

- Inflamm, 2015, 2015;329405
- 3 Morrison SF. Central neural control of thermoregulation and brown adipose tissue [J]. *Auton Neurosci*, 2016, 196: 14–24
 - 4 Morrison SF, Madden CJ. Central nervous system regulation of brown adipose tissue [J]. *Compr, Physiol*, 2014, 4(4): 1677–1713
 - 5 Yang YL, Wang N, Shen ZL, *et al.* Simultaneous telemetric monitoring of the circadian changes in core and BAT temperature in rats; endogenous vasopressin may contribute to reduced BAT thermogenesis and body temperature in the light phase of the circadian cycle [J]. *J Therm Biol*, 2012, 37(4): 316–332
 - 6 Yang YL, Hu XS, Zan W, *et al.* Arginine vasopressin does not mediate heat loss in the tail of the rat [J]. *J Therm Biol*, 2013, 38(5), 247–254
 - 7 杨永录, 沈字玲, 黄涛. 精氨酸加压素在调节性低温中的作用及其机制的研究进展 [J]. *成都医学院学报*, 2009, 4(1): 61–65
 - 8 杨永录, 卜舒, 杨春涛, 等. 不同环境温度对精氨酸加压素引起的大鼠低温的影响及其与尾部散热变化的关系 [J]. *中国病理生理杂志*, 2013, 29(9): 1672–1678
 - 9 Roth J, Zeisberger E, Vybrál S, *et al.* Endogenous antipyretics: neuropeptides and glucocorticoids [J]. *Front Biosci*, 2004, 9: 816–26
 - 10 Nakamura K. Central circuitries for body temperature regulation and fever [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2011, 301(5): 1207–1228
 - 11 胡巢凤, 李楚杰, 张穗梅. 精氨酸加压素对家兔血细胞生成内生致热源的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 1994, 10(4): 358–361
 - 12 Fleisher–Berkovich S, Kagan E, Grossman N, *et al.* Multiple effects of arginine vasopressin on prostaglandin E2 synthesis in fibroblasts [J]. *Eur J Pharmacol*, 2004, 485(1–3): 53–59

(收稿日期: 2017–02–22)

(修回日期: 2017–03–15)

绝经期和生育期雌激素缺乏小鼠细胞因子模式的研究

邵明君 胡 旻 何云芹 朱以军 唐 飞

摘 要 目的 观察雌激素(E_2)缺乏状态下年轻与老龄化 C57BL/6N 小鼠脾脏 IL-2、6、10 和 TNF- α 水平的变化。方法 清洁级健康雌性 C57BL/6 小鼠 80 只, 分为手术去卵巢组、药物去卵巢组、自然绝经组及发情间期组(对照组), 经 Con-A 刺激后 RT-PCR 技术检测 4 组小鼠脾脏 IL-2、6、10 和 TNF- α 水平, ELISA 检测血清 E_2 水平证实分组可靠性。**结果** 3 组实验组血清 E_2 水平均明显低于对照组($P < 0.01$), 而 E_2 水平在 3 组实验组内比较差异无统计学意义。小鼠脾脏表达 IL-2、IL-6 和 TNF- α 水平在自然绝经组升高, 与其他 3 组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$); 而 3 组实验组 IL-10 水平略低于对照组, 差异无统计学意义($P > 0.05$); 然而, 年轻组别中(发情间期组、手术去卵巢组、药物去卵巢组)未发现有 IL-2、IL-6、IL-10 和 TNF- α mRNA 表达的差异。**结论** Con-A 刺激后 E_2 缺乏状态下年轻与老龄化 C57BL/6N 小鼠之间细胞因子模式是不同的, E_2 缺乏对 IL-6、IL-2 和 TNF- α 水平影响作用有限。

关键词 手术去卵巢 药物去卵巢 绝经 细胞因子

中图分类号 R71 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.11.020

Different Cytokines Patten in Young and Aged Mice with Estradiol Deficiency. Shao Mingjun, Hu Min, He Yunqin, *et al.* Department of Gynecology, Jinhua Municipal Central Hospital of Chinese, Zhejiang 321000, China

