[21] Nyvad B. Diagnosis versus detection of caries[J]. Caries Res, 2004, 38:192.

[22] Stookey GK. Optical methods quantitative light fluorescence[J]. J Dent Res, 2004, 83:C84.

[23] 李丛华, 杨霞, 吴亚菲. 牙周炎危险因素问卷调查报告[J]. 重庆医学, 2009, 38(20):2597.

(收稿日期:2010-06-23 修回日期:2010-08-13)

· 综 述 ·

抗磷脂抗体导致妊娠丢失动物模型研究进展

朱 姝^{1#} 综述, 陆启滨^{2△} 审校

(1. 南京中医药大学 2008 级中医妇科, 江苏南京 210029; 2. 江苏省中医院妇科, 南京 210029)

关键词: 复发性流产; 抗磷脂抗体; 动物模型

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.24.065

中图分类号: R714.21; R-332

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)24-3437-03

复发性流产(recurrent spontaneous abortion, RSA)是临床上常见的疾病之一,其病因除与遗传、解剖、内分泌、感染有关外,相当比例的 RSA 与抗磷脂抗体(antiphospholipin antibodies, aPL)有关,是抗磷脂综合征(antiphospholipid syndrome, APS)主要的临床表现之一。aPL 导致流产的病因多认为与血栓形成有关,但具体机制不明,为了更好地研究 aPL 与妊娠丢失的关系,建立其动物模型显得尤为重要, aPL 导致妊娠丢失的动物模型方法不一,且用来诱导 aPL 产生的抗体或抗原的种类各异,现将近年来国内外对 aPL 导致妊娠丢失动物模型研究的概况综述如下。

1 采用自身免疫性疾病的动物模型

具有系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)倾向的小鼠逐渐出现类似于 SLE 患者的临床表现,可伴有血栓形成, aPL 浓度升高等表现,现被人们所认知的主要有两种小鼠类型,即 MRL/lpr 鼠和(NZW × BXSB) F1 鼠^[1]。Gharavi 等^[2]研究发现 MRL/lpr 雌鼠在 2 月龄时可呈现出抗心磷脂抗体(anticardiolipin antibodies, aCL)的活性,雄鼠是在 3 月龄时可呈现出 aCL 活性,且这类鼠表现出 aCL 的活性不依赖于作为辅因子参与的 β_2 -糖蛋白 I(β_2 -glycoprotein I, β_2 -GPI),但是这类自身免疫性小鼠多用来研究 SLE 的发病机制,而单独作为妊娠丢失模型的研究较少。

2 采用被动诱导法造模

此种方法多通过给不同种类的孕鼠注射单克隆或多克隆的 aPL,或注射 β_2 -GPI 来诱导模型产生,观察 aPL 对妊娠丢失的直接作用。

2.1 用单克隆或多克隆的 aPL 来造模

2.1.1 用单克隆或多克隆的 aCL-IgG 或 aCL-IgM 来诱导模型产生 Blank 等^[3]用 ICR 小鼠来造模,待小鼠受孕后通过尾静脉注射单克隆的 aCL-IgG 或多克隆的 aCL-IgG/IgM,结果出现很低的胚胎成活率以及胎鼠宫内发育迟缓。Fishman 等^[4]同样用 ICR 小鼠造模,在 ICR 雌鼠妊娠第 1 天时通过尾静脉注射 10 μ g 的 aCL 单克隆抗体,妊娠第 15 天时处死孕鼠,发现胚胎吸收率在 32% 左右。Ikematsu 等^[5]用单克隆的 aCL-IgG 注入 BALB/c 孕鼠体内,结果出现了胚胎吸收,胎鼠体质量及胎盘质量显著下降,而且胎盘中有 aCL-IgG 沉积,胎盘病理组织切片显示栓塞及坏死。Stoeger 等^[6]在胚胎植入前给 BALB/c 孕鼠注射鼠单克隆 aCL-IgM 后,出现了不良的妊娠结

局。而在植入后注射单克隆 aCL-IgM 则不影响妊娠结果,提示 aCL-IgM 主要是通过干扰胚胎植入而影响妊娠结局的。

2.1.2 从 APS 患者的血清中提取抗体来造模 卫爱武等^[7]通过收集 aCL 阳性(定量检测为中、高度)RSA 或具有胚胎停育病史患者的血清及狼疮抗凝物(lupus anticoagulant, LA)阳性患者的血清,经二次盐析法蛋白液提纯后,在 SD 大鼠孕第 8、12 天时通过背部多部位皮下注射 aCL 纯化蛋白液、LA 纯化蛋白液,动物于孕第 15 天处死,结果产生了高浓度的 aCL,胚胎吸收率增加,胚胎质量明显减轻等表现。

