

[文章编号] 1000-4718(2008)06-1056-04

## 不同阶段应用抗 L3T4 单抗干预治疗 对心肌病小鼠细胞因子的影响\*

汪朝晖<sup>1</sup>, 廖玉华<sup>1△</sup>, 袁璟<sup>1</sup>, 王敏<sup>1</sup>, 张景辉<sup>2</sup>, 田元<sup>2</sup>, 董继华<sup>3</sup>(华中科技大学同济医学院附属协和医院<sup>1</sup>心内科,<sup>2</sup>普外科实验室,<sup>3</sup>病毒学实验室,湖北武汉 430022)

**[摘要]** 目的: 研究不同阶段应用抗 L3T4 单抗对心肌病小鼠 Th1/Th2 亚群及血清和心肌组织中细胞因子的影响,探讨抗 L3T4 单抗治疗自身免疫性心肌病的机制。方法: 用含有人线粒体 ADP/ATP 载体肽的免疫液免疫近交系 BALB/c 小鼠建立类扩张型心肌病模型(心肌病组);以不含肽免疫液免疫小鼠作为对照组;在用 ADP/ATP 载体肽免疫小鼠的前 1 d 连续 3 d 以 400 μg 抗 L3T4 单抗免疫小鼠获得早期治疗组;心肌病组小鼠于第 4 个月初连续 3 d 给予抗 L3T4 单抗治疗获得中期治疗组,单抗使用方法同早期治疗组。运用 3 色荧光标记流式细胞术检测小鼠脾脏中 Th1/Th2 的百分含量;以 ELISA 法检测其血清中 IFN-γ、IL-2、IL-4、IL-6 和 TNF-α 水平;实时荧光定量 PCR 法检测其心肌细胞因子基因表达。结果: 早期治疗组 Th1 及 Th2 亚群明显低于心肌病组;中期治疗组 Th1 相关细胞因子水平高于心肌病组,Th2 水平介于心肌病组和早期治疗组之间。早期治疗组 IFN-γ 和 IL-6 与对照组相近,IL-2 和 TNF-α 均高于对照组和心肌病组,IL-4 介于前两组之间且与它们均有显著差异;中期治疗组 IFN-γ 和 IL-2 水平介于对照组和心肌病组之间,IL-6 和 IL-4 明显低于心肌病组。结论: 不同阶段应用抗 L3T4 单抗能够阻断或减轻系统性和局部细胞因子的生成,早期治疗较中期治疗对细胞因子的抑制作用更显著。

[关键词] 心肌病;细胞因子类;抗 L3T4 单克隆抗体

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

### Cytokine production in mice with experimental cardiomyopathy treated with anti-L3T4 monoclonal antibody at different stages

WANG Zhao-hui<sup>1</sup>, LIAO Yu-hua<sup>1</sup>, YUAN Jing<sup>1</sup>, WANG Min<sup>1</sup>, ZHANG Jing-hui<sup>2</sup>, TIAN Yuan<sup>2</sup>, DONG Ji-hua<sup>3</sup>(<sup>1</sup>Department of Internal Cardiology, <sup>2</sup>Laboratory of General Surgery, <sup>3</sup>Laboratory of Virology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China. E-mail: liaoyh27@hotmail.com)

