

C57BL/6J 小鼠实验性自身免疫性脑脊髓炎模型建立的关键性问题

吴彦青¹ 郭玉红^{1,2,3} 刘清泉^{1,2,3}

(1 首都医科大学附属北京中医医院,北京,100010; 2 北京中医医院顺义医院,北京,101300;

3 中医感染性疾病基础研究北京市重点实验室,北京,100010)

摘要 实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)模型是国际公认的多发性硬化(MS)的经典动物模型,被广泛用于MS发病机制和评价免疫调节药物的实验研究。实验操作中仍有较多缺陷导致发病率不能达到100%和死亡率偏高,需要对造模的关键技术不断完善。加强该模型免疫前准备工作、免疫操作和免疫后护理3个方面的研究,分析EAE模型成功建立的关键性问题,并根据实验操作过程提出解决办法,完善EAE模型的规范化造模流程,可以使EAE模型具备发病率高、死亡率低、模型稳定的特点。

关键词 实验性免疫性脑脊髓炎模型;关键性问题;免疫前处理;免疫操作;免疫后护理

Key issues on establishment of the experimental autoimmune encephalomyelitis model in C57BL/6J mice

Wu Yanqing¹, Guo Yuhong^{1,2,3}, Liu Qingquan^{1,2,3}

(1 Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, affiliated with Capital Medical University, Beijing 100010, China; 2 Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine shunyi branch, Beijing 101300, China; 3 Beijing Key Laboratory of basic research with Traditional Chinese Medicine on infectious diseases, Beijing 100010, China)

Abstract Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model is an internationally recognized classic animal model of multiple sclerosis (MS) and is widely used in researches on the pathogenesis of MS and the evaluation of immunomodulator for MS. However, There are still many defects leading to morbidity less than 100% and high mortality. Therefore, in order to reach a high morbidity, a low mortality and a stable EAE model, the process of EAE model establishment was standardized and refined by improving the preparation, operation and nursing of the model immunization. In addition, the key issues to the successful establishment were analyzed and the solutions were provided according to the process of experiment operation.

Key Words Experimental autoimmune encephalomyelitis; Key issues; Preparation before immunization; Operation in immunization; Nursing after immunization

中图分类号:R228 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2017.04.006

实验性自身免疫性脑脊髓炎(Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, EAE)是由自身抗原特异性T细胞进行介导的自身免疫性疾病,在病理特征以及临床表征上与多发性硬化(Multiple Sclerosis, MS)非常相似,是当前国际公认的、被广泛运用来评价防治MS的免疫调节药物和探讨MS的发病机制进行动物实验研究的经典MS实验动物模型^[1-4]。C57BL/6J纯系小鼠具有遗传背景明确的品系特点,髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(MOG₃₅₋₅₅)诱导免疫的C57BL/6J小鼠EAE模型主要表现为复发-缓解型病程,适合从分子免疫学的角度探讨发病机制^[5],日渐

成为MS临床前研究、复杂新药开发的重要研究手段。但是,该模型实验操作中仍有较多缺陷导致发病率不能达到100%、临床表现和病程重复性差、死亡率偏高。因此,MOG₃₅₋₅₅诱导C57BL/6J小鼠造模过程中的诸多细微的关键技术无疑应该成为值得关注的问题。

1 免疫前准备工作

1.1 实验动物的确定与饲养 不同品种或品系的实验动物诱导EAE的易感性与临床特点迥异,可能由主要组织相容性复合体基因的多样性表达引起^[6];EAE的敏感性和临床过程的特点与实验动物

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:81403221)

作者简介:吴彦青(1980.02—),男,医学博士,博士后,副主任医师,研究方向:中医药防治危急重症的临床与基础研究,E-mail:wyqbs120@163.com

通信作者:刘清泉(1965.11—),男,大学本科,主任医师/教授,首都医科大学附属北京中医医院院长,研究方向:中西医结合诊治危重病,E-mail:liuqingquan2003@126.com

