



电子、语音版

·综述·

重症肌无力的动物模型研究进展

姚舜禹^{1,2}, 薛雅慧^{1,2}, 杜妙乔^{1,2}, 刘澍^{1,2}, 彭永^{1,2}

1. 湖南中医药大学, 湖南长沙 410208

2. 湖南中医药高等专科学校附属第一医院神经内科, 湖南株洲 412000

摘要:重症肌无力(MG)的动物模型研究成为当前关注的焦点。不同的MG实验模型在一定程度上反映了MG的多样性,但由于其各自的局限性,尚不能在一种模型中模拟MG的所有特征。实验性自身免疫性重症肌无力(EAMG)模型涵盖了参与抗乙酰胆碱受体免疫反应的关键细胞机制,为理解MG的免疫学特征提供了基础。被动转移模型的特点是疾病诱导简单,在单次注射抗体后24 h内迅速出现虚弱症状。基因工程的优势在于更具有特异性,能够更准确地模拟MG的遗传基础,弥补了EAMG模型的不足。药物诱导模型具有建模迅速、不涉及复杂免疫激活和抗原诱导的特性,然而,其在模拟疾病复杂性方面存在一定局限。体外模型对患者血清的表型和功能反应进行匹配,该模型能够更直观地观察异种细胞在疾病发展中的作用,更贴近临床实际。该综述总结了各种实验模型的优缺点,帮助研究者选择适用于不同研究目的模型。为推动对该疾病复杂机制的深入理解提供方向,并为新的治疗策略的制定提供科学依据。

[国际神经病学神经外科学杂志, 2024, 51(1): 79-85]

关键词:重症肌无力;动物模型;研究进展

中图分类号:R746.1

DOI:10.16636/j.cnki.jinn.1673-2642.2024.01.014

Advances in the research on animal models for myasthenia gravis

YAO Shunyu^{1,2}, XUE Yahui^{1,2}, DU Miaoqiao^{1,2}, LIU Shu^{1,2}, PENG Yong^{1,2}

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

2. Department of Neurology, Affiliated First Hospital of Hunan Traditional Chinese Medical College, Zhuzhou, Hunan 412000, China

Corresponding author: PENG Yong, Email:1779342446@qq.com

Abstract: The animal models for myasthenia gravis (MG) have become a research hotspot in recent years. While various experimental models partially capture the heterogeneity of MG, due to their respective limitations, it is difficult to achieve a comprehensive emulation of all facets of MG. The experimental autoimmune myasthenia gravis (EAMG) model covers the key cellular mechanisms involved in the immune response against acetylcholine receptor, which provides a basis for understanding the immunological characteristics of MG. The passive transfer model is characterized by simple disease induction, rapidly manifesting the symptom of weakness within 24 hours after a single antibody injection. Genetic engineering models offer more specificity and can accurately simulate the genetic basis of MG, thereby making up for the shortcomings of the EAMG model. Drug-induced models attract researchers with their rapid modeling and do not involve complex immune activation and antigen induction, but with certain limitations in simulating disease complexity. By matching the phenotypes and functional responses of patient serum, the *in vitro* model allows a more intuitive observation of the role of heterologous cells in disease development, which is closer to clinical reality. This article summarizes the

基金项目:株洲市科技局课题(2021-009);湖南中医药高等专科学校附属第一医院优秀科研创新团队(B2021-003);2022年湖南中医药大学校院联合基金项目(2022-44);湖南省卫生健康委科研计划课题(C202303076574)。

收稿日期:2023-08-30;**修回日期:**2024-01-06

作者简介:姚舜禹(2000—),女,在读硕士,主要从事神经系统疾病研究。Email:yaoshunyu2023@163.com。

通信作者:彭永(1970—),男,硕士研究生导师,副主任医师,主要从事神经系统疾病研究。Email:1779342446@qq.com。

advantages and disadvantages of various experimental models and helps researchers to select the models suitable for different research purposes. This review provides directions for a deeper understanding of the complex mechanisms of this disease, as well as a scientific basis for the development of new therapeutic strategies.

