文章编号:1000-5404(2006)13-1397-04

论著

# nAChR单克隆抗体建立重症肌无力被动转移小鼠模型的研究

黄 志,徐秀娟 (重庆医科大学儿童医院神经内科,重庆 400014)

**提 要:目的** 采用乙酰胆碱受体(nAChR)单克隆抗体-mAb35建立C57BL/6幼年小鼠重症肌无力被动转移模型(passive transferred myasthenia gravis, PTMG),摸索成功建立动物模型的mAb35的有效剂量,为进一步探讨重症肌无力(myasthenia gravis,MG)的发病机制和免疫治疗提供实验动物模型。**方法** 将实验组分为3组(E1、E2、E3),分别经腹腔注射含0.5、1.0、1.5 mg/kg mAb35的Ringer's液0.2ml给B6幼年小鼠,对照组(N)注射不含mAb35的Ringer's液0.2 ml。观察其临床表现,并进行药理学、神经电生理学及电镜超微结构鉴定,同时检测血清中nAChRAb水平,以判断模型建立是否成功。**结果** 实验组小鼠表现不同程度的MG临床症状,电生理改变、药理学特征、血清学AChRAb升高及超微结构病理改变等均符合MG的病理生理特点。**结论** 利用AChR单克隆抗体-mAb35可在幼年C57BL/6小鼠成功建立PTMG模型,其有效剂量为1.0 mg/kg,该方法简便、可靠、敏感,为研究儿童MG提供了一种很好的实验动物模型。

**关键词**:重症肌无力;单克隆抗体;被动转移
**中图法分类号**:R-332; R392.11; R746.1 **文献标识码**:A

# Establishing animal model of passive transferred myasthenia gravis in C57BL/6 mice aged 4 to 5 weeks by acetylcholine receptor monoclonal antibody

HUANG Zhi, XU Xiu-juan (Department of Neurology, Children's Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400014, China)

**Abstract: Objective** To establish an animal model of passive transferred myasthenia gravis (PTMG) in C57BL/6 mice aged 4 to 5 weeks with nicotinic acetylcholine receptor monoclonal antibody-mAb35 so as to decide the effective dose of mAb35 required to induce PTMG and to supply animal model for further study of the pathogenesis and immunotherapy of human MG. **Methods** The C57BL/6 mice aged 4 to 5 weeks in the experimental group were divided into three subgroups (E1, E2, E3), injected intraperitoneally (i.p.) with 0.2 ml of Ringer's buffer solution containing 0.5, 1.0 or 1.5 mg/kg capital monoclonal antibody mAb35 of acetylcholine receptor respectively. The control group (N) were injected i.p. with 0.2 ml of Ringer's buffer solution without mAb35. To decide whether the model was successful, the clinical symptoms, ultrastructural changes of the mice as well as pharmacological and electrophysiological evaluation were observed and the serum levels of acetylcholine receptor antibody (AChRAb) were detected. **Results** All mice in the experimental groups were induced of clinic symptoms of myasthenia. The features in pharmacology, electrophysiology, ultrastructure and increased level of acetylcholine receptor antibody were in accordance with those of MG patients. **Conclusion** The model of PTMG can be successfully induced in C57BL/6 mice with mAb35 at effective dose of 1.0 mg/kg. The method is convenient and reliable. A fine animal model is established for experimental study of myasthenia gravis in children.