的动物品种、年龄、性别具有相关性^[7]。而小鼠在病理学方面的特点与人类非常相似^[8],无论是慢性进展型病程还是复发-缓解型病程上的模型在病理上均可见脱髓鞘特征。C57BL/6J 小鼠一直被认定为“标准”的近交系,可以为多种突变基因提供遗传背景,是生理学方面、免疫学方面、遗传学方面、肿瘤学方面在实验研究中的常用品系。MOG₃₅₋₅₅ 诱导 C57BL/6J 小鼠建立 EAE 模型实验过程中,宜选用 8~10 周龄雌性 C57BL/6J 小鼠,体质量 18 g 左右^[9-10]。免疫操作前小鼠进行适应性饲养 1 周左右,饲养环境维持明-暗每次各 12 h 交替循环,笼中每天给予充足的饲料和洁净饮水^[3]。

1.2 抗原乳剂的配制 完全弗氏佐剂 (Complete Freun's Adjuvant, CFA) 是实验中最常用的免疫佐剂,无论是皮内还是皮下注射 CFA 均可提高细胞免疫反应的强度来激发多种自身免疫性疾病。大多数 EAE 模型在诱导方案中会采用 CFA 降低机体对抗原的破坏以延迟机体对抗原的免疫耐受,同时促进抗原的弥散,从而使抗原对机体缓慢持续的发挥免疫原性^[11]。相对于易感大鼠,小鼠对诱导 EAE 相对抵抗,主要体现在发病率以及发病时间的差异,因此需要佐剂辅助。此外,CFA 可增加 EAE 模型血脑屏障 (Blood Brain Barrier, BBB) 的通透性和中枢神经系统血管周围血清蛋白渗出^[12]。结核分枝杆菌在 EAE 模型的诱导中主要通过激发 T 细胞介导的免疫反应来扩大免疫效应并引起淋巴结增生^[13]。

乳化于完全弗氏佐剂的中枢神经系统不同特异性抗原在不同实验动物上诱导多种 EAE,常见的抗原包括髓磷脂碱性蛋白 (MBP)、蛋白脂质蛋白质 (PLP)、髓鞘相关糖蛋白 (MAG) 和 MOG, C57BL/6J 小鼠是具有 EAE-susceptible 特性的品系之一,其对 MOG 的敏感抗原表位是 35-55 位氨基酸^[14],其致敏的主要抗原是 MOG₃₅₋₅₅ 多肽 (MEVGWYRSPFSRV-VHLYNGK)。

MOG₃₅₋₅₅ 抗原油包水乳剂的配制首先将 MOG₃₅₋₅₅ 多肽 15 mg 加入生理盐水 7.5 mL 混匀为 A 液 (每 100 μ L 液体含 MOG₃₅₋₅₅ 200 μ g),将结核杆菌粉末 30 mg 加入完全弗氏佐剂 (TB 1 mg/mL) 7.5 mL 中混为 B 液 (每 100 μ L 含结核杆菌 500 μ g),采用玻璃注射器吸取 A 液和 B 液后反复用力抽打 2 个小时以上充分乳化至将抗原油包水乳剂滴可以在清洁水面聚集而不分散并保持小球状。见图 1。

1.3 百日咳毒素溶液的配制 早期的研究显示,当用小鼠脊髓匀浆组织溶于完全弗氏佐剂中来诱导

EAE 模型时,百日咳毒素可以增加模型的成功率和加重神经功能损伤症状^[15]。后来的研究显示百日咳毒素能破坏血脑屏障,防止自身反应 T 细胞抗原产生,刺激抗原呈递细胞 (APCs),不可逆地抑制第二信使和影响信号通路^[16],所有的这些结果都在解释百日咳毒素帮助诱导 EAE 模型的可能机制。将百日咳毒素采用生理盐水稀释成 0.1 mL 含 400 ng 百日咳毒素的溶液。

