

文章编号: 1006-3080(2026)02-0193-11

DOI: 10.14135/j.cnki.1006-3080.20250525001

Vamorolone 通过调节 Th17/Treg 细胞平衡改善系统性红斑狼疮小鼠的肾脏损伤

肖运平, 杜思铭, 郝爱静, 黎晓雯, 黄思梦, 王蕊
(华东理工大学药学院, 上海 200237)

摘要: 传统糖皮质激素治疗系统性红斑狼疮虽有效但长期使用副作用严重。本文旨在探究新型解离型类固醇药物 Vamorolone 对系统性红斑狼疮的治疗效果, 并阐明其关键的免疫调节机制。本研究在两种经典的系统性红斑狼疮动物模型中系统地验证了 Vamorolone 的疗效, 为其作为传统糖皮质激素的替代疗法提供了关键的临床前证据。在自发性狼疮 MRL/lpr 和 Pristane 诱导的这两种系统性红斑狼疮小鼠模型中, Vamorolone 均显著提高了小鼠存活率, 降低了血清 anti-dsDNA 抗体水平, 并减少了蛋白尿、血肌酐的含量。肾脏病理学分析显示, Vamorolone 能显著减轻肾小球的细胞增生、基底膜增厚及免疫球蛋白 G(IgG)免疫复合物沉积。Vamorolone 在自发性狼疮 MRL/lpr 模型中主要提高了具有免疫抑制功能的 Treg 细胞水平, 而在 Pristane 诱导模型中则主要降低了促炎性的 Th17 细胞比例, 最终均实现了关键的 Th17/Treg 比值的有效降低。

关键词: 系统性红斑狼疮; Vamorolone; 类固醇药物; Th17 细胞; Treg 细胞

中图分类号: R967

文献标志码: A

系统性红斑狼疮(Systemic Lupus Erythematosus, SLE)是一种复杂且严重的自身免疫性疾病,主要表现为广泛的临床症状,涉及多个器官系统,包括皮肤、关节、肾脏、心血管系统和中枢神经系统^[1-2]等。由于 SLE 的免疫系统广泛受损,导致产生大量自身抗体并形成免疫复合物,沉积于体内多个组织和器官中,进一步激活补体系统,引发炎症反应,最终导致不可逆的器官损伤^[3-5]。SLE 的临床表现各异,每个患者的症状和疾病进展可能不同,因此 SLE 的诊断和治疗具有较大的挑战性^[6-7]。SLE 的患病率在全球范围内呈上升趋势,尤其在女性群体中尤为突出,根据流行病学研究, SLE 的发病率高峰出现在育龄期女性(18~40 岁)中,尤其在亚洲、拉美等国家, SLE 的患病率较高^[8-10]。中国 SLE 的标准化发病率约为每 10 万人 14 例,总体患病率约为每 10 万人 48 例^[11]。尽管 SLE 的五年生存率高达 94%,十年

生存率达到 80% 左右,但患者的长期生存质量仍然较差,尤其在疾病进展至后期,生存率急剧下降,仅有约 30% 的患者能够存活超过 25 年^[12]。因此, SLE 的治疗目标不仅是延长患者的生命,更是改善生活质量,减少器官损伤,控制疾病活动^[13]。

目前,治疗 SLE 的主要策略是通过药物来控制疾病的活跃度和减少器官损伤^[7, 13-14]。糖皮质激素仍然是临床上治疗 SLE 的一线药物,如醋酸泼尼松、甲泼尼龙等,能够有效抑制免疫系统的异常活性,减轻炎症反应^[15]。然而,长期使用糖皮质激素常伴随一系列严重的副作用^[16-17]。大量临床研究表明,糖皮质激素与库欣综合症、骨质疏松、高血糖、高血压和心血管疾病等不良反应密切相关,长期使用激素可能进一步抑制免疫系统,增加感染和器官损伤的风险^[18]。这些副作用严重影响了 SLE 患者的长期治疗效果,并严重影响了患者的生活质量^[19-20]。因此,寻找具有

收稿日期: 2025-05-25

作者简介: 肖运平(1996—),男,江西人,博士生,主要研究方向为免疫药理学。E-mail: yunpxiao@163.com

通信联系人: 王蕊, E-mail: ruiwang@ecust.edu.cn

引用本文: 肖运平,杜思铭,郝爱静,等. Vamorolone 通过调节 Th17/Treg 细胞平衡改善系统性红斑狼疮小鼠的肾脏损伤[J]. 华东理工大学学报(自然科学版), 2026, 52(2): 193-203.

Citation: XIAO Yunping, DU Siming, HAO Aijing, *et al.* Vamorolone Ameliorates Renal Injury in Mice with Systemic Lupus Erythematosus by Modulating Th17/Treg Cell Balance[J]. Journal of East China University of Science and Technology, 2026, 52(2): 193-203.

更好安全性和疗效的替代药物成为 SLE 治疗领域的重要研究方向。

Vamorolone 作为一种新型的解离型类固醇药物,作用机制与糖皮质激素相似,均通过结合糖皮质激素受体来发挥抗炎作用^[21]。然而,Vamorolone 改变了下游活性,并不会像传统激素药物那样引起局部药效增强和相关毒性^[22-23]。研究表明,Vamorolone 并非 11- β -羟基类固醇脱氢酶的底物^[24],因此不容易引发传统激素治疗中常见的副作用,如库欣症状、骨质疏松等^[25-26]。Vamorolone 已被应用于杜氏肌营养不良症(Duchenne muscular dystrophy, DMD)患者的治疗^[27-28];在 DMD 的治疗过程中,Vamorolone 表现出比传统糖皮质激素更好的安全性和疗效,尤其在骨密度和生长方面的优势尤为突出^[22, 29-30]。在需要长期治疗的患者中,Vamorolone 的应用能够有效减少糖皮质激素带来的副作用,提高患者的生活质量,这使得 Vamorolone 成为了潜在的 SLE 治疗替代方案。

本研究通过 MRL/lpr 小鼠模型及 Pristane 诱导模型,评估了 Vamorolone 对 SLE 的治疗效果。结果表明,在这两种 SLE 模型中,Vamorolone 显著降低了小鼠血清中 anti-dsDNA 抗体的水平,减少了肌酐及尿蛋白的含量。此外,肾脏病理分析显示,Vamorolone 能够缓解 SLE 模型小鼠的肾小球损伤,并显著减少免疫球蛋白 G(IgG)的沉积,改善肾功能。进一步的机制研究表明,Vamorolone 通过调节 Th17/Treg 细胞的平衡调控免疫系统的功能,发挥其治疗作用。

1 实验部分

1.1 主要原料与试剂

Pristane 购自美国 Sigma 公司;小鼠 Th1/Th2 细胞检测试剂盒、小鼠 Treg 细胞检测试剂盒购自中国联科生物有限公司;PE-CyTM7-Anti-Mouse IL-17A 抗体、小鼠尿蛋白检测试剂盒购自中国伊莱瑞特生物科技股份有限公司;小鼠 anti-dsDNA 抗体检测试剂盒购自中国华美生物有限公司;小鼠尿素氮检测试剂盒、小鼠肌酐检测试剂盒购自中国建成生物工程研究所;苏木素伊红染色试剂盒购自中国索莱宝科技有限公司;山羊抗小鼠 IgG H&L(FITC)购自美国 abcam 公司;Naive CD4 T Cell Isolation Kit、anti-CD3 ϵ 、anti-CD28 购自美国 Biolegend 公司;Anti-mouse IL-4、Murine IL-12、Murine IL-2、Murine IL-4、Anti-mouse IFN- γ 、Anti-mouse IL-12、Murine IL-6、Human TGF- β 、Murine TNF- α 、Murine IL-1 β 购自美国 Pepro Tech 公司。

