

小鼠脑实质注射水通道蛋白4抗体所致的病理损伤

方 羚¹, 陈 晨¹, 康新梅¹, 孙晓渤¹, 周一凡¹, 黄 巧², 彭立胜¹, 邱 伟¹

(1. 中山大学附属第三医院神经内科, 广东 广州 510630; 2. 肇庆市第二人民医院神经内科, 广东 肇庆 526060)

摘 要:【目的】探讨小鼠脑实质注射视神经脊髓炎谱系疾病(NMOSD)患者来源水通道蛋白4(AQP4)抗体(AQP4-IgG)造成的病理损伤,以及全身免疫状态对局部病灶的影响。【方法】于C57BL/6小鼠诱导实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE),在发病高峰期脑实质局部注射AQP4-IgG阳性患者血清来源的IgG和健康人补体(hC)(EAE+AQP4-IgG+hC组, n=5),以单纯脑实质注射IgG和hC(AQP4-IgG+hC组, n=5)与EAE小鼠脑实质注射生理盐水(NS; EAE+NS组, n=5)为对照组。通过免疫荧光方法,比较3组病灶中AQP4、星形胶质细胞胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、少突胶质细胞髓鞘碱性蛋白(MBP),以及炎性细胞(T淋巴细胞、中性粒细胞和巨噬细胞)浸润等指标的异常。【结果】AQP4-IgG联合hC注射可以造成小鼠局灶性脑实质病理损伤,包括星形胶质细胞损伤,脱髓鞘以及炎性细胞浸润。与单纯AQP4-IgG+hC组相比, EAE+AQP4-IgG+hC组脑实质AQP4缺失面积($P=0.008$)及GFAP缺失面积($P=0.016$)显著增大, MBP缺失面积呈增大趋势; CD3⁺T细胞浸润的血管套数量、中性粒细胞浸润的血管套数量以及巨噬细胞浸润面积改变未达统计学差异。EAE+NS组亦可见注射周边星形胶质细胞增生,但无AQP4、GFAP与MBP缺失,炎性细胞主要分布在注射针道周围。【结论】小鼠脑实质注射AQP4-IgG联合hC可致显著局灶性病理损伤,而诱导EAE造成的全身免疫激活状态可加重该损伤; EAE联合AQP4-IgG局部注射能更好模拟NMOSD临床发病机制。

关键词:视神经脊髓炎谱系疾病;水通道蛋白4抗体;动物模型;实验性自身免疫性脑脊髓炎

中图分类号: R744.5²

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2018)02-0207-08

Lesions Caused by Intracerebral Injection of Aquaporin-4 Immunoglobulin G

FANG Ling¹, CHEN Chen¹, KANG Xin-mei¹, SUN Xiao-bo¹, ZHOU Yi-fan¹, HUANG Qiao²,
PENG Li-sheng¹, QIU Wei¹

(1. Department of Neurology, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China; 2. Department of Neurology, Zhaoqing No.2 People's Hospital, Zhaoqing 526000, China)

Corresponding to: QIU Wei; E-mail: qiuwei120@vip.163.com

Abstract: 【Objective】 To investigate the pathological damage caused by aquaporin-4 antibody extracted from patients with neuromyelitis optica spectrum disorders (NMOSD) and the influence of systemic immune status on the local disease focus. 【Methods】 The C57BL/6 mice were chose for establishing experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). During the peak at onset, serum-derived immunoglobulin G (IgG) from aquaporin-4 (AQP4) IgG positive patients and healthy human complement (hC) were injected in the brain parenchyma (EAE + AQP4-IgG + hC group, n=5). The EAE induced mice injected with normal saline (EAE + NS group, n=5) and mice without EAE injected with AQP4-IgG and hC from healthy volunteers (AQP4-IgG + hC group, n=5) were served as control groups. The dramatic loss of AQP4, astrocyte glial fibrillary acidic protein (GFAP), oligodendrocyte myelin basic protein (MBP) and the infiltration of inflammatory cells (T lymphocytes, neutrophils and macrophages) were compared with each group by using immunofluorescence, in order to find abnormal changes. 【Results】 Intracerebral injection of AQP4-IgG together with hC can cause

收稿日期: 2017-12-11

基金项目: 国家自然科学基金(8177050896); 广东省自然科学基金(2017A030313853)

作者简介: 方羚, 硕士研究生, 研究方向: 神经免疫病, E-mail: 771705537@qq.com; 邱伟, 通信作者, 博士生导师, 教授, 研究方向: 神经免疫病, E-mail: qiuwei120@vip.163.com

NMO-like lesions, including astrocyte injury, demyelination and inflammatory cell infiltration. However, EAE mice model with intracerebral injection of AQP4-IgG and hC represented more significant loss of AQP4 and GFAP ($P=0.008$ and $P=0.016$, respectively) compared with mice without EAE induced. The area of MBP loss was also increased, while there's no statistical difference. No statistical difference was also found in the number of vessels infiltrated with CD3⁺T cell, neutrophils and the area infiltrated with macrophage. Astrocyte proliferation existed in all groups, but no loss of AQP4, GFAP and MBP was found in EAE mice injected with NS. 【Conclusion】 Intracerebral injection of AQP4-IgG and hC can cause distinct pathological damage and the pathology can be promoted by immune system activated by EAE. Intracerebral injection of AQP4-IgG and hC can mimic the pathogenesis of NMOSD better in EAE mice model.

