

大鼠免疫抑制长期模型的建立及验证^Δ

马盼盼*, 叶 军, 杨艳芳, 张 星, 王洪亮, 刘玉玲[#](中国医学科学院北京协和医学院药物研究所/药物传输技术及新型制剂北京市重点实验室, 北京 100050)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)15-2045-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.15.07

摘要 目的:建立可用于免疫调节剂长期(1个月)药效评价的大鼠免疫抑制长期模型并进行验证实验。方法:以Wistar大鼠为实验动物,以环磷酰胺(CTX)为诱导剂。将大鼠随机分为正常对照组、模型组和治疗组,每组5只。模型组大鼠以35 mg/kg的CTX连续腹腔注射3 d,之后以相同剂量每周腹腔注射1次进行加强诱导,共加强诱导3次,全程31 d;正常对照组大鼠不作任何处理;治疗组大鼠在模型组大鼠建模的基础上,于第3天建模后肌内注射胸腺五肽(TP5)注射液1 mg/kg,隔天注射1次至实验结束。观察整个实验周期内大鼠的精神状况和体质量变化,分别于第4、11、18、25、32天取血,测定外周血中CD4⁺/CD8⁺比值。实验结束后处死大鼠,测定其胸腺指数和脾指数。结果:与正常对照组比较,模型组大鼠精神状态较差,体质量增加较缓慢,各时间点的CD4⁺/CD8⁺比值和实验结束后的胸腺指数均明显降低,脾指数明显升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,治疗组大鼠精神状态和体质量增加速度均有所改善,第11、25、32天的CD4⁺/CD8⁺比值和实验结束后的胸腺指数均明显升高,脾指数明显降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论:成功建立大鼠免疫抑制长期模型,该模型免疫抑制程度适中,可用于免疫调节剂1个月内的药效评价。

关键词 免疫抑制;长期模型;环磷酰胺;胸腺五肽;免疫调节剂;药效学;大鼠

Establishment and Validation of Long-term Immunosuppressive Model in Rats

MA Panpan, YE Jun, YANG Yanfang, ZHANG Xing, WANG Hongliang, LIU Yuling (Institute of Materia Medical, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College/Beijing Key Lab of Drug Delivery Technology and Novel Formulations, Beijing 100050, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a long-term immunosuppressive rat model for immunomodulator long-term pharmacodynamic evaluation (1 month). METHODS: Wistar rats were selected as experimental animal and cyclophosphamide (CTX) was selected as an inducer. Rats were randomly divided into normal control group, model group and treatment group, with 5 rats in each group. Model group was given 35 mg/kg CTX intraperitoneally for consecutive 3 d, and then given same dose once a week to induce model, 3 times in total, for 31 d. Normal control group was not given any treatment. Treatment group was additionally given Thymopentin (TP5) injection 1 mg/kg at third day after modeling, every other day, till the end of experiment, on the basis of model group. The changes of mental status and body weight were observed during the whole experimental period. Blood samples were collected at 4th, 11th, 18th, 25th, 32th day, and CD4⁺/CD8⁺ ratio of peripheral blood was determined. Rats were sacrificed after experiment, and thymus index and spleen index were measured. RESULTS: Compared with normal control group, mental state of the rats in the model group was poor and the body weight increased slowly; CD4⁺/CD8⁺ ratio at different time points and thymus index after experiment were decreased significantly in model group, while spleen index increased significantly, with statistical significance ($P < 0.05$). Compared with model group, mental state of the rats and the increase of body weight were all improved in treatment group. CD4⁺/CD8⁺ ratio at 11th, 25th, 32th day and thymus index after experiment were increased significantly, while spleen index was decreased significantly, with statistical significance ($P < 0.05$). CONCLUSIONS: The long-term immunosuppressive rat model is established successfully. The immunosuppressive level of the model is middle, and it can be used for pharmacodynamic evaluation of immunomodulator within 1 month.

KEYWORDS Immunosuppression; Long-term model; Cyclophosphamide; Thymopentin; Immunomodulator; Pharmacodynamics; Rats

[9] 陈力,高守红,熊筱娟,等. HPLC法同时测定益心饮口服液液中6种成分的含量[J].中国药房,2016,27(9):1272-1274.

