论 著 文章编号:0253-3626(2008)11-1319-04

用hTSHR活化脾细胞免疫小鼠建立Graves病动物模型的研究

何 云[1],刘 纯[1],张 徽[2],张 琳[1],詹升华[1],李秀娟[1],随 华[1]

(1. 重庆医科大学附属第一医院内分泌科,重庆 400016; 2. 重庆医科大学基础医学院病理教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:用人促甲状腺激素受体活化的脾细胞免疫同源雌性BALB/c小鼠建立Graves病动物模型。方法:第一阶段,将6~8周龄的雌性BALB/c小鼠随机分为2组(a组和b组),分别用重组质粒pcDNA3.1/hTSHR和空质粒pcDNA3.1免疫,第3和6周加强免疫2次。18周时分别处死两组小鼠,分离其脾细胞。第二阶段,分别取a组和b组小鼠的脾细胞免疫同源的两组6~8周龄的雌性BALB/c小鼠(实验组和对照组),4周后光镜和电镜检查甲状腺组织,并测定小鼠血清TT4、TSH和TRAb水平。结果:实验组约44%小鼠甲状腺组织见明显增生,滤泡上皮细胞增多、变大呈立方形,部分突向滤泡腔内;散在免疫细胞侵润。电镜下见滤泡上皮细胞胞浆内有丰富的线粒体和粗面内质网,腔面有发育良好的微绒毛。实验组血清TT4高于对照组(7.13±1.02与6.43±0.57 μg/dl)($P<0.05$)、TSH水平低于对照组(0.070±0.032与0.098±0.020 μIU/ml) ($P<0.05$)。其中4只小鼠可能发生了甲状腺功能亢进,1只小鼠可能发生了亚临床甲状腺功能亢进。结论:hTSHR活化脾细胞免疫BALB/c小鼠可以有效地产生类似人类Graves病的动物模型。

【关键词】Graves病;促甲状腺激素受体;脾细胞;免疫

【中国图书分类法分类号】R581.11 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-04-01

Model establishment of Graves' disease by immunizing mice with hTSHR-activated splenocytes

HE Yun, et al

(*Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*:To establish an animal model of Graves' disease by immunizing syngeneic BALB/c mice with hTSHR-activated splenocytes. *Methods*:The female BALB/c mice(6~8 weeks) were randomly divided into 2 groups(group a and group b), which were immunized with recombinant plasmid pcDNA3.1/hTSHR and blank plasmid pcDNA3.1(+) respectively for 3 times at 3-week intervals.The animals were sacrificed at 18th week and their splenocytes were isolated.Other two groups of female syngeneic BALB/c mice(6~8 weeks) were divided randomly into experimental and control groups, which received splenocytes from group a and group b respectively. Four weeks later, the thyroid glands were removed for histological examination and the sera were determined for Total T4,TSH and TRAb measurements. *Results*:The thyroid tissues under light microscope displayed diffuse hypercellularity with the follicular epithelia being tall cuboidal cells and reduced colloid in 44% of experimental mice with irregular apical poles protruding into the follicular space; there was minimal immune cell in the interstitium with hyperaemia and edema. Electron microscope examination revealed that the follicular epithelia contained numerous mitochondria and rough endoplasmic reticula,and many long microvilli existed in the luminal surface.The serum level of TT4 in experimental mice was higher than that in control(7.13±1.02 vs 6.43±0.57 μg/dL) ($P<0.05$).The serum level of TSH in experimental mice was lower than that in control(0.070±0.032 vs 0.098±0.020 μIU/ml) ($P<0.05$).Hyperthyroidism probably appeared in 4 mice and subclinical hyperthyroidism in 1 mouse. *Conclusion*:We have effectively induced an animal model which mimics some characteristics of human Graves'disease via splenocytes from the animals immunized with recombinant plasmid pcDNA3.1/hTSHR.

