

## 基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxh.002761

# 慢病毒介导的过表达 NR4A1 单核细胞缓解狼疮小鼠狼疮性肾炎的研究

林佳忆<sup>1</sup>, 张雅琴<sup>1</sup>, 刘 锦<sup>1</sup>, 曹颖平<sup>1</sup>, 李 频<sup>2</sup>, 张 旻<sup>1</sup>, 杨旭伟<sup>2</sup>

(福建医科大学附属协和医院 1. 检验科; 2. 风湿科, 福州 350001)

**【摘要】目的:**探索过表达 NR4A1 是否能够缓解狼疮性肾炎(lupus nephritis, LN)的肾炎症状。**方法:**通过腹腔注射 0.5 mL pristane 构建狼疮小鼠模型, 分为生理盐水对照(SC)组、pristane 对照(PC)组、空载体对照(VC)组及过表达 NR4A1 治疗(NR4A1)组。第 20 周尾静脉注射过表达 NR4A1 的脾脏单核细胞进行治疗。第 28 周测量小鼠踝关节左右直径。HE 染色及半定量评分评估肾脏病理改变, ELISA 检测血清肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )及抗 ds-DNA 浓度。荧光定量 qPCR 检测脾脏 NR4A1、Bcl-2 基因 mRNA 表达。**结果:**与 SC 组相比, PC 组 LN 相关活动指标明显升高, 踝关节直径[4.69(4.26, 5.14) mm,  $P=0.000$ ]、抗 ds-DNA 抗体浓度[(173.11  $\pm$  25.49) ng/mL,  $P=0.000$ ]、肾脏病理评分[2.78(2.68, 2.81),  $P=0.000$ ]和 NR4A1 表达(0.40  $\pm$  0.09,  $P=0.008$ )明显降低。与 PC 组、VC 组相比, NR4A1 组 LN 活动指标明显改善, 踝关节直径[3.80(3.44, 4.20) mm,  $P_{PC}=0.002$ ,  $P_{VC}=0.033$ ]、抗 ds-DNA 抗体浓度[(51.92  $\pm$  10.91) ng/mL,  $P_{PC}=0.008$ ,  $P_{VC}=0.025$ ]、肾脏病理评分[1.39(1.30, 1.49),  $P_{PC}=0.002$ ,  $P_{VC}=0.018$ ]。ELISA 结果显示 NR4A1 组 TNF- $\alpha$  浓度[(542.86  $\pm$  108.28) pg/mL]明显低于 PC 组[(1 779.00  $\pm$  358.40) pg/mL,  $P=0.008$ ]、VC 组[(1 759.71  $\pm$  280.27) pg/mL,  $P=0.010$ ]。Real-time PCR 结果显示 NR4A1 组 Bcl-2 基因表达(1.92  $\pm$  0.58)明显高于 PC 组(0.48  $\pm$  0.20,  $P=0.000$ )。**结论:**过表达 NR4A1 缓解 LN 小鼠 LN 症状, 降低肾炎活动指标, 可能涉及 NR4A1、TNF- $\alpha$  及 Bcl-2 之间的相互作用。

**【关键词】**狼疮性肾炎; NR4A1; 单核细胞; 凋亡; 肿瘤坏死因子- $\alpha$ **【中图分类号】**R593.24**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2020-02-12

## Lentivirus-mediated overexpressed NR4A1 monocytes in the treatment of lupus nephritis in lupus mice

Lin Jiayi<sup>1</sup>, Zhang Yaqin<sup>1</sup>, Liu Jin<sup>1</sup>, Cao Yingping<sup>1</sup>, Li Pin<sup>2</sup>, Zhang Yang<sup>1</sup>, Yang Xuwei<sup>2</sup>

(1. Department of Laboratory Medicine; 2. Department of Rheumatology, Fujian Medical University Union Hospital)

