

· 实验研究 ·

双类似物鼻黏膜耐受对实验性自身免疫性重症肌无力幼鼠作用机制的研究

刘仕林, 黄志

(重庆医科大学附属儿童医院神经内科, 重庆 400014)

〔摘要〕 **目的** 对实验性自身免疫性重症肌无力(EAMG)幼鼠选择双类似物(Lys262-Ala207)通过不同时间点进行鼻黏膜免疫耐受预防性给药后,观察其临床及免疫指标的变化,评价临床疗效及探讨鼻黏膜耐受对EAMG的预防作用机制。**方法** 用乙酰胆碱受体单克隆抗体建立C57BL/6小鼠EAMG模型,并在致敏前10 d(A组)及致敏当日(B组)经鼻黏膜滴入Lys262-Ala207诱导黏膜耐受,检测给药后A、B组及相应对照组CA组、CB组小鼠的临床症状及各项指标的改变情况。**结果** ①A、B两组临床症状明显轻于相应对照组,且A组临床症状轻于B组。②A、B组低频重复电刺激(RNS)出现衰减的阳性率低于各自对照组;③A、B两组小鼠血清乙酰胆碱受体抗体AChRAb(IgG)水平明显低于各自对照组,且A组轻于B组。④调节性CD4⁺CD25⁺T细胞含量A组(4.516±0.598)明显高于B组(3.671±0.300),且A、B组明显高于各自对照组。**结论** Lys262-Ala207鼻黏膜预防耐受可有效地抑制重症肌无力的临床症状,为采用该途径治疗重症肌无力的可行性提供了理论依据。

[中国当代儿科杂志,2008,10(2):191-194]

〔关键词〕 实验性自身免疫性重症肌无力;单克隆抗体;鼻黏膜耐受;双类似物;小鼠

〔中图分类号〕 R-33 **〔文献标识码〕** A **〔文章编号〕** 1008-8830(2008)02-0191-04

The mechanism of prophylactic effects of nasal tolerance with a dual analogue on experimental autoimmune myasthenia gravis in young mice

LIU Shi-Lin, HUANG Zhi. Department of Neurology, Children's Hospital Affiliated to Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China (Huang Z, Email:huangzhi3500@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective To study the prophylactic effects of nasal tolerance with a dual analogue, Lys262-Ala207, on the mouse model of experimental autoimmune myasthenia gravis (EAMG) and the underlying mechanism. **Methods** Mouse model of EAMG was induced by intraperitoneal injection of mAb35. Lys262-Ala207 or PBS was given nasally before 10 days (study group A and control group A) or on the day (study group B and control group B) of immunization for 10 days. Clinical syndromes were evaluated after immunization. Serum level of acetylcholine receptor antibody (AChR-Ab) IgG was detected using ELISA. The number of mononuclear cells expressing CD4⁺ and CD4⁺CD25⁺T from spleen was measured using flow cytometry. **Results** Compared with the corresponding control groups, the clinical syndromes were improved ($P<0.01$) in mice from the study groups A and B. The positive rate of the repetitive nerve stimulation (RNS) test in the study groups A and B was significantly lower than that in the corresponding control groups ($P<0.01$). The study group A showed lower positive rate of RNS than the study group B ($P<0.05$). The serum levels of AChR-Ab IgG in the study groups A and B (15.01 ± 1.09 and $19.23\pm1.31\mu\text{g/mL}$) decreased compared with that in the corresponding control groups (28.12 ± 1.28 and $29.35\pm1.28\mu\text{g/mL}$) ($P<0.01$). The study group A mice had lower serum AChR-Ab IgG levels than the study group B ($P<0.01$). The number of CD4⁺CD25⁺T cells in the study groups A ($4.516\pm0.598\%$) and B ($3.671\pm0.300\%$) increased significantly compared with that in the corresponding control groups ($2.661\pm0.411\%$ and $2.412\pm0.500\%$) ($P<0.01$) and more CD4⁺CD25⁺T cells were found in the study group A than in the study group B ($P<0.01$). **Conclusions** Nasal administration with dual analogues may ameliorate clinical syndromes in EAMG rats, which may be associated with decreased serum AChR-Ab IgG levels and increased number of CD4⁺CD25⁺T cells from spleen.

