昆明小鼠实验性自身免疫性脑脊髓炎模型的建立

杨明理[1]，罗素元[1]，胡火珍[2]，郭萍[1]
（1. 遵义医学院细胞生物学与遗传学教研室，贵州遵义 563003；
2. 四川大学生命科学学院细胞生物学教研室，成都 610041）

摘要：用豚鼠脊髓匀浆液和不完全弗氏佐剂制备免疫原，联合腹腔注射百日咳毒素，建立昆明小鼠实验性自身免疫性脑脊髓炎动物模型。发病小鼠临床神经系统症状逐渐加重，脑组织经 HE 染色后，可见血管周围有大量炎性细胞浸润，呈袖套状改变；大脑白质可见胶质细胞增生形成胶质细胞结节以及神经细胞坏死等病理改变。正常小鼠中枢神经系统功能及病理检查均未见异常。此模型为进一步阐明多发性硬化的发病机制打下基础。

关键词：实验性自身免疫性脑脊髓炎；昆明小鼠；多发性硬化；动物模型
中图分类号：Q95-33；R744.5　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1000－7083(2010)06－0994－03

Establishment of an Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Model in KM Mice

YANG Ming-li[1], LUO Su-yuan[1], HU Huo-zhen[2], GUO Ping[1]
(1. Department of Cell Biology and Genetics, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou Province 563003, China;
2. Department of Cell Biology, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: Chinese Kun Ming (KM) mice were immunized with both guinea pig spinal cord homogenate (GPSCH) in complete Freund's adjuvant (CFA) and pertussis toxin (PTx) to establish an experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model. EAE clinical symptoms gradually worsened with the development of this disease. Perivascular cuffs of inflammatory cell infiltration, formation of glial nodules and necrosis of neurons were observed in brain slices of EAE mice, which were stained with HE. By contrast, there were no signs of neural function disorder and parenchymal pathology in mice from the adjuvant group. This EAE model provided in this paper will be helpful to illuminate the pathogenesis of multiple sclerosis (MS).

Key words: experimental autoimmune encephalomyelitis; KM mice; multiple sclerosis; animal model

实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)是一种由 $CD4^+$ T 细胞介导的自身免疫性疾病，其病理表现为中枢神经系统(central nervous system, CNS)血管周围 $CD4^+$ T 细胞和单核细胞浸润，以及轴突原发性脱髓鞘(Dawn *et al.*, 1992)，此病理改变与多发性硬化(multiple sclerosis, MS)异常相似，因此成为研究 MS 的理想动物模型(Ercolini *et al.*, 2006)。不同的诱导方法、动物品系或免疫原可诱导产生不同病程的 EAE 模型，因此有多种方法可以制备此类模型。目前 EAE 模型大多选用 DA 大鼠、Lewis 大鼠、SJL 小鼠等具有特殊遗传背景的实验动物，但这些品系的动物国内不易获得。昆明小鼠(Chinese Kun Ming mice, KM)是我国生产量和使用量最大的小鼠品种，在生物学、药理学等领域使用广泛。为此我们采用豚鼠全脊髓匀浆(guinea pig spinal cord homogenate, GPSCH)为抗原免疫 KM 小鼠，诱导非敏感品系 EAE 动物模型，为进一步研究 MS 的发病机制和治疗方法奠定基础。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　实验动物　7 周龄雌性 KM 小鼠(18～22 g)40 只，豚鼠(350～400 g)5 只，购于第三军医大学实验动物中心，生产许可证号：SCXK(渝)2007-0003，使用许可证号：SYXK(渝)2007-0002。

1.1.2　试剂和材料　百日咳毒素(pertussis toxin, PTx)、不完全弗氏佐剂(incomplete Freund's adjuvant, IFA)购于 Sigma 公司，结核分枝杆菌 H37Ra 购自 Difco 公司。

1.2　方法

1.2.1　免疫原的制备　用 10% 水合氯醛(300 mg/kg)

收稿日期：2009-12-04　**接受日期**：2010-03-22　**基金项目**：遵义医学院硕士启动基金资助(F-280)
作者简介：杨明理，男，讲师，从事神经生物学方向的研究，E-mail：yangmingli_1982@126.com

