

网络出版时间: 2017-5-22 17: 46 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170522.1745.036.html>

◇ 综 述 ◇

原发性干燥综合征动物模型的研究进展

徐诗霞 吴华勋 综述, 魏 伟 审校

摘要 干燥综合征是一种较为常见的自身免疫性疾病, 以唾液腺和泪腺损伤较为典型, 并存在较多的腺体外器官受累。目前对于此类疾病具体的发病机制仍然不明, 针对发病机制的药物尚未问世, 因此理想的动物模型对于新药研发具有重要的意义。目前国内外存在自发型和诱导型两种动物模型, 由于自发型动物模型主要症状对于干燥综合征的机制研究存在干扰, 因此对于诱导型动物模型建模方法的需求不断增加。本文干燥综合征动物模型的研究进展作一综述。

关键词 原发性干燥综合征; 动物模型; 抗原

中图分类号 R 593.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)07-1094-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.07.036

2017-01-13 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81330081、81302784、81673444)

作者单位: 安徽医科大学临床药理研究所, 抗炎免疫药物教育部重点实验室, 抗炎免疫药物安徽省协同创新中心, 合肥 230032

作者简介: 徐诗霞, 女, 硕士研究生;

魏 伟, 男, 教授, 博士生导师, E-mail: wwei@ahmu.edu.cn

干燥综合征(sjogren syndrome, SS)是一种以侵犯外分泌腺为主要特征的慢性炎症性自身免疫疾病, 主要临床症状为口干及眼干, 并以淋巴细胞浸润为主要的病理学特征。除口干眼干外, 该病还具有众多的腺外系统症状, 如皮肤干燥、关节疼痛、肾脏、肺部以及消化系统损害等, 部分患者出现低热、乏力等全身症状^[1]。SS 根据发病原因可分为原发性和继发性。原发性 SS 发病机制尚不清楚, 目前多数认为是一种遗传、免疫、病毒等多因素综合作用的结果; 继发性 SS 一般是继发于某种诊断明确的结缔组织病, 如系统性红斑狼疮、类风湿关节炎等。SS 以女性和老年患者较多, 男女比例约为 1 : 9, 可能与体内激素水平有关^[2]。目前, 对于原发性 SS 的治疗仍然停留在症状改善和替代治疗水平, 毒蕈碱 3 型受体(muscarinic 3 receptor, M3R)激动剂刺激唾液的产生, 人工泪液和人工唾液的给予都不能从根本上解除该疾病给患者带来的痛苦, 免疫抑制剂的诸多不良反应使得其只能作为临床基础治疗药物。

的诊断价值[J]. 放射学实践, 2012, 27(3): 268-70.

[11] Spettel S, Shah P, Sekhar K, et al. Using hounsfield unit measurement and urine parameters to predict uric acid stones[J]. Urology, 2013, 82(1): 22-6.

[12] 黄科峰, 周宝成, 黄金山, 等. 能谱 CT 有效平均原子序数对离体尿路结石成分分析的前瞻性研究[J]. 临床军医杂志, 2011,

39(4): 615-7.

[13] Duan X, Li Z, Yu L, et al. Characterization of urinary stone composition by use of third generation dual-source dual-energy CT with increased spectral separation[J]. AJR Am J Roentgenol, 2015, 205(6): 1203-7.

Diagnostic value of dual energy spectrum CT in uric acid calculus

Zhang Yujiao¹, Li Xiaohu¹, Jiang Zhaoxiang², et al

(¹Dept of Radiology, ²Dept of Urology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University Hefei 230022)

Abstract 57 cases of patients were treated with dual energy spectral CT scanning in a retrospective study and the effective atomic number and histogram were adopted to determine the stone composition. The results of infrared spectroscopy were used as reference standards. The sensitivity for detecting pure uric stones, pure non-uric acid stones and mixed stones were 100%, 91.7%, 97.0%, respectively; with specific degree 100%, 97.4%, 95.7%, respectively; with positive predictive value 100%, 84.6%, 98.5%, respectively; and the negative predictive value were 100%, 98.7%, 91.7%, respectively. Dual energy spectrum CT through effective atomic number combining histogram has high accuracy in the diagnosis of pure uric acid stones, pure non-uric acid stones and mixed stones and can accurately distinguish uric acid stones and non-uric acid stones *in vivo*.

