

一种慢性 EAE 模型的制备方法

颜津津, 黄国祥, 肖波, 杨欢, 吴志国, 周文斌

(中南大学湘雅医院神经内科, 长沙 410008)

[摘要] 目的:通过探讨一种慢性实验变态反应性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)模型的制备方法,为研究多发性硬化的发病机制打下基础。方法:72只近交系清洁级8~10周健康雌性C57BL/6J小鼠,随机分为发病组、佐剂组和空白对照组,各组小鼠又分为发病初期、发病高峰期和慢性期组。发病组用mMOG₃₅₋₅₅免疫C57BL/6J小鼠制成慢性EAE动物模型。结果:本实验终止时,发病组C57BL/6J小鼠累计有20/24(83.3%)的小鼠发病,累计有1/24(8.3%)的小鼠死亡,最高临床症状评分达5级,即全身皆瘫后死亡。发病组小鼠第1次免疫后13d内均未发病,14~20d发病,20~24d达高峰,28~32d进入慢性期,部分临床症状可缓解;空白对照组和佐剂组均没有发病。发病小鼠病理学检测有特征性表现。结论:本实验采用人工合成mMOG₃₅₋₅₅与自制完全弗氏佐剂混合而成抗原乳剂,成功建立了慢性EAE小鼠模型。本实验所复制的慢性EAE模型具有发病率高、死亡率低、模型稳定的特点,可用于研究多发性硬化。

[关键词] 多发性硬化; 实验性自身免疫性脑脊髓炎; 动物模型

[中图分类号] R512.39 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-7347(2008)08-0663-06

A preparative method of chronic experiment autoimmune encephalomyelitis

YAN Jin-jin, HUANG Guo-xiang, XIAO Bo, YANG Huan, WU Zhi-guo, ZHOU Wen-bin

(Department of Neurology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract: **Objective** To explore the model of chronic experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) for the further study of multiple sclerosis. **Methods** A total of 72 female SPF C57BL/6J mice (inbred strain, aged 8~10 weeks), were randomly divided into an EAE group, a blank group and an adjuvant group, and each group was divided into 3 subgroups: an onset group, a peak group and a chronic phase group. The EAE group was immunized with mMOG₃₅₋₅₅. **Results** At the end of the study, and 83.3% of the mice in EAE group suffered the onset, and 8.3% of the mice died. The highest clinical score reached grade 5, namely paralysis of the whole body and then death. In the EAE group, after being immunized firstly, the mice were all anosis during the first 13 days. They got ill on the third week, and in about 20~24 days the clinical symptom reached the peak, and in 28~32 days the chronic phase arrived, when parts of the clinical symptoms got relieved. On the contrary, both the adjuvant group and the blank group were healthy all the time. Characteristic appearance was detected in the EAE group. **Conclusion** Antigen emulsion, mixture of artificially synthesized mMOG₃₅₋₅₅ and complete Freund's adjuvant can successfully induce chronic EAE in the mice. The model of EAE duplicated in our study has the characteristics of high incidence, low

收稿日期 (Date of reception) 2008-02-15

作者简介 (Biography) 颜津津(1977-),女,湖南常德人,硕士,主要从事多发性硬化的研究。现工作于湖南省长沙市旺旺医院。

通讯作者 (Corresponding author) 周文斌, E-mail: wenston@vip.sina.com

基金项目 (Foundation item) 湖南省科技厅资助项目(2007SK3032)。 The work was supported by Department of Science and Technology of Hunan Province, P. R. China (2007SK3032).

death rate and stability, which can be used to carry out further research on multiple sclerosis.

Key words: multiple sclerosis; experimental autoimmune encephalomyelitis; animal model
[*J Cent South Univ (Med Sci)*, 2008, 33(8):0663-06]

多发性硬化(multiple sclerosis, MS)是一种主要由 CD4⁺T 细胞介导的中枢神经系统(CNS)炎性脱髓鞘性疾病。病理特点主要表现为 CNS 白质脱髓鞘及其小血管周围炎性细胞浸润,而轴索相对保持完好^[1]。其发病率高,呈慢性病程,倾向于青壮年。实验变态反应性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE),尤其是慢性 EAE 与 MS 在临床表现和病理上更为接近,因此被作为研究 MS 的发病机制和治疗策略的理想动物模型。EAE 模型可通过注射 CNS 髓鞘、特定的髓鞘蛋白或其选择肽段加完全弗氏佐剂主动诱导;或转移已致敏的 CD4⁺T 细胞进行过继免疫诱导。