Key words: neuromyelitis optica spectrum disorders; aquaporin-4 immunoglobulin g; animal models; experimental autoimmune encephalomyelitis

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2018, 39(2):207-214;244]

视神经脊髓炎谱系疾病(neuromyelitis optica spectrum disorders, NMOSD)是中枢神经系统(central nervous system, CNS)自身免疫性炎性疾病,主要临床表现包括视神经炎、脊髓炎、极后区综合征等^[1]。33%~91%的NMOSD患者血清水通道蛋白4抗体(aquaporin-4 immunoglobulin G, AQP4-IgG)阳性^[2]。AQP4-IgG已经被证明是NMOSD的致病性抗体^[3]。AQP4-IgG与星形胶质细胞足突上的AQP4特异性结合,通过抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用和补体依赖的细胞毒作用(complement dependent cytotoxicity, CDC)损伤星形胶质细胞,募集巨噬细胞、嗜酸性粒细胞及中性粒细胞,继发髓鞘脱失,甚至轴索损害、神经元死亡^[4]。NMOSD患者病情严重程度与血清AQP4-IgG滴度不完全成正相关,提示抗体以外因素参与疾病发生、发展^[5-6]。T细胞是体内细胞免疫的主要效应细胞,分为CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞两个亚群。Th17细胞为新发现的CD4⁺T细胞亚群,参与了多种自身免疫疾病的发病,如系统性红斑狼疮^[7]、干燥综合征^[8]等。AQP4-IgG为IgG1型抗体,它的产生需要T细胞辅助参与^[9-10]。值得注意的是在NMOSD患者体内可检测到AQP4(p61-80肽段)特异性CD4⁺T细胞,其分化向Th17偏移,Th17细胞相关的促炎细胞因子,如IL-17、IL-6、IL-22、IL-21等升高,可增加BBB(Blood-brain Barrier, BBB)通透性,加重CNS炎症反应,尤其中性粒细胞的浸润^[9-10]。同时动物实验发现,AQP4特异性T细胞不仅辅助致病性IgG产生,还可穿过BBB,直接导致病灶形成^[11]。因此,细胞免疫在NMOSD发病中发挥着重要的作用。髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(myelin oligodendrocyte glycoprotein, MOG)抗原片

段MOG35-55与完全弗氏佐剂诱导经典的小鼠实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)模型,可激活Th1/Th17淋巴细胞^[12],我们由此推测,在小鼠诱导EAE,可通过激活的Th1/Th17淋巴细胞,破坏BBB,帮助AQP4-IgG到达CNS,在脑和脊髓引起AQP4缺失、星形胶质细胞损伤和广泛脱髓鞘^[13-15]。同时,T细胞激活带来一系列促炎因子释放,在立体定位注射时可以通过破坏的BBB进入注射点,模拟全身免疫异常对局部病灶的影响。因此,本研究的目的在于:①在诱导EAE的基础上联合脑实质局部注射AQP4-IgG与hC,建立NMOSD模型;②并通过此模型,探究全身免疫异常尤其是细胞免疫异常,对局部AQP4-IgG致病机制的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本研究选用C57BL/6雌性小鼠,8~12周龄,体重16~18g。购自南京大学-南京生物医药研究所。购置后的小鼠由中山大学附属第三医院疫苗研究所动物实验中心(SPF级)分笼喂养,动物实验中心对动物采用国家标准化方案喂养,所有小鼠进食及饮水自由。(24±2)℃环境,白天、黑夜循环交替光照12h:12h。20只小鼠喂养至8周龄后,以克为单位随机分为EAE组($n=15$)和AQP4-IgG+hC组(脑实质注射AQP4-IgG+hC, $n=5$)。待EAE发病高峰期,将EAE评分达1~3分的动物($n=10$)随机分为两组进行脑实质注射:EAE+脑实质注射生理盐水(normal saline, NS)组(EAE+NS组)和EAE+脑实质注射AQP4-IgG+hC组(EAE+

AQP4-IgG+hC组),每组各5只。本实验方案已经经过中山大学附属第三医院伦理审查委员会批准(伦理号001 604 22)。

1.2 患者来源AQP4-IgG纯化与健康人hC获得

将AQP4-IgG阳性(细胞间接免疫荧光法检测,滴度为1:320)患者来源血清4℃、9 000 r/min离心15 min(Eppendorf公司,5804 R型),上清液与Protein A Beads(GE Healthcare,71149800-EG,瑞典)混匀,4℃摇床结合4 h,pH 2.5甘氨酸洗脱抗体,pH 9.0 Tris-HCl平衡pH值,经150 ku超滤柱(优宁维,中国上海)浓缩,PD-10脱盐柱(GE Healthcare,17-0851-01,瑞典)将溶液置换为磷酸盐缓冲溶液,获得的抗体终浓度为20 mg/mL。干燥管新鲜抽取健康志愿者全血室温静置30 min,1 000 r/min离心收集上清,分装后-80℃保存,以保持hC活性。

1.3 EAE诱导与临床评分

小鼠尾根部上方0.5 cm取平行3点,于每个注射点皮下注射0.1 mL的MOG₃₅₋₅₅乳化液[MOG₃₅₋₅₅ 100 μg(西安联美生物有限科技公司,纯度>95%)],完全弗氏佐剂500 μg(Sigma Aldrich,美国),含500 μg灭活的结核菌素(231141,BD-DIFCO),免疫当天为第0天,第7天再次免疫,方法同前。每只动物在第0、2、7、9天腹腔注射400 ng百日咳毒素(*Bordetella pertussis*, BML-G100-0050, ENZO)。