1.2 主要仪器

净化工作台(中国上净净化设备有限公司,CA 1390-1 型);二氧化碳培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司, BB150 型);荧光倒置显微镜(德国 Leica 公司, DMIL 型);多功能酶标仪(美国 Bio Tek 公司, Synergy H1 型);流式细胞仪(美国贝克曼公司, CytoFlex LX 型)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验动物 Pristane 诱导的 SLE 模型:8 周龄雌性 BALB/c 小鼠,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司。Control 组 BALB/c 小鼠腹腔注射 0.5 mL 生理盐水,SLE 模型组 BALB/c 小鼠腹腔注射 0.5 mL Pristane。造模开始、第 8 周和第 12 周收集小鼠 24 h 尿液,采用尿蛋白试纸进行尿蛋白半定量检测,评估并记录每只实验小鼠尿蛋白情况。第 12 周根据既往尿蛋白检测结果进行评估,若连续两次检测评分大于 1 分(对应尿蛋白 300 mg/L),则判定该小鼠 SLE 动物模型造模成功。实验随机分为 Model 组和 Vamorolone 组^[21,25,31-32](Vamorolone 质量分数为 20 mg/kg),通过灌胃给药持续 12 周后结束实验。

自发性 SLE 小鼠模型:7 周龄雌性 MRL/lpr 小鼠购自常州卡文斯公司,小鼠适应性饲养 1 周后,随机分为 Model 组和 Vamorolone (20 mg/kg) 组,通过灌胃给药持续 8 周结束实验,雌性 MRL/MPJ 小鼠作为 Control 组(健康组)。

本实验经华东理工大学生物伦理委员会批准(伦理批件:ECUST—2024-022)。所有实验方案都按照美国国立卫生研究院发布的《实验动物护理和使用指南》进行设计和研究。

1.3.2 血清 anti-dsDNA 抗体检测 按照试剂盒说明书操作:酶标孔中加入样本血清或者对照品 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 培养箱静置 30 min,加入洗涤液清洗。加入 100 μ L 酶结合物,37 $^{\circ}$ C 培养箱静置 30 min,加入洗涤液清洗。加入 50 μ L 的底物溶液 A 和 B,37 $^{\circ}$ C 避光反应 10 min。加入 50 μ L 终止液终止反应,在 450 nm 波长处检测吸光度。

1.3.3 血清肌酐检测 按照试剂盒说明书操作:96 孔板中加入 6 μ L 血清或标准品,每孔加 180 μ L 酶溶液 A。在 37 $^{\circ}$ C 条件下反应 5 min,测定 546 nm 处吸光度,记为 A1;每孔加 60 μ L 酶溶液 B,再次在 37 $^{\circ}$ C 反应 5 min,测定 546 nm 处吸光度,记为 A2。A2~A1 即为吸光度变化,结合标准品计算肌酐浓度。

1.3.4 血清尿素氮检测 按照试剂盒说明书操作:在 4 mL 离心管中加入 20 μ L 血清或标准品,同时加入 250 μ L 脲酶缓冲液,在 37 $^{\circ}$ C 水浴锅中反应 10 min。

加入 1 mL 的酚显色剂和碱性次氯酸钠在 37 °C 水浴锅中反应 10 min。640 nm 处测定吸光度,根据标准品的浓度和吸光度计算血清尿素氮浓度。

1.3.5 尿蛋白检测 利用代谢笼收集小鼠 24 h 尿液,按照试剂盒说明书操作:酶标孔中加入 30 μ L 尿液或标准品,各孔中加入 180 μ L 试剂 1,室温静置 5 min。测定 595 nm 吸光度,根据标准品的浓度和吸光度计算尿蛋白浓度。

1.3.6 外周血 Th1/Th2/Th17 细胞流式检测 取 100 μ L 抗凝血加入 100 μ L RPMI-1640 培养基,混匀后加入 0.8 μ L、250 \times 的 PMA/Ionomycin Mixture 和 BFA/Monensin Mixture,37 °C 培养箱孵育 6 h。取 100 μ L 细胞混悬液加入 5 μ L FITC 标记的 Anti-Mouse CD3 ϵ 和 5 μ L PerCP-Cy5.5 标记的 Anti-Mouse CD4 抗体,室温避光孵育 15 min。加入 100 μ L FIX&PERM Medium A 进行红细胞裂解与白细胞固定,室温下保持 15 min。加入流式缓冲液洗涤离心,后用 100 μ L FIX&PERM Medium B 重悬细胞,加入 5 μ L PE 标记的 Anti-Mouse IFN- γ 、5 μ L APC 标记的 Anti-Mouse IL-4 和 5 μ L PE-CyTM7 标记的 Anti-Mouse IL-17,室温孵育 15 min,再加入流式缓冲液洗涤离心。用 500 μ L 流式缓冲液重悬细胞,立即上机检测。

1.3.7 外周血 Treg 细胞流式检测 取 100 μ L 抗凝血加入 5 μ L FITC 标记的 Anti-Mouse CD4 和 5 μ L APC (别藻蓝蛋白)标记的 Anti-Mouse CD25 抗体,室温避光孵育 15 min。加入 2 mL 红细胞裂解液,室温裂解 15 min,后加入流式缓冲液终止裂解并洗涤。加入 1 mL 固定破膜工作液,室温放置 1 h,后用破膜缓冲液洗涤。用 100 μ L 破膜缓冲液重悬细胞,加入 5 μ L PE 标记的 Anti-Mouse FoxP3 抗体,室温孵育 30 min。加入破膜缓冲液洗涤离心,用 500 μ L 流式缓冲液重悬细胞,立即上机检测。

1.3.8 H&E 染色 石蜡切片在二甲苯中浸泡 2 次,每次 10 min 进行脱蜡。依次分别在 ϕ 为 100%、95%、80%、75% 乙醇中各浸泡 5 min 复水,PBS 振荡洗涤。滴加苏木素染液染核 5 min,冲洗后滴加盐酸乙醇分化液 10 s,流水冲洗至出现清晰均匀的蓝色 10 min。滴加伊红染液染色 10 s,PBS 振荡洗涤。石蜡切片依次置于蒸馏水、75% 乙醇、80% 乙醇、95% 乙醇、100% 乙醇、二甲苯中各浸泡 5 min 进行脱水透明处理,滴加中性树脂封片。

1.3.9 PAS 染色 石蜡切片脱蜡复水步骤同 H&E 染色。石蜡切片滴加过碘酸溶液覆盖组织,避光孵育 10 min,蒸馏水冲洗并洗涤。滴加 Schiff 试剂,37 °C 避光孵育 1 h,蒸馏水冲洗并洗涤。滴加苏木素染色

液 10 s,蒸馏水冲洗,滴加盐酸乙醇分化液 10 s,流水反蓝 10 min。切片脱水透明及封片步骤同 H&E 染色。

1.3.10 免疫荧光染色 石蜡切片按 H&E 染色步骤脱蜡复水后,浸泡在抗原修复液中。微波中火加热 8 min,取出晾凉 7 min,再次加热 8 min,自然冷却至室温。PBS 洗涤后加入 5%(体积分数)山羊血清室温孵育 30 min,甩去血清后加 anti-IgG H&L(FITC)抗体,4 °C 孵育过夜,PBS 洗涤。滴加含 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)的抗荧光猝灭剂,避光室温孵育 5 min,盖玻片封片。

1.3.11 脾脏淋巴细胞提取 无菌条件下取小鼠脾脏,放入 70 μ m 细胞筛中,剪碎后边研磨边用 RPMI-1640 培养基冲洗,细胞通过筛网过滤至 50 mL 离心管,离心收集细胞。弃上清后加入 3 mL 红细胞裂解液,混匀室温放置 5 min,加入 6 mL RPMI-1640 培养基终止裂解。再次离心收集白细胞重悬,调整细胞浓度为 1×10^8 个/mL。