**【Abstract】Objective:** To explore whether overexpression of NR4A1 can alleviate lupus nephritis (LN). **Methods:** A mouse model of LN was constructed by intraperitoneal injection of 0.5 mL pristane, divided into saline control group (SC), pristane control group (PC), vector control group (VC) and overexpressed NR4A1 group. At the end of 20<sup>th</sup> week, the monocytes overexpressed NR4A1 were injected into the tail vein. The diameter of ankles was measured at the end of 28<sup>th</sup> week. Renal pathological sections were stained with HE staining and semi-quantitative scores were used to assess renal pathological damage. Serum TNF- $\alpha$  and anti-ds-DNA concentrations were measured by ELISA. The expression of Bcl-2 and NR4A1 in the spleen was detected by real-time PCR. **Results:** The results showed that compared with the SC group, LN-related activity indicators in the PC group were significantly increased, but the ankle joint diameter [4.69 (4.26, 5.13) mm,  $P=0.000$ ], the anti-ds-DNA antibody concentration [(173.11  $\pm$  25.49) ng/mL,  $P=0.000$ ], renal pathology score [2.78 (2.68, 2.81),  $P=0.000$ ], and the expression of NR4A1 (0.40  $\pm$  0.09,  $P=0.008$ ) was significantly reduced. Compared with the PC and VC groups, the NR4A1 group LN activity indicators were significantly improved, the ankle joint diameter [3.80 (3.44, 4.20) mm,  $P_{PC}=0.002$ ,  $P_{VC}=0.033$ ], the concentration of anti-ds-DNA antibody [(51.92  $\pm$  10.91) ng/mL,  $P_{PC}=0.008$ ,  $P_{VC}=0.025$ ], renal pathology score [1.39 (1.30, 1.49),  $P_{PC}=0.002$ ,  $P_{VC}=0.018$ ]. ELISA results showed that the concentration of TNF- $\alpha$  in the NR4A1 group [(542.86  $\pm$  108.28) pg/mL] was significantly lower than that of the PC group [(1 779.00  $\pm$  358.40) pg/mL,  $P=0.008$ ] and the VC group [(1 759.71  $\pm$  280.27) pg/mL,  $P=0.010$ ]. Real-time PCR results showed that the expression of Bcl-2 gene in the NR4A1 group (1.92  $\pm$  0.58) was significantly higher than that of the PC group (0.48  $\pm$  0.20,  $P=0.000$ ). **Conclusion:** Overexpression of

作者介绍: 林佳忆, Email: linjiayi1992@aliyun.com,

研究方向: 系统性红斑狼疮发病机制及治疗研究。

通信作者: 杨旭伟, Email: yangxwhk@126.com。

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目(编号: 2016J01551)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20210325.1052.002.html>

(2021-03-29)

NR4A1 alleviates the symptoms of LN and reduces LN activity indicators in LN mice, which may involve the interaction among NR4A1, TNF- $\alpha$  and Bcl-2.

**[Key words]** lupus nephritis; NR4A1; monocyte; apoptosis; tumor necrosis factor- $\alpha$

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种多因素引起的自身免疫病,在我国发病率为(30~70)/10万,以年轻女性为主。其特点是外周血中存在以抗核抗体为代表的多种自身抗体<sup>[1]</sup>。患者生存质量差、病死率高,常出现多种临床症状,狼疮性肾炎(lupus nephritis, LN)是主要死因之一。因此,缓解或治疗 SLE 及其临床并发症是主要任务。研究发现 SLE 的发病与机体内凋亡细胞的清除缺陷密切相关<sup>[2]</sup>,当机体存在凋亡细胞清除缺陷时,体内凋亡细胞碎片累积打破免疫耐受,诱发局部及全身炎症,产生自身抗体。单核巨噬细胞作为固有免疫系统的重要组成部分,在清除凋亡细胞、调节内环境稳态中发挥重要作用<sup>[3]</sup>。单核巨噬细胞通过识别凋亡细胞膜内侧磷脂酰丝氨酸,进而吞噬并清除凋亡细胞<sup>[4]</sup>。当单核巨噬细胞自身凋亡增高时,体内内环境稳态破坏,凋亡细胞增多,可能引起系统性红斑狼疮等自身免疫病<sup>[2]</sup>。

核受体 NR4A1 是 NR4A 受体超家族成员之一,当前研究发现 NR4A1 具有抗凋亡功能,在胰腺癌与结肠癌细胞中发现 NR4A1 高表达,当抑制剂或 siRNA 干扰后,降低胰腺癌细胞和结肠癌细胞中 NR4A1 基因表达,使 SURVIVIN 基因低表达,呈现生长抑制且使凋亡增加<sup>[5-6]</sup>,表明 NR4A1 抑制细胞凋亡来促进细胞生长和生存。

近年来关于 NR4A1 的研究主要集中于肿瘤、代谢性疾病及血管重塑等方面<sup>[7-8]</sup>,国内外少有关于 NR4A1 与自身免疫病的相关研究报道。文献报道 SLE 患者外周血单个核细胞 NR4A1 的 mRNA 表达降低<sup>[9]</sup>,而 NR4A1 具有抗凋亡功能,且目前研究发现 SLE 的发病机制与凋亡细胞的清除缺陷密切相关<sup>[2]</sup>。因此,本研究通过给 LN 小鼠输注过表达 NR4A1 的小鼠脾脏单核细胞,观察狼疮小鼠的 LN 相关症状是否好转,为缓解、治疗 SLE 提供新思路 and 方向。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料与仪器

