相同或相似结果。对于本领域技术人员显而易见的所有此类相似的替换和修改均被认为是在所附权利要求书所限定的本发明的精神、范围和概念内。

[0168] 参考文献

[0169] 以下参考文献以引用的方式特别并入本文,在某种程度上,它们提供示例性程序或对本文所述的那些进行补充的其他细节。

[0170] Abbott et al.,Structure and function of the blood-brain barrier.Neurobiol Dis,37,13-25,2010.

[0171] Aggarwal et al.,S-nitrosoglutathione prevents blood-brain barrier disruption associated with increased matrix metalloproteinase-9 activity in experimental diabetes.J Neurochem,132,595-608,2015.

[0172] Altannavch et al.,Effect of high glucose concentrations on expression of ELAM-1,VCAM-1 and ICAM-1 in HUVEC with and without cytokine activation.Physiol Res,53,77-82,2004.

[0173] Bauer et al.,The dual role of zonula occludens(ZO)proteins.J Biomed Biotechnol,2010,402593,2010.

[0174] Bettelli et al.,IL-10 is critical in the regulation of autoimmune encephalomyelitis as demonstrated by studies of IL-10-and IL-4-deficient and transgenic mice,J Immunol 161,3299-3306,1998.

[0175] Cho et al.,2008.

[0176] Citi,et al.,Cingulin,paracingulin,and PLEKHA7:signaling and cytoskeletal adaptors at the apical junctional complex.Ann NY Acad Sci,1257,

125-132,2012.

[0177] Corti et al.,Mechanisms and targets of the modulatory action of S-nitrosoglutathione (GSNO) on inflammatory cytokines expression,Arch Biochem Biophys 562,80-91,2014.

[0178] Dandona et al.,Cerebral blood flow in diabetes mellitus:evidence of abnormal cerebrovascular reactivity.Br Med J,2,325-326,1978.

[0179] del Zoppo and Mabuchi,Cerebral microvessel responses to focal ischemia.J Cereb Blood Flow Metab,23,879-894,2003.

[0180] Ding,et al.,Diabetes increases expression of ICAM after a brief period of cerebral ischemia.J Neuroimmunol,161,61-67,2005.

[0181] Ennis and Keep,Effect of sustained-mild and transient-severe hyperglycemia on ischemia-induced blood-brain barrier opening.J Cereb Blood Flow Metab,27,1573-1582,2007.

[0182] Fanning and Anderson,Zonula occludens-1 and-2 are cytosolic scaffolds that regulate the assembly of cellular junctions.Ann N Y Acad Sci,1165,113-120,2009.

[0183] Fiorentino et al.,IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells,J Immunol 146,3444-3451,1991.

[0184] Furuse et al.,Occludin:a novel integral membrane protein localizing at tight junctions.J Cell Biol,123,1777-1788,1993.

[0185] Gao et al.,In vivo molecular and cellular imaging with quantum dots.Curr Opin Biotechnol,16,63-72,2005.

[0186] Giebel et al.,Matrix metalloproteinases in early diabetic retinopathy and their role in alteration of the blood-retinal barrier.Lab Invest,85,597-607,2005.

[0187] Greenwood et al.,Lymphocyte migration into the central nervous system:implication of ICAM-1 signalling at the bloodbrain barrier.Vascul Pharmacol,38,315-322,2002.

[0188] Hammes et al.,Pericytes and the pathogenesis of diabetic retinopathy.Diabetes,51,3107-3112,2002

[0189] Harhaj and Antonetti,Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology./nt J Biochem Cell Biol,36,1206-1237, 2004.

[0190] Hawkins et al.,Increased blood-brain barrier permeability and altered tight junctions in experimental diabetes in the rat:contribution of hyperglycaemia and matrix metalloproteinases.Diabetologia,50,202-211,2007.

[0191] He and Frost,Direct measurement of actual levels of nitric oxide (NO) in cell culture conditions using soluble NO donors.Redox Bio.,;9:1-14.doi: 10.1016/j.redox.2016.05.002.PubMed PMID:27236086;PubMed Central PMCID:

PMCPMC4899081,2016.

[0192] Huber et al.,Th 17 cells express interleukin-10 receptor and are controlled by Foxp3(-)and Foxp3+regulatory CD4+ T cells in an interleukin-10-dependent manner,Immunity 34,554-565,2011.

[0193] Jousseaume et al.,Retinal vascular endothelial growth factor induces intercellular adhesion molecule-1 and endothelial nitric oxide synthase expression and initiates early diabetic retinal leukocyte adhesion in vivo.Am J Pathol,160,501-509,2002.

[0194] Khan et al.,Administration of S-nitrosoglutathione after traumatic brain injury protects the neurovascular unit and reduces secondary injury in a rat model of controlled cortical impact.J Neuroinflammation,6,32,2009.

[0195] Khan et al.,S-nitrosoglutathione reduces oxidative injury and promotes mechanisms of neurorepair following traumatic brain injury in rats.J Neuroinflammation,8,78,2011.

[0196] Kim J,Won JS,Singh AK,Sharma AK,Singh I.STAT3 regulation by S-nitrosylation:implication for inflammatory disease.Antioxid Redox Signal.20(16):2514-27.doi:10.1089/ars.2013.5223.Pub Med PMID:24063605;PubMed Central PMCID:PMCPMC4026100,2014.

[0197] Langrish et al.,2005.

[0198] Mogi and Horiuchi,Neurovascular coupling in cognitive impairment associated with diabetes mellitus.Circ J,75,1042-1048,2011.

[0199] Morita et al.,Expression of claudin-5 in dermal vascular endothelia Exp Dermatol,12,289-295,2003.

[0200] Nath et al.,S-nitrosoglutathione a physiologic nitric oxide carrier attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis,J Neuroimmune Pharmacol 5(2010) 240-251,2010.

[0201] Nath N,Giri S,Prasad R,Singh AK,Singh I.Potential targets of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor for multiple sclerosis therapy.J Immunol.172(2):1273-86.Epub 2004/01/07.PubMed PMID:14707106,2004.

[0202] Nath N,Khan M,Paintlia MK,Singh I,Hoda MN,Giri S.Metformin attenuated the autoimmune disease of the central nervous system in animal models of multiple sclerosis.J Immunol.182(12):8005-14.Epub 2009/06/06.doi:10.4049/jimmunol.0803563.PubMed PMID:19494326;PubMed Central PMCID:PMC2965405,2009.

[0203] Nath N,Morinaga O,Singh I.S-nitrosoglutathione a physiologic nitric oxide carrier attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis.J Neuroimmune Pharmacol.5(2):240-51.doi:10.1007/s11481-009-9187-x.PubMed PMID:20091246;PubMed Central PMCID:PMCPMC2965418,2010.

[0204] Niedbala et al.,Nitric oxide induces CD4+CD25+Foxp3 regulatory T

cells from CD4+CD25 T cells via p53,IL-2,and OX40.Proc Natl Acad Sci U S A.2007;104(39):15478-83.doi:10.1073/pnas.0703725104.PubMed PMID:17875988; PubMed Central PMCID:PMC1978217,2007.

[0205] Niedbala et al.,2007.

[0206] Nitta et al.,Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice.J Cell Biol,161,653-660,2003.

[0207] Ohtsuki et al.,Exogenous expression of claudin-5 induces barrier properties in cultured rat brain capillary endothelial cells.J Cell Physiol, 210,81-86,2007.

[0208] Pfaffl et al.,Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR.Nucleic Acids Res,30,e36,2002.

[0209] Phillips et al.,Oxidant stress and constrictor reactivity impair cerebral artery dilation in obese Zucker rats.Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol,288,R522-530,2005.

[0210] Prasad et al.,GSNO attenuates EAE disease by Snitrosylation-mediated modulation of endothelial-monocyte interactions,Glia 55,65-77,2007.

[0211] Rauhala et al.,Neuroprotective properties of nitric oxide and Snitrosoglutathione.Toxicol Appl Pharmacol,207,91-95,2005.

[0212] Song and Qian,IL-17 family cytokines mediated signaling in the pathogenesis of inflammatory diseases,Cell Signal 25,2335-2347,2013.

[0213] Start et al.,Increased blood-brain barrier permeability in type II diabetes demonstrated by gadolinium magnetic resonance imaging.J Neural Neurosurg Psychiatry,74,70-76,2003.

[0214] Veena et al.,Enriched environment restores hippocampal cell proliferation and ameliorates cognitive deficits in chronically stressed rats.J Neurosci Res,87,831-843,2009.

[0215] Won et al.,Protective role of S-nitrosoglutathione (GSNO) against cognitive impairment in rat model of chronic cerebral hypoperfusion,J Alzheimers Dis 34,621-635,2013.

[0216] Yang et al.,J Immunol.,185(11):6664-9,2010.

[0217] Zampolli et al.,Inhibition of endothelial cell activation by nitric oxide donors.J Pharmacol Exp Ther,295,818-823,2000.

[0218] Zlokovic,B.V.,The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders.Neuron,57,178-201,2008

[0219] Bogatcheva et al.,Biochemistry,67:75-84,2002.

[0220] Brass,Chest,124:18S-25S,2003.

[0221] Cannon et al.,Behav Brain Res.,183:161-8,2007.

[0222] Chen et al.,Stroke.41:2348-52,2010.

- [0223] Chen et al., *Biochem Pharmacol.*,127:34-45,2017.
- [0224] Chodobski et al., *Transl Stroke Res.*,2:492-516,2011.
- [0225] Compston and Coles, *Lancet*,359:1221-31,2002.
- [0226] Cramer et al., *Neuroimage Clin.*,4:182-9,2014.
- [0227] Davalos et al., *Ann Neurol.*75:303-8,2014.
- [0228] Di Lorenzo et al., *J Cell Sci.*,126:5541-52,2013.
- [0229] Gaston et al., *Mol Interv.*,3:253-63,2003.
- [0230] Gordge et al., *Br J Pharmacol.*,124:141-8,1998.
- [0231] Grammas and Martinez, *J Alzheimers Dis.*,42 Suppl 4:S537-44,2014.
- [0232] Holland et al., *Endothelium*,6:113-21,1998.
- [0233] Kaur et al., *Int J Stroke*,4:159-68,2009.
- [0234] Khan et al., *Behav Brain Res.*,2016a.
- [0235] Khan et al., *Brain Res*,1630:159-70,2016b.
- [0236] Khan et al., *J Neurochem*,123 Suppl 2:86-97,2012.
- [0237] Khan et al., *J Neuroinflammation.*,6:32,2009.
- [0238] Khan et al., *J Neuroinflammation*,8:78,2011.
- [0239] Kim et al., *Antioxid Redox Signal*,20:2514-27,2014.
- [0240] Kline et al., *Neurosci Lett.*,448:263-7,2008.
- [0241] Kline et al., *Behav Brain Res.*,177:186-94,2007.
- [0242] Langer et al., *Circ Res.*,110:1202-10,2012.
- [0243] Li et al., *FEBS Lett.*,580:4252-60,2006.
- [0244] Nath et al., *J Immunol.*,172:1273-86,2004.
- [0245] Nath et al., *J Immunol.*,182:8005-14,2009.
- [0246] Nath et al., *J Neuroimmune Pharmacol.*,5:240-51,2010.
- [0247] Neumann-Haefelin et al., *Stroke*,31:1965-72;discussion 1972-3,2000.
- [0248] Neuwelt et al., *Nat Rev Neurosci.*,12:169-82,2011.
- [0249] Nishikawa and Suzuki, *Neural Regen Res.*,12:1982-1984,2017.
- [0250] Olah et al., *J Cereb Blood Flow Metab.*,20:1474-82,2000.
- [0251] Pacher et al., *Physiol Rev.*,87:315-424,2007.
- [0252] Pan et al., *Redox Rep.*,9:49-55,2004.
- [0253] Popovic et al., *Mol Cell Biochem.*,359:301-13,2012.
- [0254] Prasad et al., *Glia*,55:65-77,2007.
- [0255] Rafikov et al., *J Biol Chem.*,289:4710-22,2014.
- [0256] Shapiro, *J Am Acad Dermatol.*,24:665,1991.
- [0257] Stolz et al., *J Neuroinflammation*,14:152,2017.
- [0258] Stone et al., *Neurology*,45:1122-6,1995.
- [0259] Thors et al., *FEBS Lett.*,573:175-80,2004.
- [0260] van Nieuw Amerongen et al., *Circ Res.*,87:335-40,2000.
- [0261] Won et al., *J Alzheimers Dis.*,34:621-35,2013.

