



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102166344 A

(43) 申请公布日 2011. 08. 31

(21) 申请号 201110096610. 2

(22) 申请日 2011. 04. 18

(71) 申请人 首都医科大学附属北京朝阳医院

地址 100020 北京市朝阳区白家庄路甲 8 号

(72) 发明人 卢弘 陈巍 张伟

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司

公司 11002

代理人 王加岭 张庆敏

(51) Int. Cl.

A61K 38/00 (2006. 01)

A61K 35/74 (2006. 01)

A61K 49/00 (2006. 01)

A01K 67/027 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种建立大鼠葡萄膜炎模型的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种建立大鼠葡萄膜炎模型的方法, 包括以下步骤: 1) 大鼠: 选用 6-8 周龄, 180-200g, SPF 级封闭群雄性 Wistar 大鼠; 2) 腹腔注射 150-400 μ g 霍乱弧菌内毒素, 诱导的模型即为大鼠葡萄膜炎模型。该方法建立的动物模型临床及组织学特征稳定, 重复性好, 诱导成功率高, 且采用腹腔注射较以往常规的足底注射更符合伦理学及 SCI 杂志对动物实验的要求。

1. 一种建立大鼠葡萄膜炎模型的方法,其特征在于,该方法包括以下步骤:
 - 1) 大鼠:选用 6-8 周龄,180-200g, SPF 级封闭群雄性 Wistar 大鼠;
 - 2) 腹腔注射 150-400 μ g 霍乱弧菌内毒素,诱导的模型即为大鼠葡萄膜炎模型。
2. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述霍乱弧菌内毒素选自 18001 株。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法,其特征在于,所述霍乱弧菌内毒素选自古典生物型、小川血清型。

一种建立大鼠葡萄膜炎模型的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及建立大鼠葡萄膜炎模型的方法,具体涉及采用霍乱弧菌内毒素建立大鼠葡萄膜炎模型的方法。

背景技术

[0002] 葡萄膜炎(EIU)是一种常见的眼部炎症,易反复发作且牵涉到眼内多种组织,其具体发病机制目前尚不清楚,因此有必要建立合适的动物模型以进行研究。已有研究表明,内毒素注射可以诱导动物的实验性葡萄膜炎。

[0003] 内毒素诱导的葡萄膜炎动物模型已成为人们研究葡萄膜炎重要的动物模型,它对人们了解葡萄膜炎的发病机制及治疗葡萄膜炎做出了重要贡献。

[0004] 细菌内毒素(endotoxin)首先由Broivn等于1933年用三氯醋酸自鼠伤寒杆菌中提出。当时因一般蛋白质反应呈阴性,故称为“脂多糖”(Lipopolysaccharide, LPS)抗原,后人称为Borirn型抗原。

[0005] 细菌内毒素主要由革兰氏阴性菌产生,存在于细菌细胞内,为细胞壁结构成份,细菌细胞崩解时才释放出来。化学成分主要为磷脂-多糖-蛋白质复合物。我们曾对6种革兰氏阴性菌内毒素诱导大鼠葡萄膜炎模型,结果只有霍乱弧菌内毒素诱导成功率高,并且以18001株,古典生物型,小川血清型的霍乱弧菌内毒素诱导大鼠葡萄膜炎的方法报道的比较多。

[0006] 其中《眼科新进展》2002年12月第22卷第6期,本发明的发明人卢弘发表的“霍乱弧菌内毒素诱导大鼠葡萄膜炎的组织切片研究”中报道了霍乱弧菌内毒素诱导的葡萄膜炎模型,该发明中采用LPS与PBS和完全福氏佐剂(或称弗氏佐剂)、LPS与PBS和百日咳两种配方作为诱导剂,其中LPS与PBS和完全福氏佐剂用于足垫部的注射,每只0.4ml;LPS与PBS和百日咳用于腹腔注射,每只0.15ml。

[0007] 免疫佐剂是指与抗原同时或预先应用,能促进、延长或增强对抗原特异性免疫应答的物质。弗氏佐剂(Freund's adjuvant, FA)是目前动物实验中最常用的佐剂,分为不完全弗氏佐剂(FIA)和完全弗氏佐剂(FCA)。不完全弗氏佐剂是液体石蜡与羊毛脂混合而成,组分比为1-5:1,可根据需要而定,通常为2:1。不完全佐剂中加卡介苗(最终浓度为2-20mg/ml)或死的结核分枝杆菌,即为完全弗氏佐剂。FCA是标准的诱生体液免疫和细胞免疫的佐剂,它诱导I型辅助T细胞(T helper cell; Th1型)细胞因子,而FIA则是典型的只诱导Th2型细胞因子诱生抗体的佐剂。

