

· 实验研究 ·

脂质体包裹的促甲状腺激素受体胞外段基因重组质粒免疫法构建小鼠甲状腺相关眼病动物模型的可行性

杨于力 罗清礼 吕红彬

【摘要】 背景 甲状腺相关眼病(TAO)是眼科临床常见的难治性疾病,发病率在眼眶疾病中居首位。目前对于 TAO 的研究缺乏可复制的动物模型,在疾病早期阶段难以获得眼眶组织,具体病因及确切的发病机制仍未得到阐明。要详细了解 TAO 的发病机制,探寻有效防治措施,关键在于建立适当的动物模型。目的 采用脂质体包裹的促甲状腺激素受体(TSHR)胞外段基因重组质粒免疫同系雌性 BALB/c 小鼠,探讨该方法建立 TAO 动物模型的可行性。方法 按照计算机随机分组方法将 32 只同系 6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠随机分为空白对照组、空质粒注射组、脂质体注射组和重组质粒注射组。分别于 0、3、6 周免疫各组小鼠,重组质粒注射组小鼠经双胫前肌和腹腔内分别注射阳离子脂质体包裹的 pcDNA3.1+/hTSHR289 30 μg 和 40 μg ;脂质体注射组小鼠分别经双胫前肌和腹腔内分别注射未包裹重组质粒的阳离子脂质体 30 μg 和 40 μg ;空质粒注射组小鼠分别经双胫前肌和腹腔内分别注射 pcDNA3.1+空质粒 30 μg 和 40 μg ;空白对照组小鼠未行任何干预。分别于初次免疫前及初次免疫后 1、2、3、4 个月测量各组小鼠的体质量,观察小鼠外眼表现。于初次免疫后 17 周末处死小鼠,取甲状腺及眼眶组织进行组织病理学观察;收集各组小鼠心脏血 0.6~0.8 ml,采用 ELISA 法测定小鼠血清总甲状腺素 4(TT4)和促甲状腺激素(TSH)的质量浓度。结果 重组质粒注射组 6 只小鼠 12 只眼出现眼球突出、眼睑肿胀和角膜溃疡。空白对照组、脂质体注射组、空质粒注射组小鼠随着时间的延长体质量逐渐增加,而重组质粒注射组小鼠体质量则逐渐下降,总体比较差异有统计学意义($F_{\text{时间}} = 3.838, P = 0.023$),不同组间小鼠体质量总体比较差异有统计学意义($F_{\text{分组}} = 3.425, P = 0.028$),其中注射后 2、3、4 个月重组质粒注射组小鼠体质量明显低于空白对照组、空质粒注射组和脂质体注射组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。空白对照组、脂质体注射组、空质粒注射组和重组质粒注射组小鼠血清 TT4 质量浓度分别为(7.75 \pm 1.00)、(7.96 \pm 0.76)、(6.76 \pm 1.10)和(4.43 \pm 2.88) $\mu\text{g}/\text{dl}$,TSH 质量浓度分别为(6.36 \pm 2.58)、(4.83 \pm 3.96)、(6.63 \pm 1.71)和(1.60 \pm 1.76) ng/ml ,总体比较差异均有统计学意义($F = 7.150, P < 0.001; F = 5.521, P < 0.01$),其中重组质粒注射组小鼠血清中 TT4 和 TSH 质量浓度均明显低于空白对照组、脂质体注射组、空质粒注射组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。组织病理学检查显示,6 只重组质粒注射组小鼠甲状腺出现淋巴细胞浸润,15 只眼小鼠眼眶组织出现眼眶内脂肪组织增生、淋巴细胞及肥大细胞浸润、透明质酸沉积以及眼外肌纤维肿胀、变性和断裂,并伴有炎性细胞浸润。结论 采用脂质体包裹的 TSHR 胞外段基因重组质粒免疫同系雌性 BALB/c 小鼠建立 TAO 动物模型是一种可行、有效的方法,该模型与人 TAO 的病理组织学特征相似,成模率高。

【关键词】 Graves 病; 动物模型; 免疫/方法; 近交系 BALB/c 小鼠; 促甲状腺素受体/血; 甲状腺素/血; 重组质粒; 甲状腺相关眼病

Construction of murine model of TAO by immunification with recombinant extracellular domain of human thyrotropin receptor in cationic liposomes Yang Yuli, Luo Qingli, Lyu Hongbin. Department of Ophthalmology, Southwest Hospital, Southwest Eye Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China
Corresponding author: Yang Yuli, Email: yangyl0415@gmail.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.11.004

作者单位:400038 重庆,第三军医大学西南医院 西南眼科医院(杨于力);610041 成都,四川大学第一附属医院眼科(罗清礼);646000 泸州医学院附属医院眼科(吕红彬)