大多数动物诱导的模型呈单程病程,但如果选择不同的抗原和免疫方法及动物品种和品系,也可诱导出慢性不复发、复发-缓解型和继发进展型 EAE。髓鞘成分主要为髓鞘碱性蛋白(MBP)、髓鞘脂蛋白(PLP)、髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(MOG)和髓鞘相关糖蛋白(MAG),其中 MBP 和 PLP 是髓鞘中抗原性最强的蛋白质,两者占髓鞘总蛋白的 80%,其致敏可造成经典的急性 EAE 模型;MOG 尽管含量极少,约占髓鞘总蛋白的 0.05%,但具有较强的致脑炎作用^[2-7]。同时,在髓鞘蛋白中只有某些序列具有抗原性,如 MOG 的第 35~55 氨基酸序列抗原性强,常用来免疫易感小鼠 C57BL/6J 制成 EAE 模型。mMOG₃₅₋₅₅ 免疫的 C57BL/6J 小鼠在病程上表现为急性发作、不缓解的慢性过程,病理表现为局灶性脱髓鞘反应和炎性细胞浸润,在 MS 的临床表现和病理上较急性模型更为接近^[8]。本课题参照 Mendel I 造模方法并加以改进^[8],用人工合成 mMOG₃₅₋₅₅ 免疫 C57BL/6J 小鼠(H-2b)建立主动免疫性的慢性-非缓解的 EAE 模型,旨在为以后研究 MS 的发病机制和治疗研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 MOG₃₅₋₅₅ 多肽 MEVGWYRSPFS-RVVHLYRNGK(西安美联多肽合成有限公司合成,纯度 >97%), -80 °C 保存备用;百日咳毒素(LIST Biological Laboratories, Campbell, CA); IFA

(美国 Sigma 公司);卡介苗(50 mg/支)(上海生物制品研究所)。

1.2 实验动物 72 只近交系清洁级 8~10 周健康雌性 C57BL/6J 小鼠,体质量 18~22 g,由中南大学实验动物中心代购。

1.3 实验流程 应用随机数字表,将 72 只 8~10 周 C57BL/6J 小鼠分为发病组(A 组)、佐剂组(B 组)、空白对照组(C 组)。普通光镜下观察病理组织形态。A 组($n=32$)分为 4 个亚组,分别为发病前组(A1)、发病初期组(A2)、发病高峰期组(A3)和慢性期组(A4)(A1~4 亚组, $n=8$)。于实验第 0 天、第 7 天以 MOG₃₅₋₅₅ 抗原乳剂免疫动物。分别在以上 4 个时间点断头处死动物行病理检查。随机分出 20 只小鼠作为 B 组,以 PBS 代替 MOG₃₅₋₅₅ 免疫动物,同 A 组时间点分为 4 个亚组(B1~4 亚组, $n=5$)处死动物并行病理检查。随机分出 20 只小鼠作为 C 组,不予免疫及干预措施。

慢性 EAE 模型的制作,将卡介苗加入不完全弗氏佐剂,配成完全弗氏佐剂,卡介苗浓度 10 g/L。完全弗氏佐剂呈油状,再与 PBS 溶解的抗原充分混合成乳剂,免疫当天记为第 0 天,以抗原乳剂 200 μ L(由 3 g/L MOG₃₅₋₅₅, 100 μ L CFA 和 PBS 组成);第 7 天以同样剂量的抗原乳剂皮下注射。免疫当天和 48 h 后经腹腔注射百日咳毒素每只小鼠 0.4 mg/L。免疫均在充分固定下进行。B 组用同剂量的 PBS 代替 MOG,其他注射同 A 组,包括 CFA 及百日咳毒素。C 组不予免疫及干预措施。

1.4 模型评价 从初次免疫第 0 天起至第 32 天实验终止前,采用盲法,每天 2 人至少 1 次在同一时间按 Benson 评分标准^[9],对 EAE 严重性进行临床评估,评分 2 分以上者(包括 2 分)进行发病率的计算。1 级:尾部无力或蹒跚步态伴尾部有力;2 级:蹒跚步态伴尾部无力(共济失调);2.5 级:共济失调伴部分单肢麻痹;3 级:单肢完全麻痹;3.5 级:单肢完全麻痹伴另一肢体部分麻痹;4 级:双肢完全麻痹;4.5 级:四肢麻痹;5 级:死亡。