[Journal of International Neurology and Neurosurgery, 2024, 51(1): 79-85]

Keywords: myasthenia gravis; animal model; research advances

重症肌无力(myasthenia gravis, MG)是一种慢性的自身免疫性疾病,主要特征是大多数患者在神经肌肉接头(neuromuscular junction, NMJ)处产生针对乙酰胆碱受体(acetylcholine receptor, AChR)的血清自身抗体。AChR特异性抗体导致NMJ的结构和功能改变,进而引发肌肉无力和疲劳^[1]。目前,MG的治疗方法亟待改进,尤其是在疾病进展方面,因此急需确定新的治疗靶点^[2]。为了更深入地了解人类MG的发病机制,以便针对其不同的发展阶段和主要应用范围,制定相应的缓解或治疗方案,我们对近年来MG动物模型的制备和特点进行了综述。

1 实验性自身免疫性重症肌无力

多年来,实验性自身免疫性重症肌无力(experimental allergic myasthenia gravis, EAMG)模型已经总结了参与抗AChR免疫反应的细胞机制的关键方面。具体而言,这包括抗原呈递、T细胞的协助和调控及B细胞的选择和分化为浆细胞^[3]。EAMG模型为深入了解MG的发病机制、免疫学特征及神经肌肉传递障碍提供了宝贵的资料,因为这些方面在临床和免疫病理表现上与人类MG非常相似^[2]。在该模型中,我们能够测试各种药物、免疫调节剂和其他治疗策略的有效性,为开发新的治疗方法和药物提供了合理的依据。此外,EAMG模型有助于深入了解免疫系统在MG中的作用,并寻找出MG的生物标志物。该模型使我们更好地了解炎症反应和补体运作的机制,同时验证了眼镜蛇毒因子作为一种耗竭补体的实验工具,能够抑制大鼠主动型和被动型EAMG的诱导。

然而,该模型的主要不足是疾病发作的时间,不同物种的疾病发作时间从数周到数月不等,与人类MG的发病特性存在差异。因此,在使用主动EAMG模型时,定义正确的时间窗来进行预防性或治疗性干预是相当困难的^[4]。另外,由于NMJ的解剖学差异,在动物模型中的实验结果可能只有有限的转化价值。虽然在EAMG中取得有利结果但转化到人类临床治疗仍面临挑战,只有小部分进入临床试验的药物被批准,因为许多药物会产生意想不到的药物不良反应和毒性。此外,EAMG模型疾病表型在进展、严重程度和病因方面与人类有很大的不同。高水平的近交限制了普通动物模型和受控环境中的遗传多样性,防止了遗传漂移,同时清除了可影响人类MG发病机制的常见病毒和微生物制剂;免疫应答存在差异,不同动物的免疫系统可能在对抗原的应答上存在差

异,这导致不同物种观察到不同的免疫反应和疾病表现。这种情况促使了以个性化和临床上更相关的方式研究疾病和药理作用^[5]。但EAMG模型已是被全世界认可的最常用的MG模型,所以我们不能否认EAMG模型对MG疾病机制和药物开发中的巨大贡献。

2 EAMG小鼠模型

小鼠被普遍认为是最适合EAMG模型的物种,因为其NMJ与人类的非常相似^[6]。MG患者中女性略多于男性,占全部病例的55%~60%^[7]。这可能与雌激素水平有关,故在诱导EAMG的实验中绝大多数选择雌性动物。小鼠动物模型的成功率与年龄大小呈负相关。年龄大的小鼠可抵抗MG发生,这是由于B淋巴细胞对AChR有记忆作用导致。但是这种记忆反应可被诱导弱化,即在初次抗原致敏后行再次免疫接种可提高大龄小鼠的致病率^[14]。所以MG模型建立多采用8~10周的小鼠作为实验对象^[2]。

2.1 AChR-EAMG模型

纯化的电鳗AChR复合物(acetylcholine receptor complex, AChRC)混合脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)或完全弗氏佐剂(complete Freund's adjuvant, CFA)免疫C57BL/6J小鼠诱导AChR-EAMG模型^[8],这种模型主要用于研究免疫反应、抗体产生和神经肌肉传递的障碍。直接纯化AChR可用于研究感染外伤导致的免疫屏障功能的破坏,或潜在免疫逃逸机制的失效。视神经脊髓炎(neuromyelitis optica, NMO)自身抗原抗水通道蛋白4(aquaporin-4, AQP4)或NMO-Ig免疫后可增强EAMG模型疾病严重程度,同时也能增强炎症反应^[9]。BALB/c小鼠也常用于AChR-EAMG造模,与C57BL/6小鼠相比,BALB/c小鼠易感性更低。有实验证明,从C57BL/6小鼠获得的38株单抗中有9株是针对小鼠AChR的细胞外表位,而从BALB/c小鼠获得的27株单抗中只有1株是针对小鼠AChR的细胞外表位^[10]。抗体的差异可能是这些小鼠品系之间观察到的致病性反应差异的基础。这也证明了,小鼠EAMG疾病易感性的品系特异性差异可能与潜在致病抗体可用组库的差异有关。这对于研究特定免疫因子的作用及免疫治疗方法的效果具有重要意义。