腹腔注射麻醉豚鼠,迅速取出脊髓,用预冷生理盐水洗去脊髓中的血液,去除硬膜等非脊髓组织,吸干组织表面的液体,称重后混合液氮将其研磨成粉,加入等量预冷生理盐水制成 50%(W/V)GPSCH。将 GPSCH 匀浆液与等量 CFA(结核分枝杆菌 H37Ra 终浓度为 8 mg/mL)混合,用注射器反复抽打至油包水状态,制成抗原乳剂。

1.2.2 EAE 模型的诱导 KM 小鼠随机分为 EAE 组(30 只)和佐剂组(10 只)。EAE 组小鼠在颈背部多点皮下注射抗原乳剂(0.2 mL/只),免疫后 0 h 和 48 h 腹腔注射 PTx 200 ng,并于免疫后第 6 天按上述方法再次免疫;佐剂组以生理盐水替代 GPSCH 制备抗原乳剂,其他操作与 EAE 组完全相同。

1.2.3 临床评分 初次免疫后,每天按照神经功能评分标准(Kono *et al.*, 1988)对小鼠进行 EAE 临床评估,连续 40 天。0 级:无临床症状;1 级:尾部无力;2 级:后肢无力;3 级:后肢瘫痪;4 级:后肢和前肢均瘫痪;5 级:濒死状态或死亡。

1.2.4 病理学检查 在发病高峰期,取 EAE 组和佐剂组小鼠各两只,麻醉后经 PBS 灌注至肝脏发白,再用 4% 多聚甲醛灌注固定,取出脑组织置于 4% 多聚甲醛中固定 24 h。经脱水、透明后,石蜡包埋切片,常规苏木素-伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色,镜检。

2 结果

2.1 动物发病情况

EAE 组中有 17 只小鼠于初次免疫后第 15 天开始陆续发病,第 25 天达到发病高峰,发病率为 56.7%。动物在发病过程中主要表现为食欲下降,体重减轻,皮毛暗淡以及运动迟缓,神经系统症状表现为尾部无力、后肢无力、后肢瘫痪(封 2,图 1),大小便失禁直至四肢完全瘫痪,未见小鼠死亡。临床症状随着时间延长逐渐加重,且不能自行缓解,小鼠病情于评分的最后一周趋于稳定,记录下实验最后一周各小鼠的最高临床评分。佐剂组小鼠临床表现正常,未见发病(表 1)。

表 1 EAE 组和佐剂组小鼠神经功能评分
Table 1 Clinical neural function score of EAE and adjuvant groups

组别	数量(只)	神经功能评分						发病率(%)
		0 级	1 级	2 级	3 级	4 级	5 级	
EAE 组	30	13	3	2	4	6	2	56.7
佐剂组	10	10	0	0	0	0	0	0

2.2 组织病理学检测

发病小鼠大脑组织切片经 HE 染色后,可见大脑髓质血管周围有大量炎性细胞浸润,呈袖套状改变(封 2,图 2A);大脑白质可见胶质细胞增生形成胶质细胞结节(封 2,图 2B);神经细胞坏死,脑组织局部变得疏松(封 2,图 2C)。并且随着 EAE 病情的加重,大脑白质中浸润的炎症细胞逐渐增多,神经细胞脱髓鞘、坏死的范围增大,同时在神经细胞坏死区域形成小胶质细胞结节的数量也相应增多。佐剂组小鼠脑组织病理检查未见异常(封 2,图 2D)。