[Chin J Contemp Pediatr, 2008, 10 (2):191-194]

Key words: Experimental autoimmune myasthenia gravis; Monoclonal antibody; Nasal tolerance; Dual analogue; Mice

[收稿日期]2007-11-29;[修回日期]2008-01-12
[作者简介]刘仕林,男,硕士研究生。主攻方向:儿童重症肌无力免疫学的研究。
[通讯作者]黄志,男,教授,主任医师,硕士生导师,重庆医科大学附属儿童医院神经内科,邮编 400014。

重症肌无力(myasthenia gravis, MG)是主要由乙酰胆碱受体抗体(acetylcholine receptor antibody, AChR-Ab)介导、T细胞免疫依赖、补体参与的一种自身免疫性疾病。当前国内外对MG的治疗主要采用非特异性免疫抑制剂,不能从根本上解决T和B淋巴细胞功能的异常,防止疾病复发,且易产生严重的副作用,尤其对生长发育中的儿童影响更大。对MG理想的治疗方法是既不影响机体免疫功能的完整性,又能特异性的抑制或清除异常的自身免疫性T和B淋巴细胞。而MG免疫调节及耐受治疗是目前受到广大学者高度重视和推崇的一种方法,其主要机制是通过下调乙酰胆碱受体(AChR)特异性免疫反应来纠正异常的免疫病理反应,从而达到从根本上治愈MG的目的。

实验性自身免疫性重症肌无力(experimental autoimmune myasthenia gravis, EAMG)在临床表现、药理学、电生理、免疫学及组织学等方面与MG颇为类似^[1],从而为EAMG作为MG的动物模型提供了条件。双类似物(Lys262-Ala207)是由两条单一的氨基酸类似物 p195-212 和 p259-271 衔接而成的人类AChR反应性T细胞免疫主导表位。已被证明是EAMG模型的有效免疫调节剂,经口服耐受可以缓解进展中的EAMG症状,并有效地抑制MG相关的免疫应答^[2],选择Lys262-Ala207为耐受原,通过不同时间点对EAMG动物模型进行预防性鼻黏膜免疫耐受,观察其临床及细胞免疫指标变化,从而探讨鼻黏膜耐受对预防EAMG发病的细胞免疫调节机制,以期为临床特异性治疗儿童MG提供理论依据和新的治疗方法。

1 材料和方法

1.1 材料

①乙酰胆碱受体单克隆抗体(mAb35),购自美国Sigma公司;②耐受肽: Lys262-Ala207是由氨基酸自动合成仪合成并链接的2条单个氨基酸置换的多肽类似物,作为本实验的耐受肽(V-I-V-K-L-I-P-S-T-S-S-A-V-D-T-P-Y-L-D-I-T-Y-H-F-V-A-Q-R-L-P-L),由联美(西安)生物科技有限公司合成。

1.2 实验动物

健康清洁级,雌性C57BL/6小鼠60只,4~5周龄,体重13~15 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)。

1.2.1 动物模型的建立 参照文献报道^[3,4],并采用预实验所成功建立的EAMG动物模型的剂量

(1.0 mg/kg),经腹腔注射含mAb35的Ringer's液0.2 mL(含140 mmol/L NaCl, 5.4 mmol/L KCl, 1 mmol/L CaCl₂, 2.4 mmol/L NaHCO₃, pH 7.4)建立模型^[5]。鼻腔耐受的诱导:致敏前10 d及致敏当日(0 d)水合氯醛腹腔注射浅麻醉小鼠后,用微量加样器取含有耐受肽25 μg的磷酸盐缓冲液(PBS)50 μL滴入两个鼻孔,每个鼻孔25 μL,连续10 d。对照组滴入不含耐受肽的PBS 50 μL每个鼻孔25 μL,连续10 d。

1.2.2 动物分组 将60只小鼠随机分为4组,每组15只。①预防耐受组1(A):C57BL/6小鼠自致敏前10 d开始每日用耐受肽进行鼻腔耐受诱导。②预防耐受组2(B):小鼠自致敏当日(0 d)开始用耐受肽进行鼻腔耐受诱导。③对照组1(CA):按照A组的时间程序鼻饲含有等量不含肽的PBS 50 μL。④对照组2(CB):按照B组的时间程序鼻饲含有等量不含肽的PBS 50 μL。

1.3 检测指标

1.3.1 临床评分 每6 h观察动物毛色、步态及摄食情况。小鼠致敏后,由两名观察者每日采用双盲法对其进行EAMG严重性的临床评估。按Lennon等^[6]的分级法将肌无力症状分为4级:0级,没有肯定肌无力表现;1级,嘶咬无力,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,严重无力表现,无嘶咬动作,肌肉震颤,呼吸困难,濒死或死亡。症状居中间者,分别评为0.5,1.5,2.5级。

