

## 【 评价方法学 】

## 降植烷诱导小鼠系统性红斑狼疮模型研究

崔闻宇<sup>1,2</sup>, 权茂华<sup>3</sup>, 樊宇<sup>2</sup>, 贾琦<sup>2</sup>, 耿林<sup>1\*</sup>, 张乔<sup>2</sup>

1. 哈尔滨工业大学材料科学与工程博士后流动站, 黑龙江 哈尔滨 150001

2. 哈尔滨商业大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150076

3. 北京科技大学材料科学与工程学院 粉末冶金研究所, 北京 100083

**摘要:** **目的** 建立降植烷诱导的系统性红斑狼疮(SLE)小鼠模型,并对模型进行全面验证。**方法** 6~8周龄雌性BALB/c小鼠随机分为两组,模型组单次ip降植烷0.5 mL,对照组单次ip生理盐水0.5 mL。注射前及注射后2、3、4、5、6个月ELISA法检测血清中抗SLE抗体(anti-SLE)、抗双链DNA抗体(anti-dsDNA);注射前及注射后每月1次采用目测尿蛋白试纸测定小鼠尿蛋白;6个月处死动物,观察肾脏HE染色及直接免疫荧光染色后镜下变化。**结果** 小鼠ip降植烷2个月后,其自身抗体(anti-dsDNA、anti-SLE)浓度显著高于对照组( $P<0.05$ 、 $0.01$ ),且6个月内抗体浓度逐渐升高;6个月时,73%模型组小鼠出现++++尿蛋白;肾脏HE切片显示模型组小鼠肾脏出现肾小球肿胀、炎症细胞浸润等典型的肾病理改变,直接免疫荧光染色见模型组小鼠肾小球毛细血管存在免疫复合物沉积,对照组小鼠肾脏组织未见改变。**结论** 降植烷成功诱导SLE动物模型。

**关键词:** 系统性红斑狼疮;降植烷;自身抗体;抗SLE抗体;抗双链DNA抗体;尿蛋白

**中图分类号:** R965.1

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1674-6376(2017)10-1428-04

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.10.012

## Experimental systemic lupus erythematosus mouse model induced by pristane

CUI Wen-yu<sup>1,2</sup>, QUAN Mao-hua<sup>3</sup>, FAN Yu<sup>2</sup>, JIA Qi<sup>2</sup>, GENG Lin<sup>1</sup>, ZHANG Qiao<sup>2</sup>

1. Post-doctoral Mobile Station of Materials Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150001, China

2. School of Pharmacy, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

3. Powder Metallurgy Research Institute, School of Materials Science and Engineering, University of Science and Technology Beijing, Beijing 100083, China

**Abstract: Objective** To establish the systemic lupus erythematosus (SLE) mouse model through pristane ip injection and validate the model comprehensively. **Methods** Female BALB/c mice of 6—8 weeks were randomly divided into two groups. Animals in model group were injected with 0.5 mL pristane by ip injection while in control group with 0.5 mL normal saline. Anti-systemic lupus erythematosus antibodies (anti-SLE) and anti-double strand DNA antibodies (anti-dsDNA) were checked before injection and monthly thereafter. Proteinuria was detected before injection and every month thereafter. All mice were bled to death 6 months after injection. Kidneys were excised to observe the histopathologic evidence of glomerulonephritis. **Results** The concentration of anti-dsDNA and anti-SLE antibody in sera was higher of model group than that of control group two months after pristane injection, and the concentration of antibody gradually increased within 6 months. At the sixth months, the protein concentration of urine in most model group mice was +++++. The histopathology and immunofluorescence of kidney sections indicated typical evidence of glomerulonephritis in model group. **Conclusion** The murine lupus model can be successfully established in female BALB/c mouse with a single ip injection of 0.5mL of pristane.

**key words:** Systemic lupus of erythematosus; mouse model; pristane; auto-antibodies

收稿日期: 2017-06-05

基金项目: 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12541219)