小鼠诱导EAE后第7天开始,由两名实验者各自分别对小鼠进行评分,采用6级5分制双盲评价,将两人对每只小鼠的评分结果取平均分视为当天小鼠的评分。具体标准如下:0分,小鼠无发病症状;1分,体质量下降或小鼠尾巴肌张力减低;2分,小鼠尾巴瘫痪,出现轻度后肢或前肢无力;3分,小鼠出现重度后肢或前肢无力(出现肢体拖拽);4分,小鼠后肢完全瘫痪,并部分前肢瘫痪,人为翻身不能复位;5分,濒死。

1.4 脑实质注射模型建立

使用异氟烷(瑞沃德,中国)气体麻醉小鼠,固定于立体定位仪(瑞沃德,中国),暴露小鼠前囟,在前囟右侧旁开2 mm处钻开颅骨,26 g微量注射器(哈密尔顿1701ASRN 10 μL)注射10 μL AQP4-IgG阳性患者血清来源的IgG与hC混合液(IgG浓度为20 mg/mL,IgG与hC体积比为3:2)或10 μL NS,深度为3 mm,注射速度为1 μL/min。

注射后停留5 min出针。注射过程维持小鼠体温。7 d后2%戊巴比妥腹腔注射麻醉小鼠,经心脏灌注冰生理盐水20 mL与40 g/L多聚甲醛溶液20 mL,剥离颅骨取出小鼠全脑,在40 g/L多聚甲醛溶液中后固定24 h,分别于20%、25%和30%蔗糖溶液中梯度脱水。

1.5 组织化学与免疫荧光病理

取小鼠大脑注射部位做冰冻切片(厚度20 μm),0.01% Triton X-100通透20 min,10%山羊血清室温封闭40 min,下列抗小鼠抗体4℃孵育过夜:AQP4(1:300, Santa Cruz Biotechnology, sc-28012),星形胶质细胞活化标记物:胶质纤维酸性蛋白(Glial Fibrillary Acidic Protein, GFAP, 1:500, aves, GFAP7857983),髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein, MBP, 1:500, Proteintech, 10458-1-AP),巨噬细胞(Macrophage, 1:300, Santa Cruz Biotechnology, sc-101447),补体标记C5b-9(1:100, abcam, ab55811),CD3(1:300, Santa Cruz Biotechnology, sc-101442),Ly-6G(中性粒细胞标记1:300, BD Biosciences, 562737)。荧光二抗(包括对应一抗种属的Alexa Fluor 546或Alexa Fluor 488标记的山羊来源荧光抗体,Life technologies)室温孵育1 h,4,6-二脒基-2-苯基吲哚1:5 000 5 min染细胞核,荧光显微镜(LEICA DM4000 B)下观察结果。

1.6 数据统计

数据(mean±SEM)用Graphpad Prism 5软件进行统计分析并成图。采用KS normality test检测是否服从正态分布,Bartlett's test检测方差齐性,one-way ANOVA(不服从正态分布或方差不齐时采用Kruskal-Wallis test)分析3组数据之间是否存在统计学差异,若存在统计学差异,则联合Tukey's multiple comparisons test(不服从正态分布或方差不齐时联合Mann-Whitney U test,需校正使 $\alpha=0.05/3$)比较两两组间差异。

2 结 果

2.1 脑实质注射AQP4-IgG和hC对EAE小鼠体质量及临床评分的影响

从诱导EAE开始检测小鼠体质量和临床评分,待EAE发病高峰期,将EAE评分达1-3分的动物进行脑实质立体定位注射操作,下图记录了从立体定位注射当天开始到注射后7 d的体质量和

