

猴 EAE 致敏前后脑脊液 IgG 指数和 IgG 合成率的变化^①

饶从志 胡学强 陆正齐

(中山医科大学附属第一医院神经科; 广州, 510080)

摘要 目的: 研究体液免疫在多发性硬化(MS)病程不同阶段中的作用。方法: 采用 Bekmann 免疫仪和 Monarch Plus 生化仪, 对 10 只食蟹猴中 IgG 指数和 IgG 合成率, 进行实验性变态反应性脑脊髓炎(EAE)致敏前和致敏后不同阶段的自身对照检测。结果: 致敏前正常食蟹猴脑脊液(CSF)IgG 指数为 0.3 ± 0.1 , IgG 合成率为 -4.6 ± 3.3 ; 致敏后 1、2、3、4、5 周 IgG 指数分别为 0.4 ± 0.2 、 0.7 ± 0.5 、 0.7 ± 0.4 、 0.7 ± 0.3 、 0.6 ± 0.2 ; 而 IgG 合成率分别为 -1.3 ± 4.1 、 27.1 ± 40.0 、 26.6 ± 39.1 、 26.2 ± 38.2 、 24.5 ± 43.9 。致敏后 1 周与致敏前的 IgG 指数和 IgG 合成率的差异无显著性意义, 而致敏后 2、3、4、5 周与致敏前的差异均有显著性意义, 但致敏后 2、3、4、5 周之间差异无显著性意义。结论: 提示体液免疫在 MS 和 EAE 中起重要作用, 并且持续相当长的时间。

关键词 成束猴; 脑脊髓炎; 变应性/脑脊髓液; 多发性硬化; IgG

中图分类号 R 744

THE CSF IgG INDEX AND IgG SYNTHETIC RATE BEFORE AND AFTER EAE INDUCTION IN *MACACA FASCICULARIS*

Rao Congzhi Hu Xueqiang Lu Zhengqi

(Department of Neurology, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences Guangzhou, 510080)

Abstract Objective: To investigate the immunological pathogenesis of multiple sclerosis (MS). **Methods:** The cerebrospinal fluid (CSF) IgG index and IgG synthetic rate were determined in 10 *Macaca fascicularis*, by self-control, with Bekmann immunochemistry system, and Monarch plus biochemistry system, before and different stages after sensitization in order to obtain experimental allergic encephalomyelitis(EAE). **Results:** The CSF IgG index and IgG synthetic rate were 0.3 ± 0.1 and -4.6 ± 3.3 respectively before immunization; the IgG index was 0.4 ± 0.2 , 0.7 ± 0.5 , 0.7 ± 0.4 , 0.7 ± 0.3 , 0.6 ± 0.2 separately in the 1, 2, 3, 4, 5 week after immunization, while IgG synthetic rate was -1.3 ± 4.1 , 27.1 ± 40.0 , 26.6 ± 39.1 , 26.2 ± 38.2 , 24.5 ± 43.9 respectively. The difference of the IgG index and IgG synthetic rate between before and 1 week after immunization was not significant, while the IgG index or synthetic rate of both between before and any one of 2, 3, 4, 5 week after immunization was significant, but the differences between 2, 3, 4, 5 week each other after immunization were not significant. **Conclusions:** These findings indicate the humoral immunity may play an important role in MS and EAE and last for a long time

Subject headings *Macaca fascicularis*; encephalomyelitis, allergic/cerebrospinal fluid; multiple sclerosis; IgG

实验性变态反应性脑脊髓炎(EAE)是由同种型、同种异型、异种型神经组织诱导产生的, 局限于中枢神经系统白质内反应的脱髓鞘性疾病。有与多发性硬化(MS)、急性播散性脑脊髓炎(ADEM)相同的临床、生化、免疫及病理特征^{1,2}。国外学者

对 EAE 进行了广泛细致的研究, 认为其发病机制除细胞免疫起主导作用外, 体液因素也起重要作用。1989 年 Gallop 等人^[3]发现 EAE 猴中 IgG 增高, 表现为 EAE 猴 CSF IgG 指数和 IgG 合成率增

高,表明EAE动物中枢神经系统有内源性IgG合成。但国外未对其作动态观察。国内尚未见有猴的EAE报道。为了观察EAE猴发病前、发病后不同阶段脑脊液(CSF)IgG指数和IgG合成率变化,本实验用同种型猴脑白质共致敏10只食蟹猴,测定CSF中两者的变化,并说明其与临床病程的关系。

