

杨文强,黄伟,马威,等. *Mfge8* 基因敲除纯合子小鼠的定向繁殖和鉴定及其与自身免疫疾病相关性分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(5): 69–75.

Yang WQ, HUANG W, Ma W, et al. Breeding and identification of *Mfge8* knockout homozygous mice and their association with autoimmune diseases [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(5): 69–75.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.05.011

Mfge8 基因敲除纯合子小鼠的定向繁殖和鉴定及其与自身免疫疾病相关性分析

杨文强,黄伟,马威,崔天益*

(武汉市第一医院中心实验室,武汉 430022)

【摘要】目的 繁殖和鉴定 *Mfge8* 基因敲除 C57BL/6 小鼠,获取纯合子 (*Mfge8*^{-/-}) 小鼠,并比较 *Mfge8*^{-/-} 小鼠血清学及组织学改变。方法 对幼鼠剪尾抽提基因组 DNA,用 PCR 法和琼脂糖凝胶电泳法鉴定幼鼠基因型;利用 TUNEL 法分别检测 12 周龄野生型 (WT) 和 *Mfge8*^{-/-} 小鼠肺组织中凋亡细胞;并且利用免疫荧光法分别检测 36 周龄 WT 和 *Mfge8*^{-/-} 小鼠血清中 ANA 和 AECA 含量。结果 构建的基因敲除小鼠已成功繁育保种,并得到纯合基因缺失型小鼠。同时,12 周龄 *Mfge8*^{-/-} 小鼠肺组织中凋亡细胞数量明显多于 WT 小鼠;36 周龄 *Mfge8*^{-/-} 小鼠血清中 ANA 抗体及 AECA 抗体阳性,而 WT 小鼠血清中呈现阴性。结论 C57BL/6 背景小鼠敲除 *Mfge8* 基因后,更易发生自身免疫疾病。

【关键词】 *Mfge8*;纯合子;凋亡细胞;ANA;自身免疫疾病;小鼠

【中图分类号】 R-33 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-7856(2019) 05-0069-07

Breeding and identification of *Mfge8* knockout homozygous mice and their association with autoimmune diseases

YANG Wenqiang, HUANG Wei, MA Wei, CUI Tianpen*

(Central Laboratory, Wuhan No. 1 Hospital, Wuhan 430022, China)

【Abstract】 **Objective** To breed and identify *Mfge8* gene knock-out (*Mfge8*^{-/-}) C57BL/6 mice, and to examine serological and histological changes in these animals. **Methods** Genomic DNA was obtained from the tail of young mice and the genotype was determined by PCR and agarose gel electrophoresis. TUNEL assay was used to detect apoptotic cells in the lung tissues of 12-week-old wild type (WT) and *Mfge8*^{-/-} mice. Levels of anti-nuclear antibodies (ANA) and anti-endothelial cell antibodies (AECA) in the serum of 36-week-old WT and *Mfge8*^{-/-} mice were determined by immunofluorescence. **Results** Knockout mice have been successfully generated and maintained that are homozygous for *Mfge8* gene deletion (*Mfge8*^{-/-}). The number of apoptotic cells in the lung tissues of 12-week-old *Mfge8*^{-/-} mice was higher than in WT mice. In addition, the serum of 36-weeks-old *Mfge8*^{-/-} mice, but not WT mice, was positive for ANA and AECA. **Conclusions** *Mfge8* knockout mice with the C57BL/6 genetic background demonstrate a greater susceptibility to autoimmune disease.

【Keywords】 *Mfge8*; homozygous; apoptotic cell; ANA; autoimmune disease; mouse

[基金项目] 国家自然科学基金(81770038);武汉市卫计委 2017 临床医学科研重点项目(WX17A01);武汉市卫计委 2017 临床医学科研项目(WX17Z01)。

