



MuSK 重症肌无力小鼠模型的建立^{*}

刘潺潺 李 婷

(中国科学院大学深圳医院(光明),深圳 518000)

摘要:目的 建立肌肉特异性受体酪氨酸激酶抗体(MuSK-Ab)阳性的重症肌无力小鼠模型。方法 6~8 周龄的雌性 C57BL/6 小鼠(40 只),适应饲养 1 周后,随机分组后造模。造模第 1 天在 4 个位置(两个后脚和两个肩膀)分别注射免疫抗原(每个部位 50 μ L,含 12.5 μ g 鼠源肽,CFA 完全费氏佐剂);造模第 30 及 50 天再次在上述 4 个位置(两只后脚和两个肩部)分别注射免疫抗原,第 70 天后每天对发病情况进行评分。结果 模型成功率 50%。评分为 1 分小鼠 1 只,2 分的 3 只,3 分的 5 只,4 分为 1 只。结论 制备 MuSK-Ab 小鼠模型,造模方法可行,有助于对重症肌无力疾病的深入研究。

关键词:肌肉特异性受体酪氨酸激酶抗体;造模;免疫抗原

中图分类号: R-332 文献标识码: A 文章编号: 1006-6179(2019)05-0066-03

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.05.012

重症肌无力(MG)是一种神经肌肉接头的自身免疫性疾病,早在 1973 年在 MG 患者身上发现乙酰胆碱受体抗体(AchR-Ab),2001 年在 MG 患者中才又发现了一种新的抗体,肌肉特异性受体酪氨酸激酶抗体(MuSK-Ab)。乙酰胆碱受体(AchR)和 MuSK 抗体阳性的 MG 是具有独立免疫学靶点的自身免疫性疾病。与神经肌肉接头功能障碍的机制不同,两者临床表现与治疗差别很大^[1],比如 MuSK MG 经常呈现近端肩胛肌和面部肌无力的特征性临床表现,更多的肌无力危象和呼吸衰竭,长期预后较差。在突触形成过程中,MuSK 能调节 AchR 聚集,所以 MuSK 能维持 AchR 的正常空间结构,从而保障突触功能。国外报道 AchR 抗体阴性的患者,MuSK 抗体阳性占 38%~47%左右,相当于所有 MG 患者中的 10%左右。MuSK-MG 患者胸腺增生少见,胸腺瘤罕见,而且胸腺切除术后 MuSK 抗体血清保持不变,所以胸腺切除对 MuSK 患者疗效较差,构建 MuSK-Ab 小鼠模型有利于该疾病的研究^[2]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物:6~8 周的雌性 C57BL/6 小鼠,购

于华中科技大学实验动物中心,生产单位为三峡大学实验动物中心,许可证号 SCXK(鄂)2017-0012。

1.1.2 试剂: MuSK-弗氏佐剂(Difco, Detroit, MI, USA),鼠源肽,CFA 完全费氏佐剂。

1.2 方法

1.2.1 MuSK 小鼠模型的制备

雌性 C57BL/6 小鼠 40 只,分成实验组和对照组,每组各 20 只小鼠。通过胰岛素注射器从尾静脉给药 2 次对小鼠进行免疫。第 1 次实验组 20 只小鼠麻醉并用 30 μ g 的 MuSK-弗氏佐剂免疫,对照组 20 只小鼠仅用 CFA 免疫。28 d 后进行第 2 次免疫:实验组给予 MuSK-弗氏佐剂,对照组给予等量 PBS。适应饲养 1 周后进行造模。造模第 1 天在 4 个位置(两只后脚和肩部)分别注射免疫抗原(每个部位 50 μ L,含 12.5 μ g 鼠源肽,CFA 完全费氏佐剂);造模第 30 及 50 天再次在上述 4 个位置(两只后脚和肩部)分别注射免疫抗原(每个部位 50 μ L,含 12.5 μ g 鼠源肽,CFA 不完全费氏佐剂)^[2]。参照文献要求^[1],实验组第 2 次免疫后每周测抓力,做翻笼试验,每天测临床评分和体质量,第 70 天后每天对发病情况进行评分。

收稿日期:2019-04-30

^{*} 基金项目:深圳市博士创新立项课题资助(No.SZBC2017018)

