

管博文,卢延华,苏路路,等.老年和青年 C57BL/6J 小鼠外周血及免疫细胞分型测定分析[J].中国比较医学杂志,2019,29(7):24-28.

Guan BW, Lu YH, Su LL, et al. Difference in changes of peripheral blood and immune cell phenotypes between aged and young C57BL/6J mice [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(7): 24-28.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2019.07.004

老年和青年 C57BL/6J 小鼠外周血及免疫细胞分型测定分析

管博文¹, 卢延华¹, 苏路路¹, 王玉全¹, 李德冠^{2*}, 孟爱民^{1*}

(1.中国医学科学院医学实验动物研究所,北京协和医学院比较医学中心,国家卫生健康委员会人类疾病比较医学重点实验室,北京市人类重大疾病实验动物模型工程技术研究中心,北京 100021; 2.中国医学科学院/北京协和医学院放射医学研究所,天津市放射医学与分子核医学重点实验室,天津 300192)

【摘要】 目的 比较观察老年 C57BL/6J 小鼠与年轻 C57BL/6J 小鼠外周血及免疫系统相关指标的差异。方法 19月龄和2月龄的 C57BL/6J 小鼠分别取材检测外周血细胞计数、免疫脏器指数和外周血免疫细胞分型。结果 与年轻小鼠比较,老年小鼠外周血中红细胞和血小板计数升高,中性粒细胞比例升高,淋巴细胞比例下降($P < 0.001$),CD4⁺细胞比例明显降低($P < 0.001$),胸腺指数明显降低($P < 0.001$)。结论 老年小鼠血细胞发生分化偏移,辅助性 T 细胞数量下降,与年轻小鼠有明显差异,与造血免疫老龄化改变类似。本研究为免疫衰老相关问题研究提供基础数据。

【关键词】 C57BL/6J 小鼠;外周血细胞计数;免疫脏器系数;外周血免疫分型

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 07-0024-05

Difference in changes of peripheral blood and immune cell phenotypes between aged and young C57BL/6J mice

GUAN Bowen¹, LU Yanhua¹, SU Lulu¹, WANG Yuquan¹, LI Deguan^{2*}, MENG Aimin^{1*}

(1. Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences; Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College; NHC Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine; Beijing Engineering Research Center for Laboratory Animal Models of Human Critical Diseases, Beijing 100021, China.

2. Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College; Tianjin Key Laboratory of Radiation Medicine and Molecular Nuclear Medicine, Tianjin 300192)

【Abstract】 Objective To investigate the changes of peripheral blood and immune cell phenotypes between aged and young C57BL/6J mice. **Methods** Peripheral blood cell count, immune organ coefficient and peripheral blood immune cell phenotype in aged C57BL/6J mice (19 months) and 2-month-old C57BL/6J mice used as control adult mice were analyzed. **Results** Compared with young mice, the aged mice had an increased peripheral blood platelet count, increased

【基金项目】 中国医学科学院医学与健康科技创新工程经费资助(2017-I2M-3-015);国家重点研发计划(2017YFA0105204);国家自然科学基金(81573094)。

【作者简介】 管博文(1992—),男,技师,研究方向:比较医学。E-mail: 872724882@qq.com

【通信作者】 孟爱民(1963—),女,研究员,博士生导师,研究方向:比较医学。E-mail: ai_min_meng@126.com

李德冠(1982—),男,副研究员,研究方向:放射生物学、实验动物学。E-mail: ldguan@163.com * 共同通信作者

proportion of neutrophils, and a decreased proportion of lymphocytes ($P < 0.001$). The thymus coefficient was significantly reduced ($P < 0.001$). The percentage of CD4⁺ cells in the peripheral blood immune cell typing was obviously reduced ($P < 0.001$). **Conclusions** The blood cells in aged mice are differentially skewed, and helper T-cell numbers declined. The changes are similar to those in the aging human. This study provides basic data for research on immuno-senescence.