Key words dual energy CT; urinary calculus; uric acid stone

近年来,随着对 SS 研究的逐渐深入,动物模型的种类和构建方法也不断更新和改进。

SS 动物模型主要分为两大类:自发型和诱导型。自发型动物模型往往是继发于另一种疾病而产生 SS 症状,对于其发病原因和病理生理机制的研究无法深入开展。因此用特定的方法局部模拟人类 SS,即诱导型动物模型,可以弥补自发型动物模型的不足。对于自发型动物模型,目前国内外主要有 NOD 小鼠、MRL/lpr 小鼠、NZB/WF1 小鼠等常用于 SS 的研究。这类动物各自具有特定的遗传学特征,在一定的周龄时期可逐渐表现出典型的缺陷:NOD 小鼠是 1 型糖尿病小鼠,在 19 个易感位点中,位于 1 号和 3 号染色体上的易感位点与 SS 的发病有关^[3];MRL/lpr 小鼠常被用于系统性红斑狼疮动物模型的研究,但其同时也具有涎腺炎和泪腺炎特点,与人类 SS 具有相似的症状^[4];NZB/WF1 小鼠是由新西兰黑小鼠和新西兰白小鼠杂交得到的 F1 代小鼠,因存在唾液腺淋巴细胞浸润和血清抗核抗体、抗 SSA 抗体而被用于 SS 模型的研究^[5]。目前,诱导型动物模型常采用多肽抗原、蛋白抗原以及碳酸酐酶 II 诱导的免疫性涎腺炎,均取得了一定的效果。该文根据注射抗原的种类不同,将造模方法分为蛋白抗原和多肽抗原等诱导的 SS 动物模型。

1 蛋白抗原诱导的 SS 动物模型

此类方法主要使用各类免疫佐剂加强局部免疫

应答,佐剂的选择以弗氏完全佐剂(Freund's complete adjuvant, FCA)或弗氏不完全佐剂(Freund's incomplete adjuvant, FIA)使用频率较高。由于动物的大唾液腺主要包括颌下腺、腮腺与舌下腺,颌下腺为唾液腺的主要功能腺体,唾液的分泌 70%来自颌下腺,其次是腮腺,舌下腺分泌量最小^[6]。因此将起主要作用的颌下腺制成匀浆注射入异体内,根据免疫学原理,供体颌下腺作为一种抗原进入受体,产生抗原抗体相互作用,引起机体炎症反应及免疫应答,干扰或损伤受体颌下腺功能。根据添加的辅助试剂的种类不同,蛋白抗原诱导的 SS 动物模型又分为佐剂型和病毒型。

1.1 佐剂辅助蛋白抗原诱导的动物模型 佐剂在辅助蛋白抗原诱发型动物模型中起着至关重要的作用,可将抗原包含在油滴中并以缓慢释放的方式延长抗原在体内存留时间而加强炎症免疫应答,因此佐剂的选择、剂量需适宜。一般将抗原浓度调整至所需浓度的两倍时,以 1:1 比例等体积混合制成乳化剂较为常用。对于需多次免疫的情况,在首次或前两次使用 FCA 后,后期的免疫可用 FIA,避免免疫过强导致动物死亡。Titermax 和克雷伯氏菌 O3 脂多糖(Klebsiella O3 lipopolysaccharide, KO3 LPS)为作用较强的佐剂,可以只免疫一次,但是使用时剂量的选择至关重要。部分佐剂辅助诱导的动物模型见表 1。

1.2 病毒辅助蛋白抗原诱导的动物模型 病毒免

表 1 佐剂辅助蛋白抗原诱导的动物模型

动物	抗原	辅助佐剂	诱导方法	检测指标	评价	参考文献
Lewis 大鼠	Wistar 大鼠颌下腺与舌下腺匀浆	等体积 FCA 百日咳杆菌	1 次:足垫和足背皮下注射	2 周后唾液腺泪腺淋巴细胞浸润;抗唾液腺抗泪腺抗体	大鼠造模成本高并且周期长可能导致成模率低下	[7]
出生 3 d 切除胸腺的雌性 CRJ:CD-1 小鼠	8~10 周龄 CRJ:CD-1 小鼠颌下腺	等体积 FCA	2 次:4 和 6 周龄四肢足垫皮下注射	22 周龄检测出抗颌下腺导管上皮抗体	切除胸腺的小鼠对生存环境的要求比较高	[8]
SPF 级 6~8 周龄 SMA 小鼠	SMA 小鼠颌下腺	等体积 KO3LPS	每隔 30 d 右腹股沟皮下注射(至少两次)	唾液腺细胞浸润至少 2 倍,主要是 CD4 和 CD8 阳性 T 细胞	佐剂的用量、免疫次数和动物性别的选择需慎重	[9]
SPF 级 8 周龄 Balb/c 小鼠	Balb/c 小鼠颌下腺	等体积 FCA 百日咳杆菌	多点注射于足垫、背部皮下,同时背部注射百日咳杆菌	造模后 2、4、6 周颌下腺淋巴细胞浸润逐渐加重;唾液流率降低	免疫次数过少可能导致模型成功率低	[10]
8 周龄雌性 C57BL/6 小鼠	C57BL/6 小鼠颌下腺	等体积 FCA 或 FIA	第 0、7、14 d 依次背部皮下多处注射 FCA, FCA, FIA 调整的抗原	造模后颌下腺第 5 和 30 周浸润较重, Th17 细胞表达水平明显升高	动物未在 SPF 环境下饲养可能影响模型的成功率	[11]