作者简介:刘潺潺(1979—)男,博士,主治医师,研究方向:神经免疫疾患诊治,神经介入等。E-mail:wwwipad@sina.com

通信作者:李 婷(1982—)女,硕士,主治医师,研究方向:冠心病,心律失常的诊治。E-mail:11261155@qq.com

1.2.2 临床检查:临床检查是先将小鼠在平台上放置 3 min,观察小鼠的精神状态,有无虚弱,脱水,小鼠的活动情况,四肢肌力,有无瘫痪等,以便与锻炼后情况进行对照。对小鼠按下面的标准进行评分。

(1)按国际重症肌无力小鼠临床评分标准进行评分(Clinical scores)^[2]:首先进行标准锻炼,放置金属网格,轻抓小鼠的尾巴,小鼠抓住金属网格时,再将老鼠提起,如此重复 20 次,然后让小鼠自由行走并进行测分:

1)0 分,锻炼前活动正常,没有虚弱或疲劳的迹象。在标准锻炼后,老鼠似乎比正常情况下不太活跃,或显示出其他轻微疲劳虚弱的迹象,

2)1 分,锻炼前活动正常,但在标准的锻炼方案后,它会俯卧不动,下巴着地,不能抬头,缩成一团,活动性减少,头部和尾巴搁在工作台上(悬挂时间小于 60 s)。当小鼠达到这个等级时,应将柔软、潮湿的食物放在笼子的地板上。

3)2 分,锻炼前小鼠即出现活动性减少,常俯卧不动,头部及尾巴搁在工作台上,缩成一团,但未出现脱水,瘫痪,很大程度上保持着脑袋不动和尾巴休息(悬挂时间小于 30 s)。

4)3 分,小鼠即非常虚弱,脱水,瘫痪,体质量明显下降。评分为 3 分的小鼠出现脱水和瘫痪,体质量下降达 15%(悬挂时间=0)。

5)4 分,小鼠死亡。

(2)抓力试验和翻笼试验

1)抓力试验(Grip strength)

轻抓小鼠的尾巴,当小鼠悬起时,下面放金属网格,老鼠抓住金属网格时,将老鼠提起,重复 20 次后测拉力。

一端固定在拉力器上,测力器做成前端网格形。抓住小鼠尾巴,让小鼠抓住测力器的前端,用力拉小鼠的尾巴,当小鼠力量不够抓住测力器前端时,此时测力器显示为抓力。

2)翻笼试验(Inverted screen test)

翻笼试验是用来定量评估四肢肌力的测试方法。小鼠被放在了网格的中心后立即旋转到倒立位置,稳定地保持在软垫上方 50 cm。记录小鼠掉下的时间,观察时间限定在 300 s。

1.3 统计分析

使用 SPSS19.0 软件进行统计分析, MuSK-MG 小鼠建模成功率采用卡方检验,以 $P<0.05$ 为统计学有意义。

2 结果

评分结果见表 1,评分为 ≥ 1 提示造模成功,建模成功率 50%;3 分和 4 分的小鼠抓力试验和翻笼试验明确减退,有利于下一步药物试验。评分为 1 至 4 分为造模成功,成功率为 50%, $P=0.00026$,见表 1。

表 1 评分结果

Table 1 Mouse clinical score results	
临床评分分数	小鼠/只
0	5
1	1
2	3
3	5
4	1

3 讨论

AchR 自身抗体主要在免疫球蛋白 G (IgG) IgG1 和 IgG3 亚型中,直接阻断受体功能。相比之下, MuSK 抗体主要是 IgG4,不激活补体,而是抑制 MuSK 在终板诱导 AchR 的正常聚集^[3]。肌肉活检和上肢肌肉的电生理研究没有显示任何 AchR 减少或补体沉积在 MuSK 阳性的 MG 中。MuSK-Abs 的致病性已经通过患者纯化 IgG 被动转移到实验动物上得到证实^[4]。与正常对照相比, MuSK-Ab 阳性的 MG 患者辅助性 T 细胞(Th)Th 1 和 Th17 水平更高,而 B10 细胞百分比更低。由于 B 细胞 10 是免疫耐受和免疫激活调节的基础,这些结果与 Th1 / Th17 介导的炎症反应和自身抗体产生是一致的,是 MuSK-MG 的主要机制^[5]。

