

多发性硬化相关动物模型的最新进展

彭永¹, 周建雄¹, 陈之兴¹ 综述 杨欢² 审校

1. 湖南中医药高等专科学校附属第一医院神经内科, 湖南省株洲市 412000

2. 中南大学湘雅医院神经内科, 湖南省长沙市 410008

摘要:目前的多种实验性脱髓鞘模型在某种程度上反映了多发性硬化(MS)多样性,但都不能完全模拟MS的各种特征。实验性自身免疫性脑脊髓炎模型用于阐述MS的神经炎症机制;毒素相关脱髓鞘模型适用明确了少突胶质细胞的生理特点以及脱髓鞘和髓鞘再生;病毒诱导的脱髓鞘模型支持一些假设的环境因素;斑马鱼模型则具有快速发病和基因可调控型。我们将分别综述它们的优缺点以及其与MS的相关性。

关键词:多发性硬化;多发性硬化相关动物模型;动物种属;动物品系

DOI:10.16636/j.cnki.jinn.2019.06.021

多发性硬化(multiple sclerosis, MS)是一种中枢神经系统(central nervous system, CNS)慢性炎症性病变,其主要病理改变是CNS白质脱髓鞘,最终导致神经元死亡^[1,2]。但MS的发病机制并不明确,所以了解其精确发病机制(如MS相关动物模型)有助于开发新的MS治疗方案^[1,2]。尽管MS动物模型有明显优点,但目前没有一个模型可以完全模拟MS的各个阶段。本综述将逐一介绍其优缺点以及主要应用范围。

1 实验性自身免疫性脑炎

1.1 实验性自身免疫性脑炎的功绩与困境

实验性自身免疫性脑炎(experimental autoimmune encephalitis, EAE)是目前研究MS各种特征的最有效、最常用模型,并已广泛应用于MS发病机制的研究和新治疗方案的探索^[1]。EAE小鼠模型可以反映MS的很多临床特征,但目前还没有一种EAE模型可以模拟MS的全部特征,例如绝大多数小鼠EAE模型神经系统损害主要表现在脊髓,脑损害较少^[3];后者被磁共振(MRI)证实^[1]。EAE动物模型已经证实了髓鞘蛋白特异性CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞和Th17细胞的致脑炎作用,并有助于了解MS中炎症、免疫监测和免疫介导的组织损伤的致病作用^[4]。此外,EAE模型已经直接帮助了三种药物的开发,即醋酸格拉替雷酯、米托蒽醌和那他珠单抗^[5]。

目前认为EAE有3种诱导途径:①抗原诱导(aEAE):皮下注射弗氏完全佐剂(CFA)与脑和脊

髓匀浆(SCH)或合成髓鞘多肽的乳化剂,合成髓鞘多肽包括髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(MOG)、髓鞘碱性蛋白(MBP)、蛋白脂质蛋白(PLP)、髓鞘相关蛋白、髓鞘相关少突胶质细胞碱性蛋白和2',3'-环核苷酸-3'-磷酸二酯酶^[4]。②转基因小鼠。③过继转移(iEAE):来自aEAE供体的细胞过继转移到未经处理受体小鼠。EAE模型常见的有小鼠、大鼠、兔、豚鼠和非人类灵长类(NHP)动物模型。

近年来,对EAE模型的批评逐渐增多^[4]。①基于EAE小鼠模型的很多有效治疗方案用于人类MS患者时,往往疗效欠佳。②MS缺乏典型自身免疫的许多特征。③通常CFA中的成分是热灭活的分枝杆菌,通过激活某些Toll样受体而产生导致一个明显的CD4⁺Th1反应,无法反映在MS病变中占主导地位的CD8⁺T细胞的作用^[3,4,6,7]。④MS的免疫学特性与EAE是完全不同的。总之,尽管EAE模型存在不少弊端,但EAE模型已被全世界认可为最常用的MS模型,所以我们不能否认EAE模型对MS疾病机制和药物开发中的巨大贡献。