3 讨论

EAE 因其与 MS 病人的临床及病理表现非常相似而成为研究 MS 公认的动物模型。目前国内外主要采用啮齿类动物建立 EAE 模型,包括豚鼠、家兔、大鼠和小鼠。近年来,随着对小鼠免疫遗传学研究的深入,国际上多采用小鼠建立 EAE 模型(Brocke *et al.*, 1994)。不同品系的小鼠和髓磷脂蛋白抗原的应用,会诱导相应的 EAE 病程来反映人类 MS 进程中的各种症状(Camille *et al.*, 2009)。国外常用 SJL/J、PL/J、Biozzi/ABH 等具有特殊遗传背景的小鼠制备 EAE 模型,但此类实验动物国内不易获得。KM 小鼠是我国于 1944 年从印度 Hoffkine 研究所引进的瑞士种小鼠,也是使用量最大的小鼠品种,广泛应用于药理学、毒理学的研究、生物制品的生产及检定(章根木等,1997)。因此本研究实验对象选用 KM 小鼠,通过不断优化实验方法,以期建立非敏感品系小鼠的 EAE 模型。

对于小鼠来讲,雌性动物比雄性发病率更高,运动功能损伤也更严重,且病程可能有所差异(Voskuhl *et al.*, 1996),因此选用雌性小鼠建模。诱导 EAE 常用的免疫原有脑组织匀浆、脊髓组织匀浆、髓磷脂碱性蛋白(myelin basic protein, MBP)、髓鞘少突胶质糖蛋白(myelin oligodendroglia glycoprotein, MOG)等,其中以豚鼠脊髓匀浆抗原性最强,可能 CNS 组织匀浆含有较多抗原表位,致敏动物后能引起更强烈的自身免疫应答。为此,在本实验中采用 GPSCH 与 CFA 制备抗原乳剂免疫小鼠。此外,CFA 中结核杆菌的浓度很关键,提高结核杆菌浓度可提高 EAE 的发生率及复发率(邢清和等,2000),其常用浓度为 4 mg/mL。为取得较高的发病率,将结核分枝杆菌的浓度提高到 8 mg/mL。有研究指出,小鼠对诱发 EAE 的免疫原不敏感,需要使用 PTx 致敏。PTx 能

增加血管壁的通透性,有利于 T 淋巴细胞穿过血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)进入 CNS(Hofstetter *et al.*, 2002)。为增强 EAE 的发病程度,小鼠两次注射抗原乳剂后均行腹腔注射 PTx 200 ng。

实验结果显示,昆明小鼠发病率为 56.7%,低于其他敏感品系动物,但其病程均表现为慢性非缓解型,与人类 MS 的临床表现较为接近。在实验中还发现个别动物在注射部位出现局部坏死,可能是 CFA 中结核分枝杆菌浓度过高所致。因此,要使此模型成为研究 MS 的理想动物模型,还有待在此基础上进一步改进。

4 参考文献

邢清和, 王永铭, 郑荣远. 2000. 影响 EAE 动物模型建立的因素分析[J]. 中国临床神经科学, 8(4): 305 ~ 306.

章根木, 姚甘火. 1997. 中国昆明小鼠(KM 鼠)遗传背景资料调查[J]. 中国实验动物学杂志, 7(4): 246 ~ 251.

AM Ercolini, SD Miller. 2006. Mechanisms of immunopathology in murine models of central nervous system demyelinating disease[J]. Immunol, 176(6): 3293 ~ 3298.

Brocke S, Gijbels K, Steinman L. 1994. Experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse[A]. In: Cohen IR and Miller A, ed. Autoimmune disease models: A guidebook[M]. San Diego: Academic Press: 1 ~ 14.

Camille J Olechowski, Janet J Truong, Bradley J Kerr. 2009. Neuropathic pain behaviours in a chronic-relapsing model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)[J]. Pain, 141(1-2): 156 ~ 164.

Dawn E Smilek, Anand M Gautam, Cecelia Pearson, *et al.* 1992. EAE: A model for immune intervention with synthetic peptides[J]. Intern Rev Immunol, 9(3): 223 ~ 230.

Hofstetter HH, Shive CL, Forsthuber TG. 2002. Pertussis toxin modulates the immune response to neuroantigens injected in incomplete Freund's adjuvant: induction of Th1 cells and experimental autoimmune encephalomyelitis in the presence of high frequencies of Th2 cells[J]. J Immunol, 169(1): 117 ~ 125.

Kono DH, Urban JL, Horvath SJ, *et al.* 1988. Two minor determinants of myelin basic protein induce experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice[J]. J Exp Med, 168(1): 213 ~ 227.

