

三氧化二砷对 MRL/lpr 狼疮鼠 IFN- γ 、IL-4 表达和 Th1/Th2 平衡的影响

王晓冰 陈培荣 张挺 朱小春* 周艳 孙莉 陈朝生

(温州医学院附属第一医院风湿免疫科, 温州 325000)

摘要 探讨三氧化二砷(ATO)对 MRL/lpr 狼疮鼠 IFN- γ 、IL-4 表达和 Th1/Th2 平衡的影响。将发病早期和晚期的 MRL/lpr 狼疮鼠分别接受 ATO、环磷酰胺(CTX)和生理盐水(NS)治疗 2 个月,然后用 ELISA 法测血清中 IFN- γ 、IL-4 的浓度和抗 ds-DNA 抗体水平及四色流式细胞术测脾脏 CD3⁺(T)细胞、CD3⁺CD4⁺(Th)细胞、CD3⁺CD4⁺IFN- γ ⁻IL-4⁻(Th1)细胞和 CD3⁺CD4⁺IL-4⁺IFN- γ (Th2)细胞的百分率,从而研究 ATO 对 MRL/lpr 狼疮鼠 IFN- γ 、IL-4 表达和 Th1/Th2 平衡的影响。发现给药后,3、5 月龄 ATO 组 MRL/lpr 狼疮鼠血清抗 ds-DNA 抗体水平明显下降($P < 0.05$),其血清 IFN- γ 和 IL-4 浓度、Th1、Th2 和 CD3⁺ 细胞百分率均低于相应月龄的 NS 组($P < 0.05$),且 NS 组中 5 月龄组 Th1/Th2 值较 3 月龄组显著升高($P = 0.003$),而在 ATO 组中差异无统计学意义($P = 0.187$)。因此,研究显示 ATO 能显著降低发病早期和发病晚期的 MRL/lpr 狼疮鼠血清抗 ds-DNA 抗体的水平,可抑制 T 细胞和 Th 细胞增生和活化功能,降低 IFN- γ 和 IL-4 的血清水平和细胞诱生水平,并在一定程度上逆转发病晚期的 MRL/lpr 狼疮鼠的 Th1 偏移。

关键词 三氧化二砷; MRL/lpr 狼疮鼠; IFN- γ ; IL-4

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种以淋巴细胞活化失调、自身抗体产生过多和多器官受累为特点的自身免疫病。目前, SLE 的治疗以糖皮质激素和免疫抑制剂为主。这些治疗能延长患者的寿命,但是往往伴随严重的毒副作用。因此,寻找一种新药有重要的意义。三氧化二砷(arsenic trioxide, ATO)是我国中药砒霜的主要成分,自古以来常用于治疗风湿病、气喘病、肿瘤等,近年来 ATO 已经应用于急性早幼粒细胞白血病的治疗,尽管确切的分子机制仍不清楚^[1]。研究证实 ATO 是一种治疗自身免疫性疾病如系统性红斑狼疮很有前景的方法^[2]。我们已有的研究证实 ATO 能延长 BXSB 狼疮鼠的寿命,降低 ds-DNA 抗体和 IgG 的水平,改善肾小球肾炎的病理^[3-5],体外实验也发现 ATO 能抑制 MRL/lpr 狼疮鼠 CD4⁺T 细胞的增殖,抑制 IFN- γ 和 IL-4 的转录和表达水平。鉴于 Th1/Th2 平衡在 SLE 发病机制中的重要作用,本文将探讨 ATO 对 MRL/lpr 狼疮鼠 Th1/Th2 的平衡及其细胞因子 IFN- γ 和 IL-4 的影响,为 ATO 治疗 SLE 的作用机制提供重要的实验依据。