**Key words**: myasthenia gravis; monoclonal antibody; passive transfer

重症肌无力(myasthenia gravis,MG)是一种典型的获得性自身免疫性疾病,儿童MG是小儿神经内科常见的疾病之一,严重影响患儿及家长的身心健康和生活质量。实验性自身免疫性重症肌无力(experimental autoimmune myasthenia gravis,EAMG)动物模型,其在临床表现、药理学、神经电生理和免疫病理上都与MG有相似之处,是研究MG的公认的理想工具。

然而,目前国内外多选用8~12周的动物(大鼠、小鼠),采用Califernia电鳗提取的AChR进行主动免疫的方法建立EAMG模型,而通过被动免疫的方法来

作者简介:黄 志(1959-),男,四川省隆昌县人,硕士,主任医师,主要从事小儿神经系统疾病方面的研究。电话:(023)63622714,E-mail:huangzhi3500@yahoo.com.cn

收稿日期:2006-03-08;修回日期:2006-05-15

建立幼年小鼠的MG模型的研究尚少见报道。本研究选用4～5周龄的C57BL/6(B6)幼年小鼠,采用mAb35进行腹腔注射建立重症肌无力被动转移模型(passively transferred myasthenia gravis,PTMG),探讨其建立幼年小鼠PTMG的有效剂量和方法,为研究儿童MG的发病机制和免疫治疗提供一种较好的实验动物模型。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物和试剂

健康清洁级,雌性C57BL/6小鼠48只,4～5周龄,体质量12～14 g(第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供)。将实验动物分为实验组(E)和对照组(N),实验组又分为实验1、2、3组,每组12只。大鼠乙酰胆碱受体单克隆抗体mAb35(购自美国sigma公司),Ringer's缓冲液(140 mmol/L NaCl,5.4 mmol/L KCl,1 mmol/L $CaCl_2$,2.4 mmol/L $NaHCO_3$,pH 7.4)。

### 1.2 PTMG小鼠模型的建立

参照文献[1]报道,实验组每只小鼠分别按体质量0.5、1.0、1.5 mg/kg经腹腔注射含mAb35的Ringer's液0.2 ml,对照组各只仅注射Ringer's液0.2 ml。分别记为E1、E2、E3、N组。

### 1.3 指标检测

1.3.1 症状评估及临床评分 每12小时测量体质量,并每6～8 h观察动物毛色、步态及摄食情况。肌力按Lennon等[2]的分级法将其分为4级:0级,没有肯定肌无力表现;1级,撕咬无力,四肢力量较差,在光滑地面上前肢打滑,活动减少,且易疲劳;2级,明显无力,休息时脊背呈隆起姿势,头尾下垂,大腿外展,前肢趾弯曲,动作笨拙,行走不稳;3级,严重肌无力表现,无撕咬动作,肌肉震颤,呼吸困难,濒死或死亡。症状居各级中间者,分别评为0.5、1.5、2.5级。

1.3.2 药理学实验 将注射用甲基硫酸新斯的明(上海信宜制药厂,用量37.5 μg/kg)腹腔注射给实验小鼠,观察10～15 min后其症状有无改善,同时给予阿托品(上海和丰制药厂,用量15 μg/kg)以对抗甲基硫酸新斯的明可能产生的副作用[3]。

1.3.3 重复频率电刺激(RNS) 实验小鼠麻醉后(3.3%水合氯醛0.1 ml/10 g)固定于自制的解剖板上,将成对刺激针电极以2～3 mm距离平行插至坐骨切迹附近肌肉内,记录电极置于腓肠肌内侧头,参考电极插入腓肠肌肉内,地线插入刺激电极与记录电极之间,采用RNS软件进行。刺激频率分别为1、3、5、7、10 Hz,记录实验小鼠的腓肠肌肌电位及收缩波幅,用第4个电位对第1个电位的变化百分比D4表示衰减值,>10%者为阳性。

1.3.4 血清抗nAChRAb(IgG)水平的检测 致敏48 h后由小鼠股动脉取血并分离血清,用间接ELISA法测定小鼠血清AChRAb滴度(nAChR抗原由上海第二军医大学长海医院提供),以mAb35(5 mg/ml)作为阳性标准品,并设阴性和空白对照。

1.3.5 透射电镜观察运动终板的超微结构 模型建立48 h后,解剖显微镜下沿坐骨神经分离组织,于腓神经终末分支处迅速取下肌肉组织块(1 mm×1 mm×1 mm)。置于2.5%戊二醛中,4 ℃固定2 h,按常规电镜脱水、包埋程序制成超薄切片(70 nm),铀-铅双重染色后JEM-1200EX透射电镜下观察。