1.3.12 Naïve CD4⁺ T 细胞的提取分离 在分选管中加入 200 μ L、 1×10^8 个/mL 的淋巴细胞悬液和 20 μ L 生物素抗体混合液,冰上孵育 15 min。加入 20 μ L 的链霉亲和素纳米磁珠,冰上孵育 15 min。加入 2.5 mL 的 PBS,冰上孵育 30 min。将分选管放在磁极中,上下移动 5 min,磁珠与非 CD4⁺ T 细胞结合,倒出液体,收集上清液。合并上清液后离心,底部沉淀为 CD4⁺ T 细胞。用 RPMI-1640 培养基重悬并调整浓度为 1×10^6 个/mL。

1.3.13 Naïve CD4⁺ T 细胞分化 CD4⁺ T 细胞调整细胞浓度为 1×10^6 个/mL。CD3 ϵ 和 CD28 预先铺板:Th1、Th2 和 Treg 这 3 种细胞使用 1 μ g/mL 的 CD3 ϵ 和 CD28 预先铺板,Th17 细胞铺板质量浓度为 CD3 ϵ 2 μ g/mL,CD28 5 μ g/mL,96 孔板中预先加入 50 μ L 的 CD3 ϵ 和 CD28。37 °C 培养箱中孵育 2 h,弃上清后 PBS 清洗。Th1 细胞培养条件为 IL-12 10 ng/mL、IL-2 10 ng/mL、anti-IL-4 10 μ g/mL。Th2 细胞培养条件为 IL-4 10 ng/mL,IL-2 5 ng/mL,anti-IFN- γ 10 μ g/mL,anti-IL-12 10 μ g/mL。Th17 细胞培养条件为 IL-6 30 ng/mL,TGF- β 3 ng/mL,TNF- α 10 ng/mL,IL-1 β 10 ng/mL,anti-IFN- γ 5 μ g/mL,anti-IL-4 5 μ g/mL。Treg 细胞培养条件为 IL-2 5 ng/mL,TGF- β 3 ng/mL。以上细胞铺板结束后放置在 37 °C 培养箱中,加入 0.1、1、10 μ mol/L 的 Vamorolone 进行干预,48 h 进行半量换液,96 h 收集细胞检测。

1.3.14 数据分析及处理 所有的实验数据均采用 Graphpad Prism 9.0 进行统计分析,使用 Student's t-tests 及单因素 One-Way ANOVA 进行分析,所有结

果以平均值 \pm 标准误差(SEM)表示。 $p < 0.05$ 表示数据在统计学上具有显著性差异,*表示 $p < 0.05$; **表示 $p < 0.01$, ***表示 $p < 0.001$, ****表示 $p < 0.0001$ 。免疫荧光图像使用 Image J、Graphpad Prism 9.0 进行分析。

2 结果与讨论

2.1 Pristane 诱导 SLE 模型

为了探究 Vamorolone 在病理生理条件下对 SLE 的缓解作用,本研究向 20 只雌性 BALB/c 小鼠腹腔内注射 Pristane 以诱导小鼠狼疮性肾炎。定期收集小鼠 24 h 尿液,采用尿蛋白试纸进行尿蛋白半定量检测,根据反应区显色程度判断尿蛋白阴性(-)、100 mg/L(\pm)、300 mg/L(+)、1000 mg/L(++), 3000 mg/L(+++), 20000 mg/L(++++)。

如表 1 所示,模型组于注射 Pristane 后 8 周开始出现蛋白尿,多为 \pm 或+,随时间推移,蛋白尿的阳性率和尿蛋白量增加,造模 12 周时,50%的小鼠尿蛋白质量浓度超过 300 mg/L,30%的小鼠尿蛋白质量

浓度超过 1000 mg/L,Control 组尿蛋白质量浓度低于 100 mg/L,不随时间改变而增加。采用尿蛋白检测试剂盒对模型组小鼠进行定量检测,结果表明造模 12 周后 16 只小鼠 24 h 尿蛋白含量显著高于 Control 组(图 1(a)),且模型组小鼠出现明显的腹部毛发脱落(图 1(b))。综合以上结果判定这 16 只小鼠 SLE 动物模型造模成功。

2.2 Vamorolone 对 SLE 小鼠模型存活率的影响

为了评价 Vamorolone 对 SLE 的治疗效果,本研究选择了自发性 SLE 模型 MRL/lpr 小鼠以及 Pristane 诱导的 SLE 小鼠模型进行药效评价。

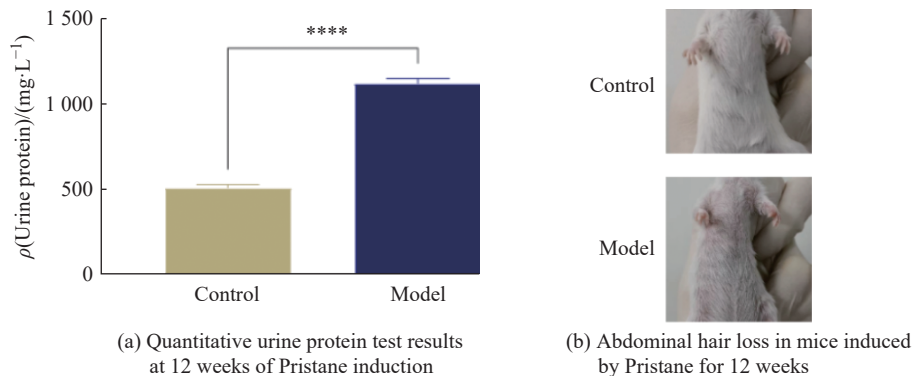
16 只 8 周龄的雌性 MRL/lpr 自发性 SLE 小鼠随机分成 Model 组和 Vamorolone 组,8 只 8 周龄的雌性 MRL/MPJ 小鼠作为 Control 组。Vamorolone 组通过灌胃给药进行治疗,持续给药 8 周。实验结束时统计各组小鼠的死亡率,Model 组死亡 1 只,MRL/MPJ 组和 Vamorolone 组无小鼠死亡(图 2(a))。这表明 Vamorolone 可降低 MRL/lpr 小鼠的死亡率。

16 只 SLE 模型造模成功的 BALB/c 小鼠按照尿蛋白结果平均分成 Model 组和 Vamorolone 组,每组 8 只,

表 1 小鼠尿蛋白跟踪监测数据

Table 1 Urinary protein monitoring data in mice

Time	Group	Number	Percentage of mice/%					
			-	\pm	+	++	+++	++++
Pre-induction	Control	10	100.0	0	0	0	0	0
	Model	20	100.0	0	0	0	0	0
Induction 8 weeks	Control	10	70.0	30.0	0	0	0	0
	Model	20	20.0	40.0	40.0	0	0	0
Induction 12 weeks	Control	10	80.0	20.0	0	0	0	0
	Model	20	0	20.0	50.0	30.0	0	0



Data are presented as mean \pm standard error of mean (SEM); **** $p < 0.0001$ compared to the model group; Control group $n=8$; Model group $n=16$