**[ABSTRACT]** **AIM:** To clarify the mechanism of treating autoimmune cardiomyopathy at different stages with anti-L3T4 monoclonal antibody. **METHODS:** Mice immunized with human mitochondria ADP/ATP peptides were used as the cardiomyopathy (DCM) group, and the sham-immunized mice were regarded as the controls. Mice receiving early treatment were immunized with the same peptides, followed by the injection of 400 μg of anti-L3T4 on day 0, 1 and 2 post-immunization. Mice in the late treatment group were immunized as of the early treatment group but anti-L3T4 was administered 3 months post-immunization. The cytokine expression was measured with three-color flow cytometry to quantitate the splenic Th1/Th2 cell subsets in the different groups of mice. In addition, serum and myocardial cytokines were measured by enzyme-linked immunosorbent assay and real-time PCR. **RESULTS:** Th1 and Th2 subsets in the early treatment group were similar to those in control group, but were drastically lower than those in DCM group. Mice in the late treatment group showed an increased level of Th1-related cytokines, while the Th2 level was between the DCM and early treatment group. IFN-γ and IL-6 levels in early treatment group were similar to those in control group. In the early treatment group, IL-4 level was higher than that in control and lower than that in DCM group, whereas IL-2 and TNF-α contents were lower than those in control and DCM group. In the late treatment group, IFN-γ and IL-2 levels were higher than those in DCM group and lower than those in the early treatment group, while IL-6 and IL-4 levels were lower than those in DCM group. **CONCLUSION:** These results suggest that the cytokine production in cardiomyopathic mice may be repressed by treatment with anti-L3T4 at different stages. Early treatment with anti-L3T4 has better inhibi-

[收稿日期] 2006-11-28 [修回日期] 2007-05-10

\* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30000070)

△通讯作者 Tel: 027-85726013; E-mail: liaoyh27@hotmail.com

tory function than treatment in late stage of autoimmune cardiomyopathy.

[KEY WORDS] Cardiomyopathy; Cytokines; Anti-L3T4 monoclonal antibody

扩张型心肌病(dilated cardiomyopathy, DCM)是一种病因多样、发病机制复杂的心脏疾病,急性病毒性心肌炎发生后的病毒持续感染及自身免疫应答导致渐进性心肌损害是其重要发病机制,但目前针对性免疫治疗尚在研究中。我们通过人工合成的线粒体ADP/ATP载体肽免疫近交系BALB/c小鼠复制出类似于人类扩张型心肌病的实验性自身免疫性心肌病模型,并发现抗L3T4(相当于人的抗CD4)单抗干预治疗能够防止或减轻鼠自身免疫性心肌病<sup>[1]</sup>。在此基础上,本研究将进一步探索抗L3T4单抗不同阶段干预治疗对心肌病小鼠血清和心肌组织中细胞因子的影响,以期为针对性免疫治疗提供理论依据。

## 材 料 和 方 法

### 1 动物及分组

本实验选用健康雄性同源近交系BALB/c小鼠24只(购自湖北省医学科学院实验动物中心),6-8周龄,体重14-18g。随机平均分为4组:心肌病组小鼠给予线粒体ADP/ATP载体肽进行免疫,ADP/ATP载体肽的合成和免疫方法同我们以前的报道<sup>[2]</sup>;对照组以不含有此肽的相同免疫液进行假性免疫;早期治疗组小鼠在给予ADP/ATP载体肽免疫(方法同心肌病组)的同时,于实验的第0、1和2d连续3d每天尾静脉注射400μg抗L3T4单抗(GK1.5, BD公司);中期治疗组小鼠在给予ADP/ATP载体肽免疫(方法同心肌病组)后第4个月初始连续3d给予抗L3T4单抗,方法同早期治疗组。上述各组小鼠均饲养半年后取血、心肌组织和脾细胞标本。

### 2 小鼠T淋巴细胞的分离

实验第6月末脱颈处死小鼠后,迅速无菌取脾、制备脾细胞悬液,然后用T细胞分离柱试剂盒(购自R&D公司)收集其中的T淋巴细胞。

### 3 流式细胞术检测T细胞IFN-γ和IL-4表达阳性的细胞百分数。

按我们以前报道的方法<sup>[2]</sup>取新鲜的脾组织,分离、洗涤并悬于RPMI-1640培养液中,分别加入刺激剂佛波醇乙酯(PMA, 20μg/L)、离子霉素(ionomycin, 1mg/L)和蛋白质转运抑制剂莫能霉素(monensin, 2μmol/L)以阻止细胞因子向胞外分泌,37℃、5%CO<sub>2</sub>环境下培养5h;离心后加入PE-Cy5标记的抗小鼠CD3单抗、FITC标记的抗小鼠CD8单抗或二者同型对照抗体,避光孵育30min进行表面抗原染色;1%多聚甲醛固定及PBS洗涤后,加入500μL破膜剂进行细胞打孔;洗涤后分别加入PE标