EAE评分情况。图1B中可以看到,注射当天(第0天)EAE建模小鼠EAE评分的平均分是2.0分。注射后7 d,3组小鼠的体质量均无明显的增

长停滞或下降(图1A); EAE评分亦无明显变化(图1B)。说明脑实质注射AQP4-IgG和hC不会加重小鼠EAE发病。

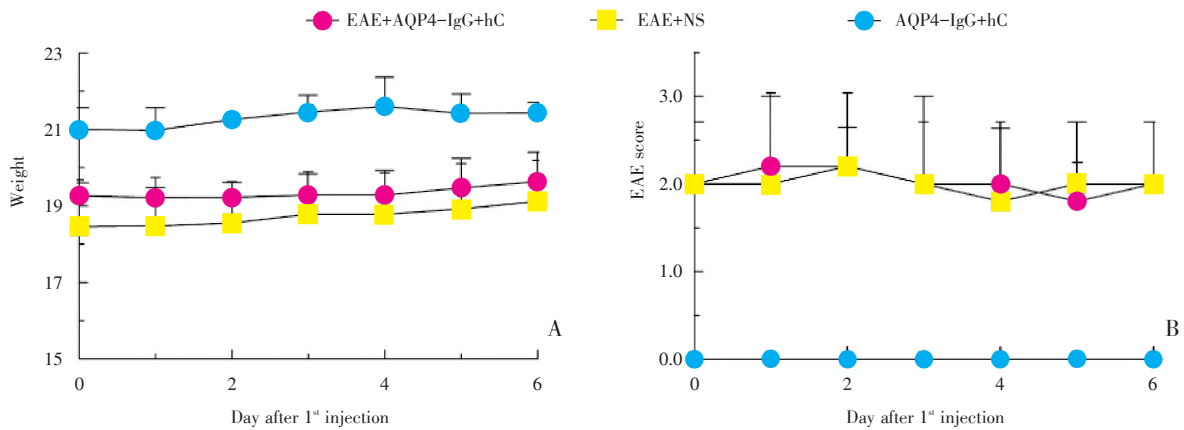


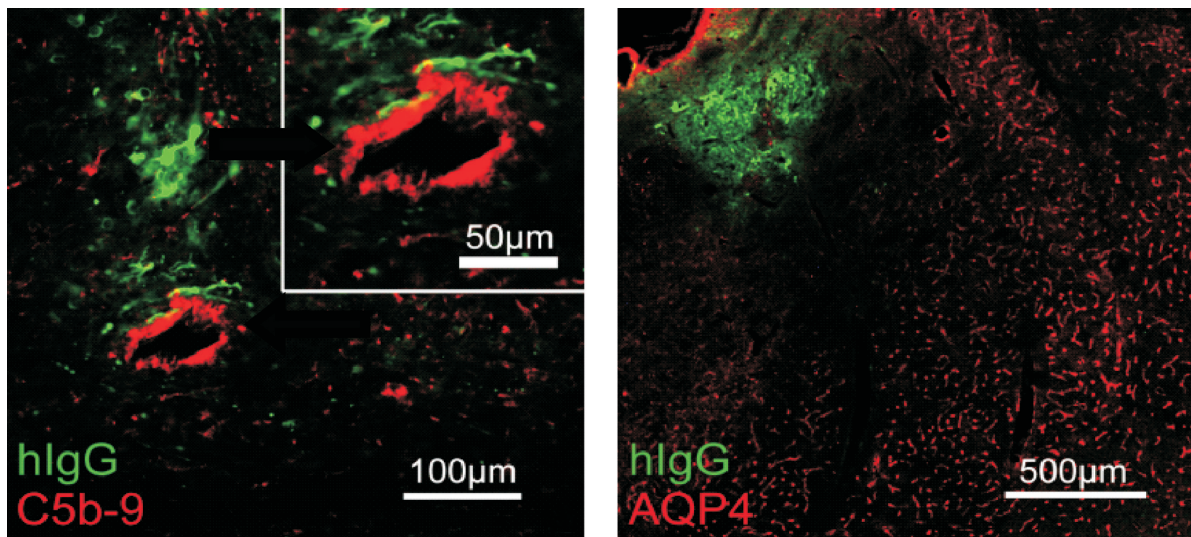
图1 局部脑实质注射6 d后3组小鼠体质量和EAE评分变化

Fig.1 Change of weights and EAE scores after intracerebral injection of AQP4-IgG and hC

2.2 小鼠脑实质注射AQP4-IgG和hC在正常小鼠和EAE小鼠颅内的病灶

不论是基于EAE小鼠脑实质注射6 μ L AQP4-IgG与4 μ L hC混合液,还是单纯脑实质注射AQP4-IgG和hC,在第7天均出现颅内病灶。荧光显微镜下可见:①人IgG和hC在注射点周围弥散分布,主要沉积于血管周围,补体沉积呈玫瑰花样或点状(图2A)。抗体和补体的沉积表明抗体与抗

原特异性结合后激活补体产生CDC作用。②病灶中央AQP4、GFAP缺失,缺失周围有AQP4减弱带,可见星形胶质细胞反应性增生(图3A、B)。病灶中心小片状脱髓鞘病变(图3A、B)。③注射侧大脑半球出现显著炎症反应,可见CD3⁺T淋巴细胞、巨噬细胞和中性粒细胞浸润,CD3⁺T淋巴细胞和中性粒细胞主要分布在血管周围(图4A)。



A showed human IgG (Green) from AQP4-IgG positive NMOSD patients deposition around the blood vessels with hC (Red). B showed that around the deposition of human IgG (Green) loss of AQP4 (Red) was observed.