1.3.2 低频重复频率电刺激(RNS) 3.3%水合氯醛按10 mL/kg的用量腹腔麻醉实验小鼠,固定于头部和四肢,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肉内侧头(跟腱附着处),参考电极插入腓肠肌肌肉内,地线插入刺激电极与记录电极之间,采用RNS软件进行操作。刺激频率分别为1 Hz、3 Hz、5 Hz、7 Hz、10 Hz,记录实验小鼠的腓肠肌肌电位及收缩波幅,用第5个电位对第1个电位的变化百分比D₅表示衰减值,>10%者为阳性。

1.3.3 血清抗AChR-Ab(IgG)水平的检测 由小鼠股动脉取血并分离血清,用ELISA法测定小鼠血清AChR-Ab滴度(包被好的nAChR酶板由上海华山医院神经免疫生化室提供)。

1.3.4 CD4⁺CD25⁺调节性T细胞测定 小鼠处死后,无菌条件下去脾脏Ficoll法分离,制成2×10⁷/mL单个核细胞(MNC)悬液,设复孔,分别加

入 20 μ L 荧光标记的抗小鼠单抗(FITC-抗 CD4、PE-抗 CD25),并作阴性对照。24 h 内用流式细胞仪检测,测定 10 000 个细胞,结果以 CD4⁺CD25⁺ Tr 细胞占 CD4⁺细胞的百分比表示。

1.4 统计学处理

所有原始数据建立数据库,以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS11.5 统计软件进行分析。配对样本比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 症状观察临床评分

实验小鼠致敏后均出现不同程度的肌无力症状,其中实验滴鼻(麻醉)过程中 A 组小鼠有 1 只死亡,B 组有 3 只死亡;由于肌无力症状加重导致 CA 组 4 只小鼠死亡,CB 组 5 只死亡,临床评分为 3 分。其中 A 组与 CA 组,B 组与 CB 组在致敏后 6~8 h 时部分出现临床症状,表现为摄食、运动减少,毛皱、易脱落失去光泽;24 h 均表现轻重不等的 EAMG 症状,临床评分差异均有显著性意义($P < 0.01$),A 组临床平均评分低于与 B 组,但二者差异无显著性(图 1)。

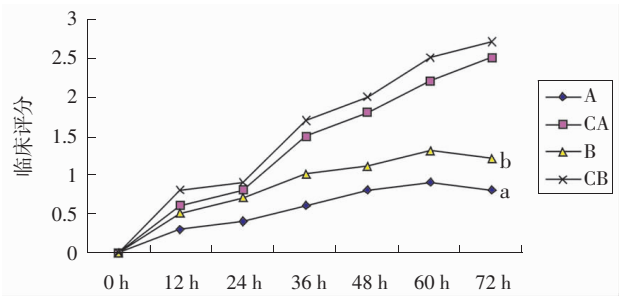


图1 各实验组小鼠临床评分 a: A 组与 CA 组比较, $P < 0.01$; b: B 组与 CB 组比较, $P < 0.01$

2.2 重复频率电刺激(RNS)

出现肌无力症状的小鼠在做低频重复电刺激时均出现明显的衰减反应($D_5 > 10\%$),CA 组与 CB 组小鼠 RNS 平均衰减率均 $> 10\%$,为阳性。A 组与 B 组小鼠 RNS 平均衰减率 $< 10\%$,均为阴性,但二者比较差异有显著性($P < 0.05$)。见表 1。出现 RNS 衰减的小鼠经腹腔注射新斯的明,10~15 min 后再行 RNS 检查,均不出现波幅的衰减,提示新斯的明试验阳性。

2.3 血清抗 AChR-Ab (IgG) 水平的检测

对小鼠血清中的 AChR-Ab 水平通过 ELISA 法进行定量检测,结果见表 2。从表中可以看出致敏后,A 组、B 组大鼠血清抗 AChR-Ab (IgG) 含量明显

低于相应对照 CA 组、CB 组,且 A 组低于 B 组,差异均有非常显著意义($P < 0.01$)。

表1 各实验组小鼠 RNS 衰减率比较

组别	鼠数	RNS 衰减率(%)	D ₅ > 10% 例数
A	14	4.38 $\pm$ 1.38 ^{a,c}	2
CA	15	15.25 $\pm$ 1.14	13
B	12	9.12 $\pm$ 1.08 ^b	6
CB	14	16.11 $\pm$ 1.23	14

a: A 组与 CA 组比较, $P < 0.01$; b: B 组与 CB 组比较, $P < 0.01$; c: A 组与 B 组比较, $P < 0.05$

表2 各实验组小鼠血清 AChR-Ab 水平的比较

组别	鼠数	AChR-Ab 水平(μ g/mL)
A	14	15.01 $\pm$ 1.09 ^{a,c}
CA	11	28.12 $\pm$ 1.28
B	12	19.23 $\pm$ 1.31 ^b
CB	10	29.35 $\pm$ 1.28

a: A 组与 CA 组比较, $P < 0.01$; b: B 组与 CB 组比较, $P < 0.01$; c: A 组与 B 组比较, $P < 0.01$

