

小鼠自身免疫性甲状腺炎模型构建

叶登美, 王萍, 陈京, 董群

(皖南医学院 微生物学与免疫学教研室, 安徽 芜湖 241002)

【摘要】目的: 建立小鼠实验性自身免疫性甲状腺炎(experimental autoimmune thyroiditis, EAT) 模型, 为自身免疫性甲状腺炎(autoimmune thyroiditis, AIT) 发病机制的研究和治疗提供依据。方法: 雌性昆明种小鼠随机分为模型组和正常组。模型组皮下多点注射完全弗氏佐剂猪甲状腺球蛋白(porcine thyroglobulin, PTg) 抗原连续 2 周, 第 3 周起注射不完全弗氏佐剂 PTg 抗原连续 3 周, 饮用高碘水; 正常组注射等剂量生理盐水, 饮用自来水。结果: 与正常组相比, 模型组出现摄食与活动减少、消瘦、突眼、皮毛欠光滑现象。模型组甲状腺部分腺泡扩张, 腺泡腔内胶质稀薄; 上皮细胞不同程度肿胀破坏; 可见较多嗜酸性粒细胞浸润。模型组甲状腺自身抗体水平显著高于正常组。结论: 皮下多点注射佐剂抗原加高碘法建立 EAT 模型符合 AIT 病理特征, 是一种有效的建模方法。

【关键词】弗氏佐剂抗原; 高碘; EAT 模型

【中图分类号】R 332 **【文献标识码】**A

【DOI】10. 3969/j. issn. 1002-0217. 2015. 01. 003

Development of murine model of experimental autoimmune thyroiditis

YE Dengmei, WANG Ping, CHEN Jing, DONG Qun

Department of Microbiology and Immunology, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China

【Abstract】Objective: To develop a murine model of experimental autoimmune thyroiditis(EAT) for a basis to research on the pathogenesis and treatment of autoimmune thyroiditis(AIT) . **Methods:** Female mice of Kunming species were randomly divided into groups of model and normal controls. The model group were induced via multiple subcutaneous injection of Freund’s complete adjuvant(porcine thyroglobulin, PTg) for consecutive two weeks and incomplete Freund’s adjuvant for another consecutive three weeks by the third week, and fed by drinking water with high iodine level. The normal controls were given equivalent dose of saline and drinking water. **Results:** Compared with the normal controls, reduced food intake and movement, emaciation, exophthalmos and less smooth fur occurred for mice in the model group, which also revealed partially expanded acini of thyroid gland, thinned gelatinous matter in the acinar lumina and damaged epithelial cells to a certain degree as well as extensive infiltration of eosinophilic granulocytes. In addition, the model group had a significantly higher level of thyroid auto-antibody. **Conclusion:** EAT models developed by multiple subcutaneous injection of adjuvant antigen is consistent with the pathological property of AIT and effective approach to such model establishment.

【Key words】 Freund’s adjuvant antigen; high iodine; EAT model

自身免疫性甲状腺炎是指一组由自身免疫功能紊乱引起的甲状腺疾病, 以甲状腺组织损伤和甲状腺自身抗体水平升高为主要特点, 近年来发病率呈逐年增高的趋势。本病发病机制尚未完全阐明且缺乏有效的治疗方法。EAT 被认为是 AIT 的动物模型^[1], EAT 模型的建立对进一步研究 AIT 的发病机制及治疗有重要意义。

目前的研究表明 AIT 的发病与雌激素、自身免疫和碘摄入等因素有关^[2-4], 因此本实验选取雌性

小鼠采用皮下多点注射佐剂抗原加高碘法模拟 AIT 的致病因素从而诱导建立 EAT 模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF 级昆明种雌性健康小鼠 20 只, 7 ~ 8 周, (30 ± 2) g, 购于上海杰思捷实验动物有限公司。

1.1.2 主要试剂 PTg、完全弗氏佐剂、不完全弗氏

收稿日期: 2014-07-09

作者简介: 叶登美(1988-), 女, 2012 级硕士研究生, (电话) 15755352965, (电子信箱) 120200959@qq.com;

董群, 女, 教授, 硕士生导师, (电子信箱) 641882217@qq.com, 通讯作者。

佐剂、碘化钠,均为 sigma 公司产品;小鼠甲状腺球蛋白抗体(TGAb)化学发光试剂盒、小鼠甲状腺过氧化物酶抗体(TPOAb)化学发光试剂盒,均为北京福瑞生物工程公司产品。

1.1.3 主要仪器 电子天平、化学发光仪。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 所有小鼠适应性饲养一周后随机分为两组 模型组和正常组各 10 只。