记的抗小鼠白细胞介素-4(interleukin-4, IL-4)单抗、PE标记的抗小鼠干扰素-γ(interferon-γ, IFN-γ)单抗或二者同型对照抗体进行胞内抗原染色。洗涤后,将细胞悬于100μL的PBS缓冲液中,应用流式细胞仪(FACS-calibur型, BD公司),以CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>设门,用Cell Quest软件分别检测CD4<sup>+</sup>细胞内细胞因子IL-4和IFN-γ的细胞百分数。

### 4 ELISA法检测小鼠血清IFN-γ、IL-2、IL-4、IL-6和TNF-α水平

根据ELISA试剂盒说明书检测<sup>[3]</sup>IFN-γ、IL-2、IL-4、TNF-α(以上试剂盒购自Bender公司)和IL-6(试剂盒购自R&D公司)水平。

### 5 实时荧光PCR法检测小鼠心肌IFN-γ、IL-2、IL-4、IL-6和TNF-α的表达

用实时荧光PCR法检测细胞因子基因的相对表达量<sup>[3]</sup>,数据分析均由FTC-2000分析软件自动进行。所得靶基因相对定量 = 2<sup>-(Ct靶基因-Ctβ-actin)</sup> × 10<sup>5</sup>,其中β-actin为内参照,Ct值为模板扩增到一定量的拷贝数时所需反应循环数,其大小与基因的表达量成反比。本文所需引物及探针序列(均由Gibco公司合成)见表1。

表1 小鼠IFN-γ、IL-2、IL-4、IL-6、TNF-α和β-actin引物及探针序列

Tab 1 Sequence of the murine IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-6, TNF-α and β-actin primers

Gene	Prime	Sequence
IFN-γ	Forward *	5'-AGCGGCTGACTGAAGTCAAGTGTAG-3'
	Reverse *	5'-GTCACAGTTTTACAGCTGTATAGG-3'
	Probe	5'-FAM-GTCTACACTCCGGCCAGCGCTTTA-TAMRA-3'
IL-2	Forward *	5'-TCATGGACCTACAGAGCTCCTCAG-3'
	Reverse *	5'-GAGTCAAATCCAGAATATGCCCGAC-3'
	Probe	5'-FAM-CTGAAACTCCCGAGATGCTCACC-TAMRA-3'
IL-4	Forward *	5'-CGAAGAACCACAGAGACTGAGCT-3'
	Reverse *	5'-GACTCATTATGCTGACGTTATCG-3'
	Probe	5'-FAM-TAGGGCTTCCAAGGTGCTTCCGATA-TAMRA-3'
IL-6	Forward *	5'-TTGCCTTCTTGGGACTGATG-3'
	Reverse *	5'-ATTGCCATTGCACAACCTCTT-3'
	Probe	5'-FAM-TTCCTACTTCCACAAGTCCCGAGAGGAG-TAMRA-3'
TNF-α	Forward *	5'-GGCAGGCTACTTTGGACTGATTGC-3'
	Reverse *	5'-ACATTGAGGGTCCAGTGAATTCGG-3'
	Probe	5'-FAM-AGGGGATTATGCTCAGACTCCAATC-TAMRA-3'
β-actin	Forward	5'-GCTACAGCTTACCACCACAG-3'
	Reverse	5'-GGTCTTTACGGATGTCAACGTC-3'
	Probe	5'-FAM-ATGACCTGCGCCCTCAGCCAGC-TAMRA-3'

\* Reference [4].

