

C57BL/6 小鼠实验性自身免疫性脑脊髓炎模型的建立

王菊蓉,张冉,王栋,邱磊,郭满盈,弓雪莲,郭葆玉*

(第二军医大学药学院生化药教研室,上海 200433)

[摘要] 目的:建立实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)的小鼠模型,为探讨多发性硬化的免疫病理机制和实验性治疗提供依据。方法:C57BL/6小鼠40只,分为3组。EAE组25只,采用皮下注射完全弗氏佐剂与300 μg MOG₃₅₋₅₅制备的乳化抗原,辅以腹腔注射10⁹个/ml百日咳疫苗的方法诱导发病;佐剂组8只,用生理盐水代替抗原肽制备免疫乳剂,余同EAE组;正常对照组7只,仅注射生理盐水。采用H-E和LFB染色的方法观察小鼠EAE模型的组织学改变。结果:从免疫后11 d开始,EAE组小鼠有22只陆续出现EAE临床症状,发病率为88%。佐剂组与正常对照组小鼠均未出现临床神经系统症状。光镜下可见EAE组小鼠的大脑和脊髓组织中有大量的炎性细胞浸润,白质脱髓鞘改变明显。结论:此种造模方法简单可行,模型稳定,可在国内广泛推广。

[关键词] 脑脊髓炎,自身免疫性,实验性,模型,动物

[中图分类号] R 593.2 [文献标识码] A [文章编号] 0258-879X(2006)10-1089-03

Establishment of experimental autoimmune encephalomyelitis model in C57BL/6 mice

WANG Jirong, ZHANG Ran, WANG Dong, QIU Lei, GUO Mairying, GONG Xuelian, GUO Bao-yu* (Department of Biochemical Pharmacy, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To establish an experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model in C57BL/6 mice, providing a basis for studying the immunopathological mechanism and experimental therapy of multiple sclerosis. **Methods:** Twenty-five C57BL/6 mice were immunized with both 300 μg MOG₃₅₋₅₅ in complete Freund's adjuvant (CFA) and 10⁹/ml Bordetella pertussis vaccine (BPV) to establish EAE model. Mice in adjuvant group (n=8) were treated with CFA, BPV and normal saline; mice in control group (n=7) were treated with normal saline. The pathologic changes of the central nervous system were studied by H-E staining and Luxol Fast Blue (LFB) staining. **Results:** The clinic symptoms of EAE were present in 22 mice in model group since the 11th day post-immunization, with the incidence being 88%. There was no evident EAE symptom in CFA group and control group. Light microscopy showed there were abundant inflammatory cells infiltrated in the cerebral and spinal cord tissues in EAE mice, with evident demyelination in white matter. **Conclusion:** This method is easy to be carried out; the model established by it is stable and worth popularizing.

[KEY WORDS] encephalomyelitis, autoimmune, experimental; models, animal

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(10):1089-1091]

多发性硬化(multiple sclerosis, MS)是一种常见的中枢神经系统自身免疫性脱髓鞘疾病,好发于青壮年,以女性多见,起病突然,初次发病后往往有明显的缓解,但是易复发,表现为缓解-复发的周期性发作过程。多次反复发作或病程进展迅速可导致运动障碍,最终全身瘫痪,严重影响了患者的生活质量。因此研究MS的发病机制及探索有效的治疗方法具有重要意义。

MS的典型病理改变是中枢神经系统炎性浸润及脱髓鞘改变。实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)的临床表现与病理改变与MS极为相似,已成为研究MS的理想动物模型。由于不同的致敏原、动物品系或诱导方法可以诱导产生不同类型或不同程度的EAE^[1],所以制备EAE动物模型的方法多种多