图2 脑实质注射AQP4-IgG阳性患者来源IgG和hC所致病灶

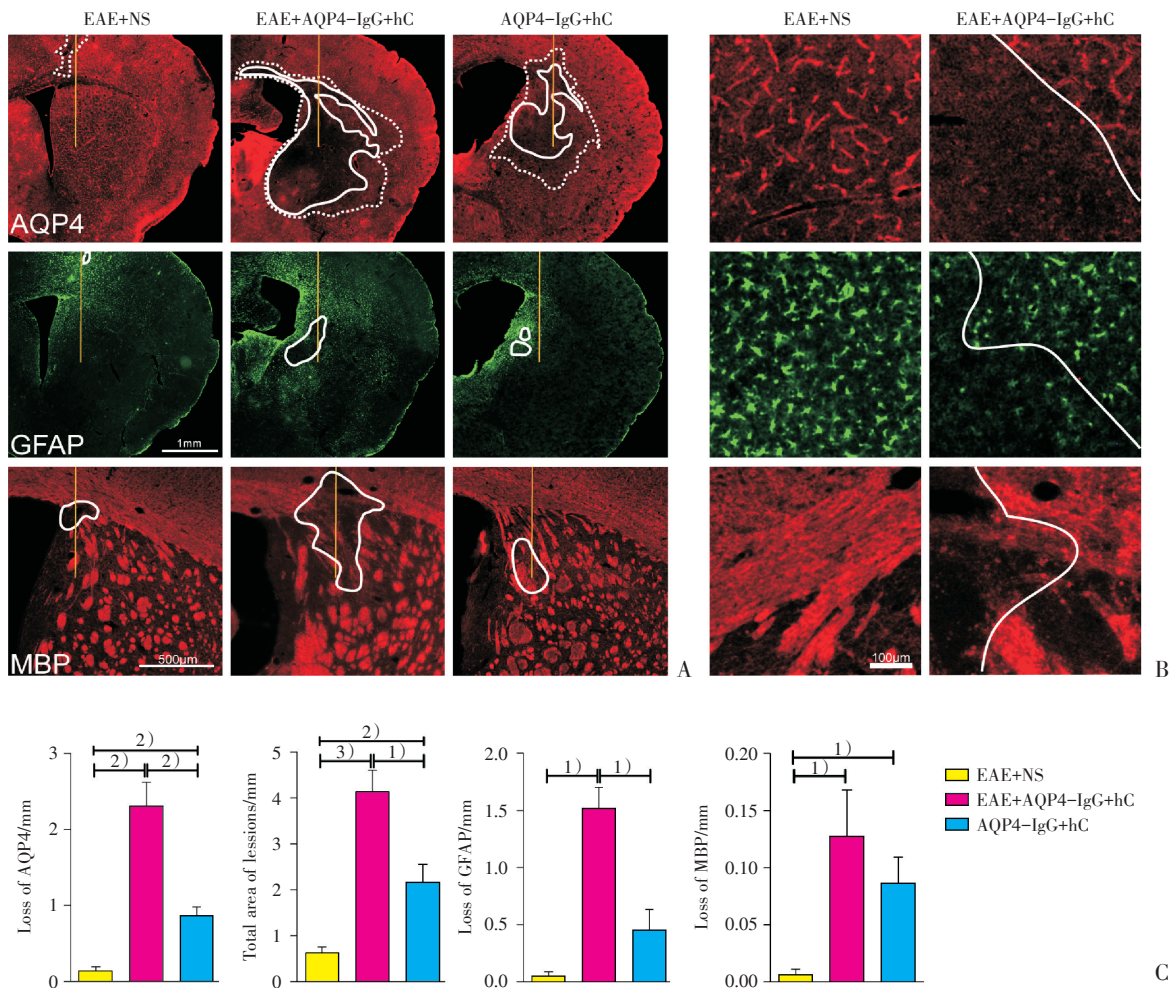
Fig.2 Disease locus in mice of EAE+AQP4-IgG+hC group and AQP4-IgG+hC group.

2.3 诱导小鼠 EAE 对脑实质注射 AQP4-IgG 和 hC 病灶的影响

在 EAE 发病的高峰期,于右侧脑实质注射 AQP4-IgG 与 hC 混合液,可见注射部位产生显著的 AQP4 和 GFAP 丢失(图 3A、B)。病灶中心为 AQP4 完全缺失区,EAE+AQP4-IgG+hC 组 AQP4 缺失面积(mm^2)大于 AQP4-IgG+hC 组(2.307 ± 0.315 vs 0.866 ± 0.115 ; $P=0.008$; 图 3C);周围是 AQP4 减弱区,病灶总面积包括 AQP4 缺失和减弱区域,EAE+AQP4-IgG+hC 组病灶总面积大于 AQP4-IgG+hC 组(4.135 ± 0.467 vs 2.176 ± 0.380 ; $F=1.507$, $P=0.012$; 图 3C),病灶中央 GFAP 缺失面积亦大于 AQP4-IgG+hC 组(1.521 ± 0.180 vs 0.453 ± 0.181 ; $P=0.016$;

图 3C)。病灶周围 GFAP 信号密集、增强,是星形胶质细胞反应性增生的表现。EAE+NS 组小鼠注射侧大脑半球亦可见星形胶质细胞增生,与 AQP4-IgG+hC 组比较,其病灶总面积小(0.625 ± 0.132 vs 2.176 ± 0.380 ; $F=8.327$, $P=0.005$),无明显 AQP4 缺失(0.136 ± 0.056 vs 0.866 ± 0.115 ; $P=0.008$)与 GFAP 缺失(0.048 ± 0.039 vs 0.453 ± 0.181 ; $P=0.034$; 图 3A)。

注射后第 7 天,AQP4-IgG+hC 组仅引起小范围 MBP 缺失(图 3A、B),相比之下,EAE+AQP4-IgG+hC 组的脱髓鞘有加重趋势(MBP 缺失面积/ mm^2 : 0.128 ± 0.040 vs 0.086 ± 0.023 ; $P=0.841$; 图 3C),而 EAE+NS 组无明显脱髓鞘改变(MBP 缺失面积/ mm^2 : 0.007 ± 0.005 vs 0.086 ± 0.023 ; $P=0.011$)。



A showed results of three groups immunofluorescence staining. The needle tract shown as a yellow line, white line demarcates region with loss of immunofluorescence, and white dashed line demarcates the decreased AQP4. B presented higher magnification of indicated regions. C: Total area of lesions contained the area of loss staining of AQP4 and decreased AQP4 immunofluorescence. Summary of lesion areas (mean±SEM), $n=5$, 1) $P<0.05/3$, 2) $P<0.01$, 3) $P<0.001$.