Voskuhl RR, Pitchekian-Halabi H, MacKenzie-Graham A, *et al.* 1996. Gender differences in autoimmune demyelination in the mouse: implications for multiple sclerosis[J]. Ann Neurol, 39(6): 724 ~ 733.

(上接第 993 页)

张六一,张玲,王振宇,等. 2005. 食蟹猴血液学和生化学指标数据背景资料的建立[J]. 四川生理科学杂志, 27(1): 39 ~ 40.

Chirase NK, Greene LW, Purdy CW, *et al.* 2004. Effect of transport stress on respiratory disease, serum antioxidant status, and serum concentrations of lipid peroxidation biomarkers in beef cattle[J]. Am J Vet Res, 65(6): 860 ~ 864.

Dere E, Ari F. 2009. Effect of Benzene on liver functions in rats (*Rattus norvegicus*)[J]. Environ Monit Assess, 154(1-4): 23 ~ 27.

Fernstrom AL, Sutian W, Royo F, *et al.* 2008. Stress in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) subjected to long-distance transport and simulated transport housing conditions[J]. Stress, 11(6): 467 ~ 476.

Gole MK, Dasgupta S. 2002. Role of plant metabolites in toxic liver injury [J]. Asia Pac J Clin Nutr, 11(1): 48 ~ 50.

Kale VP, Joshi GS, Gohil PB, *et al.* 2009. Effect of fasting duration on clinical pathology results in Wistar rats[J]. Vet Clin Pathol, 38(3): 361 ~ 366.

Kavukcu S, Soylu A, Turkmen M, *et al.* 2003. Unilateral ureteroperitoneostomy in the management of hypoproteinemia in nephrotic rats with normal renal function[J]. Tohoku J Exp Med, 201(2): 67 ~ 73.

Kim CY, Han SC, Heo JD, *et al.* 2004. Effects of transportation on hematological and serum biochemical values in cynomolgus monkeys[J]. The Korean Journal of Laboratory Animal Science, 20(4): 328 ~ 332.

Kim CY, Han JS, Suzuki T, *et al.* 2005. Indirect indicator of transport stress in hematological values in newly acquired cynomolgus monkeys [J]. Journal of Medical Primatology, 34: 188 ~ 192.

Kottová M, Pourová J, Voprsalová M. 2007. Oxidative stress and its role in respiratory diseases[J]. Ceska Slov Farm, 56(5): 215 ~ 219.

Lopez-Olvera JR, Marco I, Montane J, *et al.* 2006. Transport stress in Southern chamois (*Rupicapra pyrenaica*) and its modulation by acepromazine[J]. Vet J, 172(2): 347 ~ 355.

Nazifi S, Saeb M, Baghshani H, *et al.* 2009. Influence of road transportation during hot summer conditions on oxidative status biomarkers in Iranian dromedary camels (*Camelus dromedarius*)[J]. African Journal of Biochemistry Research, 3(7): 282 ~ 287.

Nishida M, Fujimoto S, Toiyama K, *et al.* 2004. Effect of hematopoietic cytokines on renal function in cisplatin-induced ARF in mice[J]. Biochem Biophys Res Commun, 324(1): 341 ~ 347.

Popovic M, Janicijevic-Hudomal S, Kaurinovic B, *et al.* 2008. Effects of various drugs on alcohol-induced oxidative stress in the liver[J]. Molecules, 13(9): 2249 ~ 2259.

Satyanarayana PS, Chopra K. 2002. Oxidative stress-mediated renal dysfunction by cyclosporine A in rats: attenuation by trimetazidine[J]. Ren Fail, 24: 259 ~ 274.

Thomson A, Hemphill D, Jeejeebhoy KN. 1998. Oxidative stress and antioxidants in intestinal disease[J]. Dig Dis, 16(3): 152 ~ 158.

Zafir A, Banu N. 2009. Modulation of *in vivo* oxidative status by exogenous corticosterone and restraint stress in rats[J]. Stress, 12(2): 167 ~ 177.