过表达 NR4A1 慢病毒载体购自上海吉玛制药技术

有限公司,小鼠肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )检测试剂盒(DY410-05)购自美国 R&D 公司,小鼠抗 ds-DNA 抗体检测试剂盒(3031)购自美国 Chondrex 公司,Prism (p2870)购自美国 Sigma-Aldrich 公司。逆转录试剂盒 PrimeScript™ RT reagent Kit(RR047A)及荧光定量 qPCR 试剂盒(RR420A)购自日本 Takara 公司。兔抗鼠 NR4A1 抗体(ab109180)购自美国 Abcam 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 构建 LN 小鼠动物模型及分组 48 只 6~8 周雌性 BALB/c 小鼠(购自上海斯莱克实验动物有限责任公司)随机分为 4 组,生理盐水对照组(saline control group, SC 组)、pristane 对照组(pristane control group, PC 组)、空载体对照组(vector control group, VC 组)及过表达 NR4A1 组(Overexpressed NR4A1 group, NR4A1 组)。构建 LN 小鼠动物模型时,往 PC 组、VC 组及 NR4A1 组的小鼠腹腔注射 0.5 mL pristane。SC 组腹腔注射 0.5 mL 生理盐水。LN 小鼠动物模型构建时间为 20 周。

1.2.2 过表达 NR4A1 慢病毒转染的小鼠脾脏细胞及 Western blot 验证 取野生型 8 周雌性 BALB/c 小鼠脾脏,无菌研磨并于细胞培养箱中 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 5 h,弃去悬浮细胞,留下贴壁细胞并计数  $1 \times 10^7$  个,使用 24 孔培养板,每孔加入  $0.5 \times 10^5$  个细胞,加入 0.5 mL 含 10% FBS 的 DMEM 培养液,37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养 24 h。弃旧培养液,加入稀释的病毒培养液,于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下的细胞培养箱中培养 24 h。更换培养液并继续培养 24 h,弃旧培养液,用无菌 PBS 重悬。细胞分组为阴性对照组、空载体组及过表达 NR4A1 组。按蛋白提取试剂说明书要求用超声破碎仪破碎细胞并提取各组细胞蛋白,采用 BCA 法检测蛋白浓度。蛋白样品与 2× 商鞅缓冲液等体积混合,100℃加热 5 min,在 10% SDS-PAGE 凝胶中电泳分离, PVDF 膜上转膜,5% 脱脂奶粉封闭 1 h,加入一抗过夜孵育,加入二抗,使用 ECL 进行显色。

1.2.3 过表达 NR4A1 慢病毒转染的小鼠脾脏细胞治疗 LN 小鼠 在诱导模型第 20 周结束后采用尾静脉注射,每只小鼠注射  $0.5 \times 10^5$  个细胞/0.1 mL。SC 组注射等体积生理盐水。

1.2.4 LN 小鼠模型的一般评估 评估指标包含小鼠踝关节左右直径、尿蛋白、肾脏病理积分。脚部关节直径用游标卡尺测量。尿蛋白浓度测定采用目测比色法,在第 28 周实验结束后,采用提尾反射法刺激小鼠排尿并收集尿液,将尿蛋白检测试纸浸泡于尿液中,10 s 后取出并抹去多余尿液,静置 1 min 后参考标准比色卡目测比色。肾脏病理 HE 染色后采用积分量化方式评定,由病理医师对其按照 0~4 分进行评分<sup>[10]</sup>,评定规则见表 1。

表 1 LN 肾小球评分细则表

评分	肾小球
0	正常肾小球
1	局灶性,轻度增生
2	中度、多灶性增生,基质和炎症细胞增多
3	弥漫性增生、球囊粘连
4	肾小球硬化

1.2.5 小鼠血清抗 ds-DNA 抗体及 TNF- $\alpha$  浓度检测 LN 小鼠建模第 28 周结束后,采用眼内眦静脉取血法采集小鼠眼内眦静脉血,室温静置 15 min,4℃,3 000 r/min 离心 15 min,取上层血清分装后置于-80℃冰箱保存。采用 ELISA 检测血清抗 ds-DNA 抗体及 TNF- $\alpha$  浓度,严格按试剂盒 protocol 操作。

