

李志彬,李毅,金宛霖,等. 利用黑斑双鳍电鳐构建实验性自身免疫性重症肌无力小鼠模型 [J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(2): 143-147.

Li ZB, Li Y, Jin WL, et al. Establishment of a mouse model of experimental autoimmune myasthenia gravis by using the *Narcine maculata* electric organ[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(2): 143-147.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.02.003

# 利用黑斑双鳍电鳐构建实验性自身免疫性重症肌无力小鼠模型

李志彬,李毅,金宛霖,杨树梅,孟环宇,胡波,徐立群,罗朝辉,杨欢\*

(中南大学湘雅医院神经内科,长沙 410008)

**【摘要】** 目的 建立符合国际化的临床前实验标准的实验性自身免疫性重症肌无力 (experimental autoimmune myasthenia gravis, EAMG) 动物模型。方法 参照文献报道的方法并改进后,从电鳐电器官提取乙酰胆碱受体 (acetylcholine receptor, AchR) 蛋白纯品,并采用 SDS 凝胶电泳蛋白定性鉴定及 BCA 法蛋白定量;用纯化的蛋白主动免疫 C57BL/6 小鼠,共免疫 3 次(分别于第 1 天、第 30 天、第 60 天),进行 EAMG 小鼠临床评分、体重、血清 AchR 抗体含量、新斯的明试验、肌电图等综合评价。结果 EAMG 模型组与佐剂组比较,自第三周开始发病,平均临床评分显著上升 ( $P < 0.01$ );发病小鼠体重显著减轻 ( $P < 0.01$ );新斯的明试验阳性;血清 AchR 抗体含量明显增加 ( $P < 0.01$ );肌电图重复电刺激实验阳性。结论 从黑斑双鳍电鳐的电器官提取、纯化 AchR 蛋白成功诱导 C57BL/6 EAMG 小鼠模型,为进一步研究重症肌无力创造了良好条件。

**【关键词】** 实验性自身免疫性重症肌无力;乙酰胆碱受体;黑斑双鳍电鳐;电器官;小鼠

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 02-0143-05

## Establishment of a mouse model of experimental autoimmune myasthenia gravis by using the *Narcine maculata* electric organ

LI Zhibin, LI Yi, JIN Wanlin, YANG Shumei, MENG Huanyu, HU Bo, XU Liqun, LUO Zhaohui, YANG Huan\*

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

Corresponding author: YANG Huan. E-mail: yangh69@126.com

**【Abstract】 Objective** To establish a mouse model of experimental autoimmune myasthenia gravis (EAMG) by immunization with purified AchR extracted from the *Narcine maculata* electric organ, which meets the requirements of international criteria of preclinical experiment. **Methods** Purified AchR protein was extracted from the electric organ of *Narcine maculata* and validated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. C57BL/6 mice were immunized with the protein and complete Freund adjuvant (CFA) for the EAMG group or CFA alone for the control group three times at days 1, 30, and 60. After 70 days, the clinical assessments were determined according to body weight, serum anti-AchR antibody level, neostigmine test, and electromyography. **Results** Compared with control mice, the clinical scores of EAMG mice were increased significantly ( $P < 0.01$ ). Body weight was significantly decreased ( $P < 0.01$ ), neostigmine test was positive, and the percentage of decrement of the fifth wave of electromyography and levels of anti-AchR antibody were significantly higher ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** The C57BL/6 EAMG mouse model is successfully established by immunization with purified AchR protein extracted from the *Narcine maculata* electric organ, which may provide a better research tool for

**【基金项目】** 国家自然科学基金项目 (81571173, 81771364)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (81571173 and 81771364).

**【作者简介】** 李志彬 (1989—), 男, 博士研究生。研究方向: 神经免疫与神经肌病。Email: alizhibin123@163.com

**【通信作者】** 杨欢 (1976—), 女, 教授, 研究方向: 神经免疫与神经肌病。Email: yangh69@126.com。

studies of experimental autoimmune myasthenia gravis.