样。目前报道较多的EAE模型动物是Lewis大鼠、SJL/J小鼠、B10.PL小鼠和PL/J小鼠等^[2,3],但国内不易获得这些啮齿类动物,因而在制作EAE动物模型时均不作为首选。C57BL/6小鼠(H-2^b)也是具有EAE-susceptible特性的品系之一,其对髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(myelin oligodendrocyte glycoprotein, MOG)的敏感抗原表位是35~55位氨基酸^[4]。我们参照国内外文献报道的方法,结合本实验室的条件加以改进,以MOG₃₅₋₅₅作为抗原,辅以腹腔注射百日咳疫苗,成功地建立了C57BL/6小鼠的EAE模型。

[作者简介] 王菊蓉,硕士生。E-mail:kathywjr@163.com

*Corresponding author. E-mail:byguo1632000@yahoo.com.cn

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组 雌性 C57BL/6 小鼠 40 只, 7~9 周龄, 体质量 15~19 g, 购自复旦大学医学院动物房, 清洁级 [动物合格证书号: SCXK(沪) 2002-0002]。按照随机对照分组的原则将小鼠分为以下 3 组: EAE 组 25 只, 佐剂组 8 只, 正常对照组 7 只。

1.2 主要试剂 MOG₃₅₋₅₅ (MEV GWYRSPFSRV-VHL YRNGK) 由美联(西安)生物科技有限公司合成, 经质谱及 HPLC 分析, 纯度 > 95%, 完全弗氏佐剂 (CFA, Sigma), 卡介苗 (BCG, 100 mg/ml) 与百日咳疫苗 (BPV, 1×10^{10} 个/ml) 均购自上海生物制品研究所, Luxol fast blue (Chroma), 焦油紫 (Sigma)。

1.3 EAE 的诱导 用 0.01 mol/L 的 PBS 将 MOG₃₅₋₅₅ 稀释成 300 μ g/ml, 然后将稀释液与等量的完全弗氏佐剂 (结核杆菌的终浓度为 4 mg/ml) 混合, 用玻璃注射器抽打至油包水状态, 制成诱导 EAE 的抗原乳剂。佐剂组则以生理盐水代替抗原肽制备免疫乳剂。正常对照组仅注射生理盐水。3 组小鼠分别于背部两侧皮下注射相应抗原 0.2 ml/只, 记免疫当天为第 0 天。于第 0、2 天给予 EAE 组和佐剂组小鼠腹腔注射百日咳疫苗 0.1 ml/只 (含百日咳杆菌 10^9 个)。

1.4 体质量监测及神经功能评分 自免疫当天开始, 每日称体质量, 观察小鼠的摄食情况, 并采用双盲法进行神经功能评分, 评分标准为通用的 0~5 级评分法: 0 级, 不发病; 1 级, 小鼠尾部张力降低或麻痹; 2 级, 小鼠尾部麻痹, 后肢无力; 3 级, 小鼠后肢瘫痪; 4 级, 小鼠四肢瘫痪, 人为翻身不能复位; 5 级, 濒死状态或发病后死亡。

1.5 组织取材与病理学检查 在 EAE 组小鼠发病高峰期, 腹腔注射 2% 的戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 麻醉所有小鼠, 在无菌条件下剖开胸腔, 暴露心脏, 经左心室灌注生理盐水至肝脏变白, 然后改用 4% 多聚甲醛灌注固定, 随后立即取出脑和脊髓浸入 4% 多聚甲醛液中后固定。石蜡包埋后制成 5 μ m 厚的切片, 常规 H-E 染色, LFB 染色, 并在光镜下观察炎性细胞浸润及脱髓鞘改变。

2 结果

2.1 动物发病情况 EAE 组中有 22 只小鼠从免疫后第 11 天开始陆续发病, 约在第 23 天达到发病高峰, 发病率为 88%。发病后 EAE 组小鼠的一般

状况较另外两组差, 表现为食欲下降, 体质量减轻, 皮毛不光滑, 活动量减少。同时, EAE 组小鼠亦相继出现神经系统症状, 表现为尾部无力拖垂, 步履蹒跚, 后肢瘫痪, 行动困难, 进而发展为四肢瘫痪, 最高评分为 4 分。发病高峰过后, EAE 组小鼠的体质量逐渐恢复, 症状有所缓解, 但直至第 50 天仍有部分小鼠遗留有尾部拖垂的症状。佐剂组与正常对照组小鼠均未出现临床神经系统症状, 体质量持续增加。神经功能评分结果见图 1。

