

## · 基础研究 ·

## 实验性自身免疫性肌炎动物模型的制作

段 枫

(中国人民解放军海军总医院神经内科,北京 100048)

**摘要:**目的 探讨实验性自身免疫性肌炎(EAM)动物模型制作方法。方法 实验动物选用健康雌性英国短毛豚鼠 20 只,分为正常组 5 只、佐剂对照组 5 只、EAM 组 10 只。正常组不予任何处理;佐剂对照组采用完全弗氏佐剂(CFA)0.25 mL 加等量 PBS;EAM 组采用 CFA 0.25 mL 加等体积浓度为 10 mg/L 的兔纯化肌球蛋白悬液,分别于 0、7、14、21 d 进行分次皮下注射,并在 0、7 d 同时联合腹腔注射百日咳杆菌原液。评价实验动物的临床症状、血肌酶及病理改变。结果 正常组及佐剂对照动物的临床症状、血肌酶及病理改变未见异常。EAM 组动物血肌酶升高,临床症状与病理改变与人类多发性肌炎类似,模型成功率为 80%。结论 应用纯化肌球蛋白制作实验性自身免疫性肌炎动物模型死亡率低,成功率高,为研究人类发性炎性肌病发病机理和治疗提供较好的工具,肌球蛋白可能是诱发自身免疫反应的候选成分之一。

**关键词:**实验性自身免疫性肌炎;肌球蛋白;完全弗氏佐剂;百日咳杆菌

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.18.021

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)18-1843-02

## Experimental autoimmune myositis model induced by pure myosin of rabbit

Duan Feng

(Department of neurology, the navy general hospital of PLA, Beijing, 100048, China)

**Abstract:** Objective To explore the method of experimental autoimmune myositis animal model. Methods Twenty female guinea pigs were randomly assigned into 3 groups. No treatment was given to the animals in normal group ( $n=5$ ). The animals in the adjuvant control group ( $n=5$ ) were subcutaneous injected with complete Freund's adjuvant (CFA) and equal amount of PBS. The animals in experimental autoimmune myositis (EAM) group ( $n=10$ ) received CFA plus equal volume rabbit purified myosin suspension (10 mg/L) in at day 0, 7, 14, 21 respectively, combined with intraperitoneal injection of Bordetella pertussis dope (live bacteria count =  $4.0 \times 10^{10}$ ) at day 0, 7. The clinical symptoms of experimental animals, blood creatine kinase (CK) and pathological changes were evaluated. Results The blood CK of the guinea pigs in normal and control group were normal, but abnormal elevated in EAM group. The clinical findings and pathologic changes of the guinea pigs in normal and control group were normal, and in EAM group were similar to the human's in idiopathic inflammatory myopathy. The model success rate was 80%. Conclusion Experimental autoimmune myositis model induced by pure myosin, which was with low mortality and high success rate, provided better tools for the study of the pathogenesis and treatment in inflammatory myopathy. Myosin might be a probable antigen.

**Key words:** Experimental autoimmune myositis Myosin Complete Freund's adjuvant Bacillus pertussis

特发性炎性肌病是一种病因不明的,以累及横纹肌为主的自身免疫性炎性肌病<sup>[1]</sup>。实验性自身免疫性肌炎(experimental autoimmune myositis, EAM)与人类多发性肌炎和皮肌炎病理改变具有许多共同特点,因此是研究人类炎性肌病发病机制和探寻新治疗方法的有用工具<sup>[2]</sup>。由于诱发炎性肌病的自身抗原至今仍不清楚,目前多数采用异种骨骼肌匀浆免疫动物(如豚鼠、大鼠和小鼠)方法诱发 EAM,但是存在模型成功率低、死亡率高等多种问题。近年来国外有应用纯化的肌球蛋白诱发实验性自身免疫性肌炎的报道<sup>[3-4]</sup>,国内尚无此方面研究。作者采用兔纯化的肌球蛋白作为抗原免疫豚鼠成功制作了 EAM 模型,与以往国内报道的骨骼肌匀浆免疫动物诱发的 EAM 的方法相比,成功率高,死亡率小,同时证实了肌球蛋白可能作为一种抗原参与了多发性肌炎的发病机制。

## 1 材料与方 法

**1.1 实验动物及试剂** 选用健康雌性英国短毛豚鼠 20 只,6~8 周龄,体质量 250~300 g,购于中国人民解放军总医院动物实验室。纯化兔肌球蛋白(5 mg/0.5 mL)、完全弗氏佐剂(complete freund's adjuvant, CFA)购于 sigma 公司,百日咳杆菌购于北京天坛生物制品研究所。

**1.2 动物模型制作及分组** 实验动物分为 3 组,正常组、佐剂对照组、EAM 组。正常组:动物 5 只,不给予任何处理;佐剂对照组:动物 5 只,免疫物为 CFA 0.25 mL 加等量 PBS(冰浴下混合充分乳化);EAM 组:动物 10 只,免疫物为 CFA 0.25 mL