含有重组人AChR α -亚基的大肠杆菌质粒混合CFA免疫HLA-DQ8转基因B10B6小鼠诱导的EAMG模型,引入人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)-DQ8转基因给予小鼠独特的免疫基因组合,有助于更好地模

拟自身免疫性疾病的发病机制,尤其是与 *HLA* 基因相关的免疫反应^[6]。

使用 C3、C4、C5 或 C6 基因敲除小鼠诱导 EAMG,疾病发生率显著低于野生型小鼠,证实了补体是 MG 发病机制中的一个关键因素^[11]。

研究发现,超过 80% 的早发型 MG 患者表现为胸腺增生,10%~15% 的 MG 患者除胸腺增生外还伴有胸腺瘤。有研究采用 SCID 小鼠或者 BALB/c 小鼠植入人 MG 胸腺组织标本诱导过继转移 EAMG 模型,小鼠模型建立率为 40%^[12]。该模型小鼠胸腺组织中存在胸腺 miR-653 的减少和 TRIM9 的增加,并且 miR653 对 TRIM9 具有负调控作用,miR653 通过抑制 TRIM9 来抑制 MG 小鼠胸腺细胞增殖^[12]。因此,miR653 可作为治疗自身免疫性 MG 的潜在治疗靶点。

2.2 肌肉特异性激酶-EAMG 模型

在发育过程中,肌肉特异性激酶(muscle specific kinase, MuSK)作为信号枢纽,协调突触前和突触后成分的排列^[13]。采用人肌肉 MuSK-ecto 蛋白和 CFA 免疫 C57BL/6J 小鼠可产生 MuSK 抗体^[14],免疫后的小鼠可出现与 MuSK-MG 患者相似的骨骼肌(skeletal muscles, SKM)疲劳和无力,神经肌肉传递受损,突触后 AChR 簇减少等症状^[15]。组织学上,存在广泛的突触后和突触前改

变,NMJ 形态学表现包括碎片化的 NMJ 伴不同程度的突触后肌肉终板破坏,以及异常的神经末梢。突触前变化的特点是终板体积缩小,终板持续变性,终板与神经末梢之间缺乏配准,此外,还存在局部轴突出芽和胆碱酯酶活性的结外弥散。

与 AChR-EAMG 模型相比,MuSK-EAMG 模型通常需要更长的时间来表现出明显的症状。潜伏期可能是几个月,甚至更长。这是因为 MUSK 抗体的产生和免疫反应可能需要更长的时间。

MuSK-MG 患者会出现一些特有的临床特征,如亚急性进展为严重的延髓无力和面部、延髓、舌和眼外肌的频繁萎缩^[16]。

2.3 低密度脂蛋白受体相关蛋白 4-EAMG 模型

C57BL/6J 小鼠或 BALB/c 小鼠通过重组低密度脂蛋白受体相关蛋白 4(low-density lipoprotein receptor-related protein 4, LRP4)蛋白或 LRP4 抗体注射来模拟 LRP4-EAMG^[17]。在此模型中,抗体对 LRP4 的免疫攻击会影响 NMJ 的正常功能。这可能导致乙酰胆碱(acetylcholine, Ach)的释放减少,影响神经冲动的传递,从而导致肌肉无力和疲劳。

