

· 论 著 ·

## 抗体封闭趋化蛋白受体 5 对 1 型糖尿病发病的影响

冯 皓, 郭葆玉\*

(第二军医大学药学院生化药理学教研室, 上海 200433)

[摘要] 目的: 研究体内封闭趋化蛋白受体 5 (CCR5) 分子对严重联合免疫缺陷小鼠 (severe combined immunodeficient NOD, NOD. *Scid*) 1 型糖尿病发病的影响。方法: 将发病非肥胖性糖尿病小鼠 (1 只) 的脾细胞腹腔注射至 NOD. *Scid* 小鼠体内, 将这些小鼠随机分成 2 组 (每组 8 只): 抗 CCR5 组小鼠腹腔注射抗 CCR5 膜外第一襻的多克隆抗体, 1 周 3 次, 共计 12 次; 对照组相同方法注射 PBS, 同时测定其血糖和体重。脾细胞注射后 70 d 或当小鼠出现重度糖尿病临床表现时处死, 进行组织学观察和脾细胞分泌细胞因子的 ELISA 测定。结果: 脾细胞注射后 70 d 内, 抗 CCR5 组小鼠糖尿病发病率为 37.5% (3/8), 对照组为 100% (8/8); 胰腺炎积分抗 CCR5 组较对照组差异显著 ( $P < 0.05$ ); 抗 CCR5 组 L-2、L-10、IFN- $\gamma$  水平分别为 25.2、27.3 pg/ml 和 0.238 ng/ml, 对照组为 57.7、31.6 pg/ml 和 18.03 ng/ml, 前者的 L-2 和 IFN- $\gamma$  水平显著低于后者 ( $P < 0.05$ )。结论: 在 NOD. *Scid* 小鼠体内注射抗体封闭 CCR5 可以部分抑制 1 型糖尿病的发生。

[关键词] 趋化蛋白受体 5; 1 型糖尿病; T 淋巴细胞

[中图分类号] R 587.1

[文献标识码] A

[文章编号] 0258-879X (2004) 10-1097-03

### Effects of anti-chemokine receptor-5 antibody on type 1 diabetes

FENG Hao, GUO Bao-Yu\* (Department of Biochemical Pharmacy, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To explore the antidiabetogenic effect of antibody blocking portion of chemokine receptor-5 antibody (CCR5) molecule. **Methods:** The severe combined immunodeficient NOD (NOD. *Scid*) mice, injected i.p. with splenocytes from nonobese diabetic mouse, were randomly divided into 2 groups (8 of each group): anti-CCR5 Ab group and PBS group. The mice in anti-CCR5 Ab group were treated with a specific polyclonal antibody, targeting the first extracellular loop of CCR5, and PBS group was treated with PBS. Blood glucose levels were measured to observe the anti-diabetogenic effect of the antibody. Histological examination and ELISA analysis were also performed. **Results:** Within 70 d, all of the control mice developed diabetes while 5 of the 8 mice treated with anti-CCR5 Ab were diabetes-free. The difference of inflammation score between 2 groups was significant ( $P < 0.05$ ). The supernatant of cultured splenocytes from anti-CCR5-treated mice contained L-2 (25.2 pg/ml), L-10 (27.3 pg/ml) and IFN- $\gamma$  (0.238 ng/ml), whereas that from control mice contained L-2 (57.7 pg/ml), L-10 (31.6 pg/ml) and IFN- $\gamma$  (18.03 ng/ml). **Conclusion:** Administration of antibody, which targeting the first extracellular loop of CCR5, can induce the resistance to type 1 diabetes in the adoptive transfer model.

[KEY WORDS] chemokine receptor-5; diabetes type 1; T lymphocytes

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(10): 1097-1099]

\* 1 型糖尿病系 T 淋巴细胞介导的器官特异性自身免疫性疾病, 病理特点包括胰岛单核细胞浸润、 $\beta$  细胞凋亡、胰岛素分泌不足等。近年来的研究发现趋化因子及其受体在胰岛发生炎症的过程中具有重要的作用<sup>[1,2]</sup>。本研究拟在过继性 1 型糖尿病模型小鼠上使用抗体封闭的方法研究趋化蛋白受体 5 (CCR5) 同 1 型糖尿病的关系。