通信作者:杨于力,Email:yangyl0415@gmail.com

[Abstract] Background Thyroid-associated ophthalmopathy (TAO) is a kind of clinically common and incurable ocular disease, and its incidence is at top place. The etiology and pathologic mechanism of TAO are still unknown because of shortness of replicative animal models and difficulty to acquire the ocular tissues in the early stage of the disease. To better understand the pathogenesis of TAO and investigate effective treatable measures, an appropriate animal model should be developed. **Objective** This study was to immunize female BALB/c mice with the recombinant plasmid of human thyroid-stimulating hormone receptor (TSHR) extracellular domain in cationic liposomes for the establishment of TAO models. **Methods** Thirty-two 6- to 8-week-old female BALB/c mice were randomly assigned to four groups according to computer random allocation. pcDNA3.1+/hTSHR289 of 100 μg in an adjuvant cationic liposomes was injected via anterior tibialis muscle and peritoneal cavity separately in the recombinant plasmid injection group in 0, 3, 6 weeks, and pcDNA3.1 or cationic liposomes was injected in the liposomes injection group or the blank plasmid group in the same way, respectively, and normal saline solution was injected in the blank control group. Body weight of the mice was measured before and 1 month, 2, 3 and 4 months after initial injection. The manifestations were observed after modeling. The mice were sacrificed 17 weeks after initial injection, and the histopathology examination was carried out on the thyroid gland and orbital tissue. The heart blood was collected from the mice, and serum contents of total thyroxine 4 (TT4) and thyroid-stimulating hormone (TSH) were assayed by ELISA. **Results** Protrusion, eyelid swell and keratitis occurred in 12 eyes of 6 mice in the recombinant plasmid injection group after immunization. A significant difference in the body weight of the mice was found among the blank control group, blank plasmid group, liposomes injection group and recombinant plasmid injection group ($F_{\text{group}} = 3.425, P = 0.028$), and the body weight was considerably reduced in the recombinant plasmid injection group in comparison with the blank control group, blank plasmid group, liposomes injection group ($F_{\text{time}} = 0.838, P = 0.023$). The serum levels of TT4 were (7.75 \pm 1.00), (7.96 \pm 0.76), (6.76 \pm 1.10) and (4.43 \pm 2.88) $\mu\text{g}/\text{dl}$ in the blank control group, liposomes injection group, blank plasmid group, and recombinant plasmid injection group, and those of TSH were (6.36 \pm 2.58), (4.83 \pm 3.96), (6.63 \pm 1.71) and (1.60 \pm 1.76) ng/ml, showing significant differences among the groups ($F = 7.150, P < 0.001; F = 5.521, P < 0.01$), and the serum levels of TT4 and TSH were remarkably lower in the recombinant plasmid injection group than those of the blank control group, liposomes injection group and blank plasmid group (all at $P < 0.05$). Histopathology revealed the lymphocyte infiltration of thyroid gland in 6 mice and proliferation of orbital adipose tissue, infiltration of lymphocytes and mastocytes, deposition of hyaluronic acid as well as swell, breakage and inflammatory cell infiltration of extraocular muscle in 15 eyes of the recombinant plasmid injection group. **Conclusions** A murine model of TAO can be successfully induced by immunization with recombination plasmid pcDNA3.1+/hTSHR289 and cationic liposomes. The histopathology characteristics and ocular findings of the animal models are similar to human TAO.

[Key words] Graves disease; Disease models, animal; Immunization/methods; Mice, inbred BALB/c; Receptors, thyrotropin/blood; Thyroxine/blood; Recombinant plasmid; Thyroid-associated ophthalmopathy

甲状腺相关眼病(thyroid-associated ophthalmopathy, TAO)是常见的眼眶病之一,目前认为TAO的主要病理变化是自身免疫反应引起的眶周及球后组织淋巴细胞浸润伴有黏多糖及胶原沉积,临床表现为局部组织水肿、突眼和复视。近年来,随着人们对TAO研究的深入,对其免疫病理机制有了进一步的认识,但其确切的病因和发病机制至今仍不完全清楚。优化的动物模型有助于对TAO的发病机制及治疗方法进行进一步的探讨和研究。目前采用的TAO造模途径包括同源促甲状腺激素受体(thyroid-stimulating hormone receptor, TSHR)肽免疫^[1]、TSHR肽转染的原核细胞免疫、真核细胞免疫^[2-4]、TSHR基因免疫^[5-6]、TSHR和G₂S基因联合免疫^[7]、免疫细胞转导免疫^[8-10]及激活的T细胞转导免疫^[11]等,近年又采用表达TSHR的

M12细胞以及TSHR转染的腺病毒免疫法建立TAO动物模型。各种造模方法中仅TSHR基因免疫动物模型出现明显的甲状腺的淋巴细胞浸润以及眼眶结构的组织病理学改变,接近人类TAO的自然病程。为了进一步研究更接近人类TAO自然病程的动物模型,本研究中用脂质体包裹重组质粒pcDNA3.1+/TSHR289免疫BALB/c小鼠,复制出与人类TAO外眼、全身激素水平及体质量改变相似的动物模型,为TAO的发病机制研究和防治研究提供研究工具。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 同系6~8周龄SPF级雌性BALB/c小鼠32只,体质量19~25g,由华西医科大学

实验动物中心提供。小鼠在温度为 20 ~ 25 ℃、相对湿度为 55% ~ 70%、12 h 光照/12 h 黑暗的条件下饲养。实验动物的使用和喂养遵循相关的实验动物伦理要求。