## 6 统计学处理

数据以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,使用统计软件 SPSS 10.0 进行统计分析,两组间均数比较应用配对 *t* 检验,多组数据采用单因素方差分析。

## 结 果

### 1 小鼠脾 T 细胞内细胞因子 IFN- $\gamma$ 和 IL-4 的表达

如表 2 所示,心肌病组小鼠脾细胞中 Th1 (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>) 和 Th2 (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>IL-4<sup>+</sup>) 细胞百分率明显高于正常对照组 ( $P < 0.01$ );早期治疗组和中期治疗组 Th1/Th2 比值均大于 1,而 DCM 组小于 1,2 个治疗组与心肌病组相比均有显著差异。

表 2 各组小鼠 Th1 和 Th2 细胞百分率及 Th1/Th2 比值

Tab 2 Percentages of Th1 and Th2 cells and the ration of Th1/Th2 in mice from different groups. ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

Group	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>	IFN- $\gamma$ /
	IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (%)	IL-4 <sup>+</sup> (%)	IL-4
Control	5.87 ± 0.19	2.16 ± 0.09	2.71 ± 0.08
DCM	7.85 ± 1.42*	9.45 ± 1.70**	0.83 ± 0.01**
Early treatment	6.56 ± 0.21#	2.54 ± 0.20###	2.58 ± 0.16##
Late treatment	8.91 ± 0.33*** $\Delta$	5.15 ± 0.13*** $\Delta$	1.73 ± 0.08*** $\Delta$

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control group; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  vs DCM group;  $\Delta P < 0.01$  vs early treatment group.

### 2 小鼠血清 IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-4、IL-6 和 TNF- $\alpha$ 水平

6 个月后小鼠血清细胞因子的检测结果显示,心肌病组小鼠 IFN- $\gamma$  和 IL-2 水平低于对照组,IL-4、IL-6 和 TNF- $\alpha$  均明显高于对照组;早期治疗组 IFN- $\gamma$  和 IL-6 与对照组相近而 IFN- $\gamma$  显著高于心肌病组,IL-6 明显低于心肌病组,IL-2 和 TNF- $\alpha$  均高于对照组和心肌病组,IL-4 介于前 2 组之间且与它们均有显著差异;中期治疗组 IFN- $\gamma$ 、IL-2 和 IL-6 水平介于对照组和心肌病组之间,IL-4 与早期治疗组相当,TNF- $\alpha$  水平与心肌病组相当,显著低于早期治疗组,见图 1。

### 3 小鼠心肌细胞因子 IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-4、IL-6 和 TNF- $\alpha$ 基因表达

图 2 所示,心肌病组小鼠心肌细胞因子 IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-4、IL-6 和 TNF- $\alpha$  mRNA 表达均明显高于对照组 (均  $P < 0.01$ );早期治疗组所有细胞因子的表达均受到抑制,其相对 mRNA 含量接近于对照组;而中期治疗组各种细胞因子的表达介于正常组/早期治疗组和心肌病组之间,与前面 3 组相比差异均显著。

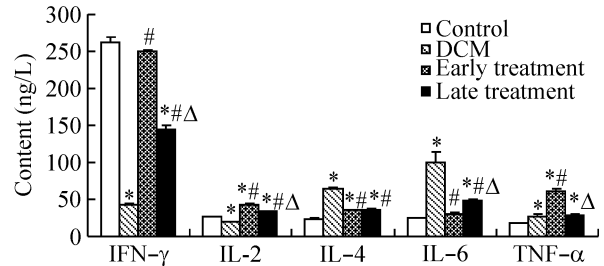


Fig 1 Levels of blood IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-6 and TNF- $\alpha$  in mice from different groups.  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.01$  vs control group; # $P < 0.01$  vs DCM group;  $\Delta P < 0.01$  vs early treatment group.

图 1 小鼠血清 IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-4、IL-6 和 TNF- $\alpha$  的表达水平

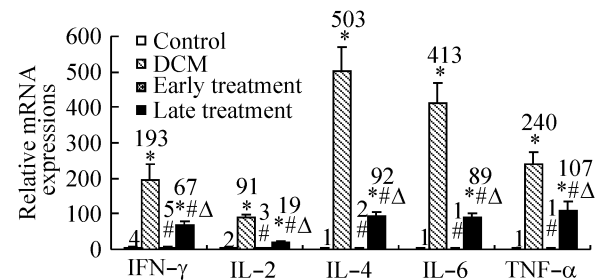


Fig 2 The mRNA expression of the myocardial cytokines in mice from different groups.  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.01$  vs control group; # $P < 0.01$  vs DCM group;  $\Delta P < 0.01$  vs early-treatment group.