Abstract Objective To compare the levels of IL-2, IL-6, IL-10 and TNF- α between young and aged C57BL/6N mice with the common feature of low E_2 status. **Methods** Twenty natural aged, 20 surgical varietectomy and 20 medical varietectomy of C57BL/6N mice were chosen in our studies. 20 stage of diestrus served as controls. Blood and spleens were collected 4 hours after injection of con-A. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to determine the mRNA levels of IL-2, IL-6, IL-10 and TNF- α in spleen cells. Serum E_2 levels were assessed using enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** The serum E_2 level of three experiment groups was significantly lower than that of control group ($P < 0.01$), while the difference was not significant when compared it within experiment groups. The levels of IL-2, IL-6 and TNF- α were increased in aged group, and the difference reached statistically significant when compared them with any other groups($P < 0.05$). While the IL-10 level was slight decreased in three exper-

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(Y13H040019)

作者单位: 321000 金华市中心医院

通讯作者: 邵明君, 电子信箱: smjun@126.com

iment groups compared with control group ($P>0.05$). **Conclusion** The cytokines response to Con – A stimulus between young and aged C57BL/6N mice with estradiol deficiency was different. The effect of E_2 to these cytokines may be marginal.

Key words Surgical varietomy; Medical varietomy; Aged mice; Cytokines

众所周知,人类内分泌系统与免疫系统关系密切,雌激素(E_2)通过干扰细胞因子分泌而影响免疫功能^[1]。细胞因子是免疫反应的关键调控因子,参与神经 – 内分泌的调控。绝经期 E_2 和促性腺激素水平的显著变化可能导致体内细胞因子水平的改变,与绝经后免疫功能下降,感染性疾病和恶性肿瘤的发生率上升有关^[2,3]。然而有关绝经期细胞因子模式的详尽报道国内较少,本研究通过检测绝经期小鼠脾脏 IL – 2、6、10 和 TNF – α 水平,对比模拟绝经的年轻小鼠,观察 E_2 缺乏状态下年轻与老龄化小鼠之间是否存在细胞因子水平的差异,为进一步研究 E_2 缺乏和免疫老化的关系提供实验依据。

材料与方 法

1. 一般资料: 清洁级健康雌性 C57BL/ 6 小鼠 80 只,鼠龄 2 ~ 10 个月,由杭州师范大学动物实验中心提供。2 个月龄小鼠随机分为发情间期组、手术去卵巢组、药物去卵巢组,10 个月龄小鼠拟为自然绝经组,每组 20 只。其中手术去卵巢组、药物去卵巢组、自然绝经组为实验组,发情间期组为对照组。

2. 动物模型制作: ①手术去卵巢组: 每只鼠腹腔注射 3% 戊巴比妥 40mg/kg 麻醉,经鼠背面切口切除双侧卵巢^[4]; ②药物去卵巢组: 丙氨瑞林(安徽丰原制药股份有限公司,批号: 20041904) 100 μ g/(kg · d) × 3 个月^[5]; ③自然绝经组和发情间期组: 无干预措施。

3. 绝经期及发情间期判定: 采用阴道细胞学检查,用小棉签蘸取少量生理盐水,擦取小鼠阴道内分泌物顺时针涂在载玻片上晾干,用 95% 乙醇固定,经苏木精 – 伊红染色后予 10 × 10 倍光镜下观察。若显微镜下见有大量白细胞及少量有核细胞为发情间期,连续 5 天内呈现不规则动情周期为绝经期^[6,7]。年轻绝经组于手术或使用药物后 20 天开始判定,自然绝经组和发情间期于 3 个月后进行判定,所有小鼠 3 个月后进行实验,实验前 4h 采用 Con A (10mg/kg) 尾静脉注射。分组可靠性经 ELISA 检测血清 E_2 水平进一步证实。