[作者简介] 杨文强(1990—),男,执业兽医师,研究方向:实验动物疾病模型。E-mail: 460576034@qq.com

[通信作者] 崔天益(1967—),男,教授,研究方向:细胞凋亡与自身免疫病。E-mail: tianpencui@126.com

乳脂球表皮生长因子 8 (milk fat globule EGF factor VIII, MFG-E8) 是一种乳汁脂肪小球表面的亲脂性糖蛋白,最初在小鼠乳腺上皮细胞被发现^[1],生理情况下在其他细胞也有表达,如角质形成细胞、脾细胞、单核细胞、腹腔巨噬细胞、树突状细胞、神经胶质细胞和抗原提呈细胞^[2]等,未成熟的树突状细胞和未分化的巨噬细胞表达较多的 MFG-E8,主要以外泌体的方式分泌,随着细胞成熟,MFG-E8 的表达降低。MFG-E8 主要在吞噬细胞与凋亡细胞之间起桥连作用,增强了凋亡细胞的吞噬清除^[3],维持机体的内环境稳态。Uchiyama 等^[4]的研究证实 MFG-E8 可加速糖尿病伤口愈合,促进血管生成,凋亡细胞附近 M2 吞噬细胞的浸润,进而抑制伤口处炎症细胞因子;在结肠炎动物模型中,接受了重组人 MFG-E8 治疗的小鼠中性粒细胞和凋亡细胞浸润明显减少,细胞因子和趋化因子的表达也显著降低^[5];MFG-E8 通过控制间充质干细胞中 VEGF 和 ET-1 的表达,增强巨噬细胞向 M2 型极化,加速血管生成,从而促进黑色素瘤的生成^[6]。MFG-E8 可能作为一种新型生物标志物来治疗人类类风湿性关节炎(RA),因为 Albus 等人^[7]发现 *Mfge8* 基因敲除小鼠关节中中性粒细胞数量增加,并伴随有破骨细胞的活化和成骨细胞的破坏,导致系统性骨质流失;MFG-E8 的缺失也会导致小鼠的脾肿大,形成无数的生发中心,由于在生发中心中清除凋亡 B 细胞的能力下降,导致肾小球肾炎自身抗体的产生,进一步发展为自身免疫病^[8];在系统性红斑狼疮(SLE)动物模型中,MFG-E8 可以下调中性粒细胞表面 CXCR2 的表达,同时使得凋亡的中性粒细胞被吞噬,降低 SLE 小鼠体内早期炎症反应^[9]。本课题组自主构建以 C57BL/6 小鼠为背景的 *Mfge8* 基因敲除小鼠并稳定繁殖鉴定,得到的纯合子小鼠旨在自身免疫性疾病中作进一步研究。

1 材料和方法

1.1 实验动物

Mfge8 基因敲除杂合子小鼠在南京模式动物研究院构建[SCXK(苏)2015-0001],背景鼠为 C57BL/6 小鼠,其中雄性 11 只,雌性 21 只,体重 16~20 g,8 周龄。稳定繁殖后在武汉市第一医院 SPF 级动物实验室[SYXK(鄂)2014-0030]内扩群使用,取纯合子和野生型小鼠各 20 只,雌雄各半,其中 12 周龄纯合子和野生型各 8 只,体重 20~24 g,36 周龄

纯合子和野生型各 12 只,体重 24~28 g。本研究经由武汉市第一医院实验动物福利伦理委员会批准(批准号:2017010),严格按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 主要试剂与仪器

Simgen 动物组织 DNA 试剂盒、蛋白酶 K(杭州新景生物试剂开发有限公司),2× Quick Taq® HS DyeMix(上海东洋纺生物科技有限公司),6× Loading buffer、DNA Marker(北京索莱宝科技有限公司),琼脂糖(美国 Bio-West 公司),GoldView 核酸染料(上海赛百盛基因技术有限公司),罗氏 TUNEL 检测试剂盒(上海罗氏诊断产品有限公司),抗核抗体 IgG 检测试剂盒、抗内皮细胞抗体 IgG 检测试剂盒(欧蒙杭州医学实验诊断有限公司)。卧式灭菌器 YX-600 W(上海三申器械有限公司),恒温混匀仪、低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司),PCR 仪(西安天隆科技有限公司),电泳仪(北京市六一仪器厂),化学发光成像仪(美国 Bio-Rad 公司),荧光显微镜 BX51(日本 Olympus 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 小鼠的饲养与繁殖

按照 SPF 级动物饲养标准进行饲养,屏障环境内温度控制在 20~22℃,湿度 40%~70%,12 h/12 h 昼夜交替,小鼠饲喂已辐照消毒的繁殖饲料(北京华阜康公司)和去离子水,实行自由采食和饮水,小鼠垫料和笼盒均经过高温高压灭菌处理,每周更换笼盒垫料两次。因引进小鼠有限,繁殖初期按 1 只雄鼠与 1 只雌鼠进行合笼,小鼠性成熟期为 8 周左右,母鼠妊娠期 21 d 左右,子代小鼠 10 d 左右剪尾鉴定和剪脚趾编号,仔鼠 21 d 断乳分笼,繁殖出 F2 代子鼠以后挑选合适基因型按 1 只雄鼠与 2 只雌鼠进行合笼,逐渐扩大繁殖。