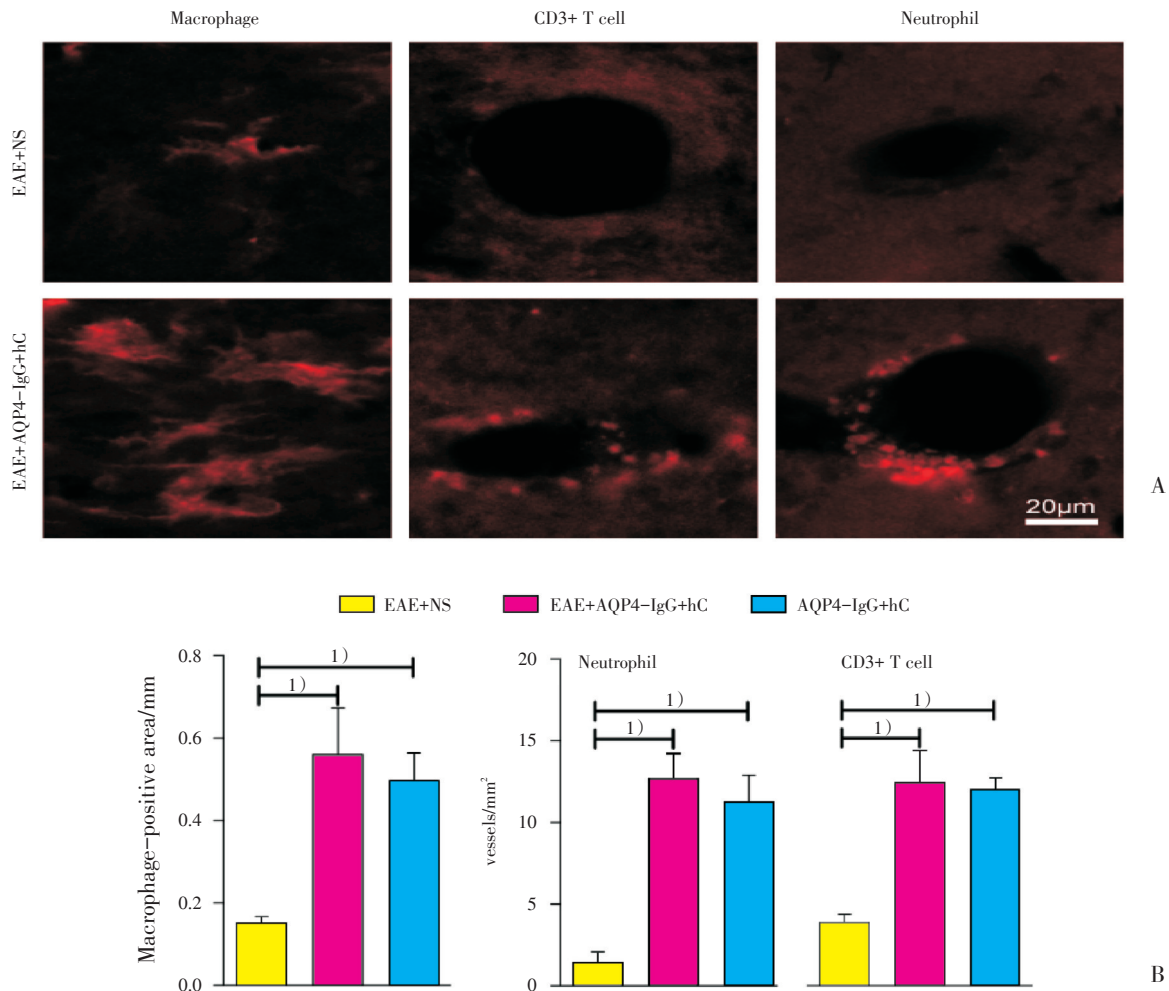
图 3 AQP4、GFAP 和 MBP 免疫荧光染色结果

Fig.3 Immunofluorescence staining of AQP4, GFAP, and MBP in three groups

2.4 基于EAE局部注射AQP4-IgG和hC与单独脑实质注射的炎症反应

在脑实质混合注射 AQP4-IgG 和 hC 的第 7 天, EAE+AQP4-IgG+hC 组与 AQP4-IgG 和 hC 组均在注射侧大脑半球引起明显的炎症反应, 可见明显的血管套生成, 周围有巨噬细胞、CD3⁺T 细胞和中性粒细胞聚集。CD3⁺T 细胞和中性粒细胞主要分布在血管周围, 病灶内也可见散在分布, 巨噬细胞分布范围广泛, 可包括 AQP4 缺失区和减弱区 (图 4A)。EAE+NS 组的炎症细胞主要分布在注射针道处, 无明显的扩散浸润 (图 4A)。对侧大脑半球 (非注射侧) 无明显炎症细胞浸润。注射侧大脑半球巨噬细胞浸润面积 (mm²) EAE+AQP4-IgG+hC 组与 AQP4-IgG+hC 组无统计学差异 (0.561±

0.113 vs 0.497±0.068; $P=1.000$); 与 AQP4-IgG+hC 组相比, EAE+NS 组仅在注射点周围小范围巨噬细胞聚集 (0.152±0.014 vs 0.497±0.068; $P=0.008$; 图 4B)。统计距离注射针道 1.24 mm 范围内 CD3⁺T 细胞与中性粒细胞浸润的血管套数量, 与 AQP4-IgG+hC 组比较, EAE+AQP4-IgG+hC 组无明显的改变 [CD3⁺T 细胞浸润血管套数量 (个/mm²) 12.50±1.93 vs 12.06±0.73, $P=1.000$; 中性粒细胞浸润血管套数量 12.670±1.52 vs 11.25±1.62, $P=0.548$; 而 EAE+NS 组仅在针道周围有少数血管套出现炎症细胞浸润 (CD3⁺T 细胞浸润血管套数量 3.91±0.50 vs 12.06±0.73, $P=0.008$; 中性粒细胞浸润血管套数量 1.41±0.68 vs 11.25±1.62, $P=0.012$; 图 4B), 是注射本身造成的炎症反应, 范围小, 程度轻。