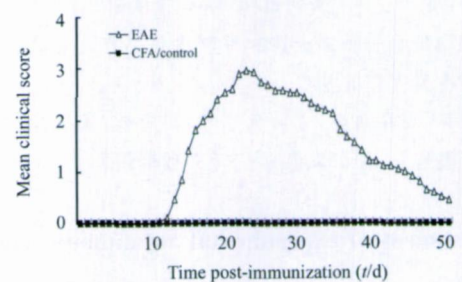


图 1 小鼠神经功能评分

Fig 1 Clinical neural function score of C57BL/6 mice

2.2 病理学检查 H-E 染色显示 EAE 组小鼠的脑和脊髓实质中有大量的炎性细胞浸润 (图 2B), 以淋巴细胞和中性粒细胞为主, 病变主要分布在脑干和脊髓腰膨大的白质区。LFB 染色可见在脊髓白质中有大小不等的片状髓鞘脱失区 (图 2D), 且髓鞘脱失程度与 EAE 小鼠的临床症状的严重程度直接相关。佐剂组和正常对照组小鼠脑和脊髓均未见明显异常改变。

3 讨论

多发性硬化的病因和发病机制尚不明确, 但目前已证实遗传、免疫、病毒和环境等因素共同参与了其发病过程^[5]。大量实验证明, 免疫因素在 MS 的发病过程中发挥了主要作用, 当抗原-MHC 复合物被反应性 T 细胞的特异性受体 (TCR) 识别后, 在 CD28/CD80-CD86 等共刺激分子的协同作用下, Th0 细胞向 Th1 细胞分化, 并由 CD4⁺ Th1 细胞介导针对 CNS 髓鞘蛋白成分细胞免疫反应, 导致炎性脱髓鞘和轴突变性。在此病理过程中, 血脑屏障 (BBB) 的连续性受到破坏的机制是怎样的? 又有哪些因素在 Th1/Th2 平衡的偏移及后续的“瀑布”式的炎症反应中起到了重要作用? 建立合适的动物模型来分析这些问题将为阐明 MS 的发病机制及设计合理有效的治疗方案提供新的思路。

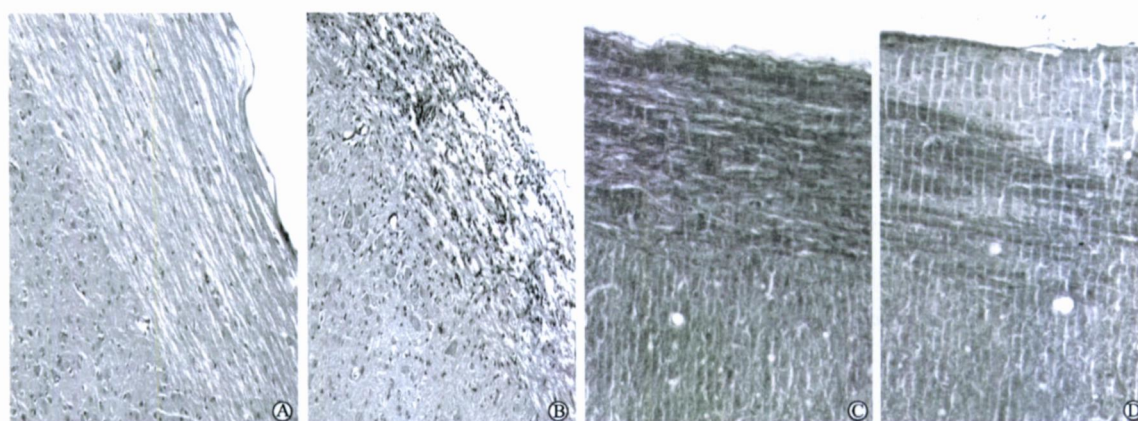


图 2 小鼠脊髓组织的病理检查结果

Fig 2 Pathological analysis of spinal cord tissues of C57BL/6 mice from different groups