1 材料与方

1.1 材料

三氧化二砷钠注射针(哈尔滨伊达药业有限公司),小鼠 IgG (Southern Biotechnology Associates 公司),羊抗小鼠 IgG-HRP (Serotec 公司),鲑鱼精 DNA (Sigma 公司),HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG (北京中山生物科技有限公司),ionomycin (Alexis Biochemicals 公司),佛波醇酯(PMA)、莫能霉素(monensin)、1% 牛血清白蛋白(BSA)小鼠细胞因子 ELISA 试剂盒(深圳晶美生物工程有限公司),Fix & Perm Reagents (Caltag Laboratories 公司),PE-Cy5.5 anti-mouse CD3、FITC anti-mouse CD4、APC rat IgG1 isotype control、PE rat IgG1 isotype control、APC anti-mouse IFN- γ 、PE anti-mouse IL-4 (eBioscience 公司),RPMI 1640 培养基(Hyclone 公司),细胞培养板为 (Dow Corning 公司),96 孔酶标板(Costar 公司),酶标仪(Ladysystems 公司),FACS Calibur 流式细胞仪(BD 公司)。

1.2 动物实验和分组

3 月龄和 5 月龄 MRL/lpr 小鼠各 30 只(实验期间

收稿日期: 2007-12-05 接受日期: 2008-03-21

浙江省自然科学基金资助项目(No.M303606)

*通讯作者。Tel: 0577-88069203, E-mail: zhuxiaochunwz@126.com

5月龄各组均意外死亡一只,予剔除),体重36~48 g,引种自美国 Jackson 实验室,饲养在温州医学院动物实验中心 SPF 级动物房中。将两种月龄的小鼠分别随机平均分成3组:① ATO 组:0.4 mg/(kg·d),腹腔注射;②生理盐水组(NS 组):作为阴性对照组,按体重取量,腹腔注射;③环磷酰胺组(CTX 组):作为阳性对照,50 mg/(kg·qw),腹腔注射。给药持续2个月,于实验起点和终点称体重和采尾血标本,分离血清于-70℃保存待测。

1.3 外周血抗 ds-DNA 抗体的检测

采用 ELISA 法。每孔加 100 μl 鲑鱼精 DNA,室温预包被 10 h;每孔加入 300 μl 1% 牛血清白蛋白(BSA),室温封闭 10 h;用 1% BSA 按 1:100 的比例将样品血清稀释,每孔加入 100 μl 稀释后的样品血清,37℃温育 90 min;每孔加入 100 μl HRP-羊抗小鼠酶标二抗(1:5 000 稀释),37℃温育 60 min,加底物液显色 10 min 后,酶标仪检测 450 nm 时的吸光度 A 值。

1.4 血清 IL-4、IFN-γ 浓度测定

实验均采用 ELISA 法,试剂盒为深圳晶美生物工程有限公司进口分装产品,严格按说明书操作,用酶标仪测定波长为 450 nm 时的 A 值,通过绘制标准曲线分别求出各指标含量。

1.5 脾脏单细胞悬液的制备

将小鼠处死,无菌条件下,取脾脏,置培养皿中,注射器针头在脾脏表面反复穿刺后,吸取细胞悬液,经 200 目筛网过滤获得单细胞悬液。冷 PBS 洗涤 2 次,每次 400 g,离心 5 min。将细胞悬浮于 RPMI 1640

中,用台盼蓝染色计数活细胞数,调整细胞浓度为 5×10^6 个/ml。

1.6 四色流式细胞术胞内细胞因子 IFN-γ、IL-4 水平检测检测

将细胞悬液加入 24 孔细胞培养板,加入 20 μg/L PMA、1 μmol/L ionomycin 活化细胞,同时加入 2 μmol/L 蛋白质转运抑制剂莫能霉素,于 37℃,5% CO₂ 培养 4 h。收集细胞,加入抗 CD3-PE-Cy5.5 及抗 CD4-FITC 细胞表面染色,温育 15 min。加 100 μl Fix & Perm Reagent A 温育 15 min 固定。洗涤,弃上清液。加入 100 μl Fix & Perm Reagent B 破膜,加入抗小鼠 IL-4-PE 和抗小鼠 IFN-γ-APC 单抗作胞内染色,另设 IgG1 同型对照,温育 15 min。洗涤,300 μl 的 1% 多聚甲醛 PBS 固定,重悬,用 FACS Calibur 流式细胞仪检测分析。

1.7 统计学处理

数据以采用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,采用 SPSS13.0 软件进行方差分析(ANOVA)、t 检验, $P < 0.05$ 认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 ATO 能降低 MRL/lpr 狼疮鼠血清中抗 ds-DNA 抗体水平