图 1 Pristane 诱导小鼠的成模情况

Fig. 1 Pristane-induced modelling in mice

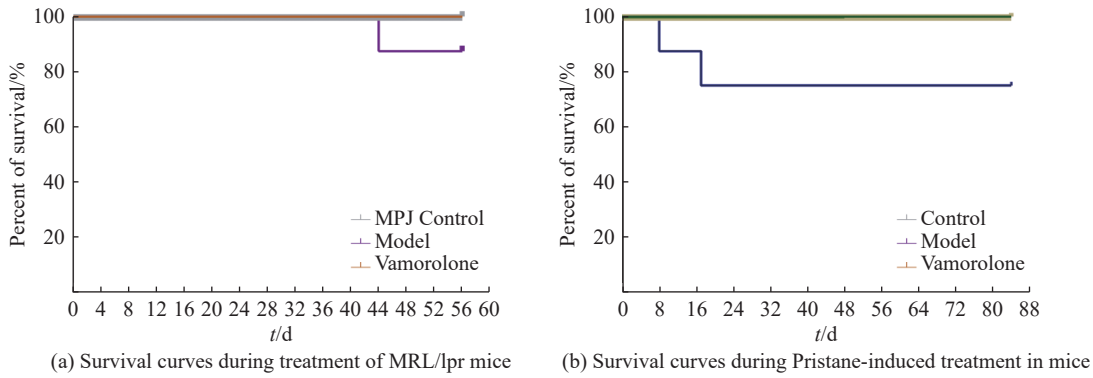


图 2 MRL/lpr 小鼠和 Pristane 诱导的小鼠治疗期间的生存曲线(n=8)

Fig. 2 Survival curves during treatment in MRL/lpr mice and Pristane-induced mice (n=8)

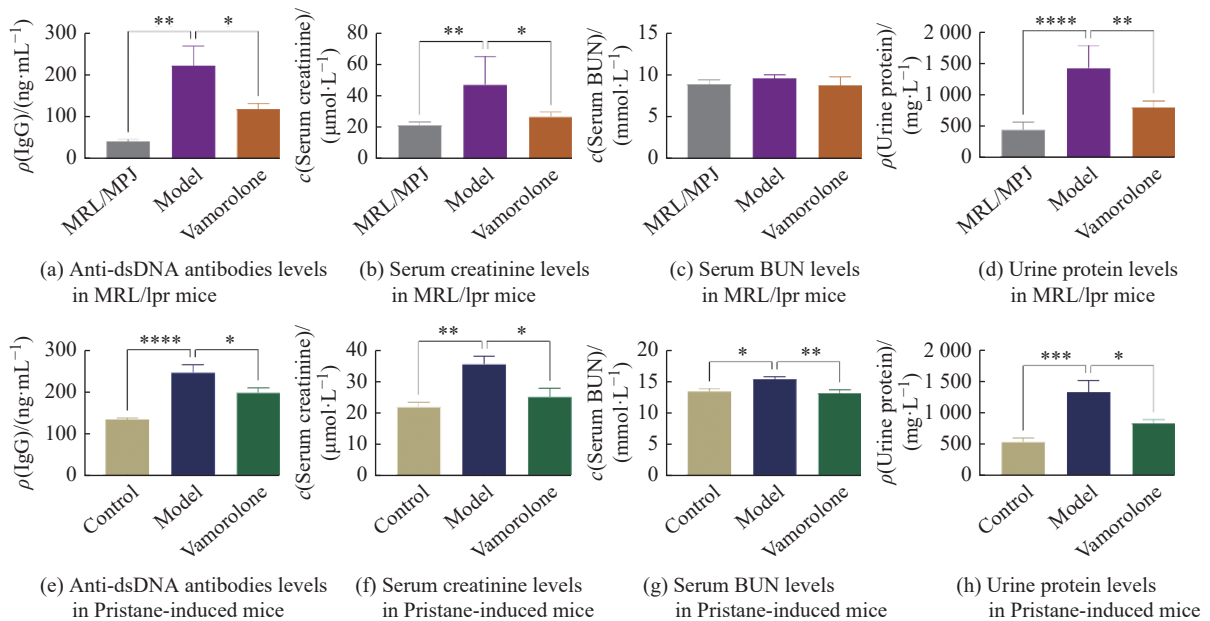
8 只雌性 BALB/c 小鼠作为 Control 组。Vamorolone 组通过灌胃给药进行治疗,持续给药 12 周。实验结束时统计各组小鼠的死亡率, Model 组死亡 2 只, Control 组和 Vamorolone 组无小鼠死亡(图 2(b))。这表明 Vamorolone 可降低 Pristane 诱导的 SLE 小鼠的死亡率。

2.3 Vamorolone 对 SLE 小鼠模型的 anti-dsDNA 抗体水平及肾损伤指标的影响

血清中 anti-dsDNA 抗体可作为判断狼疮严重程度病理指标, 给药结束后检测 MRL/lpr 模型各组小鼠血清 anti-dsDNA 抗体水平, Model 组小鼠血清 anti-dsDNA 抗体显著高于 MRL/MPJ 组, Vamorolone 组可明显降低血清 anti-dsDNA 抗体的水平(图 3(a))。血清肌酐和血尿素氮在肾功能正常机体内含量极

低,但是当肾功能受到损伤导致滤过能力减弱时,肾脏无法滤出血清肌酐和血尿素氮导致其滞留在血液中,含量升高。通过检测发现,与 MRL/MPJ 组相比, Model 组血清肌酐水平升高,经过 Vamorolone 治疗后,血清肌酐水平显著降低(图 3(b))。各组血尿素氮水平无显著差异(图 3(c))。尿蛋白存在于尿液中,正常情况下其水平极低,其水平上升可作为肾损伤的早期标志。利用尿蛋白检测试剂盒检测各组小鼠尿蛋白水平, Model 组小鼠尿蛋白显著高于 MRL/MPJ 组, Vamorolone 组可降低尿蛋白水平(图 3(d))。

在 Pristane 诱导的 SLE 小鼠模型中, Vamorolone 可降低血清 anti-dsDNA 抗体的水平(图 3(e))、血清肌酐水平(图 3(f))、血尿素氮水平(图 3(g))及尿蛋



Data are presented as mean ± standard error (SEM), **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001, *****p* < 0.0001 compared to the model group

图 3 MRL/lpr 小鼠 (MRL/MPJ 组 *n*=8, Vamorolone 组 *n*=8, Model 组 *n*=7) 和 Pristane 诱导的小鼠 (Control 组 *n*=8, Vamorolone 组 *n*=8, Model 组 *n*=6) 经过 Vamorolone 治疗后血液及尿液变化

Fig. 3 Changes in blood and urine-related indices in MRL/lpr mice (MRL/MPJ group *n*=8, Vamorolone group *n*=8, Model group *n*=7) and Pristane-induced mice (Control group *n*=8, Vamorolone group *n*=8, Model group *n*=6) treated with Vamorolone

白水平(图 3(h))。

2.4 Vamorolone 对 SLE 小鼠肾脏病理损伤的影响

SLE 导致的肾功能损伤最后会导致肾脏出现病理性变化,尤其是肾小球内皮细胞增生、基底膜增厚和炎症等。H&E 染色和 PAS 染色可观察到肾小球病变。在 MRL/lpr 模型中,未经治疗的 Model 组小鼠出现肾小球内皮细胞和系膜细胞增生、基底膜增厚,且肾间质出现炎性细胞浸润,表现出较为严重的肾脏损伤。MRL/MPJ 组则未见明显的肾小球变化,未出现肾脏损伤。Vamorolone 组的肾脏损伤与 Model 组相比,肾小球病变减轻,表现为内皮细胞和系膜细胞增生减少,未见明显炎性细胞浸润,表明 Vamorolone

可对 MRL/lpr 小鼠的肾脏损伤具有改善作用(图 4(a))。

在 Pristane 诱导的 SLE 小鼠模型中同样观察到 Model 组出现肾小球内皮细胞和系膜细胞增生、基底膜增厚,以及肾间质出现炎性细胞浸润等病变,Vamorolone 治疗后可减轻肾脏损伤(图 4(b))。