1.2.6 real-time qPCR 检测小鼠脾脏 NR4A1、Bcl-2 的 mRNA 相对表达 实验采用 Trizol 法提取小鼠脾脏组织的总 RNA,使用逆转录试剂盒将总 RNA 逆转录为 cDNA,在 Roche LightCycler 480 仪器上采用 real-time qPCR 检测小鼠脾脏 Bcl-2 的 mRNA 相对表达。根据 NCBI 网站上 GAPDH、Bcl-2 的序列设计 PCR 引物(表 2)。反应程序:变性(95℃,10 s),扩增(95℃,5 s;60℃,30 s;40 个循环),溶解曲线(95℃,5 s;60℃,1 min;95℃)。

### 1.3 统计学处理

采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。正态分布的计量资料以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,非正态分布计量资料以

$M_d(P_{25}, P_{75})$ 表示。多样本均数比较采用非参数检验 Kruskal-Wallis 并进行组内多重比较。计数资料以频数表示,采用卡方检验。Western blot 图片处理采用 Image lab 3.0(Bio-Rad,美国)和 Image J 软件进行处理。图片采用 Graph-Pad Prism 8.0 绘制。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 LN 小鼠模型的建立

在 Pristane 腹腔注射构建 LN 小鼠动物模型后第 12 周,观察到 PC 组小鼠脚部的关节出现红肿现象(图 1A 右)。第 28 周时,PC 组小鼠踝关节左右直径[4.69(4.29,5.13) mm]大于 SC 组[3.08(3.04,3.20) mm, $H=-57.123, P=0.000$ ]。在第 28 周时检测 SC、PC 组小鼠尿蛋白(表 3),发现 SC 组均为  $\pm$  (12 只)而 PC 组小鼠出现++(6 只)至+++ (6 只)的蛋白尿。

肾脏 HE 染色显示,SC 组可见正常肾小球(图 1C 左),偶见轻度增生的肾小球。PC 组显微镜下明显可见大多数肾小球出现弥漫性系膜细胞增生,同时可见到球囊粘连,部分肾小球甚至出现局灶性或节段性硬化(图 1C 右),半定量计分发现 PC 组[2.78(2.68,2.81)分]肾小球评分高于 SC 组[0.19(0.17,0.23)分, $H=-31.042, P=0.000$ ](图 1D)。

此外,ELISA 检测到 PC 组血清抗 ds-DNA 抗体浓度 [(173.11  $\pm$  25.49) ng/mL](图 1E)明显高于 SC 组 [(17.16  $\pm$  8.08) ng/mL, ( $H=-31.625, P=0.000$ )]。

表 2 qRT-PCR 引物序列

引物名	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
GAPDH	AGGTCGGTGTGAACGGATTTC	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
NR4A1	ATGCCTCCCCTACCAATCTTC	CACCAGTTCCTGGAACTTGA
Bcl-2	ATGCCTTTGTGGAAGTATATGCG	GGTATGCACCCAGAGTGATGC

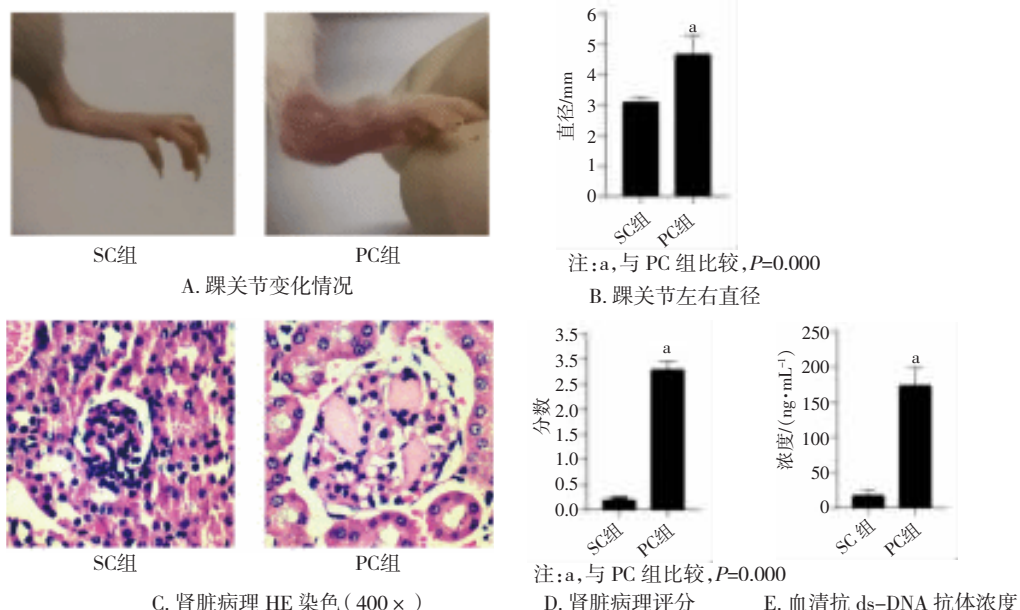
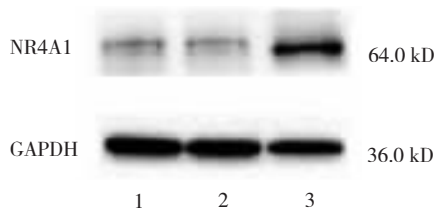