1 材料与方 法

1.1 致敏原及其制备

新鲜无菌存于 -78°C 同种型食蟹猴脑白质,按质量/体积 $=1/1.5$ 配备并加PBS,用匀浆机将其制成匀,置 -45°C 备用。

1.2 动 物

人工饲养食蟹猴,由广东省顺德灵长类实验动物中心提供,体重 $3\sim 5.5\text{ kg}$,猴龄 $3.5\sim 4.5$ 岁,雌性5只,雄性5只。单笼饲养。符合国家医用动物使用标准,标准号为普通级——95A29(广东省实验动物质量检测合格证号)。

1.3 EAE模型的建立

用 $180\sim 300\text{ mg}$ 同种猴脑白质匀浆加福氏完全辅助佐剂制成乳化剂,在猴腋窝、腹股沟多部位皮下注射给猴。如不发病者于致敏后第7、14、28天追加免疫。

1.4 血清和脑脊液样本

在致敏食蟹猴之前和致敏后1、2、3、4、5周,每只猴用氯氨酮(10 mg/kg)和戊巴比妥钠(27 mg/kg)麻醉,经股静脉采血 3 mL 、同时在1~2腰椎间行腰穿,取CSF 0.8 mL ,置 4°C 静置1h,以 1500 r/min 离心(离心半径为 6 cm) 10 min ,取出血清 1 mL 和脑脊液 0.7 mL ,置 -45°C 保存至测定。

1.5 检测方法

使用Bekmann免疫仪和Monarch Plus生化仪,采用散射比浊法和双缩脲法分别进行血清和脑脊液中IgG和白蛋白测定。检测指标及计算公式:

$$\text{IgG 指数} = \text{IgG c} : \text{IgGs} / (\text{Albc} : \text{Albs})$$

$$\text{IgG 合成率} = 5 [\text{IgG c} - \text{IgGs} / 677] - (\text{Albc} - \text{Albs} / 245) \times (\text{IgGs} / \text{Albs}) \times 0.43]^{[4]}$$

式中IgGc、Albc、IgGs、Albs分别表示脑脊液和血清中IgG和白蛋白的含量。

1.6 统计方法

所有测定结果用均数 \pm 标准差表示,按方差齐性检验,方差分析、两两比较进行统计分析。

2 结 果

2.1 EAE症状

实验组有9只动物在致敏后第5天开始发病,发病率为90%。早期表现为精神不振、厌食,随后出现体重下降、脱毛、肢体瘫痪、共济失调等,无昏迷死亡。EAE临床症状于 $24\sim 30\text{ d}$ 开始好转。发病后2个月有2只复发。

2.2 测定结果

2.2.1 IgG、Alb(蛋白白)、TP(总蛋白)水平 致敏发病后猴脑脊液中IgG大多增高,TP、Alb正常或稍增高,但疾病早期Alb、TP轻度增高,而外周血IgG、TP、Alb基本正常。

2.2.2 不同阶段IgG指数和IgG合成率的测定 致敏后第1周CSF IgG指数和IgG合成率无明显增高;致敏第2周后IgG指数和IgG合成率增高(表1)。

表1 致敏前后IgG指数和IgG合成率

Table 1 The CSF IgG index and IgG synthetic rate before and after EAE induction

Time	IgG Index	IgG synthetic rate
Before induction	0.3 ± 0.1	-4.6 ± 3.3
After induction		
1st week	$0.4 \pm 0.1^{1)}$	$-1.3 \pm 4.1^{1)}$
2nd week	$0.7 \pm 0.5^{2),3)}$	$27.1 \pm 40.0^{2),3)}$
3rd week	$0.7 \pm 0.4^{2),3)}$	$26.6 \pm 39.1^{2),3)}$
4th week	$0.7 \pm 0.3^{2),3)}$	$26.2 \pm 38.2^{2),3)}$
5th week	$0.6 \pm 0.2^{2),3)}$	$24.5 \pm 43.9^{2),3)}$

Analysis of variance: $P < 0.05$ (F was 4.12) Multiple comparison; 1) the comparison of the IgG index and IgG synthetic rate before and 1 week after induction; $P > 0.05$ (q was 2.36); 2) the comparison of both between before and any one of 2, 3, 4, 5 week after induction; P all < 0.05 (q was 4.84, 5.12, 5.35, 5.42 respectively); 3) the comparison of both between 2, 3, 4, 5 week each other after induction; P all > 0.05 (q was 2.13, 2.78, 3.19, 2.74, 3.27, 2.66 separately)

3 讨 论

EAE是迟发性变应性脱髓鞘疾病。在其发病过程中细胞免疫起主要作用,但体液免疫也起着不可忽视的作用,尤其是在髓鞘脱失过程中,当中枢神经系统(CNS)病变时,机体CNS就有内源性IgG合成,通过检测CSF中IgG指数和IgG合成率,特别是观察其动态变化,有助于疾病的诊断和预后判断。