【Keywords】 C57BL/6J mouse; peripheral blood cell count; immune organ coefficient; peripheral blood immune typing

据联合国经济和社会事务部人口司调查统计,随着医疗水平的提高,预计 2050 年全球总人口达到 98 亿,其中老龄人口约占 31 亿。中国人口老龄化进程与全球人口老龄化趋势一致,老龄化已经成为社会发展中不可忽视的影响因素。1969 年,病理学家 Wolford 在文章中提出免疫衰老,免疫系统参与正常脊柱动物的老化,并调节老化过程^[1-3]。因此免疫衰老是机体衰老的重要组成部分,免疫系统的衰老会导致老年个体更易感染、罹患肿瘤以及对疫苗的应答下降^[4]。本文就从免疫器官和外周血免疫分型等方面比较老年小鼠与年轻小鼠存在的差异,旨在为免疫衰老相关研究提供基础数据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

老年小鼠:8 只 19 月龄的 SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠,体重 28~38 g,购于北京华阜康生物科技股份有限公司[SCXK(京)2014-0004],年轻小鼠:8 只 8 周龄的 SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠,体重 19~22 g,购于北京华阜康生物科技股份有限公司[SCXK(京)2014-0004]。老年与年轻小鼠均饲养于中国医学科学院医学实验动物研究所动物房屏障环境[SYXK(京)2015-0035],温度为 20℃~26℃,相对湿度为 40%~70%,压差大于 10 Pa,照明强度为 15~20 lx,每 12 h 昼夜交替一次。本实验经过中国医学科学院医学实验动物研究所 IACUC 的批准,批准号为 MAM17002。并根据 3R 原则对实验动物的使用和饲养给予人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

荧光标记抗体 NK1.1-FITC 购于 Biolegend; CD11b-APC 购于 Invitrogen; B220-percp、F4/80-PE、CD4-PE-cy7、CD8a-APC-cy7 等购于 BD 公司; EDTA-K3 购于 Sigma 公司; 红细胞裂解液购于 Invitrogen 公司。外周血计数及分类由全自动血液分析仪 PentraDX120(ABX)分析; 血细胞免疫分型应用 BD 流式分析仪(BD FACSAria II cell sorter)。

1.3 实验方法

1.3.1 外周血细胞计数及分类

将小鼠称重,0.5%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉(50 mg/kg)。进行内眦静脉取血,EDTA-K3 抗凝,血细胞计数仪测定白细胞数、红细胞数、血小板、血红蛋白含量、中性粒细胞和淋巴细胞百分比^[5]。取血后脱颈安乐死。

1.3.2 免疫脏器指数

小鼠安乐死后,取胸腺和脾分别称重,计算胸腺系数和脾系数。胸腺指数=胸腺重量(mg)/小鼠体重(g),脾指数=脾重量(mg)/小鼠体重(g)^[6-7]。

1.3.3 外周血免疫分型检测

每个血样取 50 μ L,加入 1 mL 1 \times 红细胞裂解液,室温条件下裂解 8 min(期间混匀两次),1500 r/min 离心 5 min,4℃。弃上清,保持每个样本 100 μ L 体系,加入外周血混合抗体 4.5 μ L,冰上避光孵育 30 min。2 mL PBS 洗一遍,离心条件不变。加入 300 μ L PBS 过滤到流式管中,上机检测^[8]。

1.4 统计学方法

采用 GraphPad Prism 6 软件处理数据、作图,计量资料数据用平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间差异采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 外周血计数及分类

外周血分析结果如表 1 所示,老年小鼠 RBC 和 PLT 相对于年轻小鼠有明显增高,具有显著性差异($P < 0.05, P < 0.01$),其中血小板升高接近 30%。相对于年轻小鼠,老年小鼠的 NE% 升高了 14.5%,LY% 下降了 15.63%,均具有极显著差异($P < 0.001$)。WBC 和 HGB 没有显著性变化。提示老年小鼠出现血小板升高,白细胞分化偏移。

