研究报告

系统性红斑狼疮 MRL/lpr 小鼠的免疫作用机制

邝少松,杨　林,严家荣,谭巧燕,代路路,唐小江*

(广东省医学实验动物中心,广东 佛山　528248)

【摘要】 **目的**　探讨不同月龄系统性红斑狼疮 MRL/lpr 小鼠免疫作用机制,为其发病机制的研究提供依据。**方法**　本研究随机选取 SPF 级 3 月龄、4 月龄、5 月龄及 6 月龄 MRL/lpr 雌性小鼠各 10 只,以及 SPF 级 3 月龄野生型 C57 雌性小鼠 10 只,测定脏器质量计算脏器系数、运用 ELISA 方法检测血清抗双链 DNA 抗体(ds-DNA)、脾组织白介素 IL-2、IL-4、IL-17 和肿瘤坏死因子 TNF-α,运用流式细胞技术检测脾淋巴细胞 CD3 细胞含量和 CD4/CD8 细胞比率。**结果**　与 3 月龄野生型 C57 小鼠相比,3 ~ 6 月龄 MRL/lpr 小鼠脾脏系数、血液中 ds-DNA 抗体浓度、IL-2 和 TNF-α 浓度均显著升高($P < 0.05$);白介素 IL-4 浓度差异无显著性($P > 0.05$);与 3 月龄 MRL/lpr 小鼠比较, 5、6 月龄的 MRL/lpr 小鼠血液中 IL-17 浓度显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);其余各项指标 MRL/lpr 小鼠不同月龄间差异无显著性。与 3 月龄 C57 小鼠相比, 6 月龄 MRL/lpr 小鼠脾淋巴细胞 CD3 浓度显著降低($P < 0.01$),随着月龄增大,MRL/lpr 小鼠的 CD3 和 D4/CD8 比率都有下降趋势,但差异无显著性。**结论**　在本实验条件下,各指标变化均显示 3 月龄红斑狼疮 MRL/lpr 小鼠出现免疫损伤,并且损伤程度随小鼠月龄的增长呈一定的递增趋势。

【关键词】 系统性红斑狼疮;MRL/lpr 小鼠;免疫因子;脾淋巴细胞

【中图分类号】R-33　【文献标识码】A　【文章编号】1671-7856(2018) 04-0038-05

doi: 10.3969/j.issn.1671 -7856. 2018.04.007

Exploration of the immune mechanism in systemic lupus erythematosus MRL/lpr mice

KUANG Shaosong, YANG Lin, YAN Jiarong, TAN Qiaoyan, DAI Lulu, TANG Xiaojiang*

(Guangdong Medical Laboratory Animal Center, Foshan 528248, China)

【**Abstract**】 **Objective**　To explore the immune mechanism in the systemic lupus erythematosus MRL/lpr mice at different months of age, and to provide the basis for research of its pathogenesis. **Methods**　3-, 4-, 5- and 6-month old female MRL/lpr mice, and wild type C57 female mice were used in this study, 10 mice per each group. Their organ coefficients were determined. ELISA was performed to detect the serum levels of double stranded DNA (ds-DNA) antibody. The interleukins IL-2, IL-4, IL-17 and tumor necrosis factor-α (TNF-α) in spleen tissue were detected. Flow cytometry was used to assess the content of spleen lymphocyte CD3 cells and CD4/CD8 cell ratio. **Results**　Compared with the 3-month old wild-type C57 mice, the spleen coefficient, the blood concentration of ds-DNA antibody, IL-2 and TNF-α in the 3- to 6-month old MRL/lpr mice were significantly increased ($P < 0.05$). There was no significant difference between the concentrations of interleukin IL-4 ($P > 0.05$). The blood concentration of IL-17 in the 5- and 6-month old MRL/lpr mice was significantly lower ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) than that in the 3-month old MRL/lpr mice. The rest