[0262] Xi et al., J Neurochem., 8:3-9, 2003.

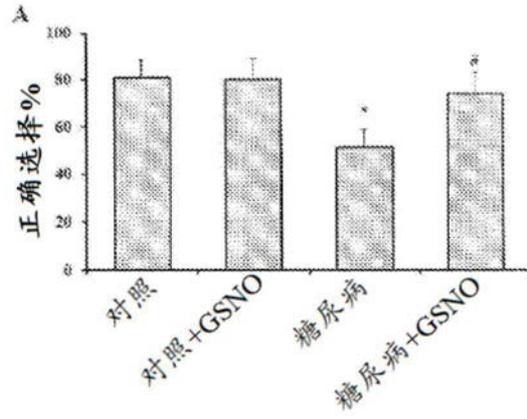


图1A

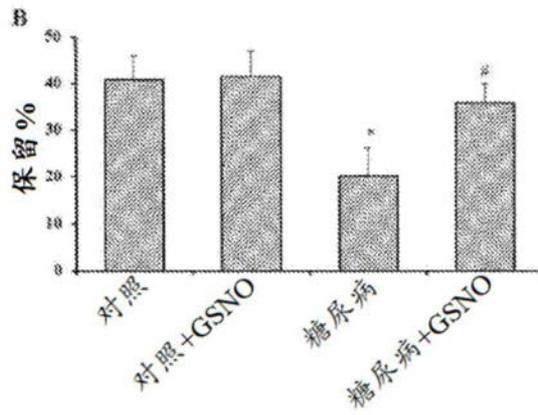


图1B

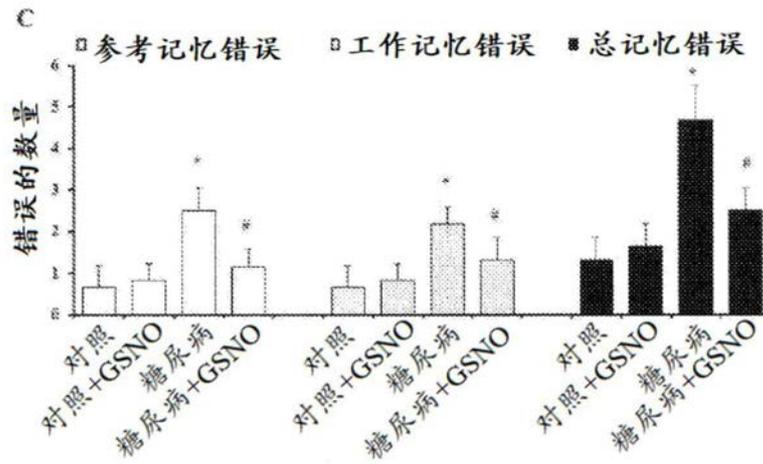


图1C

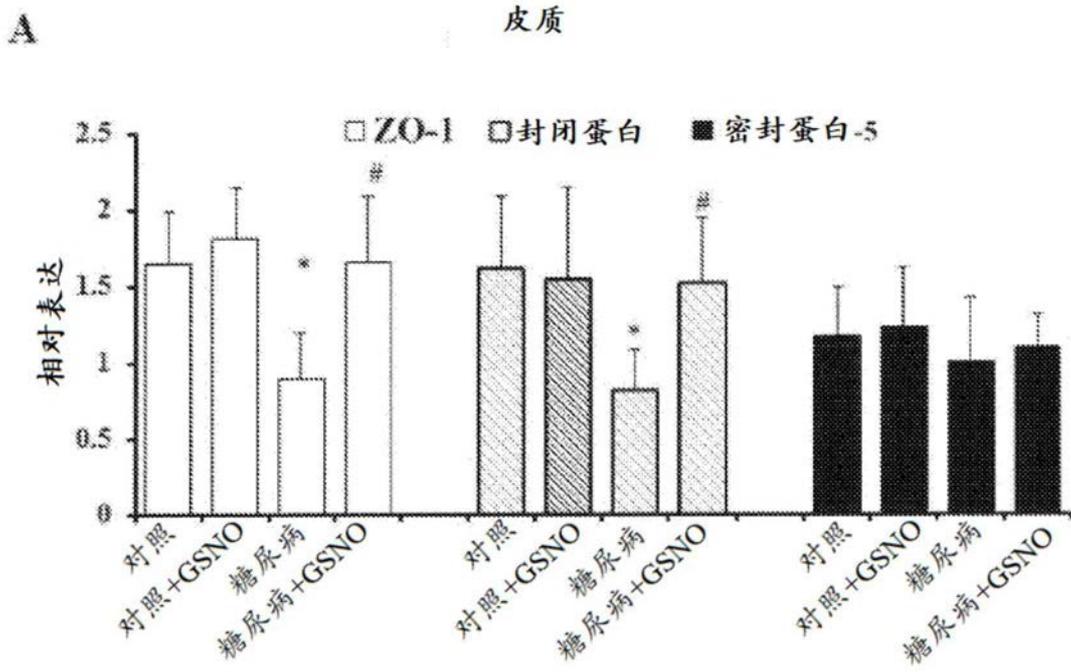


图2A

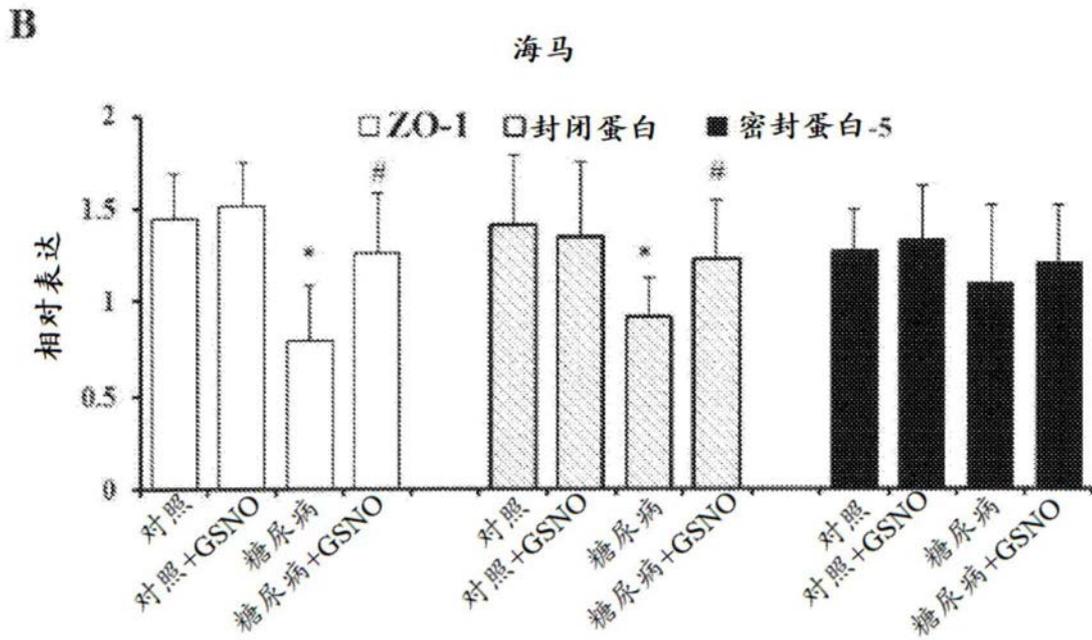


图2B

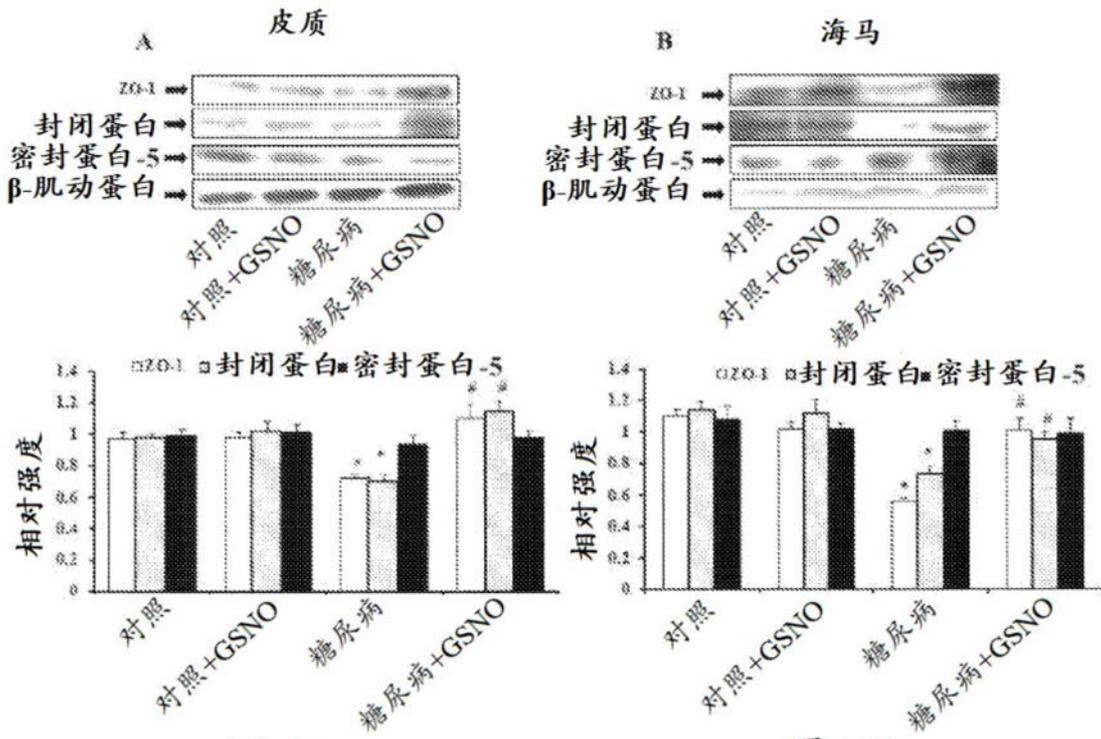


图 3A

图 3B

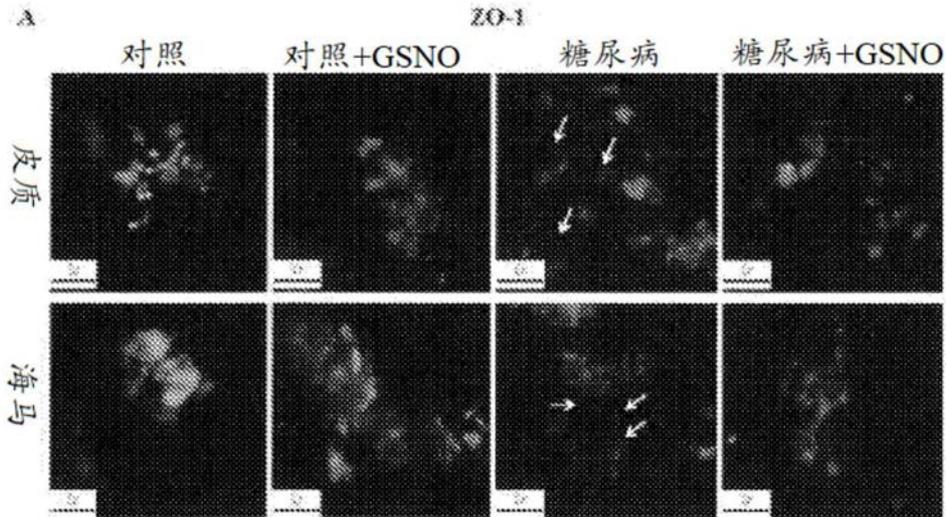


图4A