Holers 等^[8]通过收集 APS 患者(临床表现为 RSA、SLE、网状青斑等,且含有高浓度 aPL-IgG, aPL-IgG > 145 GPL U)的血清,利用亲和层析法分离 aPL-IgG,在 BALB/c 孕鼠妊娠第 8、12 天腹腔注射 10 mg 的 aPL-IgG,在妊娠第 15 天处死孕鼠,结果出现了胚胎吸收率增加,胚胎体质量下降,胎盘组织病理切片显示炎性细胞浸润,母胎界面补体 C3 及 aPL 沉积。Berman 等^[9]用同样的方法造模,发现与未受孕的 BALB/c 小鼠相比,注射 aPL-IgG 的孕鼠外周血中 aPL 的水平明显降低,并且循环中的 TNF- α 升高,而蜕膜中显示有大量的 aPL 沉积,未受孕的 BALB/c 小鼠子宫内膜中却无 aPL 沉积,循环中的 TNF- α 也未升高,未受孕与受孕小鼠的心、肝、肾、肺中都没有 aPL 沉积,提示 aPL 能特异地与蜕膜组织中的磷脂结合,引起母胎界面上一些促炎因子释放,补体激活,组织损伤,最终导致胚胎丢失。

2.1.3 用抗纤维蛋白溶酶抗体来造模 Chen 等^[10]用多克隆的抗纤维蛋白溶酶抗体(anti-plasmin Ab)注入 BALB/c 孕鼠体内来诱导模型产生,在 BALB/c 孕鼠妊娠第 8 天及第 12 天时通过腹腔注射 500 μ g 的 anti-plasmin Ab,在妊娠第 15 天时处死孕鼠,与对照组相比,模型组出现了明显的胚胎吸收,胎盘病理组织切片有大量的 C3b/C3c 及 aCL 沉积。

2.1.4 用抗 β_2 -GPI 抗体来造模 Blank 等^[11]用抗 β_2 -GPI 抗体,在 BALB/c 雌鼠与雄鼠交配后形成阴栓时通过尾静脉注射 20 mg/200 mL 的抗 β_2 -GPI 抗体,在孕鼠妊娠第 16 天时处死,出现了妊娠丢失。

2.1.5 用抗磷脂酰丝氨酸抗体来造模 还有人用其他的 APA 来造模,例如将抗磷脂酰丝氨酸抗体(anti-phosphatidylserine anti-bodies, aPS)分别注入 BALB/c、CD-1 和 ICR 孕鼠体内,也出现了妊娠丢失^[12-13]。

南京中医药大学 2008 级博士研究生。 △ 通讯作者, E-mail: zswater@sian.com。

2.2 用 β_2 -GPI 来造模 β_2 -GPI 又称载脂蛋白 H, 由肝细胞合成, 是相对分子质量为 50 KD 的单链糖蛋白。研究发现 β_2 -GPI 对于小鼠体内的磷脂 (CL) 具有高亲和性, 注入小鼠体内可使弱免疫原性的 CL 转变为免疫原, 并诱导 aPL 产生^[14]。Blank 等^[15] 在 BALB/c 小鼠交配后形成阴栓时通过尾静脉注射入纯化的 β_2 -GPI (从健康人的血清中提取), 在妊娠第 16 天时处死孕鼠, 结果孕鼠产生了高水平的 aCL, 出现了妊娠丢失, 并且出现部分凝血酶原时间延长, 血小板减少症及胚胎吸收率增加等一系列表现。

3 采用主动免疫法造模

这种方法通过用抗体或抗原主动免疫正常未受孕的小鼠, 诱导小鼠发生免疫反应后, 再与雄鼠交配, 从而导致妊娠丢失模型的产生。

3.1 用抗体作为免疫物质进行造模 利用产生病理性独特性抗体的原理来免疫动物, 即先给动物注射抗体-Ab1, 使之产生抗 Ab1 抗体-Ab2, 然后产生抗 Ab2 抗体-Ab3, 而 Ab3 与 Ab1 的功能特性相似, 从而产生了免疫动物的效果。

