



多发性硬化实验动物模型研究进展

李迎霞¹, 关东升^{1*}, 任德启¹, 郭健¹, 吴川杰²

(1. 河南中医学院第二临床医学院, 郑州 450008; 2. 郑州大学第一附属医院, 郑州 450003)

【摘要】 实验性自身免疫性脑脊髓炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) 是多发性硬化的实验动物模型, 经过近 2 个多世纪的发展, 已可以在猴、大鼠、小鼠等动物制备 EAE 模型, 在同一种品系动物采用不同免疫抗原制备的 EAE 模型在敏感性和临床特点具有多样性。本研究就 EAE 的发展史和目前不同品系实验动物、不同抗原制备 EAE 模型的特点做一述评, 对未来 EAE 模型的发展前景进行探讨。

【关键词】 多发性硬化; 实验性自身免疫性脑脊髓炎; 模型; 动物

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 05-0535-04

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2015.05.018

Research progress of animal models of multiple sclerosis

LI Ying-xia¹, GUAN Dong-sheng¹, REN De-qi¹, GUO Jian¹, WU Chuan-jie²

(1. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China, 2. The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450003)

【Abstract】 Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is a classic animal model for multiple sclerosis. After more than 2 centuries of development, EAE can be established in mice, monkeys and rats, etc. Some animals can be immunized by different immune antigens which have different features in sensibility and clinical characteristics. In this paper, we will review the development of EAE, discuss the characteristics of EAE models produced by immunization of different animals with different antigens. In summary, we explore the development of animal models of EAE.

【Key words】 Multiple sclerosis; Experimental autoimmune encephalomyelitis; Models, animal.

实验性变态反应性脑脊髓炎 (experimental allergic encephalomyelitis, EAE) 亦称实验性自身免疫性脑脊髓炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)。以中枢神经系统内小血管周围出现单个核细胞浸润及髓鞘脱失为病理特征, 由于 EAE 病理改变与人类多发性硬化 (MS) 相似, 而使其成为 MS 的理想动物模型, 在 MS 的研究中具有重要意义。

1 实验性自身免疫性脑脊髓炎模型的发展

自 18 世纪 30 年代以来, EAE 被广泛应用于 MS 的实验研究^[1]。EAE 在免疫学特征、发病特点和病

理学特征上与人类 MS 的表现非常相似^[1-9]。目前, 可以通过用组成髓鞘的多肽致敏和病毒感染两种方式建立 EAE 模型。最早的 EAE 模型是使用同种/异种脊髓匀浆 (SCH) 作为免疫原诱导建立的^[1-3]。Rivers 等^[1]第一次进行了实验性变态反应性脑脊髓炎的研究, 使用兔的脑组织 SCH 为免疫原, 肌肉注射于猴, 制备出最早的实验性变态反应性脑脊髓炎。1946 年, 首次使用 SCH 抗原乳化于完全弗氏佐剂 (含有灭活的结核杆菌), 混合成油包水乳状液, 注射于实验动物, 制备出 EAE 模型, 这种急性脑脊髓炎可以持续数周, 这即是目前已知最早的 EAE^[4-6]。早期的研究证明, 在 SCH 中导致脑脊髓

【基金项目】 国家自然科学基金青年项目 (No. 81202657); 河南省中医管理局河南省中医临床学科领军人才培育计划 (No. 201301006); 河南省教育厅科学技术研究重点项目 (No. 13A360556)。

【作者简介】 李迎霞 (1978 -), 女, 博士, 研究方向: 多发性硬化的实验研究。

【通讯作者】 关东升, 博士, 副教授, 研究方向: 多发性硬化的实验研究。Email: gds349@126.com

炎的主要抗原是髓磷脂碱性蛋白 (MBP)。1960 年, Paterson^[5]通过被动给予来自致敏动物的特异性脑脊髓炎抗原激活的 T 细胞,建立了被动免疫的 EAE。在啮齿动物身上至今尚未观察到自发的 EAE。在啮齿动物,EAE 或被动免疫的 EAE 可以观察到一个上升性瘫痪状态,开始与尾部张力降低,后肢瘫痪和迟缓性死亡。

2 实验性自身免疫性脑脊髓炎的免疫原

Theiler's 病毒、中枢神经系统 SCH 或乳化于弗氏佐剂的中枢神经系统特异性抗原均可在不同品系的实验动物及其同种品系的不同实验动物上诱导 EAE。常见的建立 EAE 的抗原包括髓磷脂碱性蛋白 (MBP), 蛋白脂质蛋白质 (PLP), 髓鞘相关糖蛋白 (MAG), 髓鞘少突胶质细胞糖蛋白 (MOG), 某些非髓性蛋白, 如神经原蛋白、胶原纤维酸蛋白也参与 EAE 的发病^[6-10]。这些抗原可以引起强烈的细胞毒性 T 细胞介导的反应。