### 1 材料和方法

1.1 过继性糖尿病模型小鼠的制备 雌性严重联合免疫缺陷小鼠 (severe combined immunodeficient NOD, NOD. *Scid*) 16 只, 8~10 周龄, 血糖值正常 (数据未给出); 发病非肥胖性糖尿病 (nonobese dia-

betic, NOD) 小鼠 1 只 (血糖: 27.2 mmol/L); 正常 NOD 小鼠 1 只 (10 周龄, 血糖: 5.2 mmol/L) 均购于中科院上海实验动物中心。NOD. *Scid* 小鼠饲养于 SPF 级环境。发病 NOD 小鼠眼球放血后颈椎脱臼法处死, 剖腹取脾; 置 RPMI 1640 完全培养液 (含双抗) 中剪碎; 置 200 目尼龙网上研磨、过滤; 置红细胞裂解缓冲液中处理 1 次; 4 条件下离心 (1 000 r/min, 10 min), RPMI 1640 完全培养液重悬洗涤, 反复 2 次; 细胞计数, 调整浓度, 得到  $5 \times$

\* [基金项目] 国家自然科学基金 (30371349)。

[作者简介] 冯 皓 (1977-), 男 (汉族), 硕士生

\* Corresponding author. E-mail: byguo163@163.net

10<sup>7</sup>/ml 的脾细胞悬液。立即将该悬液腹腔注射至 NOD. Scid 小鼠(1 × 10<sup>7</sup>/只)。

1.2 抗体及注射过程 抗小鼠 CCR5 膜外第一榫多克隆抗体系我室制备, 具体方法及特异性检测详见参考文献<sup>[3-7]</sup>。将上述接受过继的小鼠随机分成两组(n= 8), 抗 CCR5 组小鼠腹腔注射抗 CCR5 抗体, 每次 10 μg (稀释于 200 μl PBS), 1 周 3 次, 共计 4 周; 对照组腹腔注射相同剂量的 PBS。每周测定质量、血糖, 待小鼠出现严重糖尿病临床表现或脾细胞注射后 70 d 实验结束时处死。

1.3 血糖值测定 脾细胞注射后第 2 周起每周 2 次采鼠尾静脉血, 使用快速血糖仪(美国 Medisense 公司的 Precision Plus)测定随机血糖, 连续 2 次血糖值大于 13.9 mmol/L 诊断为糖尿病。

1.4 胰岛病理学观察 小鼠胰腺经甲醛固定、石蜡包埋、切片后进行 H-E 染色; 计数胰岛数目, 统计胰岛炎性积分: 0 分, 正常; 1 分, 边缘性胰岛炎(炎细胞浸润 < 50%); 2 分, 胰岛炎(炎细胞浸润 > 50%); 3 分, 严重胰岛炎(胰岛形态结构完全破坏)。

1.5 细胞因子 ELISA 测定 取 NOD. Scid 小鼠脾制成单细胞悬液, 置于 96 孔微型培养板中(2 × 10<sup>4</sup>/孔)作为反应细胞; 取正常 NOD. Scid 小鼠胰腺细胞作为刺激细胞, 与上述细胞共同孵育于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 条件中, 培养 24 h 收集上清液作 IL-2 测定, 48 h 收集上清液作 IL-10 和 IFN-γ 测定。

1.6 统计学分析 均数比较采用 t 检验。

## 2 结果

2.1 NOD. Scid 小鼠糖尿病发病率 注射发病 NOD 小鼠脾细胞后 1~ 4 周两组小鼠血糖均无变化。第 5 周对照组中 1 只小鼠血糖值突然升高(20.6 mmol/L), 以后每周均有 1~ 2 只小鼠血糖骤升, 至第 10 周对照组中所有小鼠血糖值均远远大于糖尿病诊断阈值, 发病率为 100% (8/8); 而抗 CCR5 组至接受细胞注射后 10 周共有 3 只小鼠血糖异常, 发病率为 37.5% (3/8)。

2.2 胰腺组织学观察 对照组小鼠胰腺组织出现典型胰岛炎性改变。胰岛细胞呈进行性破坏、消失, 胰岛明显变小, 数目减少。胰岛内及周围有大量炎细胞浸润, 核大、深染(图 1A)。抗 CCR5 组未发病小鼠胰岛结构完整, 未见明显炎细胞浸润(图 1B)。同抗 CCR5 组相比, 对照组小鼠胰岛炎性浸润严重, 炎性