**[Keywords]** experimental autoimmune myasthenia gravis, EAMG; acetylcholine receptor; *Narcine maculate*; electric organ; mice

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

重症肌无力(myasthenia gravis, MG)是一种由于神经肌肉接头(neuromuscular junction, NMJ)突触后膜主要以乙酰胆碱受体(acetylcholine receptor, AchR)被自身抗体破坏,从而引发 NMJ 传递障碍而产生的自身免疫性疾病<sup>[1]</sup>。目前公认的经典 MG 动物模型是用加利福尼亚电鳐(*Torpedo californica*)电器官提取、纯化的 AchR 蛋白来主动免疫,建立实验性自身免疫性重症肌无力(experimental autoimmune myasthenia gravis, EAMG)模型,进行 MG 发病机制研究。由于加利福尼亚电鳐以及用于纯化的眼镜蛇神经毒素难以获得,国内目前难以建立符合国际化的临床前实验标准的 EAMG 动物模型<sup>[2]</sup>。我们参考国内外文献<sup>[3-4]</sup>,从黑斑双鳍电鳐的电器官提取、纯化的 AchR 蛋白作为抗原免疫容易致敏的 C57BL/6 小鼠,建立小鼠 EAMG 模型。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

6~8 周龄 SPF 级 C57BL/6 雌鼠 40 只,体重 16~18g,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司【SCXK(湘)2016-0002】,并饲养于中南大学实验动物学部屏障设施内【SYXK(湘)2015-0017】。饲养环境:室温 22~25℃,湿度 50%~60%,昼夜各半交替。实验操作在中南大学实验动物学部屏障设施进行。所有操作均符合实验动物伦理学要求(伦理审批号:201703106)。

#### 1.1.2 实验试剂

免疫动物所需的 AchR 蛋白来自于我们实验室所提取。 $\alpha$ -中华眼镜蛇神经毒素(上海科敏生物科技有限公司,中国),氨甲酰胆碱(四川省奥克生物技术有限公司,中国),H37Ra(BD 公司,美国),CFA(Sigma 公司,美国)。

#### 1.1.3 实验仪器

Millipore 3000 超滤管浓缩(Millipore,德国),透析带(上海鼎国生物技术有限公司,中国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 AchR 的提取

黑斑双鳍电鳐(*Narcine maculate*)(图 1)从我

国南海海域捕捞,剖取电器官,存于-80℃冰箱。将 200 g 冰冻的电器官与 2 倍体积的匀浆缓冲液倒入组织破碎机中,高速匀浆得到均质混合物,287 000 r/min,4℃离心 30 min,弃上清液,取 3 倍于沉淀体积的匀浆缓冲液(含 1%的 Triton X-100 溶液),4℃低速振荡过夜。将振荡后混合物继续 287 000 r/min,4℃离心 30 min,得到含 AchR 的上清液。



图 1 黑斑双鳍电鳐

Figure 1 Gross image of a *Narcine maculate*

#### 1.2.2 中华眼镜蛇毒素亲和层析柱制备及纯化 AchR 蛋白

##### (1) 中华眼镜蛇毒素亲和层析柱制备

将 7.5 g 冻干的活化 CNBr 交联凝胶加入 30 mL 浓度 1 mmol/L 的盐酸中,静置 15 min,将凝胶与 30 mg  $\alpha$ -中华眼镜蛇神经毒素混合,测量 A280 吸光度检测二者混合状态。加入 50 mL pH 8.0 的 0.2 mol/L 甘氨酸入凝胶,4℃过夜。依次用 4~5 倍量的耦合缓冲液、0.1 mol/L 的醋酸缓冲液(pH=4)/0.5 mol/L 氯化钠、耦合缓冲液冲洗凝胶,以去除未偶联的神经毒素,将其倒入 1.5 × 20 cm Econo 柱中,制备神经毒素凝胶柱子。

##### (2) 制备羟基磷灰石柱

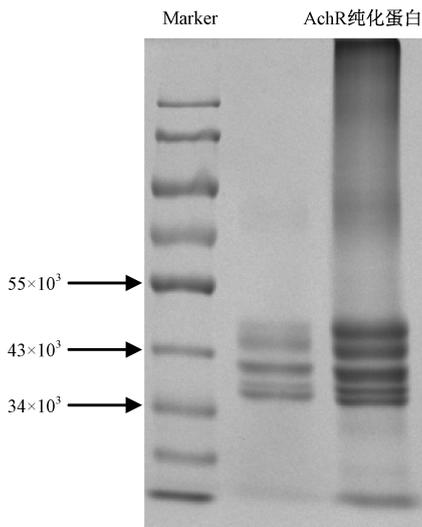
将 40 mL 生物胶 HT 羟基磷灰石溶解于 100 mL 浓度为 10 mmol/L Tris 缓冲液,轻旋搅拌,静置 5 min。小心倒出混合液上清中的悬浮细末及沉淀物上部的少许粉末。重复用 100 mL 浓度为 10 mmol/L Tris 缓冲液洗 5 次,将其倒入 1.5 × 20 cm Econo 柱中,制备羟基磷灰石柱。