SCH 中致敏的主要抗原是 MBP, 而 MBP 占髓

鞘蛋白的 30% ~ 40%^[11], 30% ~ 40% 的 MBP 在髓鞘。H-2u 小鼠, 尤其是 B10. PL 和 PL/J 系, Lewis 大鼠, 是对 MBP 高度敏感的品系^[12]。对 C57BL/6 (B6) 是最常见的小鼠品系之一, 对 MBP 不敏感^[13]。

另外, EAE 也可以通过被动转移特异性 T 细胞获得。在同一品种的动物之间, 这些被转移的特异性 T 细胞迁移到被动免疫实验动物的中枢神经系统, 参与局部炎症和继发性瘫痪。而且, 这种能引起被动 EAE 的脑脊髓炎特异性 T 细胞, 并不需要从敏感品系获得, 非敏感品系的脑脊髓炎特异性 T 细胞也可以诱导^[14]。

3 诱导 EAE 的易感性与动物种类的关系

EAE 的敏感性和临床过程的特点 (急性, 超急性, 慢性或复发缓解), 取决于以下因素, 如实验动物的动物品种、年龄、性别, 甚至动物的商业来源; 抗原、及其剂量、物理状态及给药途径; 免疫佐剂的应用。表 1、2 描述了影响 EAE 发病特点的研究结果。

表 1 不同研究方案建立大鼠 EAE 模型的特点^[10-19]

Tab.1 Characteristics of the rat EAE models established by different studies

品种 (性别) Animals (sex)	抗原 (给予部位) Antigens (Administration sites)	临床病程 (发病率/%) Clinical course (Incidence rate)	高峰期/d Peak (days)	最高临床得分 The highest Clinical scores
Lewis (F)	GP-MBP + IFA + Mb (后肢足掌)	急性病程	9 ~ 11	后肢力弱
Lewis (M)	GP-MBP + CFA MC (腹股沟淋巴结收集)	急性病程 (100)	10	后肢瘫痪
Lewis (M)	MBP + CFA + Mb (尾部)	急性病程	10	后肢瘫痪合并前肢力弱
DA (M/F)	大鼠、豚鼠脊髓匀浆 (后肢足掌)	急性病程 (83)	9 ~ 15	后肢瘫痪
DA (F)	MBP + CFA + PT (后肢足掌)	急性病程 (100)	10	四肢无力
Lewis (F)	GP-MBP + CFA + Mt (尾部)	急性病程	9	后肢瘫痪
Lewis (F)	MOG + CFA + Mt (尾部)	急性病程	14	后肢力弱
DA (F)	GP-MBP + CFA + Mt (尾部)	急性病程	11 ~ 12	尾部无力
DA (F)	MOG + CFA + Mt (尾部)	急性病程	11	后肢瘫痪
BN (F)	GP-MBP + CFA + Mt (尾部)	无		
BN (F)	MOG + CFA + Mt (尾部)	急性病程	13	后肢瘫痪
Lew. 1AV1	MOG + CFA ± PT (尾部)	根据 MOG 注射剂量变化	变化	变化
Lewis (M/F)	豚鼠脊髓匀浆 + CFA + 环孢菌素 A (后肢足掌)	慢性病程	10 ~ 14	严重的后肢瘫痪 四肢无力
Lewis (F)	豚鼠脊髓匀浆 + CFA + Mt (后肢足掌)	慢性病程	10 ~ 12	四肢无力
DA (F)	大鼠脊髓匀浆 + IFA (尾部)	复发-缓解病程	9 ~ 27	后肢瘫痪
DA (F)	MOG + IFA (尾部)	复发-缓解病程	8 ~ 16	后肢力弱

注: BN, Brown Norway 大鼠; Lewis, Lewis 大鼠; DA, Dark-Agouti 大鼠; CFA, 完全弗氏佐剂; F, 雌性; M, 雄性; GP-MBP, 豚鼠髓磷脂碱性蛋白; IFA, 不完全弗氏佐剂; Mb, 乳酪分枝杆菌; MOG, 髓鞘少突胶质细胞糖蛋白; Mt, 结核分枝杆菌; PT, 百日咳毒素。

Note. BN: Brown Norway rat; Lewis: Lewis rat; DA: Dark-Agouti rat; CFA: complete Freund's adjuvant; F: female; M: male; GP-MBP: guinea pig myelin basic protein; IFA: incomplete Freund's adjuvant; Mb: Mycobacterium butyricum; MOG: myelin oligodendrocyte glycoprotein; Mt: Mycobacterium tuberculosis; PT: pertussis toxin.