EAMG 小鼠模型汇总情况见表 1。

表 1 EAMG 小鼠模型汇总情况

造模类型	适用品系	免疫方法	造模特点	优点	不足	参考文献
AChR-EAMG 模型	C57BL/6J	纯化的电鳗 AChRC 混合 LPS 或 CFA	最常用	① AChR 是人类重症肌无力最常见的自身抗原;② 更准确地模拟人类 MG 的免疫机制;③ 时间较短	AChR-EAMG 模型在一定程度上与 AChR 相关,可能无法涵盖其他 MG 类型的病理机制	[8]
	BALB/C	纯化的电鳗 AChRC 混合 LPS 或 CFA	与 C57BL/6 相比,BALB/c 小鼠易感性更低			[9-10]
	HLA-DQ8 转基因 B10B6 小鼠	含有重组人 AChR α -亚基的大肠杆菌质粒混合 CFA 免疫	有助于更好地模拟与白细胞抗原基因相关的发病机制			[8]
	C3、C4、C5 或 C6 基因敲除小鼠	基因敲除	证实了补体是 MG 发病机制中的一个关键因素			[11]
	SCID 小鼠或者 BALB/c 小鼠	植入人 MG 胸腺组织标本	进一步模拟早发型 MG 患者的胸腺增生			[12]
MuSK-EAMG 模型	C57BL/6J 小鼠	人肌肉 MuSK-ecto 蛋白和 CFA 免疫	MuSK-EAMG 患者可能表现出严重的肌无力症状,包括吞咽困难、呼吸肌无力等,其症状可能较 AChR-EAMG 更加严重	MuSK-EAMG 模型不依赖 AChR,用于研究与 MuSK 相关的免疫机制	① 通常需要更长的时间来表现出明显的症状;② MuSK 相关的 MG 相对较少,因此模型可能在研究中受到限制	[14-16]
LRP4-EAMG 模型	C57BL/6J 小鼠或 BALB/c 小鼠	重组 LRP4 蛋白或 LRP4 抗体免疫	抗体对 LRP4 的免疫攻击会影响 NMJ 的正常功能	① 新颖性,LRP4 作为重要的神经肌肉连接蛋白得到了越来越多的研究关注;② 更好地模拟 LRP4 在人类 MG 中的作用	① 造模的难度和时间成本增加;② 技术需要进一步验证和深入研究	[17]

注:AChR=乙酰胆碱受体;EAMG=实验性自身免疫性重症肌无力;MuSK=肌肉特异性激酶;LRP4=低密度脂蛋白受体相关蛋白 4;LPS=脂多糖;CFA=完全弗氏佐剂;MG=重症肌无力;NMJ=神经肌肉接头。

3 EAMG大鼠模型

大鼠模型中,各品系对EAMG的易感性强弱程度依次递减为Wistar>Munich>fischer>Lewis>Buffalo>Brown>Norway>ACI>WatarKyoto>Kopen-hagen>WastarFurth。其中Lewis大鼠为目前常用种属。多项国家级及省级的研究中选用了Lewis大鼠^[18]。此外,目前多采用雌性Lewis大鼠来诱导MG,因雌激素可以增强EAMG的易感性。现在已经证实,包括MG在内的许多自身免疫性疾病在女性中的发病率高于男性^[8]。

大鼠比小鼠血容量更大,可用于更多的连续实验。但小鼠具有代表性的免疫系统,易于选择性控制小鼠的免疫条件,易于区分其淋巴细胞的不同功能亚群,易得到近交系便于遗传分析,并有价格低廉、便于饲养等优点^[14]。而Lewis大鼠较贵,在具体研究中应用不是很普遍。

3.1 AChR-EAMG模型

有2种大鼠模型与小鼠类似:CFA混合含有重组人AChR γ -亚基的大肠杆菌质粒免疫HLA-DQ8转基因B10大鼠^[6];CFA混合电鳗AChR免疫Lewis大鼠^[19],慢性肌无力在免疫后5周开始^[20]。但大鼠AChR-EAMG模型症状可能相对较严重,免疫后表现出症状更快。在临床表现中,小鼠AChR-EAMG模型中眼外肌受到的影响更为显著,可能导致眼睑下垂、眼球运动障碍等。而大鼠的四肢肌肉可能受到的影响相对较大,因此在AChR-EAMG模型中可能会受到较为显著的影响,导致四肢力量下降和运动障碍更为显著。

采用Lewis大鼠皮下注射R-AChR_{97~116}诱导

EAMG^[21]。R-AChR_{97~116}肽段对应于大鼠AChR- α 亚基,30 d左右开始出现明显的肌无力症状,且随着时间的推移症状加重,40 d开始出现明显的体重下降,60 d后出现典型的MG症状^[22]。当AChR-Ab和低频重复电刺激试验电衰减均为阳性或用ELISA法检测血清抗AChR抗体升高^[23],可判定EAMG造模成功^[24]。模型建立的成功率约为79.63%^[21]。然而,此EAMG模型的体液免疫调节机制尚不清楚^[25]。利用人工合成的大鼠源肽段建立EAMG大鼠模型具有简便、阳性率高等优点。Wistar大鼠模型与Lewis大鼠类似。

3.2 MuSK-EAMG模型

CFA混合人MuSK-ECD免疫雌性Lewis大鼠,首次免疫后30 d加强免疫1次^[26]。约70%的免疫大鼠在加强免疫后2~3周出现典型的EAMG症状,并伴有体重的下降。这些症状持续数周后才开始出现自发的改善^[27]。小鼠对MuSK-EAMG主动诱导的易感性在菌株间存在相当大的变异性。对于C57BL/6J小鼠,虚弱和消瘦的分布遵循个体肌肉中正常MuSK表达的梯度,这在一定程度上模仿了MuSK-EAMG中肌肉受累分布。与小鼠反应的可变性和重复免疫的要求相反,近交系Lewis大鼠的EAMG是高度定型的^[11]。