图 1 LN 小鼠动物模型构建



## 2.2 过表达 NR4A1 慢病毒感染单核细胞

经过 72 h 转染后, Western blot 结果表明转染过表达 NR4A1 慢病毒的单核细胞 NR4A1 表达高于阴性对照组和空载体组(图 2)。



1. 空白组; 2. 空载体对照组; 3. 过表达 NR4A1 组

图 2 Western blot 验证 NR4A1 转染情况

## 2.3 过表达 NR4A1 减轻 LN 小鼠活动指标

过表达 NR4A1 的小鼠脾脏单核细胞输注后, LN 小鼠各项活动指标均在一定程度上得到缓解。

2.3.1 踝关节左右直径变化 NR4A1 组踝关节左右直径 [3.80 (3.44, 4.20) mm] 明显小于 PC 组 [4.69 (4.26, 5.14) mm],  $H=29.417, P=0.002$ 、VC 组 [4.52 (3.96, 4.77) mm],  $H=22.292, P=0.033$  (图 3A)。

2.3.2 尿蛋白水平变化 NR4A1 组尿蛋白浓度 ( $\pm$ ; 1 只, +; 7 只, ++; 4 只) 较 PC 组 (++; 6 只, +++; 6 只)、VC 组 (+; 1 只, ++; 6 只, +++; 5 只) 降低 (表 3)。

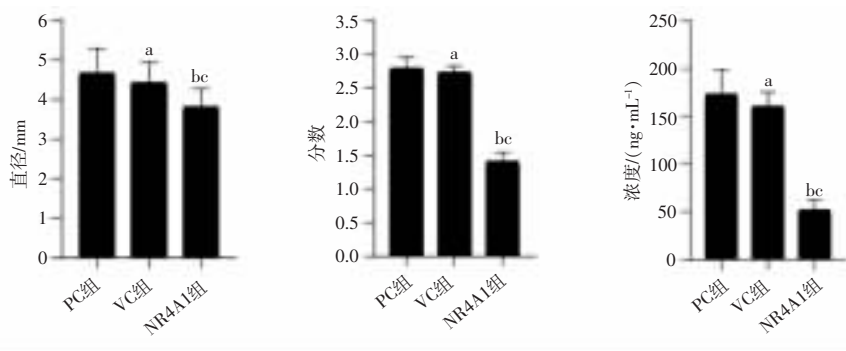
2.3.3 血清抗 ds-DNA 抗体浓度变化 NR4A1 组血清抗 ds-DNA 抗体浓度 [ $(51.92 \pm 10.91)$  ng/mL] 明显低于 PC 组 [ $(173.11 \pm 25.49)$  ng/mL,  $H=19.625, P=0.004$ ]、VC 组 [ $(160.46 \pm 15.05)$  ng/mL,  $H=16.375, P=0.025$ ] (图 3C)。

2.3.4 肾脏病理评分变化 肾脏病理提示 NR4A1 组 LN 缓解, HE 染色镜下观察未见局部/节段性硬化灶, 同时肾小球弥漫增生、球囊粘连数减少, 多见中度及轻度增生肾小球, 可偶见正常肾小球 (图 3D)。其肾脏病理评分 [1.39 (1.30, 1.49)] 低于 PC 组 [2.78 (2.68, 2.81)],  $H=19.042, P=0.005$ 、VC 组 [2.73 (2.68, 2.78)],  $H=16.958, P=0.018$  (图 3B)。

表 3 第 28 周尿蛋白浓度

组别	-	$\pm$	+	++	+++
SC组	0	12	0	0	0
PC组 <sup>a</sup>	0	0	0	6	6
VC组 <sup>b</sup>	0	0	1	6	5
NR4A1组 <sup>c-e</sup>	0	1	7	4	0