2.2 免疫脏器指数

与年轻小鼠相比,老年小鼠胸腺重量降低,脾重量增加。胸腺指数降低,与年轻小鼠差异有显著性($P < 0.001$),脾指数差异无显著性(见图 1)。

2.3 外周血免疫分型

流式分析外周血免疫细胞分型测定如图 2 所示。主要检测辅助 T 细胞 (CD4)、细胞毒 T 细胞 (CD8a)、B 淋巴细胞 (B220)、自然杀伤细胞 (NK1.1), 单核细胞采用 F4/80 和 CD11b 共标。其中辅助 T 细胞、细胞毒 T 细胞和浆细胞是从单个核细胞亚群去分析, NK 细胞和单核细胞是从白细胞群去分析 (图 2)。结果显示相对于年轻小鼠, 老年组 CD4 细胞百分比明显降低 [分别为 $(20.14 \pm 3.89)\%$, $(10.80 \pm 3.04)\%$], 差异具有极显著性 ($P < 0.001$), 见图 3A。其他类型的免疫细胞未见明显差异, 见图 3B~3E。

3 讨论

本文检测老年和年轻小鼠外周血计数及免疫细胞分型, 结果显示老年小鼠外周血血小板有明显的升高, 中性粒细胞和淋巴细胞的比例出现了偏移。老年小鼠胸腺指数下降。外周血免疫细胞分型中 CD4 细胞比例明显降低。

实验结果显示, 从脏器总体来看相对于年轻小鼠, 老年小鼠有很多器官衰老, 在免疫方面产生缺陷, 出现胸腺萎缩, CD4/CD8 比值下降等现象。与

人进入老年以后状态相似, 免疫力下降, 易患各种疾病。从器官水平看, 老年小鼠的胸腺指数比年轻小鼠的胸腺指数有明显下降, 呈现显著性差异。理论上随着年龄的增大, 记忆 T 细胞池在增加, 但是体内的 T 细胞总量会被维持在一定量, 并且胸腺的衰老萎缩也导致幼稚 T 细胞数量的减少。老年人和老龄化小鼠的免疫系统减弱的变化趋势是一致的^[9]。

临床上老年人的造血系统出现髓系细胞比例升高、淋系细胞比例降低的分化偏移的现象, 与老年人免疫力降低、髓系肿瘤高发有关^[10]。本次检测发现老年小鼠外周血的 NE% 升高, LY% 下降, 与人类老龄化改变类似。林帅等研究也显示类似的结果, 相比于成年小鼠, 12 月龄的老年小鼠 NE% 升高, LY% 下降^[8]。出现髓系分化偏移的现象, 本质上是造血干细胞的衰老导致细胞周期失调, 并且不受控制的向髓系细胞分化。造血干细胞衰老则是细胞从静止稳态进入不受调控的分裂分化状态, 使 NE% 升高, LY% 下降, 破坏血液中免疫细胞比例的平衡, 降低免疫力^[11]。

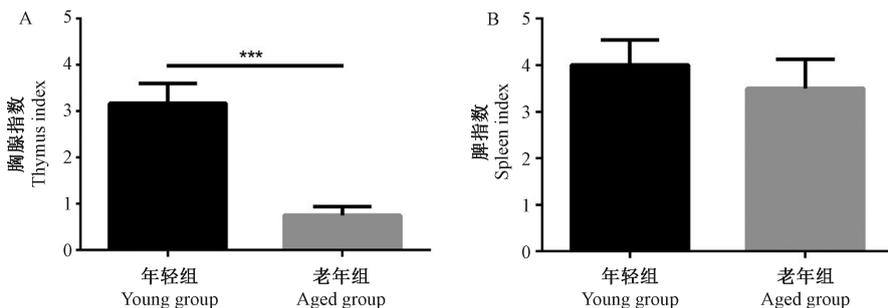
表 1 老年小鼠与年轻小鼠外周血计数比较 ($n = 8$)

Table 1 Comparison of peripheral blood counts between the aged and young mice

组别 Groups	白细胞 ($10^9/L$) WBC	红细胞 ($10^{12}/L$) RBC	血红蛋白 (g/L) HGB	血小板 ($10^9/L$) PLT	中性粒细胞百分比 (%) NE%	淋巴细胞百分比 (%) LY%
年轻组 Young group	6.21 ± 0.76	8.19 ± 0.38	126.38 ± 5.34	749.88 ± 152.49	13.56 ± 2.00	85.19 ± 2.15
老年组 Aged group	5.89 ± 2.59	$8.76 \pm 0.50^*$	127.25 ± 9.16	$972.13 \pm 128.12^{**}$	$28.06 \pm 4.35^{***}$	$69.56 \pm 4.55^{***}$

注: 与年轻小鼠相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

Note. Compared with the young mice, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.