3.3 LRP4-EAMG模型

LRP4-EAMG大鼠模型与小鼠模型类似,但目前应用较少。

EAMG大鼠模型汇总情况见表2。

表2 EAMG大鼠模型汇总情况

造模类型	适用品系	免疫方法	造模特点	参考文献
AChR-EAMG模型	HLA-DQ8转基因B10大鼠	含有重组人AChR γ -亚基的大肠杆菌质粒混合CFA免疫	大鼠造模与小鼠基本类似,但大鼠AChR-EAMG模型症状可能相对较严重,免疫后表现出症状更快	[6]
	Lewis大鼠	电鳗AChR混合CFA免疫		[19-20]
	Lewis大鼠、Wistar大鼠	皮下注射R-AChR ₉₇₋₁₁₆	具有准确、阳性率高等优点	[21-25]
MuSK-EAMG模型	Lewis大鼠	人MuSK-ECD混合CFA免疫	实验性疾病是高度定型的	[26-27]
LRP4-EAMG模型	该大鼠模型与小鼠LRP4-EAMG模型类似,但目前应用较少			[12]

注:AChR=乙酰胆碱受体;EAMG=实验性自身免疫性重症肌无力;MuSK=肌肉特异性激酶;LRP4=低密度脂蛋白受体相关蛋白4;HLA=人类白细胞抗原;CFA=完全弗氏佐剂。

4 被动转移MG

被动转移MG (passive transfer myasthenia gravis, PTMG)也是主要由针对AChR的自身抗体和MuSK、LRP4产生的^[3]。对于AChR抗体诱导的疾病,单克隆抗体、同系多克隆血清和来自MG患者的高浓度人血清已被用于诱导疾病^[3]。一般选用NOD/SCID小鼠注射MuSK-MG患者的纯化IgG4以产生被动转移的MuSK-MG模型^[28]。方法为注射第1天体重平均减少(22.6±2.9)%,第5天开始

出现肌肉力量的进行性丧失,与开始时相比,最终的平均强度损失为(79.9±10.5)%^[28]。

PTMG与EAMG模型更有优势:其特点是疾病诱导简单,单次注射抗体,在注射后24 h内迅速出现虚弱症状^[4]。该过程消除了耐受性崩溃,只看疾病诱导的最终效应机制,因此,该模型对于筛选阻断抗体结合或抑制补体激活的药物效果是有效的。然而,PTMG一个显著的不足是其只反映了最终的抗体效应机制,而不是导致抗体

产生的耐受性的丧失^[29]。并且,尽管抗体产生类似于人类疾病的突触后损伤,但也存在广泛的炎症浸润,这在人类MG中并不存在^[3]。为了避免EAMG和PTMG的缺陷,二者可叠加进行,如先肽段检测后体外抗体培养,即明确了致病肽段,又可简单快速造模。被动转移MuSK的模型已被应用于表征致病机制,但不用于临床前评估^[3]。

5 基因工程模型

利用基因编辑技术,研究人员可以在实验动物中引入与MG相关的基因突变,从而模拟疾病的发生。如①Tgε26小鼠:Tgε26小鼠携带了人类ε链胸腺细胞受体基因的转基因序列,这个ε链胸腺细胞受体与肌无力病理相关^[30]。这种转基因序列的引入旨在模拟肌无力患者中存在的免疫反应,进而研究免疫系统如何攻击NMJ。②Rag2^{-/-}小鼠:免疫缺陷模型^[29],缺乏适应性免疫反应。其特点是缺乏Rag2基因,这会导致其免疫系统丧失B细胞和T细胞的免疫反应能力,因此,常被用作移植研究的宿主,可以接受人类免疫系统的移植,用于研究人类免疫系统在异种体内的功能。③FVB/N小鼠:FVB/N小鼠对于产生胚胎干细胞具有较高的敏感性^[31],因此,在基因工程和胚胎学研究中得到广泛应用,在神经肌肉联结失调模型中使用,有助于研究肌肉疲劳和无力的机制,可探究与神经肌肉传递障碍相关的问题。