为了进一步研究 Vamorolone 对 MRL/lpr 小鼠肾脏损伤的保护作用,本研究通过免疫荧光检测了 MRL/lpr 小鼠肾小球 IgG 的沉积情况(图 5),发现 Model 组肾小球 IgG 沉积较为严重。经过 Vamorolone 的治疗,可减轻 IgG 在肾脏的沉积(图 5(a))。对 IgG 阳性信号进行统计分析,Vamorolone 组 IgG 阳性信号显著低于 Model 组(图 5(b))。Vamorolone 在 Pristane

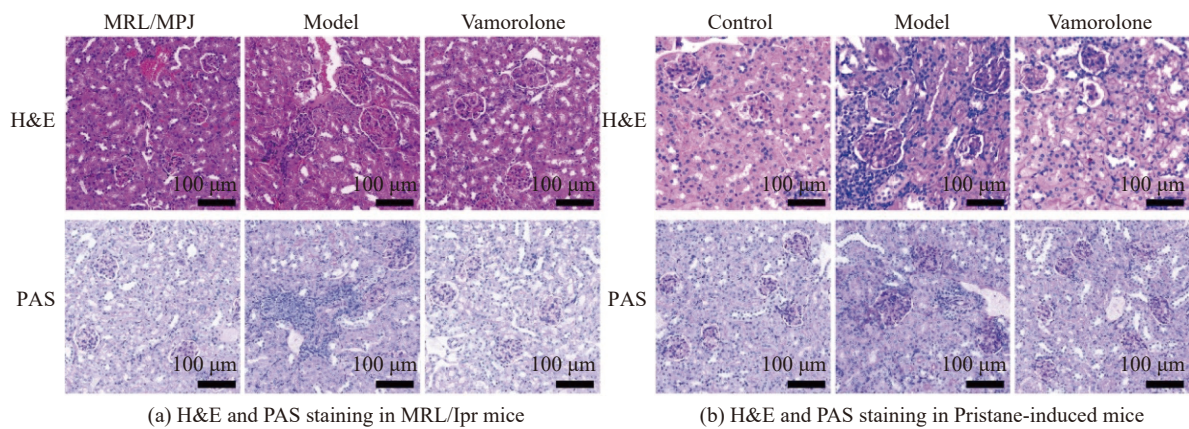
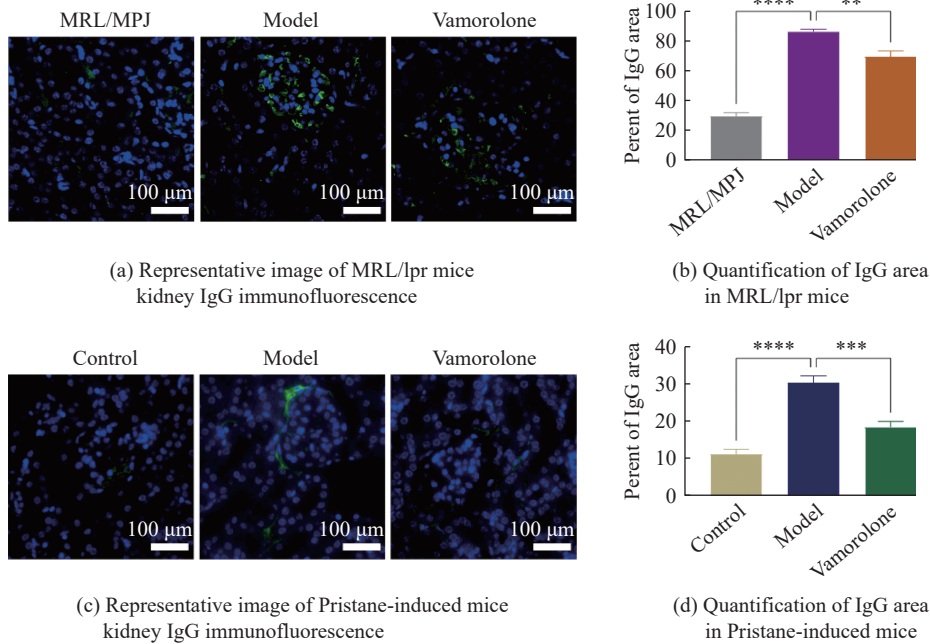


图 4 MRL/lpr 小鼠和 Pristane 诱导小鼠经 Vamorolone 治疗后肾组织 H&E 及 PAS 染色图

Fig. 4 Representative images of H&E and PAS staining of renal tissues in MRL/lpr mice and Pristane-induced mice treated with Vamorolone



MRL/MPJ group $n=8$, Vamorolone group $n=8$, Model group $n=7$; Control group $n=8$; Data are presented as mean \pm standard error (SEM), $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, $****p < 0.0001$ compared to model group

图 5 MRL/lpr 小鼠和 Pristane 诱导小鼠经 Vamorolone 治疗后肾组织 IgG 沉积变化

Fig. 5 Changes in renal tissue IgG deposition in MRL/lpr mice and Pristane-induced mice treated with Vamorolone

诱导的 SLE 小鼠模型中, 同样可减轻 IgG 在肾脏的沉积(图 5(c),(d))。

2.5 Vamorolone 调控 SLE 小鼠模型外周血 Th17/Treg 细胞平衡

SLE 作为自身免疫性疾病, 多项研究显示 Th 细胞平衡在其发病过程中发挥重要作用。Th1 和 Th17 细胞可通过分泌促炎细胞因子促进 SLE 疾病的发展, 而 Th2 和 Treg 细胞可通过分泌抗炎细胞因子拮抗 Th1 和 Th17 细胞的作用, Th1/Th2 和 Th17/Treg 平衡在调控免疫系统平衡中发挥着重要作用。

为了进一步研究 Vamorolone 对 MRL/lpr 小鼠免疫系统的调节作用, 给药结束后检测小鼠外周血的 Th1、Th2、Th17、Treg 细胞变化。与 MRL/MPJ 组相比, Model 组 Th1、Th2 细胞含量以及 Th1/Th2 比值显著升高, Vamorolone 组对 Th1、Th2 细胞含量及 Th1 和 Th2 细胞数量之比(Th1/Th2)无调控作用(图 6(a), (b), (d), (e))。与 MRL/MPJ 组相比,