ELISA 法测定了各组 MRL/lpr 狼疮鼠给药前后的血清抗 ds-DNA 抗体水平(图 1)。结果显示给药后,3、5 月龄 ATO 组小鼠血清抗体水平显著下降(前者 $P=0.012$,后者 $P=0.000$),而相应月龄的 NS 组的抗体

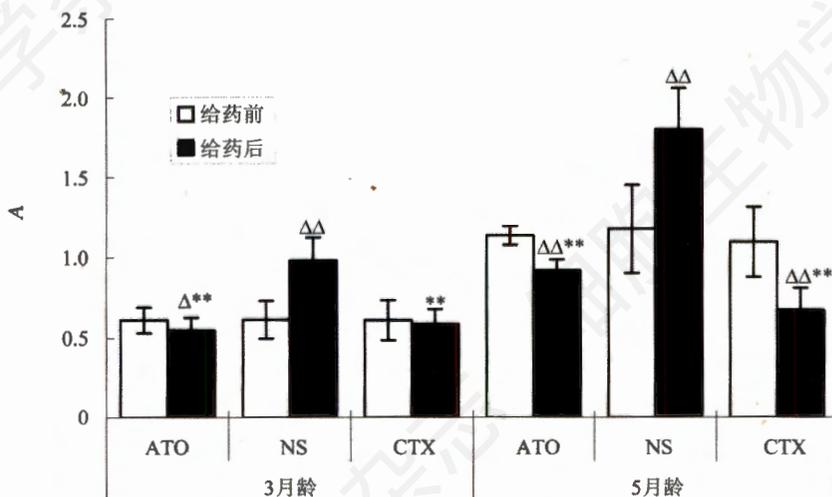


图1 各组 MRL/lpr 狼疮鼠给药前后血清抗 ds-DNA 抗体水平与给药前相比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与 NS 组比较, $**P < 0.01$ 。

水平均显著升高(前者 $P=0.002$, 后者 $P=0.002$)。3 月龄 CTX 组给药后抗体水平较给药前有下降趋势, 但差异无统计学意义($P>0.05$), 而 5 月龄由给药前抗体水平显著下降($P=0.001$)。给药前 3、5 月龄组内各组间差异无统计学意义, 给药后的 ATO 和 CTX 各月龄组的抗 ds-DNA 水平均低于相应月龄的 NS 组($P<0.01$)。5 月龄 CTX 组的抗体水平较相应月龄的 ATO 组低($P=0.033$), 而 3 月龄组中两者间差异无统计学意义($P=0.295$)。

2.2 ATO 能降低 MRL/lpr 狼疮鼠血清 IFN- γ 和 IL-4 的浓度

用 ELISA 法检测各组 MRL/lpr 狼疮鼠外周血 IFN- γ 和 IL-4 的浓度(表 1)。结果发现, 3、5 月龄 ATO 组血清 IFN- γ 均低于相应月龄的 NS 组(前者 $P=0.017$, 后者 $P=0.022$), 而与相应月龄的 CTX 组比较差异无统计学意义(前者 $P=0.147$, 后者 $P=0.872$)。3、5 月龄 ATO 组血清 IL-4 浓度也低于相应月龄的 NS 组(前者 $P=0.028$, 后者 $P=0.011$), 3 月龄组中 ATO 组 IL-4 高于 CTX 组($P=0.028$), 而 5 月龄组中 ATO 组与 CTX 组差异无统计学意义($P=0.818$); 5 月龄 CTX 组 IFN- γ 浓度低于 5 月龄 NS 组($P=0.011$), 而 3 月龄 CTX 组

IFN- γ 与 3 月龄 NS 组差异无统计学意义($P=0.441$)。3、5 月龄 CTX 组小鼠血清 IL-4 的浓度均低于相应月龄的 NS 组(前者 $P=0.000$, 后者 $P=0.012$); NS 组中 5 月龄组的 IFN- γ 比 3 月龄组高($P=0.021$), 而在 ATO 组和 CTX 组中两个月龄之间差异无统计学意义。在 NS 组、ATO 组、CTX 组中 5 月龄组的 IL-4 浓度均低于各自的 3 月龄组(P 值分别为: 0.000、0.001 和 0.026)。