4. RT – PCR 技术: 新鲜取得小鼠脾脏组织 100mg,经液氮冰冻后 Trizol 法提取总 RNA 用以待测 IL – 2、6、10 和 TNF – α 水平,引物由上海生工生物有限公司合成, β – actin 基因作为内参基因,引物序列

见图 1。电泳法检测纯度,定量后取 5 μ g 经特异性 DNA 酶消化后利用反转录试剂盒进行反转录, – 20 $^{\circ}$ C 保存备用。荧光定量 PCR 反应体系如下: 荧光标记染料 2 × SYBR Green I Master Mix 5 μ l, Forward primer 0.2 μ l, Reverse primer 0.2 μ l, 小鼠脾脏 cDNA 1 μ l, 灭菌三蒸水补至总体积 10 μ l (引物如表 1)。条件为: 95 $^{\circ}$ C 2min, 95 $^{\circ}$ C 15s, 60 $^{\circ}$ C 10s, 72 $^{\circ}$ C 15s, 39 个循环, 72 $^{\circ}$ C 5min。将以上 PCR 扩增试剂加入 96 孔反应板中, 离心 3min, 3000r/min, 然后放入 Bio – Rad CFX – 384 荧光定量 PCR 仪反应。反应结束后, 应用 SDS 分析软件 (Applied Biosystems 公司) 进行分析, 详见表 1。

表 1 PCR 引物序列和目的条带长度

目的基因	引物序列 (5'→3')	条带长度 (bp)
IL – 2	上游引物 AGCGCACCCACTTCAAGCCC	20
	下游引物 TTCTGTGGCCTGCTTGGGCA	20
IL – 6	上游引物 TCGGAGGCTTAATTACACATGTTTC	24
	下游引物 CAAGTGCATCATCGTTGTTCATAC	24
IL – 10	上游引物 GGTTGCCAAGCCTTATCGGA	20
	下游引物 ACCTGCTCCACTGCCTTGCT	20
TNF – α	上游引物 GACCCTCACACTCAGATCATCTTCT	25
	下游引物 CCTCCACTTGGTGGTTTGCT	20
GAPDH	上游引物 GCATGGCCTTCGGTGTTTC	18
	下游引物 GATGTCATCATACTGGCAGGTTT	24

5. ELISA 技术: 取小鼠眼眶静脉血经离心 (2325r/s) 后取出血清, 置于 – 80 $^{\circ}$ C 低温冰箱保存送检, 采用双抗体夹心 ELISA 法检测各组血清 E_2 (上海生工生物有限公司) 水平。待测样品孔加入样本 40 μ l, 然后各加入抗 E 抗体 10 μ l、链霉亲和素 – HRP 50 μ l, 盖上封板膜, 轻轻震荡混匀, 37 $^{\circ}$ C 温育 60min; 每孔加满洗涤液洗涤重复 3 次; 每孔加入显色剂 100 μ l, 轻轻震荡混匀, 37 $^{\circ}$ C 避光显色 10min; 最后每孔加终止液 50 μ l 终止反应, 450nm 波长依序测量各孔的吸光度 (A 值) 绘制标准曲线, 分别计算各组标本 E_2 含量。

6. 统计学方法: 采用 SPSS 19.0 统计学软件统计分析, 所测数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 各组小鼠血清 E_2 值变化:3 组实验组血清 E_2 浓度分别为手术去卵巢组 $25.98 \pm 4.23 \text{ pmol/L}$, 药物去卵巢组 $34.77 \pm 5.38 \text{ pmol/L}$ 、自然绝经组 $28.77 \pm 4.98 \text{ pmol/L}$, 均明显低于对照组 $57.25 \pm 7.66 \text{ pmol/L}$, $P < 0.01$, 而 E_2 水平在 3 组实验组内比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2. 各组小鼠脾脏 IL-2、IL-6、IL-10 和 TNF- α mRNA 水平的变化:小鼠脾脏 IL-2、IL-6、IL-10