A, C: Control group; B, D: EAE group; A, B: H-E staining (×100); C, D: LFB staining (×400)

本研究中选用的实验动物——C57BL/6 纯系小鼠在国内的来源较为广泛,具有遗传背景明确和相关的检测试剂丰富的优点,而 MOG₃₅₋₅₅ 多肽的结构明确,可精确定量,与目前国内普遍采用的 Wistar 大鼠模型相比^[6-8],在此基础上建立的 EAE 模型更适合从分子免疫学的角度探讨 EAE 的发病机制。特别值得注意的是,以野生型的 C57BL/6 小鼠作为对照,观察某些基因突变型小鼠的 EAE 发病情况,对于分析这些基因在疾病进程中的作用和设计成为药靶的可能性具有相当重要的意义。Ford 等^[9]研究发现,CD43 在 MOG₃₅₋₅₅-特异性 T 细胞的分化与迁移中起到了重要作用,从而影响了 EAE 发病的时间与严重程度。有学者^[10,11]详尽地研究了 IL-12 系统对 EAE 病程的影响,认为 IL-12 p35-deficient 小鼠对 EAE 易感。

在本实验中,我们采用卡介苗与百日咳疫苗分别代替强毒人型结合杆菌与百日咳毒素,尽管发病率比国外文献报道略低,但模型鼠发病的潜伏期与严重程度基本相符。总之,本研究建立的 C57BL/6 小鼠 EAE 模型稳定可靠,可作为研究 MS 免疫学发病机制的理想动物模型。

[参考文献]

- [1] 邢清和,王永铭,郑荣远. 影响 EAE 动物模型建立的因素分析[J]. 中国临床神经科学, 2000, 8:305-306.
- [2] Papenfuss TL, Rogers CJ, Genapp I, et al. Sex difference in experimental autoimmune encephalomyelitis in multiple murine strains [J]. J Neuroimmun, 2004, 150:59-69.
- [3] Stern JNH, Ill & Z, Reddy J, et al. Peptide 15-mers of defined sequence that substitute for random amino acid copolymers in amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102:1620-1625.
- [4] Bernard CCA, Johns TG, Slavin A, et al. Myelin oligodendrocyte glycoprotein: a novel candidate autoantigen in multiple sclerosis[J]. J Mol Med, 1997, 75:77-88.
- [5] Teuscher C, Bunn JY, Fillmore PD, et al. Gender, age, and season at immunization uniquely influence the genetic control of susceptibility to histopathological lesions and clinical signs of experimental allergic encephalomyelitis: implications for the genetics of multiple sclerosis[J]. Am J Pathol, 2004, 165:1593-1602.
- [6] 赵亚朴,黄庆军,王沛,等. Wistar 大鼠实验性自身免疫性脑脊髓炎模型的建立[J]. 白求恩医学院学报, 2003, 1:200-201.
- [7] 董梅,刘瑞春,郭力,等. Wistar 大鼠实验性变态反应性脑脊髓炎的模型建立[J]. 脑与神经病学杂志, 2004, 12:425-428.
- [8] 李勇,郑荣远,李剑敏,等. 实验性变态反应性脑脊髓炎大鼠模型的复制[J]. 中国病理生理杂志, 2005, 21:414-416.
- [9] Ford ML, Onami TM, Sperling AI, et al. CD43 modulate severity and onset of experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. J Immunol, 2003, 171:6527-6533.
- [10] Gran B, Zhang G, Yu S, et al. IL-12p35-deficient mice are susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis: evidence for redundancy in the IL-12 system in the induction of central nervous system autoimmune demyelination[J]. J Immunol, 2002, 169:7104-7110.
- [11] Zhang G, Yu S, Gran B, et al. Role of IL-12 receptor beta 1 in regulation of T cell response by APC in experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. J Immunol, 2003, 171:4485-4492.

[收稿日期] 2006-03-16

[修回日期] 2006-09-14

[本文编辑] 尹茶