2.3 ATO 能调整 MRL/lpr 狼疮鼠脾细胞淋巴亚群比例

流式细胞术检测各组 MRL/lpr 狼疮鼠 CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺ 细胞的百分率(图 2)。3、5 月龄 ATO 组的 CD3⁺ 细胞百分率显著低于相应月龄的 NS 组的水平(前者 $P=0.005$, 后者 $P=0.041$), 而与相应月龄的 CTX 组差异无统计学意义(前者 $P=0.065$, 后者 $P=0.917$)。3 月龄 ATO 组的 CD3⁺CD4⁺ 细胞百分率显著低于相应月龄的 NS 组和 CTX 组的水平(前者 $P=0.007$, 后者 $P=0.007$), 而 5 月龄的三组之间的 CD3⁺CD4⁺ 细胞百分率差异无统计学意义; 3、5 月龄 ATO 组较相应月龄的 NS 组 CD3⁺CD8⁺ 细胞百分率有降低趋势, 但是差异无统计学意义(前者 $P=0.087$, 后者 $P=0.443$); 5 月龄 CTX 组的 CD3⁺ 细胞百分率和

表 1 各组 MRL/lpr 狼疮鼠外周血 IFN- γ 和 IL-4 的浓度($\bar{x}\pm s$, pg/ml)

组别	IFN- γ		IL-4	
	3 月龄(n=30)	5 月龄(n=29)	3 月龄(n=30)	5 月龄(n=29)
NS	14.16 \pm 1.85	20.06 \pm 4.06	41.82 \pm 2.38	33.46 \pm 1.41*
ATO	10.45 \pm 2.29 ^Δ	13.65 \pm 5.10 ^Δ	37.24 \pm 2.79 ^Δ	28.94 \pm 3.98 ^{Δ**}
CTX	12.83 \pm 4.01	13.18 \pm 3.05 ^Δ	33.44 \pm 2.51 ^{ΔΔ}	29.34 \pm 2.95 ^Δ

与 NS 组比较, ^Δ $P<0.05$, ^{ΔΔ} $P<0.01$; 与 CTX 组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

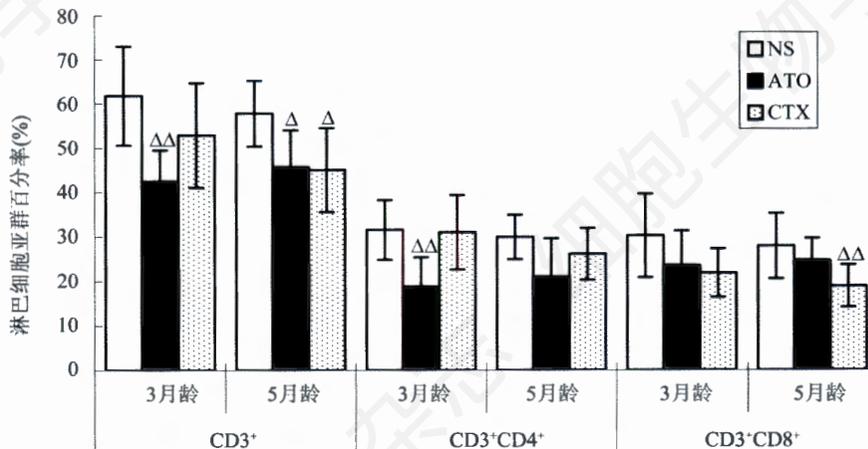


图 2 各组 MRL/lpr 狼疮鼠脾细胞淋巴亚群的比例
与 NS 组比较, ^Δ $P<0.05$, ^{ΔΔ} $P<0.01$ 。

CD3⁺CD8⁺ 细胞百分率均低于相应月龄的 NS 组(P 值分别为: 0.014 和 0.02)。

2.4 ATO 能降低 MRL/lpr 狼疮鼠脾脏 Th1、Th2 细胞的百分率及 Th1/Th2 比值

用流式细胞术测胞内细胞因子的方法来分析各组 MRL/lpr 狼疮鼠脾脏 Th1、Th2 细胞的百分率及其比值(表 2, 图 3)。结果提示, 3、5 月龄 ATO 组 Th1、Th2 细胞百分率较相应月龄 NS 组显著降低(Th1%: 前者 $P=0.009$, 后者 $P=0.004$; Th2%: 前者 $P=0.000$ 、后者 $P=0.002$), 与相应月龄的 CTX 组比

