网络出版时间:2020-4-7 16:47 网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20200403.1821.001.html

◇基础医学研究◇

MRL/lpr 小鼠 B 淋巴细胞活化的免疫病理特征

江 丽,黄李娜,王盛付,王 祥,严尚学,魏 伟

摘要 **目的** 研究 MRL/lpr 狼疮样小鼠 B 淋巴细胞活化的免疫病理学改变。**方法** 20 周龄雌性 MRL/lpr 小鼠取血后脱臼处死,称量胸腺、脾脏重量,计算胸腺指数和脾脏指数;流式细胞术检测小鼠脾淋巴细胞悬液 T 淋巴细胞亚群、总 B 细胞和浆细胞比例;HE 染色观察小鼠肾脏和脾脏病理;免疫荧光法检测肾脏免疫复合物 C3 表达;q-PCR 检测小鼠脾脏中白细胞介素-21(IL-21)水平;ELISA 检测小鼠血清 IgG1、IgG2a、抗核抗体(ANA)、抗双链 DNA 抗体(anti-dsDNA)、B 淋巴细胞刺激因子(BLyS)及 IL-10 水平,另取雌性 20 周龄 BALB/c 小鼠作为对照组。**结果** 与对照组相比,MRL/lpr 小鼠脾脏指数与胸腺指数均升高;滤泡辅助 T 淋巴细胞(TFH 细胞)、Th17 细胞、活化 T 细胞和浆细胞比例增加,总 B 细胞和幼稚 T 细胞比例降低,差异均有统计学意义;模型小鼠肾脏呈现出间质性肾炎特征,C3 免疫复合物沉积增加,脾脏中央动脉管壁纤维性增厚,白髓弥漫性增生;模型小鼠血清 IgG1、IgG2a、anti-dsDNA、ANA、BLyS、IL-10 水平以及脾脏 IL-21 mRNA 表达水平均升高,差异有统计学意义。**结论** MRL/lpr 模型小鼠脾脏淋巴细胞大量增生,B 淋巴细胞高度活化并产生大量自身抗体,肾脏免疫复合物大量沉积呈现间质性肾炎特征,与 B 细胞活化相关的 BLyS、IL-10、IL-21 等细胞因子水平也升高。

关键词 B 淋巴细胞活化;系统性红斑狼疮;MRL/lpr 小鼠
中图分类号 R 593.24
文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2020)04-0487-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.04.001

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematous,SLE)是一种复杂的自身免疫介导的弥漫性结缔组织病,其特点是大量自身抗体产生和多系统多器官的组织损伤[1]。SLE 的病因是多因素和异质性的,普遍认为 B 细胞耐受破坏和异常激活是导致疾病的关键原因[2]。在 B 细胞的活化过程中,B 淋巴细胞刺激因子(B lymphocyte stimulator factor,BLyS)对 B 细胞的存活、增殖、发育和分化起着关键作用[3];白细胞介素 IL-10(interleukin-10,IL-10)可以阻止 B 细胞凋亡,促进 B 细胞分化、增殖和 MHC Ⅱ类分子表达,并可促进免疫球蛋白类别转换[4];IL-21 可以促进 B 细胞的增殖分化和免疫球蛋白的生成[5]。同时,T 细胞不同亚群如活化 T 细胞亚群、滤泡辅助 T 细胞(T follicular helper cell,TFH)亚群也在 B 细胞向浆细胞的分化过程中发挥了重要作用。MRL/lpr 小鼠是一种自发性的 SLE 模型小鼠,其血清学、组织病理学及免疫学等方面疾病特点与人类 SLE 临床表现极为相似[6]。为了观察 SLE 病程中 B 细胞异常活化的免疫病理改变,现比较了 20 周龄的 MRL/lpr 小鼠与同周龄的 BALB/c 小鼠的自身抗体水平、T/B 淋巴细胞亚群比例、相关细胞因子水平以及肾脏和脾脏的病理变化,以更好地了解 B 细胞活化的免疫病理学改变参与红斑狼疮发病的机制。