### 1.4 统计学分析

所有原始数据建立数据库,以$\bar{x}\pm s$表示,应用SPSS 11.5统计软件进行分析。不同时间点体重变化的比较采用重复测量资料的方差分析,多个实验组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用最小显著差法;不满足正态分布时进行非参数的秩和检验。

## 2 结果

### 2.1 症状观察及临床评分

实验组小鼠在注射mAb35后,6～8 h时部分小鼠出现临床症状,表现为摄食、运动减少,毛皱、易脱落失去光泽,肌张力低;12 h后体质量开始下降,至24 h实验组所有小鼠均出现轻重不等的EAMG临床症状:不能咀嚼,被动翻转不能复位等。其症状轻重、发展速度与注射剂量呈正相关。其中E1组小鼠表现为一过性体质量下降,活动减少,24 h后症状自发缓解;E2组小鼠则按时间变化依次出现上述典型的EAMG临床表现;E3组小鼠在36 h左右有5只因严重肌无力及呼吸肌麻痹而死亡。而对照组小鼠活动、摄食如常,无1例出现临床症状。各组小鼠体重变化、临床症状评分结果分别见表1和图1。

各组小鼠体重变化,E2、E3与对照组分别比较有显著性差异($P=0.046$,$P=0.012<0.05$)。

**表1 各实验组小鼠注射mAb35后体质量的比较(g,$\bar{x}\pm s$)**

| 组别 | 例数 | 注射mAb35后的时间($t$/h) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 0 | 12 | 24 | 36 | 48 |
| E1 | 12 | 13.06±0.37 | 12.89±0.40 | 12.69±0.45 | 12.87±0.45 | 12.91±0.45 |
| E2 | 12 | 13.09±0.49[a] | 12.81±0.49[a] | 12.56±0.51[a] | 12.23±0.54[a] | 11.89±0.52[a] |
| E3 | 12 | 13.15±0.37[a] | 12.79±0.41[a] | 12.36±0.48[a] | 12.04±0.50[a] | 11.73±0.51[a] |
| 对照组 | 12 | 13.01±0.40 | 13.23±0.42 | 12.92±0.45 | 13.18±0.48 | 13.13±0.52 |

E1、E2、E3分别为实验1、2、3组;a:$P<0.05$,与对照组比较

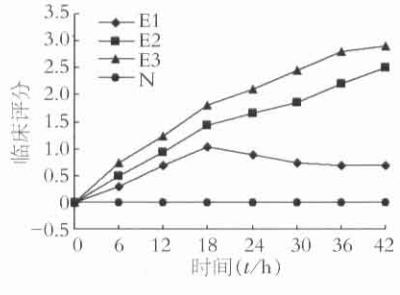



**图1 各组实验小鼠mAb35注射后临床症状评分**

### 2.2 药理学实验

各实验组小鼠于致敏后12～24 h出现临床症状,经腹腔注射甲基硫酸新斯的明10～15 min后,其症状均有不同程度的改善。值得注意的是,E3组有5只小鼠因出现严重的肌无力和

呼吸肌麻痹而死亡。其中 2 只在注射甲基硫酸新斯的明前已死亡，另外 3 只虽经腹腔注射甲基硫酸新斯的明，但其临床症状仍无法缓解，而死亡。

### 2.3　重复频率电刺激

各实验组小鼠出现不同程度波幅递减，E1 与对照组 RNS 衰减率均 <5%，为阴性。E2 与 E3 组小鼠的 RNS 衰减率均 >10%，为阳性，且以 E3 组小鼠的 RNS 衰减最为显著，见表 2。E1、对照组分别与 E2、E3 组比较有显著性差异（$P<0.01$）。