【Key words】 Graves'disease;Thyrotropin receptor;Splenocyte;Immunization

Graves病(Graves' disease,GD)是临床常见的器官特异性自身免疫性疾病,其确切的发病机制仍不是很清楚。合适的GD动物模型可以促进对其病因学、病理生理学和治疗学等的深入研究。本课题组成功构建的含有人促甲状腺激素受体(Human thyroid stimulating hormone receptor,hTSHR)基因全长cDNA的真核表达质粒pcDNA3.1/hTSHR 为建立GD

作者介绍:何 云(1972-),女,主治医师,硕士,研究方向:甲状腺疾病。

通讯作者:刘 纯,女,教授,E-mail:liuchun200157@sina.com。

基金项目:重庆市卫生局重点科研基金资助项目(01-1-104)。

动物模型奠定了重要基础。本研究在基因免疫基础上用hTSHR cDNA活化的脾细胞免疫同源BALB/c小鼠,复制出了与人类GD相似的动物模型。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康清洁级BALB/c小鼠49 只,雌性,6~8 周,体重20~25 g,分两批购自重庆医科大学实验动物中心。

1.2 主要试剂及仪器

pcDNA3.1和pcDNA3.1/hTSHR重组质粒(由本课题组构建),大量质粒制备试剂盒(德国QIAGEN公司),T4放射免疫试剂盒(北京原子高科核技术应用股份有限公司),TSH免疫放射剂盒(德国Diasorin公司),TRAb ELISA试剂盒(美国LIFEKEY BioMeditech公司),淋巴细胞分离液(北方同正生物技术发展公司),透射电镜(PHILIPS TECNAI 10型)。

1.3 方法

1.3.1 质粒提取 pcDNA3.1/hTSHR重组质粒保存于DH5a大肠杆菌中,按照QIAGEN质粒大量提取试剂盒说明书操作大量提取质粒DNA,经紫外分光光度计鉴定纯度、琼脂糖凝胶电泳鉴定质粒完整性并定量,磷酸盐缓冲液(PBS)调整为100 μg/200 μl。

1.3.2 基因免疫第一批小鼠 第一批BALB/c小鼠23只,随机分为a组(18 只)和b组(5 只)。免疫前5 d所有小鼠胫前肌注射0.25%布比卡因和0.1%对羟基苯甲酸甲酯预处理。第0 d,a组小鼠胫前肌注射100 μg的pcDNA3.1/hTSHR cDNA;b组相同部位注射100 μg的pcDNA3.1 cDNA。第3周和第6周分别于相同部位加强免疫。

1.3.3 制备脾细胞悬液 18周后处死第一批小鼠,无菌取其脾脏,剪碎制成匀浆,Hank's液稀释,然后200目不锈钢网过滤,制成细胞悬液,轻轻加入到淋巴细胞分离液的上层,离心(1 000 r×10 min),吸取中层细胞,用Hank's液清洗2次,台盼兰染色计数细胞,活细胞数>95%。用PBS液调整细胞浓度为10^6 个/100 μl,置4℃冰箱保存备用。

1.3.4 脾细胞免疫第二批小鼠 第二批小鼠26 只, 随机分为实验组(E,16 只)和对照组(C,10 只)。实验组小鼠尾静脉注射a组小鼠的hTSHR cDNA活化的脾细胞10^6个(脾细胞溶于PBS);对照组小鼠尾静脉注射10^6个b组小鼠的非活化脾细胞10^6个。免疫后4周处死小鼠。

1.4 观察指标

1.4.1 甲状腺组织学观察 取小鼠甲状腺和眼眶组织,常规石蜡包埋切片,HE染色,光镜下病理形态观察。另部分置入2%戊二醛PBS固定液4℃固定2h,PBS缓冲液4℃洗涤2次,每次10 min,再以1%锇酸PBS固定液4℃固定2h,PBS缓冲液再次漂洗。梯度乙醇脱水, 环氧丙烷置换,618包埋液浸透包埋。LKBV型超薄切片机切片, 枸橼酸铅染色液染色。Philips TECNAI透射电镜观察并摄片。

1.4.2 血清TT4、TSH和TRAb检测 血清T4、TSH和TRAb分别按照试剂盒说明书用放射免疫法、免疫放射法和ELISA法测定,所有标本同批测定。

1.5 统计学处理

数据分析以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,用统计分析软件SAS 8.1处理数据,组间均数比较采用两样本t检验和Satterthwaite近似t检验,以$P<0.05$作为有统计学意义。