MuSK-MG 的小鼠模型中最近研究结果表明,吡斯的明加剧了终板 AchR 损失,而 3,4-二氨基吡啶增强了神经肌肉传递^[6]。

C57BL/6、AJ 和 bm12 小鼠容易造模,但是 BALB/c 不适合用来做 MuSK 小鼠模型。A/WySnJ, A/J, DBA/2, FVB/N 小鼠更适合作为造模小鼠,具体原因不明^[7]。必须定期监测动物,并防止不必要的痛苦。在开始治疗前几天开始的被动免疫注射过程中,每天都要进行体重和疲劳虚弱的测量,以使动物熟悉操作人员。主动免疫研究的时间较长(4 至 11 周)。对于这类研究,在第 2 次免疫接种之前,可以接受较不频繁的例行检查,到第 2 次免疫接种时

应开始每日检查。由于老鼠有一个昼夜节律的活动周期,一个有规律的 12 小时的光/暗周期应该在每天的同一时间进行,最好是上午 10 点到下午 1 点^[8-9]。

本研究按照国外文献制备 MuSK-MG 的小鼠模型,统一测评方法,与现有研究结果一致,造模方法可行。有利于重症肌无力疾病的进一步研究。

参 考 文 献

[1] Morren J, Li Y. Myasthenia gravis with muscle-specific tyrosine kinase antibodies: A narrative review [J]. Muscle & nerve, 2018, **58**(3): 344-358.

[2] Phillips W D, Christadoss P, Losen M, *et al.* Guidelines for pre-clinical animal and cellular models of MuSK-myasthenia gravis [J]. Experimental neurology, 2015, **270**(5):29-40.

[3] Ruff R L, Lisak R P. Nature and Action of Antibodies in Myasthenia Gravis [J]. Neurologic clinics, 2018, **36**(2):

275-291.

[4] Sabre L, Evoli A, Punga A R. Cognitive dysfunction in mice with passively induced MuSK antibody seropositive myasthenia gravis [J]. Journal of the neurological sciences, 2019, **399**(4)15-21.

[5] Ghazanfari N, Linsao E L, Trajanovska S, *et al.* Forced expression of muscle specific kinase slows postsynaptic acetylcholine receptor loss in a mouse model of MuSK myasthenia gravis [J]. Physiological reports, 2015, **3**(12): 26-32.

[6] Jordan A, Freimer M. Recent advances in understanding and managing myasthenia gravis [J]. F1000Research, 2018, **7**(2): 75-21.

[7] Ben Younes T, Benrhouma H, Klaa H, *et al.* Muscle-Specific Kinase Autoimmune Myasthenia Gravis: Report of a Pediatric Case and Literature Review [J]. Neuropediatrics, 2018, **6**(8): 23-35.

[8] Gilhus N E, Verschuuren J J. Myasthenia gravis: subgroup classification and therapeutic strategies [J]. The Lancet Neurology, 2015, **14**(10): 1023-1036.

[9] 卢选成,李晓燕,张奇,等. 屏障环境动物实验设施的改建和使用[J]. 实验动物科学,2010,**27**(4):49-54.

Establishment of a Standardized MuSK Myasthenia Gravis Mouse Model

LIU Chanchan, LI Ting

(Shenzhen Hospital(Guang ming), University of Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518000, Chin)

Abstract: Objective To Model a muscle-specific receptor tyrosine kinase antibody (MuSK-Ab)-positive myasthenia gravis mouse model according to international standardization tablets. **Method** Female C57BL/6 mice (40 mice) aged 6-8 weeks were conditioned for 1 week and randomly modeled. On the first day of modeling, immunization antigens were injected at four locations (two hind legs and two shoulders) (50 μL per site, containing 12.5μg of mouse peptide, CFA complete Freund's adjuvant); modeling days 30 and 50 Immune antigens were injected at four locations (two hind legs and two shoulders) and the onset was scored daily after day 70. **Result** The model success rate is 50%. The score is 1 point for 1 mouse , 2 points for 3 , 3 points for 5 , 4 for 1. **Conclusion** The preparation of the MuSK-Ab mouse model according to international standardization is helpful for in-depth study of myasthenia gravis..

Key words: MuSK-Ab; modeling; immune antigen