### (3) 亲和纯化 AchR 蛋白

用 1.2.1 得到的 AchR 的上清液与 (1) 得到的中华眼镜蛇神经毒素凝胶重悬混合, 4℃ 低速振荡过夜。将振荡混合液重新装柱, 制备 AchR 毒素亲和柱。用含有 0.2% 的胆酸钠缓冲液冲洗 AchR 毒素亲和柱以及羟基磷灰石柱。用 100 mL 浓度为 1 mol/L 氨甲酰胆碱缓冲液冲洗含有羟基磷灰石柱。用塑料管连接两个柱子和 Bio-Rad 蛋白纯化系统的蠕动泵。以 60 mL/h 的速度运行蠕动泵, 循环 14 ~ 16 h。用 500 mL 柱子冲洗液冲洗羟基磷灰石柱, 用洗脱缓冲液冲洗柱子, 收集洗脱液。用 millipore3000 超滤管浓缩, 装入截流范围 3500 的透析带, 置于生理盐水中, 4℃ 下每次透析 8 h, 更换生理盐水, 共透析 3 次, 得到纯化的 AchR 蛋白溶液。

#### 1.2.3 SDS-PAGE 分析

取 AchR 蛋白溶液, 8% 丙烯酰胺凝胶电泳, 考马斯亮蓝染色呈现 5 个条带 (图 2)。利用 BCA 法测定纯化 AchR 蛋白浓度为 1.8 mg/mL, 从 200 g 湿电器官中共提取 21 mg 纯化 AchR 蛋白。



注: AchR 纯化蛋白经 8% SDS-PAGE 电泳后, 考马斯亮蓝染色呈现 5 个条带。

图 2 AchR 纯化蛋白电泳图

Note. After electrophoresis of the purified AchR protein by 8% SDS-PAGE, Coomassie blue staining showed 5 Bands.

Figure 2 Electrophoresis of the purified AchR protein

#### 1.2.4 EAMG 模型制备及评价

##### (1) EAMG 模型制备

6 ~ 8 周龄的 C57BL/6 雌鼠, 40 只, 随机分为 2 组, 佐剂组、模型组, 每组 20 只并编号。按每只模型组小鼠注射免疫原的剂量: 20 μg AchR 溶于 100 μL PBS, 与 100 μL 的含有 10% (m/v) H37Ra

的 CFA 悬液完全乳化, 共 200 μL, 上述乳剂以 50 μL/只皮下注射四个部位, 第一次免疫于双侧后足垫及双肩, 第二、三次免疫于双大腿处及双肩。分别于实验第 1 天、第 30 天、第 60 天, 共免疫 3 次, 第 70 天结束观察, 记录小鼠的临床评分、体重、新斯的明实验、肌电图等指标, 然后处死动物测定血清中抗 AchR 抗体水平。通过上述指标测定, 综合判定模型成功与否。

##### (2) EAMG 评价及检测方法

临床评分: 参照 Lennon 等的<sup>[5]</sup>方法将肌无力严重程度分为四级; 体重: 每周记录小鼠一次体重; 新斯的明实验: 按每克体重给予新斯的明  $2.4 \times 10^{-4}$  mg 肌肉注射, 监测小鼠的临床评分; 肌电图: 按 Wu 等<sup>[3]</sup>的方法; 血清中抗 AchR 抗体: 采用 ELISA 法测定血清抗 AchR 抗体总 IgG、IgG1、IgG2b 和 IgG2c<sup>[6]</sup>。

#### 1.3 统计学方法

所得数据采用 SPSS 19.0 统计软件和 GraphPad Prism 5 软件处理, 实验结果采用均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  时认为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 临床评分

模型组共有 11 只小鼠临床评分高于 1 分, 第 3 ~ 4 周共有两只发病, 余 9 只于第二次免疫后发病, 其中 2 分 5 只, 3 分 4 只。佐剂组动作快, 无隆起体位; 模型组发病小鼠表现为呼吸急促, 头部震颤, 行走缓慢, 竖毛, 隆起体位。两组之间临床评分比较, 差异有显著性,  $P < 0.01$  (表 1, 图 3)。