[0008] 免疫佐剂作用机理:免疫系统受到抗原物质刺激后,抗原可被抗原提呈细胞如巨噬细胞、树突状细胞摄取,加工处理,降解为多肽片段,通过主要组织相容性复合物(major histocompatibility complex; MHC)或MHC类分子途径提呈给T淋巴细胞。T淋巴细胞被激活、复制、增殖、分化,成为效应T淋巴细胞,主要包括CTL和CD4⁺Th细胞。前者分泌细胞毒素及诱导细胞凋亡以杀死带抗原的靶细胞;后者受细胞因子、抗原特性等因素的影响,向Th1细胞或Th2细胞分化。Th1细胞偏向分泌白介素-2(IL-2)、干扰素- γ (IFN- γ),与介

导迟发型超敏反应的 TDTH 细胞和 CTL 细胞的增殖、分化、成熟有关,可促进细胞介导的免疫应答,也可辅助特异性 IgG2a 亚类抗体的产生,即 Th1 应答。Th2 细胞偏向分泌 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 与 B 细胞增殖、成熟和促进 IgG1 亚类和 IgE 抗体生成有关,可增强抗体介导的免疫应答,即 Th2 应答 [本实验中百日咳杆菌的作用是第二佐剂。在实验性自身免疫性葡萄膜炎 (experimental autoimmune uveoretinitis, EAU) 模型中必须加用第二佐剂才能诱导出炎症。

[0009] 用弗氏完全佐剂和百日咳杆菌作为 LPS 的佐剂诱导葡萄膜炎进行葡萄膜炎发病机制的研究有许多混杂因素。

[0010] 为了克服现有模型的缺点,使得该模型更符合伦理学要求,发明人提到了进行了大量的试验,最终确定本发明。

发明内容

[0011] 本发明的目的是提供一种霍乱弧菌内毒素诱导的大鼠葡萄膜炎模型的建立方法。

[0012] 本发明提供的一种建立大鼠葡萄膜炎模型的方法,包括以下步骤:

[0013] 1) 大鼠:选用 6-8 周龄,180-200g, SPF 级封闭群雄性 Wistar 大鼠;

[0014] 2) 腹腔注射 150-400 μ g 霍乱弧菌内毒素,诱导的模型即为大鼠葡萄膜炎模型。

[0015] 本发明提供的霍乱弧菌内毒素诱导的大鼠葡萄膜炎模型具有以下优势:

[0016] 1、该模型临床及组织学特征稳定,重复性好,诱导成功率高可以达到 100%;

[0017] 2、本发明提供的模型为进一步研究 EIU 发病机制提供了重要工具;

[0018] 3、避免因以往弗氏佐剂造成对研究中的干扰现象;

[0019] 4、Wistar 大鼠国内购买资源方便,便捷、符合标准;

[0020] 目前国内实验用大鼠大部分为 SPF 级 (即无特定病原体动物),此级别可以满足绝大部分实验用途;

[0021] 鉴于急性前葡萄膜炎的临床特点,幼年鼠或老龄鼠有可能对模型有影响,因此选择成年大鼠诱导模型。另外成年鼠各系统已发育成熟,诱导葡萄膜炎模型较稳定,6-8 周龄的 Wistar 大鼠为成年大鼠,此周龄的大鼠体重大约在 180-200g;

[0022] 5、本研究表明单独使用霍乱弧菌内毒素 (18001 株,古典生物型,小川血清型) 腹腔注射成功地诱导出的模型与临床可见的急性前葡萄膜炎相类似,发病迅速,眼前节受累为主,为临床研究、预防和治疗提供了重要的参考模型;

[0023] 6、腹腔注射较以往常规的足底注射更符合伦理学、及 SCI 杂志对动物实验的要求。

附图说明

[0024] 图 1:内毒素诱导的葡萄膜炎的临床表现:注射 LPS 后 24 小时,箭头显示瞳孔区渗出膜;