Yodfat 等^[16] 给未免疫过的雌鼠分别注射人 IgM 和 IgG 类型的 aPL, 待雌鼠自身产生了 aPL 后, 再与雄鼠交配, 结果注射 aPL-IgG 的雌鼠产生了胚胎吸收, 而注射 aPL-IgM 的雌鼠却没有产生胚胎吸收。Cohen 等^[17] 给 BALB/C 小鼠后足皮内注射 1 μ g 的溶于弗氏佐剂的单克隆 aPL-IgG (从 APS 患者的血清中纯化获得), 3 周后, 加强免疫 1 次, 注射溶于等压 PBS 溶液中的单克隆 aPL-IgG 1 μ g, 4 个月后免疫过的雌鼠与雄鼠交配, 在妊娠第 15 天时处死, 也出现了胚胎吸收。Yodfat 等^[18] 用 APS-IgG 及 APS-IgGM (从 APS 患者血清中提取纯化所得) 分别免疫 BALB/C 小鼠, 利用病理性独特性抗体产生的原理, 诱导模型产生, 结果只有注射 aPS-IgG 的小鼠产生了高滴度的 APS、血小板减少症及增加的胚胎吸收率。Stoeger 等^[19] 用鼠单克隆的 aCL-IgM (2C4C2) 来免疫动物, 结果发现这种造模方法导致妊娠丢失的原因主要是在胚胎植入期通过破坏胚胎的种植而导致妊娠的丢失。Krause 等^[20] 给 BALB/c 小鼠后足皮内注射 10 μ g 的溶于弗氏佐剂的 anti-CL MoAb (H-3), 3 个星期以后加强注射 1 次 10 μ g 的溶于 PBS 的 H-3, 12~14 周后免疫过的雌鼠与雄鼠交配, 以发现阴栓为妊娠第 1 天, 妊娠第 15 天时处死, 结果出现了较高的胚胎吸收率。Blank 等^[21] 用单克隆的 anti-dsDNA IgM 型抗体 (MIV-7) 免疫 BALB/c 小鼠后, 小鼠产生了高水平的 aCL-IgG 及 LA, 并且出现了血小板减少症、较高的胚胎吸收率、胎盘质量及胚胎体质量下降等表现。

3.2 用抗原作为免疫物质进行造模 Aron 等^[22] 用 8 周龄的 MRL/+ 小鼠造模, 用 20 μ g 溶于弗氏佐剂 β_2 -GPI 免疫小鼠后, 在雌鼠 22 周龄时与雄鼠交配, 发现阴栓为妊娠第 1 天, 妊娠第 15 天时处死孕鼠, 产生了高水平的 aCL 及较高的胚胎吸收率。刘润侠等^[23] 通过给昆明种小鼠皮下多部位注射加有等体积弗氏佐剂的 β_2 -GPI (1 mg/mL) 150 μ g, 每周 1 次, 共 3 次, 结果与对照组相比, 小鼠产生了高水平的 aCL, 但对于妊娠结局的影响尚未做进一步研究。Gharavi 等^[24] 用合成的多肽 (与 β_2 -GPI 的磷脂结合位点具有相同结构), 溶于含有牛人血清蛋白的弗氏佐剂来免疫 NIH/Swiss 鼠后, NIH/Swiss 鼠产生了高水平的 aPL, 但至于这种多肽诱导产生的 aPL 能否导致妊娠丢失还有待于进一步研究。

4 采用骨髓移植造模

Blank 等^[25] 先用放射线照射 BALB/c 小鼠, 使小鼠丧失免

疫功能后, 然后将来源于 APS 实验性小鼠的全骨髓细胞和 T 细胞剔除的骨髓细胞分别移植到 BALB/c 小鼠体内, 移植全骨髓细胞的小鼠体内立即产生了高浓度的 aCL 及其他 aPL, 并出现了较高的胚胎吸收率, 而移植 T 细胞剔除骨髓细胞的小鼠却没有上述现象发生, 提示 T 细胞在 aPL 导致妊娠丢失的产生中起着重要的作用。虽然这种方法并不是主要用来进行 aPL 导致妊娠丢失动物模型的建立, 但却为 aPL 导致妊娠丢失的机制研究提供了一个信息, 即 aPL 导致妊娠丢失产生的过程中, T 细胞是参与的。