### 2.2 体重

动态监测小鼠体重, 模型组于免疫接种第三周后食量减少, 体重逐渐减轻, 佐剂组体重逐渐增加。与佐剂组体重比较, 模型组发病小鼠的体重明显减轻, 差异有显著性,  $P < 0.01$  (表 1)。

表 1 小鼠临床评分及体重 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别 Groups	<i>n</i>	临床评分 Clinical scores	体重(g) Body weight
佐剂对照组 Adjuvant control group	20	0 ± 0	23.01 ± 0.40
EAMG 模型组 EAMG model group	11	1.068 ± 0.146**	18.23 ± 0.88**

注: 与佐剂对照组比较, \*\* $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the adjuvant control group, \*\* $P < 0.01$ .

### 2.3 血清中抗 AchR 抗体

与佐剂组比较,血清抗 AchR 抗体总 IgG、IgG1、IgG2b 和 IgG2c 含量在 EAMG 模型组发病小鼠中明显增高,差异有显著性, $P < 0.01$ (表 2)。

### 2.4 肌电图

与对照组比较,模型组发病小鼠在 3 Hz 低频电刺激下第五个反应幅度较第一个衰减显著大于 10%(图 4)。

### 2.5 新斯的明试验

取 EAMG 模型组发病小鼠,按每克体重给新斯

的明  $2.4 \times 10^{-4}$  mg 肌肉注射,5 min 后小鼠症状出现明显改善,判定为新斯的明试验阳性。

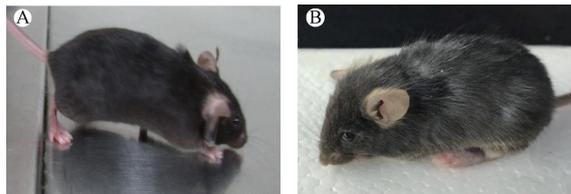


图 3 对照组(A)与模型组(B)小鼠

Figure 3 Mice of the control (A) and model (B) groups

表 2 小鼠血清 anti-AchR ab 不同亚型含量( $\bar{x} \pm s$ , OD 值)

Table 2 Different subtypes of serum anti-AchR ab in the mice ( $\bar{x} \pm s$ , OD values)

组别 Groups	n	抗 AchR IgG Anti-AchR IgG	抗 AchR IgG1 Anti-AchR IgG1	抗 AchR IgG2b Anti-AchR IgG2b	抗 AchR IgG2c Anti-AchR IgG2c
佐剂对照组 Adjuvant control group	20	0.113 ± 0.048	0.037 ± 0.012	0.031 ± 0.021	0.087 ± 0.025
EAMG 模型组 EAMG model group	11	1.068 ± 0.146**	0.787 ± 0.306**	0.754 ± 0.149**	0.636 ± 0.164**

注:与佐剂对照组比较,\*\* $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the adjuvant control group, \*\* $P < 0.01$ .

## 3 讨论

重症肌无力是一种位于神经肌肉接头处的,针对突触后膜不同成分,产生不同自身抗体的自身免疫性疾病,其中 80% 以上患者血清可检测到抗 AchR 抗体阳性<sup>[1]</sup>。为了探讨 MG 的发病机制及治疗方法,1973 年 Lindstrom 等<sup>[7]</sup>从电鳗的电器官中提取 AchR 免疫兔子首次建立了 AchR-EAMG 模型。自 Lindstrom 的研究后,越来越多建模方法被应用到 MG 动物模型上。国内研究者也利用电鳗乙酰胆碱受体构建了重症肌无力小鼠模型<sup>[8]</sup>,除了使用 AchR 作为免疫原得到 AchR-EAMG 模型,随后研究者们又首次建立了 Musk-EAMG 模型<sup>[9]</sup>和 LRP4-EAMG 模型<sup>[10]</sup>。其中 AchR-EAMG 模型还包括利用杂交瘤细胞株制备单克隆抗体构建被动转移模型<sup>[11-12]</sup>,重组人 AchR 建立 EAMG 模型<sup>[13-14]</sup>以及人工合成 AchR 多肽构建 EAMG 模型<sup>[15]</sup>,其中最经典是利用 T-AchR 构建小鼠及大鼠的 EAMG 模型<sup>[3]</sup>。