表 2 不同研究方案建立小鼠 EAE 模型特点^[10-19]

Tab. 2 Characteristics of the mouse EAE models established by different regimens

品种 Animals (性别)(sex)	抗原 Antigens (给予部位) (Administration sites)	临床病程 Clinical course	高峰期/d Peak (days)	最高临床得分 The highest clinical scores
SJL/J (F)	PLP + CFA + Mt(侧腹皮下)	复发-缓解病程	15 ~ 19	后肢瘫痪
SJL/J (F)	MOG + CFA + Mt(后肢足掌、尾部)	复发-缓解病程	40	后肢力弱
A. SW(F)	MOG + CFA + Mt(后肢足掌、尾部)	急性病程	60 ~ 90	后肢力弱
F1 (SJL/J_C57BL/6)	MOG + CFA + Mt(后肢足掌、尾部)	复发-缓解病程	19	严重的后肢瘫痪四肢无力
SJL/J (F)	PLP + CFA + Mt(后肢足掌、尾部)	复发-缓解病程	17 ~ 23	严重的后肢瘫痪四肢无力
F1 (SJL/J_C57BL/6)	PLP + CFA + Mt(后肢足掌、尾部)	急性病程	19 ~ 23	严重的后肢瘫痪四肢无力
C57BL/6	PLP + CFA + PT(侧腹皮下)	慢性病程	23 ~ 25	后肢瘫痪
C57BL/6	MOG(侧腹皮下)	复发-缓解病程	14 ~ 20	后肢瘫痪
C57BL/6	MBP-PLP + CFA + PT(侧腹皮下)	慢性病程	10 ~ 20	后肢瘫痪

注: SJL/J, SJL/J 小鼠; A. SW, A. SW 小鼠; F1 SJL/J_C57BL/6, SJL/J 与 C57BL/6 小鼠杂交 F1 代; C57BL/6, C57BL/6 小鼠; CFA, complete Freund's adjuvant 完全弗氏佐剂; F, female 雌性; M, male 雄性; PLP, proteolipid protein 蛋白脂蛋白; MBP, myelin basic protein, 髓脂质碱性蛋白; MOG, myelin oligodendrocyte glycoprotein; Mt, Mycobacterium tuberculosis 结核分枝杆菌; PT, pertussis toxin. 百日咳毒素。

Note. SJL/J: SJL/J mouse; A. SW: A. SW mouse; F1 SJL/J_C57BL/6: SJL/J and C57BL/6 mice, hybrid F1 generation; C57BL/6: C57BL/6 mouse; CFA: complete Freund's adjuvant; F: female; M: male; PLP: proteolipid protein; MBP: myelin basic protein; MOG: myelin oligodendrocyte glycoprotein; Mt: Mycobacterium tuberculosis; PT: pertussis toxin.

不同品种和不同品系的实验动物诱导 EAE 的易感性和临床特点不同,这归因于主要组织相容性复合体基因的多样性表达^[13]。从这个角度来讲,每种动物建立的 EAE 模型在 MS 的研究中都具有一定的意义。在过去 30 年中,大鼠和小鼠是建立 EAE 最多的实验动物。如表 2 所示大鼠自行恢复的急性病程的 EAE,提供了研究有关诱导和恢复阶段的机制的模型。有些大鼠品系即使给予低剂量抗原的情况下,仍然显示可预测的临床症状和统一的敏感性^[16]。大鼠 EAE 的病理学特征为在脊髓、脑干和脑实质的血管周围单个核细胞浸润。大鼠 EAE 不同与人类 MS 的主要特点是髓鞘脱失对大鼠的影响是微乎其微的。因此,引起瘫痪的最重要很可能是水肿和炎症^[17]。而小鼠的病理学特点与人类相似^[18],在慢性进展型病程和复发缓解型病程上均可见脱髓鞘特征。小鼠建立 EAE 的优点还包括的敏感品系较多,可用的实验试剂较多,在转基因小鼠上研究遗传学的易感性。

小鼠建立 EAE 的主要缺陷是相对于易感大鼠,小鼠通常更难以诱导 EAE,小鼠对 EAE 相对抵抗,体现为发病率和发病时间的差异,以及需要佐剂辅助诱发疾病。除了使用百日咳毒素作为辅助补充外,往往需要多次注射高剂量的抗原^[15]。