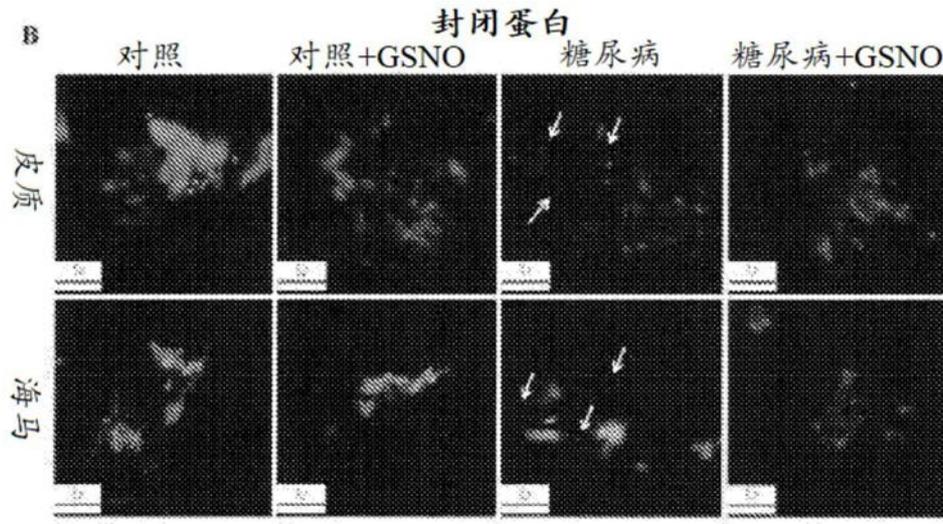


图4B

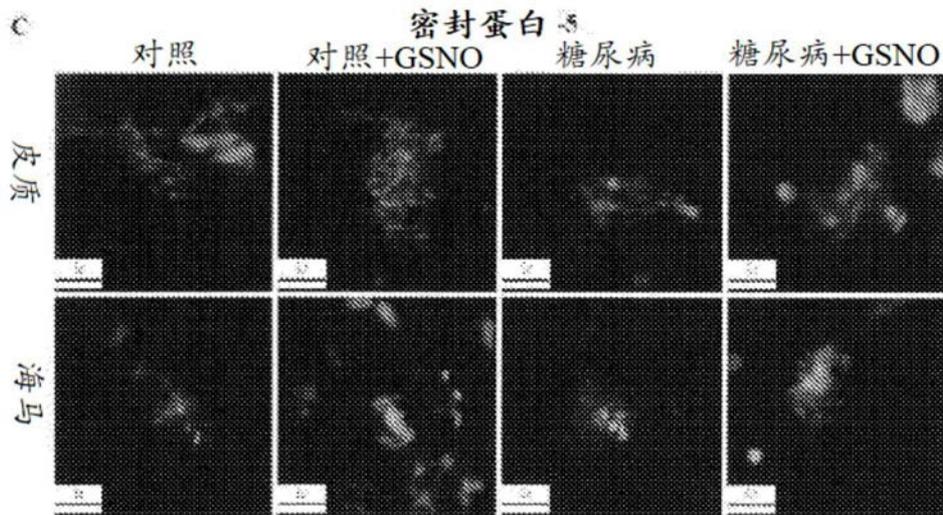


图4C

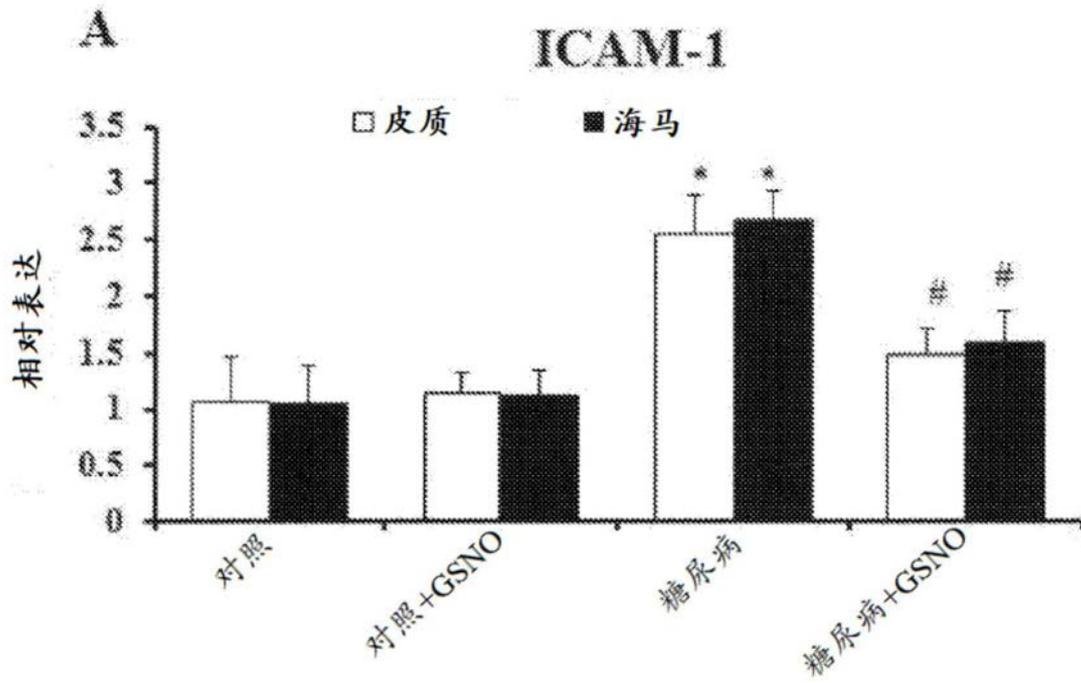


图5A

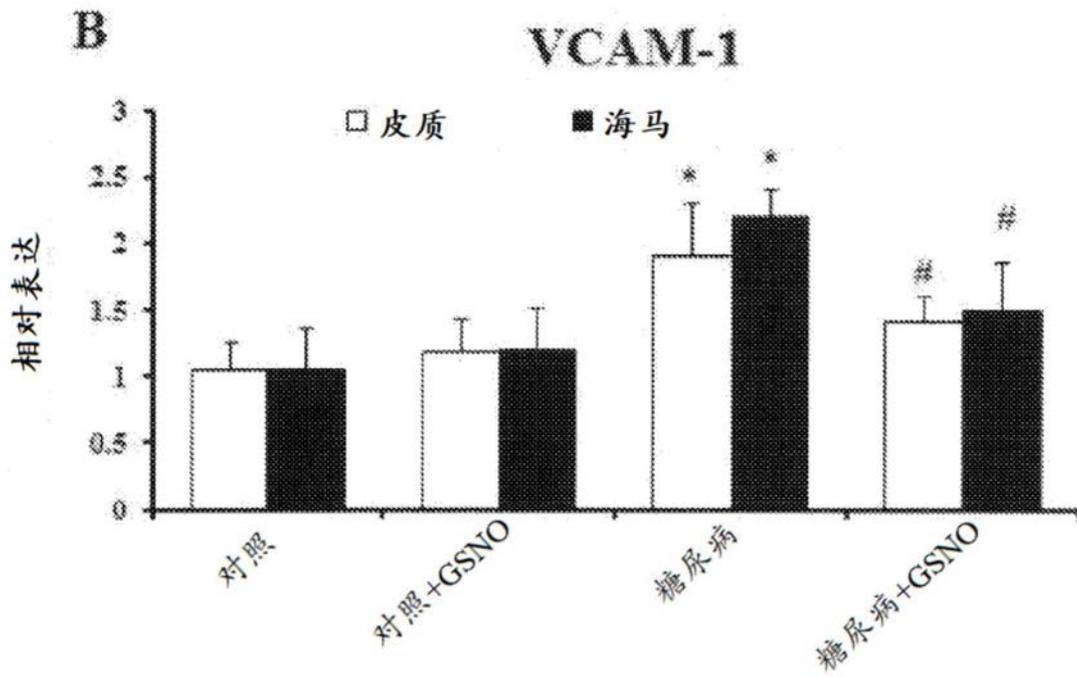


图5B

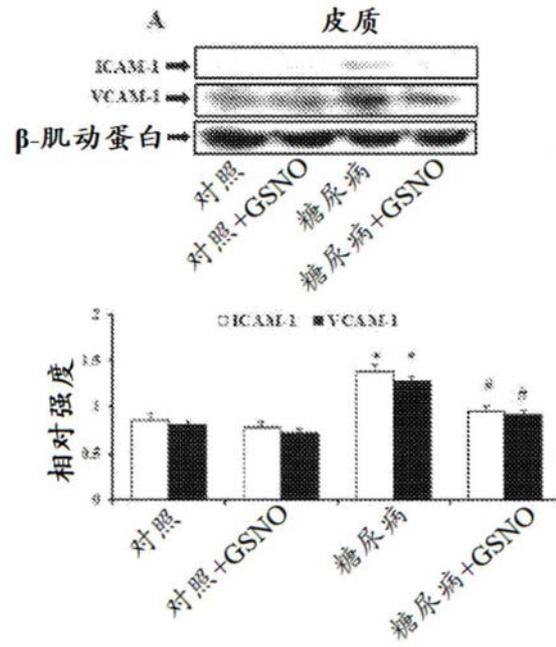


图6A

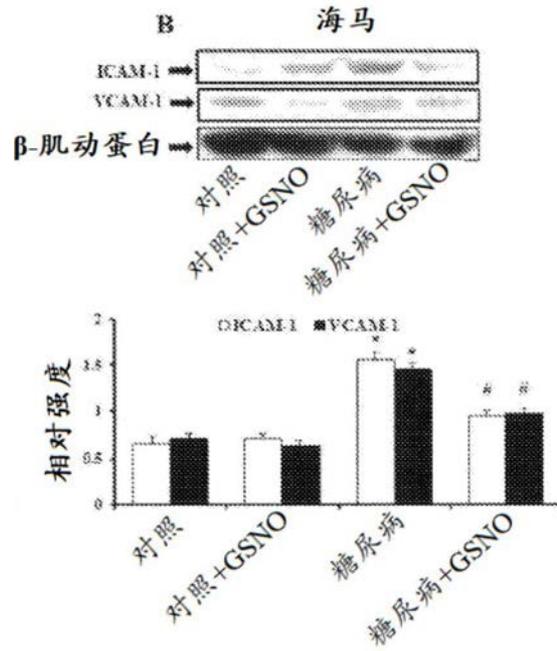


图6B

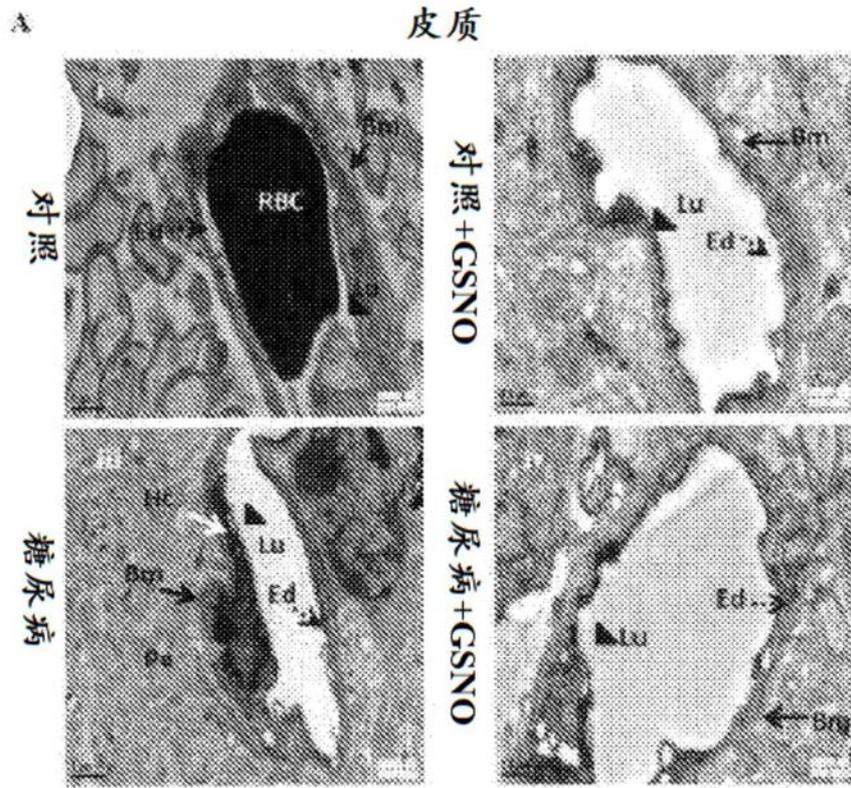


图7A

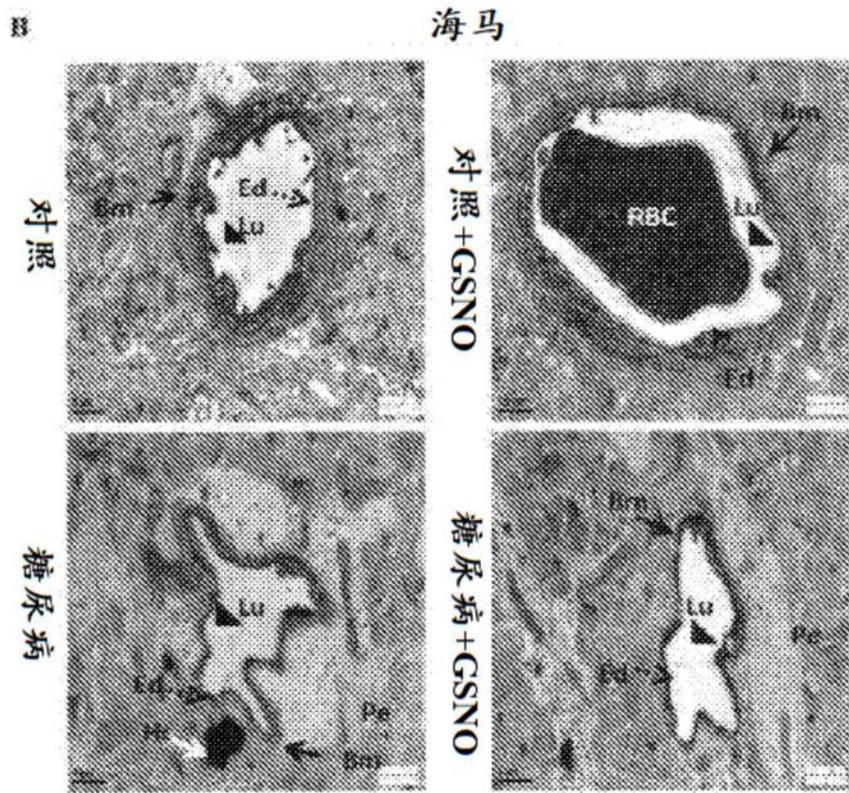


图7B

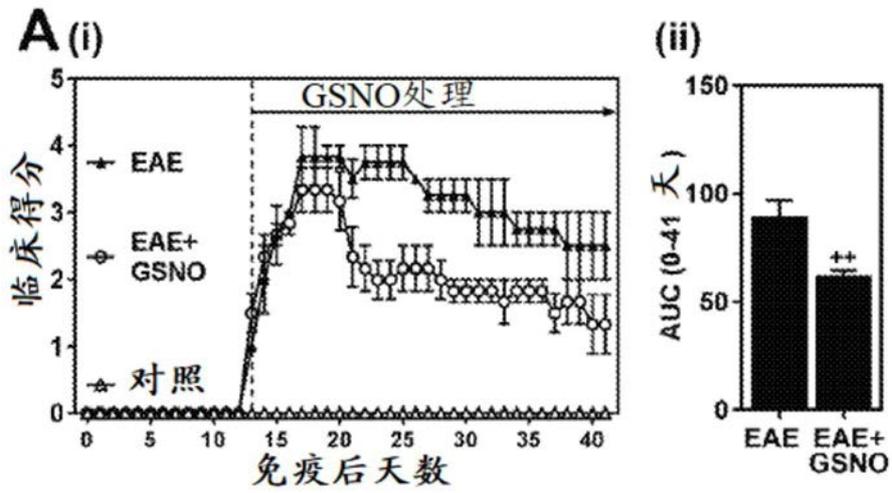