2.4 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞测定

A 组和 B 组 CD4⁺ T 数目明显低于各自的对照组;而 CD4⁺CD25⁺ T 细胞数目则高于各自对照组,且 A 组高于 B 组,二者差异有显著性($P < 0.01$);A、B 组中 CD4⁺细胞中的 CD4⁺CD25⁺细胞亚群所占比例均比各自对照组显著增高(表 3)。

表3 小鼠脾脏 MNC 中 CD4⁺, CD4⁺CD25⁺细胞数目 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	鼠数	CD4 ⁺ T	CD4 ⁺ CD25 ⁺ T
A	14	12.801 $\pm$ 1.205 ^a	4.516 $\pm$ 0.598 ^{a,c}
CA	11	14.984 $\pm$ 1.703	2.661 $\pm$ 0.411
B	12	13.025 $\pm$ 1.430 ^b	3.671 $\pm$ 0.300 ^b
CB	10	17.814 $\pm$ 3.825	2.412 $\pm$ 0.500

a: A 组与 CA 组比较, $P < 0.01$; b: B 组与 CB 组比较, $P < 0.01$; c: A 组与 B 组比较, $P < 0.01$

3 讨论

目前,国内外对 MG 的免疫治疗主要采用皮质类固醇及免疫抑制剂,但这种非特异性治疗通常不能完全控制免疫反应,且停药后易复发。预防 MG 发病的主要目的是下调 AChR 特异性免疫反应,防止异常免疫反应。最初用完整的电鳗 AChR 口服耐受虽然取得了一定的疗效,但追踪观察发现可使部分大鼠病情加重^[7],推测与 AChR 本身分子量极大和具有高度致病性有关,且所需耐受量大,作用微弱,维持有效耐受时间短暂。双类似物 Lys262-Ala207 是经过改良使免疫原性减弱后的肽段,除具有很好的安全性外,还具有下调人类针对 AChR 自身免疫反应的作用。鼻黏膜免疫耐受不需要确定作用部位,并有特异性免疫抑制的优点,优势是抗原剂

量用微克计,约为口服耐受剂量的 1/100 ~ 1/1 000,所以采用鼻黏膜耐受。

本研究应用 Lys262-Ala207 预防性免疫耐受 A, B 组后,实验小鼠的病情明显轻于相应对照组,且 A 组耐受效果优于 B 组。在对实验小鼠做重复神经电刺激,通过检测肌电图衰减率的结果也证实了这一结果。MG 患者血清中的 AChR 特异性 IgG 抗体是 MG 最主要的致病因子,小鼠致敏后测定血清的 AChR 抗体 IgG 含量,A,B 组均低于各自对照组,且 A 组低于 B 组。本实验结果表明,Lys262-Ala207 经鼻黏膜耐受不仅可以有效的抑制临床症状,而且伴有 AChR 特异性 IgG 致病性抗体含量减少,说明 Lys262-Ala207 鼻黏膜耐受疗法可有效的抑制 EAMG 的发生或减轻 EAMG 的病情。

随着对免疫耐受机制研究的不断深入,CD₄⁺CD₂₅⁺T 细胞引起了人们极大的兴趣,它是除胸腺阴性选择以外,机体调节免疫耐受,阻止自身免疫性疾病发生的另一重要机制^[8,9]。免疫耐受发生的机制之一是与诱导 CD₄⁺调节性 T 细胞(Tr)产生免疫性调节性细胞因子 TGF-β 等介导的主动抑制有关。目前研究表明,CD₄⁺CD₂₅⁺T 细胞系在体外被认为是 TGF-β 的分泌细胞,免疫抑制功能与 TGF-β 分泌呈正相关^[10]。通过检测 CD₄⁺CD₂₅⁺T 细胞变化可推测 TGF-β 在本实验中亦有上调,Tr(CD₄⁺CD₂₅⁺T)细胞能抑制由 CD₄⁺CD₂₅⁻T 细胞诱导的器官特异性自身免疫性疾病,且在体外可有效地抑制抗原特异性 T 细胞激活^[11]。在本实验中预防耐受治疗后,A 组、B 组 CD₄⁺CD₂₅⁺T 细胞数均显著高于各自对照组,且 A 组高于 B 组,即反应 TGF-β 功能的 CD₄⁺CD₂₅⁺Tr 细胞含量增高,证明 TGF-β 功能增强在 EAMG 耐受中起重要作用。推测经鼻黏膜给予的 Lys262-Ala207 被鼻黏膜相关淋巴组织吸收加工后,激活免疫调节性 CD₄⁺CD₂₅⁺T 细胞,发挥生物学效应,提示鼻黏膜耐受机制可能是首先导致了特异性 CD₄⁺T 细胞的无能,同时由于调节性 CD₄⁺CD₂₅⁺T 细胞的激活又反过来抑制了 CD₄⁺、CD₈⁺T 细胞的活性,从而使 B 细胞的增殖和分化受到抑制,其结果是导致了 AChR 抗体 IgG 的含量减少^[12,13]。因此 CD₄⁺CD₂₅⁺T 细胞可作为检测 EAMG 功能的重要免疫指标。