[0025] 图 2:注射 LPS 后 24 小时组织学改变 (HE 200 $\times$)。后房内大量炎性细胞渗出 (箭头)。Lens:晶状体;i:虹膜;cor:角膜;cb:睫状体;

[0026] 图 3:注射 LPS 后 24 小时组织学改变 (HE 200 $\times$)。前房内大量炎性细胞浸润。Lens:晶状体;cor:角膜;

[0027] 图 4:注射 LPS 后 24 小时组织学改变 (HE 400×)。前房内大量炎性细胞渗出 (箭头)。ac:前房;cor:角膜;

[0028] 图 5:内毒素诱导的葡萄膜炎前房血性渗出,瞳孔区白色渗出;

[0029] 图 6:急性前葡萄膜炎前房积脓;

[0030] 图 7:前房、后房的炎性细胞浸润;

[0031] 图 8:不同方法诱导的前葡萄膜炎临床分级评分:其中 1 为 100 μ g 组:配方 1 腹腔注射 0.1ml;2 为 150 μ g 组:配方 1 腹腔注射 0.15ml;3 为 300 μ g 组:配方 1 腹腔注射 0.3ml;4 为 400 μ g 组:配方 1 腹腔注射 0.4ml;5 为 500 μ g 组:配方 1 腹腔注射 0.5ml;6 为 LPS+ 完全弗氏佐剂组:配方 2 腹腔注射 0.2ml;7 为 LPS+ 完全弗氏佐剂+百日咳杆菌组:腹腔注射配方 10.12ml,配方 3 腹腔注射 0.15ml;8 为正常对照组:腹腔灭菌生理盐水 0.2ml。

具体实施方式

[0032] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。

[0033] 实验例 1:

[0034] 1、实验药物:180-200g,6-8 周龄 SPF 级封闭群雄性 Wistar 大鼠,由北京维通利华实验动物技术有限公司中心提供。

[0035] 2、实验材料:霍乱弧菌内毒素 (LPS) 和百日咳杆菌溶液购自兰州生物制品研究所;完全弗氏佐剂 (FCA) 购自 Sigma, St. Louis, MO。

[0036] 3、实验分组:

[0037] 将大鼠随机分为 4 组,每组 6 只:

[0038] 其中 LPS 组:给予 200 μ g LPS 腹腔注射;

[0039] LPS+ 佐剂组:给予 200 μ g LPS 和弗氏完全佐剂 FCA 0.1ml 腹腔注射;

[0040] LPS+ 佐剂组+百日咳组:LPS 200 μ g+百日咳杆菌 2 μ g 腹腔注射,足垫部注射弗氏完全佐剂 0.06ml;

[0041] 正常对照组:腹腔注射灭菌生理盐水。

[0042] 4、实验方法:

[0043] 按照分组的要求注射相关药物。

[0044] 5、检测结果:每隔 2 小时进行裂隙灯显微镜检查,详细记录发病眼数、发病时间、高峰时间、疾病严重程度和疾病持续时间,对临床观察进行炎症分级,并行病理组织学观察,观察炎症细胞浸润及渗出情况。

[0045] 6、结果:

[0046] 6.1 炎症反应除正常对照组外,其余 3 组注射 LPS 后大鼠眼部均出现一系列临床可见的炎症反应,其症状 (见图 5:内毒素诱导的葡萄膜炎前房血性渗出,瞳孔区白色渗出。)与急性前葡萄膜炎的临床表现 (见图 6:急性前葡萄膜炎前房积脓。)一致。

[0047] 6.2 LPS 组大鼠常规切片 HE 染色病理学检查结果与临床表现一致。

[0048] 6.3 24 小时组织学检查可见角膜内皮后中性粒细胞团块状粘附;前房、后房均可见大量炎性细胞浸润及纤维蛋白性渗出;虹膜血管扩张,虹膜睫状体内有多数炎性细胞浸润,基质增厚,上皮细胞破坏,失去正常结构,玻璃体腔有少量炎症细胞 (如图 7 所示)。

[0049] 实验例 2

[0050] 1、实验药物：180-200g, 6-8 周龄 SPF 级封闭群雄性 Wistar 大鼠, 由北京维通利华实验动物技术有限公司中心提供。

[0051] 2、实验材料：霍乱弧菌内毒素 (LPS) 和百日咳杆菌溶液购自兰州生物制品研究所；完全弗氏佐剂 (FCA) 购自 Sigma, St. Louis, MO。