1.2.2 EAT 模型的建立 将 PTg 用 PBS 溶解后与等量完全弗氏佐剂混合充分乳化成油包水乳剂,终浓度为 0.25 mg/mL,对模型组背部皮下多点注射,连续两周,每周 1 次。第 3 周起注射经不完全弗氏佐剂乳化的佐剂 PTg 抗原(终浓度为 0.25 mg/mL),连续 3 周,每周 1 次,注射部位为背部皮下、颈部皮下和腹腔。注射剂量均为 0.2 mL/(只·次),即 50 μg/(只·次)。模型组每日饮高碘水,高碘水配制方法为 1 L 自来水加 0.64g 碘化钠^[5],避光贮存。正常组皮下多点注射等剂量生理盐水,饮自来水。实验过程中观察小鼠的状态变化。

1.2.3 甲状腺自身抗体水平检测 小鼠免疫 5 周后眼球采血,留取血清,-20℃保存。采用化学发光法检测 TGAb 和 TPOAb 水平。

1.2.4 甲状腺组织病理学检查 小鼠采血后断颈处死,取与甲状腺相连的一段气管,获得双侧甲状腺。用 10% 甲醛溶液固定,石蜡包埋切片,HE 染色,光镜下观察甲状腺的组织病理形态变化。

1.3 数据处理 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用两样本 *t* 检验。

2 结果

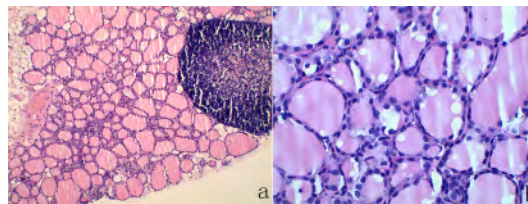
2.1 一般状况 实验前所有小鼠均饮食正常、活动良好、皮毛光滑。建模后,与正常组相比,模型组出现摄食与活动减少、消瘦、突眼、皮毛欠光滑现象。

2.2 甲状腺自身抗体水平检测结果 模型组血清 TGAb 和 TPOAb 水平都高于正常组,且与正常组相比有显著性差异(表 1)。

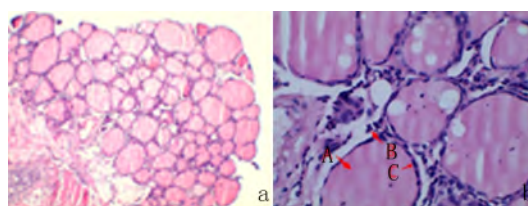
表 1 皮下多点注射抗原加高碘对小鼠 TGAb、TPOAb 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TGAb	TPOAb
正常组	10	90.81 ± 14.48	0.34 ± 0.05
模型组	10	865.62 ± 257.92	796.60 ± 333.69
<i>t</i> 值		9.49	7.55
<i>P</i> 值		<0.01	<0.01

2.3 甲状腺病理观察结果 正常组甲状腺腺泡发育完整,呈圆形或椭圆形,腺泡腔内充满胶质且分布均匀;上皮细胞呈立方形;腺泡腔内及间质未见嗜酸性变化和淋巴细胞浸润(见图 1a、b)。模型组甲状腺部分腺泡扩张,腺泡腔内胶质稀薄;上皮细胞有不同程度肿胀破坏,可见较多嗜酸性粒细胞灶性或弥漫性浸润(见图 2a、b)。



a. ×10 b. ×40
图 1 正常组甲状腺病理图



a. ×10 b. ×40; A: 腺泡腔, B: 嗜酸性粒细胞, C: 上皮细胞
图 2 模型组甲状腺病理图

3 讨论

目前建立 EAT 模型的方法主要有以下几种:皮下注射佐剂抗原;在动物腹腔中植入同源动物的甲状腺;将幼龄动物胸腺摘除,进行亚致死量 X 线全身照射;将已建立的 EAT 动物体内的 T 细胞转移给正常动物。其中皮下注射佐剂抗原诱导 EAT 模型的方法相对简单、效果较好,是较为经典的建模方法^[6-7]。碘对甲状腺的生长发育和功能维持有重要作用,是 AIT 的诱发因素。高碘不仅能直接损伤甲状腺细胞,还可与抗原结合生成碘化抗原,增强抗原的免疫原性。因此本实验在经典的佐剂抗原免疫诱导建模的同时给予高碘环境,能够较好模拟 AIT 的致病因素,缩短建模时间。EAT 模型建立成功的指标包括两个方面:①甲状腺组织损伤,上皮细胞嗜酸性变及淋巴细胞浸润;②血清中含有以 TGAb 和 TPOAb 为代表的高水平甲状腺自身抗体。本实验中,模型组小鼠出现摄食与活动减少、消瘦、突眼等现象与 AIT 临床症状类似。病理观察显示模型组甲状腺腺泡及胶质异常,上皮细胞肿胀破坏,可见较多嗜酸性粒细胞浸润,说明甲状腺出现了组织损伤,且与正常组相比模型组血清 TGAb 和 TPOAb 水平显