图8A

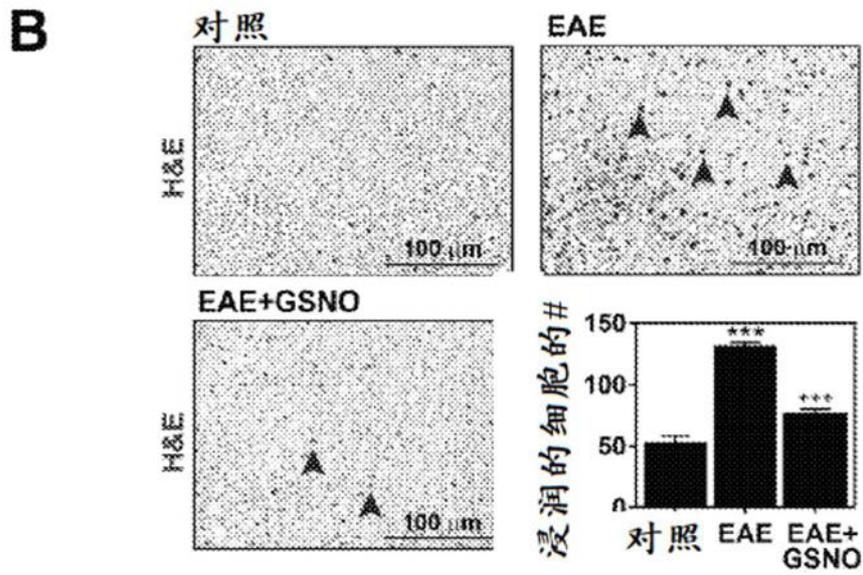


图8B

C 脊髓中CD4⁺T细胞的数量

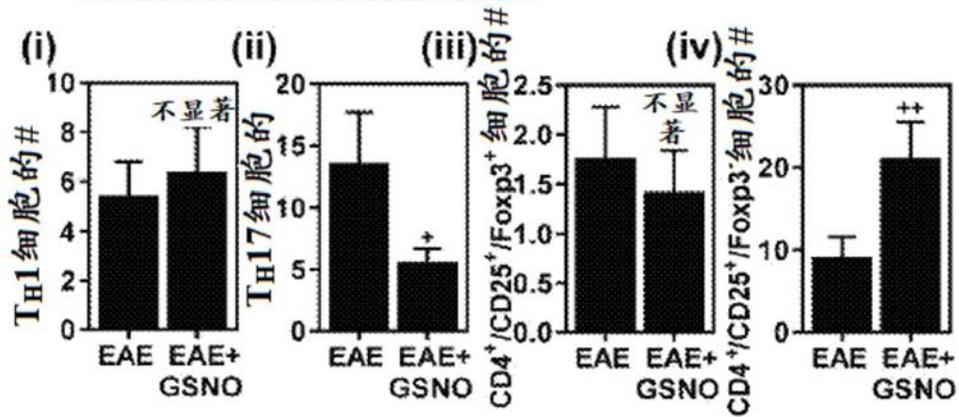


图8C

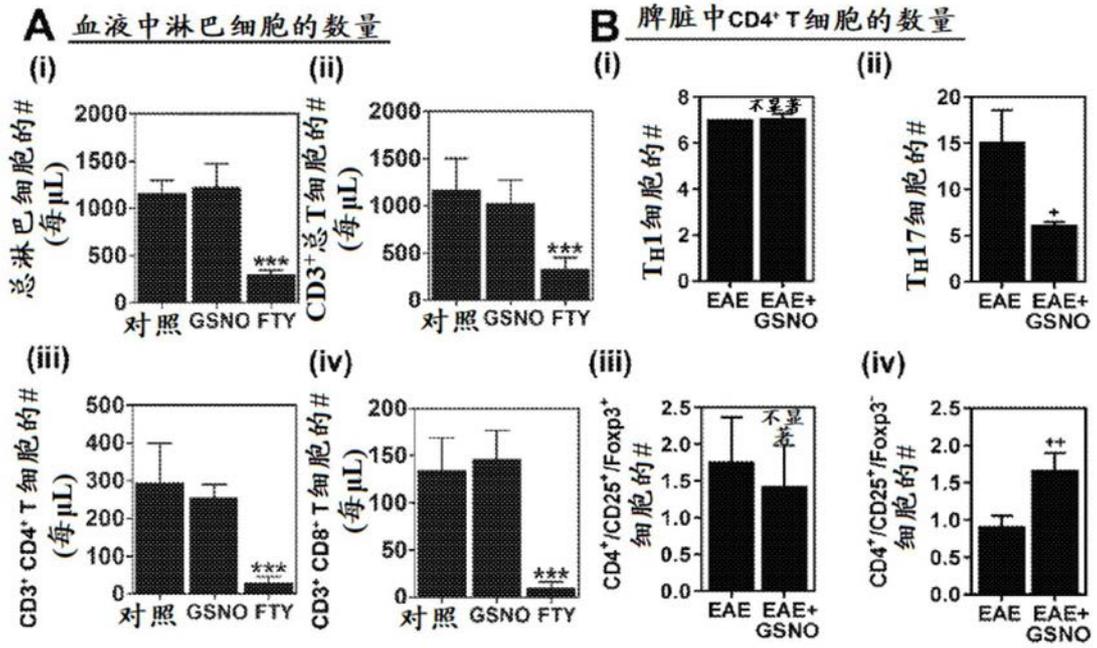


图 9A

图 9B

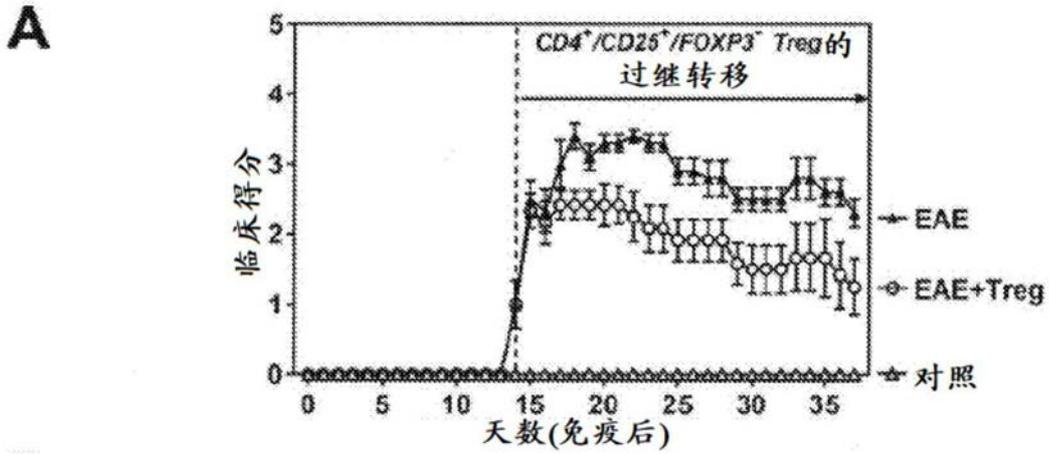


图10A

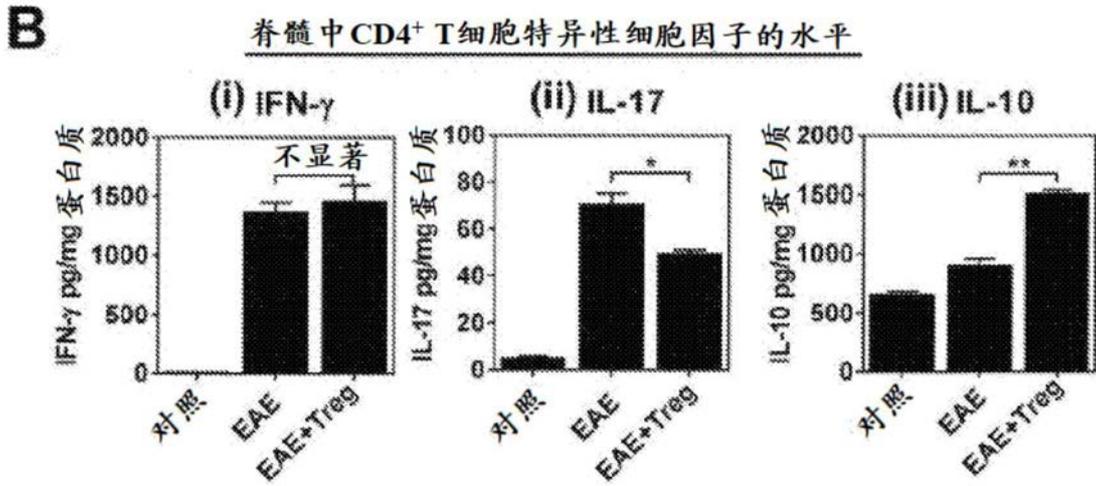


图10B

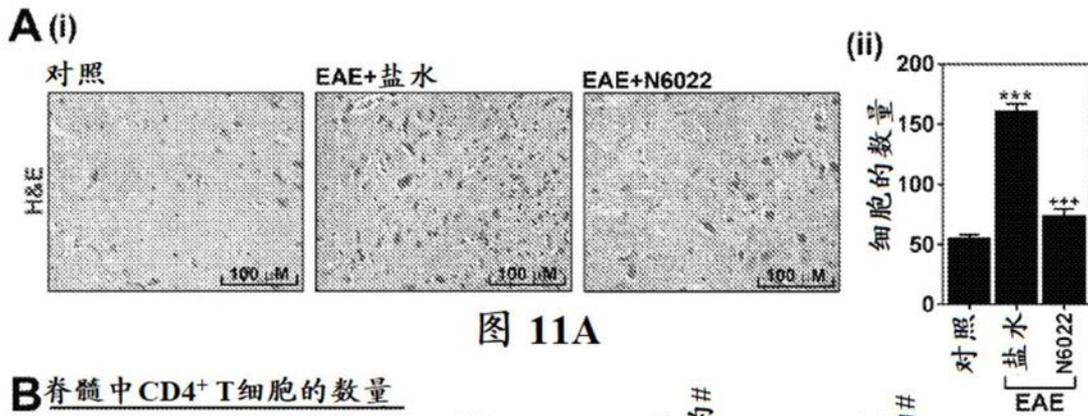


图 11A

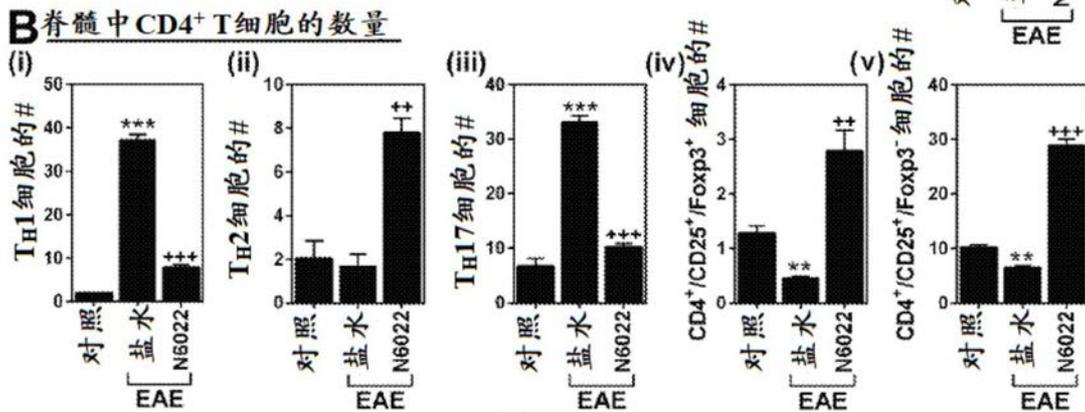


图 11B

C 脊髓中CD4⁺T细胞特异性细胞因子的水平