A showed inflammatory infiltration of CD3⁺T cells, neutrophils (Ly-6G) and macrophages. B showed area of macrophage infiltration and number of vessels per mm² that infiltrated by CD3⁺T cells and neutrophils. C: Counted the number of CD3⁺T cells and neutrophils infiltration vessels/mm² in a region 1.24 mm lateral to the injection site in coronal sections. mean±SEM, $n=5$, $1) P<0.05/3$

图4 炎症细胞免疫荧光染色结果

Fig.4 Results of immunofluorescence staining of CD3, Ly-6G and Macrophage

3 讨 论

本研究表明,①脑实质局部注射 AQP4-IgG 和 hC 可以造成典型的 NMOSD 样颅内病灶;②诱导 C57BL/6 小鼠 EAE 可以显著加重该损伤,导致 AQP4 缺失和减弱面积增加,GFAP 缺失面积增大,表明星形胶质细胞损伤加重;③在 EAE 基础上脑实质局部注射 AQP4-IgG 和 hC 为 NMOSD 临床机制研究提供了实验基础。

本研究进一步证实了 AQP4-IgG 具有致病性,可导致补体依赖的星形胶质细胞损伤,并有脱髓鞘改变和炎性细胞浸润。同时证明了,诱导 EAE 可以增加脑实质局部 AQP4-IgG 和 hC 的致病作用,说明 Th 细胞的激活在 NMOSD 的致病机制中发挥了一定的作用。事实上,很多研究已经关注到 NMOSD 患者外周血和脑脊液中相关的生物学标记,包括趋化因子和细胞因子^[16-18],涉及 Th1 和 Th17 细胞,其中以 Th17 细胞轴及其相关因子影响较大,如 IL-17、IL-6 与长节段脊髓炎和 AQP4-IgG 阳性相关,IL-6 和 IL-21 与 EDSS 评分成正相关。近年来,随着对小鼠 EAE 研究的深入,人们认识到与大鼠 EAE 不同,小鼠 EAE 可产生 Th1 和 Th17 等多种 Th 细胞^[12, 19-20],尤其 Th17 细胞与其分泌的 IL-17、IL-6 等细胞因子可增加 BBB 通透性,IL-17 可通过诱导内皮细胞的活性氧簇直接破坏 BBB,IL-17 及其下游细胞因子还可吸引并激活中性粒细胞进入 CNS,因此,EAE 小鼠外周血和脑脊液相关促炎因子变化与 NMOSD 患者更具有相似性^[16-18],小鼠 EAE 外周血中升高的多种 Th17 细胞相关的细胞因子如,IL-17、IL-6、IL-22、IL-21^[12],有助于加重 BBB 损伤,扩大病变范围,协助 AQP4-IgG 使星形胶质细胞损伤加重,促使 NMO 样病灶进一步恶化。

AQP4-IgG 阳性患者病灶炎症细胞浸润通常

以巨噬细胞、中性粒细胞为主,部分病灶有 CD3⁺T 细胞聚集^[15]。本研究中 AQP4-IgG+hC 组和 EAE+AQP4-IgG+hC 组病灶中血管套周围均可见中性粒细胞和 CD3⁺T 细胞浸润,以及片状的巨噬细胞激活,这符合人类病灶特点^[15],也符合既往基于 EAE 的 AQP4-IgG 腹腔注射模型和局部脑实质注射等相关动物实验报道结果^[21-22]。但是尽管 EAE 可加重 AQP4-IgG 的致病作用,这两组间炎症细胞浸润程度差异并无统计学意义。可能的原因是,本研究用 CD3⁺标记 T 淋巴细胞,囊括了 CD4⁺与 CD8⁺T 细胞,仅能检测 T 细胞的数量变化,而 EAE 可能仅改变了局部病灶 Th 细胞类型,不影响 T 细胞数量,这需要进一步验证。而中性粒细胞的浸润高峰期主要在局部注射后 24 h,到注射后第 7 天仅有少量中性粒细胞浸润^[3],因此导致本研究中注射后第 7 天 AQP4-IgG+hC 组和 EAE+AQP4-IgG+hC 组中性粒细胞聚集无明显差异。

相比于传统的单纯脑实质注射 AQP4-IgG、hC 以及 EAE 腹腔注射 AQP4-IgG 这两种方法,本研究采用的基于小鼠 EAE 的脑实质局部注射 AQP4-IgG 和 hC 的方法融合了上述两种模型的优点。EAE 小鼠提供了一个全身的免疫激活状态,尤其具有 Th17 极化倾向,Th17 细胞激活和相关细胞因子的分泌,能弥补局部脑实质注射仅有 CDC 作用的不足;而局部脑实质注射 AQP4-IgG 和 hC 可以破坏 BBB 允许外周血中抗体等效应因子通过注射处渗漏到 CNS 发挥作用^[23],同时解决腹腔注射模型中的 AQP4-IgG 来源紧缺以及 AQP4-IgG 抗体不能激活小鼠补体等问题^[3, 24],并且局部注射的方法更适合研究小分子药物靶向治疗^[25-27]。

综上所述,本研究表明小鼠脑实质注射 AQP4-IgG 联合 hC 可致显著局灶性病理损伤,而诱导 EAE 造成的全身免疫激活状态可加重该损伤;EAE 联合 AQP4-IgG 局部注射可能更好模拟 NMOSD 临床发病机制。

参考文献

[1] Wingerchuk DM, Banwell B, Bennett JL, et al. International consensus diagnostic criteria for neuromyelitis optica spectrum disorders [J]. *Neurology*, 2015, 85(2): 177-189.