注: a, PC 组与 SC 组相比,  $\chi^2=24.000, P=0.000$ ; b, VC 组与 PC 组相比  $\chi^2=1.091, P=0.580$ ; c, NR4A1 组与 SC 组相比,  $\chi^2=22.308, P=0.000$ ; d, NR4A1 组与 PC 组相比,  $\chi^2=14.400, P=0.002$ ; e, NR4A1 组与 VC 组相比,  $\chi^2=10.900, P=0.012$

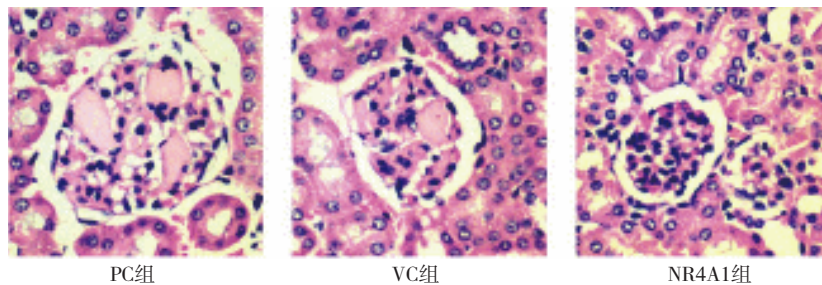


注: a, 与 PC 组比较,  $P=0.000$ ; b, 与 PC 组比较,  $P<0.05$ ; c, 与 VC 组比较,  $P<0.01$

A. 踝关节左右直径

B. 肾脏病理评分

C. 血清抗 ds-DNA 抗体浓度



PC组

VC组

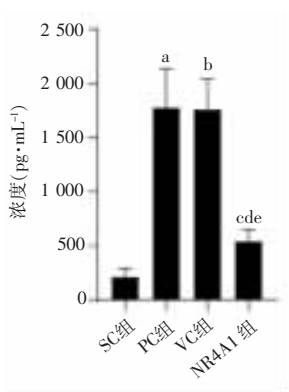
NR4A1组

D. 肾脏病理 HE 染色 (400 $\times$ )

图 3 NR4A1 减轻 LN 小鼠活动指标

## 2.4 过表达 NR4A1 的脾单核细胞降低 LN 小鼠 TNF- $\alpha$ 水平

TNF- $\alpha$  是参与全身炎症的重要细胞因子之一,也是组成急性期反应的细胞因子之一。其与细胞膜表面 TNFR 结合启动细胞信号转导,参与细胞死亡信号转导,诱导细胞凋亡。研究结果显示,PC 组 TNF- $\alpha$  浓度 $[(1\,779.00 \pm 358.40)\text{ pg/mL}]$ 高于 SC 组 $[(212.90 \pm 77.43)\text{ pg/mL}]$ , $H=-30.83$ , $P=0.000$ ](图 1F)。NR4A1 组小鼠血清 TNF- $\alpha$  浓度 $[(542.86 \pm 108.28)\text{ pg/mL}]$ 略高于 SC 组 $[(212.90 \pm 77.43)\text{ pg/mL}]$ , $H=-11.833$ , $P=0.230$ ],而明显低于 PC 组 $[(1\,779.00 \pm 358.40)\text{ pg/mL}]$ , $H=18.250$ , $P=0.008$ ],VC 组 $[(1\,759.71 \pm 280.27)\text{ pg/mL}]$ , $H=17.917$ , $P=0.010$ ](图 4)。



注:a,与 SC 组比较, $P=0.000$ ;b,与 PC 组比较, $P=1.000$ ;c,与 SC 组比较, $P=0.230$ ;d,与 PC 组比较, $P=0.008$ ;e,与 VC 组比较, $P=0.010$