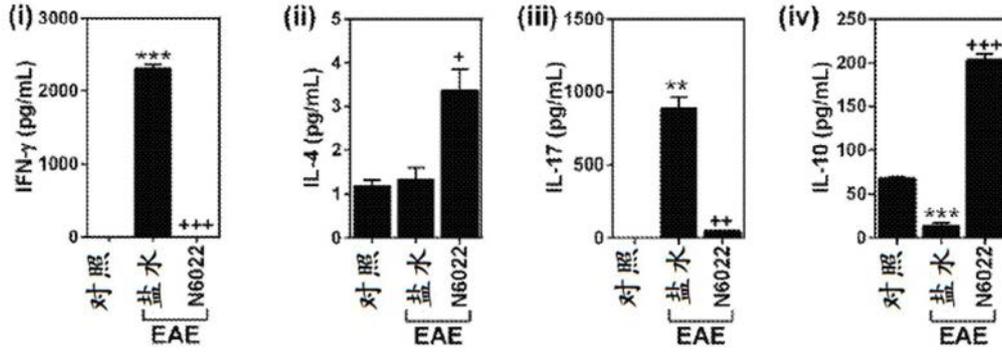


图11C

A 血液中CD4⁺淋巴细胞的数量

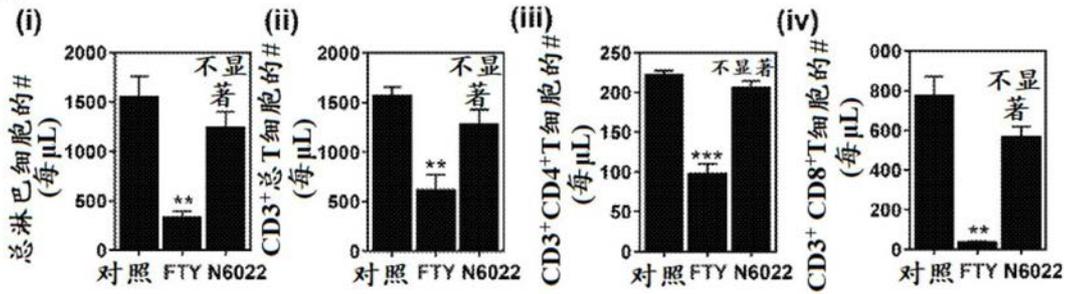


图12A

B 脾脏中CD4⁺T细胞的数量

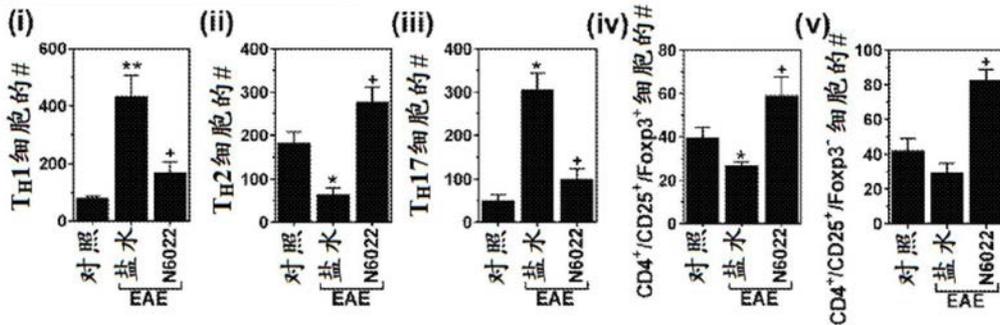


图12B

C 脾脏中CD4⁺T细胞特异性细胞因子的水平

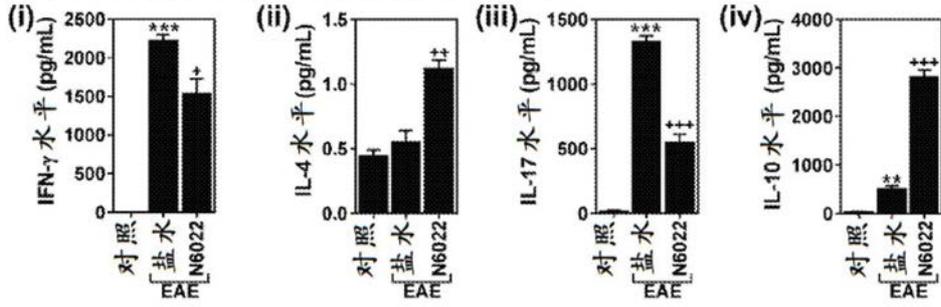


图12C

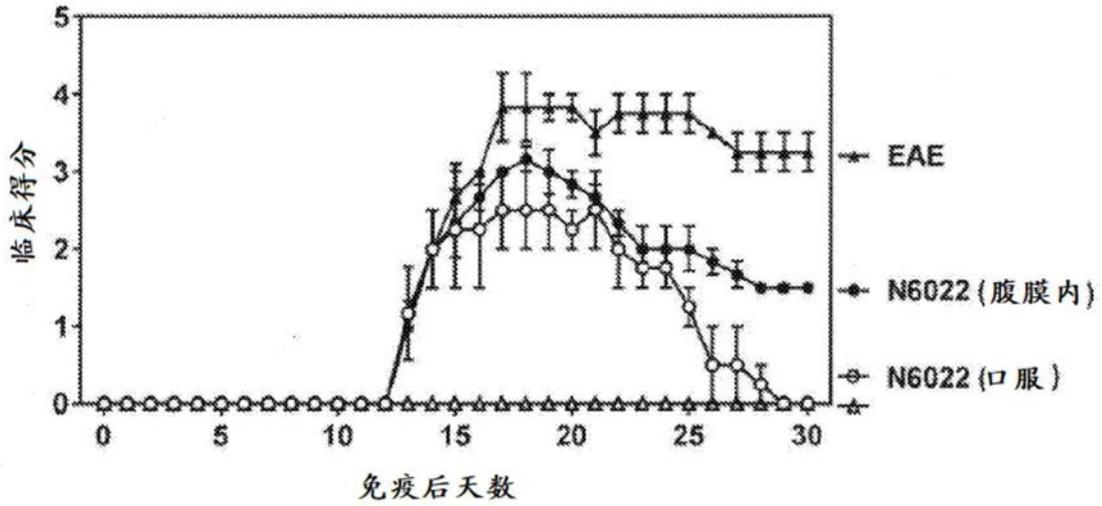


图13

A 来自...的T细胞
■ EAE小鼠 ○ GSNO+EAE小鼠

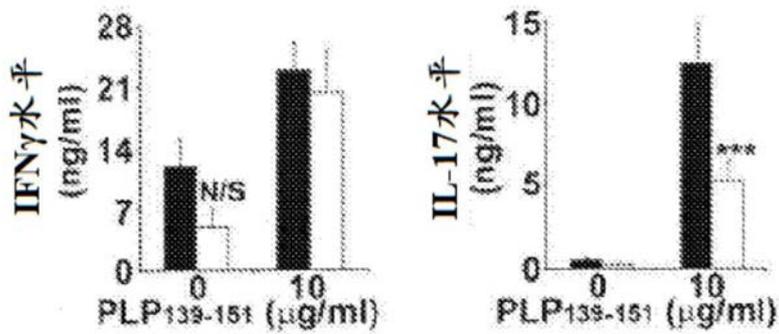


图14A

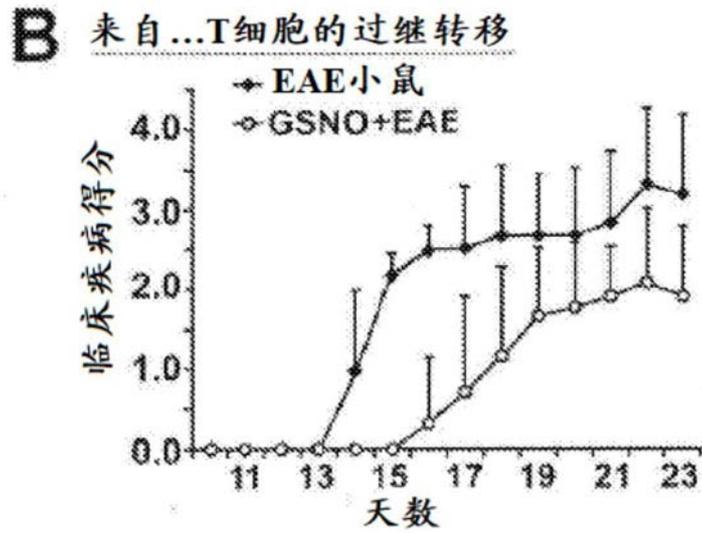