**表 2　各实验组小鼠 RNS 衰减率及血清 AChRAb 水平比较**

| 组别 | 例数 | RNS 衰减率（%） | AChRAb（μg/ml） |
|---|---|---|---|
| E1 | 12 | 3.60 ± 0.97 | $10.48 \pm 1.34^{b}$ |
| E2 | 12 | $14.40 \pm 2.27^{ab}$ | $27.69 \pm 1.45^{abc}$ |
| E3 | 7 | $15.71 \pm 3.45^{ab}$ | $38.23 \pm 1.10^{ab}$ |
| 对照组 | 12 | 2.60 ± 1.35 | 1.69 ± 0.79 |

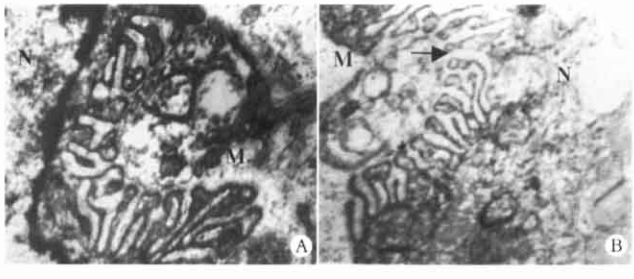
E1、E2、E3 分别为实验 1、2、3 组；a：$P<0.01$，与 E1 组比较；b：$P<0.01$，与对照组比较；c：$P<0.01$，与 E3 组比较

### 2.4　血清抗 AChRAb 水平的检测

对小鼠血清中的 AChRAb 水平进行定量检测，实验组（E1、E2、E3）高于对照组（N），其中以 E3 组 AChRAb 水平最高，提示与 mAb35 的注射剂量呈正相关。而对照组仅有低水平的 AChRAb 存在，结果见表 2。各组间两两比较均有显著性差异（$P<0.01$）。

### 2.5　运动终板超微结构电镜观察

由于实验组 2（E2）小鼠 MG 的临床表现和其他检查指标均与人类（儿童）MG 最接近，故从实验组（E2）小鼠和对照组（N）小鼠各随机选取 2 个标本，进行电镜超微结构观察。图 2A 示对照组小鼠运动终板突触后区域正常，突触后膜皱褶明显，分级清晰易辨，突触间隙正常。而实验组小鼠运动终板突触后区域简单化，突触后膜皱褶退化，分级减少并短缩，突触间隙略增宽，见图 2B。上述结果表明 PTMG 模型小鼠腓肠肌运动终板处发生了超微结构的病理变化，而这种改变符合 MG 运动终板的病理改变。




A：对照组；B：实验组；N：神经末梢；M：肌肉细胞；→：病变处

**图 2　小鼠运动终板超微结构电镜观察**　（TEM ×30 000）

## 3　讨论

众所周知，重症肌无力是由乙酰胆碱受体抗体（nAChRAb）介导并有补体参与，引起神经肌肉接头处乙酰胆碱传递障碍的自身免疫性疾病。虽然对 MG 的发病机制和治疗的研究已取得许多新的进展，但其确切的发病机制，尤其是免疫治疗方法的探讨尚有待进一步的加强和完善，因此研究实验性自身免疫性重症肌无力模型的制备具有重要的现实意义。

EAMG 模型主要通过主动免疫和被动免疫两种方法来建立。前者建模需用 AChR 免疫动物 3～5 次，历时 2～3 个月；后者是将 AChRAb 转移至动物体内，在短期内诱发 MG 症状，这种方法较前者所需时间短，且易于操作，目前国际上较多采用[1,4,5]。Loutrari 等[6]用 mAb35 被动转移大鼠建立的 PTMG 模型则属于第二种。mAb35 是大鼠 nAChR 的一种单克隆抗体，成分为 IgG1，可直接作用于多种品系 AChR α 亚单位主要免疫区肽段，并可与患者血清 IgG 竞争结合小鼠 AChR，是建立 PTMG 模型的理想抗体[7]。目前的研究表明，采用国内使用频率较高的昆明小鼠和 BALB/c 小鼠制作 PTMG，前者无 1 例成功，后者成功率仅为 30%，而 C57BL/6 小鼠对 PTMG 具有高度的易感性，产生 EAMG 几率为 50%～70%，故认为它是制作 PTMG 动物模型的最佳选择之一[3]。