积分有显著差异(P < 0.05, 表 1)。

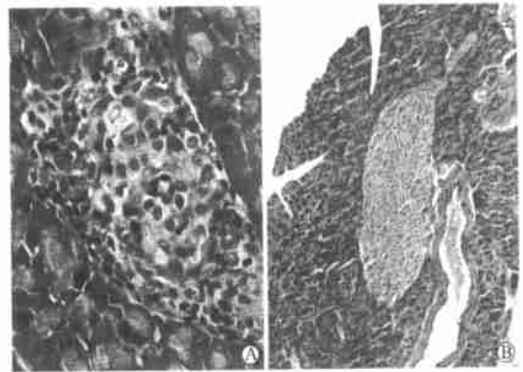


图 1 实验小鼠胰岛组织学观察(H-E 染色)

Fig 1 H-E staining of pancreatic islets from mice  
A: Anti-CCR5 group (× 400); B: Control group (× 100)

表 1 实验小鼠不同炎性积分胰岛数的分布

Tab 1 Pancreatic islets distribution in mice with different inflammation scores

Group	Inflammation score				Total islets
	0	1	2	3	
Anti-CCR5	53*	10	4	0*	67
Control	1	5	9	40	55

\* P < 0.05 vs control group

2.3 细胞因子测定 Th1/Th2 类细胞因子分泌程式失调是 1 型糖尿病发病过程中的重要病理变化, 我们使用正常 NOD. Scid 小鼠胰腺细胞作为抗原, 以两组小鼠脾细胞为反应细胞, 进行体外刺激, ELISA 法测定 IL-2、IL-10、IFN-γ。抗 CCR5 组 IL-2、IL-10、IFN-γ 分别为 25.2、27.3 pg/ml 和 0.238 ng/ml, 对照组为 57.7、31.6 pg/ml 和 18.03 ng/ml。两组数据比较, IL-2 和 IFN-γ 水平有显著差异(P < 0.05), IL-10 差异不显著。

## 3 讨论

迄今为止, 研究者已在人和小鼠的 CD4<sup>+</sup> T 细胞、CD8<sup>+</sup> T 细胞、NK 细胞和单核细胞上发现 CCR5 的表达<sup>[8,9]</sup>。CCR5 作为重要的免疫分子在单核/巨噬细胞向炎症部位的趋化活动中起着十分关键的作用, 单核细胞在胰岛选择性的聚积是 1 型糖尿病的重要病理特征之一<sup>[10]</sup>; 另外, CCR5<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T 细胞还可通过 Fas、穿孔素等途径直接或间接的导致 β 细胞的凋亡<sup>[11,12]</sup>。近年来发现, CC 类趋化因子还具有增强 T 细胞和 NK 细胞裂解细胞能力和促进 T 细胞增殖方面的作用。现在有人提出 MIP-1α、MIP-

1 $\beta$  RANTES, ATAC 和 IFN- $\gamma$ 在原发性和继发性免疫反应中是作为一个功能单元发挥作用的,倾向于将上述5种细胞因子统称为1类细胞因子而非原先的Th1类细胞因子<sup>[13]</sup>。故有人推测,在体内封闭CCR5分子或选择性去除CCR5<sup>+</sup>细胞可以阻断一些由1类细胞因子介导的疾病(如1型糖尿病)<sup>[14,15]</sup>。

本实验中由于抗CCR5抗体阻碍了CCR5分子同其配体的结合,趋化蛋白的作用无法得以有效的发挥,影响单核细胞选择性的向胰岛聚积,故胰岛的单核细胞浸润大大降低。其次,从结果中可见抗CCR5抗体也影响了Th1细胞分泌炎症细胞因子,而L-2、NF- $\gamma$ 分泌水平的下降势必抑制T细胞的活化、增殖、分化过程和T细胞间的相互作用。

当然,在过继的脾细胞中还包括效应性T细胞,如针对 $\beta$ 细胞自身抗原的特异性T细胞。另外,我们发现抗CCR5组中有3只小鼠在注射了抗体后10周内发生了糖尿病,提示我们的抗体并未完全阻断小鼠体内的CCR5同其配体的结合,或者尚有其他受体可以替代CCR5分子发挥作用,这些问题都有待在以后的研究中加以解决。