图14B

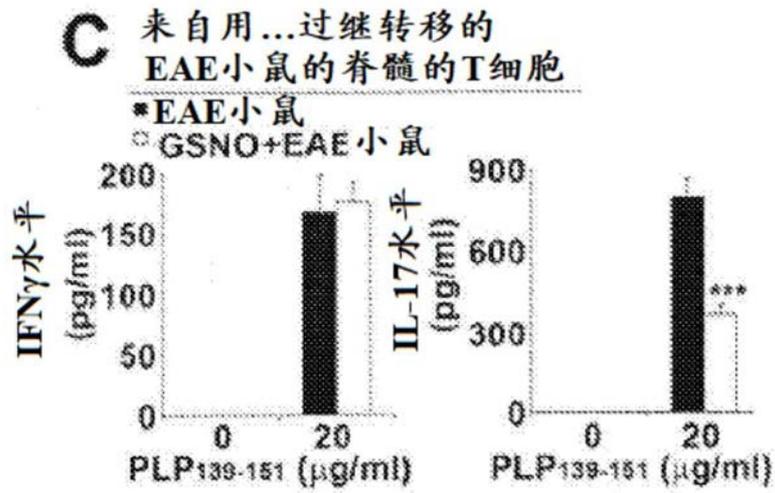


图14C

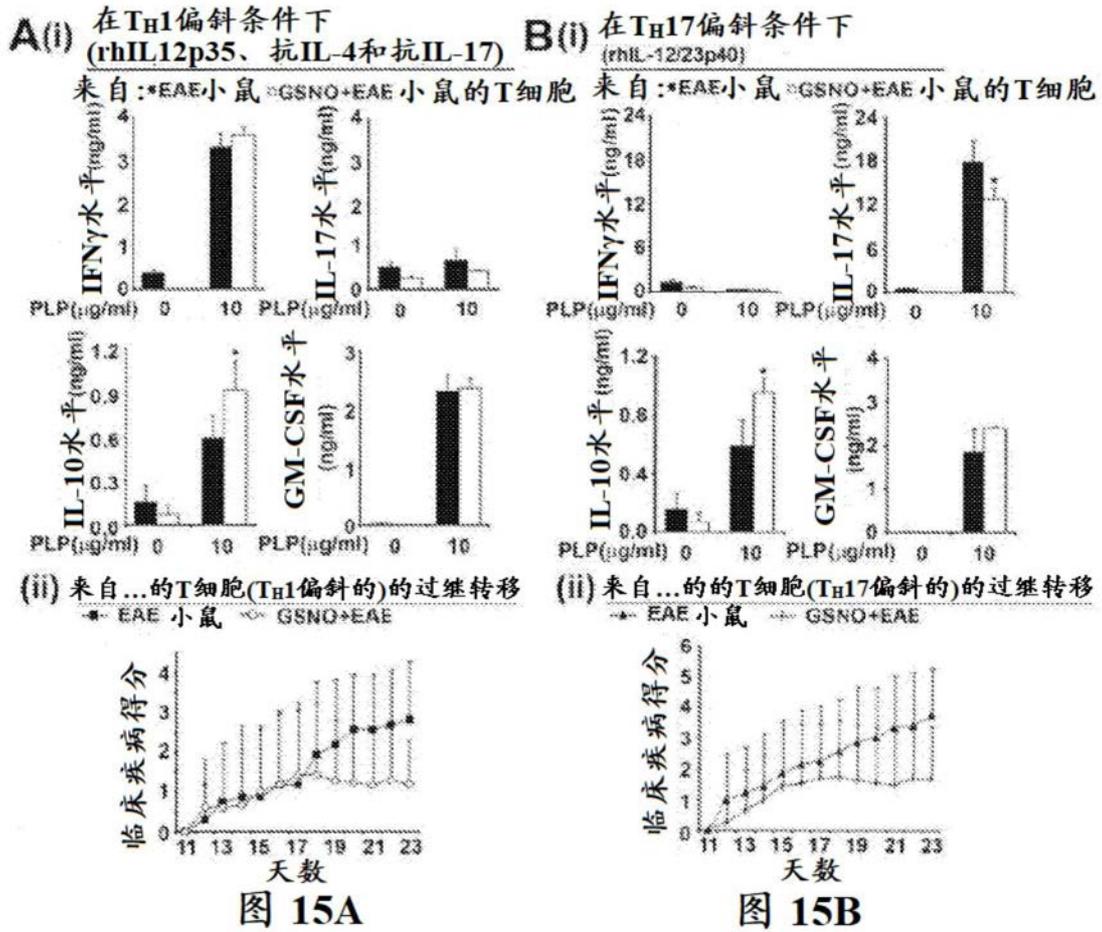


图 15A

图 15B

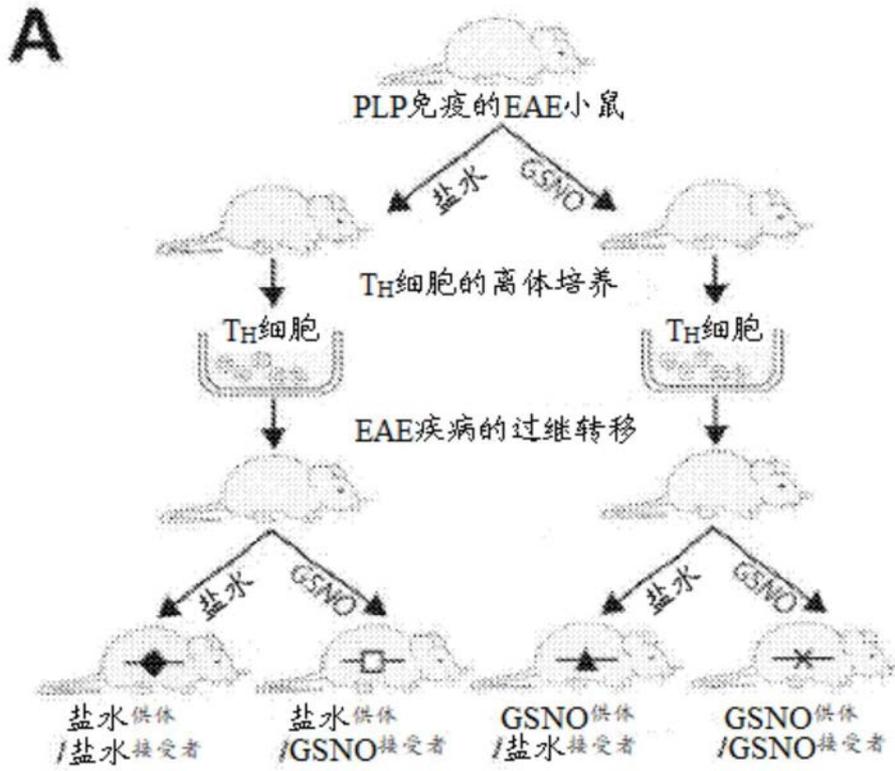


图16A

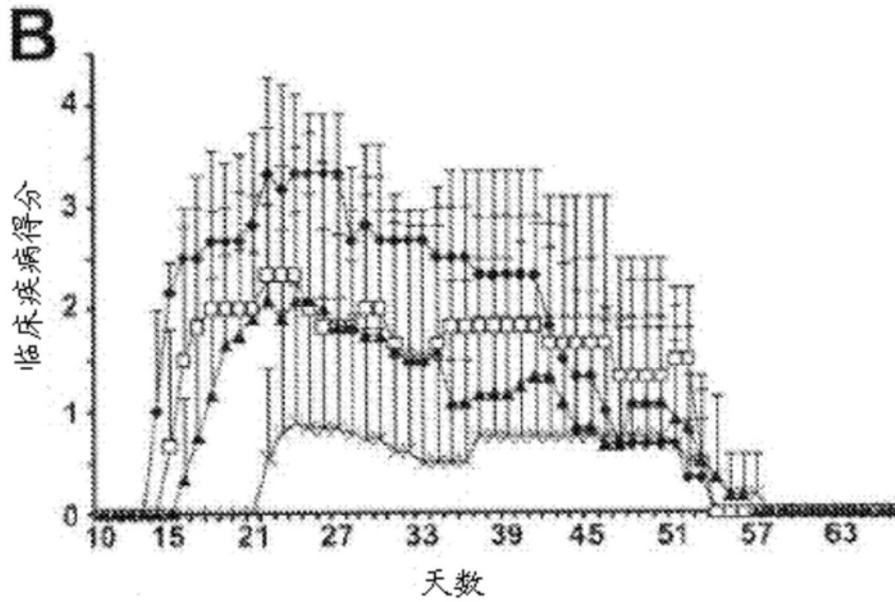


图16B

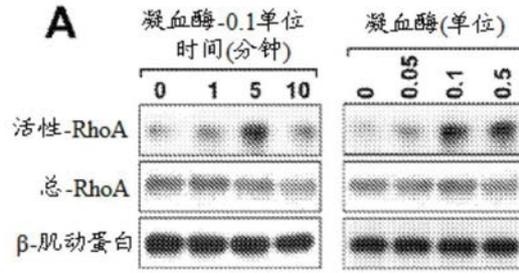


图17A

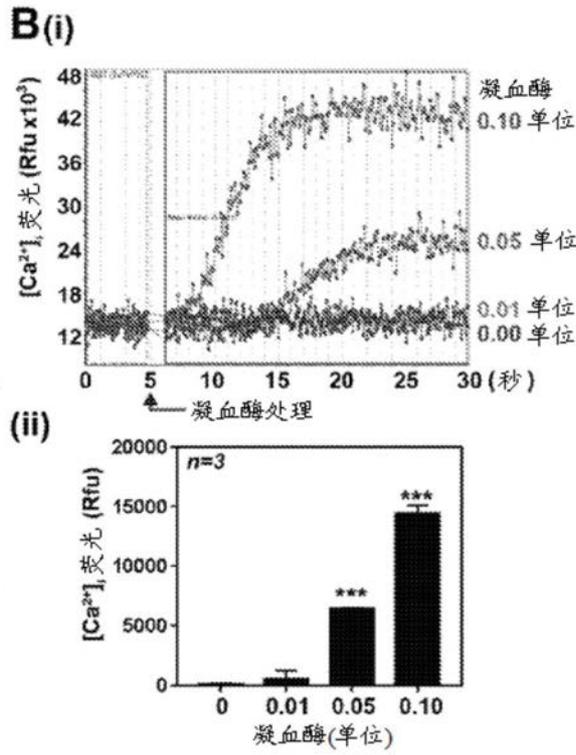


图17B

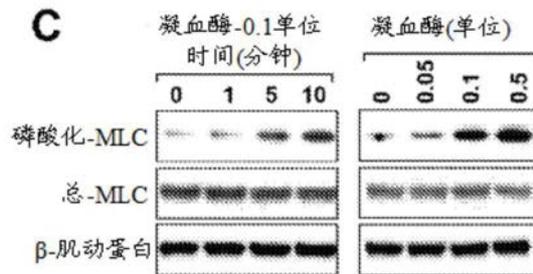
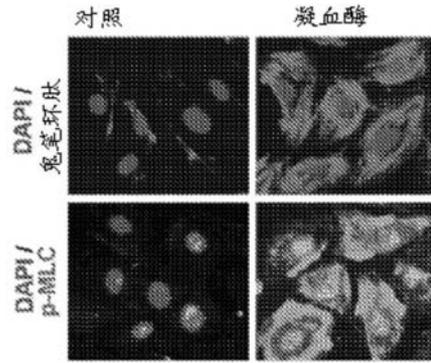