[基金项目]广东省科技计划基金(2013B060300033);广东省科技计划项目(2016A030303026)。

[作者简介]邝少松(1973—),女,博士,高级兽医师,主要从事病理学、毒理学兽医学的研究。E-mail: kuangss@126.com

[通信作者]唐小江,主任医师。E-mail: river-t@126.com

indexes of MRL/lpr mice showed no obvious changes or significant difference in the mice at different ages. Compared with the 3-month old C57 mice, the spleen CD3 lymphocyte concentration in the MRL/lpr mice was significantly decreased ($P < 0.01$). With the increasing age, the CD3 lymphocyte concentration and $D4^+/CD8^+$ cell ratio in the MRL/lpr mice were decreased, however, showing a non-significant difference ($P > 0.05$). **Conclusions** The data obtained in this study indicate that 3-month old lupus MRL/lpr mice have already immune injury, increasing with the increase of age of the mice.

【**Key words**】 systemic lupus erythematosus; MRL/lpr mice; immune factors; splenic lymphocytes

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种慢性、多系统受累的自身免疫性疾病[1],其发病机制复杂,突出表现为多种自身抗体并通过免疫复合物等途径诱导的炎症免疫反应,而炎症通路的激活、炎症细胞(特别是巨噬细胞和 T 细胞)的浸润及炎症因子的表达发挥着重要作用[2-4]。研究表明,白细胞介素(interleukin, IL)、肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α)等细胞因子参与 SLE 的发病过程,尤其以 T、B 淋巴细胞免疫紊乱、产生大量的自身抗体为特征[5]。T 淋巴细胞是高度异质性的群体,根据发育的过程中出现的分化抗原的不同,可分为 $CD4^+$ T 和 $CD8^+$ T 细胞,研究发现 T 细胞的功能主要是通过其分泌的细胞因子介导的。MRL/lpr 小鼠作为一种研究狼疮发病的代表性动物模型,在 16 周龄自发产生与人类疾病类似的狼疮症状[6]。本研究选取了 4 种细胞因子(IL-2、IL-4、IL-17、TNF-α)和 T 淋巴细胞的主要表面标志 CD4 和 CD8 进行检测,目的在于对不同月龄的 MRL/lpr 小鼠和野生型小鼠进行一系列免疫机制基础数据比较,为日后的广大相关领域的科研工作者提供基础数据及参考。

1　材料和方法

1.1　实验动物

B6. MRL-FaslprNJU 小鼠, C57 小鼠, SPF 级雌性。3 月龄体重 15 ~ 18 g、4 月龄体重 18 ~ 22 g、5 月龄体重 22 ~ 25 g、6 月龄体重 25 ~ 28 g 雌性 B6. MRL-FaslprNJU 小鼠各 10 只,3 月龄 15 ~ 18 g 野生型雌性 C57 小鼠 10 只,共 50 只。购自广东省医学实验动物中心[SCXK(粤) 2013 - 0002]。所有实验在广东省医学实验动物中心完成[SYXK(粤) 2013 - 0002],经广东省医学实验动物中心伦理委员会审查,福利伦理审查证号 B201404 - 06。

1.2　主要试剂与仪器

小鼠抗双链 ds-DNA 抗体(IgG)、白介素 IL-2、白介素 IL-4、白介素 IL-17、肿瘤坏死因子 TNF-α ELISA 试剂盒均购自武汉华美生物工程有限公司; Anti-CD3、Anti-CD4 抗体购自 Abcam 公司;全波长酶标仪,型号 Multiskan Go,美国 Thermo Fisher 公司;流式细胞仪,型号 BD Accuri C6 美国 BD 公司。

1.3　实验方法

1.3.1　解剖取材

小鼠称体重后,采用异氟烷吸入麻醉后摘眼球采集血液,离心,取血清置于 -20℃保存;采集血液后断颈处死,常规消毒动物腹部皮肤,无菌打开腹腔,取心、肝、脾、肺、肾称重,计算脏器系数;钝性去除被膜取脾,脾组织分成两份置于 -20℃保存备用。