本研究选用 mAb35 在 C57BL/6 幼鼠成功建立了 PTMG 模型，该模型具有以下特点：①用于建模的 C57BL/6 小鼠，年龄小（为 4～5 周龄），相当于学龄期儿童，但成功率很高，实验 E2、E3 组小鼠均出现肌无力症状。这是因为虽然人类大约有 60% MG 患者是在 40 岁之后首次出现症状，而小鼠动物模型的成功率却与年龄大小呈相反趋势，即年龄越小建模成功的几率越大，而年龄大的小鼠由于 B 淋巴细胞对 AChR 有记忆作用，所以能在一定的程度上抵抗 MG 的发生，反而成功率较低。同时另外一个目的是为研究儿童 MG 的发病机制、临床特征和免疫学治疗提供一种更为接近儿童 MG 的动物模型。②我们的研究与其他作者的意见相一致：PTMG 症状的轻重、发展速度的快慢与注射 mAb35 的剂量呈正相关[1]。即注射 mAb35 的剂量越小，幼鼠出现肌无力等症状越轻、越慢；反之越快、越重，甚至由于呼吸肌麻痹而发生死亡。我们的实验 E1 组幼鼠肌无力症状很轻，持续时间很短；实验 E3 组幼鼠肌无力症状很重，甚至由于呼吸肌麻痹而发生死亡 5 只；而实验 E2 组幼鼠肌无力症状很典型，持续时间较长，但无 1 只幼鼠由于呼吸肌麻痹而发生死亡，故我们认为 mAb35 1.0 mg/kg 是成功建立 C57BL/6 幼鼠 PTMG 的有效最佳剂量。③用 mAb35 在 C57BL/6 幼鼠成功建立的 PTMG 模型，其临床症状（肌无力和易疲劳性）、电生理改变（肌电图衰减）、药理学特征（新

斯的明实验阳性)、血清学抗体改变(AChRAb升高),形态学(电镜下超微结构)改变等特征均与MG患者相似。④mAb35经腹腔注射给C57BL/6幼鼠,方法简便、易于操作,且起病迅速,易于评估,同时还具有经济实惠,重复性好等其他动物品系无可比拟的优点。

综上所述,用mAb35诱导C57BL/6幼鼠建立PT-MG模型的特点是起病迅速,发病率高,易于观察,明确免疫攻击部位为终板的AChR,显示免疫病理学AChR特异性破坏。因此,它完全可以成为临床研究人类儿童MG的发病机制和免疫学治疗的一种可靠而理想的实验动物模型。

**参考文献:**


[1] POULAS K, TSOULOUFIS T, TZARTOS S J. Treatment of passively transferred experimental autoimmune myasthenia gravis using papain [J]. Clin Exp Immunol, 2000, 120(2): 363-368.

[2] LENNON V A, LAMBERT E H, LEIBY K R, *et al*. Recombinant human acetylcholine receptor alpha-subunit induces chronic experimental autoimmune myasthenia gravis[J]. J Immunol, 1991, 146(7): 2245-2248.

[3] BERMAN P W, PATRICK J. Experimental myasthenia gravis. A murine system[J]. J Exp Med, 1980, 151(1): 204-223.

[4] PAPANATASIOU D, POULAS K, KOKLA A, *et al*. Prevention of passively transferred experimental autoimmune myasthenia gravis by Fab fragments of monoclonal antibodies directed against the main immunogenic region of the acetylcholine receptor[J]. J Neuroimmunol, 2000, 104(2): 124-132.