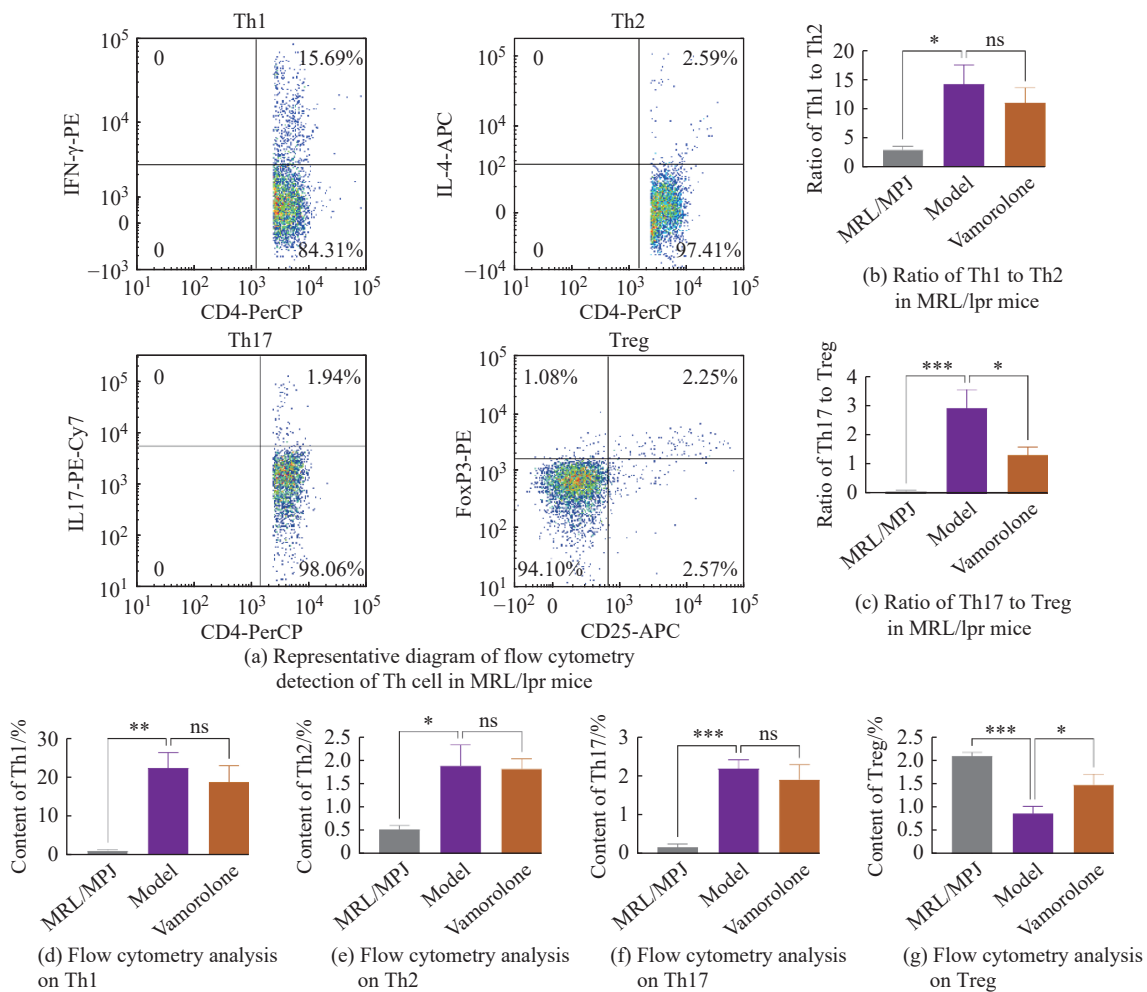
Model 组 Th17 细胞含量显著升高, Treg 细胞含量显著降低, Th17 和 Treg 细胞数量之比(Th17/Treg)升高, Vamorolone 组对 Th17 细胞含量也无调控作用, 但是可显著升高 Treg 细胞含量, 并降低 Th17/Treg 比值(图 6(a), (c), (f), (g))。

在 Pristane 诱导的 SLE 小鼠模型中, Vamorolone 同样对 Th1、Th2、Th1/Th2 比值无影响(图 7(a), (b), (d), (e))。Vamorolone 对 Treg 细胞也无影响, 但是可降低 Th17 细胞的含量, 同时降低 Th17/Treg 比值(图 7(a), (c), (f), (g))。

综合 Vamorolone 对 MRL/lpr 自发性 SLE 小鼠模型和 Pristane 诱导的 SLE 小鼠模型中 Th 细胞的调控作用, 可知 Vamorolone 可通过调控 Th17/Treg 细胞平衡发挥对 SLE 的治疗作用。

2.6 Vamorolone 对 naïve CD4⁺ T 细胞分化的影响

在 SLE 小鼠模型的药效评价中, Vamorolone 表现出通过调节 Th17/Treg 平衡来实现其治疗效果。



Data are presented as mean \pm standard error (SEM), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to model group; MRL/MPJ group $n=8$, Vamorolone group $n=8$, Model group $n=7$

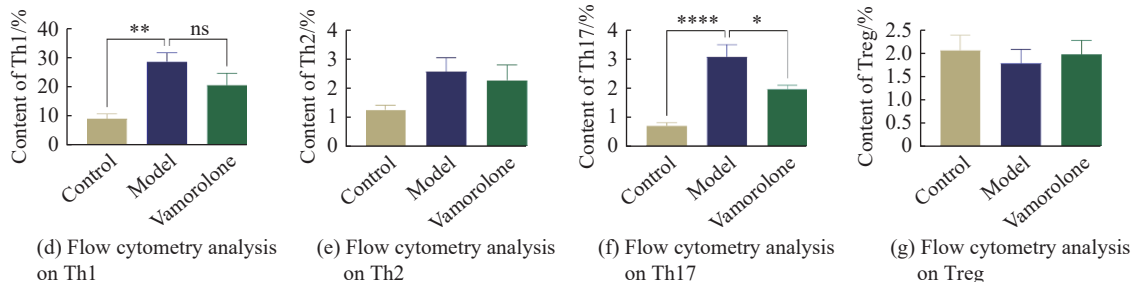
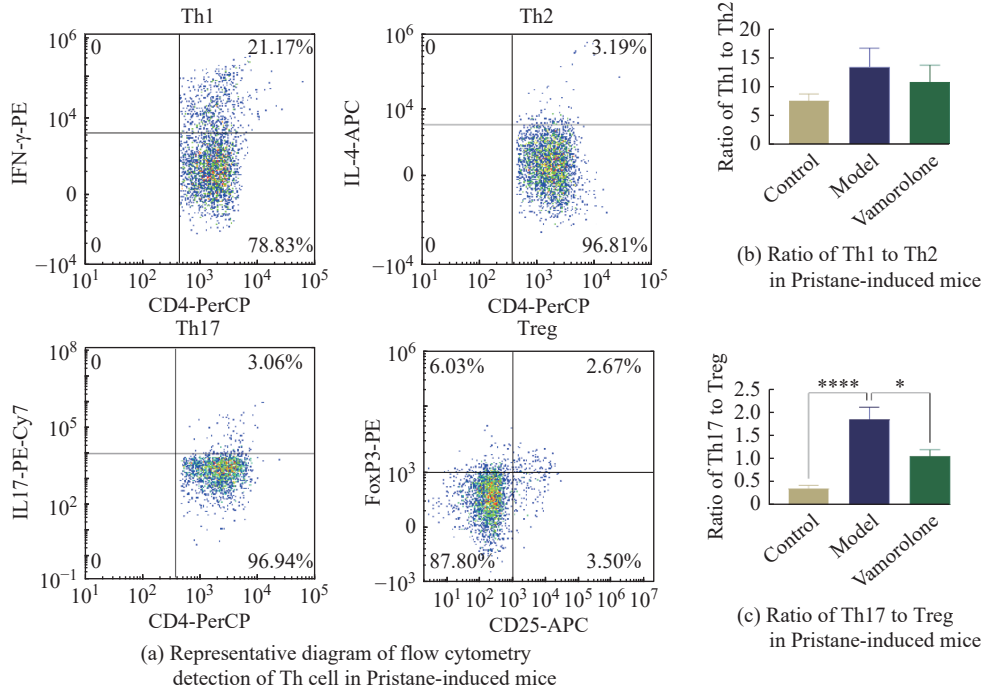
图 6 MRL/lpr 小鼠经 Vamorolone 治疗后外周血 Th 细胞变化