1 材料与方法

1.1 动物 雌性 SPF 级 MRL/lpr 小鼠 10 只,体质量 25~35 g,购自上海斯莱克有限责任公司,合格证号:SCXK(沪)2017-0005;雌性 SPF 级 BALB/c 小鼠 10 只,体质量 20~25g,购自安徽医科大学 SPF 实验动物中心,合格证号:SCXK(皖)2017-001。

1.2 主要试剂 FITC 抗小鼠 CD4 抗体、Percp-5.5 抗小鼠 CXCR5 抗体、APC 抗小鼠 CD279 抗体、FITC 抗小鼠 CD19 抗体、PE 抗小鼠 CD138 抗体、PE 抗小鼠 IL-17A 抗体、PE 抗小鼠 CD62L 抗体、PE-cy7 抗小鼠 CD69 抗体(美国 BD 公司产品);ANA、anti-ds-DNA、BLyS、IL-10、IgG1、IgG2a 等 ELISA 试剂盒(美国 ADL 公司);C3 一抗(美国 proteintech);DAPI(上海碧云天生物技术公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 胸腺指数和脾指数的测定 脱臼处死小鼠后剥离胸腺和脾脏,分别称重,以每 100 g 动物体质量的胸腺和脾脏重量作为动物的相应胸腺指数和脾脏指数。

1.3.2 荧光定量 PCR 检测 IL-21 表达 用 TRIzol

2020-01-09 接收
基金项目:国家自然科学基金(编号:81673444、81330081)
作者单位:安徽医科大学临床药理研究所,合肥 230032
作者简介:江 丽,女,硕士研究生;
严尚学,男,博士,副研究员,硕士生导师,责任作者,E-mail:yan-shx@163.com

从脾脏组织中提取 1 μg 总 RNA 合成 cDNA，采用 SYBR® Green Master Mix 试剂进行扩增反应。所有的聚合酶链反应均使用特定的引物进行。用 $2^{-\Delta Ct}$ 法计算基因表达的倍数变化。小鼠引物序列如下，见表 1。

表 1 引物列表

引物名称	引物序列(5′-3′)
GAPDH	正: AGGTCGGTGTGAACGGATTTG
	反: TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
IL-21	正: GGGGACAGTGGCCCATAAATC
	反: TGGAGCTGATAGAAGTTCAGGA

1.3.3 组织病理学检查 取小鼠肾脏、脾脏，4% 多聚甲醛固定 24 h，石蜡切片，HE 染色，显微镜观察各组织病理改变情况。

1.3.4 免疫荧光检测免疫复合物 C3 的表达 肾脏石蜡切片脱蜡水化后，抗原修复液进行修复，BSA 封闭，一抗 4 ℃孵育过夜，二抗室温孵育 1 h，DAPI 染核 10 min，加抗荧光淬灭剂，指甲油封片，最后在荧光显微镜下观察 C3 的表达情况。

1.3.5 流式细胞术检测 T、B 细胞亚群比例 常规制备脾细胞悬液，调细胞浓度为 10^6 个细胞/ml，分别加入 FITC-CD4、Percy-5.5-CXCR5、PE-IL-17A、APC-CD279、FITC-CD19、PE-CD138、PE-cy7-CD69、PE-CD62L，4 ℃避光放置 30 min，流式细胞术检测 TFH 细胞($CD4^+CXCR5^+PD\text{-}1^+$)、Th17 细胞($CD4^+IL\text{-}17A^+$)、活化 T 细胞($CD4^+CD69^+$)、幼稚 T 细胞($CD4^+CD62L^+$)、总 B 细胞($CD19^+$)和浆细胞($CD19^-CD138^+$)比例。