加等体积浓度为 10 mg/L 的兔纯化肌球蛋白悬液(冰浴下混合充分乳化)。免疫注射部位为背部两侧,均为皮下注射,免疫剂量为每次 0.5 mL,1 次/周,分别于 0、7、14、21 d 各进行 1 次免疫注射,共 4 次。佐剂对照组、EAM 组所有实验动物在第 1 次和第 2 次免疫注射同时进行百日咳原液腹腔注射,每只 0.5 mL,细菌数目为  $4 \times 10^{10}$  个。

**1.3 评价指标及方法** 每周免疫注射前所有豚鼠均称重;从第 2 次免疫注射前开始每周参照韩顺昌等<sup>[1]</sup>的方法进行临床症状评分;在第 4 次免疫注射后 1 周行肌肉活检;而后行心脏取血,测肌酸激酶。从临床表现、生化和组织病理 3 个角度进行模型评价。

**1.3.1 临床症状评分测定** 豚鼠于第 4 次免疫注射 1 周后根据动物体质量、姿势、呼吸及活动情况,参照 Wada 等<sup>[5]</sup>和 Matsubara 等<sup>[6]</sup>的方法进行评分。0 分:无明显的肌无力表现;1 分:无力咬啮或喊叫;2 分:休息时隆起体位,头下垂,前肢屈曲,行走震颤;3 分:严重肌无力,不喊叫,体质量减轻,甚至肌肉萎缩,呼吸困难,濒于死亡。(症状居中者分别评分为 0.5、1.5、2.5 分)。

**1.3.2 血清 CK 检查** 豚鼠于第 4 次免疫注射 1 周后心脏缓慢取血。低温 2 000 转/分,离心 7 min,取上清,立即冷冻与-80℃冰箱,标本收集完毕后,送往生化科行血清肌酸激酶(CK)检查(日立全自动生化分析仪)。

**1.3.3 病理检查及组织病理学分析** 每只豚鼠于第 4 次免疫

注射后 1 周取材,将豚鼠麻醉(水合氯醛腹腔注射),取左侧股四头肌,黄芪胶粉包埋后立即用异戊烷和液氮速冻,低温恒温切片连续切片,切片厚度为 5  $\mu\text{m}$ ,进行苏木素-伊红染色(HE 染色),光学纤维镜观察。所有组织切片根据 Kojima 等<sup>[2]</sup>描述的方法对组织炎症浸润程度进行分级:—未发现病灶;+:累及 1~5 肌纤维;++:累及 6~30 个肌纤维;+++ :累及整个肌束;++++ :肌纤维广泛受累超过一个肌束范围。

**1.4 统计学处理** 采用美国 Graphpad Prism 4 软件分析,各项指标以  $\bar{x} \pm s$  表示,对组间计量资料进行  $t$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 各组豚鼠一般情况比较** 正常组豚鼠( $n=5$ )全部存活,进食良好,活动正常,每周重量增长 15~40 g。佐剂对照组豚鼠( $n=5$ )全部存活,第 1~2 次免疫注射后局部见 0.2~0.5 cm 硬结,无局部破溃,进食良好,活动正常,重量每周增长 15~40 g。EAM 组 10 只豚鼠免疫注射后两周开始出现背部皮肤红肿、硬结或破溃,其中 1 只豚鼠(8 号)活动正常,重量增长缓慢,第 4 周体质量增长 10 g;其余 9 只豚鼠第 2 次免疫注射后出现重量增长缓慢或重量减轻,活动迟缓,进行性加重,7 号豚鼠在第 3 次免疫注射后出现严重的肌肉萎缩、呼吸急促、进食费力等症状,并于第 4 次免疫注射后死亡,死亡后行肌肉病理检查,死亡原因考虑为肌炎导致的呼吸功能衰竭。

**2.2 各组豚鼠临床症状评分情况比较** 正常组和佐剂对照组豚鼠临床症状评分均为 0 分,EAM 组 10 只豚鼠临床症状评分见表 1。

**2.3 各组豚鼠血清 CK 水平比较** 正常组豚鼠血清 CK 水平为 534~696.09 IU/L,平均(637.4 $\pm$ 62.903) IU/L;佐剂对照组豚鼠血清 CK 水平为 525~701.05 IU/L,平均(638.4 $\pm$ 57.08)IU/L;EAM 组 10 只豚鼠血清 CK 水平为见表 1。

**2.4 各组豚鼠组织病理学分析比较** 正常组和佐剂对照组豚鼠肌肉组织 HE 染色显示正常。EAM 组中 8 只豚鼠 HE 染色证实模型成功(模型成功率 80%),镜下可见肌纤维大小不一,肌纤维变性、坏死及吞噬现象,有较多淋巴细胞和巨噬细胞浸润;EAM 组临床评分正常豚鼠(8 号)的肌肉病理检查正常;EAM 组 10 只豚鼠病理评分见表 1。EAM 组豚鼠的病理分级与血清 CK 水平呈正相关( $r=0.9665, P < 0.01$ )。