表 2 病毒辅助蛋白抗原诱导的动物模型

动物	抗原	辅助佐剂	诱导方法	检测指标	评价	参考文献
出生 3 d 切除胸腺的雌性 CRJ: CD-1 小鼠	培养的同种鼠类颌下腺细胞	流行性腮腺炎病毒	2 次: 4 周龄和 6 周龄时足垫皮下注射	抗颌下腺导管上皮抗体; 腮腺、胰腺轻微的炎症性损伤	小鼠的生存环境要求较高	[12]
8 ~ 14 周龄雌性 C57BL/6 - +/+ 和 C57BL/6-gld/gld 小鼠	培养的同种鼠类颌下腺细胞	巨细胞病毒	1 次: 分别在小鼠双侧颌下腺组织的上、中、下位置注射	颌下腺大量的 T 淋巴细胞浸润	小鼠周龄差异大; 抗原注射方式及操作须严谨	[13]

疫的方法近年来并不常见,但理论上此类方法同样可以诱导 SS 动物模型。病毒可能参与的免疫学原理是,病毒在复制活跃期可直接破坏宿主细胞,刺激机体免疫细胞介导的体液免疫和细胞免疫,从而造成机体的自我损伤。可能的病毒包括 EB 病毒、巨细胞病毒、丙型肝炎病毒、疱疹性口角炎病毒等。部分病毒辅助蛋白抗原诱导的动物模型见表 2。

2 多肽抗原诱导的 SS 动物模型

这是近年来逐渐被采用的模型构建方法。根据多肽种类的不同分为 M3R 诱导的 SS 动物模型和 SSA 抗原(Ro)诱导的 SS 动物模型等。由于 SS 患者体内存在抗 M3R 抗体和抗 SSA 抗体、抗 SSB 抗体,将 M3R 和 SSA 抗原多肽片段注射入动物体内,同时还可以通过表位扩散产生其它抗体,如抗 SSB 抗体,这些相关的抗体与体内相应的受体或抗体发生相互作用,干扰了信号传导途径,引起外分泌腺功能障碍,产生干燥症状。此种方法免疫小鼠具有很强的特异性,成模小鼠体内可以检测出针对该肽段的特异抗体,但是较长的周期问题仍然需要解决。

2.1 M3R 诱导的 SS 动物模型 M 受体属于鸟苷酸结合蛋白偶联的受体超家族,分为 5 个亚型 M1~M5,其中 M3R 主要位于腺体和平滑肌上,起到刺激腺体分泌和平滑肌收缩的功能^[14],抗 M3R 抗体与 SS 患者唾液腺腺泡细胞上的 M3R 结合可能导致唾液腺的分泌功能损伤^[15]。因此 M3R 在 SS 的发生机制中可能发挥了重要作用。将 M3R 的多肽片段 N49 用 CFA 乳化后足垫或背部皮下注射入 Balb/c 小鼠体内,并在第 14、35、51 天以 FIA 平行操作加强免疫,结果表明小鼠血清 N49 抗体阳性率为 100%^[16]。将合成的 M3R 6 个胞外区域的肽段混合物与 FIA 混合制成乳化剂通过尾根部皮内注射入 C57BL/6 小鼠体内,并以百日咳加强免疫,10 d 后同法操作;在免疫后 20 d 将小鼠的脾脏细胞取出移植入重组激活基因-1 (recombination activating gene-

1, rag1) 敲除的小鼠体内,随后 rag1 敲除的小鼠血清出现高水平的 M3R 抗体和低唾液流率,颌下腺出现较明显的 T 淋巴细胞浸润,提示模型构建成功^[17]。用合成的 M3R (208~227) 肽段免疫 8 周龄的雌性 NOD/LtJ 小鼠,结果表明,唾液腺和泪腺的淋巴细胞浸润,血清抗 M3R (208~227) 抗体水平明显升高,提示活化 M3R 可能是治疗 SS 的有效策略^[18]。