1.3.6 ELISA 法检测血清中自身抗体与细胞因子水平 收集动物的血清，按照 ELISA 试剂盒检测方法检测自身抗体 IgG1、IgG2a、anti-dsDNA、ANA 水平和细胞因子 BLyS、IL-10 水平。

1.4 统计学处理 使用 graphpad prism 6.0 软件进行统计分析，数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较采用 t 检验，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠脾脏指数与胸腺指数 处死小鼠，解剖后肉眼可见 MRL/lpr 小鼠的胸腺和脾脏均比 BALB/c 小鼠大，由图 1A 可知，与对照组比较，MRL/lpr 小鼠胸腺指数升高[(0.18 ± 0.20) *vs* (1.76 ± 0.19)，$t=9.86$，$P<0.01$]；图 1B 结果提示，MRL/lpr 小鼠脾脏指数高于对照组小鼠[1.71 ± 0.24) *vs* (0.53 ± 0.032)，$t=5.86$，$P<0.01$]，差异均有统计学意义。

2.2 细胞因子 IL-21 的基因表达水平 小鼠脾脏中 IL-21 mRNA 检测结果(图 1C)显示，MRL/lpr 小鼠脾脏中 IL-21 mRNA 水平高于 BALB/c 小鼠，且差异有统计学意义($t=5.04$，$P<0.01$)。

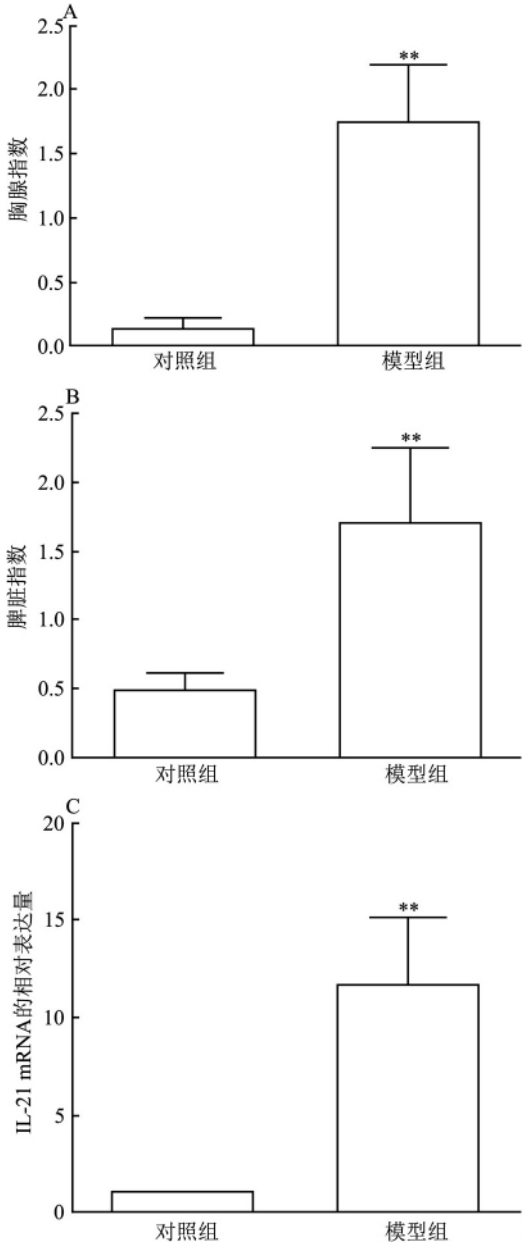

图 1 小鼠胸腺指数、脾脏指数及 IL-21mRNA 表达水平

A: 胸腺指数; B: 脾脏指数; C: IL-21 mRNA 的相对表达量; 与对照组比较，** $P<0.01$

2.3 小鼠肾脏、脾脏组织的病理学改变 图 2 结果显示，正常小鼠(A1)肾小球轮廓清晰(a)，系膜细胞无增生(b)，模型小鼠(A2)肾小球体积增大(e)，系膜细胞增生(c)，系膜基质增多，肾小球玻璃样变