[5] KAMINSKI H J, LI Z, RICHMONDS C, *et al*. Complement regulators in extraocular muscle and experimental autoimmune myasthenia gravis [J]. Exp Neurol, 2004, 189(2): 333-342.

[6] LOUTRARI H, KOKLA A, TZARTOS S J. Passive transfer of experimental myasthenia gravis *via* antigenic modulation of acetylcholine receptor[J]. Eur J Immunol, 1992, 22(9): 2449-2452.

[7] VENKATESH N, IM S H, BALASS M, *et al*. Prevention of passively transferred experimental autoimmune myasthenia gravis by a phage library-derived cyclic peptide[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(2): 761-766.


(编辑 王 红)

# 个案与短篇

文章编号:1000-5404(2006)13-1400-01

## 风湿性心脏病左心房血栓华法林溶栓疗效及溶栓后行二尖瓣球囊扩张术的风险评价

庞小华,李庆平,杨建军,牟华明,邬 江,冯促进,涂雪梅 (重庆三峡中心医院心血管内科,重庆 404000)

风湿性心脏病二尖瓣狭窄患者,特别是合并房颤者左心房血栓发生率非常高,一旦血栓形成,不但脑卒中或其他部位栓塞的机会明显增高[1],同时也使大量具有良好条件进行二尖瓣球囊成形术(PBMV)的患者失去治疗机会。既往有使用小剂量华法林治疗的经验[2],但我们体会该方法抗凝溶栓疗程较长,在此过程中栓塞发生或心功能加重的可能性增加。本研究拟探讨常规剂量华法林治疗后PBMV的疗效及风险。

### 1 资料与方法

#### 1.1 病例选择

本院心血管内科临床诊断风心病,常规经胸超声心动图(TTE)检查确诊154例,发现左房血栓者37例,其中窦性心律2例,房颤35例,其中11例拟行外科瓣膜置换术或放弃治疗者未纳入治疗组。符合PBMV瓣膜条件者26例,心功能Ⅱ~Ⅲ级,其中男性9例,女性17例,年龄18-58岁,平均34岁。26例患者均行经食道超声心动图(TEE)检查和治疗随访。

#### 1.2 方法

超声心动图机使用美国GE公司Vivid 7型超声显像仪,TTE为M3S探头,频率为1.5~4.0 MHz,TEE为T6探头,频率为2.9~6.7 MHz。PT-INR化验采用日本Sysmex公司CA-6000检验分析仪。超声心动图测量指标:①二尖瓣口面积(MVA);②二尖瓣口平均跨瓣压差(MPG);③二尖瓣的形态结构超声积分(score);④血栓最大体积(EM);⑤左心房舒张期内径(LA)。

治疗观察组共计26例,所有患者初始剂量给予2.5 mg/d,1周后检查PT-INR值,以1.5为理想目标,并据此调整剂量,最大达3.75 mg/d,以后2周、1个月、2个月分别检测。用药1、2、3个月左右复查TTE,发现血栓消失者即行TEE检查,再次证明左房无血栓者即行PMMV手术。用药期间无明显出血并发症发生。平均用药剂量3 mg/d。

### 2 结果

21例患者TTE结果是:MVA:(0.8±0.16)$cm^2$;MPG:(1.52±0.56)kPa;LA:(48.4±4.5)mm;score:(7.2±1.6);EM:5.6 cm×4.3 cm×3.6 cm,最小体积0.8 cm×1.0 cm×1.2 cm,平均2.2 cm×2.6 cm×1.7 cm;所有患者瓣膜Wilkins积分<8分,具有PBMV手术的瓣膜条件。本组病例中未见机化血栓。

华法林治疗及随访效果:26例患者中,1个月时TTE复查血栓均未消失,但有17/26例(63.38%)发现血栓明显缩小;

(下转1406页)

作者简介:庞小华(1963-),男,重庆市人,副主任医师,主要从事心血管介入方面的研究。电话:(023)58273588

收稿日期:2005-08-24;修回日期:2005-10-05