1.3.2　指标检测

ELISA 检测血清中小鼠抗双链 ds-DNA 抗体,按照试剂盒说明书进行操作;取脾组织用 ELISA 检测免疫因子白介素 IL-2、IL4、IL17、肿瘤坏死因子 TNF-α,按照试剂盒说明书进行操作;运用流式细胞仪检测脾淋巴细胞 CD3 含量及 CD4/CD8 细胞比率。

1.4　统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件对数据进行分析,实验数据用平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,对满足正态性和方差齐性的资料做单因素的方差分析,不满足方差齐性的资料做校正后的方差分析。对不满足正态分布和率的资料采用非参数检验。以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2　结果

2.1　不同月龄 MRL/lpr 小鼠及正常 C57BL/6 小鼠脏器系数比较

与 3 月龄 C57 小鼠相比,3 ~ 6 月龄 MRL 小鼠心脏系数、肝脏系数、肺脏系数、双肾系数差异无显著性($P > 0.05$),3 ~ 6 月龄 MRL 小鼠脾脏系数均显著升高($P < 0.05$)(见表 1)。

表 1 不同月龄 MRL/lpr 小鼠及正常 C57BL/6 小鼠脏器系数水平($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 The main organ coefficients of MRL/lpr and normal C57 mice at different months of age

组别 Groups	心脏系数 Heart coefficient	肝脏系数 Liver coefficient	脾脏系数 Spleen coefficient	肺脏系数 Lung coefficient	双肾系数 Kidney coefficient
C57 – 3 月龄 3-month old C57 mice	0.58 ± 0.06	5.36 ± 0.37	0.33 ± 0.04	0.74 ± 0.12	1.38 ± 0.15
MRL/lpr-3 月龄 3-month old MRL/lpr mice	0.57 ± 0.09	5.37 ± 0.85	0.64 ± 0.35 *	0.68 ± 0.06	1.32 ± 0.06
MRL/lpr-4 月龄 4-month old MRL/lpr mice	0.561 ± 0.07	5.05 ± 0.71	0.86 ± 0.36 *	0.67 ± 0.10	1.40 ± 0.30
MRL/lpr-5 月龄 5 month old MRL/lpr mice	0.52 ± 0.05	4.60 ± 1.32	0.77 ± 0.30 *	0.66 ± 0.05	1.24 ± 0.12
MRL/lpr-6 月龄 6-month old MRL/lpr mice	0.511 ± 0.07	5.28 ± 0.62	0.68 ± 0.32 *	0.67 ± 0.08	1.18 ± 0.10 *

注:与 3 月龄 C57 小鼠比较, $^{*}P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$。

Note. Compared with the 3-month old C57 mice, $^{*}P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$.

表 2 MRL/lpr 小鼠与 C57 小鼠抗 ds-DNA 抗体水平的变化($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Tab. 2 Changes of anti ds-DNA antibody levels in the MRL/lpr mice and C57 mice

组别 Groups	ds-DNA 抗体浓度 (ng/mL) Anti ds-DNA antibody concentration	ds-DNA 抗体阳性率(%) Positive rate of anti ds-DNA antibody
C57-3 月龄 3-month old C57 mice	19.12 ± 3.95	0
MRL/lpr-3 月龄 3-month old MRL/lpr mice	32.75 ± 3.54 **	90
MRL/lpr-4 月龄 4-month lod MRL/lpr mice	34.81 ± 3.47 **	100
MRL/lpr-5 月龄 5-month old MRL/lpr mice	32.67 ± 3.54 **	90
MRL/lpr-6 月龄 6-month old MRL/lpr mice	34.74 ± 3.47 **	100

注:与 3 月龄 C57 小鼠比较, $^{*}P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$。

Note. Compared with the 3-month old C57 mice, $^{*}P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$.