Δ 基金项目:北京市自然科学基金资助项目(No.7162135)

* 实习研究员,硕士。研究方向:蛋白多肽类微球。电话:010-83160332。E-mail:mapanpan@imm.ac.cn

通信作者:高级研究员,博士。研究方向:缓控释和肿瘤靶向制剂。电话:010-63159373。E-mail:ylliu@inn.ac.cn

[10] 温丽宏,石克,黄世琼,等. HPLC法同时测定参芪颗粒中3种异黄酮成分的含量[J].中国药房,2015,26(36):5155-5157.

[11] 吴小斌,王洛临,李洁环,等.三黄益肾方的纯化工艺研究[J].中国药房,2017,28(7):957-960.

(收稿日期:2017-12-12 修回日期:2018-04-08)

(编辑:刘 萍)

蛋白多肽类免疫调节剂可用于多种疾病的治疗,但治疗周期长,需长期频繁注射。为此,针对蛋白多肽类药物的长效制剂的研究备受关注。针对免疫调节剂长效制剂的药效学评价,目前还没有合适的动物模型。

常规免疫抑制模型的建立,常用方法是给予大鼠或小鼠特定剂量的诱导剂环磷酰胺(CTX)^[1-3]连续腹腔注射3 d诱导动物免疫功能低下,但动物通常在造模后2周内即可自行从免疫功能低下恢复至正常水平,因此,常规模型很难满足免疫调节剂长期给药或长效制剂的药效学评价需求。通过加大CTX的诱导剂量或增加给药频率,动物免疫抑制的时间将有所延长,但在已有研究中,一般仅在实验结束后的一个时间点对动物的免疫水平进行考察,未对造模过程中动物的免疫抑制状态的变化情况进行监测。

本文选择较大剂量的诱导剂CTX诱导并适时强化的造模策略,建立大鼠免疫抑制长期(拟定1个月)模型。并将模型组与正常对照组及胸腺五肽(TP5)注射液长期多次给药治疗组比较,以大鼠生长情况、免疫学指标CD4⁺/CD8⁺比值、胸腺指数和脾指数为指标监测造模周期内大鼠的免疫水平变化情况,进而评价免疫抑制长期模型的可行性。

1 材料

1.1 仪器

FACS Verse型流式细胞仪(美国BD Biosciences公司);1-14离心机(德国Sigma-Aldrich公司)。

1.2 药品与试剂

注射用CTX(美国Baxter公司,批号:6D108A,规格:0.2 g/支);TP5注射液(海南中和药业有限公司,批号:20161006,规格:1 mL:10 mg);异硫氰酸荧光素标记的鼠源CD3抗体(FITC anti-rat CD3)、藻红蛋白标记的鼠源CD4抗体(PE anti-rat CD4)和别藻青蛋白标记的鼠源CD8抗体(Alexa Fluor 647 anti-rat CD8a)(美国Biolegend公司,批号分别为:B233749、B201139、B214521);红细胞裂解液(美国BD Biosciences公司,批号:5356501,10倍稀释后使用);磷酸盐缓冲液(PBS,美国HyClone公司,批号:ABC211556);牛血清白蛋白(BSA,碧云天生物技术有限公司,批号:ST023,纯度:>98%);肝素钠(北京百灵威科技有限公司,批号:20070131,纯度:170 u/mg)。

1.3 动物

Wistar大鼠,SPF级,♂,体质量170~190 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物生产许可证号为:SCXK(京)2016-0011,动物合格证号:No.11400700-209934。本动物实验通过中国医学科学院中国协和医科大学药物研究所实验动物管理与动物福利委员会同意。

2 方法

2.1 分组

大鼠于动物房适应性饲养2 d后,随机分为正常对

照组、模型组和治疗组,每组5只。

2.2 建模

以35 mg/kg的剂量连续腹腔注射CTX 3 d,之后每周以相同剂量腹腔注射1次加强诱导,共加强诱导3次,建立免疫抑制长期模型。通过对比正常对照组和模型组的免疫水平,判断免疫抑制长期模型是否建立成功。此外,在建模基础上设立治疗组,于整个实验周期内多次给予TP5注射液,以期进一步考察免疫抑制长期模型大鼠经治疗后机体免疫水平的恢复情况,进而验证该模型是否可用于评价免疫调节剂的药效。