和 TNF- α 的表达水平见表 2。分析显示小鼠脾脏表达 IL-2 和 TNF- α 水平在自然绝经组升高, 与其他 3 组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.01$); IL-6 亦在自然绝经组升高, 与发情间期组、手术去卵巢组、药物去卵巢组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 而 3 组实验组 IL-10 水平略低于对照组, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。然而, 年轻组别中 (发情间期组、手术去卵巢组、药物去卵巢组) 未发现有 IL-2、IL-6、IL-10 和 TNF- α mRNA 表达的差异。

表 2 各组小鼠脾脏各细胞因子 mRNA 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

项目	自然绝经组	发情间期组	手术去卵巢组	药物去卵巢组
IL-2	9.37 ± 1.84	$3.54 \pm 0.46^{**}$	$3.61 \pm 0.51^{**}$	$3.23 \pm 0.68^{**}$
IL-6	6.18 ± 2.71	$2.73 \pm 0.29^{**}$	$4.15 \pm 1.68^*$	$3.64 \pm 1.32^{**}$
IL-10	3.03 ± 1.04	3.74 ± 1.06	2.47 ± 0.99	3.58 ± 1.08
TNF- α	6.75 ± 1.83	$1.56 \pm 0.61^{**}$	$2.61 \pm 0.68^{**}$	$1.95 \pm 0.95^{**}$

与自然绝经组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

讨 论

免疫老化是指免疫功能的失调和缺陷, 因此衰老的机体容易得感染性疾病, 慢性疾病, 自身免疫性疾病和恶性肿瘤。随着年龄的增长, 机体皮肤的脆性增加, 产生抗体减少, 固有免疫和非特异性免疫功能均下降。有证据表明, 除了年龄因素以外, 绝经期卵巢功能下降导致 E_2 缺乏可能与此变化有关, 而 E_2 治疗可以阻止或恢复部分免疫缺陷, 维持细胞因子和淋巴细胞的动态平衡^[8,9]。然而, E_2 缺乏和免疫老化的关系仍未明确, 有关绝经小鼠细胞因子模式的报道国内较少。故本研究通过检测和对比绝经期和模拟绝经的年轻手术去卵巢和药物去卵巢小鼠经 Con-A 刺激后脾脏 IL-2、IL-6、IL-10 和 TNF- α 水平, 探索 E_2 缺乏状态下年轻与老龄化小鼠之间是否存在此类细胞因子水平的差异, 以证实 E_2 水平是否影响此类细胞因子表达。

细胞因子是调控蛋白质, 由不同类型的细胞产生, 经自分泌, 内分泌和旁分泌形式参与对外界刺激的反应。绝经后 E_2 的骤然下降影响细胞因子的产生^[8]。IL-6 是主要由单核-吞噬细胞和 T 细胞分泌, 作用于 T、B 细胞, 促进其增殖分化。绝经期妇女体内 IL-6 水平升高与阿尔茨海默病、多发性骨髓瘤、淋巴细胞恶性增生等疾病有关^[10]。单核-吞噬细胞、T 细胞和 NK 细胞产生 TNF- α , TNF- α 在骨质形成和丢失平衡中起重要作用, 绝经期妇女 TNF- α 过度表达加速骨质疏松^[11]。IL-6 亦参与其

中^[10]。本实验显示小鼠脾脏表达 IL-6 和 TNF- α 水平在自然绝经组升高, 与其他 3 组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 然而年轻组别中 (发情间期组、手术去卵巢组、药物去卵巢组) 未发现有 IL-6 和 TNF- α mRNA 表达的差异。说明老化小鼠体内升高的 IL-6、TNF- α 并非单纯由 E_2 缺乏所致, 有报道绝经后 E_2 补充并未使 IL-6、TNF- α 水平下降^[12], 绝经后 E_2 补充阻止骨质丢失的机制是因为降低 sIL-6R 水平而不是 IL-6 水平^[13]。本研究中去卵巢组的 IL-6、TNF- α 检测结果与笔者以往的研究结果有所不同, 可能与不同的检测方法和使用不同的标本有关^[14]。