Fig. 6 Peripheral blood Th cell changes in MRL/lpr mice treated with vamorolone

本研究进一步在体外细胞水平上验证 Vamorolone 对 Th 细胞亚群的调控作用。

用 naïve T 细胞分选试剂盒从小鼠脾脏中分选出 naïve CD4⁺ T 细胞, 添加细胞因子刺激其分化为

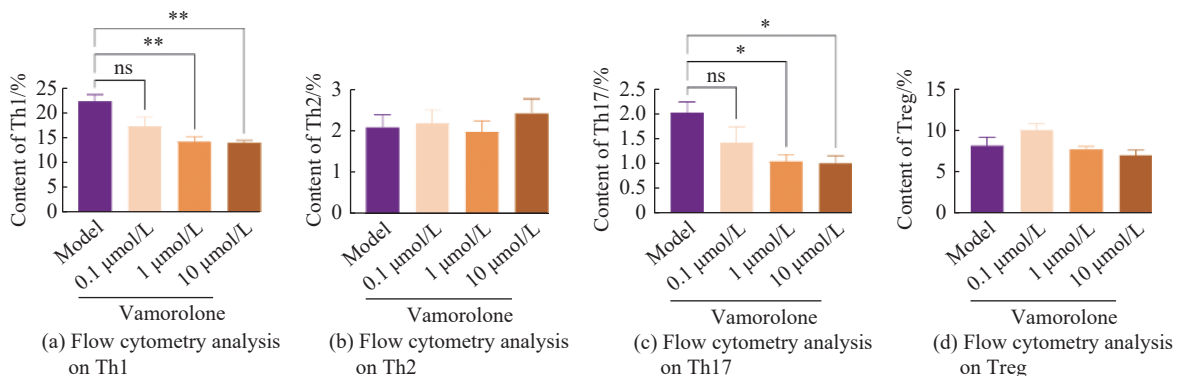
Th1、Th2、Th17、Treg 细胞, 同时加入 0.1、1、10 μmol/L 的 Vamorolone 进行干预, 96 h 后收集细胞检测。1、10 μmol/L Vamorolone 可降低 Th1 和 Th17 细胞水平(图 8(a), (c)), 对 Th2、Treg 细胞水平无影响(图 8(b),



Control group $n=8$, Vamorolone group $n=8$, Model group $n=6$; Data are presented as mean \pm standard error of mean (SEM), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.001$ compared to model group

图 7 Pristane 诱导的小鼠经 Vamorolone 治疗后外周血 Th 细胞变化

Fig. 7 Peripheral blood Th cell changes in Pristane-induced mice treated with Vamorolone



Data are presented as mean \pm standard error (SEM), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to model group

图 8 Vamorolone 对 naïve CD4⁺ T 细胞分化的调控($n=3$)

Fig. 8 Regulation of naïve CD4⁺ T cell differentiation by Vamorolone ($n=3$)

(d))。以上结果显示在体外细胞实验中, Vamorolone 可调控 Th1、Th17 细胞的分化。在 SLE 小鼠模型中未观察到 Vamorolone 对 Th1 细胞的调控作用,可能是由于动物模型相比于细胞模型,其免疫调控更为复杂。综合动物和细胞水平的验证结果,本研究认为 Vamorolone 主要通过调节 Th17/Treg 平衡发挥对 SLE 的治疗作用。

3 结束语

本研究在两种经典 SLE 小鼠模型(自发性 MRL/lpr 模型和 Pristane 诱导模型)中系统地评估了 Vamorolone 的治疗潜力,并初步探讨其免疫调节机制。研究结果显示, Vamorolone 在两种不同病理机制的 SLE 模型中均表现出显著的治疗效果。Vamorolone 有效降低了血清 anti-dsDNA 抗体水平,改善了蛋白尿、血肌酐等肾功能损伤指标,并减轻了肾小球的病理损伤及免疫复合物沉积,从而延缓了疾病进展并显著提高小鼠生存率。

本研究显示 Vamorolone 通过调节 Th17/Treg 细胞平衡发挥免疫调节作用,但在不同模型中侧重点有所不同。在 MRL/lpr 小鼠中, Vamorolone 主要提升 Treg 细胞比例;而在 Pristane 诱导模型中,它则主要通过抑制 Th17 细胞来降低 Th17/Treg 比值。这种差异性可能源于两种模型不同的病理进程。MRL/lpr 小鼠因 Fas 基因缺失,导致自身反应性淋巴细胞无法清除,从而引起淋巴增生和自身免疫。而 Pristane 则类似佐剂,通过诱导单核吞噬细胞吞噬和淋巴细胞增殖,启动 T、B 细胞高度活化和自身抗体产生。虽然两种模型发病机制不同,但 T 细胞亚群失衡,尤其是 Th17/Treg 轴紊乱是 SLE 发病的共同关键^[31]。Vamorolone 通过恢复 Th17/Treg 轴平衡进而恢复整体免疫稳态。我们推测, Vamorolone 能根据 MRL/lpr 和 Pristane 模型中疾病发生机制和主要免疫细胞参与的差异,针对性地调节 Th17/Treg 轴的不同组分,从而有效恢复整体免疫稳态。

本研究采用 20 mg/kg 的 Vamorolone,该剂量基于其在杜氏肌营养不良症等其他疾病中确认的有效性和安全性^[21,25,31-32]。实验周期内, Vamorolone 治疗组小鼠的生存率均高于模型组,未见明显药物相关毒性或额外死亡,推测其耐受性较好。虽然本研究未检测详细的系统性毒性(如肝功能、骨密度等),也未设置完整剂量-效应曲线与阳性对照组,但结合既有证据, Vamorolone 在 SLE 的安全性仍具优势。

此外, Vamorolone 在体内外实验均能有效调节

Th17 和 Treg 细胞亚群,但对 Th1 细胞的调节出现了体内外不一致:体外实验可见其抑制 Th1 细胞分化,动物实验中则未观察到显著影响。这一差异反映了体内免疫环境的高度复杂性^[32]。Vamorolone 作为类固醇药物可通过多靶点对免疫细胞功能产生影响,且体内存在诸多补偿和交叉调节机制^[33],可能削弱了其对 Th1 细胞的直接作用。综合来看, Vamorolone 对 Th17/Treg 轴的持续、显著调节,可能是其发挥 SLE 治疗作用的主要机制;而 Th1 细胞的非显著改变则提示其他机制可缓冲其单一靶点调控效应。

综上,本研究首次证实 Vamorolone 在两种经典 SLE 动物模型中均具有明显的治疗效果,通过调节 Th17/Treg 细胞平衡,显著改善了肾脏损伤和疾病进展,且表现出良好的耐受性和安全性趋势。这为 Vamorolone 作为新型、可能更安全的糖皮质激素替代或联合治疗药物应用于 SLE 提供了有力的临床前证据。未来需开展多剂量阳性药物对照和更全面的安全性评估,并深入解析 Vamorolone 在体内调控多个免疫亚群、维持免疫稳态的分子机制,以期为其临床应用和个体化治疗奠定基础。

参考文献:

- [1] FANOURIAKIS A, TZIOLOS N, BERTSIAS G, *et al.* Update on the diagnosis and management of systemic lupus erythematosus[J]. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2021, 80(1): 14-25.
- [2] FAVA A, PETRI M. Systemic lupus erythematosus: Diagnosis and clinical management[J]. *Journal of Autoimmunity*, 2019, 96(2): 1-13.
- [3] KIRIAKIDOU M, CHING C L. Systemic lupus erythematosus[J]. *Annals of Internal Medicine*, 2020, 172(11): ITC81-ITC94.
- [4] CROW M K. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus: Risks, mechanisms and therapeutic targets[J]. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2023, 82(8): 999-1014.
- [5] CAIELLI S, WAN Z R, PASCUAL V. Systemic lupus erythematosus pathogenesis: Interferon and beyond[J]. *Annual Review of Immunology*, 2023, 41(1): 533-560.
- [6] PISETSKY D S. Pathogenesis of autoimmune disease[J]. *Nature Reviews Nephrology*, 2023, 19(8): 509-524.
- [7] KATARZYNA P B, WIKTOR S, EWA D, *et al.* Current treatment of systemic lupus erythematosus: A clinician's perspective[J]. *Rheumatology International*, 2023, 43(8): 1395-1407.
- [8] TIAN J, ZHANG D, YAO X, *et al.* Global epidemiology of systemic lupus erythematosus: A comprehensive systematic analysis and modelling study[J]. *Annals of the Rheuma-*