2.3 给药方案

正常对照组大鼠不作任何处理。模型组大鼠以建模第1天计,分别于第1、2、3、11、18、25天腹腔注射CTX,给药剂量为35 mg/kg。治疗组大鼠在模型组大鼠建模基础上,于建模第3天后开始肌内注射TP5注射液,给药剂量为1 mg/kg^[4],隔天注射1次至实验结束,共给药14次,实验周期全程32 d。

2.4 取血方案

以建模第1天计,分别于第4、11、18、25、32天(其中治疗组第4天为先取血后给予TP5注射液)采集大鼠眼底静脉丛外周血约0.3 mL,置于预先涂有肝素钠的离心管中,备用。

2.5 检测指标

2.5.1 生长情况 以建模第1天开始计,于第1、4天称量各组大鼠体质量,之后分别于加强诱导前1 d称量各组大鼠体质量,绘制整个实验周期内大鼠的体质量变化曲线,并观察整个实验周期内大鼠的精神状态。

2.5.2 免疫器官指数 于第32天取血后麻醉处死各组大鼠,取其胸腺和脾,将胸腺和脾组织周围的脂肪剔除,称质量。按公式计算免疫器官指数:免疫器官指数(mg/g)=脏器质量(mg)/体质量(g)。

2.5.3 外周血T淋巴细胞亚群CD4⁺/CD8⁺比值 取100 μL抗凝血于2 mL离心管中,加入1 mL红细胞裂解液,轻轻混匀,于室温孵育裂解10 min,期间不时轻轻振摇,待完全溶血后向离心管中加入0.5 mL含1% BSA的PBS,封闭,以300×g离心5 min,弃上清液,留下管底沉淀的细胞。按照上述步骤再重复裂解一次至红细胞裂解完全,加入1.5 mL PBS,与细胞混匀,300×g离心5 min,弃上清液,洗涤3次,以去除细胞碎片。再分别以200:1、80:1、50:1的比例于PBS中加入FITC anti-rat CD3、PE anti-rat CD4、Alexa Fluor 647 anti-rat CD8a抗体,混匀,取50 μL混合抗体溶液于离心管中,混匀,室温避光孵育30 min作为样品管。另设空白管和单染管。空白管不作处理,用于调节仪器电压,单染管中分别加入FITC anti-rat CD3、PE anti-rat CD4、Alexa Fluor 647 anti-rat CD8a单一抗体,用于调节仪器补偿,其他操作与样品管一致。每支离心管中加入1.5 mL PBS混匀,以300×g离心5 min,弃上清液,洗涤3次,以去除游离的抗

体。最后加入0.5 mL PBS,混匀,制成单细胞悬液样品,将样品过300目筛后上流式细胞仪测定CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ T淋巴细胞数量,计算CD4⁺/CD8⁺比值。

2.6 统计学方法

采用Excel 2010软件处理。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,3组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用*t*检验。*P*<0.05表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 生长情况

3.1.1 体质量 各组大鼠实验周期内的体质量变化曲线见图1。

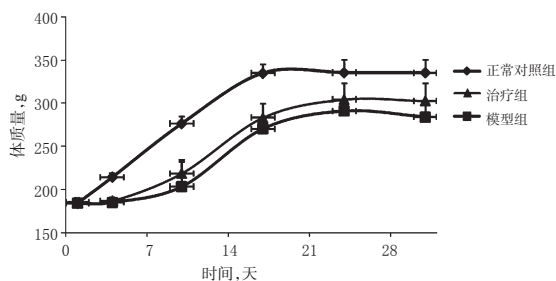


图1 各组大鼠实验周期内的体质量变化曲线

Fig 1 Body weight curve of rats in each group during experimental period

由图1可见,在整个实验周期内模型组大鼠体质量均比正常对照组大鼠低,且差异有统计学意义(*P*<0.05)。与模型组比较,治疗组大鼠的体质量稍高,但差异无统计学意义(*P*>0.05)。

3.1.2 精神状态 连续建模3 d后,模型组大鼠明显不如正常对照组大鼠活跃,且模型组大鼠精神不振,被抓取时挣脱不如正常对照组大鼠明显,挣脱力气明显减小。治疗组大鼠给予TP5注射液治疗1周后至实验结束,精神状态稍好于模型组,被抓取时能够明显感觉到治疗组大鼠的挣脱力气比模型组大,但是整体状态不如正常对照组大鼠活跃。