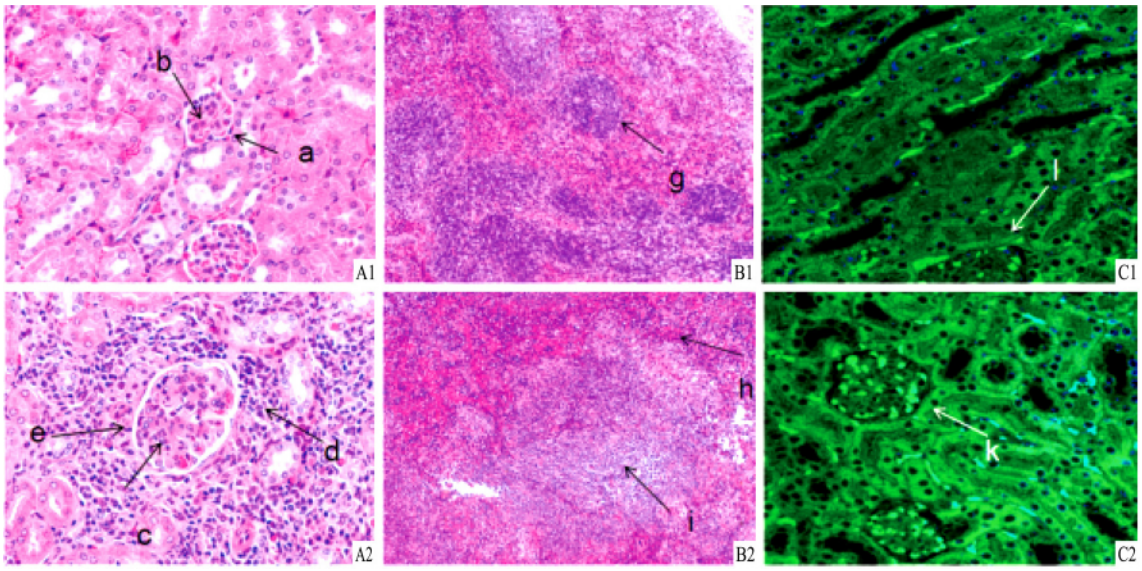

图2 小鼠组织病理学的改变

A1:正常小鼠肾脏(HE×400);A2:模型小鼠肾脏(HE×400);B1:正常小鼠脾脏(HE×200);B2:模型小鼠脾脏(HE×200);C1:正常小鼠肾小球免疫复合物C3表达(×400);C2:模型小鼠肾小球免疫复合物C3表达(×400)

性,局部中性粒细胞浸润(d),毛细血管基底膜略增厚,具有明显的间质性肾炎特征;正常小鼠(C1)肾小球几乎没有免疫复合物C3的表达(l),模型小鼠(C2)肾小球免疫复合物C3沉积增多(k);脾脏病理结果显示,正常小鼠(B1)脾脏结构清晰(g),无增生,模型小鼠(B2)脾脏白髓弥漫性增生(i),中央动脉管壁纤维性增厚,生发中心数量增多,红髓白髓界限不明显(h)。

2.4 小鼠脾脏T、B淋巴细胞亚群比例 流式细胞术分别检测小鼠脾淋巴细胞悬液中TFH细胞($CD4^+CXCR5^+PD\text{-}1^+$)、活化T细胞($CD4^+CD69^+$)、Th17细胞($CD4^+IL\text{-}17A^+$)、幼稚T细胞($CD4^+CD62L^+$)、浆细胞($CD19^-CD138^+$)和总B细胞($CD19^+$)亚群比例。图3结果显示,MRL/lpr小鼠脾脏组织的TFH细胞(图3A)、活化T细胞(图3B)、Th17细胞(图3C)以及浆细胞(图3E)比例升高;幼稚T细胞(图3D)和总B细胞(图3F)比例低于BALB/c小鼠,差异均有统计学意义。

2.5 小鼠血清中自身抗体水平和细胞因子水平 表1结果可知,与对照组比较,MRL/lpr小鼠自身抗体IgG1、IgG2a、anti-dsDNA、ANA水平以及细胞因子BLyS和IL-10水平均升高。

3 讨论

SLE是一种慢性、系统性自身免疫病,机体对自身的耐受性下降导致大量自身抗体的产生[7]是疾病发生的主要原因。目前研究[8]认为,SLE与B淋巴细胞过度活化、分化有着密切的关联。B淋巴细胞是机体内主要的免疫效应细胞,不仅能产生致病性自身抗体,而且作为抗原呈递细胞,为T细胞的活化和分化提供共刺激信号,介导固有免疫和体液免疫[8]。