图17C

D(i)



(ii)

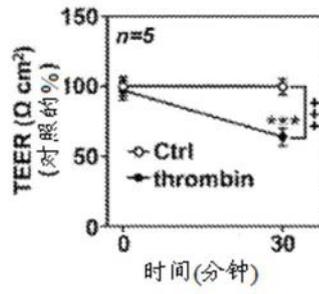


图17D

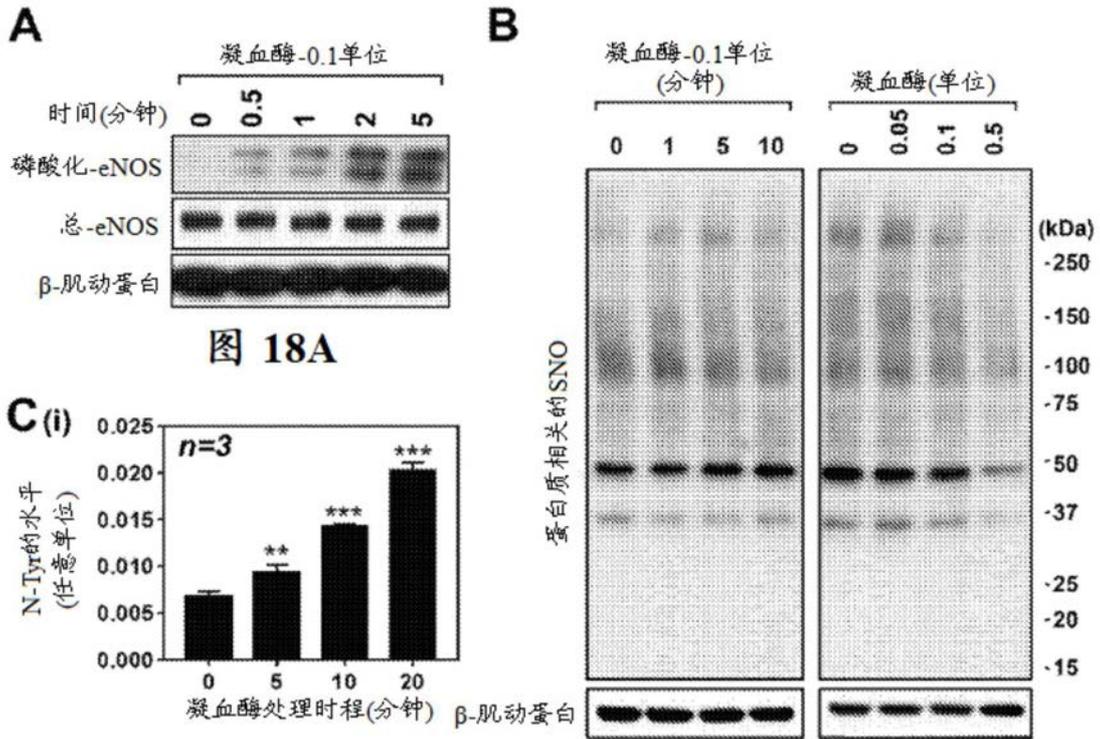


图 18A

图 18B

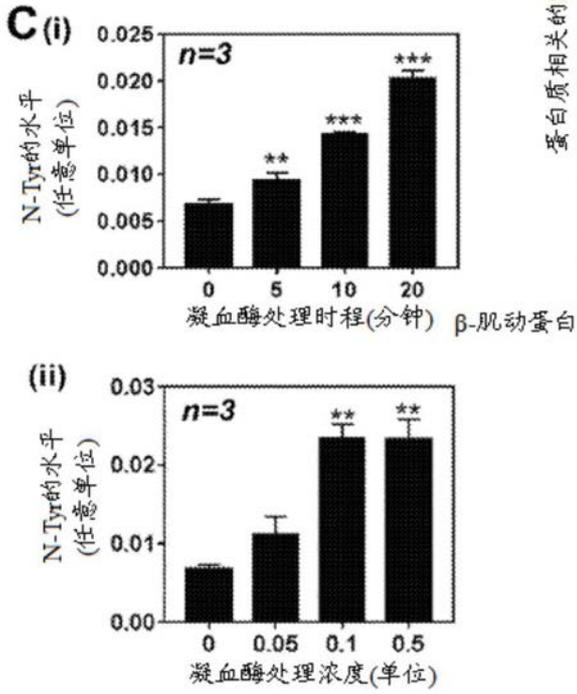


图 18C

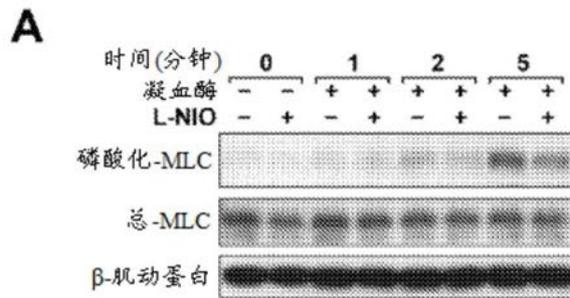


图19A

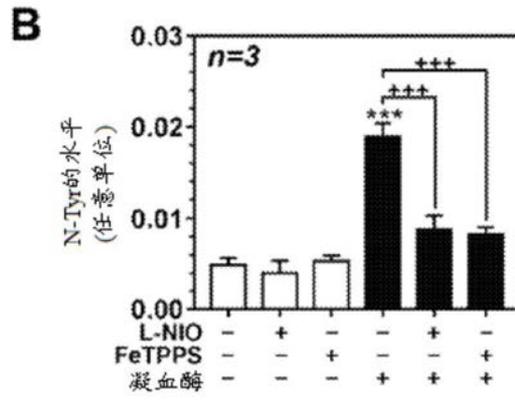


图19B

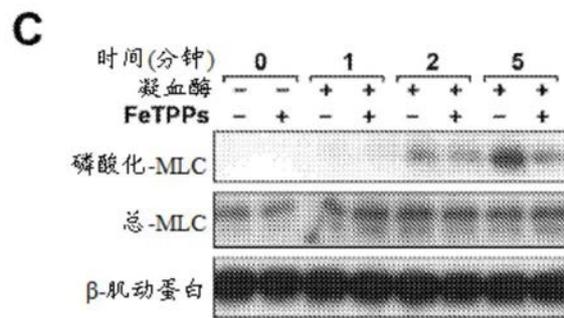


图19C

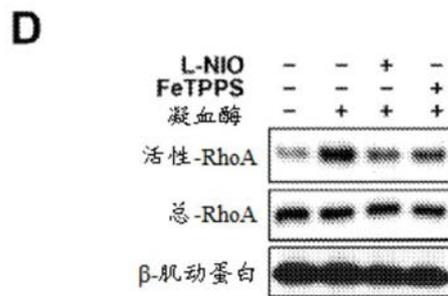


图19D

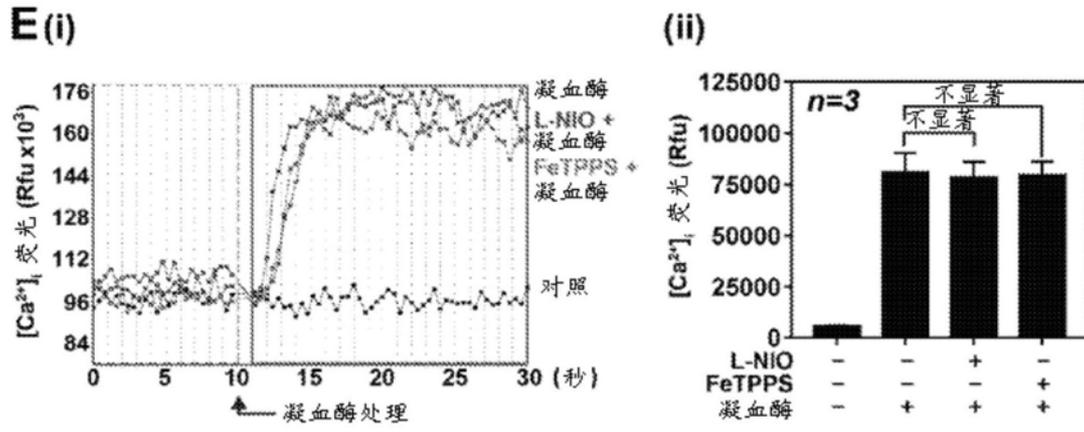


图19E

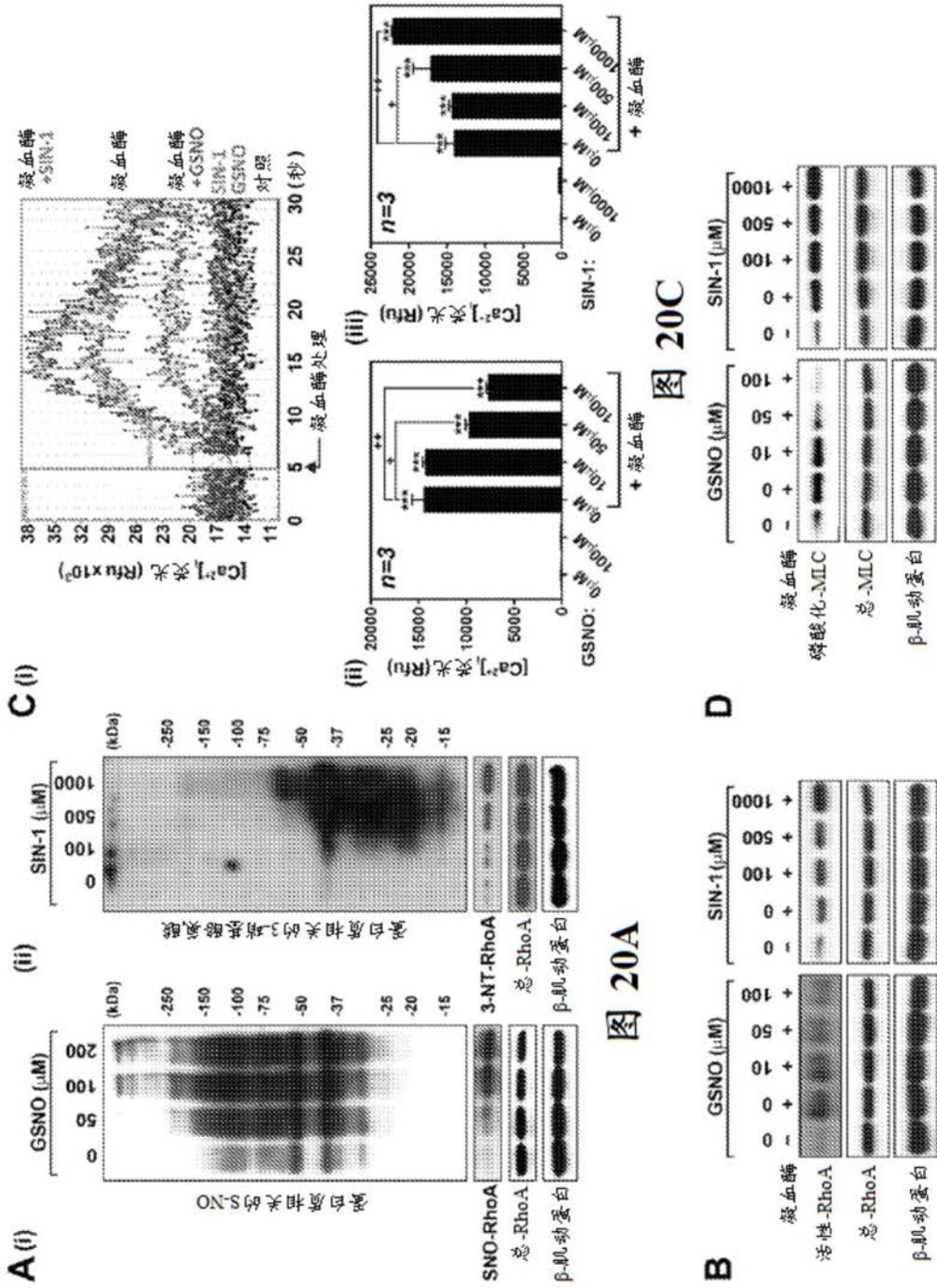


图 20A

图 20C

图 20B

图 20D

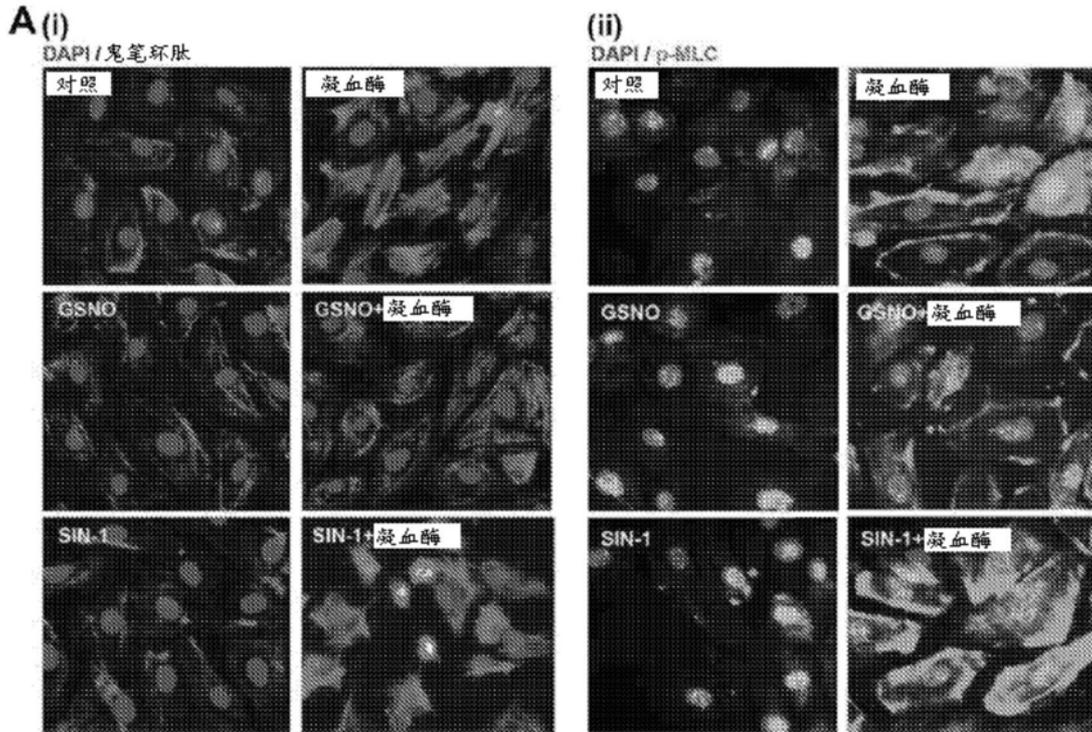