2.2 SSA 抗原(Ro) 诱导的 SS 动物模型 抗 SSA 抗体由于首次在名为 Ro 的系统性红斑狼疮患者血清中发现而命名为 Ro。Ro 的靶抗原为核糖核蛋白复合物,由 RNA 和蛋白质组成,RNA 成分来源于 hY RNA 中 Y1~Y5 的 5 型之一,蛋白质成分有 60 ku 和 52 ku 两种。Ro52 为 E3 泛素连接酶,在调节细胞增殖和凋亡中起重要作用,因此被认为可能参与了自身免疫病的发生和发展^[19]。研究^[20]表明,用短肽 Ro480~494、Ro274~290 与 FCA 等比例混合后于 Balb/c 小鼠体内注射,并在第 14、35、51、63 天将 FCA 调整为 FIA 同法操作,得出 Ro274 和 Ro480 肽段免疫的小鼠血清中较快出现对应肽段的抗体。有研究^[21]将纯化的特异性 Ro274 的抗体免疫 6 周龄雌性 Balb/c 小鼠,先腹腔注射 FCA 等体积乳化的 Ro273~289 的线性短肽,再依次于第 14、35、51、63 天将 Ro274 以 FIA 乳化后通过皮下注射入此组小鼠体内,该法得出刺激条件下的小鼠颌下腺唾液流率减少并且在颌下腺出现 Ro274 IgG 抗体。将合成的 Ro 抗原的氨基酸序列为 273~289 的线性短肽与 FCA 混合制成乳化剂依次在第 1、14、36、63、119 天于 Balb/c、DBA-2、SJL/J、C57Bl/6 和 PL/J 小鼠体内注射,结果表明只有 Balb/c 小鼠产生了免疫应答、抗原表位扩散、唾液腺淋巴细胞浸润以及低唾液流率等指标变化,而其它种小鼠的这几类指标并没有完全出现,SJL/J 小鼠几乎没有任何指标的变化^[22]。因此线性短肽免疫的小鼠模型中,动物种类的选择须适宜。此外,Ro 抗原构建模型的方法需要重复多

次进行,较长的周期成为此类模型较难克服的弊端。

3 其他方法诱导的 SS 动物模型

碳酸酐酶 II (Carbonic Anhydrase II, CA II) 是一种基本的锌金属酶,可以快速催化二氧化碳和水,转化为碳酸氢盐和质子,可以调节酸碱平衡状态。抗 CA II 抗体是自身免疫性胰腺炎典型的特征之一,但也有相关研究^[23]表明在自身免疫病,如 SS 或者弥漫性结缔组织病体内同样存在。因此,将 CA II 制备成适宜的剂型注入小鼠体内可能会诱导机体的炎症免疫反应,产生类似 SS 症状。有研究^[24]用等体积 CFA 混合的 CA II 于背部皮下多点注射免疫 5 周龄 PL/J(H-2u) 小鼠,第 7 天和第 14 天后同法操作,免疫后的小鼠颌下腺、泪腺浸润灶增加,颌下腺完整性破坏。然而,在外周血单核细胞增殖实验^[25]中没有显示 CA II 的免疫应答,CA II 是否是 SS 发生发展的靶抗原仍不清楚。

综上所述,目前临床上缺乏治疗 SS 的安全有效药物,需要积极开发,但与 SS 临床表现和病理机制类似的动物模型尚不成熟,需要加大方法研究,将为推动治疗 SS 创新药物研制提供技术支撑。

参考文献

- [1] 葛均波,徐永健.内科学(第8版)[M].北京:人民卫生出版社,2013:826-9.
- [2] Delaleu N, Jonsson M V, Appel S, et al. New concepts in the pathogenesis of Sjögren's syndrome [J]. *Rheum Dis Clin North Am* 2008, 34(4): 833-45.
- [3] Cha S, Nagashima H, Brown V B, et al. Two NOD Idd-associated intervals contribute synergistically to the development of autoimmune exocrinopathy (Sjögren's syndrome) on a healthy murine background [J]. *Arthritis Rheum* 2002, 46(5): 1390-8.
- [4] 董怡,张奉春.干燥综合征(第1版)[M].北京:人民卫生出版社,2015:232-3.
- [5] Jonsson R, Tarkowski A, Bäckman K, et al. Immunohistochemical characterization of sialadenitis in NZB X NZW F1 mice [J]. *Clin Immunol Immunopathol*, 1987, 42(1): 93-101.
- [6] 徐晨,钟翠平.组织学与胚胎学[M].北京:高等教育出版社,2009:193.
- [7] 陈海英,栗占国.干燥综合征动物模型的研究与应用现状[J].中华风湿病学杂志,2004,8(8):493-6.
- [8] Hayashi Y, Sato M, Hirokawa K. Induction of experimental allergic sialadenitis in mice [J]. *Am J Pathol*, 1985, 118(3): 476-83.
- [9] Mu M M, Chakravorty D, Takahashi K, et al. Production of experimental autoimmune sialadenitis in mice immunized with homologous salivary gland extract and *Klebsiella* O3 lipopolysaccharide [J]. *J Autoimmun* 2001, 16(1): 29-36.
- [10] 肖林,杨军,暨兴华等.干燥综合征动物模型的建立[J].

