

## • 基础研究 •

## 小鼠实验性自身免疫性脑脊髓炎性别差异研究

邢广羽 张金涛 宋春杰 尹岭\*

[摘要] 目的 探讨小鼠实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)性别差异的原因。方法 应用髓鞘脂质蛋白<sub>139-151</sub>(PLP<sub>139-151</sub>)免疫诱导建立 EAE 模型,观察雌雄小鼠病情的差异,采用 MTT、ELISA 法,检测外周淋巴细胞对自身抗原反应的性别差异。结果 雌性小鼠的平均发病时间( $15 \pm 2.1$ )d,早于雄性的( $22 \pm 4.3$ )d,病程有复发-缓解的特点,而雄性则多呈一过性发病;EAE 雌雄小鼠的特异性淋巴细胞增殖反应和  $\gamma$ -干扰素分泌无显著性差异( $P > 0.05$ ),雄性小鼠白细胞介素-4(IL-4)分泌明显高于雌性小鼠( $P < 0.01$ )。结论 PLP<sub>139-151</sub> 诱发小鼠 EAE 性别差异可能与雄性小鼠外周淋巴细胞分泌 IL-4 水平较高,具有保护作用有关。

[关键词] 实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE);SJL/J 小鼠;性别差异;T 淋巴细胞增殖; $\gamma$ -干扰素;白细胞介素-4(IL-4)

Study of the sex differences in experimental autoimmune encephalomyelitis XING Guang-yu, ZHANG Jin-tao, SONG Chun-jie, et al. Department of Neuroinformation, The General Hospital of PLA, Beijing 100853, China

[Abstract] Objective To explore the mechanism causing the sex differences in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). Methods EAE model was established with PLP<sub>139-151</sub> in SJL/J mice. The sex differences of illness state were evaluated by neurologic score, and that of response of peripheral lymphocytes to autologous antigens were detected by methods of MTT and ELISA. Results The onset time of female SJL mice was  $15 \pm 2.1$  days less than that of male ones ( $22 \pm 4.3$  days), and the feature of diseases course of female mice was relapse after recovery, but that of male mice was transient. No significant differences were observed in T cell responses and interferon  $\gamma$  productions between male and female mice ( $P > 0.05$ ). Male mice secreted more interleukin-4 than female mice ( $P < 0.01$ ). Conclusion The sex differences of EAE in mice are due to peripheral lymphocytes secreting more interleukin-4 in male mice.

[Key words] experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE);SJL/J mice;sex difference;T cell proliferative response;interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ );interleukin-4 (IL-4)

中图分类号:R744.5 文献标识码:A 文章编号:1006-9771(2005)05-0345-02

[本文著录格式] 邢广羽,张金涛,宋春杰,等.小鼠实验性自身免疫性脑脊髓炎性别差异研究[J].中国康复理论与实践,2005,11(5):345-346.

大量的研究表明,多发性硬化(multiple sclerosis, MS)和其动物模型——实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)具有性别差异<sup>[1,2]</sup>。本实验采用髓鞘脂质蛋白<sub>139-151</sub>(PLP<sub>139-151</sub>)免疫 SJL/J 小鼠建立 EAE 模型,观察雌雄小鼠发病时间和病程的差异,并初步探讨其原因。

## 1 材料与方法

1.1 实验动物 8~12 周龄 SJL/J 小鼠(美国 Jackson 实验室提供),饲养于解放军总医院实验动物中心。

1.2 抗原 PLP<sub>139-151</sub> 多肽 HSLGKWLGHDPKF(140 号半胱氨酸由丝氨酸代替),由美国 Gene med Synthesis Inc (South San Francisco, CA)合成,纯度 > 90%。

1.3 EAE 模型<sup>[3]</sup> 将 100  $\mu$ l PLP<sub>139-151</sub> 水溶液(含 PLP<sub>139-151</sub> 150  $\mu$ g)与 100  $\mu$ l 完全福氏免疫佐剂混合,充分乳化。第 1 天小鼠上腹部多点皮下注射 0.2 ml 抗原配剂;第 1 天和第 3 天尾静脉注射  $0.60 \times 10^6$  百日咳

杆菌。模型建立后小鼠按性别分组进行以下实验。

1.4 神经功能评分 取雌、雄小鼠各 30 只每天进行神经功能评分。评分标准:①0 分:不发病;②1 分:尾部张力降低或轻度步态笨拙;③2 分:尾部无张力,和/或中度步态异常,和/或姿态维持缺乏;④3 分:肢体无力;⑤4 分:肢体麻痹;⑥5 分:濒死状态。