6 药物诱导模型

一些药物,如卡巴胆碱酯酶抑制剂(如氨基酯碱酯)可以在动物体内引发AChR功能减退,从而模拟MG的症状。

总而言之,啮齿动物MG模型仍存在许多局限性。

①不容易复制与人体MG相关的复杂病情,这说明了人类和实验性啮齿动物之间存在免疫、遗传、发育和环境方面的差异。②使用动物进行研究可能引发伦理问题,尤其是在涉及动物模型中的自身免疫性疾病时。因此,在进行这些研究时,必须遵循严格的伦理标准和动物福利保护措施。③啮齿动物MG模型主要来源于在特定病原体自由条件下繁殖的转基因小鼠或大鼠品系,这些动物的免疫系统未受到病原体等环境因素的影响。这些都与人类免疫系统的复杂环境存在差异。

7 MG的非人类灵长类动物模型

猴子模型在MG研究中也得到了应用。由于猴子的生理和免疫系统更接近人类,因此这种模型能够提供更真实的疾病表现。然而,考虑到成本和伦理问题,猴子模型的使用相对较为有限。

8 体外模型

由于体内环境的复杂性,直接分析异种细胞的在动物模型中对MG病理的重要作用受到了阻碍。另一方面,体外模型对患者血清的表型和功能反应与人类捐献者的疾病严重程度相匹配,能够特异性阐明细胞串扰在疾病

进展中的作用。工程化的人体组织模型为研究NMJ的健康发育和神经肌肉疾病的病理提供了机会,并允许进行药物筛选。人诱导性多能干细胞可以分化为多种细胞类型,包括SkM细胞和运动神经元(motor neurons, MN)细胞。由于人诱导性多能干细胞可以轻松地从患者细胞中获得,这为通过患者特异性组织模型进行疾病建模和药物筛选提供了更好的选择^[32]。

利用人类干细胞来源的MN和SkM细胞建立的体外NMJ模型可以使我们更好地理解发育过程中发生的复杂信号^[32]。然而,其并不模拟系统性的发病机制。因此,下一代体外MG模型应纳入免疫细胞,以更好地再现自身免疫炎症环境。并且应在体外MG模型中进一步研究干细胞,分析其定位到突触前膜和潜在的神经炎性作用,包括参与临床观察到的病理特征,如轴突微细胞器紊乱、Reich颗粒积聚和脂色素^[5]。

8.1 二维体外模型

体外模型在体外NMJ模型中加入MG患者IgG和含有活性补体的人血清来模拟MG病理。MN和SkM细胞的共培养体系可以在体外建立比在体模型更简化和易于操作的NMJ模型^[32]。现有的体外NMJ模型是MN和SkM细胞共培养。最常用的方法是简单的共培养,将肌细胞和MN直接铺于彼此的上方或相邻,MN伸出轴突与肌细胞形成功能性的NMJ。这些2D培养模型的主要优点是相对简单,使用平坦的基底,可以有效和直接地分析细胞形态和病理特征^[5]。这种方法不需要对培养基质进行先进制造,足以诱导功能性NMJ的形成,并允许进行相对简单的分析^[32]。

但NMJ相比二维单层共培养缺乏生理性NMJ的形态、表型、组织和功能行为。首先,本质上是二维的,缺乏在体内存在的三维线索,这包括来自其他细胞类型的信号及与细胞外基质的相互作用^[5];其次,培养模型中SkM和MN的NMJs在2D培养中随机形成,这抑制了用于分析的运动单位的隔离,限制了精确的功能测量,并限制了其用于重复的、系统的实验^[32]。NMJ的三维组织模型克服了这些限制,再现了生理性NMJ的形态和功能特征^[31]。但3D体外NMJ模型也有一些潜在缺点包括难以重现和难以放大进行高通量分析。此外,一些分析方法如成像等在3D模型中难度较大。因此,在某些情况下,如对单根纤维的分析,二维模型可能仍然是必要的^[32]。

8.2 三维体外模型

三维体外模型的发展,尽管比二维模型培养更昂贵、更耗时和更低的通量,但弥补了二维NMJ模型中缺乏三维模型中细胞与细胞和细胞与细胞外基质的相互作用,有望为神经肌肉疾病研究提供一个更符合生理的平台。