较差异均无统计学意义($P>0.05$)。5 月龄组中, CTX 组的 Th1 细胞百分率低于 NS 组的水平($P=0.016$), 3、5 月龄 CTX 组 Th2 细胞百分率均低于相应月龄 NS 组的水平(前者 $P=0.000$, 后者 $P=0.002$)。在 ATO 组、NS 组和 CTX 组中 5 月龄组 Th1 细胞百分比均高于相应的 3 月龄组(P 值分别为 0.021、0.001 和 0.025), 而各治疗组中两月龄组之间 Th2 细胞百分比差异无统计学意义($P>0.05$)。3 月龄组中, ATO 组和 CTX 组的 Th1/Th2 值显著高于相应月龄 NS 组的水平(前者 $P=0.022$, 后者 $P=0.006$), 而 ATO 组和 CTX

表 2 各组 MRL/lpr 狼疮鼠脾脏 Th1、Th2 细胞及其比值的影响($\bar{x} \pm s$, %)

组别	Th1 (CD3 ⁺ CD4 ⁺ IFN- γ IL-4 ⁻)		Th2 (CD3 ⁺ CD4 ⁺ IL-4 ⁺ IFN- γ)		Th1/Th2	
	3 月龄	5 月龄	3 月龄	5 月龄	3 月龄	5 月龄
NS	7.02 \pm 0.55	11.91 \pm 2.24*	5.44 \pm 1.09	4.70 \pm 0.89	1.41 \pm 0.31	2.64 \pm 0.69
ATO	5.54 \pm 0.7 ^A	7.42 \pm 2.28 ^{AA}	2.60 \pm 0.77 ^{AA}	2.20 \pm 1.76 ^{AA}	2.33 \pm 0.82 ^A	3.98 \pm 1.54
CTX	6.26 \pm 1.69	8.84 \pm 1.71 ^A	2.35 \pm 0.71 ^{AA}	2.48 \pm 1.23 ^{AA}	2.71 \pm 0.61 ^{AA}	4.72 \pm 2.62 ^{AA}