1.1.2 主要试剂及仪器 穿梭质粒 pHMCMVTSHR289 (Sandra M. Melachlan, Ph. D Professor of medicine CSMC&UCLA 馈赠);真核表达质粒 pcDNA3.1+(华西医学中心眼科实验室);阳离子脂质体(四川大学华西医院生物治疗国家重点实验室提供);E. coli DH5 α 感受态细胞(大连宝生物公司);琼脂糖凝胶回收试剂盒、产物纯化试剂盒(美国 Omega 公司);硅胶树脂型质粒大量制备试剂盒(北京天为时代科技有限公司);血清总甲状腺素 4(total tetraiodothyronine 4, TT4) ELISA 试剂盒(96T, Catalogue No: QRCT-3013320203021EIA \ UTL; LOT #: RT110371)、TSHELISA 试剂盒(96T, Catalogue No: QRCT-3013320102122EIA \ UTL; LOT #: RT110371)(美国 Adlitteram Diagnostic Laboratories 公司)。Multiskan MK3 type335 酶标仪(芬兰 Labsystems 公司);高速离心机(美国 Bechman 公司);低温高速台式离心机(德国 Heraeus 公司);Leica DM LB2 生物显微镜(德国 Leica 公司);Pixera Viewfinder 3.0 显微数码相机系统(美国 Pixera 公司);Image-Pro Plus 图像分析软件(美国 Media Cybernetics 公司);Gallenkamp Orbital Incubator 摇床(日本 Sanyo 公司);Sartorius BP210S 电子天平(德国 Sartorius AG Göttingen 公司);微量移液器(日本 Nichiryog 公司);紫外分光光度计(美国 PE 公司)。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒 pcDNA3.1+/hTSHR289 及真核质粒 pcDNA3.1+ 的抽提及定量 扩增宿主菌 E. coli DH5 α , 采用质粒抽提试剂盒分别提取重组质粒 pcDNA3.1+/hTSHR289 及真核质粒 pcDNA3.1+, 经紫外分光光度计纯度鉴定及定量。重组质粒的质量为 100 μ g。

1.2.2 动物分组及基因免疫 采用计算机随机分组方法将 32 只 BALB/c 小鼠随机分为重组质粒注射组、空白对照组、空质粒注射组和脂质体注射组。阳离子脂质体分别与重组质粒 pcDNA3.1+/hTSHR289 及真核质粒 pcDNA3.1+ 按体积质量比 3:1 混合均匀, 室温静置 30 min。分别于 0、3、6 周免疫各组小鼠, 重组质粒组小鼠经双胫前肌注射 30 μ g 阳离子脂质体包裹的 pcDNA3.1+/hTSHR289, 然后腹腔内注射 40 μ g 阳离子脂质体包裹的 pcDNA3.1+/hTSHR289; 脂质体组小鼠双胫前肌和腹腔内注射未包裹重组质粒的阳离子脂质体; 空质粒组小鼠双胫前肌和腹腔内注射 pcDNA3.1+

空质粒 100 μ g; 空白对照组小鼠未行任何干预。胫前肌注射时尽量靠胫前肌后外侧, 以防刺穿血管引起出血; 腹腔内注射时应靠近下腹部两侧, 以防刺穿腹腔内血管及脏器。动物免疫后观察小鼠外眼的形态表现及小鼠体质量变化。

1.2.3 小鼠血清的收集 初次基因免疫后 17 周末, 采用乙醚麻醉方法麻醉小鼠, 立即用体积分数 75% 乙醇行小鼠颈、胸、腹部消毒, 剪开胸腔并暴露心脏, 用 1 ml 胰岛素注射器自小鼠心脏采血 0.6 ~ 0.8 ml, 收集于 1.5 ml 的 Eppendorf 管中, 室温下静置 2 h, 3 000 r/min 离心 5 min, 离心 2 次, 取上清液 180 ~ 240 μ l 置入 0.5 ml Eppendorf 管中并冻存于 -70 ℃ 冰箱中, 以检测 TT4 和 TSH 含量。

1.2.4 各组小鼠甲状腺及眼眶组织标本的制备 过量麻醉法处死小鼠后剪开颈部皮肤, 分离颈部皮下组织和肌肉, 暴露气管及甲状软骨两侧的甲状腺, 完整摘取甲状腺并附带部分气管组织, 分别暴露双侧眼眶, 摘取全部眶内软组织。甲状腺组织和眼眶组织均置于质量分数 10% 中性甲醛中固定 48 h, 然后所有标本行常规石蜡包埋, 分别行苏木精-伊红染色、阿尔新蓝-过碘酸希夫染色、Masson 三色染色和甲苯胺蓝染色, 观察小鼠甲状腺组织病理学和眼眶组织病理学改变。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计学软件进行统计分析。本研究中测量指标的数据资料经 K-S 检验呈正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间均数经 Bartlett 检验方差齐(均 $P > 0.05$)。采用完全随机分组单因素干预多水平比较实验设计, 空白对照组、脂质体注射组、空质粒注射组和重组质粒注射组小鼠免疫前后各观察时间点各组 BLAB/c 小鼠体质量差异的总体比较采用区组设计两因素方差分析, 各组小鼠注射后 17 周血清中 TT4、TSH 质量浓度的总体差异比较采用单因素方差分析, 组间多重比较采用 LSD- t 检验。采用双尾检验法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠免疫前后的外眼表现

空白对照组和脂质体注射组小鼠外眼均正常, 免疫前后外眼表现无明显改变(图 1A, B)。重组质粒注射组部分小鼠出现外眼改变, 其中 5 只小鼠 6 只眼出现不同程度的眼球突出(图 1C), 4 只小鼠 4 只眼出现明显的眼睑肿胀, 1 只眼有角膜水肿和刺激症状, 出现溢泪和局部脱毛(图 1D), 1 只小鼠的 2 只眼出现明显的眼睑肿胀。