1.3.2 小鼠的基因型鉴定

由于所构建的小鼠均为杂合子 *Mfge8* 基因敲除小鼠,繁殖后代可能出现野生型(*Mfge8*^{+/+})、杂合子(*Mfge8*^{+/-})和纯合子(*Mfge8*^{-/-})3 种表型,故需对子代进行基因型鉴定。

(1)抽提鼠尾基因组 DNA:剪取小鼠尾尖 0.5~1.0 cm,放入 1.5 mL EP 管中,参照 Simgen 动物组织 DNA 试剂盒说明书抽提 DNA,TE 溶解后测 OD 值,于 4℃ 保存。

(2)PCR 扩增反应及琼脂糖凝胶电泳进行基因型鉴定:①引物设计:针对 *Mfge8* 基因敲除小鼠的基

因型设计引物:上游引物:P1 5'-GTGGGCAAGTCATCTGAGTAC-3',下游引物:P2 5'-GAGCGATCCATCTCAAAACCAA-3',用于检测 *Mfge8* 基因敲除小鼠中包含 LoxP 插入位点的等位基因片段(扩增大小 620 bp)。针对野生型小鼠设计引物:上游引物:P3 5'-TTGCCAACAGGCTTGATGGATAT-3',下游引物:P4 5'-GACAGTACGGAACAGCGAAGGTA-3',用于检测野生型小鼠的 *Mfge8* 等位基因的片段(扩增大小 453 bp)引物由上海生工生物工程股份有限公司合成,为干粉状。②PCR 扩增:10 μ L 反应体系:用微量移液枪依次加入 DNA 模板 1 μ L、PCR Master Mix 5 μ L、上游引物 1 μ L、下游引物 1 μ L 和 ddH₂O 2 μ L,充分混匀后将 PCR 管置于 PCR 反应仪上进行扩增,扩增条件:预变性 94℃、3 min;变性 94℃、30 s,退火 56℃、40 s,延伸 68℃、40 s,循环 35 次;末次循环后延伸 68℃、10 min。4℃ 保存。③琼脂糖凝胶电泳:样品孔分别取 PCR 扩增产物 7 μ L 与 6 $\times$ Loading buffer 1 μ L 混匀,对照孔加 Marker 5 μ L 作对照,在以 GoldView 为分子量标记物的 1.5% 琼脂糖凝胶中以 120 V 由负极向正极电泳 30 min 后,于凝胶成像中观察拍照。

1.3.3 利用 TUNEL 法检测小鼠肺组织中凋亡细胞

取 12 周龄 *Mfge8*^{-/-} 和野生型小鼠左肺组织,放置于 4% 多聚甲醛溶液中固定,石蜡包埋切片,肺组织经过脱蜡和抗原修复后,用罗氏 TUNEL 试剂盒显色,在荧光显微镜下观察拍照。

1.3.4 小鼠血清中抗核抗体(ANA)检测

抗核抗体是一组具有多种细胞核成分的自身抗体,由于自身免疫疾病谱型范围广和自身抗体呈多样性,ANA 虽不能作为自身免疫疾病的诊断性指标,但对自身免疫病有一定的初筛作用^[10]。本研究将 36 周龄的 *Mfge8*^{-/-} 和野生型小鼠血清按 1:10 稀释后分别与猴肝组织作为基质的生物薄片温浴,洗涤后再与异硫氰酸荧光素标记的羊抗小鼠 IgG 温浴,再洗涤后在荧光显微镜下观察结果。

1.3.5 小鼠血清中抗内皮细胞抗体(AECA)检测

抗内皮细胞抗体最初在系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎等自身免疫疾病患者血清中获得,其出现在多种自身免疫性疾病中,尤其是与血管炎相关的疾病,在系统性红斑狼疮的血管炎中表现尤为突出^[11]。本研究将 36 周龄的 *Mfge8*^{-/-} 和野生型小鼠血清按 1:10 稀释后分别与人脐静脉内皮细胞(HUVEC)作为基质的生物薄片温浴,洗涤后再与异硫氰酸荧光素标记的羊抗小鼠 IgG 温浴,再洗涤后在荧光显微镜下观察结果。