1.5 标本的制备 动物断头处死后,立即在无菌条件下取出脑;一次性 20 mL 无菌注射器装

有 RNase-free 的灭菌生理盐水冲出完整的脊髓。部分标本作 RT-PCR, 部分标本置于 4% 多聚甲醛中固定 12 ~ 24 h, 然后流水冲洗约 1 h, 制成石蜡块, 放置 4 °C 冰箱保存备用。具体步骤如下: (1) 脱水。70% 乙醇 5 h, 80% 乙醇 2 h, 95% 乙醇 (I) 2 h, 95% 乙醇 (II) 2 h, 100% 乙醇 (I) 2 h, 100% 乙醇 (II) 1 h。 (2) 透明。酒精二甲苯混合液 (1:1) 10 min, 二甲苯 (I) 15 min, 二甲苯 (II) 15 min。 (3) 浸蜡。石蜡 I (52 °C ~ 54 °C) 10 min, 石蜡 II (56 °C ~ 58 °C) 15 min, 石蜡 III (60 °C ~ 62 °C) 1 min。 (4) 包埋。石蜡 (60 °C ~ 62 °C) 包埋。将断头无菌取出的脑和脊髓制成石蜡块切片, 4 μm 切片行 HE 染色, 8 ~ 10 μm 行 Weil 氏髓鞘染色, 光镜下观察。

2 结果

2.1 实验小鼠的行为及形态学变化 A 组中 C57BL/6J EAE 小鼠发病前毛色发暗, 活动减少, 反应迟钝, 食欲较差; 发病时, 首发症状多为尾部远端无力下垂, 体重明显减轻, 临床评分随着时间延长加重, 临床症状有多种表现, 例如尾部完全松弛无力, 蹒跚步态, 双后肢爬行困难, 不能站立; 发病小鼠的临床症状无缓解, 但部分小鼠症状稍减轻, 活动量较前略增加, 反应仍较迟钝, 体重没有进一步下降。B 组和 C 组食欲好, 形态活泼, 反应灵敏, 尾部有张力。

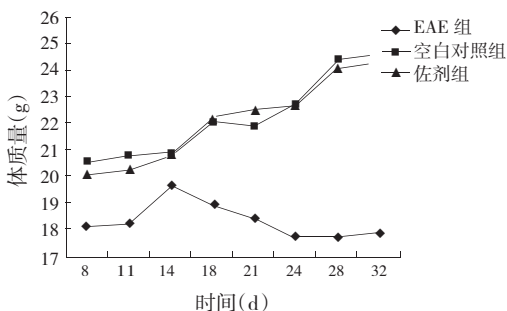


图 1 实验小鼠体质量的变化。

Fig. 1 Body weight's variances of experimental mice.

2.2 实验小鼠的发病率、体质量及临床评分变化 本实验终止时, A2 ~ 4 组 C57BL/6J 小鼠累计有 20/24 (83.3%) 的小鼠发病, 累计有 1/24 小鼠 (8.3%) 死亡, 最高临床症状评分达 5 级, 即全身皆瘫后死亡。A2 ~ 4 组在第 1 次免疫后 13 d 内均未发病, 14 ~ 20 d 发病, 20 ~ 24 d

达高峰, 28 ~ 32 d 进入慢性期, 部分临床症状可缓解; B 组和 C 组小鼠均没有发病, 体质量没有下降并呈增加趋势。在人为处死之前, A4 组小鼠因疾病严重而自然死亡 1 只, 其余组未出现自然死亡。发病期体质量下降明显 (图 1), 且 A1 ~ 4 组平均临床评分分别为 (0 ± 0), (2.3 ± 0.5), (3.9 ± 0.4) 和 (3.5 ± 0.4) 分 (图 2)。

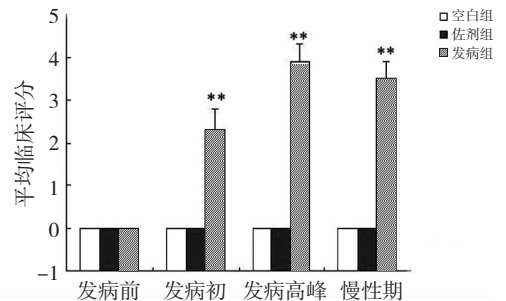


图 2 实验小鼠的临床评分。与其余两组比较, ** $P < 0.01$ 。

Fig. 2 Clinical score of experimental mice. Compared with the other 2 groups, ** $P < 0.01$.