在B细胞活化过程中,T细胞各亚群发挥了重要作用。B细胞接受相应抗原或多克隆刺激剂刺激后,生发中心(germinal center,GC)的TFH细胞通过CD40L、IL-21、PD-1、BLyS等多种途径提供细胞存活和增殖信号给B细胞,刺激GC中B细胞进行超频突变,然后选择成功的GC B细胞进入下一轮发育[9]。在TFH细胞的作用下,这个诱导增殖、选择细胞的过程不断反复,会产生大量的B细胞,并最终形成完整的GC。TFH细胞除了促进GC的形成,还可以通过Fas-FasL信号清除GC中的B细胞,以维持GC的正常功能[10]。在本研究中,MRL/lpr小鼠T细胞大量活化,幼稚T细胞(CD62L)比例下降,活化T细胞(CD69)比例升高,且TFH细胞和Th17细胞百分比增加,其相应分泌的IL-21、IL-17水平升高,进一步促进了GC的形成;此外,MRL/lpr小鼠体内血清IL-10水平也升高,SLE患者的IL-10血清水平升高且与疾病活动程度相关[11],其对B细胞的存活、增殖、分化和自身抗体的产生有积极影响,也维持和促进了B细胞的发育分化;同时,由于MRL/lpr小鼠Fas基因的缺失抑制了TFH细胞通过

表 1 小鼠血清中 IgG1、IgG2a、anti-dsDNA、ANA、BLyS 和 IL-10 水平($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	IgG1(ng/L)	IgG2a(ng/L)	anti-dsDNA(ng/L)	ANA(ng/L)	BLyS(μg/L)	IL-10(pg/L)
对照	0.54 ± 0.12	0.27 ± 0.07	0.74 ± 0.11	0.99 ± 0.09	0.38 ± 0.25	102.39 ± 35.52
模型	1 139.00 ± 429.43**	618.50 ± 116.19**	58.40 ± 4.73**	593.50 ± 116.19**	1.10 ± 0.21**	313.40 ± 82.55**
t 值	7.50	15.05	34.47	14.42	6.24	6.64