IL-2 是由 Th1 产生的 15kDa 小分子多肽类介质, 在 T 细胞、B 细胞及巨噬细胞上均有受体表达。IL-2 上调自身受体, 自分泌和旁分泌形式刺激其他细胞增殖, 扩大局部免疫反应。随着年龄的增长, 体内 IL-2 水平逐渐下降, 与老龄化相关的 T 细胞、NK 细胞的老化和功能下降可能与 IL-2 分泌不足和 IL-2 受体的表达下降有关, IL-2 在免疫老化中起着重要的作用^[15]。然而, 笔者的研究发现小鼠脾脏表达 IL-2 在自然绝经组最高, 与其他 3 组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。此结论的差异可能与笔者使用绝经时期不同年龄段的实验对象有关, 笔者使用的 C57BL/6N 小鼠正处于绝经的早期阶段。Yasui 等^[16]发现 IL-2 水平在围绝经期或绝经早期阶段妇女 (<5 年) 较绝经前期妇女升高, 然后在绝

经后期才开始降低(>5 年)。

IL-10 是 18kDa 多肽,来源于 Th2 细胞,通过抑制(IL-1、TNF- α)下调 T 细胞免疫,诱导 B 细胞产生大量 IgG、IgA、IgM。E₂ 对 IL-10 水平的影响虽然没有其他细胞因子显著,但 E₂ 通过刺激 IL-10 产生而提高免疫球蛋白量,促进机体呈现为 Th2 型细胞因子模式^[17]。本研究 3 组实验组(即手术去卵巢组、药物去卵巢组和自然绝经组)IL-10 水平略低于对照组,但差异无统计学意义($P>0.05$)。因此 E₂ 缺乏是否降低 IL-10 产生并导致机体呈现为 Th1 型细胞因子模式值得进一步探讨。

总之,笔者发现 Con-A 刺激后 E₂ 缺乏状态下年轻与老龄化 C57BL/6N 小鼠之间细胞因子模式是有所不同的,自然绝经组脾脏表达 IL-6、IL-2 和 TNF- α 较年轻非自然绝经组(手术去卵巢组和药物去卵巢组)高,说明 E₂ 对 IL-6、IL-2 和 TNF- α 作用有限,E₂ 是否通过影响其他细胞因子表达而参与免疫老化改变仍需进一步实验证实。

参考文献

- Liu L, Zhao Y, Xie K, *et al.* Estrogen inhibits LPS-induced IL-6 production in macrophages partially via the nongenomic pathway[J]. *Immunol Inves*, 2014, 43(7):693-704
- Sivro A, Lajoie J, Kimani J, *et al.* Age and menopause affect the expression of specific cytokines/chemokines in plasma and cervical lavage samples from female sex workers in Nairobi, Kenya[J]. *Immun Ageing*, 2013, 10(1):42
- Priyanka HP, Sharma U, Gopinath S, *et al.* Menstrual cycle and reproductive aging alters immune reactivity, NGF expression, antioxidant enzyme activities, and intracellular signaling pathways in the peripheral blood mononuclear cells of healthy women[J]. *Brain Behav Immun*, 2013, 32:131-143
- Curran EM, Berghaus LJ, Verneti NJ, *et al.* Natural killer cells express estrogen receptor- α and estrogen receptor- β and can respond to estrogen via a non-estrogen receptor- α -mediated pathway[J]. *Cell Immunol*, 2001, 214(1):12-20
- Zhao RQ, Zhou MH, Qu W, *et al.* Inhibitory effect of alarelin microspheres on experimental endometriosis in rats[J]. *Acta Pharmaceut*