[0052] 3、实验分组：

[0053] 将 LPS 溶于灭菌生理盐水中, 分别配制成以下几种配方：

[0054] 配方 1 : 1mg/ml LPS 溶液 2ml ；

[0055] 配方 2 : 2mg/ml LPS 溶液 2ml + 完全弗氏佐剂 2ml ；

[0056] 配方 3 : 0.5mg/ml LPS 溶液 1ml + 百日咳杆菌溶液 12 μ l。

[0057] 按照分组分别对各组大鼠给予以下处理：

[0058] 1) LPS 组 : 配方 1 腹腔注射 0.2ml ；

[0059] 2) LPS + 完全弗氏佐剂组 : 配方 2 腹腔注射 0.2ml ；

[0060] 3) LPS + 完全弗氏佐剂 + 百日咳杆菌组 : 腹腔注射配方 10.12ml, 配方 3 腹腔注射 0.15ml ；

[0061] 4) 正常对照组 : 腹腔灭菌生理盐水 0.2ml。

[0062] 4、实验方法：

[0063] 按照分组的要求注射相关药物。

[0064] 5、监测指标：

[0065] 5.1 临床观察

[0066] 免疫大鼠后每隔 2 小时进行裂隙灯显微镜检查, 详细记录发病眼数、发病时间、高峰时间、疾病严重程度和疾病持续时间, 并根据 Lajavardi L 的标准对大鼠临床表现进行临床评价与记分, 其中：

[0067] 0 = 无炎症；

[0068] 1 = 轻度虹膜和结膜血管扩张；

[0069] 2 = 中度虹膜和结膜充血及中度前房闪辉；

[0070] 3 = 重度虹膜充血并前房闪辉；

[0071] 4 = 除严重虹膜充血前房闪辉外出现瞳孔区纤维素渗出。

[0072] 5.2 组织学检查

[0073] LPS 免疫大鼠后 24 小时过量戊巴比妥钠 (100mg/kg) 处死大鼠, 摘取眼球放置于福尔马林溶液中固定 24 小时, 固定后组织浸入 50% 乙醇溶液中 1 小时, 洗去固定液, 依次浸入 75%、80%、90%、100% 乙醇溶液中各脱水 1 小时, 二甲苯处理 30 分钟, 浸蜡 1 小时 $\times$ 3, 包埋, 切成 4 μ m 厚切片, 苏木素 - 伊红染色, 光镜下观察。

[0074] 6、结果

[0075] 6.1 临床观察

[0076] 除正常对照组外, 其余 3 组注射 LPS 后大鼠眼部均出现一系列临床可见的炎症反应, 其症状与急性前葡萄膜炎的临床表现一致。

[0077] LPS 注射后 4 小时开始出现结膜水肿, 睫状充血, 虹膜血管迂曲扩张。6-8 小时虹膜血管扩张更明显, 12-16 小时出现前房闪辉与细胞, 瞳孔缩小, 虹膜纹理模糊。随着时间推移, 这些临床表现逐渐加重, 22-24 小时所有 LPS 免疫大鼠均达到炎症反应的高峰, 表现为

瞳孔显著缩小,瞳孔缘处出现纤维素样渗出,甚至瞳孔膜闭,晶体前囊有灰白色絮状沉着物(见图1)。然后炎症开始逐渐减轻,第48小时前房纤维素样渗出部分吸收,但仍有前房闪辉。

[0078] 临床评分结果见表1:

[0079] 表1:LPS免疫大鼠后不同时间点的临床评分

[0080]

	LPS 组	LPS+ 佐剂组	LPS+ 佐剂 + 百日咳组	正常对照组
4h	0.67 ± 0.52	0.83 ± 0.41	0.83 ± 0.41	0 ± 0
8h	1.33 ± 0.82	1.5 ± 0.55	1.67 ± 0.52	0 ± 0
12h	2.33 ± 0.52	2.33 ± 0.52	2.17 ± 0.41	0 ± 0
18h	3.83 ± 0.41	3.5 ± 0.55	3.67 ± 0.52	0 ± 0
24h	4 ± 0	3.67 ± 0.52	4 ± 0	0 ± 0
36h	3.67 ± 0.52	3.5 ± 0.55	3.5 ± 0.55	0 ± 0
48h	3.17 ± 0.41	3.33 ± 0.52	3.17 ± 0.41	0 ± 0