3.2 免疫器官

各组大鼠实验结束后的胸腺指数和脾指数测定结果见表1。

胸腺是重要的中枢免疫器官,随着免疫功能的降低或者年龄的增长,胸腺会逐渐萎缩,其质量可反映免疫功能的高低^[5-6]。由表1可以看出,模型组大鼠胸腺指数明显低于正常对照组大鼠,差异有统计学意义(*P*<0.05),这说明该建模条件下模型组大鼠免疫功能受到抑制。治疗组大鼠胸腺指数明显高于模型组大鼠,差异有统计学意义(*P*<0.05),这说明该模型大鼠的免疫功能经治疗后有所恢复,进一步说明了所建立的长期模型免疫抑制程度适中。

脾是机体最大的外周免疫器官^[5-6],受到免疫抑制影响时,淋巴组织萎缩,致脾体积缩小。由表1可以看出,

表1 各组大鼠实验结束后的胸腺指数和脾指数测定结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 1 Results of thymus index and spleen index of rats in each group after experiment ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	胸腺指数,mg/g	脾指数,mg/g
正常对照组	1.20±0.15	3.44±0.48
模型组	0.85±0.16*	7.67±1.97*
治疗组	1.31±0.31 [#]	4.99±0.59 [#]

注:与正常对照组比较,**P*<0.05;与模型组比较,[#]*P*<0.05

Note: vs. normal control group, **P*<0.05; vs. model group, [#]*P*<

0.05

模型组大鼠脾指数明显高于正常对照组大鼠,差异有统计学意义(*P*<0.05);治疗组大鼠脾指数明显低于模型组大鼠,差异有统计学意义(*P*<0.05)。该结果与理论不符,产生以上结果的原因可能是,大鼠脾受到免疫抑制的作用在2周后会逐渐消失,继而出现脾指数代偿性增高和脾肿大现象^[6]。

3.3 外周血T淋巴细胞亚群中CD4⁺/CD8⁺比值

各组大鼠不同时间点的CD4⁺/CD8⁺比值测定结果见表2。

表2 各组大鼠不同时间点的CD4⁺/CD8⁺比值测定结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 2 Results of CD4⁺/CD8⁺ ratio in rats in each group at different time points ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	第4天	第11天	第18天	第25天	第32天
正常对照组	6.21±0.54	7.37±0.55	9.13±0.68	5.99±1.10	11.74±1.91
模型组	4.31±0.23**	3.36±0.08**	5.83±0.87**	3.19±0.21*	3.93±0.49**
治疗组	4.31±0.11**	5.83±1.27 [#]	7.26±2.21 [#]	4.15±0.11 ^{###}	6.63±0.28 ^{###}

注:与正常对照组比较,**P*<0.05,***P*<0.01;与模型组比较,[#]*P*<0.05,^{###}*P*<0.01

Note: vs. normal control group, **P*<0.05, ***P*<0.01; vs. model group, [#]*P*<0.05, ^{###}*P*<0.01

由表2可以看出,与正常对照组比较,在整个实验周期内模型组大鼠的CD4⁺/CD8⁺比值均显著降低,差异有统计学意义(*P*<0.05或*P*<0.01),这说明该建模方案可使大鼠在实验周期内维持稳定的免疫抑制状态,免疫抑制长期模型建立成功。治疗组大鼠在给予TP5注射液治疗后CD4⁺/CD8⁺比值明显高于模型组,差异有统计学意义(*P*<0.05),提示该模型对大鼠的免疫抑制程度适中,使用免疫调节剂可使大鼠免疫抑制状态有所恢复。

从以上指标可以看出,大鼠连续腹腔注射CTX 3 d后,其免疫功能明显下降,通过之后的加强诱导,2周后的大鼠仍处于免疫功能低下的状态,对其给予免疫调节剂TP5注射液进行治疗后,大鼠的免疫功能有所恢复。

4 讨论

T淋巴细胞是构成机体免疫防御系统的重要成分,T淋巴细胞有2个主要亚群,即CD4⁺ T淋巴细胞和CD8⁺ T淋巴细胞。在正常情况下,CD4⁺ T淋巴细胞和CD8⁺ T