作者简介: 崔闻宇(1981—),女,黑龙江齐齐哈尔人,博士,讲师,研究方向为电化学传感器。E-mail: cuiwenyu0603@163.com

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种累及全身多系统器官组织的自身免疫性疾病,有一定的致死率<sup>[1]</sup>。合适的动物模型有助于 SLE 的发病机制研究以及临床新治疗手段的开发。近年来,环境因素的致病作用和机制正日益引起重视。化学物质降植烷即 2, 6, 10, 14-四甲基十五烷(2, 6, 10, 14-tetramethyl pentadecane, TMPD)存在于废油垃圾中,为细胞膜激活剂,与脂质双分子和细胞膜结合,在一定浓度下对细胞造成毒性<sup>[2]</sup>。自从 Satoh M 等<sup>[3]</sup>发现给非自发性免疫鼠 BALB/cByJ 注射降植烷成功诱导小鼠狼疮以来,该方法已成为诱导狼疮小鼠模型最常用方法。本实验对降植烷诱导小鼠 SLE 模型的构建方法做了全面的、系统性研究,从抗双链 DNA 抗体(anti-dsDNA)、抗 SLE 抗体(anti-SLE)、尿蛋白、肾脏组织病理学改变等几个方面对造模成功与否进行了验证,其中 anti-SLE 检测文献报道较少,实验充分表明了环境因素在发病中的重要作用,为后续致病原因及施治方法的研究提供了参考。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

6~8 周龄近交系 BALB/c 雌鼠 30 只,体质量 18~22 g, SPF 级,购于长春市亿斯实验动物技术有限责任公司,实验动物生产许可证号 SCXK(吉)-2016-0003。

### 1.2 药物及主要试剂

降植烷(mym biological technology company, 50 mL,批号 119K3802);小鼠 anti-dsDNA、anti-SLE 抗体 ELISA 检测试剂盒(上海岚派生物科技有限公司);FITC-羊抗鼠 IgG(北京康为世纪生物科技有限公司)。

### 1.3 主要仪器

酶标仪(瑞士-TECAN 公司);尿蛋白试纸(广州市花都高尔宝生物技术有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 小鼠分组及动物模型的制备

BALB/c 雌鼠随机分为 2 组,每组 15 只,模型组小鼠 1 次性 ip 降植烷 0.5 mL,对照组小鼠 1 次性 ip 生理盐水 0.5 mL。所有动物实验均按照哈尔滨商业大学药学院动物实验操作指南进行。

### 2.2 模型小鼠自身抗体的检测

注射前及注射 2、3、4、5、6 个月后内眦采取小鼠外周血,留取血清,采用 ELISA 法检测血清中

自身抗体(anti-dsDNA、anti-SLE)的浓度。操作步骤按照 ELISA 试剂盒说明书进行,在酶标仪 450 nm 处读取吸光度(A)值。

### 2.3 模型小鼠尿蛋白检测

在小鼠注射前及注射后每月 1 次采用目测尿蛋白试纸测定小鼠尿蛋白。根据反应区显色程度判断尿蛋白阴性(-)、10 mg/L(±)、30 mg/L(+),100 mg/L(++),300 mg/L(+++),2 000 mg/L(++++)。

### 2.4 模型小鼠肾脏病理学检测

降植烷或生理盐水注射 6 个月后处死小鼠,分别取出肾脏经 10%的甲醛固定,乙醇脱水,石蜡包埋,切片,行 HE 染色,在光镜下观察肾脏的病理学特征。

### 2.5 小鼠免疫复合物(IC)沉淀检测

降植烷或生理盐水注射 6 个月后处死小鼠,分别取出肾脏,包埋于组织冰冻切片包埋剂,做冰冻切片,经丙酮固定洗涤后,与 FITC-羊抗鼠 IgG 避光孕育 30 min 后洗去未结合抗体,封片置荧光显微镜下观察。

### 2.6 统计学分析

采用 SPSS 21.0 软件对计数资料进行单因素方差分析,率的比较采用秩和检验,分析模型组和对照组差异性 P 值。

## 3 结果

### 3.1 自身抗体(anti-dsDNA、anti-SLE)

表 1 可知,造模 2 个月后,模型组小鼠自身抗体(anti-dsDNA、anti-SLE)浓度均显著高于对照组小鼠( $P<0.05$ 、 $0.01$ )。在造模后 6 个月内,对照组小鼠自身抗体浓度无明显规律性变化,而模型组小鼠自身抗体逐渐升高。

### 3.2 小鼠尿蛋白结果

如表 2 所示,模型组于注射降植烷后 2 个月开始出现蛋白尿,多为±或+,随时间推移,蛋白尿的阳性率和尿蛋白量增加,6 个月时,73%小鼠出现++++尿蛋白;对照组尿蛋白量≤±,不随时间改变而增加。模型组和对照组蛋白尿的程度、出现率的秩和检验比较有显著性差异( $P<0.05$ )。

### 3.3 肾脏组织病理学改变

如图 2 所示,模型组小鼠肾脏组织可见病变肾小球明显增大,肾间质水肿,炎症细胞浸润,肾小管上皮细胞增生及变性肾小球上皮细胞肿胀,水肿样变性、管腔狭窄。对照组小鼠肾脏组织无上述变化。