[0081] 2、组织学改变

[0082] 具体见图2、3、4:

[0083] 图2显示:注射LPS后24小时组织学改变(HE 200 $\times$)。后房内大量炎性细胞渗出;

[0084] 图3显示:注射LPS后24小时组织学改变(HE 200 $\times$)。前房内大量炎性细胞浸润;

[0085] 图4显示:注射LPS后24小时组织学改变(HE 400 $\times$)。前房内大量炎性细胞渗出;

[0086] LPS组大鼠常规切片HE染色病理学检查结果与临床表现一致,均表现为显示前房内可见大量炎性细胞浸润及纤维蛋白性渗出,虹膜血管扩张,虹膜睫状体内有多数炎性细胞浸润,基质水肿增厚。

[0087] 实施例3:

[0088] 1、试验药物、材料和方法同实施例2

[0089] 2、实验分组中:

[0090] 1) 100 μ g 组:配方1腹腔注射0.1ml;

[0091] 2) 150 μ g 组:配方1腹腔注射0.15ml;

[0092] 3) 300 μ g 组:配方1腹腔注射0.3ml;

[0093] 4) 400 μ g 组:配方1腹腔注射0.4ml;

[0094] 5) 500 μ g 组:配方1腹腔注射0.5ml;

[0095] 6) LPS+ 完全佛氏佐剂组:配方2腹腔注射0.2ml;

[0096] 7) LPS+ 完全佛氏佐剂 + 百日咳杆菌组 : 腹腔注射配方 10. 12ml, 配方 3 腹腔注射 0. 15ml ;

[0097] 8) 正常对照组 : 腹腔灭菌生理盐水 0. 2ml。

[0098] 结果如图 8 所示 : 临床观察以上七组 (除对照组外) 不同方法诱导的前葡萄膜炎临床分级评分无明显差别。

[0099] 总结两个实验例可知 : 单纯用霍乱弧菌内毒素诱导大鼠葡萄膜炎, 且通过观察各组炎症程度, 结果显示三组之间炎症表现相似, 说明 LPS 不依赖于佐剂能单独诱导葡萄膜炎。

[0100] 虽然, 上文中已经用一般性说明、具体实施方式及试验, 对本发明作了详尽的描述, 但在本发明基础上, 可以对之作一些修改或改进, 这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此, 在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进, 均属于本发明要求保护的