1.2 EAE小鼠模型

小鼠是EAE研究中最常见的物种,主要是因为它们具有成本低、研究方案成熟和具有繁殖转基因品系的特点,因此EAE的小鼠模型主导了CNS的自身免疫性炎症研究^[4]。

1.2.1 常规小鼠EAE模型 ①MOG₃₅₋₅₅加CFA免疫C57BL/6小鼠可诱导单相EAE,主要以脑白质和脊髓炎症浸润与脱髓鞘为特征。发病于诱导

基金项目:湖南省自然科学基金(2018JJ6043);湖南省卫计委课题(B20180815);株洲市科技局课题(20160104)

收稿日期:2019-06-11;**修回日期:**2019-10-31

作者简介:彭永(1970-),男,硕士,副主任医师,主要从事神经系统自身免疫疾病特别是多发性硬化发病机制的研究。E-mail:1779342446@qq.com。

后 11 ~ 15 d, 4 个月内不能恢复;病理表现为皮质、脊髓和小脑中免疫细胞浸润。② PLP₁₃₉₋₁₅₁、PLP₁₇₈₋₁₉₁ 均可以诱导 SJL 小鼠出现慢性复发性疾病,发病于诱导后 12 ~ 18 d;而第一次急性复发在初发病后 10 ~ 20 d 内。③ PLP₅₆₋₇₀ 诱导 Biozzi ABH 小鼠出现继发性进展型 EAE 模型,伴有明显的脱髓鞘、神经胶质细胞活化、神经胶质增生和神经元丢失。发病于诱导后 16 d 出现临床症状,该模型主要用于评估免疫介导和神经退行性疾病的潜在治疗剂。④ MOG₃₅₋₅₅ 免疫 NOD 小鼠可以诱导复发缓解型 EAE。发病于诱导后 20 d,然后呈现一个慢性进展的过程。NOD-EAE 小鼠模型包含了人类 MS 的所有 3 个阶段:第一次缓解后;小鼠进入 RR 阶段;免疫 60 d 后,小鼠进入慢性进展阶段^[1]。⑤ MOG₉₂₋₁₀₆ 诱导的 ASW 小鼠可以诱导原发性进行性多发性硬化模型,发病于诱导后 1 个月,大多数小鼠在此后 20 d 内死亡。

1.2.2 过继转移 EAE 模型 供体多为髓鞘特异性如 PLP₁₃₉₋₁₅₁、MBP₈₄₋₁₀₂ 或 MOG₃₅₋₅₅ 特异性 Th1 细胞。转基因 C57BL/6 小鼠的过继转移 EAE 模型可以过度表达了促炎性细胞因子,也可以用于研究 CNS 炎症的机制^[8]。过度表达 TCRMOG₃₅₋₅₅ 转基因小鼠和过度表达 TCRMOG₃₅₋₅₅ 和抗 MOG-IgG 链双转基因小鼠可以研究 T 细胞和 B 细胞在 EAE 发病机制中的作用。

1.2.3 自发 EAE 模型 表达 MBP 特异性 CD4⁺ T 细胞的转基因小鼠可自发产生 EAE 的概率约为 14%,而与其 Rag 缺陷小鼠杂交后产生的 Rag 缺陷转基因小鼠产生 EAE 的发病率为 100%。表达 MOG₉₂₋₁₀₆ 特异性 T 细胞受体的 SJL/J 小鼠可自发产生 RR-EAE,伴随小脑和脑干的炎症和脱髓鞘病变。

1.2.4 人源性小鼠 EAE 模型 表达人 MBP₈₄₋₁₀₂ 和 HLA-DR15 的双转基因小鼠、PLP₄₅₋₅₃ CD8⁺ 转基因 2D1 小鼠以及表达 MS 相关的主要组织相容性抗原(MHC) II 类单倍型和人源性髓鞘(MBP)特异性 TCR 转基因小鼠。这些有助于阐明 HLA 基因在疾病发病机制中的作用。

1.3 EAE 大鼠模型

MBP₆₈₋₈₆ 可直接诱导 Lewis 大鼠形成 EAE 模型,无需任何佐剂^[9]。发病于诱导后 8 ~ 12 d,随后自发恢复,不再复发^[10]。病理表现为脊髓、小脑和脑干单核细胞浸润、水肿和神经胶质增生;但很少出现脱髓鞘。该模型有助于研究 T 细胞活化和浸润