[2] Jarius S, Wildemann B. AQP4 antibodies in neuromyelitis optica: Diagnostic and pathogenetic relevance [J]. *Nat Rev Neurol*, 2010, 6(7): 383-392.

[3] Saadoun S, Waters P, Bell BA, et al. Intra-cerebral injection of neuromyelitis optica immunoglobulin G and human complement produces neuromyelitis

- optica lesions in mice [J]. *Brain*, 2010, 133(2): 349-361.
- [4] Parratt JD, Prineas JW. Neuromyelitis optica: A demyelinating disease characterized by acute destruction and regeneration of perivascular astrocytes [J]. *Mult Scler*, 2010, 16(10): 1156-1172.
- [5] 方羚, 黄艳露, 邱伟. 视神经脊髓炎谱系疾病患者水通道蛋白4-IgG临床意义及转归 [J]. *临床内科杂志*, 2016, 33(8): 518-520.
Fang L, Huang YL, Qiu W. Clinical significance and outcome of aquaporin 4-IgG in neuromyelitis optica spectrum disorders [J]. *J Clin Intern Med*, 2016, 33(8): 518-520.
- [6] 黄艳露, 黄巧, 卢婷婷, 等. 中国人视神经脊髓炎谱系疾病及多发性硬化与妊娠的相关性 [J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2017, 38(2): 267-272.
Huang YL, Huang Q, Lu TT, et al. Neuromyelitis optica spectrum disorder and multiple sclerosis associated with pregnancy in Chinese [J]. *J Sun Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2017, 38(2): 267-272.
- [7] Talaat RM, Mohamed SF, Bassyouni IH, et al. Th1/Th2/Th17/Treg cytokine imbalance in systemic lupus erythematosus (SLE) patients: Correlation with disease activity [J]. *Cytokine*, 2015, 72(2): 146-153.
- [8] Fei Y, Zhang W, Lin D, et al. Clinical parameter and Th17 related to lymphocytes infiltrating degree of labial salivary gland in primary Sjogren's syndrome [J]. *Clin Rheumatol*, 2014, 33(4): 523-529.
- [9] Varrin-Doyer M, Spencer CM, Schulze-Topphoff U, et al. Aquaporin 4-specific T cells in neuromyelitis optica exhibit a Th17 bias and recognize Clostridium ABC transporter [J]. *Ann Neurol*, 2012, 72(1): 53-64.
- [10] Weiner HL. Role of T cells in neuromyelitis optica [J]. *Ann Neurol*, 2012, 72(1): 6-8.
- [11] Zeka B, Hastermann M, Hochmeister S, et al. Highly encephalitogenic aquaporin 4-specific T cells and NMO-IgG jointly orchestrate lesion location and tissue damage in the CNS [J]. *Acta Neuropathol*, 2015, 130(6): 783-798.
- [12] Kurschus FC. T cell mediated pathogenesis in EAE: Molecular mechanisms [J]. *Biomed J*, 2015, 38(3): 183-193.
- [13] Bennett JL, Lam C, Kalluri SR, et al. Intrathecal pathogenic anti-aquaporin-4 antibodies in early neuromyelitis optica [J]. *Ann Neurol*, 2009, 66(5): 617-629.
- [14] Kinoshita M, Nakatsuji Y, Kimura T, et al. Neuromyelitis optica: Passive transfer to rats by human immunoglobulin [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 386(4): 623-627.
- [15] Bradl M, Lassmann H. Experimental models of neuromyelitis optica [J]. *Brain Pathol*, 2014, 24(1): 74-82.
- [16] Barros PO, Dias AS O, Kasahara TM, et al. Expansion of IL-6 + Th17-like cells expressing TLRs correlates with microbial translocation and neurological disabilities in NMOSD patients [J]. *J Neuroimmunol*, 2017, 307(9): 82-90.
- [17] Chang K, Ro L, Lyu R, et al. Biomarkers for neuromyelitis optica [J]. *Clinica Chimica Acta*, 2015, 440(8): 64-71.
- [18] Uzawa A, Mori M, Kuwabara S. Cytokines and chemokines in neuromyelitis optica: Pathogenetic and therapeutic implications [J]. *Brain Pathol*, 2014, 24(1): 67-73.
- [19] Zhao Q, Cheng W, Xi Y, et al. IFN- β regulates Th17 differentiation partly through the inhibition of osteopontin in experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *Mol Immunol*, 2018, 93(5): 20-30.
- [20] Nelson PA, Khodadoust M, Prodhomme T, et al. Immunodominant T cell determinants of aquaporin-4, the autoantigen associated with neuromyelitis optica [J]. *PLoS One*, 2010, 5(11): e15050.
- [21] Wrzos C, Winkler A, Metz I, et al. Early loss of oligodendrocytes in human and experimental neuromyelitis optica lesions [J]. *Acta Neuropathol*, 2014, 127(4): 523-538.
- [22] Saadoun S, Waters P, Macdonald C, et al. T cell deficiency does not reduce lesions in mice produced by intracerebral injection of NMO-IgG and complement [J]. *J Neuroimmunol*, 2011, 235(1-2): 27-32.
- [23] Asavapanumas N, Verkman AS. Neuromyelitis optica pathology in rats following intraperitoneal injection of NMO-IgG and intracerebral needle injury [J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2014, 2(1): 48-57.

(下转第244页 to page 244)