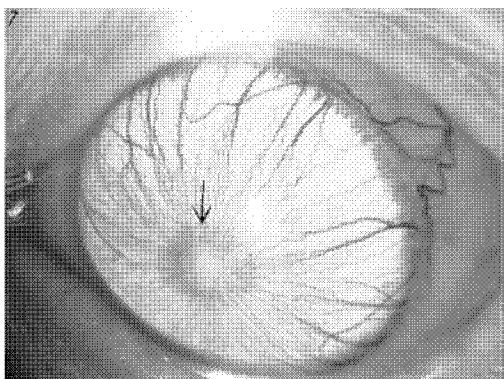


图 1

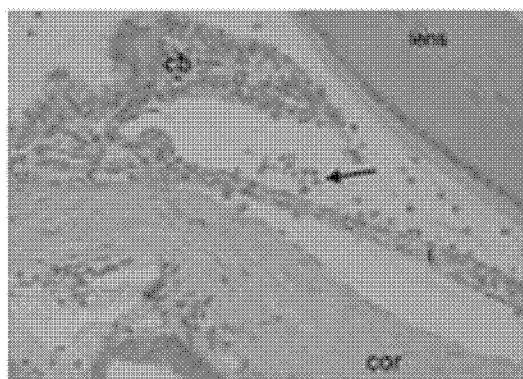


图 2

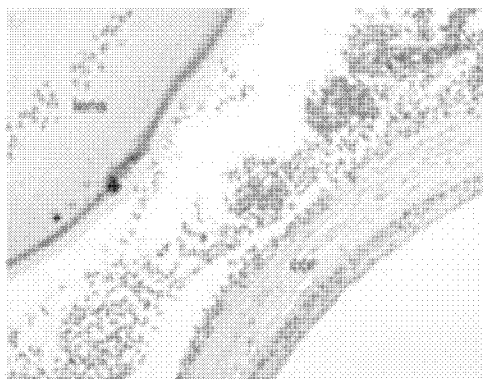


图 3

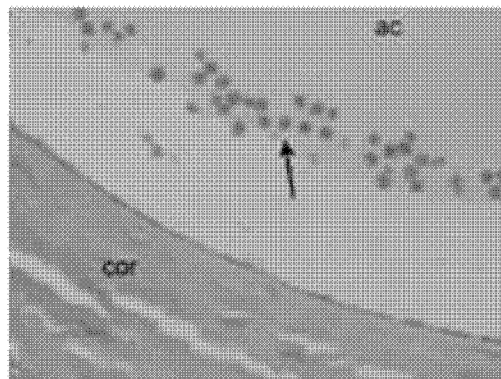


图 4

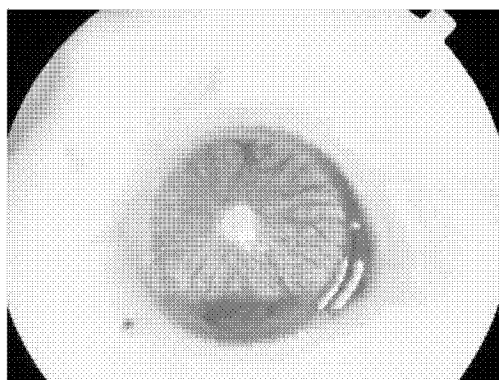


图 5

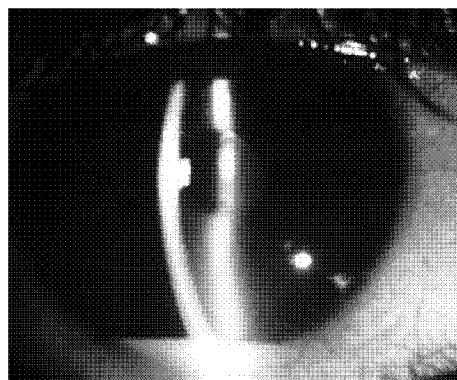


图 6

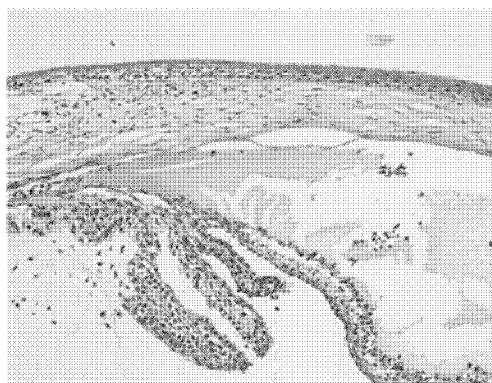


图 7

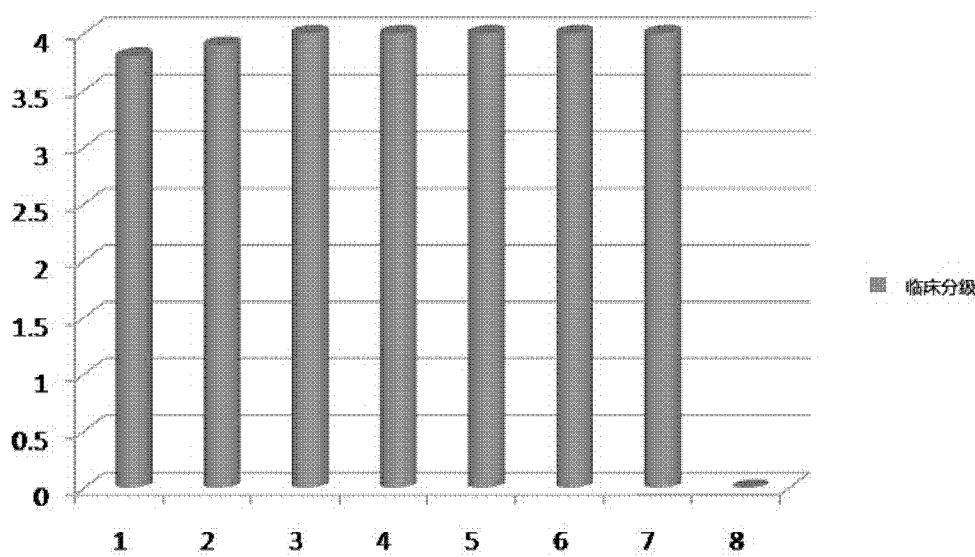


图 8