1.4 统计学方法

数据采用 SPSS 17.0 进行统计分析,数据以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠繁殖情况

初次生产的母鼠会出现食仔现象,每胎平均产仔 4~13 只,如图 1 所示,成活率大于 90%。



图 1 子代 1 日龄仔鼠

Figure 1 One-day-old progeny mice

2.2 小鼠基因型鉴定结果

利用 PCR 扩增小鼠基因组 DNA 中因敲除而插入的 loxp 位点基因及 *Mfge8* 基因片段,并利用琼脂糖凝胶电泳检测扩增片段的长度,用以鉴定子代小鼠的基因型。结果如图 2 所示,扩增片段 1、2、5、6、9、10、12、13、14 号为杂合子(*Mfge8*^{+/-}); 3 号为野生型(*Mfge8*^{+/+}); 4、7、8、11 号为纯合子(*Mfge8*^{-/-})。

2.3 肺组织中凋亡细胞检测结果

利用 TUNEL 法检测 12 周龄 WT 和 *Mfge8*^{-/-} 小鼠肺组织中凋亡细胞含量。在放大 100 倍视野下的观察结果,凋亡细胞被染绿色颗粒的数量 *Mfge8*^{-/-} 小鼠明显比 WT 小鼠要多,因此 12 周龄 *Mfge8*^{-/-} 小鼠肺组织中凋亡细胞数量明显多于 WT 小鼠,如图 3 所示。

2.4 小鼠血清中 ANA 检测结果

36 周龄 WT 和 *Mfge8*^{-/-} 小鼠血清中 IgG 型抗核抗体(ANA)以猴肝 Hep-2 细胞为基质利用间接免疫荧光法在 100 倍和 400 倍视野下观察结果,*Mfge8*^{-/-} 小鼠在 100 倍和 400 倍两个视野下细胞核被标记的荧光强度明显高于 WT 小鼠,因此 36 周龄 *Mfge8*^{-/-} 小鼠血清中 ANA 抗体呈现阳性,而 WT 小鼠血清中 ANA 抗体呈现阴性,如图 4 所示。

2.5 小鼠血清中 AECA 检测结果

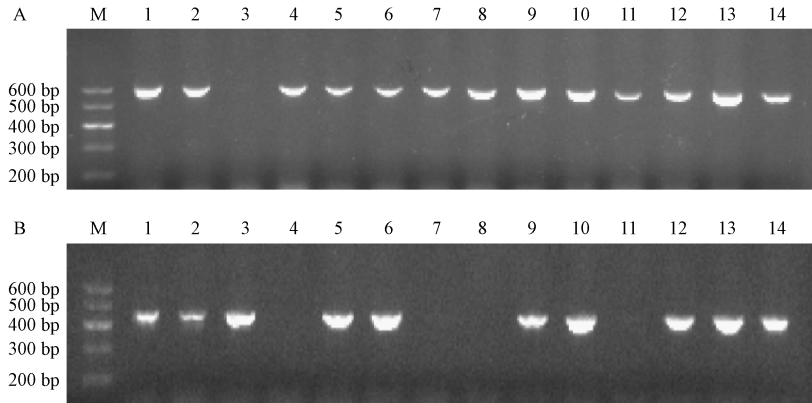
36 周龄 WT 和 *Mfge8*^{-/-} 小鼠血清中 IgG 型抗内皮细胞抗体(AECA)以人脐静脉内皮细胞(HUVEC)为基质利用间接免疫荧光法在 400 倍视

野下观察结果,*Mfge8*^{-/-} 小鼠内皮细胞外周被标记的荧光强度明显高于 WT 小鼠,因此 36 周龄 *Mfge8*^{-/-} 小鼠血清中 AECA 抗体呈现阳性,而 WT 小鼠血清中 AECA 抗体呈现阴性,如图 5 所示。

3 讨论

由于构建的 *Mfge8* 基因敲除小鼠均为杂合子,所以其子代可能出现 *Mfge8*^{+/+}、*Mfge8*^{+/-} 和 *Mfge8*^{-/-} 三种表型,我们采用 PCR 用两组引物扩增小鼠 DNA,然后进行琼脂糖凝胶电泳,*Mfge8*^{-/-} 表型的小鼠扩增产物只有一条带,即 620 bp,*Mfge8*^{+/+} 表型的小鼠也只有一条带,即 453 bp,而 *Mfge8*^{+/-} 表型的小鼠同时会出现 620 bp 和 453 bp 两条带。