的机制^[11]。DA 大鼠模型与 Lewis 大鼠模型基本相同。过继转移 EAE 大鼠模型的造模方法同小鼠。过继转移前同位素标记的 T 细胞用于跟踪 EAE 中 T 细胞向 CNS 的迁移模式及其在 EAE 发育期间的后续行为^[6, 12]。

啮齿动物 EAE 模型仍有许多局限性。① 不容易复制 MS 的复杂病情,因此说明了人类和实验性啮齿动物之间存在不同的免疫、遗传、发育和环境差异^[13]。② 主要是脊髓白质疾病,而 MS 主要是脑部脱髓鞘疾病^[3]。③ 主要来源于 SPF 条件下繁殖的转基因小鼠或大鼠品系,这些动物免疫系统没有受到病原体等类似的环境因素的影响;而后者是人类免疫系统经常面对的。④ 只有 EAE 的 NHP 模型才可以对人源性抗体进行临床前评估^[14, 15]。

1.4 EAE 的 NHP 模型

NHP 模型在临床上是多样的,具有多变的发病时间、临床病程和严重程度,均取决于灵长类的种类、免疫原和佐剂的使用。免疫方法类似小鼠模型,可产生严重的急性和单相性疾病。但重组人 MOG(rhMOG)的 EAE 的 NHP 模型或与 IFA 相关的 MOG 肽可导致较温和的具有单相和多相临床形式的疾病。常用的有绒猴的慢性多相性多次复发和缓解 EAE 模型;恒河猴的急性 EAE 模型;猕猴的暴发型和多相轻度暴发型 EAE 模型。EAE 的 NHP 模型通常以虚弱、偏瘫、感觉异常和共济失调开始,可迅速发展为轻瘫、麻痹和昏迷。但是人类的其他症状,如疼痛、抑郁、认知功能障碍仍难以在 NHP 模型中评估。人类和 NHP 模型的病变发生和发展可使用 MRI 监测,如脑室周、皮质和脊髓白质 T2 加权图像及急性期增强后的 T1 加权图像^[16]。

2 毒素诱导脱髓鞘模型

毒素诱导脱髓鞘模型是评价脱髓鞘的主要手段,主要相关毒素有铜蛋白佐酮、溶血磷脂酰胆碱(LPC)、溴化乙锭(EB)。

2.1 铜蛋白佐酮模型

是一种脱髓鞘和髓鞘再生模型,已被用来研究少突胶质细胞死亡、少突胶质细胞前体细胞迁移、分化和髓鞘再生的具体机制^[17]。

2.2 溶血磷脂酰胆碱

LPC 对有髓鞘的少突胶质细胞有特异性毒性,而神经元轴突保持完整。LPC 模型具有明显的空间和时间控制脱髓鞘的优势,因此可用于研究髓鞘再生的复杂机制^[18]。

2.3 溴化乙锭

EB 对所有有核的细胞都有毒性,并且可以用于造成局部脱髓鞘病变。立体定向注射 EB 进入特定的白质区可以引起脱髓鞘病变^[19]。此外,海马内注射 EB 可作为一种研究认知改变的模型,这也是 MS 中的一个临床特征^[20]。

3 病毒感染脱髓鞘模型

病毒被认为在 MS 启动和进展中起重要作用^[21],主要病毒是泰勒病毒、犬瘟热病毒和小鼠肝炎病毒^[22]。其中最具特征的病毒诱导脱髓鞘模型是泰勒病毒所致的小鼠脑脊髓炎病毒 (TMEV)。TMEV 有两个亚类可以致 CNS 脱髓鞘, SJL、DBA/1、DBA/2、SWR、PL/J 和 NZW 小鼠是高度易感的。在病毒感染后 3~12 d 出现早期急性病变,表现为大脑灰质变性;病毒快速复制后出现神经元凋亡。慢性期出现在感染后 30 d 左右,即炎症性脱髓鞘和白质的大量炎症;也可以发现轴突肿胀^[21]。该模型的缺陷是实验很耗时,脱髓鞘和髓鞘再生同时发生。