1.5 特异性淋巴细胞增殖实验 取雌、雄小鼠各 3 只,于免疫后第 10 天处死取腋下淋巴结,分离细胞,用含 10%胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素的 RPMI 1640 培养液调制细胞浓度为  $2 \times 10^6$ /ml,接种于 96 孔培养板,每孔 100  $\mu$ l,然后每孔加入含 100  $\mu$ g/ml PLP<sub>139-151</sub> 的 RPMI 1640 基础液 100  $\mu$ l。以上每样本均设 10 个复孔,置 5% CO<sub>2</sub> 孵箱中,37℃ 孵育 68 h 后弃去 100  $\mu$ l 上清液,再加 20  $\mu$ l MTT(5 mg/ml)/孔继续孵育 4 h,加二甲基亚砷 150  $\mu$ l/孔,震荡溶解 10 min,酶标仪波长 550 nm 测 OD 值。重复测 3 次,取平均值。

1.6 淋巴结细胞分泌  $\gamma$ -干扰素(interferon  $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )、白细胞介素-4(interleukin-4, IL-4)检测 取雌、雄小鼠各 5 只,于免疫后第 10 天处死取腋下淋巴结,分离细胞,用含 10%胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素的 RPMI 1640 培养液调制细胞浓度为  $5 \times 10^6$ /

基金项目:全军医药卫生十五重点课题科研基金资助项目(01Z041)。

作者单位:100853 北京市,解放军总医院神经信息中心。作者简介:邢广羽(1974-),女,黑龙江集贤县人,硕士研究生,医师,主要研究方向:神经系统免疫性疾病。\* 通讯作者:尹岭。

ml,以每孔 1 ml 细胞悬液接种于 24 孔培养板,然后每孔加入含 100 μg/ml PLP<sub>139-151</sub> 的 RPMI 1640 基础液 1 ml,置于 5 % CO<sub>2</sub> 孵箱,37℃培养 48 h。取上清液采用双抗夹心 ELISA 试剂盒检测 IFN-γ 和 IL-4 含量。

1.7 统计学处理 采用 State 7.0 统计软件对发病率、复发率进行  $\chi^2$  分析,其余数据进行 *t* 检验。

2 结果

2.1 病程和神经功能评分 雌雄小鼠发病后均表现为不活泼,进食少,皮毛不光滑,并出现明显的神经系统体征,如尾巴下垂无力、双后肢瘫痪。雌性小鼠的发病时间明显早于雄性小鼠( $P < 0.01$ );30 只雌性小鼠发病 3 个月内有 18 只呈缓解—复发特点,2 只呈持续性加重,另外 4 只好转后未再复发,而 30 只雄性小鼠只有 3 只在发病 3 个月内呈缓解—复发,其他均呈一过性发病;雌性小鼠神经功能评分与雄性小鼠有显著性差异( $P < 0.01$ ),见图 1、表 1。

2.2 PLP<sub>139-151</sub> 特异性 T 细胞增殖反应 雌雄小鼠的淋巴结特异性 T 细胞增殖反应无显著性差异( $P > 0.05$ ),见表 1。

2.3 外周淋巴细胞细胞因子分泌变化 雌雄小鼠的 IFN-γ 分泌无显著性差异( $P > 0.05$ ),但雄性小鼠 IL-4 分泌明显高于雌性小鼠( $P < 0.01$ ),见表 2。

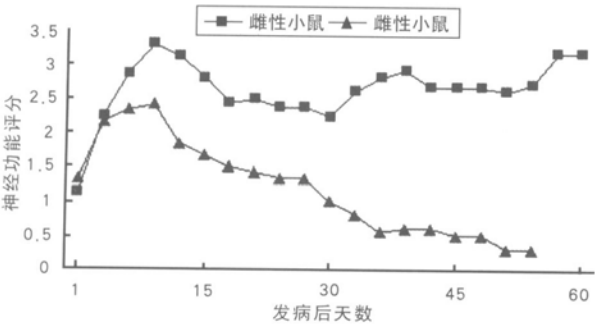


图 1 EAE 雄性、雌性小鼠发病后神经功能评分比较

表 1 雌雄 EAE 小鼠病情比较

分组	发病率	发病时间(d)	复发率	吸光度 OD 值
雌性	24/30	15±2.1	18/24	0.481±0.029
雄性	26/30	22±4.3 <sup>a</sup>	3/26 <sup>b</sup>	0.478±0.027 <sup>c</sup>