通过本实验,我们推测 Lys262-Ala207 鼻黏膜耐受具有下调人类针对 AChR 自身免疫反应的作用,不同的时间点预防耐受效果不同,致敏前及致敏时耐受优于致敏后耐受,致敏前优于致敏时耐受,提示自身免疫一旦启动再给予耐受的疗效要逊于自身免

疫启动前或启动同时耐受治疗^[14]。Lys262-Ala207 鼻黏膜耐受使用方便、安全、无明显毒副作用,与临床应用的目标更接近,为临床治疗 MG 提供了理论依据,为临床探索重症肌无力的防治开辟了新的途径。

[参 考 文 献]

[1] Yeh JH, Chiu HC. Comparison between double-filtration Plasmapheresis and immunoabsorption Plasmapheresis in the treatment of patients with myasthenia gravis[J]. J Neurol, 2000, 247(7): 510-513.

[2] Paas-Rozner M, Dayan M, Paas Y, Changeux JP, Wirguin I, Sela M, et al. Oral administration of a dual analog of two myasthenogenic T cell epitopes down-regulates experimental autoimmune myasthenia gravis in mice[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(5): 2168-2173.

[3] Poulas K, Tsouloufis T, Tzartos J. Treatment of passively transferred experimental autoimmune myasthenia gravis using papain[J]. Clin Exp Immunol, 2000, 120(2):363-368.

[4] Kaminski HJ, Li Z, Richmonds C, Lin F, Medof ME. Complement regulators in extraocular muscle and experimental autoimmune myasthenia gravis[J]. Exp Neurol, 2004, 189(2):333-342.

[5] 黄志,徐秀娟. nAChR 单克隆抗体建立重症肌无力被动转移小鼠模型的研究[J]. 第三军医大学学报,2006,28(13):1397-1340.

[6] Lennon VA, Lambert EH, Leiby KR, Okarma TB, Talib S. Recombinant human acetylcholine receptor alpha-subunit induces chronic experimental autoimmune myasthenia gravis[J]. J Immunol, 1991, 146(7):2245-2248.

[7] 王增钰,乔健,Link H. 乙酰胆碱受体抑制剂实验性自身免疫性重症肌无力的抑制作用[J]. 上海免疫学杂志,1994,14(3):129-133.

[8] Takahama Y. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection[J]. Nat Rev Immunol, 2006, 6(2): 127-135.

[9] Sakaguchi S. Naturally arising CD₄⁺ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses[J]. Annu Rev Immunol, 2004, 22(4):531-538.

[10] Levings MK, Sangregorio R, Sartirana C, Moschin AL, Battaglia M, Orban PC, et al. Human CD₄⁺CD₂₅⁺T suppressor cell clones produce transforming growth factor beta, but not interleukin 10, and are distinct from type 1 T regulatory cells[J]. J Exp Med, 2002, 196(10):1335-1346.

[11] Kohm AP, Carpentier PA, Anger HA, Miller SD. Cutting edge: CD₄⁺CD₂₅⁺regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. J Immunol, 2002, 169(9):4712-4716.

[12] Liu R, La Cava A, Bai XF, Jee Y, Price M, Campagnolo DI, et al. Cooperation of invariant NKT cells and CD₄⁺CD₂₅⁺T regulatory cells in the prevention of autoimmune myasthenia[J]. J Immunol, 2005, 175(12):7898-7904.

[13] Yamagiwa S, Gray JD, Hashimoto S, Horwitz DA. A role for TGF-β in the generation and expansion of CD₄⁺CD₂₅⁺regulatory T cells from human peripheral blood[J]. J Immunol, 2001, 166(12):7282-7289.

[14] 富羽弘,王化冰,王丽华,王维治. 设计耐受原并用鼻黏膜耐受治疗 EAMG 的方法学研究[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志,2002,9(4):206-209.

(本文编辑:吉耕中)