4 斑马鱼的 MS 模型

斑马鱼模型具有快速发病和基因可调控型的优势,正在成为许多神经退行性疾病(包括 MS 和其他脱髓鞘疾病)的一种新型动物模型^[23, 24]。斑马鱼 CNS 是哺乳动物神经系统的简化版本,它包含哺乳动物大脑和脊髓的大多数细胞类型、连接和结构。斑马鱼髓鞘是由少突胶质细胞形成紧密的同心包绕轴突,和哺乳动物相同,其主要蛋白质是 p0,而不是 PLP^[25]。斑马鱼模型可以实时可视化髓鞘形成和脱髓鞘形成过程^[26]。

目前为止,以斑马鱼为模型的研究主要集中在毒素诱导和基因突变的髓鞘细胞消融模型,主要用于研究髓鞘再生和髓鞘前体细胞分化的机制。成年斑马鱼的 LPC 暴露模型表现为视神经局灶性脱髓鞘、小胶质细胞浸润和 olig2⁺ 细胞减少,然后出现髓鞘再生、小胶质反应消失和少突胶质细胞恢复。基因突变的脱髓鞘模型在 12 h 至 2 d 内可见到脱髓鞘,1 周后恢复。这种遗传模型有利于筛选促进髓鞘再生的治疗药物。例如,最近一种 EAE 斑马鱼模型被开发用于药物如芬戈利莫、地塞米松和富马酸二甲酯的体内快速筛选^[27]。该模型的优势在于比啮齿类动物 EAE 模型要节约时间和成本。

5 小结与展望

MS 的发病机制目前尚不明确,动物模型可以

帮助我们了解 MS 的精确机制。众多动物模型中, EAE 是 MS 的最好模型,因为 EAE 能再现 MS 的很多临床和病理特征,包括免疫细胞介导的 CNS 浸润、炎症、脱髓鞘、髓鞘再生和神经元脱失。现有的 MS 动物模型各有优缺点,如何有机地整合四大类模型,将来成为 MS 的基础实验和临床转化的主要方向。

参 考 文 献

- [1] Levy H, Assaf Y, Frenkel D. Characterization of brain lesions in a mouse model of progressive multiple sclerosis [J]. *Exp Neurol*, 2010, 226(1): 148-158.
- [2] Thompson A, Baranzini SE, Geurts J, et al. Multiple sclerosis [J]. *Lancet*, 2018, 391: 1622-1636.
- [3] Wagner CA, Roqué PJ, Mileur TR, et al. Myelin-specific CD8⁺ T cells exacerbate brain inflammation in CNS autoimmunity [J]. *J Clin Invest*, 2019, doi: 10. 1172/JCI132531. [Epub ahead of print].
- [4] Burrows DJ, McGown A, Jain SA, et al. Animal models of multiple sclerosis: From rodents to zebrafish [J]. *Mul Scler J*, 2019, 25(3): 306-324.
- [5] Steinman L, Shoenfeld Y. From defining antigens to new therapies in multiple sclerosis: Honoring the contributions of Ruth Arnon and Michael Sela [J]. *J Autoimmunity*, 2014, 54: 1-7.
- [6] 彭永,甘露,李淑萍,等.髓鞘抗原特异性 CD8⁺ T 细胞在 MS/EAE 脑组织免疫豁免中作用的研究进展 [J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2018, 45(5): 532-535.
- [7] van Kaer L, Post oak JL, Wang C, et al. Innate, innate-like and adaptive lymphocytes in the pathogenesis of MS and EAE [J]. *Cell Mol Immunol*, 2019, 16(6): 531-539.
- [8] Yang C, Lai W, Zhou J, et al. Betaine Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Inhibiting Dendritic Cell-Derived IL-6 Production and Th17 Differentiation [J]. *J Immunol*, 2018, 200(4): 1316-1324.
- [9] Croxford AL, Spath S, Becher B. GM-CSF in Neuroinflammation: Licensing Myeloid Cells for Tissue Damage [J]. *Trends Immunol*, 2015, 36(10): 651-662.
- [10] Miao J, Wang F, Wang R, et al. Pleiotrophin regulates functional heterogeneity of microglia cells in EAE animal models of multiple sclerosis by activating CCR-7/CD206 molecules and functional cytokines [J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(4): 2013-2027.
- [11] Buzzard K, Chan WH, Kilpatrick T, et al. Multiple Sclerosis: Basic and Clinical. In: Beart P, Robinson M, Rattray M, Maragakis NJ, eds. *Neurodegenerative Diseases: Pathology, Mechanisms, and Potential Therapeutic Targets* [M].