2.2 不同月龄 MRL/lpr 小鼠及正常 C57BL/6 小鼠抗 ds-DNA 抗体比较

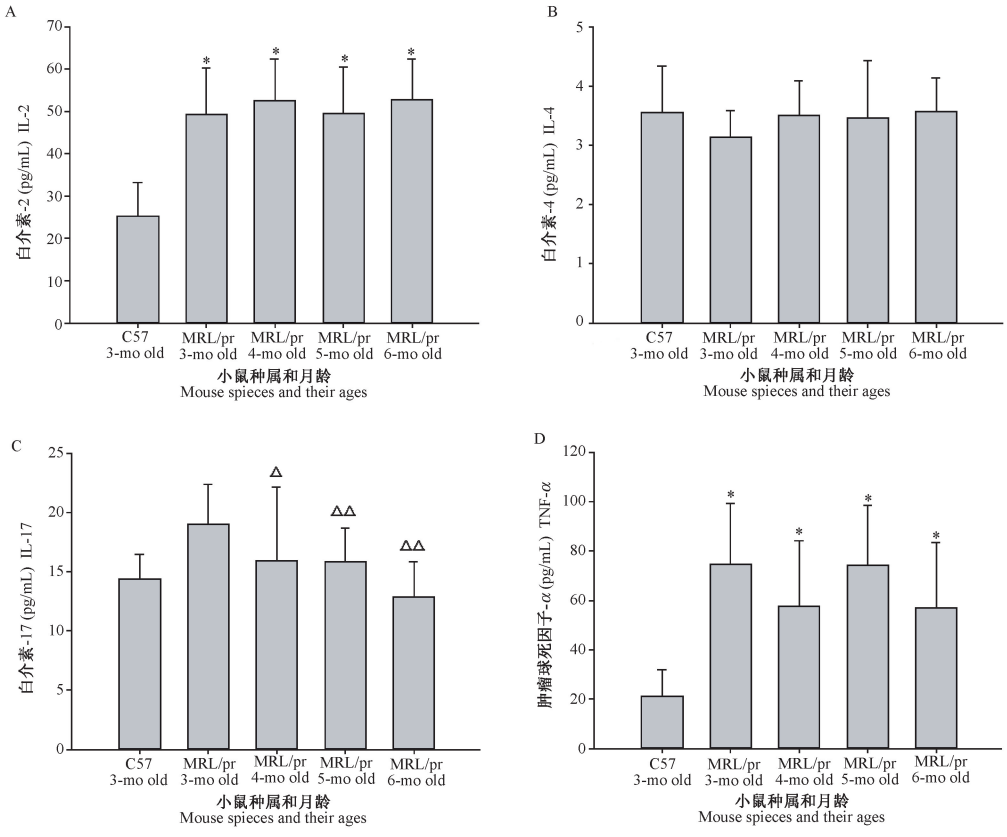
与 3 月龄 C57 小鼠相比,3 ~6 月龄 MRL/lpr 小鼠血清 ds-DNA 抗体浓度均显著升高($P < 0.05$),但 MRL/lpr 小鼠不同月龄间 ds-DNA 抗体浓度之间无明显趋势(见表 2)。

2.3 免疫因子白介素 IL-2, IL-4、IL17、肿瘤坏死因子 TNF-α 检测

与 3 月龄 C57 小鼠相比,3 ~6 月龄 MRL/lpr 小鼠白介素 IL-2 浓度、肿瘤坏死因子 TNF-α 均显著升高($P < 0.05$),MRL/lpr 小鼠不同月龄间白介素 IL-2、TNF-α 浓度无明显趋势;与 3 月龄 C57 小鼠相比,3 ~6 月龄 MRL/lpr 小鼠白介素 IL-4、IL-17 浓度差异无显著性($P > 0.05$);MRL/lpr 小鼠随着月龄增大,白介素 IL-17 浓度显著升高($P < 0.05$)(见图 1 A ~ D)。

2.4 脾淋巴细胞 CD3、CD4/CD8 检测

与 3 月龄 C57 小鼠相比, 6 月龄 MRL/lpr 小鼠脾淋巴细胞 CD3 浓度显著降低($P < 0.01$),MRL/lpr 小鼠随月龄增大 CD3 含量和 D4/CD8 比率有下降趋势,但差异无显著性。(见表 3)



注:(A)IL-2 浓度;(B)IL-4 浓度;(C)IL-17 浓度;(D)TNF-α 浓度。与 C57BL/6 小鼠比较,$^{*}P < 0.05$;与 3 月龄 MRL/lpr 小鼠比较,$^{\Delta}P < 0.05$,$^{\Delta\Delta}P < 0.01$。

图 1　不同月龄 MRL/lpr 和 C57BL/6 小鼠血液炎症细胞因子浓度

Note. (A) Concentration of IL-2. (B) Concentration of IL-4. (C) Concentration of IL-17. (D) Concentration of TNF-α. Compared with the C57BL/6 mice, $^{*}P < 0.05$. Compared with the 3-month MRL/lpr mice, $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$.