- 重庆医学 2003, 32(3): 306-9.
- [11] Lin X, Rui K, Deng J, et al. Th17 cells play a critical role in the development of experimental Sjögren's syndrome [J]. *Ann Rheum Dis* 2015, 74(6): 1302-10.
- [12] Hayashi Y, Yura Y, Yoshida H, et al. Development of allergic sialadenitis in mice immunized with mumps virus-infected submandibular salivary gland [J]. *Am J Pathol*, 1986, 123(2): 271-9.
- [13] Fleck M, Zhang H G, Kern E R, et al. Treatment of chronic sialadenitis in a murine model of Sjögren's syndrome by local fasL gene transfer [J]. *Arthritis Rheum* 2001, 44(4): 964-73.
- [14] Matsui M, Motomura D, Karasawa H, et al. Multiple functional defects in peripheral autonomic organs in mice lacking muscarinic acetylcholine receptor gene for the M3 subtype [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97(17): 9579-84.
- [15] Chen Y, Zheng J, Huang Q, et al. Autoantibodies against the second extracellular loop of M3R do neither induce nor indicate primary Sjögren's syndrome [J]. *PLoS One* 2016, 11(2): 1-15.
- [16] 邹新乐,李想,徐凯彪等.毒蕈碱受体3抗原表位多肽诱导干燥综合征动物模型的研究[J].现代免疫学,2009,29(1):25-8.
- [17] Iizuka M, Wakamatsu E, Tsuboi H, et al. Pathogenic role of immune response to M3 muscarinic acetylcholine receptor in Sjögren's syndrome-like sialoadenitis [J]. *J Autoimmun* 2010, 35(4): 383-9.
- [18] Yang L, Ju J, Zhang W, et al. Effects of muscarinic acetylcholine 3 receptor (208~227) peptide immunization on autoimmune response in nonobese diabetic mice [J]. *Clin Dev Immunol*, 2013, 2013: 485213.
- [19] Espinosa A, Zhou W, Ek M, et al. The Sjögren's syndrome-associated autoantigen Ro52 is an E3 ligase that regulates proliferation and cell death [J]. *J Immunol* 2006, 176(10): 6277-85.
- [20] Scofield R H, Asfa S, Obeso D, et al. Immunization with short peptides from the 60-kDa Ro antigen recapitulates the serological and pathological findings as well as the salivary gland dysfunction of Sjögren's syndrome [J]. *J Immunol* 2005, 175(12): 8409-14.
- [21] Maier-Moore J S, Kurien B T, D'Souza A, et al. Passive transfer of antibodies to the linear epitope 60 kD Ro 273~289 induces features of Sjögren's syndrome in naive mice [J]. *Clin Exp Immunol*, 2015, 180(1): 19-27.
- [22] Deshmukh U S, Lewis J E, Gaskin F, et al. Immune responses to Ro60 and its peptides in mice. I. The nature of the immunogen and endogenous autoantigen determine the specificities of the induced autoantibodies [J]. *J Exp Med*, 1999, 189(3): 531-40.
- [23] Caccavo D, Afeltra A, Rigon A, et al. Antibodies to carbonic anhydrase in patients with connective tissue diseases: relationship with lung involvement [J]. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2008, 21(3): 659-67.
- [24] Nishimori I, Bratanova T, Toshkov I, et al. Induction of experimental autoimmune sialoadenitis by immunization of PL/J mice with carbonic anhydrase II [J]. *J Immunol*, 1995, 154(9): 4865-73.
- [25] Nishimori I, Miyaji E, Morimoto K, et al. Diminished cellular immune response to carbonic anhydrase II in patients with Sjögren's syndrome and idiopathic chronic pancreatitis [J]. *JOP*, 2004, 5(4): 186-92.