图 4 NR4A1 降低 TNF- $\alpha$  浓度

## 2.5 过表达 NR4A1 组脾脏 NR4A1 基因及抗凋亡基因 Bcl-2 表达升高

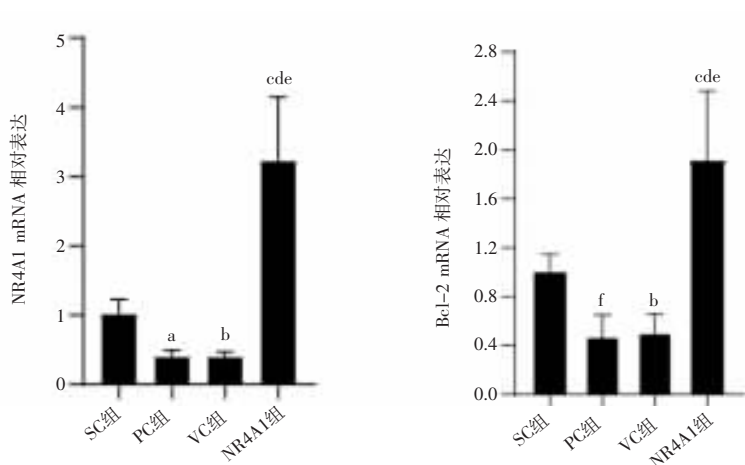
本研究检测了 SC 组、PC 组、VC 组及 NR4A1 组脾脏抗凋亡基因 NR4A1、Bcl-2 表达。qPCR 结果显示(图 5)PC 组 LN 小鼠 $(0.40 \pm 0.09)$ NR4A1 表达明显低于 SC 组 $(1.02 \pm$

$0.21$ , $P=0.007$ )。治疗后 NR4A1 组 $(3.23 \pm 0.92)$ 表达明显高于 PC 组 $(0.40 \pm 0.09)$ , $P=0.007$ 、VC 组 $(0.40 \pm 0.07)$ , $P=0.007$ 。PC 组 Bcl-2 表达 $(0.48 \pm 0.20)$ 低于 SC 组 $(1.01 \pm 0.15)$ , $H=18.667$ , $P=0.007$ 。而 NR4A1 组 Bcl-2 表达 $(1.92 \pm 0.58)$ 明显高于 PC 组 $(0.48 \pm 0.20)$ , $H=-30.208$ , $P=0.000$ 、VC 组 $(0.51 \pm 0.16)$ , $H=-29.250$ , $P=0.000$ )。

## 3 讨论

SLE 是一种累及多器官的自身免疫病,其异常淋巴细胞过度活化,体内产生多种高亲和力自身抗体,出现自身免疫复合物,细胞因子异常及淋巴细胞信号传导紊乱。SLE 发病影响因素多、机制复杂,目前发病机制尚未明确<sup>[1]</sup>。研究表明 SLE 的发病机制与机体内凋亡细胞的清除缺陷密切相关<sup>[2]</sup>,由于凋亡细胞清除缺陷,次级坏死细胞释放自身抗原,从而刺激自身反应性免疫细胞产生自身抗体。细胞凋亡受体体内多种因素调节,一旦出现凋亡失控,可能导致体内炎症因子释放、组织损伤、代谢紊乱等<sup>[12]</sup>。文献报道 SLE 患者外周血单个核细胞 NR4A1 表达低于正常人<sup>[9]</sup>。因此本研究旨在探索过表达 NR4A1 的单核细胞能否缓解 SLE 疾病症状,并探索可能存在的机制。

通过构建 LN 小鼠模型,本实验发现,PC 组 LN 小鼠 NR4A1 表达明显低于 SC 组(图 5),且 PC 组 LN 相关活动指标表现明显(如踝关节左右直径、肾脏病理、抗 ds-DNA 抗体)(图 3)。通过过表达 NR4A1



A. 各组 NR4A1 表达相对表达情况

B. Bcl-2 相对表达情况

注:a,与 SC 组比较, $P=0.008$ ;b,与 PC 组比较, $P=1.000$ ;c,与 SC 组比较, $P>0.05$ ;d,与 PC 组比较, $P=0.000$ ;e,与 VC 组比较, $P=0.000$ ;f,与 SC 组比较, $P=0.007$

图 5 各组 NR4A1、Bcl-2 相对表达情况

可以有效缓解 LN 小鼠活动指标,其踝关节左右直径、尿蛋白浓度均明显下降。此外,肾脏病理同时显示其 LN 症状明显减轻,且血清抗 ds-DNA 浓度降低。这些结果均表明过表达 NR4A1 可以减轻 LN 小鼠 LN 症状。

TNF- $\alpha$  是一种多功能细胞因子,参与多种事件的调节,例如细胞存活和细胞死亡<sup>[13]</sup>。在乳腺癌组织中 NR4A1 高表达,而当使用干扰 RNA 干扰 NR4A1 表达后,TNF- $\alpha$  诱导乳腺癌细胞凋亡增加<sup>[14]</sup>。本实验发现,与 SC 组相比,PC 组血清 TNF- $\alpha$  浓度明显升高,而相较于 PC 组,NR4A1 组 LN 小鼠血清 TNF- $\alpha$  浓度降低(图 4),表明 NR4A1 可能参与调节、抑制 TNF- $\alpha$  诱导的单核细胞凋亡。