- tic Diseases, 2023, 82(3): 351-356.
- [9] BORCHERS A T, NAGUWA S M, SHOENFELD Y, *et al.* The geoepidemiology of systemic lupus erythematosus[J]. *Autoimmunity Reviews*, 2010, 9(5): A277-A287.
- [10] ZUCCHI D, SILVAGNI E, ELEFANTE E, *et al.* Systemic lupus erythematosus: One year in review 2023[J]. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 2023, 41(5): 997-1008.
- [11] LI M, LI C, CAO M, *et al.* Incidence and prevalence of systemic lupus erythematosus in urban China, 2013-2017: A nationwide population-based study[J]. *Science Bulletin*, 2024, 69(19): 3089-3097.
- [12] AMEER M A, CHAUDHRY H, MUSHTAQ J, *et al.* An overview of systemic lupus erythematosus (SLE) pathogenesis, classification, and management[J]. *Cureus*, 2022, 14(10): e30330.
- [13] MORAND E F, FERNANDEZ R, BLAZER A, *et al.* Advances in the management of systemic lupus erythematosus[J]. *Bmj-British Medical Journal*, 2023, 383(3): e073980.
- [14] BASTA F, FASOLA F, TRIANTAFYLLIAS K, *et al.* Systemic Lupus Erythematosus (SLE) therapy: The old and the new[J]. *Rheumatology and Therapy*, 2020, 7(3): 433-446.
- [15] LAZAR S, KAHLENBERG J M. Systemic lupus erythematosus: New diagnostic and therapeutic approaches[J]. *Annual Review of Medicine*, 2023, 74: 339-352.
- [16] HOI A, IGEL T, MOK C, *et al.* Systemic lupus erythematosus[J]. *Lancet*, 2024, 403(10441): 2326-2338.
- [17] SANCHEZ A, VOSKUYLA E, VOLLENHOVEN R E. Treat-to-target in systemic lupus erythematosus: Advancing towards its implementation[J]. *Nature Reviews Rheumatology*, 2022, 18(3): 146-157.
- [18] APOSTOLOPOULOS D, KANDANE R, LOUTHRENOO W, *et al.* Factors associated with damage accrual in patients with systemic lupus erythematosus with no clinical or serological disease activity: A multicentre cohort study[J]. *Lancet Rheumatology*, 2020, 2(1): E24-E30.
- [19] FANOURIAKIS A, KOSTOPOULOU M, ANDERSEN J, *et al.* EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus: 2023 update[J]. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2024, 83(1): 15-29.
- [20] XIPELL M, LLEDO G M, EGAN A C, *et al.* From systemic lupus erythematosus to lupus nephritis: The evolving road to targeted therapies[J]. *Autoimmunity Reviews*, 2023, 22(10): 103404.
- [21] DAMSKER J M, CORNISH M R, KANNEBOYINA P, *et al.* Vamorolone, a dissociative steroidal compound, reduces collagen antibody-induced joint damage and inflammation when administered after disease onset[J]. *Inflammation Research*, 2019, 68(11): 969-980.
- [22] CONKLIN L S, DAMSKER J M, HOFFMAN E P, *et al.* Phase IIa trial in Duchenne muscular dystrophy shows vamorolone is a first-in-class dissociative steroidal anti-inflammatory drug[J]. *Pharmacological Research*, 2018, 136(1): 140-150.
- [23] HOFFMAN E P, RIDDLE V, SIEGLER M A, *et al.* Phase I trial of vamorolone, a first-in-class steroid, shows improvements in side effects via biomarkers bridged to clinical outcomes[J]. *Steroids*, 2018, 134(2): 43-52.
- [24] GRAS J. Vamorolone Δ -9, 11 glucocorticoid analogue dissociative steroid treatment of Duchenne muscular dystrophy[J]. *Drugs of the Future*, 2021, 46(8): 621-629.
- [25] CRASTIN A, SHANKER A, SAGMEISTER M S, *et al.* Vamorolone: A novel metabolism resistant steroid that suppresses joint destruction in chronic polyarthritis with reduced systemic side effects[J]. *Rheumatology*, 2025, 2(1): keaf129.
- [26] ELHALAG R H, MOTAWEA K R, TALAT N E, *et al.* Efficacy of vamorolone in treatment of Duchene muscle dystrophy: A meta-analysis[J]. *Frontiers in Neurology*, 2023, 14(1): 1107474.
- [27] KEAM S J. Vamorolone: First approval[J]. *Drugs*, 2024, 84(1): 111-117.
- [28] CLEMENS P, GUGLIERI M, MORGENROTH L, *et al.* Drug development of vamorolone for Duchenne muscular dystrophy[J]. *Neuromuscular Disorders*, 2017, 27(2): S217-S218.
- [29] PASCUAL C, LUCERON M, MARTINEZ I, *et al.* Efficacy and safety of vamorolone in duchenne muscular dystrophy: A systematic review[J]. *Pediatric Drugs*, 2024, 26(6): 695-707.
- [30] GROUNDS M D, LLOYD E M. Considering the promise of vamorolone for treating Duchenne muscular dystrophy[J]. *Journal of Neuromuscular Diseases*, 2023, 10(6): 1013-1030.
- [31] SHAN J, JIN H, XU Y. T cell metabolism: A new perspective on Th17/Treg cell imbalance in systemic lupus erythematosus[J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11(3): 1027.
- [32] HUANG Y, WU Q, TAM P K H. Immunomodulatory mechanisms of mesenchymal stem cells and their potential clinical applications[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(17): 10023.
- [33] STREHL C, EHLERS L, GABER T, *et al.* Glucocorticoids—all-rounders tackling the versatile players of the immune system[J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10(2): 1744.

Vamorolone Ameliorates Renal Injury in Mice with Systemic Lupus Erythematosus by Modulating Th17/Treg Cell Balance

XIAO Yunping, DU Siming, HAO Aijing, LI Xiaowen, HUANG Simeng, WANG Rui
(School of Pharmacy, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: While traditional glucocorticoids are effective in treating systemic lupus erythematosus (SLE), their long-term use is associated with severe side effects. This study aims to explore the therapeutic effects of the novel dissociative steroid Vamorolone on SLE and elucidate its key immunomodulatory mechanisms. We systematically evaluated the efficacy of Vamorolone in two classical SLE animal models, providing critical preclinical evidence for its potential as an alternative to conventional glucocorticoids. In both the spontaneous lupus MRL/lpr and Pristane-induced SLE mice models, Vamorolone significantly improved survival rates, reduced serum anti-dsDNA antibody levels, and effectively ameliorated renal function indicators such as proteinuria and serum creatinine. Renal histopathological analysis revealed that Vamorolone significantly alleviated glomerular cell proliferation, basement membrane thickening, and IgG immune deposition. Mechanistically, Vamorolone exerted its effects by reshaping immune balance: it primarily increased the levels of immunosuppressive Treg cells in the MRL/lpr model, while predominantly reducing the proportion of pro-inflammatory Th17 cells in the Pristane model, achieving an effective reduction in the Th17/Treg ratio. This study confirms the significant efficacy of Vamorolone in treating SLE, demonstrating that by modulating the Th17/Treg cell balance, it effectively mitigates renal damage in SLE mice with differing pathological backgrounds. This suggests Vamorolone holds promise as a new generation of safe and effective SLE therapeutic agent.

Key words: systemic lupus erythematosus; Vamorolone; steroid drug; Th17 cell; treg cell

(责任编辑: 王晓丽)