2 结 果

2.1 甲状腺组织形态学改变

2.1.1 光镜检查 对照组小鼠甲状腺滤泡中等大小,上皮细胞呈低立方形,部分为扁平状,滤泡中胶质含量多(图1)。成模小鼠甲状腺内有明显的滤泡增生,滤泡上皮细胞增多变大呈高立方形,少许滤泡中可见小乳头形成,滤泡腔内胶质含量少,部分可见吸收空泡(图2);滤泡间血管扩张充血,见散在炎症细胞侵润(图3)。

2.1.2 透射电镜检查 对照组小鼠甲状腺滤泡上皮细胞呈扁平状,胞浆内见少量粗面内质网和线粒体(图4)。成模小鼠的甲状腺组织呈现功能活跃征象:上皮细胞变大呈立方形,胞浆内有丰富的线粒体和

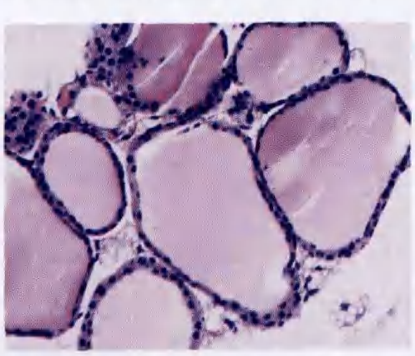


图 1 对照组小鼠甲状腺滤泡(HE×400)

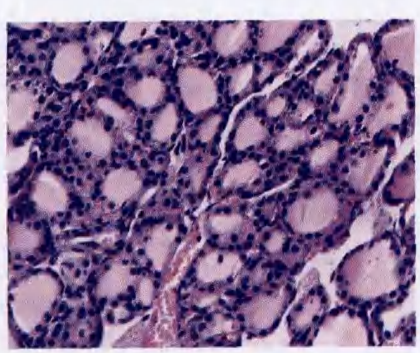


图 2 成模小鼠甲状腺滤泡(HE×400)

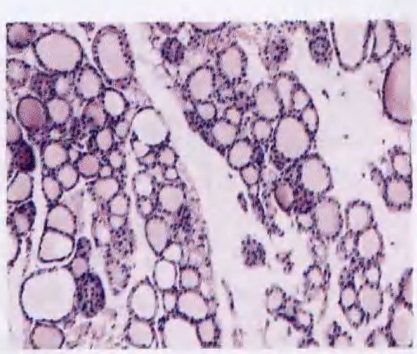


图 3 成模小鼠甲状腺滤泡间散在炎症细胞(HE×200)

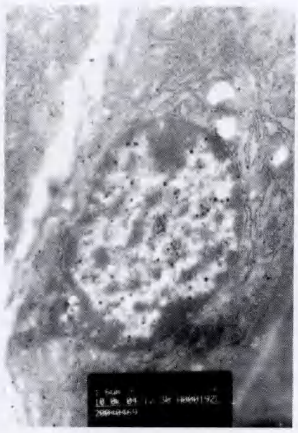


图 4 对照组小鼠甲状腺组织形态学(EM)

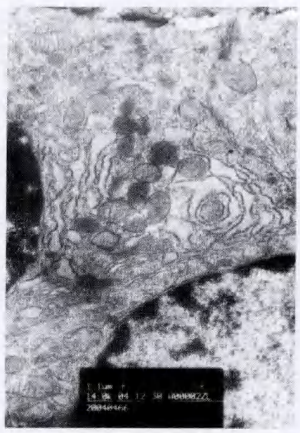


图 5 成模小鼠甲状腺上皮细胞浆内线粒体和粗面内质网(EM)

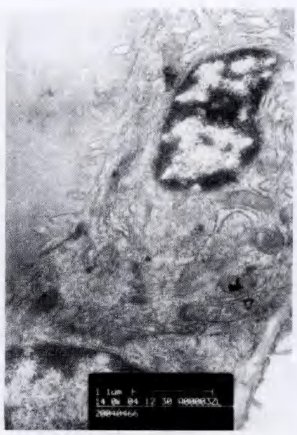


图 6 成模小鼠甲状腺上皮细胞腔面丰富的微绒毛(EM)

表1 小鼠血清TT4、TSH和TRAb水平($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	TT4(μg/dL)	TSH(uIu/ml)	TRAb
实验组	16	7.13±1.02*	0.070±0.032*	0.202±0.057
对照组	10	6.43±0.57	0.098±0.020	0.151±0.055
正常范围	-	5.29~7.57	0.058~0.138	0.041~0.261