2.3 实验小鼠病理观察 B 组和 C 组小鼠的脑和脊髓中 HE 染色和 Weil 氏髓鞘染色均未发现明显异常改变。A 组中 A1 组为临床症状出现前, 其小鼠的脑和脊髓中 HE 染色和 Weil 氏髓鞘染色, 与 B 组和 C 组一样, 未发现明显异常改变。A2 ~ 4 组 CNS 脑干、小脑、大脑和脊髓白质区内有不同程度的炎性细胞浸润, 多见于小血管旁, 呈血管袖套样改变; 神经细胞肿胀、变性; 疾病高峰期, 髓鞘脱失呈局灶性, 严重时可见大片坏死而崩解消失, 多位于小血管旁, 脊髓脱髓鞘大多位于脊髓表面。同时在脱髓鞘区可见到大量格子细胞存在, 大脑皮质下的白质区可见散在胶质小结形成, 甚至能看见噬神经现象。随着病情的增加, 炎症病灶的范围和细胞浸润的程度也相应增加, 临床评分 3 级以上者, 可在视交叉区域及大脑的皮质、皮髓交界处甚至深部髓质、脑脊膜和侧脑室周围有大量典型的血管周袖套样炎性细胞浸润 (图 3 A ~ J)。

2.4 实验小鼠 MRI 扫描 1.5T 头部和脊髓扫描发现, EAE 组病变多分布于脑室周围及枕叶, 呈斑块状改变。病变在 MRI 冠状切面, 横断面 T_2 加权像及水抑制像可见多个散在长 T_2 高信号, 但在 T_1 加权像及脊髓信号中不易辨认。这与人类 MS 的影像改变有相似之处, 可说明该模型的可靠性 (图 4)。