表 1 anti-dsDNA、anti-SLE 抗体浓度 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )  
Table 1 Concentration of anti-dsDNA and anti-SLE antibodies ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	anti-dsDNA 浓度/ (pg·mL <sup>-1</sup> )					
	造模前	造模后 2 个月	造模后 3 个月	造模后 4 个月	造模后 5 个月	造模后 6 个月
对照	9.572±1.89	7.637±1.19	9.435±2.79	13.760±6.36	11.413±7.34	7.881±0.68
模型	6.545±3.27	25.825±2.31**	35.465±1.47**	37.779±4.62**	44.848±5.73**	51.497±9.36**

组别	anti-SLE 浓度/ (pg·mL <sup>-1</sup> )					
	造模前	造模后 2 个月	造模后 3 个月	造模后 4 个月	造模后 5 个月	造模后 6 个月
对照	10.495±1.36	18.241±1.16	19.689±2.37	21.771±0.89	21.311±0.85	20.669±1.03
模型	9.584±2.82	24.677±0.95**	29.045±3.16*	33.732±4.59**	46.800±6.28**	64.201±18.98*

与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$   
\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs control group

表 2 小鼠尿蛋白跟踪监测数据  
Table 2 Monitoring data of proteinuria

时间点	组别	n/只	出现率/%					
			—	±	+	++	+++	++++
造模前	对照	15	100.0	0	0	0	0	0
	模型	15	100.0	0	0	0	0	0
造模后 2 个月	对照	14	71.4	28.6	0	0	0	0
	模型	14	28.6	35.7	35.7	0	0	0
造模后 3 个月	对照	14	85.7	14.3	0	0	0	0
	模型	12	0	25.0	50.0	25.0	0	0
造模后 4 个月	对照	14	100.0	0	0	0	0	0
	模型	11	0	0	0	9.0	45.5	45.5
造模后 5 个月	对照	14	100.0	0	0	0	0	0
	模型	11	0	0	0	36.4	54.5	9.1
造模后 6 个月	对照	14	71.4	28.6	0	0	0	0
	模型	11	0	0	0	9.0	18.0	73.0

