

· 论著 ·

实验性自身免疫性肌炎动物模型制作

方琪 马红岗 董万利 曹健 徐嵩

【摘要】 目的 研究实验性自身免疫性肌炎动物模型的制作方法。方法 将实验用 SD 大鼠分为 A(对照组), B(常用剂量组), C(加大剂量组)。采用豚鼠骨骼肌的肌匀浆球蛋白加完全弗氏佐剂(含卡介苗)以不同浓度多次免疫各组大鼠。制成实验性多发性肌炎的模型, 观察其临床表现、肌电图、肌酶谱、磁共振及骨骼肌、心肌和肺的病理改变。结果 C 组症状出现较 B 组早且重, 肌酶谱升高更显著; 模型组肌电图均有肌源性损害表现; 磁共振检查 B 组和 C 组选送标本中各有 1 只阳性改变; B 组有 11 只, C 组全部大鼠骨骼肌出现病理改变, 随机选送的心肌标本中有 3 只阳性改变, 肺标本中有 1 只阳性改变。结论 免疫机制与多发性肌炎发病有关; 适当加大抗原免疫剂量可以获得更为典型的动物模型。

【关键词】 多发性肌炎; SD 大鼠; 免疫; 动物模型

【中图分类号】 R593 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 0253-3685(2008)07-0721-03

Establishment of the animal model of experimental autoimmune myositis FANG Qi, MA Honggan, DONG Wanli, et al. Department of Neurology, Affiliated First Hospital, Soochow University, Suzhou 215006, CHINA

【Abstract】 Objective To find out a method for establishing the animal model of experimental autoimmune myositis. Methods SD rats were divided 3 groups of control(A) normal dose(B) and large dose model group(C). The animal model of experimental polymyositis was induced by repeatedly immunizing the three groups of rats with guinea pig skeletal muscle homogenates added to Freund's complete adjuvant (CFA) (containing BCG vaccine). The clinical presentations, electromyogram, serum muscle enzymes, MRI, pathology of cardiac muscle and lung were observed. Results Group C had the symptoms earlier and more severe than group B. The serum enzymes in group C increased significantly compared with those in the other groups. Sarcous harmfulness was seen on electromyogram in model groups. MRI showed positive change in one rat of group B and in one rat of group C. Skeletal muscles taken from group C and 11 rats of group B had pathological changes. Three random cardiac muscle samples had positive changes, and positive change was seen in one lung sample. Conclusion Immunity mechanism is related to polymyositis. A better classical animal model may be established by properly increase of antigen immunity dosage.

【Key words】 Polymyositis; SD rats; Immunity; Animal model

[Jiangsu Med J, July 2008, 34(7):721-723.]

多发性肌炎(PM)是一组以骨骼肌间质性炎症和肌纤维变性为特征的综合症。临床报道表明部分 PM 患者除肌肉病变外,尚有心肌、肺的病变存在^[1,2]。尽管近年来 PM 的发病机制、病理改变、治疗方法及疗效上取得一定进展,但仍有许多问题尚待解决。制作实验性自身免疫性肌炎模型(EAM)不仅可以对 PM 的发病机制予以探讨,更重要的是为寻找有效的治疗方法提供理论依据。

材料与方 法

一、动物及试剂

40 只健康雄性 SD 大鼠(苏州大学实验动物中心提供),体重 200~220 g,随机分为 3 组, A(对照)组 8 只, B(常用剂量)组 16 只, C(加大剂量)组 16 只。

完全弗氏佐剂购于上海西格玛奥德一里奇公司。

二、动物模型制作

1. 肌匀浆制备 消毒条件下取豚鼠后肢骨骼肌,剔除神经、血管、筋膜等组织,剪碎后放入预冷的磷酸缓冲溶液(pH 7.2)30 min,冰水浴中用刀式匀浆机 1700 r/min 制成糊状,生理盐水稀释后,用四层粗纱布过滤,离心后取上清液,该上清液用 BCA (bicinchoninic acid)蛋白定量法测的蛋白含量为 32 mg/ml,将该上清液按 1:2 分装于两容器中,并用双蒸水分别稀释至 15 mg/ml 和 30 mg/ml,置于 -20℃ 冰箱中备用。

2. 免疫方法 免疫注射部位为双后肢皮下,双侧腹部皮下,尾根部皮下共 5 点。免疫剂量为每点 1 ml/kg,每周免疫 1 次,共 6 周。A 组免疫物为 CFA 加等量的生理盐水; B 组免疫物为 CFA 加等

EAM 模型制成原理、方法予以探讨。

PM 的临床表现为对称性近端肌肉无力,肌痛,严重者伴颈肌无力,吞咽困难或呼吸肌受累。C 组较 B 组大鼠症状出现早,症状也更严重。C 组中有 4 只大鼠在免疫第 5 周后体重明显减轻,进食量极少,可能除食欲差外,与咽喉部骨骼肌及食管上端肌肉受累引起的吞咽困难有关。

血清肌酶谱升高多在病程的活动期,CK、LDH、AST 广泛存在于肌细胞浆中,当肌纤维炎症病变时,肌细胞被破坏或肌细胞膜通透性增高,上述肌酶释放到血清中,导致血中肌酶谱增高,可较全面的反映病变的程度。其中 CK 敏感性最大(最高达正常值 20 多倍)。本实验中,C 组大鼠较 B 组大鼠血清肌酶谱增高更明显。表明适当加大免疫剂量,可以使肌酶谱增高,肌肉病变更严重。