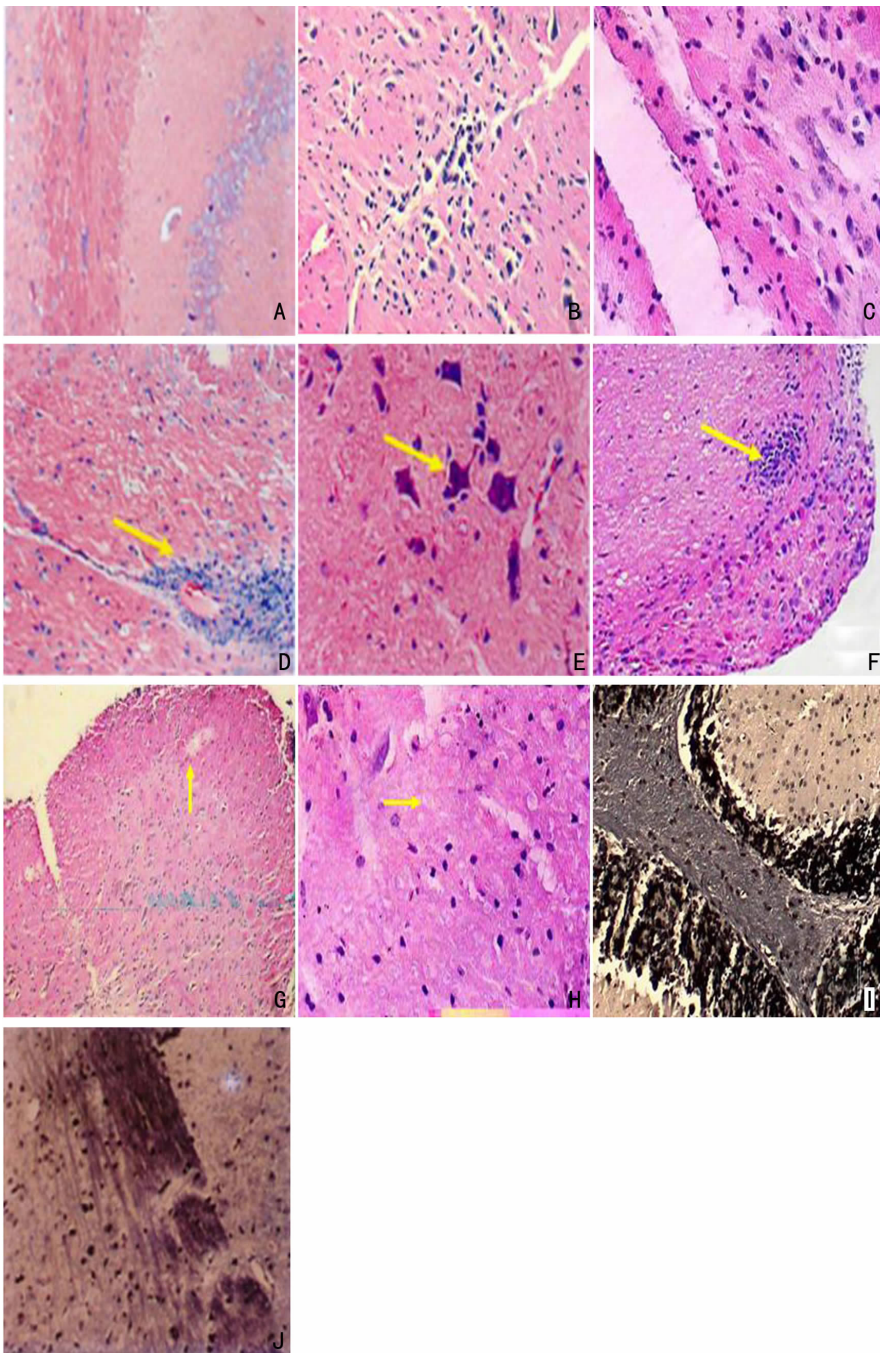


图3 不同组实验小鼠 CNS 病理表现。A:正常大脑白质(HE, ×100);B:正常脊髓(HE, ×100);C:大脑白质少量炎症细胞浸润(发病初期,HE, ×200);D:大脑白质炎症细胞浸润,形成血管袖套样改变(发病高峰,HE, ×100);E:大脑皮层噬神经现象(HE, ×400);F:小脑皮质胶质小结形成(HE, ×100);G:脊髓侧索脱髓鞘(HE, ×100);H:神经细胞坏死(HE, ×200);I:正常小脑白质(Weil's 染色, ×100);J:大脑白质节段性脱髓鞘(Weil's 染色, ×100)。

Fig. 3 Patho-representation of CNS in different groups. A: Normal cerebral white matter (HE, ×100); B: Normal spinal cord (HE, ×100); C: Cerebral white matter with little inflammatory cell infiltration (at catadrome, HE, ×200); D: Cerebral white matter with inflammatory cell infiltration and the formation of vascular sleeve-like changes (in the peak, HE, ×100); E: Phenomenon of phagocytizing neuron in cerebral cortex (HE, ×400); F: Formation of colloid node in cerebellum cortex (HE, ×100); G: Demyelination in the funiculus lateralis medullae spinalis (HE, ×100); H: Necrosis of the neuron (HE, ×200); I: Normal cerebellum white matter (Weil's staining, ×100); J: Segmental demyelination in cerebral white matter (Weil's staining, ×100).