注: A: 胸腺指数; B: 脾指数。与年轻小鼠相比, *** $P < 0.001$ 。

图 1 老年小鼠与年轻小鼠脏器指数比较

Note. A, Thymus index. B, Spleen index. Compared with young mice, *** $P < 0.001$.

Figure 1 Comparison of organ indexes between the aged and young mice

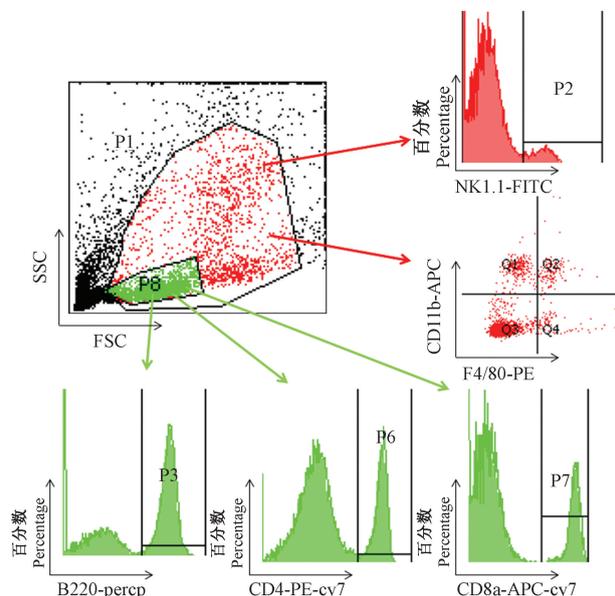


图 2 流式细胞仪分析时门的设置及典型图

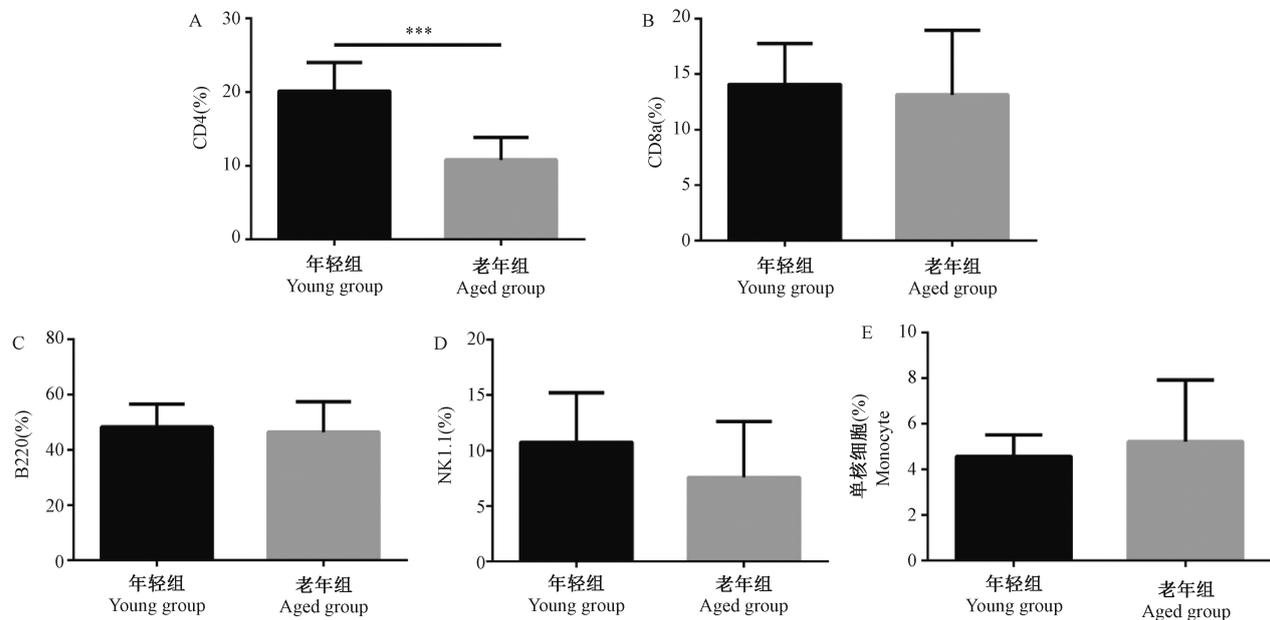
Figure 2 Representative gating strategy for peripheral blood immune cell phenotypes analyzed by flow cytometry