本实验结果提示IgG指数和IgG合成率于致

敏后 2 周开始升高, 并持续相当长时间, 这可能与反复追加免疫有关。与本实验细胞免疫反应相比: 体液免疫出现晚, 随着疾病恢复虽稍有降低, 但仍持续存在。细胞免疫方面, 在疾病早期外周血和脑脊液以 CD 4⁺ T 细胞(Th/ Ti)为主; 在疾病的高峰期, 以非 T 单核和巨噬细胞为主, 有部分 B 细胞; 而在疾病的恢复期, 以 CD 8⁺ T 细胞为主, 也有部分 B 细胞。其中脑脊液中细胞免疫更为敏感, 表现为: 在发病早期及高峰期, CSF 细胞数明显升高, 其中 5 只动物出现浆细胞; 疾病恢复时, 细胞数恢复正常; 当疾病复发时, 细胞数又升高。这与国外报道一致。可见研究 CSF 中的细胞学改变, 尤其是免疫活性细胞(浆细胞和淋巴转化型细胞)的研究, 有助于揭示 CNS 疾病与免疫的内在关联, 对疾病的病因学探索和疾病的治疗提供有价值的作用。

有关人类脱髓鞘疾病 MS 的细胞、体液免疫反应报道很多。MS 病人的细胞免疫反应方面的改变与 EAE 上述细胞学改变极为相似。同时, 国外学者 Lowenthal 等^[5]证明了 MS 有异常体液免疫反应参与, 表现为 CSF 中 IgG 增高, IgG/Alb 比值增高、IgG 指数和 IgG 合成率也增高, 而且电泳时出现寡克隆区带。最近几年 Mehta 等证明了 EAE 出现与 MS 相同的结果, 从而证实了 EAE 是 MS 代表性疾病^[6]。Gallop^[3]和 Walls 等^[7]报道 EAE 这种 IgG 仅在 CSF 中存在, 而血清中没有这种现象更证明了 CNS 有独立存在的体液免疫反应, 这些说明 EAE 发病机制中体液免疫起着十分重要的作用, 同时也有助于阐明 MS 发病机制的一些问题。

参 考 文 献

- 1 Massacesi L, Genain C P, Lee-parritz D, *et al*. Actively and passively induced experimental allergic encephalomyelitis in common marmosets: a new model for multiple sclerosis. *Ann Neurol*, 1995, 37(4): 519
- 2 Owens T, Sriram S. The immunology of multiple sclerosis and its animal model, experimental allergic encephalomyelitis. *Neuroclin*, 1995, 13(1): 51
- 3 Gallop P, Cupic D, Bracco F, *et al*. Experimental allergic encephalomyelitis in the monkey: humoral immunity and blood-brain barrier function. *Ital J Neurol Sci*, 1989, 10(6): 561
- 4 刘 鸣, 徐文桢, 东方毕. IgG 指数和 IgG 合成率 in 多发性硬化诊断中的应用. *中华神经科杂志*, 1996, 29(1): 23
- 5 Lowenthal A, Karcher D, Lassmann H, *et al*. Antibody-restricted heterogeneity in serum and cerebral spinal fluid of chronic-replasing experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*, 1982, 2: 93
- 6 Rosse L M, Richards T, Ellsworth C, *et al*. Experimental allergic encephalomyelitis in nonhuman primates: a model of multiple sclerosis. *Lab Anim Sci*, 1994, 44(5): 508
- 7 Walls A F, Suckling A J, Rumsby M G, *et al*. The origin and specificity of intrathecal IgG in chronic replasing experimental allergic encephalomyelitis. *Autoimmunity*, 1989, 2(2): 123

(1997-06-26 收稿 1998-03-17 修回)

· 简 讯 ·

夏穗生教授郑重推荐《肝脏移植的理论与实践》一书

由黄洁夫主编的《肝脏移植的理论与实践》一书目前已正式面世。肝脏移植是移植学、外科技术、生物医学工程、免疫学、麻醉学、重症监护医学等多学科综合发展的结果。黄洁夫教授根据亲身经验和丰富的知识, 在原主编的《临床肝移植》一书的基础上, 组织同行学者共同撰写完成这本专著。该书从基础到临床, 从历史到未来发展方向, 对肝脏移植各个方面进行了系统的叙述, 对临床肝移植各个环节作了详细的描述, 总结了在现阶段条件下如何引进、消化、吸收国外先进肝移植经验, 发展适合中国国情的肝移植成功经验, 集全面性、系统性、学术性、实用性和现代性于一体; 对渴望了解肝移植的各级医师、研究生、医学生都可从中获取大量有用的现代移植学知识, 对从事普通外科、肝胆外科、移植外科、麻醉科、临床免疫学的科技工作者都是一本极好的参考书。著名外科专家夏穗生教授为该书写了序, 并郑重推荐此书。

(冯世容)