使用灵长类动物(如恒河猴和狨猴),在遗传学和免疫学上具有接近人类的优势^[20]。在灵长类动物建立 EAE,主要表现为慢性病程,急性炎症和脱髓鞘,伴随不断形成新的免疫活性受伤^[21]。但使用 MBP 和 MOG 诱导灵长类(猕猴)动物,表现为急性病程。病理以广泛的中性粒细胞浸润、坏死、白质破坏,从而影响髓鞘及轴突^[22]。狨猴对重组、人类 MOG 和完全福氏佐剂的乳剂高度易感,相比之下,无百日咳毒素的 MBP 是一种弱抗原^[23]。

4 CFA 在 EAE 建立过程中的影响

大多数 EAE 模型的建立方案中均采用完全弗氏佐剂(complete Freund's adjuvant, CFA), CFA 是多种研究中最常应用的免疫佐剂,佐剂的作用是通过降低机体对抗原的破坏,从而延迟机体对抗原的免疫耐受。促进抗原的弥散,使抗原逐渐而持续的对机体发挥免疫原性。另外,在 EAE 模型的建立方案中多采用分歧杆菌,以扩大免疫效应,导致淋巴结增生,主要激发 T 细胞介导的免疫反应^[5,6]。

不论是皮下或者皮内注射 CFA,均有助于促进细胞免疫反应的强度。从而激发多种自身免疫性疾病。然而,单独使用 CFA 本身就能够诱导强烈的炎症反应,产生众多的免疫调节功能,甚至导致局部皮肤的肉芽肿和坏死。将 CFA 注射入动物足掌底部时, CFA 能够引起局部慢性疼痛,潜藏有慢性伤害感受性的机制,可以用于慢性疼痛的研究。鉴于此,在 EAE 模型建立过程中,注射 CFA 时,应当采用合理的方案,选用恰当的剂量和适宜的部位。CFA 还可以提高 EAE 模型血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)的通透性和导致 CNS 血管周围血清蛋白渗出^[21]。

在没有 CFA 的情况下,使用 MBP 抗原腹腔注射免疫 Lewis 大鼠,需要重复注射抗原的同时使用次氯酸钠预处理(增加淋巴结对 MBP 的吸收程度)和百日咳毒素作为免疫佐剂。另一个方案是直接注射 MBP 水溶液到腭窝淋巴结,并且于致敏前 3 周给予金属锡作为致敏剂。

5 发展新的 EAE 模型的原则

EAE 与人类 MS 尚存在一定的差距,要建立能够更好的反映人类 MS 发病机制的 EAE 模型,必须注意以下几点^[24,25]:①人类与实验动物在遗传学上

的差异,虽然鼠类和狨猴等实验动物与人同属哺乳动物,但是在遗传学上还是有巨大的差异;②MS 的发病与环境密切相关;③MS 临床病程的特点:建立与人类 MS 临床病程特点更加吻合的 EAE 模型;④病理机制:MS 的病理特征是其区别与其他疾病的最主要特征;⑤临床治疗反应:建立 EAE 的最终目的是治疗 MS,因此,建立的 EAE 要能够反映 MS 的临床治疗反应。遗传学上的差异在任何实验动物上均存在。目前,研究者几乎不可避免的使用近交系动物,然而临床治疗反应才是决定药物安全性、有效性、代谢的主要因素。

综上所述,EAE 模型的建立是涉及多因素研究工作,选用实验动物,抗原、佐剂以及抗原给予部位等因素均能够影响 EAE 模型的发病特点及其病理变化。研究出能够真实、准确还原人类 MS 特点的 EAE,是 EAE 研究发展的最终目标。与此同时,研究者需要根据研究目的选择恰当的 EAE 建立方案。