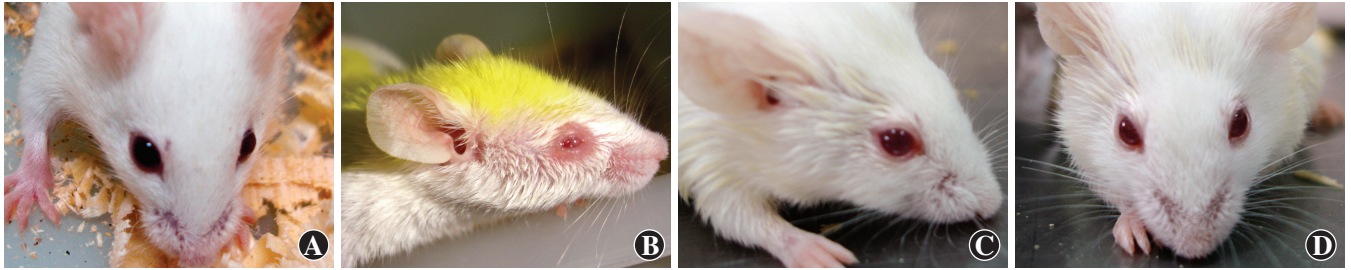


图 1 小鼠免疫前后外眼表现 A:空白对照组小鼠免疫前外眼正常 B:脂质体注射组小鼠免疫后外眼未见异常改变 C:重组质粒注射组小鼠右眼球明显突出,左眼球正常 D:重组质粒注射组小鼠右眼睑明显肿胀伴角膜刺激症状

2.2 各组小鼠免疫前后的体质量变化

空白对照组、脂质体注射组、空质粒注射组小鼠随着时间的延长体质量逐渐增加,而重组质粒注射组小鼠体质量则逐渐下降,总体比较差异有统计学意义 ($F_{\text{时间}} = 3.838, P = 0.023$)。不同组间小鼠体质量总体比较差异有统计学意义 ($F_{\text{分组}} = 3.425, P = 0.028$),其中注射后 2、3、4 个月重组质粒注射组小鼠体质量较空白对照组、脂质体注射组、空质粒注射组明显下降,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$) (表 1)。

表 1 各组小鼠免疫前后不同时间点体质量变化 ($\bar{x} \pm s, g$)

组别	样本量	注射前后不同时间点小鼠体质量				
		注射前	注射后 1 个月	注射后 2 个月	注射后 3 个月	注射后 4 个月
空白对照组	8	22.38±2.11	23.89±2.38	24.28±2.00 ^a	25.30±1.79 ^a	25.45±1.66 ^a
脂质体注射组	8	21.89±1.94	22.73±1.83	24.08±1.73 ^a	24.58±1.53 ^a	24.42±2.33 ^a
空质粒注射组	8	21.75±1.80	22.64±2.01	23.38±1.33 ^a	23.56±1.02 ^a	24.24±0.68 ^a
重组质粒注射组	8	21.59±1.18	21.71±1.90	19.95±1.56	20.15±1.47	19.55±2.05

注: $F_{\text{分组}} = 3.425, P = 0.028; F_{\text{时间}} = 3.838, P = 0.023$ 。与各自时间点重组质粒注射组比较, $^a P < 0.05$ (区组设计两因素方差分析, LSD-*t* 检验)

2.3 各组小鼠注射后血清 TT4、TSH 的变化

2.3.1 血清 TT4、TSH 标准曲线

采用标准品绘制血清 TT4 和 TSH 的标准曲线。TT4 标准品质量浓度为横坐标,标准品在波长为 450 nm 时吸光度(A)值为纵坐标,相关系数为 0.921 7(图 2A);TSH 标准品质量浓度为横坐标,标准品在波长为 450 nm 时 A 值为纵坐标,相关系数为 0.994 4(图 2B)。

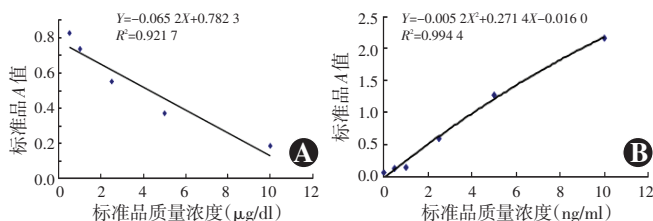


图 2 血清 TT4、TSH 标准曲线 A:血清中 TT4 标准曲线 B:血清中 TSH 标准曲线

2.3.2 各组小鼠血清 TT4、TSH 的比较

由空白对照组小鼠血清 TT4 测量数据加减 2 标准差作为参考值范围,TT4 和 TSH 参考值范围分别为 5.75 ~ 9.75 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 和 1.18 ~ 11.54 ng/ml 。空白对照组、脂质体注射组、空质粒注射组、重组质粒注射组小鼠血清中 TT4 质量浓度依次下降,总体比较差异有统计学意义 ($F = 7.150, P < 0.001$),其中空白对照组、脂质体注射组和空质粒注射组间小鼠血清 TT4 质量浓度的差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$),重组质粒注射组小鼠血清 TT4 质量浓度明显低于空白对照组、脂质体注射组和空质粒注射组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$) (表 2)。