Fig. 1　Blood concentration of inflammatory cytokines in the MRL/lpr mice and C57BL/6 mice at different ages

表 3　MRL/lpr 小鼠与 C57BL/6 小鼠脾淋巴细胞亚群的情况

Tab. 3　Splenic lymphocyte subsets in the MRL/lpr mice and C57BL/6 mice

组别 Groups	CD3(%)	D4/CD8
C57-3 月龄 3-month old C57 mice	34.99 ± 5.37	1.50 ± 0.42
MRL/lpr-3 月龄 3-month old MRL/lpr mice	30.77 ± 13.15	1.53 ± 1.13
MRL/lpr-4 月龄 4-month old MRL/lpr mice	29.96 ± 6.53	1.27 ± 0.28
MRL/lpr-5 月龄 5-month old MRL/lpr mice	24.93 ± 6.51	1.45 ± 0.13
MRL/lpr-6 月龄 6-month old MRL/lpr mice	23.10 ± 2.85 **	1.18 ± 0.12

注:与 3 月龄 C57 小鼠比较,$^{*}P < 0.05$;$^{**}P < 0.01$。

Note. Compared with the 3-month old C57 mice, $^{*}P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$.

3　讨论

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种多系统、多器官受累的全身性自身免疫病,T 细胞异常可能是 SLE 发病的重要机制之一。SLE 患者 T 细胞异常主要表现为辅助性 T 细胞(Th)活性增高,抑制性 T 细胞(Ts)活性下降。Th 细胞按照功能可分为 Th1、Th2 和 Th17 细胞。在活

动性红斑狼疮中,Th 细胞分泌的细胞因子表达异常。Thl 细胞因子水平反映的是细胞免疫功能水平,Th2 细胞因子水平反映体液免疫功能,Th17 细胞以分泌细胞因子 IL-17 为特征,Thl,Th2 与 Th17 细胞之间的相互调节,令机体的免疫应答处于一种精细而复杂平衡的状态,细胞因子内部平衡的改变导致机体免疫的紊乱,进而诱导 SLE 疾病的发生和发展。IL-17 能促进炎性反应以及加强机体的免疫防御功能[7]。IL-2 促进 B 细胞分化增殖,启动免疫球蛋白 J 链的翻译合成,增强抗体的分泌,使 B 细胞分化成为能够产生免疫球蛋白的活化细胞。TNF-α 主要由单核巨噬细胞分泌,最主要的功能是参与机体的防御反应,是重要的促炎症因子和免疫调节因子,它通过抑制 T 细胞信号传导、促进 B 细胞和树突状细胞的生长以及诱导凋亡分子的产生等,参与自身免疫性疾病的发病机制[8]。本研究显示 3 ~ 6 月龄 MRL/lpr 小鼠血清 IL-2 和 TNF-α 的水平比正常小鼠显著升高;IL-4、IL-17 的水平与正常小鼠相比差异不显著。IL-2 和 TNF-α 同属 Th1 型细胞因子,IL-4、IL-17 分别属于 Th2、Th17 型细胞因子,由此我们推测在 3 ~ 6 月龄 MRL/lpr 小鼠狼疮样病变发展过程中,Th1 型细胞因子占优势,细胞因子网络的失衡,导致了机体免疫紊乱。因此,IL-2 和 TNF-α 在 MRL/lpr 小鼠模型 SLE 疾病的发生和发展的过程中起到了关键的作用。