图 2 小鼠心肌细胞因子 mRNA 表达

## 讨 论

多种细胞因子参与心肌炎和心肌病的发病过程<sup>[5,6]</sup>,细胞因子在控制针对各种抗原的 T 细胞应答中起重要作用,根据分泌细胞因子的不同,Th0 细胞可分化为主要介导细胞免疫应答的 Th1 和主要介导体液免疫应答的 Th2 细胞亚群。其中 Th1 主要分泌 IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-12 和 TNF- $\alpha$ ,Th2 主要分泌 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10。

本研究以 3 色荧光标记的流式细胞技术检测心肌病组 and 不同阶段单抗治疗小鼠 Th 细胞内的 IFN- $\gamma$  和 IL-4 百分含量,分别代表 Th1 和 Th2 的相对分布趋势。结果显示细胞免疫和体液免疫均参与了自身免疫性心肌病的发生发展,但 Th2 介导的体液免疫应答机制似乎起更重要的作用;我们已证实不同阶段应用抗 L3T4 单抗对线粒体 ADP/ATP 载体肽诱导的小鼠自身免疫性心肌病均有治疗作用,且早期疗效更为明显<sup>[1]</sup>,本研究发现单抗对心肌病的治疗作用与其 Th2 细胞活化受到抑制有关;中期使用单抗不能抑制 Th1 但同样起到一定的治疗疾病的作用,这亦支持 Th2 在心肌病的发病中更重要这一观点。

Th1/Th2 细胞正常动态平衡的破坏可以受很多

因素影响,比较重要的有:免疫抗原的性质和剂量、抗原提呈细胞、细胞因子、T 细胞抗原受体介导的信号等,其中细胞因子更为重要<sup>[7]</sup>。IFN- $\gamma$  是 T 细胞免疫应答中的重要调节和效应因子,它可以促进 Th0 细胞向 Th1 细胞分化。IL-2 可促进 T 细胞和 B 细胞的增殖分化及 IFN- $\gamma$  的产生。IL-4 可促进 Th2 细胞分化,它与 IFN- $\gamma$  在生成过程中相互抑制。IL-6 是 Th2 类细胞因子,但在外周系统中的来源较为丰富。TNF- $\alpha$  为非 T 细胞来源细胞因子,主要来源于活化的单核/巨噬细胞<sup>[8]</sup>。后两类细胞因子与自身免疫性心脏病和心衰等关系密切<sup>[9,10]</sup>。

我们发现血清细胞因子的检测结果与流式计数的结果相近,进一步说明单抗的治疗作用与其对 Th2 及其相关细胞因子抑制有关。但 IFN- $\gamma$  和 IL-2 等与上述 CD4<sup>+</sup> T 细胞的细胞内细胞因子表达情况略有不同,考虑与下列因素有关:(1) DCM 外周血中 CD8<sup>+</sup> T 细胞活性降低、分泌相关细胞因子减少<sup>[11]</sup>,而抗 L3T4 单抗主要是抑制 CD4<sup>+</sup> Th 细胞,对 CD8<sup>+</sup> T 细胞无明显作用,故而接受单抗治疗的两组小鼠血清 IFN- $\gamma$  和 IL-2 水平相反高于心肌病组;(2) 自身免疫性心肌病发生后,IFN- $\gamma$  和 IL-2 在由细胞内至外周血的分泌可能存在障碍,单抗干预能够防止或减轻心肌病的发生从而使分泌障碍不同程度减轻;(3) TNF- $\alpha$  为非 T 细胞来源细胞因子,在 T 细胞来源的细胞因子如 IFN- $\gamma$  和 IL-4 等被阻断后,非 T 细胞来源细胞因子可能发挥一定的作用<sup>[12]</sup>; (4) 单一的细胞因子只能在一定程度上起作用,而导致疾病的发生发展或控制疾病是多种细胞因子共同作用的结果。