空白对照组、脂质体注射组、空质粒注射组、重组质粒注射组小鼠血清中 TSH 质量浓度总体比较差异有统计学意义 ($F = 5.521, P < 0.01$),其中空白对照组、脂质体注射组和空质粒注射组间小鼠血清中 TSH 质量浓度两两比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$),而重组质粒注射组小鼠血清中 TSH 质量浓度均明显低于空白对照组、脂质体注射组和空质粒注射组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$) (表 2)。

表 2 注射后 17 周时各组血清中 TT4、TSH 的质量浓度比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	TT4 ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	TSH (ng/ml)
空白对照组	8	7.75±1.00 ^a	6.36±2.58 ^a
脂质体注射组	8	7.96±0.76 ^a	4.83±3.96 ^a
空质粒注射组	8	6.76±1.10 ^a	6.63±1.71 ^a
重组质粒注射组	8	4.43±2.88	1.60±1.76
F		7.150	5.521
P		<0.001	<0.01

注:与各自的重组质粒注射组比较, $^a P < 0.01$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) TT:总甲状腺素;TSH:促甲状腺素

2.4 重组质粒注射组小鼠甲状腺组织病理学改变和比较

空白对照组、脂质体免疫组和空质粒免疫组小鼠甲状腺组织病理学检查未见异常,可见甲状腺滤泡为单层滤泡上皮围成的卵圆形或不规则的球形囊泡,基

底面有薄基板,表面包绕纤细的网状纤维网架。上皮细胞呈立方状,滤泡大小不等,结构完整;滤泡中为滤泡腔,正常时腔内充满均匀红染的胶体物质,为滤泡上皮细胞分泌的碘化糖蛋白。滤泡间质无水肿,未发现淋巴细胞浸润。重组质粒注射组注射后 17 周时,6 只小鼠出现程度不同的甲状腺炎改变,苏木精-伊红染色见甲状腺腺泡明显增大、增生,部分腺泡上皮细胞增生,上皮细胞因受压而变扁平,偶可见滤泡上皮细胞增生构成乳头状结构,或滤泡上皮细胞柱状增生,呈乳头状向腔内突起,间质血管明显充血,可见淋巴细胞浸润,导致少数滤泡破坏,可见部分滤泡之间组织细胞吞噬的胶质物质,伴间质增生(图 3)。

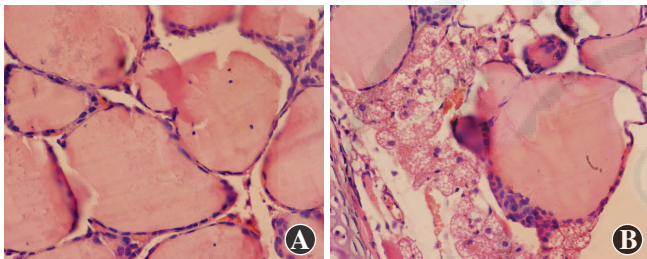


图 3 小鼠甲状腺组织病理学表现(HE ×400) A:空白对照组小鼠甲状腺上皮细胞呈立方状,结构完整,滤泡腔内充满均匀红染的碘化糖蛋白 B:重组质粒注射组小鼠甲状腺腺泡上皮呈乳头状突向滤泡腔(红箭头),其间可见组织细胞和增生的间质(绿箭头)

2.5 重组质粒注射组小鼠眼眶组织病理学改变

2.5.1 小鼠眼眶脂肪结缔组织

光学显微镜下可见重组质粒注射组小鼠眼眶脂肪细胞间间隙增宽,有红色无定形物质堆积,间隔部分血管增生,伴炎性细胞浸润;部分脂肪细胞核明显可见,为前脂肪细胞。甲苯胺蓝染色可见脂肪结缔组织中有较多深紫红色肥大细胞浸润,含较多嗜碱性颗粒状物质,但大多数肥大细胞出现脱颗粒现象。阿尔新蓝-过碘酸希夫染色发现眼眶脂肪与肌肉组织周边的堆积物质呈紫红色染色。Masson 三色染色可见脂肪组织间隙不同程度变宽,其间有蓝色的胶原纤维增生(图 4)。

2.5.2 小鼠眼外肌纤维改变

苏木精-伊红染色可见空白对照组小鼠肌纤维排列整齐,呈圆形、梭形或不规则形,肌纤维周围边界清楚,肌浆均匀红染,肌细胞核呈梭形,位于肌纤维周边部。重组质粒注射组小鼠眼外肌肌纤维横断面肥大且不均匀,部分肌纤维周围边界不清,可见肌纤维断裂和肌浆溶解,部分肌纤维仅存细胞膜;肌肉组织间可见脂肪组织和间质组织增生。甲苯胺蓝染色可见肌间隙和周围间质内肥大细胞浸润和脱颗粒,呈深紫红染色。Masson 三色染色可见部分肌纤维间胶原纤维增生,呈蓝染(图 5)。