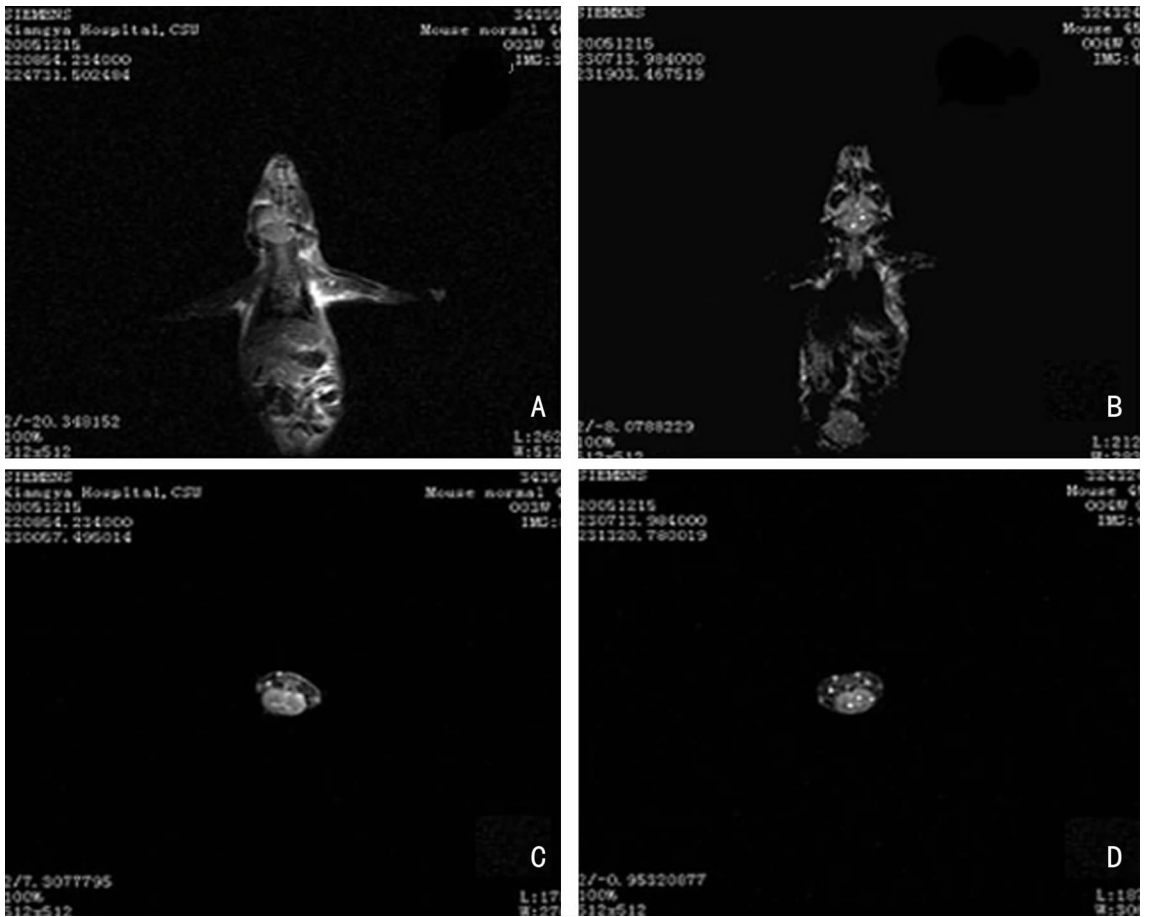


图4 实验小鼠的1.5T MRI扫描结果。A:佐剂组和空白对照组小鼠头部未见异常;B:EAE组小鼠头部可见散在的斑点样长 T_2 信号;C:佐剂组和空白对照组小鼠脊髓横断面扫描未见异常;D:EAE组小鼠脊髓横断面可见散在的斑点状、小片样长 T_2 信号。

Fig. 4 1.5T MRI scan of the cerebra and spinal cord of experimental mice. A: Cerebra of both the adjuvant group and the control were normal; B: There were sporadic spot-like T_2 hyperintense in the brain of EAE group; C: Spinal cord was scanned transversely in both the adjuvant group and the blank group, no abnormality was seen; D: In transection of the spinal cord of EAE group, there were sporadic spot-like, flaky T_2 hyperintense.

3 讨 论

MS的发病主要是由抗原特异性 $CD4^+$ T细胞针对自身组织髓鞘蛋白成分的炎症性病理反应。目前EAE常用于MS的炎性脱髓鞘的病理和免疫发病机制研究,其模型的制备方法多样,但各有优缺点,具体表现在动物品种和品系的选择、抗原和抗原乳剂的制备、免疫方法的不同。急性EAE的临床表现为急性发作,完全缓解的单病程,是急性播散性脑脊髓炎的理想模型;慢性EAE在临床表现上呈慢性非缓解型,组织病理上表现为炎性细胞浸润和局灶性脱髓鞘,与MS更为接近。

本实验采用人工合成mMOC₃₅₋₅₅与自制完全弗氏佐剂混合而成抗原乳剂,成功建立了慢性EAE小鼠模型。mMOC₃₅₋₅₅作为抗原与脑脊髓匀浆相比,结构明确,可精确定量,有利于进行EAE机制的研究。本实验中百日咳毒素为有免疫原性的佐剂,国内外有文献报道,加入百日咳毒素可以明显增加EAE的发病程度,但发病率无明显差异。在慢性EAE小鼠模型的建立中,作者通过摸索总结了一些经验并在Mendel等模型建立的基础上进行了改良。与国外及国内EAE模型和高波廷等报道用H37RA结核分枝杆菌制成CFA不同^[8,10],用冻干的卡介苗代替H37RA结核分枝杆菌自制CFA(结核分枝杆菌的终浓度为10 g/L,而国内CFA中结核分枝杆菌浓度仅为4 g/L),价廉易得,配制时需避光并充分混匀。皮下接种