Hanayama 等^[3]研究表明,与野生型动物相比,不能分泌 MFG-E8 的动物巨噬细胞对凋亡细胞的吞噬能力减弱,由于缺乏足够的清除凋亡细胞的能力,不分泌 MFG-E8 的成年动物更易引发自身免疫性疾病。抗核抗体(ANA)的产生细胞凋亡有两种不同的理论,一种理论认为由细胞凋亡抑制引起;另一种理论认为与细胞过度凋亡有关,在凋亡过程中产生的凋亡小体是一种重要的自身抗体来源,推测细胞凋亡增加时,吞噬细胞不能完全清除凋亡小体,未被吞噬的凋亡小体膜破裂,细胞核物质增多^[12],MFG-E8 在吞噬细胞与凋亡细胞中的桥梁作用,可能会推动这种进程,进而诱导 *Mfge8*^{-/-} 小鼠机体产生 ANA;正常细胞膜上的磷脂呈不对称分布,中性磷脂分布在细胞膜的外层,磷脂酰丝氨酸(PS)分布在细胞膜的内层,当细胞凋亡时,磷脂的不对

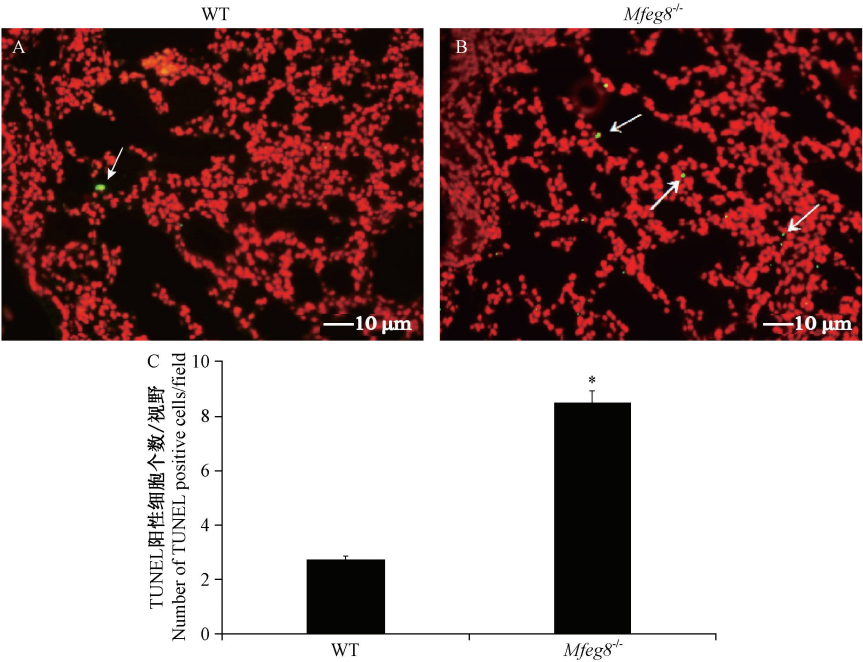


注:A:引物 P1 和 P2 扩增 620 bp 片段;B:引物 P3 和 P4 扩增 453 bp 片段。M 为 DNA Marker,1~14 代表小鼠编号。

图 2 PCR 及琼脂糖凝胶电泳鉴定子代小鼠基因型

Note. A, Amplification of 620 bp fragment with primers P1 and P2. B, Amplification of 453 bp fragment with primers P3 and P4. M, DNA marker; 1-14, the mice number.