注：* 与对照组相比，$P<0.05$

粗面内质网，粗面内质网池扩张，其内充满低密度物质(图5)，上皮细胞腔面有发育良好的微绒毛(图6)。

2.2 甲状腺功能

实验结束时，两组间小鼠甲状腺功能有显著差异($P<0.05$)，如表1所示，模型组小鼠血清TT4水平显著高于对照组，而血清TSH则低于对照组。以对照小鼠血清TT4的$\bar{x}+2s$为正常TT4水平上限，以对照小鼠血清TSH的$\bar{x}-2s$为正常TSH下限，具甲状腺组织学改变7只小鼠中有4只的血清TT4升高、TSH降低，另1只血清TSH低但TT4水平在正常范围内，血清学指标分别符合甲亢和亚临床甲亢。

2.3 血清TRAb

以对照小鼠血清TRAb的$\bar{x}+2s$为正常小鼠TRAb上限，模型组血清TRAb效价在正常范围内。从表1可见实验组的血清TRAb效价绝对值略高于对照组，但无统计学意义。

3 讨 论

尽管近年来对GD的认识日益深入，但在病因与发病机理等方面的研究仍未完全阐明，其原因之一就是缺乏合适的动物模型。理想的GD动物模型应具有如下特点[2]：(1)血清甲状腺激素水平升高和/或TSH水平降低。(2)存在有活性的TRAb，最好是甲状腺刺激性抗体(TSAb)。(3)甲状腺有相应病理改变。(4)淋巴细胞侵润的甲状腺炎。(5)甲亢的临床表现如体重减轻等。(6)类似甲状腺眼病(Graves眼病)的表现。(7)胫骨前皮肤淋巴细胞侵润。

目前国外建立GD动物模型的方法有多种，主要包括①hTSHR cDNA胫前肌注射[3]及皮内注射[4]；②同时表达全长hTSHR和 MHC Ⅱ类分子的纤维母细胞腹腔注射[5]；③外源性注入TSHR活化脾细胞[6,7]；④表达TSHR的重组腺病毒载体肌肉注射[8]；⑤TSAb转基因小鼠模型[9]。这些方法在不同种系小鼠中复制出具有人GD某些特征的疾病，为研究GD的发病机制及进一步进行基因治疗提供了有效的实验手段。但是国内关于此方面的研究尚少。

用TSHR活化的脾细胞免疫小鼠建立GD动物模型是利用TSHR和针对TSHR的T淋巴细胞在GD自身免疫过程中具有重要作用的特点，用表达TSHR cDNA的载体免疫小鼠，经过一段时间，小鼠脾脏可产生识别TSHR的T淋巴细胞，将这种含有活化T淋巴细胞的脾细胞转移给同源小鼠后，小鼠将在活化T淋巴细胞的作用下发生特异性的免疫反应。

在本研究中,我们参照文献[6,7],在基因免疫基础上,采用外源性注入TSHR活化脾细胞的方法,并稍加以改进,取得了较为满意的结果。实验组16只小鼠中有7只的甲状腺组织光镜下呈现细胞增生等改变,与Costagliola等[6]和Many等[7]报道的相似,而且伴间质内少量炎症细胞侵润,为GD的特征性改变[5]。同时,其中,有4只小鼠血清TT4水平高于正常范围伴血清TSH水平压低,推测发生了甲状腺功能亢进;1只小鼠血清TSH水平压低,TT4水平却在正常范围内,提示发生了亚临床甲状腺功能亢进。与Many免疫BALB/c小鼠的研究相比, 我们的模型更加简单、经济适用,成模率接近。我们在第一阶段基因免疫时所使用的预处理液为布比卡因加对羟基苯甲酸甲酯,相对于Many使用的心脏毒素(蛇毒)来说,此预处理液便宜且容易得到。其次,在第二阶段的转移实验时我们所用的脾细胞并未经过体外活化,步骤更简化,并进一步证实了体外激活阶段并不是转化方案所必需。