与二维单层细胞相比,与SkM共培养的三维MN球体增加了轴突长度和MN成熟标志物的SMI32的表达,而

MN的存在改善了肌管的整体结构和功能,揭示了MN和SkM在三维共培养体系中的互利作用。此外,在三维模型中的培养2周后实现了功能性神经支配,而在可比较的二维NMJ共培养体系中则没有,且仅在三维NMJ共培养体系中观察到了成熟的AChR ϵ -亚基的表达。除了混合的三维NMJ模型外,还开发了隔室化的微型装置,在空间上分离MN球体和工程化的SkM,并通过轴突允许的通道进行连接,以更适当地模拟体内肌肉神经支配。通过这种区室化,三维神经突起生长和工程化SkM神经支配的可视化大大简化,类似于二维区室化共培养的研究^[31]。该系统已具备表征和量化NMJ功能的能力及体外模拟MG的能力^[31]。能够实现NMJ功能的自动化和无偏评估;理解在生理发育过程中测量NMJ功能变化的能力;表征神经毒素暴露和MG患者血清等病理因素的破坏作用。该三维系统提供了更加可控的环境,即突触的定向形成,样本间的异质性更小,通过光遗传学增加了刺激的时空控制,自动化的高通量系统,减少了每个样本分析的主观性^[32]。总之,三维系统为在疾病病理早期研究人类NMJ功能提供了可能,为药物筛选提供了机会,也为建立健壮的系统推进精准医疗奠定了基础。

9 小结与展望

目前,MG的发病机制尚未完全明确,而动物模型为深入了解MG的精确机制提供了重要的工具。其中,EAMG作为MG研究中最为常用的动物模型之一,成功地再现了许多MG的临床和病理特征,该模型涵盖了参与AChR免疫反应的关键细胞机制。然而,目前已有的MG动物模型各自具有一定的优势和不足。在未来的研究中,需要更深入地探索如何有机地整合这些模型,以形成一个更全面、可靠的疾病模拟系统。这将为MG的基础实验研究和临床转化提供支持。

在未来的应用中,有望探索精准治疗的方向,根据不同动物模型的研究结果,制定更为个性化的治疗策略,以提高治疗效果并减少不良反应。整合不同动物模型将有助于更全面地模拟MG的复杂病理过程,为基础实验研究提供更有说服力的数据支持。如何将实验室中的关键发现转化为临床应用,为MG患者提供更有效的治疗方案,是未来研究的重要方向。

参 考 文 献

- [1] SONG JW, LEI XW, JIAO W, et al. Effect of Qiangji Jianli decoction on mitochondrial respiratory chain activity and expression of mitochondrial fusion and fission proteins in myasthenia gravis rats[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 8623.
- [2] BERNARD I, SACQUIN A, KASSEM S, et al. A natural variant of the signaling molecule Vav1 enhances susceptibility to myasthenia gravis and influences the T cell receptor repertoire [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 2399.
- [3] KUSNER LL, SENGUPTA M, KAMINSKI HJ. Acetylcholine receptor antibody-mediated animal models of myasthenia gravis and the role of complement[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2018, 1413 (1): 136-142.
- [4] MANTEGAZZA R, VANOLI F, FRANGIAMORE R, et al. Complement inhibition for the treatment of myasthenia gravis[J]. *Immunotargets Ther*, 2020, 9: 317-331.
- [5] FRALISH Z, LOTZ EM, CHAVEZ T, et al. Neuromuscular development and disease: learning from in vitro and in vivo models[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 764732.
- [6] BOGATIKOV E, LINDBLAD I, PUNGA T, et al. miR-1933-3p is upregulated in skeletal muscles of MuSK+ EAMG mice and affects Impa1 and Mrpl27[J]. *Neurosci Res*, 2020, 151: 46-52.
- [7] 姚健. 胸腺切除治疗重症肌无力疗效及影响因素的分析[D]. 长春:吉林大学, 2005.
- [8] YAN L, YIN ZX, CHANG XL, et al. Neuromuscular junction disorders: experimental models and pathophysiological mechanisms[J]. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 2022, 82(4): 501-510.
- [9] MIZRACHI T, BRILL L, RABIE M, et al. NMO-IgG and AQP4 peptide can induce aggravation of EAMG and immune-mediated muscle weakness[J]. *J Immunol Res*, 2018, 2018: 5389282.
- [10] GRAUS YM, VAN BREDA VRIESMAN PJ, DE BAETS MH. Characterization of anti - acetylcholine receptor (AChR) antibodies from mice differing in susceptibility for experimental autoimmune myasthenia gravis (EAMG)[J]. *Clin Exp Immunol*, 1993, 92(3): 506-513.
- [11] HOWARD JF Jr. Myasthenia gravis: the role of complement at the neuromuscular junction[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2018, 1412 (1): 113-128.
- [12] CAO YL, DONG W, LI YZ, et al. MicroRNA - 653 inhibits thymocyte proliferation and induces thymocyte apoptosis in mice with autoimmune myasthenia gravis by downregulating TRIM9 [J]. *Neuroimmunomodulation*, 2019, 26(1): 7-18.
- [13] GHAZANFARI N, TRAJANOVSKA S, MORSCH M, et al. The mouse passive - transfer model of MuSK myasthenia gravis: disrupted MuSK signaling causes synapse failure[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2018, 1412(1): 54-61.
- [14] BORGES LS, RICHMAN DP. Muscle - specific kinase myasthenia gravis[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 707.
- [15] MORI S, SUZUKI S, KONISHI T, et al. Proteolytic ectodomain shedding of muscle-specific tyrosine kinase in myasthenia gravis [J]. *Exp Neurol*, 2023, 361: 114300.
- [16] LUO J, LINDSTROM J. Acetylcholine receptor - specific immunosuppressive therapy of experimental autoimmune myasthenia gravis and myasthenia gravis[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2018, 1413(1): 76-81.
- [17] 朱丽君. 重症肌无力动物模型的建立及中药治疗重症肌无力的机制研究[D]. 长春:吉林大学, 2011.
- [18] JIAO W, HU FY, LI JQ, et al. Qiangji Jianli Decoction promotes mitochondrial biogenesis in skeletal muscle of myasthenia gravis