与 NS 组比较, ^A $P<0.05$, ^{AA} $P<0.01$; 与 CTX 组比较, * $P<0.05$ 。

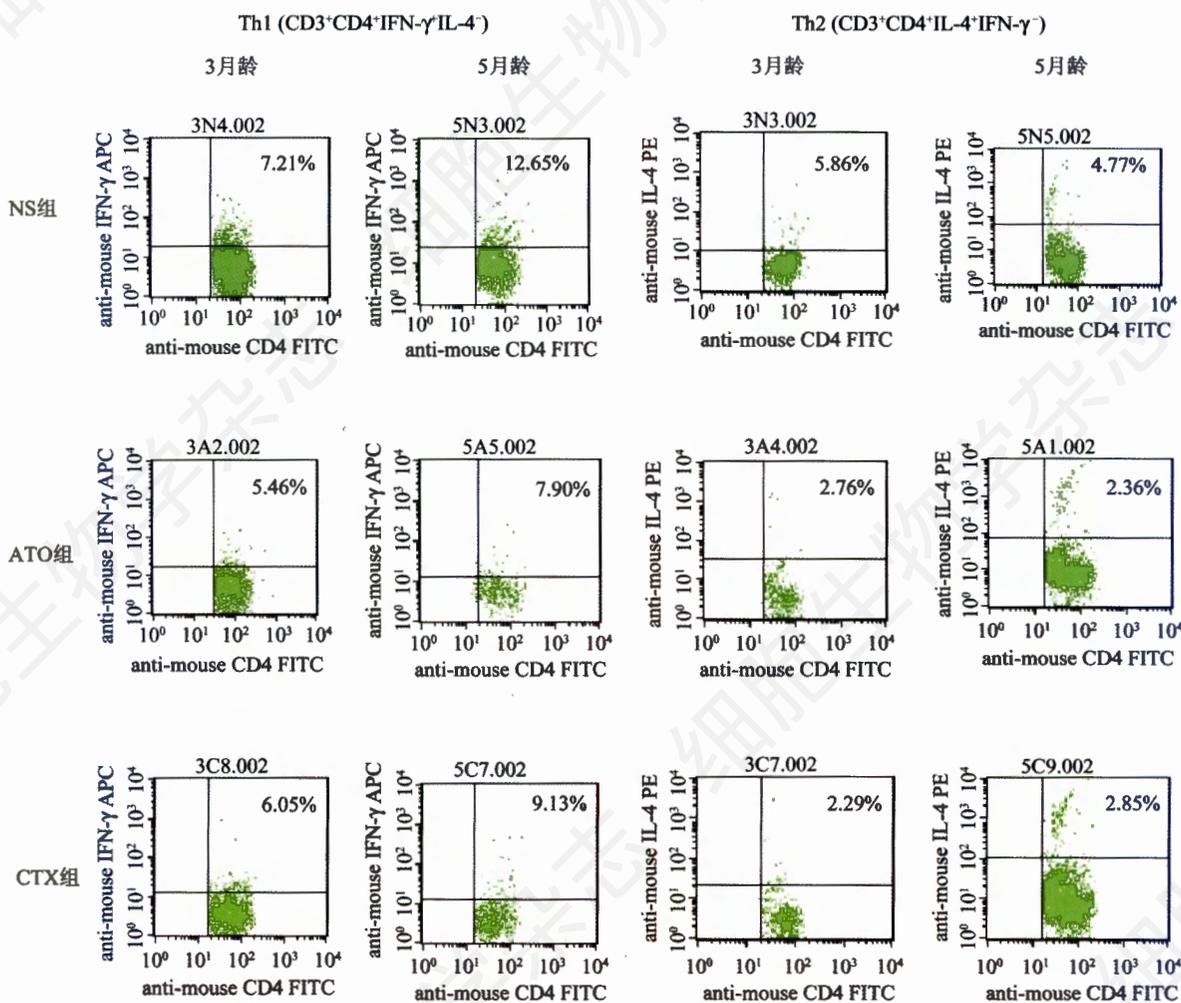


图 3 各组 MRL/lpr 狼疮鼠脾脏 Th1、Th2 细胞的百分率流式图例

组之间差异均无统计学意义($P=0.351$)。5月龄的NS组、ATO组、CTX组Th1/Th2值组间差异无统计学意义($P>0.05$); NS组中5月龄组较3月龄组Th1/Th2值显著升高($P=0.003$), 而ATO组和CTX的两个月龄组之间差异无统计学意义(前者 $P=0.187$, 后者 $P=0.112$)。

3 讨论

SLE发病过程与CD4⁺T辅助细胞(Th)密切相关, 研究证实SLE病程中伴有细胞因子网络的紊乱和Th1/Th2比例的失衡^[6], 而究竟是Th1占优势还是Th2占优势存在争议: 既有SLE患者中Th2类细胞因子IL-4表达上调的研究结果^[7,8], 也有发现在人类和狼疮鼠模型Th1类细胞因子IFN- γ 表达亢进, 促进疾病的发展及组织损伤的经典证据^[9,10]。最近文献报道, 组织损害严重的SLE患者以Th1型免疫紊乱占优势, 与疾病活动程度相关; 而组织损害轻微的SLE患者的免疫紊乱则趋向于以Th2型为主^[11]。因此, 有学者认为Th1/Th2平衡是一个动态过程, 当免疫紊乱发生SLE时, Th1、Th2型细胞因子均有不同程度升高^[12]: IL-4、IL-10等Th2型细胞因子上升显著时, 则促使B细胞多克隆活化和病理性自身抗体生成, 主要表现为病情活动, 推进炎症进程; 以IFN- γ 为代表的Th1型细胞因子上升显著时, 则易引起免疫复合物沉积于肾脏等组织, 发生免疫损伤。

MRL/lpr小鼠是常用的SLE动物模型之一, 含有与细胞凋亡有关的Fas基因隐性突变, 导致淋巴细胞增生, 加速了自身免疫反应^[13]。其发病年龄一般为10~12周, 症状与人类红斑狼疮相似, 包括出现高滴度ANA、抗ds-DNA抗体、关节炎和血管炎等, 最终死于免疫复合物肾小球肾炎, 是研究SLE发病机制和治疗方法的良好工具。