图21A

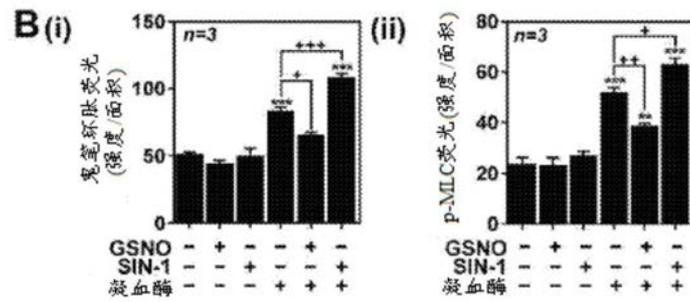


图21B

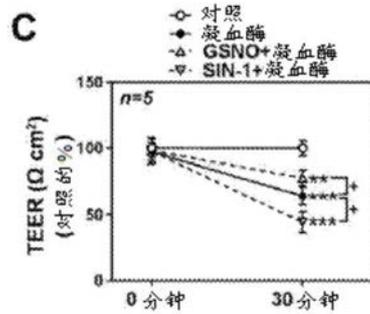


图21C

A 伊文思蓝外渗

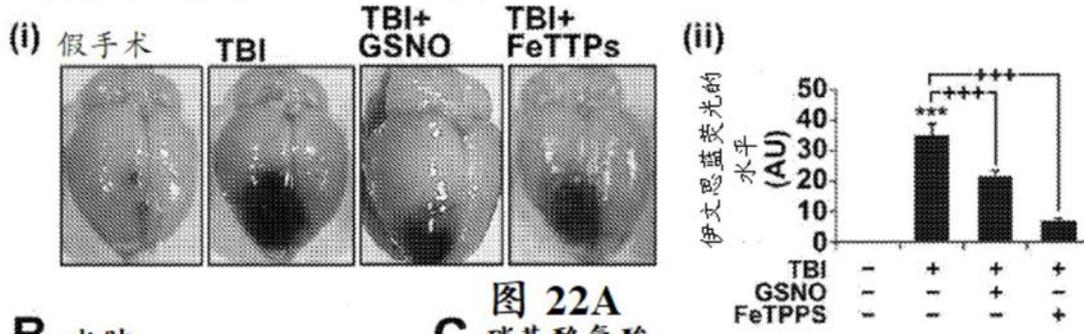


图 22A

B 水肿

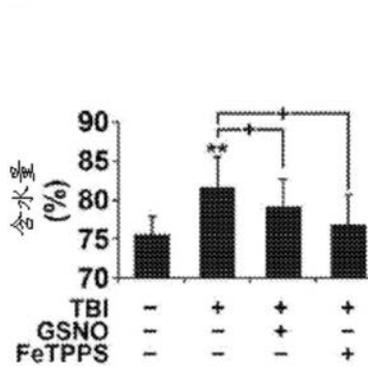


图 22B

C 硝基酪氨酸

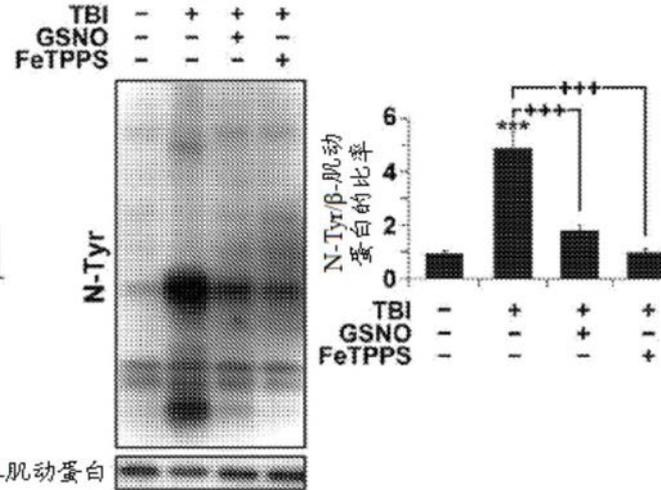


图 22C

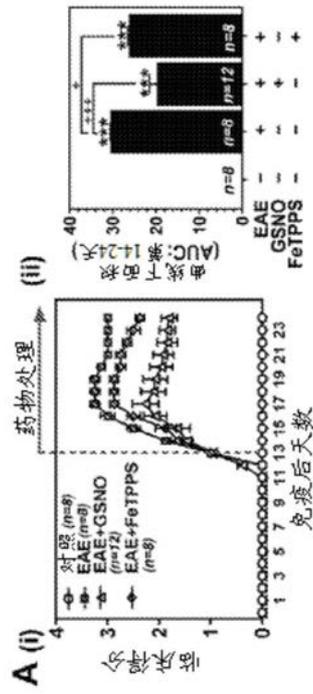


图23A

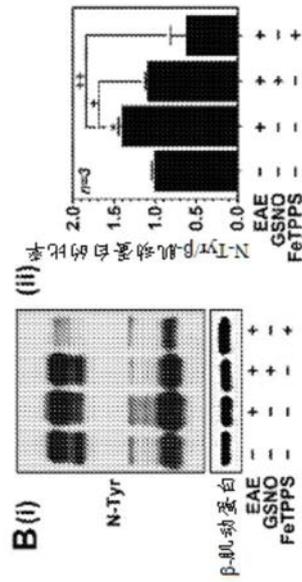


图23B

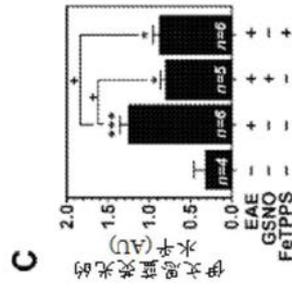


图23C

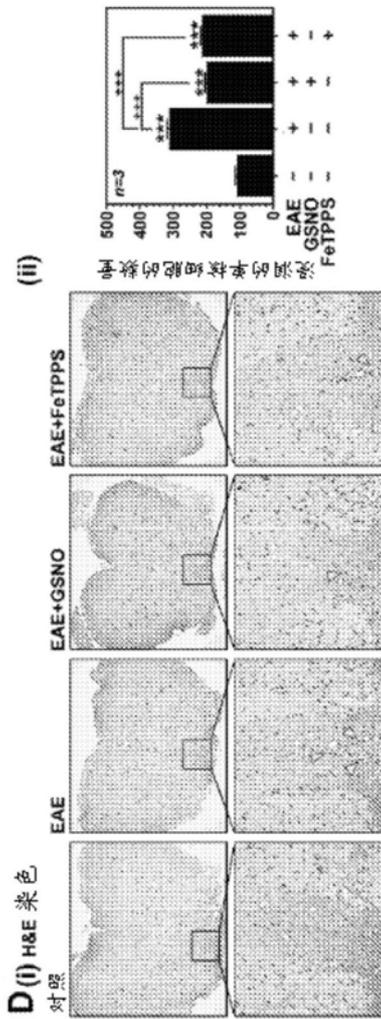


图23D

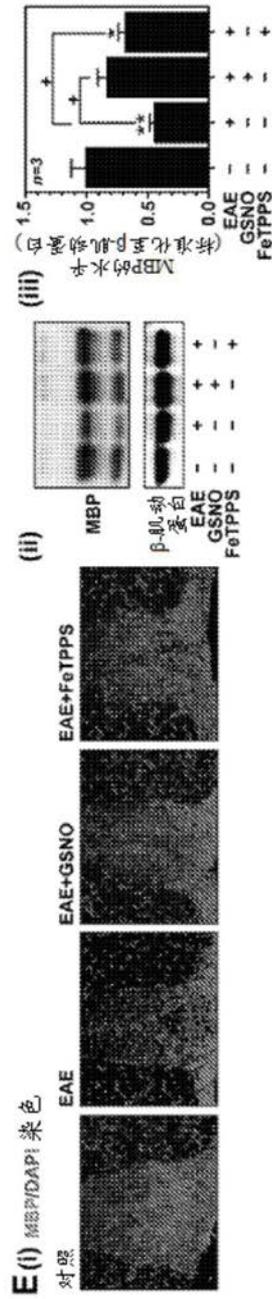


图23E