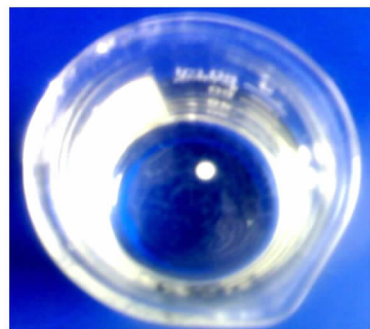


图 1 抗原乳剂配制成功的标准

2 免疫操作

2.1 C57BL/6J 小鼠麻醉 麻醉是保障动物福利的重要内容之一,也是动物实验的一项重要基本技术^[17-18]。实验动物麻醉是保证实验成功的一个重要环节,采用安全、有效、适宜的麻醉方法以达到良好的麻醉效果是保证实验安全性、数据可靠性的重要基础。影响动物麻醉效果的因素主要包括麻醉剂的种类、浓度、剂量和给药方式。一项针对乌拉坦、阿佛丁和水合氯醛对 C57BL/6J 小鼠的麻醉研究证明^[19],使用乌拉坦则麻醉效果差、死亡率高,以合适剂量注射阿佛丁或水合氯醛 (4% 水合氯醛以 0.20 mL/20 g) 对 C57BL/6J 小鼠的麻醉时可以达到起效时间短、维持时间适中、死亡率低的效果。水合氯醛是在动物实验中具有良好效果和安全性保证的一种麻醉药^[4],具有性价比高、麻醉诱导快、术后苏醒快、死亡率低等优点^[20]。一项水合氯醛对 C57BL/6J 小鼠麻醉研究表明,选择水合氯醛 (2.5% 水合氯醛以 0.10 mL/10 g) 腹腔注射麻醉 C57BL/6J 小鼠就可以诱导浅麻状态^[21]。MOG₃₅₋₅₅ 诱导 C57BL/6J 小鼠皮下注射抗原油包水乳剂过程中诱导至浅麻状态即可,因此,建议使用 2.5% 水合氯醛以 0.10 mL/10 g 腹腔注射进行麻醉。

2.2 皮下注射部位 建立 EAE 模型抗原油包水乳剂给予部位主要有后肢足掌、尾部和侧腹皮下,其临床病程、高峰期、最高临床得分各不相同。C57BL/6J 小鼠抗原给予部位均以侧腹皮下为主,其中蛋白脂质蛋白 (PLP) + CFA + 百日咳毒素 (PT) 制成的抗原诱

导慢性病程,高峰期为 23 ~ 25 d;以髓脂质碱性蛋白 (MBP)联合 PLP + CFA + PT 制成的抗原诱导也为慢性病程,高峰期为 10 ~ 20 d;以 MOG 的抗原诱导为复发-缓解病程,高峰期为 14 ~ 20 d^[22-23]。由于抗原乳剂能够诱导强烈的炎症反应,甚至导致局部皮肤的肉芽肿和坏死,MOG₃₅₋₅₅ 诱导 C57BL/6J 小鼠注射抗原油包水乳剂建议在鼠侧腹皮下分四点皮下注射共计 0.2 mL MOG₃₅₋₅₅ 抗原乳剂。注射完抗原乳剂 30 min 后每只小鼠腹腔内注射 0.1 mL (400 ng) 百日咳毒素溶液,48 h 后每只小鼠再次腹腔内注射 1 次 0.1 mL (400 ng) 溶液。

3 免疫后护理

动物的福利考虑周全,其中对动物的优质护理能够很大程度上减少应激因素在动物实验中对实验结果准确性、可靠性的干扰^[5]。其中动物麻醉中采取适当的水浴恒温垫保温措施,可以显著缩短麻醉周期和麻醉后恢复自主期的时间,减轻寒颤发生,增加动物舒适度,对辅助实验动物安全顺利苏醒有着重要的作用^[24]。

免疫后小鼠由于强烈的炎症反应产生众多的免疫调节功能,小鼠出现激惹状态,建议减少单笼小鼠数量,并给予足量食物和水,否则弱小小鼠会被吃掉。免疫后 3 d 体质量缓慢下降,并伴有精神萎靡、皮毛不光滑、活动减少等特征,但是无运动功能障碍,随后体质量有所恢复。免疫第 11 天左右,伴随着出现体质量明显下降,小鼠逐渐依次出现尾部远端无力、尾麻痹、跛行、弓背、肢体瘫痪、濒死貌等症状,此时部分小鼠可以自行进食、饮水,多数小鼠进食、饮水比较困难,必须注意单笼饲养、食料及饮水嘴边放置、保温等精心呵护,必要时进行人工灌胃 4 次/d 以防止其营养缺乏、脱水及水电解质紊乱等引起死亡,造模后死亡几乎全由免疫后护理不周全引起。