相较于年轻人,健康男性老年人红细胞、血红蛋白和血小板倾向于降低,出现老年人贫血现象^[10, 12-13]。C57 小鼠外周血血小板计数比人类的要高,本次检测老年鼠血小板有升高趋势,与健康老年人的变化趋势有一定的差异。提示老年小鼠在血小板数量和功能的代偿方面可能与老年人有

一定的差异。Simon 等人的研究也显示,血小板会在炎症感染和大量出血等应激情况下,直接从造血干细胞分化成血小板,提示老年小鼠可能处于慢性炎症状态,炎症状态促使造血干细胞不断的向巨核细胞分化,最终导致血小板的升高^[14]。外周血细胞检测中出现血小板有明显上升,三系血细胞同时增多,暗示老年小鼠可能患有老年真性红细胞增多症 (polycythemia vera, PV)^[15-16],有潜在成为 PV 动物模型的可能。但是这点与人外周血计数规律并不一致,相较于年轻人,健康男性老年人红细胞、血红蛋白和血小板倾向于降低^[10, 12-13]。

外周血免疫细胞分型检测显示 CD4 淋巴细胞的比例下降,CD8 不变,导致 CD4/CD8 比例下降。林帅等文献中除 CD4 有显著下降外,NK1.1 和 CD11b 有明显的上升并有显著性差异^[8]。CD4/CD8 比例下降暗示老年小鼠免疫系统功能下降,与临床上老年人 CD4 细胞的减少,免疫力低下相似。小鼠月龄的增加导致胸腺的萎缩,是免疫衰老的直接原因^[18],CD4 细胞的减少 CD4⁺/CD8⁺ 比值的下降与老年人细胞亚群失调的情况一致^[2]。

随着年龄增长,免疫系统出现衰老性改变。这些改变过程非常复杂,主要包括以下几个方面:(1) 免疫细胞;(2) 淋巴器官和非淋巴组织中的微环境(免疫细胞驻留的组织);(3) 与免疫细胞及其微环



注:A:CD4⁺;B:CD8⁺;C:B220⁺;D:NK1.1⁺;E:CD11b⁺F4/80⁺。与年轻小鼠相比,*** P<0.001。

图 3 老年小鼠与年轻小鼠外周血免疫细胞分型比较

Note. A, CD4⁺. B, CD8⁺. C, B220⁺. D, NK1.1⁺. E, CD11b⁺F4/80⁺. Compared with the young mice, *** P<0.001.

Figure 3 Comparison of peripheral blood immune cell typing between the aged and young mice

境相互作用的循环因子,包括趋化因子、细胞因子和其他可溶性分子^[19-20]。从 1969 年免疫衰老概念的提出,免疫衰老研究取得了很大的进展,不仅观察到不同免疫细胞数量和比例的改变,还注意探讨不同亚型免疫细胞功能变化以及免疫细胞与微环境及系统环境相互作用方式的变化^[21]。这些改变作为免疫衰老,甚至作为全身衰老生物学标记方面也取得了进展^[22]。这些深入研究对阐明衰老机制、探讨干预老年人免疫功能衰老的靶点和策略、改善老年人生活质量具有重要意义^[23]。

本文对老年小鼠外周血和免疫器官指数进行了测定并与人类老龄化改变进行了初步比较分析。作为研究衰老及老龄化疾病的重要模型小鼠,研究结果将为免疫衰老相关研究提供基础数据。