Bcl-2 是一种抗凋亡蛋白,有研究指出 SLE 患者单核细胞凋亡明显升高而 Bcl-2 蛋白表达降低<sup>[15]</sup>,说明单核细胞凋亡可能与 Bcl-2 存在密切联系。因此,本实验检测了小鼠脾脏抗凋亡基因 Bcl-2 的表达,结果发现 PC 组小鼠 Bcl-2 表达明显低于 SC 组,而 NR4A1 组 LN 小鼠脾脏 Bcl-2 表达升高(图 5),推测过表达 NR4A1 参与调节 Bcl-2 表达发挥抗凋亡作用,减轻单核细胞凋亡。

综上所述,过表达 NR4A1 可以缓解 LN 小鼠肾炎症状。NR4A1 可提高抗凋亡基因 Bcl-2 表达,而降低 TNF- $\alpha$  水平。而 NR4A1 如何调节 Bcl-2 及 TNF- $\alpha$ ,以及 NR4A1 与单核细胞凋亡、抗凋亡之间的关系仍需后续实验进行验证。本课题组将会进一步研究 NR4A1 与 SLE 之间深层次的联系,对 LN 小鼠相关的凋亡指标,如对凋亡相关蛋白及单核细胞凋亡率等进行检测,通过荧光免疫在细胞内定位 NR4A1,深入分析 NR4A1 与凋亡之间的关联及其机制。

## 参 考 文 献

[1] Lisnevskaja L, Murphy G, Isenberg D. Systemic lupus erythematosus [J]. Lancet, 2014, 384(9957): 1878–1888.

- [2] Mahajan A, Herrmann M, Muñoz LE. Clearance deficiency and cell death pathways: a model for the pathogenesis of SLE[J]. Front Immunol, 2016, 7: 35.
- [3] Atkin-Smith GK, Tixeira R, Paone S, et al. A novel mechanism of generating extracellular vesicles during apoptosis via a beads-on-a-string membrane structure[J]. Nat Commun, 2015, 6: 7439.
- [4] Segawa K, Nagata S. An apoptotic 'eat me' signal: phosphatidylserine exposure[J]. Trends Cell Biol, 2015, 25(11): 639–650.
- [5] Lee SO, Li X, Hedrick E, et al. Diindolylmethane analogs bind NR4A1 and are NR4A1 antagonists in colon cancer cells[J]. Mol Endocrinol, 2014, 28(10): 1729–1739.
- [6] Lee HS, Safe S, Lee SO. Inactivation of the orphan nuclear receptor NR4A1 contributes to apoptosis induction by fangchinoline in pancreatic cancer cells[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2017, 332: 32–39.
- [7] Winthrop KL. The emerging safety profile of JAK inhibitors in rheumatic disease[J]. Nat Rev Rheumatol, 2017, 13(5): 320.
- [8] Schwartz DM, Kanno Y, Villarino A, et al. JAK inhibition as a therapeutic strategy for immune and inflammatory diseases[J]. Nat Rev Drug Discov, 2017, 17(1): 78.
- [9] 杨旭伟, 张 旸, 郑祥雄, 等. SLE 患者外周血单个核细胞 Nr4a1 基因的 mRNA 表达水平[J]. 免疫学杂志, 2015, 31(10): 893–896.
- [10] Tao XL, Fan F, Hoffmann V, et al. Therapeutic impact of the ethyl acetate extract of *Tripterygium wilfordii* Hook F on nephritis in NZB/W F1 mice[J]. Arthritis Res Ther, 2006, 8(1): R24.
- [11] Celhar T, Fairhurst AM. Modelling clinical systemic lupus erythematosus: similarities, differences and success stories[J]. Rheumatology (Oxford), 2017, 56(S1): i88–i99.
- [12] Wu HJ, Fu SQ, Zhao M, et al. Dysregulation of cell death and its epigenetic mechanisms in systemic lupus erythematosus[J]. Molecules, 2016, 22(1): E30.
- [13] Balkwill F. Tumour necrosis factor and cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9(5): 361–371.
- [14] Xie L, Jiang FQ, Zhang XD, et al. Honokiol sensitizes breast cancer cells to TNF- $\alpha$  induction of apoptosis by inhibiting Nur77 expression [J]. Br J Pharmacol, 2016, 173(2): 344–356.
- [15] Liphaus BL, Kiss MH, Carrasco S, et al. Reduced expressions of Fas and Bcl-2 proteins in CD14<sup>+</sup> monocytes and normal CD14 soluble levels in juvenile systemic lupus erythematosus[J]. Lupus, 2013, 22(9): 940–947.

(责任编辑: 冉明会)