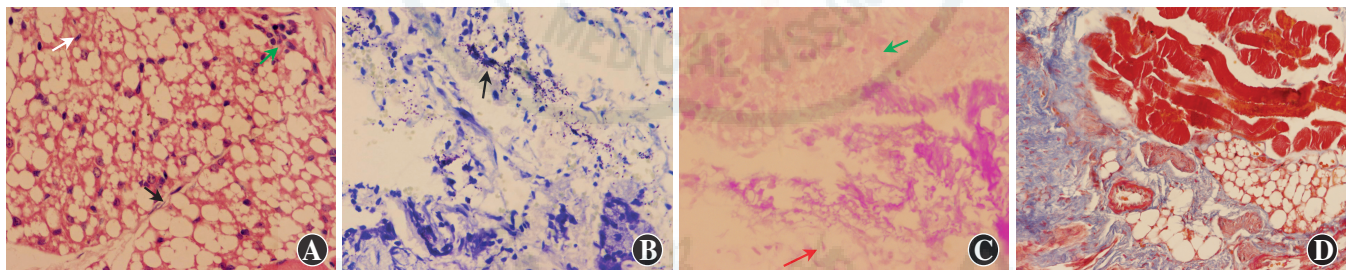


图 4 重组质粒注射组小鼠眼眶脂肪结缔组织改变 A:眼眶脂肪细胞间隙增宽(黑箭头),可见部分脂肪细胞的细胞核,有红色无定形物质堆积(白箭头)及炎性细胞浸润(绿箭头)(HE ×100) B:脂肪结缔组织内肥大细胞浸润及脱颗粒(箭头)(甲苯胺蓝 ×200) C:可见脂肪(红箭头)和肌肉(绿箭头)组织间紫红色黏液物质堆积(阿尔新蓝-过碘酸希夫 ×200) D:可见脂肪组织间的胶原纤维增生,呈蓝色染色(Masson ×100)

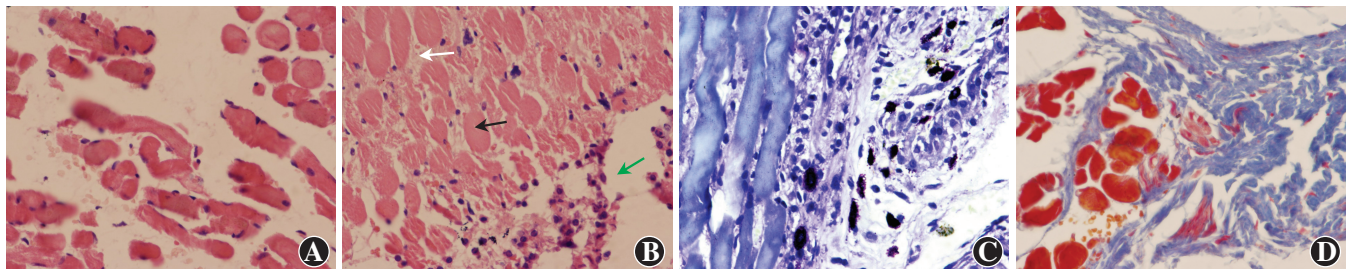


图 5 重组质粒注射组小鼠眼外肌纤维组织改变 A:空白对照组小鼠眼外肌肌纤维正常,横切面呈梭形,纵切面为圆形(HE ×400) B:重组质粒注射组小鼠眼外肌肌纤维肿胀、肥大(黑箭头),肌纤维间隔增宽(白箭头),间质增生伴炎性细胞浸润(绿箭头)(HE ×400) C:肌纤维周边间质内大量肥大细胞、淋巴细胞浸润(甲苯胺蓝 ×400) D:肌纤维间大量蓝染的纤维组织(Masson ×200)

3 讨论

以往建立 TAO 动物模型的方法可归纳为两类:一类是转染自身抗原蛋白的细胞系免疫法,另一类是转染自身抗原基因的各种载体免疫^[11]。Rao 等^[12]采用转染 TSHR 的成纤维细胞免疫雌性 AKR/N 小鼠后从 70% 小鼠血清中检测出甲状腺刺激激素抗体 (thyroid stimulating antibody, TSAb), 模型鼠甲状腺腺体肿大,但并未在甲状腺组织中观察到炎性细胞浸润。Many 等^[13]采用转染 TSHR 的脾细胞免疫雌性 BALB/c 小鼠,结果 60% ~ 100% 小鼠甲状腺出现淋巴细胞浸润,模型鼠血清中可检测出甲状腺阻断性抗体 (TSH-binding antibody, TBAb), 68% 的小鼠眼眶组织出现透明质酸浸润造成的组织水肿、脂肪组织聚积、肌纤维溶解断裂以及淋巴细胞和肥大细胞浸润。在各种造模方法中,以转染 TSHR 的 M12 细胞以及转染 TSHR 的腺病毒免疫鼠的成模率最高。Kaithamana 等^[14]采用转染 mTSHR 或 hTSHR 的 M12 细胞系免疫 BLAB/c 小鼠,结果发现 100% 的小鼠诱导出甲状腺功能亢进,但这种造模方法需要 6 ~ 8 个月。Nagayama 等^[15-16]采用转染 hTSHR 的腺病毒免疫 BALB/c 小鼠建立 TAO 的动物模型,诱导出甲状腺功能亢进者占 55%,其血清 TT4 水平增高,同时血清中可检测出 TSAb 和 TBAb,小鼠眼眶组织出现典型的组织病理学改变。