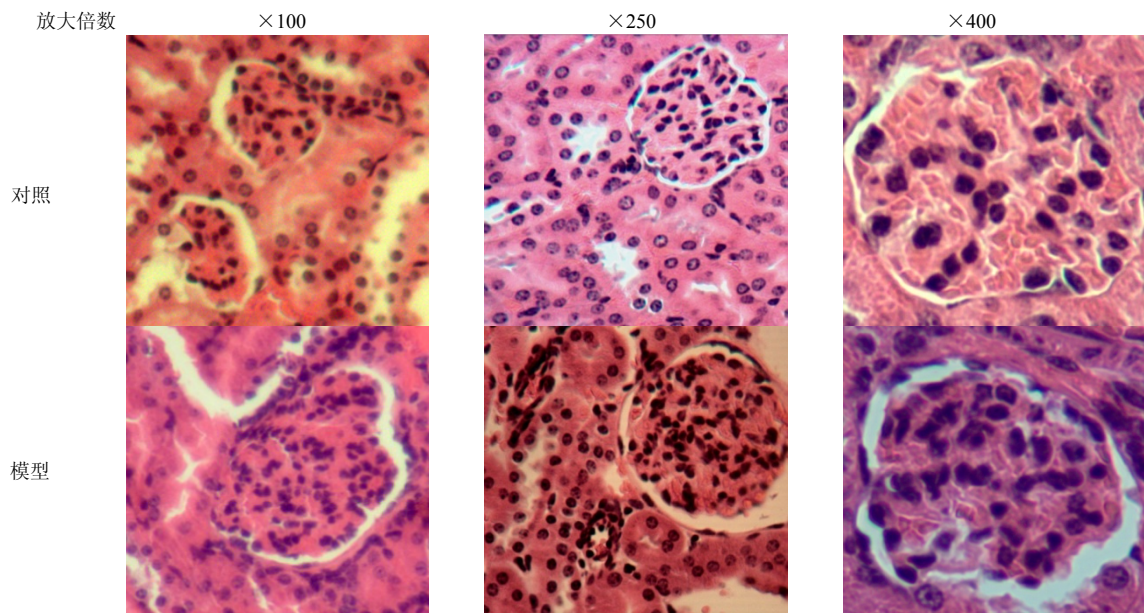


图 1 小鼠肾脏组织 HE 染色  
Fig. 1 HE staining of kidney tissue in mice

### 3.4 肾脏冰冻切片直接免疫荧光染色

如图3所示,观察到模型组出现弥漫性绿色荧光,表明肾小球毛细血管存在免疫复合物沉积。对照组小鼠肾脏未见明显荧光。

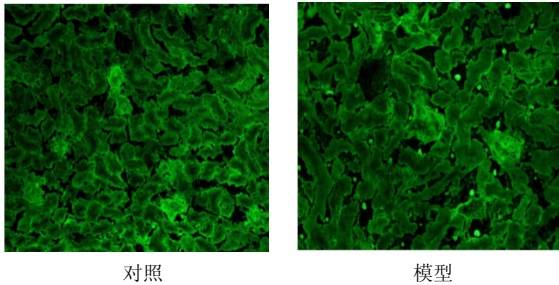


图3 小鼠肾脏组织直接免疫荧光染色

Fig. 3 Direct immunofluorescence staining of kidney tissue in mice

## 4 讨论

狼疮鼠模型的研究对探索 SLE 的发病机制和开发新的诊疗方法有重要的意义。狼疮鼠模型可分为自发性和诱导性两类。自发性小鼠模型在自然状态下发生,诱导性模型是研究 SLE 的常用模型<sup>[5]</sup>。

SLE 的发病机制目前仍未完全明了,体内可检测到特异性自身抗体,尤其是针对细胞核成分的抗体,对 SLE 性肾炎诊断具有特异性,由此推断体内衰老或死亡细胞可能是自身抗原的来源。降植烷存在于周围环境中,对细胞有一定毒性。SLE 患者自身抗体的存在是主要的病理特征,其中 anti-dsDNA、anti-SLE 可作为重要的诊断参考指标,本研究在 BALB/c 小鼠 ip 降植烷后 2 个月后,小鼠血清中自身抗体(anti-dsDNA、anti-SLE)浓度明显升高,且在 6 个月内逐渐升高,而对照组自身抗体浓度无明显变化,说明降植烷可使小鼠产生自身抗原特异性的自身抗体。

尿蛋白作为肾脏受累的主要标志,也是检验狼疮模型成功与否的标准之一。本研究结果显示,模型组于注射降植烷后 2 个月开始出现蛋白尿,多为

±或+,随时间推移,蛋白尿的阳性率和尿蛋白量增加,6 个月时,73%小鼠出现++++尿蛋白;对照组尿蛋白量≤±,不随时间改变而增加,该结果与文献<sup>[6]</sup>报道结果类似。

本研究病理组织学检查发现,模型组肾脏肾小球体积增大,肾小管上皮细胞增生及变性,肾小球上皮细胞肿胀,水肿样变性、管腔狭窄,炎症细胞浸润;对照组未见明显病理改变。免疫荧光抗体染色后可见免疫复合物在肾小球的沉积。该结果可进一步证实降植烷成功地诱导了 BALB/c SLE 鼠模型。

使用降植烷诱导 BALB/c 鼠模型,对动物和实验条件的要求相对较低,制备方法简便,一次 ip 即可,疾病发展时间较长,发病情况与人类更相似。探讨该模型的特点,不仅对研究 SLE 发病机制、开发新的治疗方案具有一定的指导意义,而且为研究环境因素在 SLE 发病中的地位提供了手段。

## 参考文献

- [1] Satoh M, Reeves W H. Induction of lupus-associated autoantibodies in BALB/c mice by intraperitoneal injection of pristane. [J]. J Exp Med, 1994, 180(12): 2341-2346.
- [2] 高增燕,孙杰,王艳茹,等.降植烷诱导 C57BL/6 狼疮性肾病鼠模型的建立和生物学鉴定 [J]. 苏州大学学报:医学版,2010, 30(3): 498-502.
- [3] Satoh M, Kumar A, Kanwar Y S, et al. Anti-nuclear antibody production and immune-complex glomerulonephritis in BALB/c mice treated with pristane [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92: 10934-10938.
- [4] 崔广梅. Pristane 诱导 BALB/c 狼疮鼠模型的实验研究 [D]. 成都: 四川大学, 2004.
- [5] 余立凯,黄安斌,侯晓华. 自发性狼疮鼠小鼠模型研究进展 [J]. 国际病理科学与临床杂志, 2009, 29(1): 82-85.
- [6] Via C S. Advances in lupus stemming from the parent-into-F1 model [J]. Trends Immuno, 2010, 3(6): 236-245.