双组分信号转导系统 SrrBA 调控表皮葡萄球菌生长和生物膜形成

朱 涛 ,谷生丽

(皖南医学院 医学寄生虫学教研室 ,安徽 芜湖 241002)

【摘要】目的: 探讨双组分信号转导系统 SrrBA 在表皮葡萄球菌中的调控作用。方法: 利用同源重组技术构建表皮葡萄球菌 *srrBA* 基因敲除突变株 ,通过检测 OD₆₀₀ 值绘制其有氧生长曲线 ,并观察其厌氧生长状态 ,微量板半定量方法检测其生物膜形成能力。结果: 经 PCR 扩增和测序验证获得了表皮葡萄球菌 *srrBA* 基因敲除突变株(SE 1457-Δ*srrBA*) 。突变株的生长不论是在有氧还是在厌氧条件下均明显滞后于野生株。此外 ,突变株形成生物膜的能力较之野生株也显著下降。结论: 双组分系统 SrrBA 可调控表皮葡萄球菌的生长和生物膜形成。

【关键词】双组分信号转导系统; SrrBA; 表皮葡萄球菌; 生物膜

【中图分类号】R 378 **【文献标识码】**A

【DOI】10. 3969/j. issn. 1002-0217. 2015. 01. 004

Two-component signal transduction system SrrBA to regulate bacterial growth and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*

ZHU Tao ,GU Shengli

Department of Medical Parasitology ,Wannan Medical College ,Wuhu 241002 ,China

【Abstract】Objective: To explore the regulatory role of the two-component signal transduction system SrrBA in *Staphylococcus epidermidis*(*S. epidermidis*) . **Methods:** Homologous recombination technique was used to generate a *srrBA* knockout mutant in *S. epidermidis* 1457 via temperature-sensitive shuttle vector pMAD. Bacterial growth curve was determined by measuring the value of OD₆₀₀ under aerobic condition ,with anaerobic growth being observed. Effect of *srrBA* mutant on the biofilm formation was measured by a semi-quantitative microtiter plate assay. **Results:** The knockout mutant was successfully acquired and verified by PCR amplification and sequencing. The mutant exhibited drastically retarded growth compared to the parent strain under either aerobic or anaerobic conditions. Moreover ,biofilm formation was significantly reduced in the *srrBA* mutant. **Conclusion:** The SrrBA two-component system could regulate bacterial growth and biofilm formation in *S. epidermidis*.

【Key words】two-component signal transduction system; SrrBA; staphylococcus epidermidis; biofilm

基金项目: 皖南医学院博士科研启动基金项目(2011)

收稿日期: 2014-08-04

作者简介: 朱 涛(1983-) ,男 ,讲师 ,博士 (电话) 15155317590 (电子信箱) happyzhtao@ gmail. com.

著升高 ,表明采用皮下多点注射佐剂抗原加高碘法建立小鼠 EAT 模型符合 AIT 的病理损害特征 ,是一种有效的建模方法 ,可以为 AIT 的发病机制和治疗方法的研究提供可靠的动物模型。

【参考文献】

[1] Farine JC. Animal models in autoimmune disease in immunotoxicity assessment[J]. Toxicology ,1997 ,119: 29 - 35.

[2] 郭小楠 ,宋广义 ,封娟毅 ,等. 自身免疫性甲状腺疾病患者血清雌二醇泌乳素检测的临床意义[J]. 实用医机杂志 ,2006 ,13(13) : 2209 - 2211.

[3] 陈忠城 ,李学俊 ,黄建华 ,等. 血清中 TGAb 和 TPOAb 在甲状腺疾病中的临床意义[J]. 中国卫生检验杂志 ,2011 ,21(11) :

2717 - 2719.

[4] 邬月琴 ,何岚 ,刘萍 ,等. 碘与自身免疫性甲状腺疾病发病的关系[J]. 西安交通大学学报: 医学版 ,2006 ,27(3) : 295 - 297.

[5] 孙葳 ,宋光华 ,贺斌. 碘和甲状腺球蛋白诱导大鼠实验性自身免疫性甲状腺炎的研究[J]. 中华内科杂志 ,2000 ,39(12) : 841 - 842.

[6] Zaccone P ,Fehervari Z ,Blanchard L ,et al. Autoimmune thyroid disease induced by thyroglobulin and lipopolysaccharide is inhibited by soluble TNF receptor type I[J]. Eur J Immunol ,2002 ,32(4) : 1021 - 1028.

[7] 田恩江 ,赵树君 ,孙富军 ,等. 3 种诱导自身免疫性甲状腺炎动物模型的效果比较[J]. 中国地方病学杂志 ,2003 ,22(6) : 488 - 491.