参考文献:

- [1] Walford R. The immunologic theory of aging [J]. *Immunol Rev*, 1969,2(1):195.
- [2] 王燕,董群. 衰老与 T 淋巴细胞[J]. *皖南医学院学报*, 2004, 23(2):68-71.
- [3] 田建辉,罗斌,刘嘉湘. 免疫衰老及其在肿瘤中的作用[J]. *国际肿瘤学杂志*, 2016,43(2):122-125.
- [4] 王敏. 免疫衰老与固有免疫细胞的相关研究进展[J]. *基础医学与临床*, 2016,36(1):125-129.
- [5] 李程程,管博文,苏路路,等. 白消安对小鼠造血干细胞功能的损伤作用[J]. *中国比较医学杂志*, 2018,28(2):26-32.
- [6] 巩萍,孙铜,戴晓莉,等. 松花粉对环磷酰胺增效减毒作用研究[J]. *中国比较医学杂志*, 2017,27(5):60-63.
- [7] 陶祥,郑芹,杨惠玲. S₁₈₀ 荷瘤鼠免疫器官等变化及小柴胡汤对其影响的研究[J]. *广东医学*, 2004,25(12):1384-1385.
- [8] 林帅,陈孟毅,刘冰,等. 环磷酰胺对不同年龄小鼠免疫细胞损伤及修复作用的影响[J]. *中国医药导报*, 2016,13(36):8-13.
- [9] 郭盛淇. 免疫衰老与老年人免疫[J]. *微生物学免疫学进展*, 2013,41(3):1-9.
- [10] 林洪燕,周腾坚. 永嘉县 2289 名健康老年人外周血细胞参数参考值调查分析[J]. *中国医师杂志*, 2012,14(2):271-273.
- [11] Wang Y, Tian H, Cai W, et al. Tracking hematopoietic precursor division ex vivo in real time[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018,9(1):16.
- [12] 张海洁,兰周燕,石祥,等. 不同年龄段壮族健康人群外周血细胞参数检测结果分析[J]. *检验医学与临床*, 2014(18):2519-2520.
- [13] Jones C I. Platelet function and ageing [J]. *Mamm Genome*, 2016,27(7-8):358-366.
- [14] Haas S, Hansson J, Klimmeck D, et al. Inflammation-induced emergency megakaryopoiesis driven by hematopoietic stem cell-like megakaryocyte progenitors [J]. *Cell Stem Cell*, 2015,17(4):422-434.
- [15] 施凯耀. 对 JAK2V617F 突变所导致的骨髓增生性疾病的小鼠心脏肥大的研究[D]. 吉林大学, 2014.
- [16] Xing S, Wanting TH, Zhao W, et al. Transgenic expression of JAK2V617F causes myeloproliferative disorders in mice [J]. *Blood*, 2008,111(10):5109-5117.
- [17] 林帅. 环磷酰胺和辐射诱导不同年龄小鼠造血免疫损伤与修复的观察[D]. 福建医科大学, 2016.
- [18] 魏群,周萍. 六味地黄丸对老年人细胞免疫衰老的影响[J]. *实用临床医学*, 2017,18(12):20-21.
- [19] Nikolich-ã Ugich J. The twilight of immunity: emerging concepts in aging of the immune system[J]. *Nat Immunol*, 2018,19(1):10-19.
- [20] 李彦红,刘颖,秦川. 免疫衰老与 T、B 细胞改变的相关研究[J]. *中国比较医学杂志*, 2012,22(6):65-71.
- [21] Effros RB. From Hayflick to Walford: the role of T cell replicative senescence in human aging[J]. *Exp Gerontol*, 2004,39(6):885-890.
- [22] Sharpless NE, Sherr CJ. Forging a signature of *in vivo* senescence [J]. *Nat Rev Cancer*, 2015,15(7):397-408.
- [23] 王宇虹,曲光瑾,肖冲,等. 灵长类巨细胞病毒慢性潜伏再激活诱导免疫衰老的研究进展[J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(7):124-128.

[收稿日期] 2019-02-19