与对照组比较，** $P<0.01$

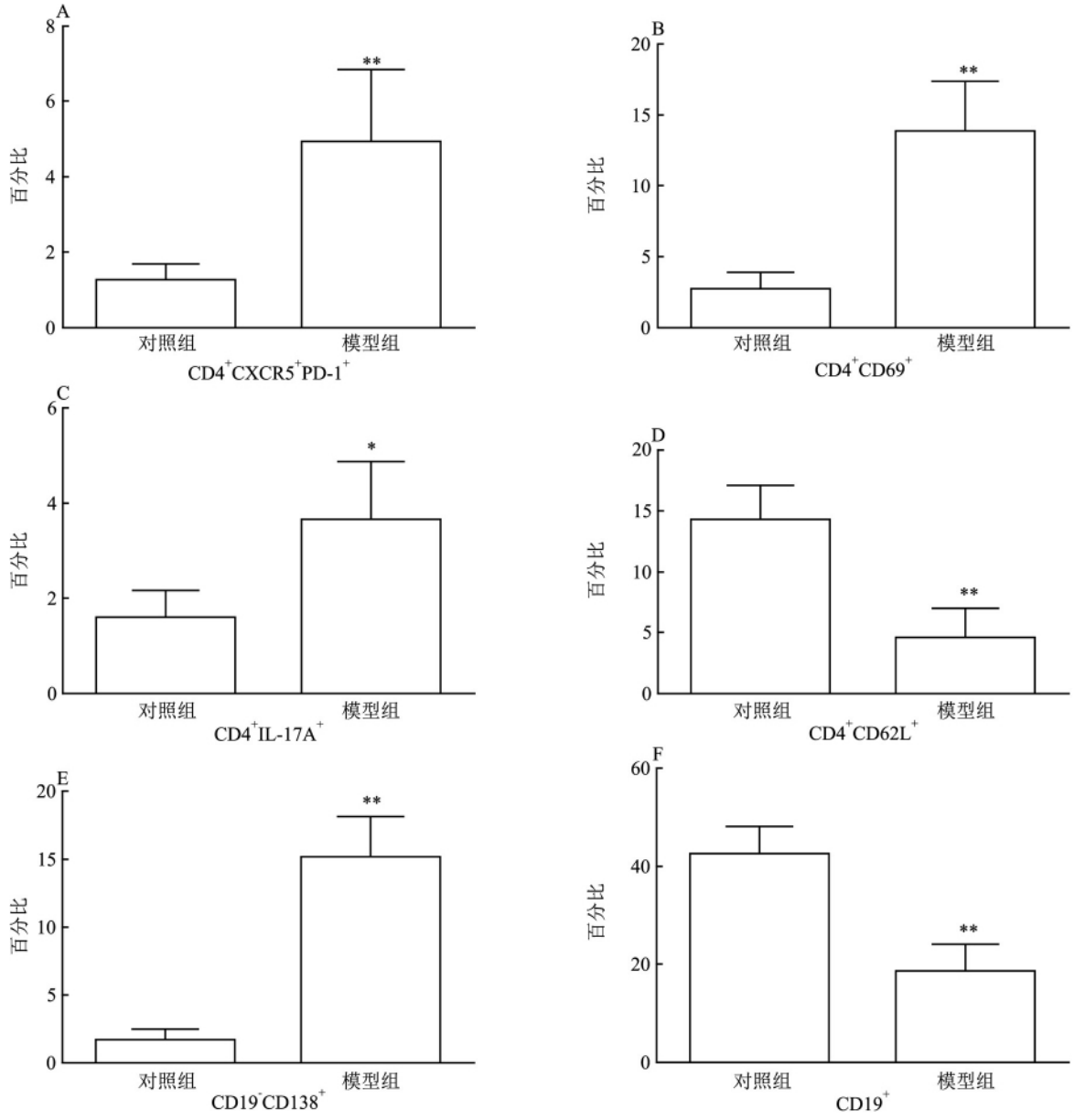

图 3 T、B 淋巴细胞亚群比例

A: TFH 细胞; B: 活化 T 细胞; C: Th17 细胞; D: 幼稚 T 细胞; E: 浆细胞; F: 总 B 细胞; 与对照组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$

Fas-FasL 信号介导的 B 细胞凋亡，造成 B 细胞凋亡不足、大量活化并最终分化为浆细胞。

本研究结果显示，MRL/lpr 小鼠的浆细胞比例升高，其产生的血清 IgG1、IgG2a、anti-dsDNA 和 ANA 等自身抗体水平高于对照组小鼠，anti-dsDNA、ANA 作为 SLE 疾病活动期的特征性自身抗体[12]，表明 MRL/lpr 小鼠 B 细胞已大量分化为浆细胞，B 细胞比例减少，这一现象与文献报道的 SLE 活动期患者 B 细胞亚群紊乱，主要表现为浆细胞比例增加，$CD19^+$ B 细胞比例减少相一致[13]。脾脏病理结果也观察到 MRL/lpr 小鼠脾脏白髓弥漫性增生，肾脏呈现了间质性肾炎特征以及大量 C3 免疫复合物

的沉积。这些大量免疫复合物又作为自身抗原刺激机体的髓样树突细胞并产生高水平的 BLyS,进一步促进了 B 细胞的发育和 GC 的形成,导致了 B 细胞活化的恶性循环,最终导致了疾病的发生。

参考文献

[1] Ali A, Sayyed Z, Ameer MA, et al. Systemic lupus erythematosus: An overview of the disease pathology and its management [J]. Cureus, 2019, 11(4): r13.

[2] Tipton C M, Hom J R, Fucile C F, et al. Understanding B-cell activation and autoantibody repertoire selection in systemic lupus erythematosus: A B-cell immunomics approach [J]. Immunol Rev, 2018, 284(1): 120 - 31.