我们同时检测心肌组织中细胞因子 mRNA 的表达,发现这些细胞因子在正常心脏组织中基本不表达,而当心肌受损时这些细胞因子表达明显上调,其蛋白质合成亦可能增多;通过不同阶段单抗治疗能够阻断或减少心肌局部细胞因子的合成,这亦是单抗能够治疗心肌病的机制之一。这里我们之所以检测细胞因子的基因表达,是为了正确判断细胞因子的来源:心肌组织中的细胞因子可能来源于血中也可能是局部组织本身合成,而我们检测 mRNA 的表达即可以断定是由局部组织合成而非移行而来。这说明抗 L3T4 单抗不仅可抑制全身免疫系统所产生的相关致病性细胞因子,对局部靶器官的免疫异常亦有防治作用。

由此可见,细胞因子在心肌病的发生发展中有复杂的作用,不同细胞因子可以有相同或不同的作用,单一细胞因子在疾病中发挥一定作用亦受到其它细胞因子的限制。抗 L3T4 单抗能够阻断和减轻系统性和局部细胞因子的生成,从而能够治疗实

验鼠自身免疫性心肌病,这是其治疗作用的重要机制之一;早期治疗较中期治疗对细胞因子的抑制作用更肯定。

#### [参 考 文 献]

- [1] 袁 璟, 廖玉华, 汪朝晖, 等. 抗 L3T4 单克隆抗体对小鼠自身免疫性心肌病免疫干预的研究[J]. 中华医学杂志, 2005, 85 (47): 3346-3349.
- [2] Liao YH, Yuan J, Wang ZH, et al. Infectious tolerance to ADP/ATP carrier peptides induced by anti-L3T4 monoclonal antibody in dilated cardiomyopathy mice [J]. J Clin Immunol, 2005, 25(4): 376-384.
- [3] 袁 璟, 廖玉华, 汪朝晖, 等. 腺苷酸转位酶诱导自身免疫性心肌病小鼠的异常 T 细胞受体信号通路[J]. 中国病理生理杂志, 2006, 22 (2): 214-218.
- [4] Ulett GC, Ketheesan N, Hirst RG. Cytokine gene expression in innately susceptible BALB/c mice and relatively resistant C57BL/6 mice during infection with virulent *Burkholderia pseudomallei* [J]. Infect Immun, 2000, 68 (4): 2034-2042.
- [5] Fuse K, Kodama M, Okura Y, et al. Polarity of helper T cell subsets represents disease nature and clinical course of experimental autoimmune myocarditis in rats [J]. Clin Exp Immunol, 2003, 134(3): 403-408.
- [6] Adamopoulos S, Parissis JT, Paraskevidis I, et al. Effects of growth hormone on circulating cytokine network and left ventricular contractile performance and geometry in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy [J]. Eur Heart J, 2003, 24(24): 2186-2196.
- [7] Seder RA, Paul WE. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4<sup>+</sup> T cells [J]. Annu Rev Immunol, 1994, 12(4): 635-673.
- [8] Grabstein KHJ, Eisenman K, Shanebeck D, et al. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the  $\beta$ -chain of the interleukin-2 receptor [J]. Science, 1994, 264(5161): 965-968.
- [9] Eriksson U, Kurrer MO, Schmitz N, et al. Interleukin-6-deficient mice resist development of autoimmune myocarditis associated with impaired upregulation of complements C3 [J]. Circulation, 2003, 107(1): 320-325.
- [10] Bradham WS, Bozkurt B, Gunasinghe H, et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  and myocardial remodeling in progression of heart failure: a current perspective [J]. Cardiovasc Res, 2002, 53(4): 822-830.
- [11] Bozkurt A, Canataroglu A, Cetiner S, et al. Lymphocyte subsets in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy [J]. Anadolu Kardiyol Derg, 2001, 1(2): 98-100.
- [12] Smith SC, Allen PM. Neutralization of endogenous tumor necrosis factor ameliorates the severity of myosin-induced myocarditis [J]. Circ Res, 1992, 70(4): 856-863.