表 1 EAM 组豚鼠临床评分、血清 CK 水平及炎症浸润的程度比较

编号	临床评分	血清 CK 水平(IU/L)	炎症浸润的程度
1	2	6329.7	+++
2	1.5	2589.8	++
3	2.5	10874.2	++++
4	2	5544.7	+++
5	1.5	2613.7	++
6	1.5	1598.3	++
7	3(死亡)	—	++++
8	0	895.5	—
9	2	7134.5	+++
10	1	1354.9	+

—:表示此项无数据。

## 3 讨 论

目前国内外采用较多的是异种动物骨骼肌匀浆免疫动物方法诱发 EAM,模型的严重程度变异大,死亡率较高,应用受到限制<sup>[3-8]</sup>。作者参考 Nemoto 等<sup>[9]</sup>的方法应用纯化肌球蛋白诱发豚鼠的自身免疫性肌炎模型,其临床、病理改变与人类的多发性肌炎相似,成功率高、死亡率低,虽然模型的临床评分

较以往报道低,但变异性小,是多发性肌炎非常好的动物模型,可用于多发性肌炎发病机制的研究。与 Nemoto 等<sup>[9]</sup>不同,作者使用灭活的百日咳杆菌原液代替百日咳毒素作为佐剂,因此模型的成本相对较低。

复习以往国内的文献报道,肌肉匀浆免疫的实验性肌炎动物模型肌球蛋白浓度是 3~6 mg/mL,需免疫 4~8 周时间成模<sup>[6-7]</sup>。本组采用了纯化的肌球蛋白,浓度为 10 mg/L,模型成功率高达 80%,虽然临床评分主要在 1.5~2.0 分之间,相对较低,但模型稳定,并且发病早,可较早的筛选动物。同时 EAM 组肌肉病理改变与人类肌炎相似,表现为肌肉变性坏死及淋巴细胞浸润,是非常好的多肌炎的动物模型。

本研究发现 EAM 组豚鼠的病理分级与血清 CK 水平呈正相关,说明血清 CK 水平是反应 EAM 急性期肌肉损伤严重程度的客观指标,在临床上可用来观察多肌炎病情变化和进行病情的评估。同时作者发现 EAM 组 8 号豚鼠临床评分正常,虽然肌肉组织病理正常,但血清 CK 轻度增高,同时体质量增长较正常组少,考虑为多肌炎的早期,同时可能说明血清 CK 的升高出现在肌肉组织病理改变之前。同样在临床上有时会碰到血清 CK 升高但肌肉病理正常的患者,可能也是因为同样的原因。

作者选用雌性豚鼠为实验对象,采用兔纯化肌球蛋白加完全弗氏佐剂反复多次免疫豚鼠,成功地制作出 EAM 动物模型。与以往的多次实验相同,作者证实单纯的 CFA 并不能造成肌炎模型,表明肌球蛋白在 EAM 模型中起了决定性的作用,但 Kohayama 等报道应用 C 蛋白可以在 Lewis 大鼠诱发病理改变更为严重的肌炎模型。因此,肌球蛋白可能是诱发自身免疫反应的候选成分之一。

## 参考文献:

- [1] 韩顺昌,蒲传强,英夫利昔治疗实验性免疫性肌炎的实验研究[J]. 中国神经免疫学神经病学杂志,2007,14(6):336-339.
- [2] Kojima T, Tanuma N, Aikawa Y, et al. Myosin-induced autoimmune polymyositis in the rat[J]. J Neurol Sci, 1997, 151(2):141-148.
- [3] Rosenberg NL, Ringel SP, Kotzin BL. Experimental autoimmune myositis in SJL/J mice[J]. Clin Exp Immunol, 1987, 68(1):117-129.
- [4] Constantinescu CS, Hilliard B, Fujioka T, et al. Pathogenesis of neuroimmunologic diseases. Experimental models[J]. Immunol Res, 1998, 17(1-2):217-227.
- [5] Wada J, Shintani N, Kikutani K, et al. Intravenous immunoglobulin prevents experimental autoimmune myositis in SJL mice by reducing anti-myosin antibody and by blocking complement deposition[J]. Clin Exp Immunol, 2001, 124(2):282-289.
- [6] Matsubara S, Shima T, Takamori M. Experimental allergic myositis in SJL/J mice immunized with rabbit myosin B fraction: immunohistochemical analysis and transfer[J]. Acta Neuropathol, 1993, 85(2):138-144.
- [7] 张宁,肖波,李静,等. 实验性自身免疫性肌炎中 MMP-2, MMP-9, TIMP-1 的表达及甲基强的松龙的影响[J]. 湖南医科大学学报, 2003, 28(1):5-8.