## [参考文献]

[1] Atkinson MA, Wilson SB. Fatal attraction: chemokines and type 1 diabetes[J]. *J Clin Invest*, 2002, 110(11): 1611-1613

[2] Bradley LM, Aensio VC, Schibetz L, et al. Islet-specific Th1, but not Th2, cells secrete multiple chemokines and promote rapid induction of autoimmune diabetes[J]. *J Immunol*, 1999, 162(4): 2511-2520

[3] Murai M, Yoneyama H, Harada A, et al. Active participation of CCR5<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in the pathogenesis of liver injury in graft-versus-host disease[J]. *J Clin Invest*, 1999, 104(1): 49-57

[4] Guo BY, Zhang SY, Mukaida N, et al. CCR5 gene expression in fulminant hepatitis and DTH in mice[J]. *WJG*, 1998, 4(1): 14-18

[5] 郭葆玉, 久野耕嗣, 向田直使, 等. 小鼠 $\beta$ 趋化因子受体CCR5基因的克隆[J]. 第二军医大学学报, 1997, 18(3): 231-234

Guo BY, Kuno K, Mukaida N, et al. Molecular cloning of  $\beta$  chemokine receptor in mouse CCR5[J]. *Di-er Junyi Daxue*

*Xuebao(Acad J Sec Mil Med Univ)*, 1997, 18(3): 231-234

[6] 郭葆玉, 张淑英, 程振球, 等. 融合表达 $\beta$ 趋化因子受体5NH<sub>2</sub>端膜外第一攀及其特异抗体F(ab')<sub>2</sub>的制备[J]. 第二军医大学学报, 1999, 20(3): 142-145

Guo BY, Zhang SY, Cheng ZQ, et al. Fusion expression of the first extracellular membrane loop chemokine receptor 5NH<sub>2</sub>-terminal and preparation of its specific antibody F(ab')<sub>2</sub>[J]. *Di-er Junyi Daxue Xuebao(Acad J Sec Mil Med Univ)*, 1999, 20(3): 142-145

[7] 郭葆玉, 久野耕嗣, 张淑英, 等. 克隆超级基因家族中的新基因的一种PCR同源产物[J]. 第二军医大学学报, 1998, 19(2): 101-105

Guo BY, Kuno K, Zhang SY, et al. The PCR homology primers in cloning novel gene member of the supergene-family[J]. *Di-er Junyi Daxue Xuebao(Acad J Sec Mil Med Univ)*, 1998, 19(2): 101-105

[8] Mack M, Cihak J, Simonis C, et al. Expression and characterization of the chemokine receptors CCR2 and CCR5 in mice[J]. *J Immunol*, 2001, 166(2): 4697-4704

[9] Kunkel EJ, Boisvert J, Murphy K, et al. Expression of the chemokine receptors CCR4, CCR5, and CXCR3 by human tissue infiltrating lymphocytes[J]. *Am J Pathol*, 2002, 160(1): 347-355

[10] Murdoch C, Finn A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases[J]. *Blood*, 2000, 95(10): 3032-3043

[11] Mauricio D, Mandrup-Poulsen T. Apoptosis and the pathogenesis of IDDM. A question of life and death[J]. *Diabetes*, 1998, 47(10): 1537-1543

[12] Su X, Hu Q, Kristan JM, et al. Significant role for Fas in the pathogenesis of autoimmune diabetes[J]. *J Immunol*, 2000, 164(5): 2523-2532

[13] Dorner BG, Scheffold A, Rolph MS, et al. MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES, and ATAC/lymphotactin function together with IFN- $\gamma$  as type 1 cytokines[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(9): 6181-6186

[14] Gao P, Zhou XY, Yashiro-Ohtani Y, et al. The unique target specificity of a nonpeptide chemokine receptor antagonist: selective blockade of two Th1 chemokine receptors CCR5 and CXCR3[J]. *J Leukoc Biol*, 2003, 73(3): 273-280

[15] Brühl H, Cihak J, Stangassinger M, et al. Depletion of CCR5-expressing cells with bispecific antibodies and chemokine toxins: a new strategy in the treatment of chronic inflammatory diseases and HIV[J]. *J Immunol*, 2001, 166(3): 2420-2426

[收稿日期] 2004-02-27 [修回日期] 2004-06-28

[本文编辑] 尹茶