- Sinic, 1999, 34(8):565-568
- Martins RR, Pereira NM, Silva TM. Liquid-base cytology: a new method for oestral cycle study in Wistar's rats[J]. *Acta Cir Bras*, 2005, 20(1):78-81
- Wang JM, Hou X, Adeosun S, *et al.* A dominant negative ER β splice variant determines the effectiveness of early or late estrogen therapy after ovariectomy in rats[J]. *PLoS One*, 2012, 7(3):e33493
- Gameiro CM, Rom? o F, Castelo-Branco C. Menopause and aging: changes in the immune system-a review[J]. *Maturitas*, 2010, 67(4):316-320
- Xia X, Zhang S, Yu Y, *et al.* Effects of estrogen replacement therapy on estrogen receptor expression and immunoregulatory cytokine secretion in surgically induced menopausal women[J]. *J Reprod Immunol*, 2009, 81(1):89-96
- Ersler WB, Keller ET. Age-associated increased interleukin-6 expression, late-life diseases, and frailty[J]. *Ann Rev Med*, 2000, 51:245-270
- Kotrych D, Dziedzicko V, Safranow K, *et al.* TNF- α and IL-10 gene polymorphisms in women with postmenopausal osteoporosis[J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2016, 199:92-95
- Abrahamsen B, Bonnevie-Nielsen V, Ebbesen EN, *et al.* Cytokines and bone loss in a 5-year longitudinal study-hormone replacement therapy suppresses serum soluble interleukin-6 receptor and increases interleukin-1-receptor antagonist: the danish osteoporosis prevention study[J]. *J Bone Miner Res*, 2000, 15(8):1545-1554
- Kamada M, Irahara M, Maegawa M, *et al.* Postmenopausal changes in serum cytokine levels and hormone replacement therapy[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2001, 184(3):309-314
- 邵明君,胡旻,何云芹,等.雌激素对去卵巢小鼠肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素 6 水平的影响[J]. *生殖医学杂志*, 2011, 20(5):410-412
- DelaRosa O, Pawelec G, Peralbo E, *et al.* Immunological biomarkers of ageing in man: changes in both innate and adaptive immunity are associated with health and longevity[J]. *Biogerontology*, 2006, 7(5-6):471-481
- Yasui T, Maegawa M, Tomita J, *et al.* Changes in serum cytokine concentrations during the menopausal transition[J]. *Maturitas*, 2007, 56(4):396-403
- Zhang J, Lapato A, Bodhankar S, *et al.* Treatment with IL-10 producing B cells in combination with E₂ ameliorates EAE severity and decreases CNS inflammation in B cell-deficient mice[J]. *Metab Brain Dis*, 2015, 30(5):1117-1127

(收稿日期:2017-01-15)

(修回日期:2017-02-27)

(上接第 33 页)

- 李凡,徐志凯.医学微生物学[M].8 版.北京:人民卫生出版社, 2013:132
- Mckenna P, Hoffmann C, Minkah N, *et al.* The macaque gut microbiome in health, lentiviral infection, and chronic enterocolitis[J]. *PLoS Pathogens*, 2008, 4(2):e20
- Spor A, Koren O, Ley R. Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2011, 9(4):279
- Wu GD, Bushmanc FD, Lewis JD. Diet, the human gut microbiota, and IBD. [J]. *Anaerobe*, 2013, 24(12):117-120

- Kang DW, Jin GP, Ilhan ZE, *et al.* Reduced incidence of Prevotella and other fermenters in intestinal microflora of autistic children[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7):e68322
- Gungor B, Adiguzel E, Gursel I, *et al.* Intestinal Microbiota in Patients with Spinal Cord Injury[J]. *PLoS One*, 2016, 11(1):e0145878
- Patrone V, Vajana E, Minuti A, *et al.* Postoperative changes in fecal bacterial communities and fermentation products in obese patients undergoing bilio-intestinal bypass[J]. *Front Microbiol*, 2016, 7:200

(收稿日期:2017-05-03)
(修回日期:2017-05-17)