4 结语

综上所述,EAE 模型模拟人类 MS 或与人类 MS 极为相似的发病现象旨在有助于人们深入研究 MS 并探索合适的治疗方法。MOG₃₅₋₅₅ 诱导 C57BL/6J 小鼠 EAE 模型在病理学特点上与人类 MS 相似,在复缓解型病程上可见脱髓鞘特征,组建 MOG₃₅₋₅₅ 诱导 C57BL/6J 小鼠 EAE 模型的规范化流程弥补实验操作中的导致发病率不能达到 100% 和死亡率偏高的缺陷是进行 MS 研究和治疗的根基,其他研究工作都要围绕在均一性动物模型成功建立的基础上展开。因此,加强免疫前准备工作、免疫操作和免疫后

护理 3 个方面的研究,分析 EAE 模型成功建立的关键性问题,对于其后一系列研究的成功有着重要意义。

参考文献

- [1] Constantinescu CS, Farooqi N, O'Brien K, et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS) [J]. *Br J Pharmacol*, 2011, 164 (4): 1079-1106.
- [2] 童巧文, 朱英标, 姚苏琴, 等. 不同神经功能评分标准在小鼠 EAE 模型评价中的比较 [J]. *温州医学院学报*, 2009, 39 (3): 223-226.
- [3] Lassmann H, Bradl M. Multiple sclerosis: experimental models and reality [J]. *Acta Neuropathol*, 2017, 133 (2): 223-244.
- [4] Patel J, Balabanov R. Molecular mechanisms of oligodendrocyte injury in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13 (8): 10647-10659.
- [5] 王菊蓉, 张冉, 王栋, 等. C57BL/6 小鼠实验性自身免疫性脑脊髓炎模型的建立 [J]. *第二军医大学学报*, 2006, 27 (10): 1089-1091.
- [6] 关东升, 高颖, 朱陵群. C57BL/6J 小鼠实验性自身免疫性脑脊髓炎模型的建立及其病理特征 [J]. *中国实验动物学报*, 2008, 16 (6): 406-409.
- [7] Sakuma H, Kohyama K, Park IK, et al. Clinicopathological study of a myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced demyelinating disease in LEW. 1AV1 rats [J]. *Brain*, 2004, 127 (10): 2201-2213.
- [8] Abramowski P, Steinbach K, Zander AR, et al. Immunomodulatory effects of the ether phospholipid edelfosine in experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *J Neuroimmunol*, 2014, 274 (1/2): 111-124.
- [9] 黄夏冰, 康巧珍, 王晓东, 等. 实验性自身免疫性脑脊髓炎 (EAE) C57BL/6J 小鼠模型构建 [J]. *河南医学研究*, 2015, 24 (8): 8-10.
- [10] 颜津津, 黄国祥, 肖波, 等. 一种慢性 EAE 模型的制备方法 [J]. *中南大学学报: 医学版*, 2008, 33 (8): 663-668.
- [11] PATERSON PY. Transfer of allergic encephalomyelitis in rats by means of lymph node cells [J]. *J Exp Med*, 1960, 111: 119-136.
- [12] Laman JD, van Meurs M, Schellekens MM, et al. Expression of accessory molecules and cytokines in acute EAE in marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*) [J]. *J Neuroimmunol*, 1998, 86 (1): 30-45.
- [13] Levine S, Sowinski R, Gruenewald R, et al. Experimental allergic encephalomyelitis. Production by myelin basic protein adsorbed on particulate adjuvants [J]. *Immunology*, 1972, 23 (4): 609-614.
- [14] Bernard CC, Johns TG, Slavin A, et al. Myelin oligodendrocyte glycoprotein: a novel candidate autoantigen in multiple sclerosis [J]. *J Mol Med (Berl)*, 1997, 75 (2): 77-88.
- [15] Kamradt T, Soloway PD, Perkins DL, et al. Pertussis toxin prevents the induction of peripheral T cell anergy and enhances the T cell response to an encephalitogenic peptide of myelin basic protein [J]. *J Immunol*, 1991, 147 (10): 3296-3302.
- [16] Shive CL, Hofstetter H, Arredondo L, et al. The enhanced antigen-specific production of cytokines induced by pertussis toxin is due to clonal expansion of T cells and not to altered effector functions of long-term memory cells [J]. *Eur J Immunol*, 2000, 30 (8): 2422-2431.