本研究中小鼠甲状腺功能异常发生率不高,主要原因可能是因免疫时间短,致使实验结束时体内自身免疫反应未发展到一定程度。如果延长免疫时间,血清甲状腺激素水平可能会增加得更明显。

TRAb是一组异质性抗体,用于检测血清TRAb的方法有生物活性法、放射受体分析法及ELISA法等。ELISA法的优点是敏感性特异性高,有文献报道其阳性率高达99%以上[10],且简便易行。Many等用ELISA法发现多数小鼠血清能检测到TRAb[7]。但本实验中,实验组的血清TRAb较对照组仅轻度增高,并无统计学意义,这种不同结果可能与检测方法本身有关,因为ELISA法的敏感性受用于包被的膜受体蛋白纯度、酶标抗体效价等因素影响。有人用不同剂量表达TSHR的重组腺病毒免疫BALB/c小鼠,发现在低剂量组(抗原刺激较弱)检测到的血清TRAb滴度较低,而高剂量组(抗原刺激较强)检测到的血清TRAb滴度较高[11]。本研究中用于转移实验的脾细胞并未证实均来自发生了甲状腺炎的小鼠,也没有在体外进一步活化,因此抗原刺激可能较弱,检测到的TRAb滴度也就低。另外,与血清甲状腺激素水平一样,血清TRAb随着时间的推移可能还会发生变化。

本实验结果表明,用hTSHR cDNA活化的脾细胞免疫同源的雌性BALB/c小鼠能诱导出类似人GD某些特征的动物模型,证实了TSHR是GD主要的靶抗原,其与TSHR自身抗体相互作用在GD的自身免疫过程中起着非常重要的作用。我们所进行的实验性研究为将来进一步完善GD动物模型以及利用此种动物模型研究GD的发病机制及其防治措施打下了良好的基础。

参 考 文 献

[1] 詹升华,刘 纯,张 徽.pcDNA3.1/hTSHR真核表达载体的构建及其在COS-7细胞中的表达[J].细胞与分子免疫学杂志,2004,20(4):390-393.

[2] Ludgate M.Animal models of Graves'disease[J]. Eur J Endocrinol, 2000,142(1):1-8.

[3] Costagliola S,Many M C,Denef J F,et al. Genetic immunization of outbred mice with thyrotropin receptor cDNA provides a model of Graves' disease[J]. J Clin Invest,2000,105(6):803-811.

[4] Barrett K,Liakata E,Rao PV,et al.Induction of hyperthyroidism in mice by intradermal immunization with DNA encoding the thyrotropin receptor[J]. Clin Exp Immunol,2004,136(4):413-422.

[5] Shimojo N,Kohno Y,Yamaguchi K,et al. Induction of Graves-like disease in mice by immunization with fibroblasts transfected with the thyrotropin receptor and a class II molecule[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1996,93(20):11074-11081.

[6] Costagliola S,Many M C,Stalmans-Falys M,et al. Transfer of thyroiditis,with syngeneic spleen cells sensitized with the human thyrotropin receptor,to naive BALB/c and NOD mice[J]. Endocrinology,1996,137(11):4637-4643.

[7] Many M C,Costagliola S,Detrait M,et al. Development of an animal model of autoimmune thyroid eye disease[J]. J Immunol, 1999,162(10):4966-4974.

[8] Nagayama Y,Kita-Furuyama M,Ando T,et al. A novel murine model of Graves'hyperthyroidism with intramuscular injection of adenovirus expressing the thyrotropin receptor[J]. J Immunol,2002,168(8):2789-2794.

[9] Kim-Saijo M,Akamizu T,Ikuta K,et al. Generation of a trans genic animal model of hyperthyroid Graves' disease [J]. Eur J Im munol,2003,33(9):2531-2538.

[10] Kamijo K,Ishikawa K,Tanaka M. Clinical evaluation of 3rd generation assay for thyrotropin receptor antibodies: the M22-biotin-based ELISA initiated by Smith[J]. Endocr J,2005,52(5):525-529.

[11] Chen C R,Pichurin P,Chazenbalk G D,et al.Low-dose immunization with adenovirus expressing the thyroid-stimulating hormone receptor A-subunit deviates the antibody response toward that of autoantibodies in human Graves disease[J]. Endocrinology,2004,145(1):228-233.

(责任编辑:冉明会)