5 展 望

综上所述, aPL 导致妊娠丢失动物模型方法不一, 主动免疫法通过注射一定的抗原或抗体, 使动物自身产生抗体, 但实验周期较长, 耗材较多, 不利于大规模的动物实验。SLE 倾向的基因小鼠虽然能产生较高的 aPL, 并有栓塞表现, 但这种小鼠多用来研究 SLE, 不适合作为研究 aPL 导致妊娠丢失的规范动物模型。骨髓移植虽然能够产生较高的 aCL 水平及胚胎吸收率, 但需要用 APS 实验性小鼠的骨髓细胞, 旨在说明 aPL 导致妊娠丢失中 T 细胞的参与, 与动物模型的建立有重复之嫌。相比之下, 被动诱导法具有实验周期短的优点, 并且侧重于研究 aPL 在诱导妊娠丢失方面的病理机制, 但不能很好地模拟临床上 aPL 在体内产生的过程。综合利弊, 大多数学者更倾向于利用被动诱导法来造模, 通过收集 APS 患者 (含有高浓度 aPL-IgG) 的血清, 用亲和层析法提取 aPL-IgG, 把提取出来的多克隆的 aPL-IgG 注射到孕鼠体内, 从而导致妊娠丢失。这种被动诱导造模法在大规模动物实验中更为可行, 因为这种方法所用抗体来自于 APS 患者血清, 而这些患者体内异常的 aPL 是导致流产的主要因素, 亲和层析法又是目前比较常用的提取 IgG 的方法, 与其他被动诱导造模法相比, 具有价格低廉, 模型较稳定的优点, 便于大规模动物实验研究。aPL 导致妊娠丢失动物模型给我们提供了一个很好的研究 aPL 导致流产机制的平台, 既往的研究多偏重于栓塞方面, 因为 aPL 在体内及体外实验中都证明可通过激活内皮细胞、单核细胞, 血小板导致高凝状态, 连续许多年, aPL 导致的流产普遍认为是栓塞的缘故, 但具体病理机制还未完全阐明, 有待进一步研究。最近在 aPL 导致妊娠丢失动物模型中发现炎症及补体激活在 aPL 导致妊娠丢失的病理中也起着非常重要的作用^[26-28]。另外在 aPL 导致妊娠丢失的动物模型中发现, 除了出现妊娠丢失外, 还伴有胚胎体质量及胎盘质量下降等改变。因此, 借助于 aPL 导致妊娠丢失的动物模型, 对于 aPL 导致流产的研究可以拓宽领域, 包括其与胎儿宫内发育迟缓的关系、炎症及补体激活在 aPL 导致妊娠丢失中的作用等, 都将是今后进一步研究的方向。

参考文献:

- [1] Radway-Bright EL, Inanc M, Isenberg DA. Animal models of the antiphospholipid syndrome [J]. *Rheumatology* 1999, 38(17): 591.
- [2] Gharavi AE, Mellors RC, Elkon KB, et al. IgG anticardiolipin antibodies in murine lupus [J]. *Clin Exp Immunol*, 1989, 78(23): 233.
- [3] Blank M, Choen J, Toder V, et al. Induction of antiphospholipid syndrome in naive mice with mouse lupus monoclonal and human polyclonal anticardiolipin antibodies [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1991, 88(8): 3069.