CD3 可表达于所有成熟 T 细胞表面,它是由五条肽链组成的复合分子,与其抗原受体(TCR)由非共价连接的方式形成完整的 TCR/CD3 复合体,共同参与对抗原刺激的免疫应答,而 T 细胞亚群中的 $CD4^+$ 细胞与 $CD8^+$ 细胞的相互制约及平衡对机体免疫应答具有重要的调节作用[9]。本研究显示,6 月龄 MRL/lpr 小鼠脾淋巴细胞 CD3 浓度显著降低,D4/CD8 比率下降,表明 SLE 存在 T 淋巴细胞失衡,T 细胞功能紊乱现象。

抗 ds-DNA 抗体是一种能与天然的脱氧核糖核酸(DNA)结合的成分,它与细胞核的反应位点在于 DNA(外围区)脱氧核糖磷酸框架上。抗 ds-DNA 抗体对 SLE 的诊断高度特异,是红斑狼疮的诊断标准之一,它能促进抗原抗体复合物形成,激活补体,加剧了炎症的发生,造成组织损伤[10]。本研究显示 3 月龄 MRL/lpr 小鼠血清中的抗 ds-DNA 抗体浓度是正常的 C57 小鼠的 1.7 倍以上,MRL/lpr 小鼠抗 ds-DNA 抗体的阳性率高达 90% 以上,表明 MRL/lpr 小鼠 3 月龄开始已出现 SLE 的特征,而且呈现出高水平的抗 ds-DNA 抗体。综上,MRL/lpr 小鼠是目前最常用的自发性系统性红斑狼疮动物模型之一,研究初步表明 MRL/lpr 小鼠在 3 月龄已开始出现 T 淋巴细胞失衡,免疫损伤的表现,在 SLE 发病发展过程中,Th1 型淋巴细胞因子可能 SLE 免疫抑制的关键因素之一。

参考文献:

[1] 王晶晶,严尚学,张小丹,等. TACI 融合蛋白对 MRL/lpr 小鼠免疫功能的作用及其部分机制 [J]. 安徽医科大学学报, 2011, 46(9): 865 – 870.

[2] Nowling TK, Gilkeson GS. Mechanisms of tissue injury in lupus nephritis [J]. Arthritis Res Ther, 2011, 13(6): 250.

[3] Gigante A, Gasperini ML, Afeltra A, et al. Cytokines expression in SLE nephritis [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2011, 15 (1): 15 – 24.

[4] 梁柳琴, 许韩师, 叶玉津, 等. 白细胞介素 – 15 在狼疮性肾炎活动病变中的临床意义 [J]. 中国病理生理杂志, 2008, 24(8): 1581 – 1584.

[5] 袁敏, 慕思娟, 崔慧娟, 等. DNA 甲基化转移酶在 MRL/lpr 狼疮鼠 $CD4^+$ T 淋巴细胞中的表达水平研究及功能分析 [J]. 中华风湿病学杂志, 2009, 13(8): 521 – 524.

[6] Liu J, Karypis G, Hippen KL, et al. Genomic view of systemic autoimmunity in MRL/lpr mice [J]. Genes Immun, 2006, 7 (2): 156 – 168.

[7] 秦卫松, 刘志红. Th17 细胞与自身免疫性疾病 [J]. 肾脏病与透析肾移植杂志,2008, 17(5): 453 – 456.

[8] 叶倩舲, 翟志敏, 王会平, 等. 多发性骨髓瘤与系统性红斑狼疮患者血浆 IL – 2、TNF – α 检测 [J]. 安徽医科大学学报, 2016, 51 (2): 255 – 258.

[9] 钱齐宏, 张学光, 於葛华, 等. T 细胞亚群及共刺激分子表达与系统性红斑狼疮免疫病理的关系 [J]. 苏州大学学报(医学版), 2002, 22(1): 8 – 12

[10] 吴希国,刘秀珍,马越. 173 例系统性红斑狼疮患者 ANA, ENA 和 ds-DNA 抗体的联合检测分析 [J]. 中国卫生检验杂志, 2012, 22 (4): 781 – 782.

〔**收稿日期**〕2017 – 09 – 14