- rats via AMPK/PGC - 1α signaling pathway[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 129: 110482.
- [19] KHALES I N, KORANI S, KORANI M, et al. Bortezomib: a proteasome inhibitor for the treatment of autoimmune diseases [J]. Inflammopharmacology, 2021, 29(5): 1291-1306.
- [20] CUI YZ, CHANG LL, WANG CB, et al. Metformin attenuates autoimmune disease of the neuromotor system in animal models of myasthenia gravis[J]. Int Immunopharmacol, 2019, 75: 105822.
- [21] LAZARIDIS K, BALTATZIDOU V, TEKTONIDIS N, et al. Antigen-specific immunoadsorption of MuSK autoantibodies as a treatment of MuSK - induced experimental autoimmune myasthenia gravis[J]. J Neuroimmunol, 2020, 339: 577136.
- [22] HAO Y, ZHAO W, CHANG LL, et al. Metformin inhibits the pathogenic functions of AChR - specific B and Th17 cells by targeting miR-146a[J]. Immunol Lett, 2022, 250: 29-40.
- [23] JING F, HUANG W, MA Q, et al. AEB-071 ameliorates muscle weakness by altering helper T lymphocytes in an experimental autoimmune myasthenia gravis rat model[J]. Med Sci Monit, 2020, 26: e924393.
- [24] FANG TK, YAN CJ, DU J. CTLA-4 methylation regulates the pathogenesis of myasthenia gravis and the expression of related cytokines[J]. Medicine (Baltimore), 2018, 97(18): e0620.
- [25] LIU Y, YANG CL, YANG B, et al. Prophylactic administration of fingolimod (FTY720) ameliorated experimental autoimmune myasthenia gravis by reducing the number of dendritic cells, follicular T helper cells and antibody - secreting cells[J]. Int Immunopharmacol, 2021, 96: 107511.
- [26] HUIJBERS MG, PLOMP JJ, VAN ES IE, et al. Efgartigimod improves muscle weakness in a mouse model for muscle-specific kinase myasthenia gravis[J]. Exp Neurol, 2019, 317: 133-143.
- [27] ALBAZLI K, KAMINSKI HJ, HOWARD JF Jr. Complement inhibitor therapy for myasthenia gravis[J]. Front Immunol, 2020, 11: 917.
- [28] OHIGASHI I, YAMASAKI Y, HIRASHIMA T, et al. Identification of the transgenic integration site in immunodeficient tg ϵ 26 human CD3 ϵ transgenic mice[J]. PLoS One, 2010, 5(12): e14391.
- [29] LEE HK, SEO SM, KIM JY, et al. Rag2 deficiency enhances susceptibility to systemic mouse adenovirus type 1 infection[J]. Intervirology, 2022, 65(3): 134-143.
- [30] TANNER SM, LORENZ RG. FVB/N mouse strain regulatory T cells differ in phenotype and function from the C57BL/6 and BALB/C strains[J]. FASEB Bioadv, 2022, 4(10): 648-661.
- [31] LIBERMAN M, CHAVEZ M, NASH TR, et al. Engineering and characterization of an optogenetic model of the human neuromuscular junction[J]. J Vis Exp, 2022(182): 63759.
- [32] LYNCH E, PEEK E, REILLY M, et al. Current progress in the creation, characterization, and application of human stem cell-derived in vitro neuromuscular junction models[J]. Stem Cell Rev Rep, 2022, 18(2): 768-780.

责任编辑:龚学民