- [4] Fishman P, Falach-Vaknine E, Zigelman R, et al. Prevention of fetal loss in experimental antiphospholipid syndrome by in vivo administration of recombinant interleukin-3[J]. Rapid Publication, 1993, 91(4):1834.
- [5] Ikematsu W, Luan FL, La Rosa L, et al. Human anti cardiolipin monoclonal autoantibodies cause placental necrosis and fetal loss in BALB/c mice[J]. Arthritis Rheum, 1998, 41(6):1026.
- [6] Stoeber ZM, Mozes E, Tartakovsky B, et al. Anti-cardiolipin antibodies induce pregnancy failure by impairing embryonic implantation [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(7):6464.
- [7] 卫爱武, 宋艳丽, 马存亮. 丹寿汤对抗磷脂抗体致妊娠丢失的作用机制[J]. 四川中医, 2009, 27(4):7.
- [8] Holers VM, Girardi G, Mo L, et al. Complement C3 activation is required for antiphospholipid antibody induced fetal loss[J]. Exp Med, 2003, 195(2):211.
- [9] Berman J, Girardi G, Salmon J, et al. TNF- α is a critical effector and a target for therapy in antiphospholipid antibody induced pregnancy loss[J]. Immunology, 2005, 174(1):485.
- [10] Chen XX, Gu YY, Li SJ, et al. Some plasmin induced antibodies bind to cardiolipin, display lupus anticoagulant activity and induce fetal loss in mice[J]. Immunology, 2007, 178:5351.
- [11] Blank M, Anafi L, Zandman-Goddard G, et al. The efficacy of specific IVIG anti-idiotypic antibodies in antiphospholipid syndrome (APS): trophoblast invasiveness and APS animal model[J]. Int Immunol, 2007, 19(7):1.
- [12] Vogt E, Lyden TW, Rote NS, et al. Monoclonal antiphosphatidylserine antibody induces intrauterine growth retardation in BALB/c mice [J]. Clin Exp Rheumatol, 1992, 10:641.
- [13] Blank M, Tincani A, Shoenfeld Y, et al. Induction of antiphospholipid syndrome in naive mice with purified IgG antiphosphatidylserine antibodies [J]. Rheumatol, 1994, 21:100.
- [14] Pierangeli SS, Harris EN. Induction of phospholipid binding antibodies in mice and rabbits by immunization with human β 2-glycoprotein I or anticardiolipin antibodies alone [J]. Clin Exp Immunol, 1993, 93:269.
- [15] Blank M, Faden D, Tincani A, et al. Immunization with anticardiolipin cofactor (beta-2-glycoprotein I) induces experimental antiphospholipid syndrome in naive mice [J]. Autoimmun, 1994, 7:441.
- [16] Yodfat O, Blank M, Krause I, et al. The pathogenic role of antiphosphatidylserine antibodies; active immunization with the antibodies leads to the induction of the antiphospholipid syndrome [J]. Clin Immunol Immunopathol, 1996, 78:14.
- [17] Cohen J, Bakimer R, Blank M, et al. Pathogenic natural anti-cardiolipin antibodies: the experience from monoclonal gammopathy[J]. Clin Exp Immunol, 1994, 97(2):181.
- [18] Yodfat O, Blank M, Krause I, et al. The pathogenic role of antiphosphatidylserine antibodies; active immunization with the antibodies leads to the induction of the antiphospholipid syndrome [J]. Clin Immunol Immunopathol, 1996, 78(1):14.
- [19] Stoeber ZM, Mozes E, Tartakovsky B. Anti-cardiolipin antibodies induce pregnancy failure by impairing embryonic implantation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(14):6464.
- [20] Krause M, Blank Y, Levi T, et al. Anti-idiotypic immunomodulation of experimental anti-phospholipid syndrome via effect on Th1/Th2 expression[J]. Clin Exp Immunol, 1999, 117(1):190.
- [21] Blank M, Krause I, Ben-Bassat M, et al. Induction of experimental antiphospholipid syndrome associated with SLE following immunization with human monoclonal pathogenic anti-DNA idiotype [J]. Autoimmun, 1992, 5(4):495.
- [22] Aron AL, Cuellar mL, Brey RL, et al. Early onset of autoimmunity in MRL/++ mice following immunization with f32 glycoprotein I[J]. Clin Exp Immunol, 1995, 101(1):78.
- [23] 刘润侠, 刘艳巧, 陈刚, 等. 清热活血方对 β 2-糖蛋白诱导的 aCL 产生的影响及机制研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2003, 10(6):31.
- [24] Gharavi EF, Tang H, Wilson WA, et al. Induction of antiphospholipid antibodies in normal mice by immunization with viral peptides[J]. Invest Med, 1997, 45:23.
- [25] Blank M, Krause I, Lanir N, et al. Transfer of experimental antiphospholipid syndrome by bone marrow cell transplantation[J]. Arthritis Rheum, 1995, 38:115.
- [26] Redecha P, Tilley R, Tencati M, et al. Tissue factor: a link between C5a and neutrophil activation in antiphospholipid antibody induced fetal injury[J]. Blood, 2007, 110(7):2423.
- [27] Stone S, Pijnenborg R, Vercruyse L, et al. The placental bed in pregnancies complicated by primary antiphospholipid syndrome[J]. Placenta, 2006, 27:457.
- [28] Girardi G, Berman J, Redecha P, et al. Complement C5a receptors and neutrophils mediate fetal injury in the antiphospholipid syndrome[J]. Clin Invest, 2003, 112(11):1644.