[3] Regola F, Piantoni S, Lowin T, et al. Association between changes in BLyS levels and the composition of B and T cell compartments in patients with refractory systemic lupus erythematosus treated with belimumab [J]. Front pharmacol, 2019, 10: 433.

[4] Ouyang W, Rutz S, Crellin N K, et al. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease [J]. Annu Rev Immunol, 2011, 29: 71 - 109.

[5] Nakou M, Papadimitraki E D, Fanouriakis A, et al. Interleukin-21 is increased in active systemic lupus erythematosus patients and contributes to the generation of plasma B cells [J]. Clin Exp Rheumatol, 2013, 31(2): 172 - 9.

[6] Celhar T, Fairhurst A M. Modelling clinical systemic lupus erythematosus: similarities, differences and success stories [J]. Rheumatology, 2017, 56(suppl 1): i88 - 99.

[7] Tsokos G C, Lo M S, Reis P C, et al. New insights into the immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus [J]. Nat Rev Rheumatol, 2016, 12(12): 716 - 30.

[8] Dörner T, Giesecke C, Lipsky PE. Mechanisms of B cell autoimmunity in SLE [J]. Arthritis Res Ther, 2011, 13(5): 243.

[9] Crotty S. Follicular helper CD4 T cells (TFH) [J]. Annu Rev Immunol, 2011, 29: 621 - 63.

[10] Schrock D C, Leddon S A, Hughson A, et al. Pivotal role for α integrins in sustained Tfh support of the germinal center response for long-lived plasma cell generation [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019, 116(10): 4462 - 70.

[11] Houssiau F A, Lefebvre C, Vanden Berghe M, et al. Serum interleukin 10 titers in systemic lupus erythematosus reflect disease activity [J]. lupus, 1995, 4(5): 393 - 5.

[12] Yap D, Lai K. Pathogenesis of renal disease in systemic lupus erythematosus-the role of autoantibodies and lymphocytes subset abnormalities [J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(4): 7917 - 31.

[13] Moulton V R, Suarez-Fueyo A, Meidan E, et al. Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: a cellular perspective [J]. Trends Mol Med, 2017, 23(7): 615 - 35.

Immunopathological characteristics of B lymphocyte activation in MRL/lpr mice

Jiang Li, Huang Lina, Wang Shengfu, et al

(*Institute of Clinical Pharmacology, Anhui Medical University, Hefei* 230032)

Absteact ***Objective*** To investigate the immunopathological changes of B lymphocyte activation in MRL/lpr lupus-like mice. ***Methods*** 20-week-old female MRL/lpr mice were sacrificed by cervical dislocation. The index of thymus and spleen of mice were calculated. The ratio of T lymphocyte subsets, total B cells and plasma cells in spleen lymphocyte suspension were analyzed with flow cytometry. Kidney and spleen pathology were observed with HE staining. The level of immune complex C3 expression in kidney and IL-21 mRNA in spleen were detected by immunofluorescence and q-PCR respectively. Serum IgG1, IgG2a, ANA, anti-dsDNA, B lymphocyte stimulating factor(BLyS) and IL-10 levels were examinated by ELISA kits. The 20-week-age female BALB/c mice were used as control. ***Results*** Compared with the control group, the spleen and thymus index of MRL/lpr mice increased significantly, the proportion of TFH cells, Th17 cells, activated T cells and plasma cells increased while total B cells and immature T cells decreased obviously, and the differences were statistically significant. Furthermore, the C3 immune complex in glomerulus in kidney and the levels of serum IgG1, IgG2a, anti-dsDNA, ANA, BLyS and IL-10 in MRL/lpr mice increased remarkably, displaying an interstitial nephritis. The spleen HE staining result of model mice displayed diffuse proliferation of white pulp, and the expression of IL-21 in spleen distinctly increased. The differences were statistically significant. ***Conclusion*** Similar with SLE, MRL/lpr mice display distinct interstitial nephritis which includes B lymphocyte hyperactivation, a mass of autoantibodies, immune complex deposition and high levels of BLyS, IL-10, IL-21.

Key words B lyphocyte activation; systemic lupus erythematous; MRL/lpr mice