时避免堵针和跑针,使接种的抗原量不充分,可能会导致小鼠 EAE 的发病率下降。本研究中,发病小鼠的组织病理染色提示 EAE 脊髓损害大多位于脊髓表面,如脊髓前索、侧索和后索,与 MS 主要是累及深部白质不同,可能是两者脊髓的大小和引流静脉分布的差别所致。

在该实验中还探索性地采用 1.5T MRI 对发病动物进行了扫描,发现 T₂WI 和水抑制像的冠状位和横位对脑组织结构的改变较敏感,在发病高峰期病灶显示高信号并呈多发特点,这与人类 MS 的影像学改变一致^[11]。为今后用更高磁场强度的 MRI 观察和随访疾病活动性变化和观察 EAE 药物实验治疗效果进行了有益的探索。但病灶 T₁WI 和脊髓信号改变不易辨认,考虑该实验动物为小鼠,体积偏小的缘故。

本实验中动物发病率为 83.3%,动物死亡率为 8.3%。MOG₃₅₋₅₅ 免疫 C57BL/6J 小鼠慢性 EAE 模型在病程上表现为急性发作,而非缓解的慢性过程;但可见动物存在部分临床表现恢复现象,与 Jifen 等^[12]报道一致。

本次实验所复制的慢性 EAE 模型具有发病率高、死亡率低、模型稳定的特点,但仍需进一步的研究比较,使其成为研究 MS 的理想动物模型。

参考文献:

- [1] Linington M B C. Animal models of demyelination [J]. *Brain Pathol*, 2008, 6(3):303-311.
- [2] Slavin A, Ewing C, Liu J, et al. Induction of a multiple sclerosis-like disease in mice with an immunodominant epitope of myelin oligodendrocyte glycoprotein [J]. *Autoimmunity*, 1998, 28(2):109-120.
- [3] Trotter J L, Damico C A, Cross A H, et al. HPRT mutant T-cell lines from MS patients recognize myelin proteolipid protein peptides [J]. *J Neuro Immunol*, 1997, 75(1-2):95-103.
- [4] Kerlero de Rosbo N, Milo R, Lees M B, et al. Reactivity to myelin antigens in multiple sclerosis; Peripheral blood lym-

- phocytes respond predominantly to myelin oligodendrocyte glycoprotein [J]. *J Clin Invest*, 1993, 92(6):2602-2608.
- [5] Mix E, Ibrahim S, Pahnke J, et al. Gene-expression profiling of the early stages of MOG-induced EAE proves EAE-resistance as an active process [J]. *J Neuroimmunol*, 2004, 151(1-2):158-170.
- [6] Amiguet P, Gardinier M V, Zanetta J P, et al. Purification and partial structural and functional characterization of mouse myelin/oligodendrocyte glycoprotein [J]. *J Neurochem*, 1992, 58(5):1676-1682.
- [7] Ben-Nun A, Mendel I, Bakimer R, et al. The autoimmune reactivity to myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) in multiple sclerosis is potentially pathogenic; effect of copolymer 1 on MOG-induced disease [J]. *J Neurol*, 1996, 243(4):S14-22.
- [8] Mendel I, Kerlero N, Rosbo D, et al. A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells [J]. *Eur J Immunol*, 1995, 25(7):1951-1959.
- [9] Benson J M, Stuckman S S, Cox K L, et al. Oral administration of myelin basic protein is superior to myelin in suppressing established relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *J Immunol*, 1999, 162(10):6247-6254.
- [10] 王琼,高波廷,王伟,等.小鼠实验性自身免疫性脑脊髓炎的病理变化[J].*卒中与神经疾病*,2006,13(2):97-102.
WANG Qiong, GAO Bo-ting, WANG Wei, et al. Pathological changes in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *Stroke and Nervous Disease*, 2006, 13(2):97-102.
- [11] Dijkhuizen R M, Nicolay K. Magnetic resonance imaging in experimental models of brain disorders [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2003, 23(12):1383-1402.
- [12] LI J, Gran B, Zhang G X, et al. IL-27 subunits and its receptor (WSX-1) mRNAs are markedly up-regulated in inflammatory cells in the CNS during experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *J Neurol Sci*, 2005, 232(1-2):3-9.

(本文编辑 傅希文)