注:与雌性比较,a: $P < 0.01$ ;b: $P < 0.01$ ;c: $P > 0.05$ 。

表 2 雌雄 EAE 小鼠淋巴结细胞分泌细胞因子比较

细胞因子	雄性小鼠	雌性小鼠
IFN-γ (pg/ml)	433.04±16.94 <sup>a</sup>	439.96±28.74
IL-4 (pg/ml)	6.85±0.36 <sup>b</sup>	2.68±0.43

注:与雌性比较,a: $P > 0.05$ ;b: $P < 0.01$ 。

3 讨论

国内外的研究表明,许多动物都可用于建立 EAE 模型,但只有 SJL/J 鼠的 EAE 和 MS 最为相似,两者的病程都呈缓解—复发的特点,且发病都存在性别差异<sup>[4,5]</sup>。Cua 等采用中枢神经组织匀浆免疫 <8 周(未成熟)的 SJL 雌雄小鼠,结果雌性发病,雄性不发病,换

用 PLP<sub>139-151</sub> 免疫未成熟小鼠则两性都发病,但雄性表现为单时相病程而雌性则呈现缓解—复发的特点<sup>[6]</sup>。本实验用 PLP<sub>139-151</sub> 免疫成熟 SJL 小鼠(8~12 周)诱发 EAE,结果雌、雄小鼠的发病率、发病时间无显著性差异,但病程不同,雌性小鼠比雄性发病早,且病程多表现为缓解—复发型,而雄性小鼠 EAE 多数表现为单时相病程。

目前,关于 MS/EAE 性别差异的机制仍不清楚,较为一致的看法是:EAE/MS 是一种 CD4<sup>+</sup>(Th)细胞介导的炎性脱髓鞘疾病,其中 Th1 细胞主要分泌 IL-2、肿瘤坏死因子-α(tumor necrotic factor-α, TNF-α)、IFN-γ 和 IL-12 等 Th1 类型的细胞因子,介导 EAE 的发生;Th2 细胞主要分泌 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 和 TGF-β 等 Th2 类型的细胞因子,具有抗炎作用,对 EAE 有保护作用。维持 Th1 和 Th2 反应以及与之有关细胞因子的适当平衡是 EAE/MS 发生与转归的关键。由此推测,EAE 的性别差异可能与淋巴细胞亚型及其分泌的细胞因子有关。Cua 等研究发现,雄鼠 T 细胞产生 Th2 类型细胞因子,而雌鼠产生 Th1 类型细胞因子。但也有人报道,雌、雄小鼠均产生 Th1 和 Th2 反应,但雄性个体较雌性产生的 IL-10/IFN-γ 比例增高<sup>[7]</sup>。本实验结果显示,雌、雄小鼠在发病前期都分泌两种类型的细胞因子,其中 IFN-γ 的分泌两者无显著性差异,但雄性小鼠分泌 IL-4 明显高于雌性小鼠。由此推测,雌雄小鼠 EAE 的差异在一定程度上可能是由 IL-4 的保护作用引起,即雄性小鼠分泌的较高水平的 IL-4 推迟了 EAE 的发生,并可减轻疾病严重程度,抑制复发。

[参考文献]

[1] Kim S, Voskuhl RR. Decreased IL-12 production underlies the decreased ability of male lymph node cells to induce experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. J Immunology, 1999, 162: 5561—5568.

[2] Fillmore PD, Blankenhorn EP, Zachary JF. Adult gonadal hormones selectively regulate sexually dimorphic quantitative traits observed in experimental allergic encephalomyelitis [J]. Am J Pathol, 2004, 164(1): 167—175.

[3] 宋春杰,尹岭,王鲁宁,等.髓鞘蛋白脂质蛋白多肽<sub>139-151</sub> 诱发实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠模型[J].中国神经免疫学和神经病学杂志, 2001, 8(3): 142—144.

[4] Palaszynski KM, Loo KK, Ashouri JF, et al. Androgens are protective in experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for multiple sclerosis [J]. J Neuroimmunology, 2004, 146: 144—152.

[5] Voskuhl RR, Palaszynski K. Sex hormones in experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for multiple sclerosis [J]. Neuroscientist, 2001, 7: 258—270.

[6] Bebo BF Jr, Vandenbark AA, Offner H. Male SJL mice do not relapse after induction of EAE with PLP<sub>139-151</sub> [J]. J Neurosci Res, 1996, 45(6): 680—689.

[7] Bebo BF Jr, Schuster JC, Vandenbark AA, et al. Androgens alter the cytokine profile and reduce encephalitogenicity of myelin reactive T cells [J]. J Immunol, 1999, 162(1): 35—40.

(收稿日期:2004-12-10)