参 考 文 献

- [1] Rivers TM, Schwentker FF. Encephalomyelitis accompanied by myelin destruction experimentally produced in monkeys [J]. J Exp. 1935, 61(5):689-702.
- [2] Levine S, Sowinski R. Experimental allergic encephalomyelitis in inbred and outbred mice [J]. J Immunol, 1973, 110(1):139-143.
- [3] Simone A, Teixeira, Ana A. et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis: a heterogeneous group of animal models to study human multiple sclerosis. [J]. Inflamm Infect Dis. 2005, 2(2):127-134.
- [4] Steinman L, Zamvil SS. How to successfully apply animal studies in experimental allergic encephalomyelitis to research on multiple sclerosis [J]. Ann Neurol, 2006, 60(1):12-21.
- [5] Paterson PY. Transfer of allergic encephalomyelitis in rats by means of lymph node cells [J]. J Exp Med, 1960, 111(1):119-136.
- [6] Levine S. Experimental allergic encephalomyelitis production by myelin basic protein adsorbed on particulate adjuvants [J]. Immunology, 1972, 23(4):609-614.
- [7] Raivicha G, Banati R. Brain microglia and blood-derived macrophages: molecular profiles and functional roles in multiple sclerosis and animal models of autoimmune demyelinating disease [J]. Brain Res Rev, 2004, 46(3):261-281.
- [8] Friese MA, Montalban X, Willcox N. et al. The value of animal models for drug development in multiple sclerosis [J]. Brain, 2006, 129(Pt 8):1940-1952.
- [9] Schluesener HJ, Sobel RA, Linington C. et al. A monoclonal antibody against a myelin oligodendrocyte glycoprotein induces relapses and demyelination in central nervous system autoimmune disease [J]. J Immunol 1987, 139(12):4016-4021.
- [10] Petzold A, Baker D, Pryce G, et al. Quantification of neurodegeneration by measurement of brain-specific proteins [J]. J Neuroimmunol, 2003, 138(1-2):45-48.
- [11] Martenson RE, Deibler GE, Kies MW. Myelin basic proteins of the rat central nervous system. Purification, encephalitogenic properties, and amino acid compositions [J]. Biochim Biophys Acta, 1970, 200(2):353-362.
- [12] Wekerle H, Kojima K, Lannes-Vieira J, et al. Animal models. Ann Neurol, 1994, 36(Suppl):S47-S53.
- [13] 关东升, 高颖, 朱陵群. C57BL/6J 小鼠实验性自身免疫性脑脊髓炎模型的建立及其病理特征 [J]. 中国实验动物学报, 2008, 6(16):406-409.
- [14] Stromnes IM, Goverman JM. Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis [J]. Nat Protoc, 2006, 1(4):1952-1960.
- [15] Pappalardo LW, Liu S, Black JA. et al. Dynamics of sodium channel Nav1.5 expression in astrocytes in mouse models of multiple sclerosis [J]. Neuroreport. 2014, 25(15):1208-1215.
- [16] Savarin C, Hinton DR, Valentin-Torres A, et al. Astrocyte response to IFN- γ limits IL-6-mediated microglia activation and progressive autoimmune encephalomyelitis [J]. J Neuroinflamm, 2015, 12(1):79-86.
- [17] Liu Z, Xu Y, Zhang X, et al. The motorized RhoGAP myosin IXb (Myo9b) in leukocytes regulates experimental autoimmune encephalomyelitis induction and recovery [J]. J Neuroimmunol. 2015, 15(282):25-32.
- [18] Abramowski P, Steinbach K, Zander AR, et al. Immunomodulatory effects of the ether phospholipid edelfosine in experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. J Neuroimmunol. 2014, 274(1-2):111-124.
- [19] Sakuma H, Kohyama K, Park IK, et al. Clinicopathological study of a myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced demyelinating disease in LEW.1AV1 rats [J]. Brain, 2004, 127(10):2201-2213.
- [20] Ovadia H, Siegal T, Weidenfeld J. Delayed central nervous system irradiation effects in rats—part 2: aggravation of experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. Neuroimmunomodulation, 2013, 20(1):51-56.
- [21] Laman JD, van Meurs M, Schellekens MM, et al. Expression of accessory molecules and cytokines in acute EAE in marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*) [J]. J Neuroimmunol, 1998, 86(1):30-45.
- [22] Stewart WA, Alvord EC Jr, Hruby S, et al. Magnetic resonance imaging of experimental allergic encephalomyelitis in primates [J]. Brain, 1991, 114(Pt2):1069-1096.
- [23] Brok HP, Uccelli A, Kerlero De Rosbo N, et al. Myelin/oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis in common marmosets: the encephalitogenic T cell epitope pMOG24-36 is presented by a monomorphic MHC class II molecule [J]. J Immunol, 2000, 165(2):1093-1101.
- [24] Lassmann H, Bruck W, Lucchinetti C. Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy [J]. Trends Mol Med, 2001, 7(3):115-121.
- [25] Sriram S, Steiner I. Experimental allergic encephalomyelitis: a mis-leading model of multiple sclerosis [J]. Ann Neurol, 2005, 58(6):939-945.

[收稿日期] 2015-05-11