我们的实验数据证实, 随着病程的进展MRL/lpr鼠血清抗ds-DNA抗体的水平越来越高, 但是能被ATO和CTX明显抑制。其中CTX能显著降低5月龄组的抗体水平, 而ATO对狼疮早期和晚期的自身抗体均有抑制作用。MRL/lpr小鼠存在T淋巴细胞的增生, 但ATO能明显减少CD3⁺和CD3⁺CD4⁺细胞数, 对CD3⁺CD4⁺细胞的抑制尤为明显, 在这个方面ATO优于CTX。我们推测这些细胞主要通过凋亡等方式消减。我们发现, 5月龄NS组小鼠的血清IFN- γ 浓度和Th1细胞的百分率显著增高的, 而血清IL-4浓

度和Th2细胞表达率呈一定的降低趋势, 体现了MRL/lpr鼠发病晚期的Th失衡, 表现为向Th1偏移。我们这一实验发现与相关研究结果相一致。国内外文献报道, MRL/lpr小鼠脾脏CD4⁺T细胞及其分泌的IFN- γ 、IL-4水平高于正常小鼠^[14,15]。本实验的结果提示, ATO能降低MRL/lpr狼疮鼠外周血IFN- γ 和IL-4的水平和脾脏Th1和Th2细胞百分率, 可见ATO能抑制MRL/lpr狼疮鼠的细胞免疫和体液免疫反应。

CTX是最早应用于临床治疗SLE的一种经典的细胞周期非特异性免疫抑制剂。然而与CTX相比, ATO对Th1细胞的数量和活性以及血清IFN- γ 浓度的抑制作用更加显著, 提示ATO在抑制Th1型免疫反应方面可能优于CTX, 尽管对Th2细胞及其细胞因子IL-4的抑制作用与CTX相当。目前关于SLE患者病情严重程度与Th1/Th2比值的相关性尚无定论, 5月龄NS组小鼠的Th1/Th2比值较3月龄组高, 而ATO组和CTX的两个月龄组之间差异无统计学意义, 说明ATO和CTX能在一定程度上纠正MRL/lpr狼疮鼠发病晚期的Th1偏移。另外, 需要说明的是, 3月龄的ATO组和CTX组小鼠的Th1/Th2比值升高, 主要是由CTX对Th2细胞的抑制幅度较大所致。

综上所述, 通过MRL/lpr狼疮鼠这个模型我们看到了ATO对系统性红斑狼疮治疗的可观前景: 首先, ATO能在数量上抑制狼疮鼠T细胞的过度活化和Th细胞的增生, 减弱其在自身免疫应答的作用; 其次, ATO能降低IFN- γ 等Th1型细胞因子的血清水平和细胞诱生水平, 有利于炎症的控制和减少肾脏等组织的损伤, 而且ATO还能降低IL-4等Th2型细胞因子的血清水平和细胞诱生水平, 有助于减少自身抗体产生。因此, ATO对早期狼疮和晚期狼疮的细胞免疫和体液免疫均有抑制作用, 能阻止和/或逆转SLE疾病的进展, 其效果与CTX接近。

现已知道某些免疫分子如STAT4、STAT6等在Th1/Th2分化调控、效应中起着重要介导分化作用^[16]。有报道称砷能通过和蛋白酪氨酸激酶直接作用, 导致JAK-STAT途径失活^[17]; 也有研究发现基因启动子的甲基化水平在IFN- γ 和IL-4的表达和Th1/Th2平衡中起重要的作用^[18,19], 而ATO能改变多种基因的甲基化水平。但是ATO是否通过对以上这些调控机制的影响来调节Th的活性和分化仍待进一步证实。本实验中尚未涉及ATO对B细胞和相关调节因子的影响, 这也是本课题组下一步的研究方向。

参考文献(References)