Figure 2 Identification of progeny genotype by PCR and agarose gel electrophoresis



注:A:WT 小鼠肺组织中凋亡细胞(×100);B:*Mfge8*^{-/-} 小鼠肺组织中凋亡细胞(×100)。箭头所指为凋亡细胞。C:随机视野下 TUNEL 阳性细胞个数统计(×100),与 WT 小鼠相比,**P*<0.05。

图3 TUNEL 染色检测肺组织中凋亡细胞

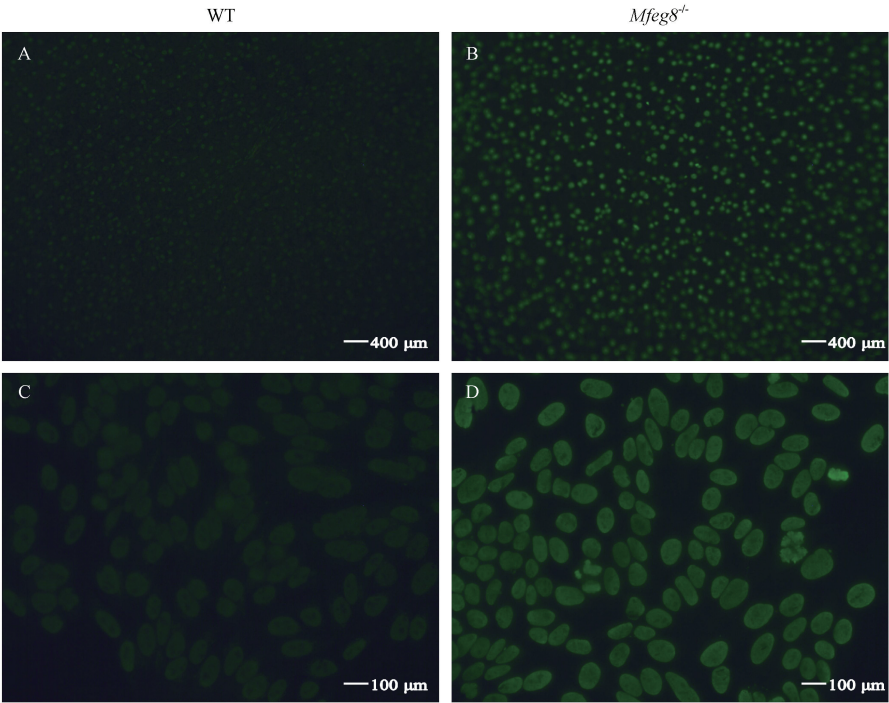
Note. A, Apoptotic cells in the lung tissue of a WT mouse (×100). B, Apoptotic cells in the lung tissue of a *Mfge8*^{-/-} mouse (×100). Arrows indicate apoptotic cells. C, Average number of TUNEL positive cells in random view fields (×100). Compared with the WT mice, **P*<0.05.

Figure 3 Detection of apoptotic cells in lung tissues by TUNEL staining

称分布被破坏,PS 从细胞膜内侧向外侧转移,PS 的暴露是内皮细胞凋亡的最早期特征^[13],MFG-E8 包含两个不同的功能结构域,一个是有两个表皮生长因子样结构域的氨基端(N 端),另一个是羧基端(C 端)的两个与凝血因子 V 和Ⅷ结构域同源的 C 样结构域,能结合细胞膜的阴离子磷脂双层,其中第二个 C 样结构域含有一个氨基的置换,可以使 MFG-E8 与 PS 膜有更强的亲和力^[14],暴露 PS 的凋亡内皮细胞在 MFG-E8 的作用下更易被吞噬细胞识别并吞噬,反之,MFG-E8 的缺乏不能及时清除凋亡的内皮细胞,AECA 也会随即升高。血清中抗核抗体和抗内皮细胞抗体均显著增加(图 4 和图 5),抗核抗体(ANA)对自身免疫性疾病有重要诊断价值^[15],其中 ANA 的靶抗原为细胞死亡后释放的细胞核内不同生化成分,包括核酸、细胞核蛋白和核糖体蛋白,此外,抗内皮细胞抗体(AECA)在临床上主要用炎症疾病的判断标准,最主要的就是各种血管炎^[16],在系统性红斑狼疮的活动期患者的血清中也发现高滴度的 AECA,但是是否作为自身抗体还有