自 2015 年美国 NIH 及 MGFA 重症肌无力临床前实验标准化指南发布以来,提取 AchR 用于构建符合国际化临床前标准的 EAMG 模型越来越受到科研人员的重视<sup>[2]</sup>。由于电鳗体内 AchR 含量高、易获取,因此 Torpedo AchR (T-AchR) 成为制备 EAMG 模型的最理想抗原,但国内难以获得 T-AchR,且用于纯化的  $\alpha$  银环蛇神经毒素价格昂贵。我们依据 Wu 等<sup>[3]</sup>经典方法并予以改进,从国产电

鳗的电器官提取、纯化 AchR 蛋白。主要有以下几个方面的改进:首先,我们依照沈国光等的文献报道,选用容易得到的中国南海海域黑斑双鳍电鳗作为提取 AchR 的来源,有利于充分利用我国的自然资源;其次,在方法上,我们选用价格便宜且容易获得的国产 30 mg  $\alpha$ -中华眼镜蛇神经毒素即可构建达到较好效果的亲和层析柱,与并在亲和纯化 AchR 时,选用国产的氨甲酰胆碱,并运用超滤管浓缩和透析的方法,来获得纯化的蛋白。最后,我们从 200 g 湿电器官中得到 21 mg 纯化 AchR 蛋白,这蛋白得率明显高于沈国光研究的蛋白得率,且本实验蛋白电泳图结果与其报道的 AchR 的电泳图有一定相似,但显示为 5 个条带,考虑国内外许多实验室报道的纯化受体蛋白电泳图各不相同,这可能与不同实验室所用的方法、条件不一有关。且很可能是不同实验室所用的 AchR 的种属来源不同,不同的受体来源,它们的亚基组成存在不同,多肽亚基的数目从 1 至 4 均有报道,但其中均含有一种分子量在  $40 \times 10^3$  左右的亚基,例如 Torpedo AchR 的  $\alpha$  亚基即由两个肽链构成,我们的 AchR 的电泳图中最下面两条带可能是同一亚基的两条肽链经电泳分离后的图像。之前也有研究验证该亚基可能是 Ach 的结合位点所在,在我们的电泳图中也存在一条分子量在  $40 \times 10^3$  左右的亚基,这与其他实验室结果一致。

有关从这种国产黑斑双鳍电鳗中大量提取、纯化获得 AchR,并用于构建 C57BL/6 EAMG 小鼠模

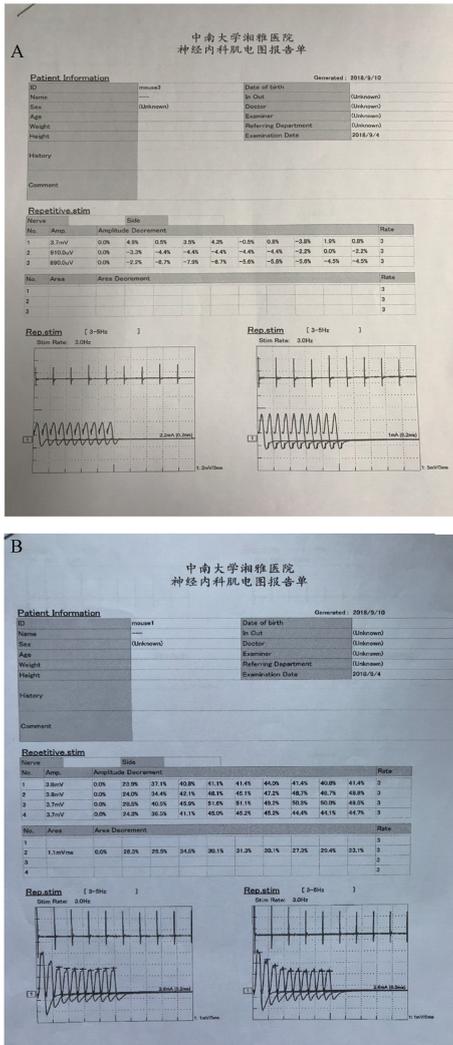


图 4 对照组(A)与模型组(B)小鼠肌电图  
**Figure 4** Electromyogram of the mice in control group (A) and model group(B)