甲状腺和眼眶组织有着多重共同抗原,如 TSHR、甲状腺过氧化物酶、甲状腺球蛋白以及各种眼外肌抗原,目前普遍认为 TSHR 的胞外段是引起 TAO 的自身抗原,也是与 TSAb 以及 TBAb 结合的位点。Chazenbalk 等^[17-18]提出 TSHR 胞外段的空间构象是其产生自身免疫反应的重要前提条件,他们利用刀豆凝集素 a 和镍螯合物进行色谱分析,从而得到部分纯化的 TSHR-289,用极其微量的 TSHR-289 即可中和 Graves 病患者血清中的 TBAb,纯化的 TSHR-289 去免疫大鼠时,产生针对这种抗原的单克隆抗体 3BD10,这种抗体仅在 TSHR 的 N 端富含半胱氨酸的区域具有空间构象时才能与其发生反应,说明 TSHR 胞外段三级结构的保持对其产生自身免疫反应有着极其重要的作用。Seetharamaiah 等^[19]发现无糖基化的 TSHR 胞外段仅中和兔血清中的 TBAb 而不能中和 Graves 病患者血清中的抗体,而糖基化后的 TSHR 胞外段既可中和实验动物又可中和 Graves 病患者血清中的 TBAb 和 TSAb,从而说明 TSHR 胞外段的糖基化是产生自身免疫反应的关键。Mizutori 等^[20]采用转染 TSHR 和 TSHR289 的腺病毒免疫 BALB/c 小鼠的甲状腺功能亢

进的成模率分别为 36% 和 70%,认为 TSHR 的胞外段是造模的主要抗原。Chen 等^[21]采用转染 hTSHR289 的腺病毒免疫 BALB/c 小鼠,68% ~ 80% 的小鼠发生甲状腺功能亢进,血清中检测出抑制性 TSAb。Kaneda 等^[22]采用 hTSHR289 免疫 BALB/c 小鼠后 79.2% ~ 95.7% 的小鼠血清 TT4 水平增高,并且血清中出现 TSAb。Zhao 等^[23]采用 TSHR 的胞外段质粒免疫雌性 BALB/c 小鼠后 75% 的小鼠发生甲状腺功能亢进,血清中检测出 TSAb,并且小鼠眼眶组织发生纤维化。目前,TSHR 的胞外段区域已被普遍被认为是有效的致 TAO 的自身抗原。

TAO 是一种自身免疫疾病,理想的 TAO 动物模型除了应具备甲状腺功能亢进特征外,还应具备该病眼部的特征。以往动物模型研究报道中大部分出现甲状腺炎症的改变,少有典型的 TAO 眼部病理改变。本研究中采用脂质体包裹的重组质粒 pcDNA3.1+/hTSHR289 免疫 BALB/c 小鼠,初次免疫后 17 周时经组织病理学证实 6 只重组质粒免疫组小鼠出现典型淋巴细胞浸润的甲状腺炎症改变,同时实验组小鼠体质量在初次免疫后 2 个月开始明显下降,小鼠眼球不同程度突出,并出现眼睑肿胀,甚至角膜炎症改变,这些 TAO 外眼的特征性表现在以往国内外 TAO 动物模型中鲜有报道,此外本研究中重组质粒注射组 8 只小鼠的 15 个眼眶组织出现不同程度的 TAO 典型病理改变,如眼眶内脂肪组织大量增生伴淋巴细胞及肥大细胞浸润,透明质酸沉积;眼外肌的典型改变包括肌纤维肿胀、变性和断裂,并伴有炎性细胞浸润,这些结果表明采用脂质体包裹的重组质粒 pcDNA3.1+/hTSHR289 免疫小鼠成模率高,模型鼠表现与人类 TAO 相似。本研究提供的造模方法简单、有效,为进一步开展相关的实验研究提供了有用的工具。

参考文献

- [1] Hidaka Y, Guimaraes V, Soliman M, et al. Production of thyroid-stimulating antibodies in mice by immunization with T-cell epitopes of human thyrotropin receptor[J]. *Endocrinology*, 1995, 136(4): 1642-1647.
- [2] Costagliola S, Many MC, Stalmans-Falys M, et al. Recombinant thyrotropin receptor and the induction of autoimmune thyroid disease in BALB/c mice: a new animal model[J]. *Endocrinology*, 1994, 135(5): 2150-2159.
- [3] Wagle NM, Dallas JS, Seetharamaiah GS, et al. Induction of hyperthyroxinemia in BALB/C but not in several other strains of mice[J]. *Autoimmunity*, 1994, 18(2): 103-112.
- [4] Vlase H, Weiss M, Graves PN, et al. Characterization of the murine immune response to the murine TSH receptor ectodomain: induction of hypothyroidism and TSH receptor antibodies[J]. *Clin Exp Immunol*, 1998, 113(1): 111-118.
- [5] Nakahara M, Mitsutake N, Sakamoto H, et al. Enhanced response to mouse thyroid-stimulating hormone (TSH) receptor immunization in TSH receptor-knockout mice [J]. *Endocrinology*, 2010, 151(8): 4047-4054. doi:10.1210/en.2010-0315.