待进一步研究,MFG-E8 的缺失促进了炎症的发展,进而产生了大量的 AECA。

MFG-E8 是一种多结构域蛋白,能介导不同类型的细胞间相互作用,其中在介导精卵结合、附睾上皮细胞的维持^[17]、肠上皮细胞的维持与修复^[18]、促进乳腺分支形态发生^[19]、促进血管形成^[20]、促进树突状细胞外泌体功能和增强吞噬清除凋亡细胞等功能显著。系统性红斑狼疮患者体内,低水平的 MFG-E8 能增强吞噬作用,高水平的 MFG-E8 减弱吞噬作用并呈剂量依赖性,其原因可能是过量的 MFG-E8 分别与吞噬细胞和凋亡细胞结合,打破了两种细胞间 MFG-E8 的桥梁关系,从而引起吞噬障碍,引发慢性自身免疫疾病^[21];文献报道女性 SLE 患者的内含子 6 发生一个少见突变,导致内含子 6 中的一个隐匿外显子拼接成截断的 MFG-E8,其异常糖基化和唾液酸化产生 C 端截短的 MFG-E8,导致 SLE 发生^[22]。*Mfge8* 基因敲除小鼠由于其生发中心内 TBM_s 及 FDC_s 吞噬凋亡细胞能力障碍,凋亡细胞过量积累,T 细胞及 B 细胞过度活化,解剖

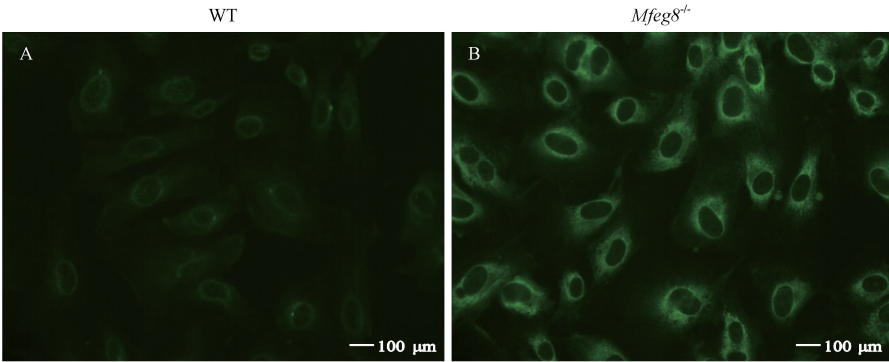


注:A:WT 小鼠血清中 ANA($\times 100$);B:*Mfge8*^{-/-}小鼠血清中 ANA($\times 100$);C:WT 小鼠血清中 ANA($\times 400$);D:*Mfge8*^{-/-}小鼠血清中 ANA($\times 400$)。

图 4 血清中 ANA 检测结果

Note. A, ANA in the serum of WT mice($\times 100$). B, ANA in the serum of *Mfge8*^{-/-} mice($\times 100$). C, ANA in the serum of WT mice($\times 400$). D, ANA in the serum of *Mfge8*^{-/-} mice($\times 400$).

Figure 4 Analysis of ANA serum levels



注:A:WT 小鼠血清中 AECA($\times 400$);B:*Mfge8*^{-/-}小鼠血清中 AECA($\times 400$)。

图 5 血清中 AECA 检测结果

Note. A, AECA in the serum of WT mice. B, AECA in the serum of *Mfge8*^{-/-} mice.

Figure 5 Analysis of AECA serum levels

Mfge8 基因敲除老年小鼠呈现脾肿大;病理学检测发现脾生发中心及 T 淋巴细胞区域增大,且 TBM_s 增大伴有大量凋亡细胞在胞内未被降解,因此,*Mfge8* 基因敲除脾生发中心内 TBM_s 不能有效清除凋亡 B 细胞;血清学检测老年 *Mfge8* 基因敲除小鼠体内自身抗体明显升高,表现为 SLE 样自身免疫性疾病^[8,23]。

本文通过构建 *Mfge8* 基因敲除小鼠,检测分析自发诱导自身免疫性疾病相关重要指标,为模拟人 SLE 等其它自身免疫疾病的发生发展提供一个有效的动物模型,同时为进一步研究 MFG-E8 在自身免疫疾病中的发病机制提供了可靠的工具基础。

参考文献:

- [1] Stubbs JD, Lekutis C, Singer KL, et al. cDNA cloning of a mouse mammary epithelial cell surface protein reveals the existence of epidermal growth factor-like domains linked to factor VIII-like sequences [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990, 87 (21): 8417-8421.
- [2] Peng Y, Elkon KB. Autoimmunity in MFG-E8-deficient mice is associated with altered trafficking and enhanced cross-presentation of apoptotic cell antigens [J]. J Clin Invest, 2011, 121(6): 2221-2241.
- [3] Hanayama R, Tanka M, Miwa K, et al. Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes [J]. Nature, 2002, 417 (6885): 182-187.
- [4] Uchiyama A, Motegi SI, Sekiguchi A, et al. Mesenchymal stem cells-derived MFG-E8 accelerates diabetic cutaneous wound healing [J]. J Dermatol Sci, 2017, 86(3): 187-197.
- [5] Zhang Y, Brenner M, Yang WL, et al. Recombinant human MFG-E8 ameliorates colon damage in DSS-and TNBS-induced colitis in mice [J]. Lab Invest, 2015, 95(5): 480-490.
- [6] Yamada K, Uchiyama A, Uehara A, et al. MFG-E8 drives melanoma growth by stimulating mesenchymal stromal cell-induced angiogenesis and M2 polarization of tumor-associated macrophages [J]. Cancer Res, 2016, 76(14): 4283-4292.
- [7] Albus E, Sinnigen K, Winzer M, et al. Milk fat globule-epidermal growth factor 8 (mfg-e8) is a novel anti-inflammatory factor in rheumatoid arthritis in mice and humans [J]. J Bone Mineral Research, 2016, 31(3):596-605.
- [8] Hanayama R, Tanaka M, Miyasaka K, et al. Autoimmune disease and impaired uptake of apoptotic cells in MFG-E8 deficient mice [J]. Science, 2004, 304(5674): 1147-1150.
- [9] Huang W, Wu J, Yang H, et al. Milk fat globule-EGF factor 8 suppresses the aberrant immune response of systemic lupus erythematosus-derived neutrophils and associated tissue damage [J]. Cell Death Differ, 2017, 24(2): 263-275.
- [10] 陈曼丹,陈林兴.抗核抗体谱在自身免疫性疾病的检测及应用 [J].实用医技杂志,2005, 12(3):302-304.
- [11] 高颖,赵雪,李峰,等.抗内皮细胞抗体与自身免疫病 [J]. 国际检验医学杂志,2008,29(5):450-451.
- [12] 邢艳,唐中,袁国华.抗核抗体的研究进展 [J].国际内科学杂志,2006,33(5):36-39.
- [13] 郑文洁.抗内皮细胞抗体介导的内皮细胞损伤机制及其靶抗原研究 [D].中国协和医科大学,2004.
- [14] 李金丽,崔天盆.MFG-E8 的生物学功能及应用 [J].医学分子生物学杂志, 2010,7(5):467-470.
- [15] Grygiel-Górniak B, Rogacka N, Rogacki M, et al. Antinuclear antibodies in autoimmune and allergic diseases [J]. Reumatologia,2017,55(6):298-304.
- [16] Papa N D, Conforti G, Gambini D, et al. Characterization of the endothelial surface proteins recognized by anti-endothelial antibodies in primary and secondary autoimmune vasculitis [J]. Clinical Immunology & Immunopathology, 1994, 70(3):0-216.
- [17] Raymond A, Ensslin MA, Shur BD. SED1/MFG-E8: a bi-motif protein that orchestrates diverse cellular interactions [J]. J Cell Biochem, 2009, 106(6): 957-966.
- [18] Wang X, Bu HF, Liu SX, et al. Molecular mechanisms underlying the regulation of the MFG-E8 gene promoter activity in physiological and inflammatory conditions [J]. J Cell Biochem, 2015, 116(9): 1867-1879.
- [19] Ensslin MA, Shur BD. The EGF repeat and discoidin domain protein, SED1/MFG-E8, is required for mammary gland branching morphogenesis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(8): 2715-2720.
- [20] Uchiyama A, Yamada K, Ogino S, et al. MFG-E8 regulates angiogenesis in cutaneous wound healing [J]. Am J Pathol, 2014, 184(7): 1981-1990.
- [21] Kruse K, Janko C, Urbonaviciute V, et al. Inefficient clearance of dying cells in patients with SLE: anti-dsDNA autoantibodies, MFG-E8, HMGB-1 and other players [J]. Apoptosis, 2010, 15 (9):1098-1113.
- [22] Yamaguchi H, Fujimoto T, Nakamura S, et al. Aberrant splicing of the milk fat globule-EGF factor 8 (MFG-E8) gene in human systemic lupus erythematosus [J]. Eur J Immunol, 2010, 40 (6):1778-1785.
- [23] Kranich J, Krautler NJ, Heinen E, et al. Follicular dendritic cells control engulfment of apoptotic bodies by secreting Mfge8 [J]. J Exp Med, 2008, 205(6):1293-1302.

[收稿日期]2018-09-26