型的研究在国内外尚未有报道。本实验用纯化的国产电鳗乙酰胆碱受体作为抗原免疫动物,成功建立了符合国际化的临床前实验标准的 EAMG 小鼠模型。该模型发病早且重,发生率达到 50% 以上,与经典的 T- AchR 造模接近。综合动物体内的各项指标发现,用纯化的 AchR 诱导 EAMG 模型,在发病机制、症状、电生理及免疫学改变方面与人 MG 十分相似。由此可见,这种方法造模效果好、原材料易获得、可行性强、较经济,适合我国的国情,可用于批量造模、机制研究以及 MG 的临床前实验,适合 MG 具体发病机制、评估药物有效性及治疗机制等方面的研究。它对我国在 EAMG 的研究以及 MG 的临床前实验国际化认可方面将会产生积极意义。

参 考 文 献 (References)

[ 1 ] Gilhus NE. Myasthenia gravis [ J ]. N Engl J Med, 2016, 375

(26): 2570-2581.  
 [ 2 ] Tuzun E, Berrih-Aknin S, Brenner T, et al. Guidelines for standard preclinical experiments in the mouse model of myasthenia gravis induced by acetylcholine receptor immunization [ J ]. Exp Neurol, 2015, 270: 11-17.  
 [ 3 ] Wu B, Goluszko E, Huda R, et al. Experimental autoimmune myasthenia gravis in the mouse [ J ]. Curr Protoc Immunol, 2013, Chapter 15: Unit 15.8.  
 [ 4 ] 陈丽筠,沈国光.黑斑双鳍电鳗 (Narcine maculata) 电器官 ACh 受体的分离、纯化及其某些特性的研究 [ J ].动物学研究, 1984, 6(02):199-208.  
 Chen LJ, Shen GG. Purification and characterization of acetylcholine receptor from *Narcine maculata* electroplax [ J ]. Zool Res, 1984, 6(02):199-208.  
 [ 5 ] Lennon VA, Lindstrom JM, Seybold ME. Experimental autoimmune myasthenia: A model of myasthenia gravis in rats and guinea pigs [ J ]. J Exp Med, 1975, 141(6): 1365-1375.  
 [ 6 ] Yang H, Goluszko E, David C, et al. Mapping myasthenia gravis-associated T cell epitopes on human acetylcholine receptors in HLA transgenic mice [ J ]. J Clin Invest, 2002, 109(8): 1111-1120.  
 [ 7 ] Patrick J, Lindstrom J. Autoimmune response to acetylcholine receptor [ J ]. Science, 1973, 180(4088): 871-872.  
 [ 8 ] 陈国江,王建安,韩根成,等.重症肌无力小鼠模型的建立 [ J ].中国实验动物学报, 2006, 14(01): 8+69-72.  
 Chen GJ, Wang JA, Han GC, et al. Establishment of a mouse model of experimental autoimmune myasthenia gravis. [ J ]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2006, 14(01): 8+69-72.  
 [ 9 ] Phillips WD, Christadoss P, Losen M, et al. Guidelines for pre-clinical animal and cellular models of MuSK-myasthenia gravis [ J ]. Exp Neurol, 2015, 270: 29-40.  
 [ 10 ] Shen C, Lu Y, Zhang B, et al. Antibodies against low-density lipoprotein receptor-related protein 4 induce myasthenia gravis [ J ]. J Clin Invest, 2013, 123(12): 5190-5202.  
 [ 11 ] Lindstrom JM, Engel AG, Seybold ME, et al. Pathological mechanisms in experimental autoimmune myasthenia gravis. II. Passive transfer of experimental autoimmune myasthenia gravis in rats with anti-acetylcholine receptor antibodies [ J ]. J Exp Med, 1976, 144(3): 739-753.  
 [ 12 ] Duan RS, Adikari SB, Huang YM, et al. Protective potential of experimental autoimmune myasthenia gravis in Lewis rats by IL-10-modified dendritic cells [ J ]. Neurobiol Dis, 2004, 16(2): 461-467.  
 [ 13 ] Lennon VA, Lambert EH, Leiby KR, et al. Recombinant human acetylcholine receptor alpha-subunit induces chronic experimental autoimmune myasthenia gravis [ J ]. J Immunol, 1991, 146(7): 2245-2248.  
 [ 14 ] Yang H, Wu B, Tuzun E, et al. A new mouse model of autoimmune ocular myasthenia gravis [ J ]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007, 48(11): 5101-5111.  
 [ 15 ] Sun C, Zhang H, Xu J, et al. Improved methodology to obtain large quantities of correctly folded recombinant N-terminal extracellular domain of the human muscle acetylcholine receptor for inducing experimental autoimmune myasthenia gravis in rats [ J ]. Arch Med Sci, 2014, 10(2):389-395.