肌电图是一种常用的肌肉病变检查方法^[4]。时限缩短,波幅降低,多相波增多是 PM 患者的主要肌电图表现^[5]。本实验通过对末次免疫 1 周后各组大鼠,对双后肢肌电图的时限、波幅和多相波的变化进行记录和分析,发现 B 组和 C 组大鼠的时限、波幅不同程度的缩短或降低,多相波增多,且 C 组较 B 组明显,B 组和 C 组与 A 组比较有明显统计学差异。本实验提示模型组大鼠有肌源性损害,且这种损害同时见于双侧后肢,说明病变为多发性而非局限性。本实验结果与绝大多数临床报道相符^[6,7]。

近年来,MRI 被应用于 PM 的诊断,因其对软组织的分辨率高,灵敏度高,能及时发现病变,正越来越被接受,作为诊断 PM 的新方法。在 PM 活动期,其受累的肌群可能出现 2 种 MRI 的主要表现^[8],即 T2WI 呈高信号,T1WI 呈等低信号或 T2WI 与 T1WI 均呈高信号,前者提示炎症水肿样病变,后者提示脂肪替代样病变。本实验 EAM 模型,MRI 影像学改变在 T1WI 上信号未见明显异常,在 T2WI 及 STIR 序列上均呈高信号改变,斑片状,说明病变处于炎症水肿期^[9]。本实验行 MRI 检查的大鼠样本较少,无法行阳性率统计。

肌肉病理是诊断 PM 的金标准。PM 较典型的表现肌纤维变性、坏死,间质内结缔组织增生,炎症细胞浸润,有时可有血管改变,表现为管腔狭窄或闭塞。本实验中,B 组有 11 只和 C 组全部大鼠骨骼肌出现 PM 病理改变,且 C 组尤为明显。模型组 8 只心肌标本中有 3 只出现阳性改变,其病理改变与骨骼肌表现相仿。在模型组 8 只肺标本中,有 1 只

有明显阳性改变,其表现为有蛋白渗出,炎症细胞浸润及小血管扩张改变。大量文献报道 PM 患者可能会合并肺间质病变(ILD)。但肺病理活检国内外报道较少。本实验肺组织活检有蛋白渗出,但未见明显纤维化改变,可能由于实验大鼠发病时间较短,尚处于亚急性期,故肺组织学改变相对较轻。由于样本较少,心肌和肺病理改变阳性率尚不具有统计学意义,但可以说明 PM 是一种除累及骨骼肌外还可损害多系统的一种疾病。

我们建立的 PM 大鼠模型,B 组实验动物制模成功率达 68.8%,与文献报道的 60%~74.1%相符^[10,11],C 组实验动物制模成功率则达到 100%,较文献报道大为提高,说明本试验 PM 动物模型的建立是成功的。所有实验大鼠无一例死亡,提示我们所用免疫剂量是安全的。C 组大鼠发病早,可以较早的筛选模型。实验表明,适当加大抗原免疫剂量可以提高制模成功率。

本试验中,实验组大鼠的临床表现,血清肌酶谱,肌电图和病理改变等特征均与人类 PM 相类似。肌肉磁共振和心肌、肺的病理改变也与诸多临床报道一致。表明实验性自身免疫性肌炎模型可以作为研究人类 PM 的一个重要工具,为研究人类肌炎的发病机理及治疗提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] 佟胜全,周新福,张奉春,等. 多发性肌炎或皮肌炎心脏损害的临床分析[J]. 中华风湿病学杂志,2005,9(10):605-608.
- [2] 周亚欧,左晓霞,游运辉,等. 皮肌炎/多发性肌炎肺间质病变的临床及相关因素分析[J]. 中华风湿病学杂志,2005,9(5):318-319.
- [3] 李彬,刘江波,郭德玉,等. 双侧颈动脉结扎大鼠行为学研究[J]. 中国实验动物学杂志,2000,10(1):15-18.
- [4] 宋玉强,沈定国. 多发性肌炎和皮肌炎患者的临床与肌电图分析[J]. 临床神经电生理学杂志,2002,11(4):217-219.
- [5] Milanov L, Ishpekova B. Differential diagnosis of chronic idiopathic polymyositis and neuromyositis[J]. Electromyogr Clin Neurophysiol,1998,38(3):183-187.
- [6] 高长玉,王彩娟,刘桂宇,等. 多发性肌炎和皮肌炎分期分型与实验室诊断指标相关性分析[J]. 中国实用内科杂志,2006,26(3):212-214.
- [7] 陆寅,张人美,刘运林,等. 多发性肌炎和皮肌炎 33 例肌电图与血清肌酶在病程中的演变[J]. 临床神经电生理学杂志,2004,13(3):143-145.
- [8] 郑贤应,慕容慎行,李银官,等. 磁共振成像在多发性肌炎/皮肌炎诊断中的应用[J]. 中华神经科杂志,2003,36(6):433-435.
- [9] Fraser DD, Frank JA, Dalaks M, et al. Magnetic resonance imaging(MRI) demonstrates muscle inflammation in idiopathic inflammatory myopathies[J]. Arthritis Rheumatism,1989,32(5):125-129.
- [10] 周倩,高玉祥,金惠玲,等. 青蒿琥酯对实验性免疫性肌炎动物模型的影响[J]. 中华皮肤科杂志,1998,30(4):241-243.
- [11] 赵宝胜,李萍,裴茂伟,等. 实验性多发性肌炎动物模型制作的研究[J]. 疑难病杂志,2002,1(4):194.

(收稿日期:2007-12-12) (供稿编辑:王 璐)