- Cham : Springer International Publishing , 2017 , 211-252 .
- [12] Kyratsous NI , Bauer IJ , Zhang G , et al . Visualizing context-dependent calcium signaling in encephalitogenic T cells in vivo by two-photon microscopy [J] . Proc Natl Acad Sci U S A , 2017 , 114 (31) : E6381-E6389 .
- [13] Tao L , Reese , TA . Making mouse models that reflect human immune responses [J] . Trends Immunol , 2017 , 38 : 181-193 .
- [14] ' t Hart BA , Dunham J , Faber BW , et al . A B Cell-Driven Autoimmune Pathway Leading to Pathological Hallmarks of Progressive Multiple Sclerosis in the Marmoset Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Model [J] . Front Immunol , 2017 , 8 : 804 .
- [15] ' t Hart BA , Laman JD , Kap YS . Reverse Translation for Assessment of Confidence in Animal Models of Multiple Sclerosis for Drug Discovery [J] . Clin Pharmacol Ther , 2018 , 103 (2) : 262-270 .
- [16] Stimmer L , Fovet CM , Serguera C . Experimental Models of Autoimmune Demyelinating Diseases in Nonhuman Primates [J] . Vet Pathol , 2018 , 55 (1) : 27-41 .
- [17] Oakden W , Bock NA , Al-Ebraheem A , et al . Early regional cuprizone-induced demyelination in a rat model revealed with MRI [J] . Nmr Biomed , 2017 , 30 (9) : e3743 .
- [18] Keough MB , Jensen SK , Yong VW . Experimental Demyelination and Remyelination of Murine Spinal Cord by Focal Injection of Lysolecithin [J] . J Vis Exp , 2015 , 2015 (97) : e52679 .
- [19] Salem EA , Salem NA , Hellstrom WJ . Therapeutic effect of ozone and rutin on adriamycin-induced testicular toxicity in an experimental rat model [J] . Andrologia , 2017 , 49 (1) : e12603 .
- [20] Goudarzvand M , Choopani S , Shams A , et al . Focal Injection of Ethidium Bromide as a Simple Model to Study Cognitive Deficit and Its Improvement [J] . Basic Clin Neurosci , 2016 , 7 (1) : 63-72 .
- [21] Bjelobaba I , Savic D , Lavrnja I . Multiple Sclerosis and Neuroinflammation : The Overview of Current and Prospective Therapies [J] . Curr Pharm Des , 2017 , 23 (5) : 693-730 .
- [22] Lassmann H , Bradl M . Multiple sclerosis : experimental models and reality [J] . Acta Neuropathol , 2017 , 133 (2) : 223-244 .
- [23] Kim S , Lee YI , Chang KY , et al . Promotion of Remyelination by Sulfasalazine in a Transgenic Zebrafish Model of Demyelination [J] . Mol Cell , 2015 , 38 (11) : 1013-1021 .
- [24] Münzel EJ , Becker CG , Becker T , et al . Zebrafish regenerate full thickness optic nerve myelin after demyelination , but this fails with increasing age [J] . Acta Neuropathol Commun , 2014 , 2 : 77 .
- [25] Karttunen MJ , Czopka T , Goedhart M , et al . Regeneration of myelin sheaths of normal length and thickness in the zebrafish CNS correlates with growth of axons in caliber [J] . PLOS One , 2017 , 12 (5) : e0178058 .
- [26] Almeida R , Lyons D . Oligodendrocyte Development in the Absence of Their Target Axons In Vivo [J] . PLOS One , 2016 , 11 (10) : e0164432 .
- [27] Kulkarni P , Yellanki , S , Medishetti , R . Novel zebrafish EAE model : A quick in vivo screen for multiple sclerosis [J] . Mult Scler Relat Disord , 2017 , 11 : 32-39 .