- [23] 朱炜, 张妮, 王爱华. 血浆瓜氨酸在胃肠损伤中的研究进展[J]. 中国急救医学, 2014, 34(10): 949-952.
- [24] 肖飞, 郭振辉, 严启滔. 瓜氨酸在脓毒症中的代谢变化及应用[J]. 中华危重病急救医学, 2015, 27(6): 534-537.
- [25] 肖霞. 脓毒症患者血中氨基酸谱的变化[D]. 大连: 大连医科大学, 2015.
- [26] 刘德红, 徐志伟, 孟新科, 等. 脓毒症患者血浆瓜氨酸水平与胃肠功能障碍及 SOFA 评分相关性研究[J]. 中国医药指南, 2015, 13(10): 1-2.
- [27] Nielsen C, Erlandsen E J, Lindholt J S, et al. D-lactate is a valid biomarker of intestinal ischemia induced by abdominal compartment syndrome. [J]. Journal of Surgical Research, 2014, 194(2): 400-404.
- [28] 李娟, 姜辉, 张艳, 等. 老年危重症患者血浆 D-乳酸及内毒素的检测及临床意义[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2014, 23(6): 715-717.
- [29] 张纪兰. 胰岛素早期强化治疗对脓毒症患者血清内毒素、二胺氧化酶和 D-乳酸指标的影响及疗效观察[J]. 中国微生态学杂志, 2016, 28(3): 294-296.
- [30] Shi H, Wu B, Wan J, et al. The role of serum intestinal fatty acid binding protein levels and D-lactate levels in the diagnosis of acute intestinal ischemia [J]. Gastroentérologie Clinique Et Biologique, 2015, 39(3): 373-378.
- [31] 傅益永, 韦红. 肠型脂肪酸结合蛋白在早期诊断小儿肠缺血性疾病中的研究进展[J]. 实用儿科临床杂志, 2011, 26(19): 1531-1533.
- [32] Derikx J P, Poeze M, van Bijnen A A, et al. Evidence for intestinal and liver epithelial cell injury in the early phase of sepsis. [J]. Shock, 2007, 28(5): 544-548.
- [33] 冯文涛, 蔡文君, 沙圆圆, 等. 脓毒症胃肠道功能紊乱的中西医结合概况[J]. 中国中医急症, 2015, 24(9): 1583-1586.

(2017-03-17 收稿 责任编辑: 洪志强)

(上接第 740 页)

- [17] 杨伟敏, 姜莹, 旺静, 等. 四种麻醉药物对小鼠自主意识恢复时间影响的观察[J]. 实验动物与比较医学, 2009, 29(2): 130-131, 134.
- [18] 覃筱燕, 杨林, 张淑萍, 等. 常用麻醉药物麻醉效果的比较[J]. 中央民族大学学报: 自然科学版, 2005, 14(3): 264-268.
- [19] 詹红微, 邱泽文, 李慧玲, 等. 三种麻醉药物对小鼠麻醉效果的比较[J]. 实验动物科学, 2012, 29(4): 19-24.
- [20] 周洁, 李旸, 张稳燕. 水合氯醛和戊巴比妥钠对 KM 小鼠麻醉效果实验研究[J]. 医学信息(上旬刊), 2010, 23(10): 3795-3796.
- [21] 吴伟芳, 林剑鸣, 张南文. 水合氯醛在 C57BL/6 小鼠麻醉中的应用研究[J]. 海峡药学, 2013, 25(9): 43-44.
- [22] Liu Z, Xu Y, Zhang X, et al. The motorized RhoGAP myosin IXb (Myo9b) in leukocytes regulates experimental autoimmune encephalomyelitis induction and recovery [J]. J Neuroimmunol, 2015, 282: 25-32.
- [23] Sakuma H, Kohyama K, Park IK, et al. Clinicopathological study of a myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced demyelinating disease in LEW. 1AV1 rats [J]. Brain, 2004, 127(Pt 10): 2201-2213.
- [24] 严国锋, 张健, 周勇, 等. 保温措施对小鼠麻醉效果的影响[J]. 实验动物与比较医学, 2008, 28(5): 341-342.

(2017-03-17 收稿 责任编辑: 王明)