- [1] Leoni F *et al.* *Haematologica*, 2002, **87**: 485
 [2] Bobé P *et al.* *Blood*, 2006, **108**: 3967
 [3] 朱小春等. *中华风湿病学杂志*, 2002, **6**: 343
 [4] 朱小春等. *中国中西医结合肾病杂志*, 2004, **5**: 7
 [5] 夏晓茹等. *中国中西医结合杂志*, 2007, **27**: 141
 [6] Hagiwara E. *Ryumachi*, 2001, **41**: 888
 [7] Funachi M *et al.* *Scand J Rheumatol*, 1998, **27**: 219
 [8] Viallard JF *et al.* *Clin Exp Immunol*, 1999, **115**: 189
 [9] Hasegawa K *et al.* *J Comp Pathol*, 2002, **127**: 1
 [10] 刘华锋等. *中华风湿病学杂志*, 2003, **5**: 268
 [11] Wong CK *et al.* *Lupus*, 2000, **9**: 589
 [12] Lit LC *et al.* *Ann Rheum Dis*, 2006, **65**: 209
 [13] Santiago- Raber ML *et al.* *Autoimmun Rev*, 2004, **3**: 33
 [14] Balomenos D *et al.* *Clin Invest*, 1998, **101**: 364
 [15] 周广宇等. *中华风湿病学杂志*, 2006, **10**: 306
 [16] Rogge L *et al.* *Nat Genet*, 2000, **25**: 96
 [17] Cheng HY *et al.* *Oncogene*, 2004, **23**: 3603
 [18] Yano S *et al.* *J Immunol*, 2003, **171**: 2510
 [19] Makar KW *et al.* *J Immunol*, 2004, **173**: 4402

The Effects of Arsenic Trioxide on Expression of IFN- γ , IL-4 and Th Balance in MRL/lpr Mice

Xiao-Bing Wang, Pei-Rong Chen, Ting Zhang, Xiao-Chun Zhu*, Yan Zhou, Li Sun, Chao-Sheng Chen
 (Division of Rheumatology, First Affiliated Hospital, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China)

Abstract To investigate the effects of arsenic trioxide (ATO) on the expression of IFN- γ , IL-4 and Th balance in MRL/lpr mice in both early and later stage of the disease, young (3-month-old) and old (5-month-old) MRL/lpr mice were chosen for such experiment, each age group was then separated in 3 different sub-groups. The 3 sub-groups of both age groups received arsenic trioxide [ATO, 0.4 mg/(kg·d)], cyclophosphamide [CYC, 50 mg/(kg·qw)] and sodium chloride (NS, volume weight-determined) abdominal injection respectively for 2 months. Afterwards, serum levels of IFN- γ , and IL-4 were assayed using the mouse cytokines ELISA kit. The rates of the CD3⁺ (T) cells, CD3⁺CD4⁺ (Th) cells and the CD3⁺CD4⁺IFN- γ ⁻IL-4⁻ (Th1) cells CD3⁺CD4⁺IL-4⁺IFN- γ (Th2) cells were detected using single-cell measurement of intracellular cytokines by flow cytometry. Results showed that: ① The production of anti-dsDNA autoantibody was markedly decreased in both of the ATO-treated mice (the young $P=0.012$, the old $P=0.000$), while it was dramatically increased in the NS groups (the young $P=0.002$, the old $P=0.002$). ② Compared to NS-treated mice, the levels of IFN- γ , IL-4 was dramatically lower in ATO-treated mice ($P<0.05$). ③ The ATO-treated mice had significantly fewer CD3⁺ cells, Th1 and Th2 cells than NS-treated mice ($P<0.05$). ATO-treated young mice had significantly fewer CD3⁺CD4⁺ cells than NS-treated young mice ($P=0.007$). ④ Th1/Th2 ratio in NS-treated old mice was greater than the young ones ($P=0.003$), while there was no significant difference between the two age groups of ATO-treated mice. It was concluded that, ATO can reduce the production of anti-dsDNA autoantibody in both early and later stages of the disease, inhibit the activation and proliferation of both T cells and Th subsets in MRL/lpr mice, decrease the expression of IFN- γ and IL-4, and partly adjust the shifting of 5-month-old MRL/lpr mice to Th1.

Key words arsenic trioxide; MRL/lpr mice; IFN- γ ; IL-4

Received: December 5, 2008 Accepted: March 21, 2008

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No.M303606)

*Corresponding author. Tel: 86-577-88069203, E-mail: zhuxiaochunwz@126.com