- [6] Zhao SX, Tsui S, Cheung A, et al. Orbital fibrosis in a mouse model of Graves' disease induced by genetic immunization of thyrotropin receptor cDNA [J]. *J Endocrinol*, 2011, 210(3): 369-377. doi: 10.1530/JOE-11-0162.
- [7] Yamada M, Li AW, West KA, et al. Experimental model for ophthalmopathy in BALB/c and outbred (CD-1) mice genetically immunized with G2s and the thyrotropin receptor [J]. *Autoimmunity*, 2002, 35(6): 403-413.
- [8] Kita M, Ahmad L, Mariani RC, et al. Regulation and transfer of a murine model of thyrotropin receptor antibody mediated Graves' disease [J]. *Endocrinology*, 1999, 140(3): 1392-1398.
- [9] 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 U S A*, 1996, 93(20): 11074-11079.
- [10] Costagliola S, Many MC, 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.
- [11] Ludgate M. Animal models of Graves' disease [J]. *Eur J Endocrinol*, 2000, 142(1): 1-8. doi: 10.1530/eje.0.1420001.
- [12] Rao PV, Watson PF, Weetman AP, et al. Contrasting activities of thyrotropin receptor antibodies in experimental models of Graves' disease induced by injection of transfected fibroblasts or deoxyribonucleic acid vaccination [J]. *Endocrinology*, 2003, 144(1): 260-266.
- [13] Many MC, Costagliola S, Detrait M, et al. Development of an animal model of autoimmune thyroid eye disease [J]. *J Immunol*, 1999, 162(8): 4966-4974.
- [14] Kaithamana S, Fan J, Osuga Y, et al. Induction of experimental autoimmune Graves' disease in BALB/c mice [J]. *J Immunol*, 1999, 163(9): 5157-5164.
- [15] Nagayama Y, Saitoh O, McLachlan SM, et al. TSH receptor-adenovirus-induced Graves' hyperthyroidism is attenuated in both interferon-gamma and interleukin-4 knockout mice; implications for the Th1/Th2 paradigm [J]. *Clin Exp Immunol*, 2004, 138(3): 417-422. doi: 10.1111/j.1365-2249.2004.02641.x.
- [16] 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(6): 2789-2794. doi: 10.4049/jimmunol.168.6.2789.
- [17] Chazenbalk GD, Jaume JC, McLachlan SM, et al. Engineering the human thyrotropin receptor ectodomain from a non-secreted form to a secreted, highly immunoreactive glycoprotein that neutralizes autoantibodies in Graves' patients' sera [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(30): 18959-18965. doi: 10.1074/jbc.272.30.18959.
- [18] Chazenbalk GD, Wang Y, Guo J, et al. A mouse monoclonal antibody to a thyrotropin receptor ectodomain variant provides insight into the exquisite antigenic conformational requirement, epitopes and vivo concentration of human autoantibodies [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999, 84(2): 702-710.
- [19] Seetharamaiah GS, Dallas JS, Patibandla SA, et al. Requirement of glycosylation of the human thyrotropin receptor ectodomain for its reactivity with autoantibodies in patients' sera [J]. *J Immunol*, 1997, 158(6): 2798-2804.
- [20] Mizutori Y, Saitoh O, Eguchi K, et al. Adenovirus encoding the thyrotropin receptor A-subunit improves the efficacy of dendritic cell-induced Graves' hyperthyroidism in mice [J]. *J Autoimmun*, 2006, 26(1): 32-36. doi: 10.1016/j.jaut.2005.08.008.
- [21] Chen CR, Pichurin P, Chazenbalk GD, 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.
- [22] Kaneda T, Honda A, Hakozaiki A, et al. An improved Graves' disease model established by using in vivo electroporation exhibited long-term immunity to hyperthyroidism in BALB/c mice [J]. *Endocrinology*, 2007, 148(5): 2335-2344.
- [23] Zhao SX, Tsui S, Cheung A, et al. Orbital fibrosis in a mouse model of Graves' disease induced by genetic immunization of thyrotropin receptor cDNA [J]. *J Endocrinol*, 2011, 210(3): 369-377.

(收稿日期: 2015-08-19)

(本文编辑: 尹卫靖 杜娟)

读者·作者·编者

本刊稿件处理流程

本刊实行以同行审稿为基础的三级审理制度(编辑初审、专家外审、编委会终审)稿件评审。编辑部在稿件审理过程中坚持客观、公平、公正的原则,郑重承诺审稿过程中尊重和保护审稿专家、作者及稿件的私密权。专家审理认为不宜刊用的稿件,编辑部将告知作者专家的审理意见,对稿件处理有不同看法的作者有权向编辑部申请复议,但请写出申请理由和意见。

稿件审理过程中作者可通过“中华医学会杂志社远程稿件管理系统”查询稿件的审理结果。作者如需要采用通知或退稿通知可与编辑部联系。编辑部发给作者修改再评的稿件,如2个月没有修回,视为作者自行撤稿。编辑部的各种通知将通过Email发出,投稿后和稿件审理期间请作者留意自己的电子信箱。作者自收到采用通知之日起,即视为双方建立合约关系,作者如撤稿必须向编辑部申诉理由并征得编辑部同意。一旦稿件进入编排阶段,作者不应提出自撤稿件,在此期间因一稿两投或强行撤稿而给本刊造成不良影响和/或经济损失者,编辑部有权给以公开曝光、通报并实施经济赔偿,作者自行承担一切责任和后果。

根据《中华人民共和国著作权法》的相关条文,本刊编辑可对待发表的来稿按照编辑规范和专业进行文字加工、修改和删减,修改后的稿件作者须认真校对核实,修改涉及文章的核心内容时双方应进行沟通并征得作者同意。除了编辑方面的技术加工以外,作者对已经发表论文的全部内容文责自负。稿件编辑流程中编辑退回作者修改的稿件逾期2个月不修回者,视作自行撤稿。

常用英文缩略语名词解释

RGCs: 视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells)

IGF: 胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factor)

IS/OS: 内节/外节 (inner segment/outer segment)

TAO: 甲状腺相关眼病 (thyroid associated ophthalmopathy)

IMH: 特发性黄斑裂孔 (idiopathic macular hole)

(本刊编辑部)