淋巴细胞在体内维持着稳定的比例,处于平衡状态,共同参与机体的免疫应答。 $CD4^+/CD8^+$ 比值是重要的免疫状态检测指标,可反映机体免疫水平的高低,比值降低说明细胞免疫功能下降^[8-10]。采用流式细胞仪先测定 $CD3^+$ T淋巴细胞, $CD3^+$ T淋巴细胞代表总的T淋巴细胞,再测定 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T淋巴细胞数量(先测定 $CD3^+$ T淋巴细胞可避免直接测定的 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T淋巴细胞中包含有假阳性的 $CD3^+$ T淋巴细胞,从而使 $CD4^+/CD8^+$ 比值更准确),计算 $CD4^+/CD8^+$ 比值,评价机体的免疫功能。

TP5是一种疗效确切、安全性好的双向免疫调节剂^[11-12],临床使用的制剂形式有TP5注射液和TP5注射用冻干粉,疗程3~24个月不等^[13]。郝华珍等^[4]以聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)为材料制备的TP5/PLGA长效微球取得了良好进展,大鼠药动学考察结果表明,TP5/PLGA长效微球的释药周期可达1~2个月,但现有常规免疫抑制模型不能满足其免疫药效学的评价需求。

关于常规免疫抑制模型,有研究^[14-15]报道采用大鼠为实验动物,以35 mg/kg剂量连续腹腔注射CTX 3 d诱导建立免疫抑制模型,在建模3 d结束后开始单次或多次给予TP5制剂,给药7 d后结束实验,以 $CD4^+/CD8^+$ 比值、胸腺指数、脾指数等指标的变化,考察了TP5的免疫调节作用。

通过加大CTX的诱导剂量或给药频率,动物免疫抑制的时间将有所延长,但如果剂量或给药频率掌握不合理,会导致动物死亡。杨颖等^[16]对小鼠免疫抑制的长期模型进行了研究,以外周血T淋巴细胞和自然杀伤细胞为指标,探讨了小剂量每天建模(每天腹腔注射CTX 40 mg/kg,连续30 d)和较大剂量建模适时强化(每天腹腔注射CTX 80 mg/kg,连续3 d,之后每周强化1次)对小鼠免疫功能的影响,于30 d实验结束后检测相应的指标。结果表明,建模30 d时小鼠仍可处于免疫功能低下状态。但该文献仅对建模结束后的一个时间点进行了研究,未对建模过程中小鼠的免疫抑制状态的变化情况进行监测。

本文针对免疫调节剂长效微球的药效学评价需求,在参考文献的基础上,确定合理的CTX诱导剂量范围,选择较大剂量CTX诱导并适时强化的建模策略,建立大鼠免疫抑制长期(1个月)模型。CTX给药剂量的选择参考文献^[14-15]中建立常规免疫抑制模型时的给药剂量即每日35 mg/kg,并适时加强诱导。

本研究结果表明,以35 mg/kg的给药剂量连续腹腔注射CTX 3 d,之后每周以35 mg/kg的给药剂量腹腔注射1次加强诱导,共加强诱导3次,可建立免疫抑制长期(1个月)模型。本文所建立的免疫抑制长期模型可为免疫调节剂的长期给药或免疫长效制剂的免疫功能评价提供具有参考价值的药效学模型。

参考文献

- [1] 钟金凤,方热军.环磷酰胺免疫抑制机制及在动物模型上的应用[J].中国免疫学杂志,2016,32(10):1541-1546.
- [2] 刘长江,叶亚龙,孙凤祥,等.环磷酰胺诱导小鼠免疫功能低下模型建立与评价[J].潍坊医学院学报,2015,37(1):4-6.
- [3] 张俊,YONG-SEONG SHIN,胡安君,等.环磷酰胺致大鼠免疫抑制和免疫亢进模型的建立与评价[J].中国实验动物学报,2015,23(4):395-400.
- [4] 郝华珍,王洪亮,刘玉玲.胸腺五肽聚乳酸-羟基乙酸共聚物长效微球在大鼠体内的药动学研究[J].中国药房,2014,25(33):3100-3103.
- [5] RAJ S, GOTHANDAM KM. Immunomodulatory activity of methanolic extract of *Amorphophallus commutatus* var. *Wayanadensis* under normal and cyclophosphamide induced immunosuppressive conditions in mice models[J]. *Food Chem Toxicol*, 2015. DOI: 10.1016/j.fct.2015.04.026.
- [6] 汪婷婷,张卫平,中国明,等.黄芪建中汤对脾气虚证大鼠 Leptin-NPY/VIP/GAS 信号传导通路及胸腺指数、脾指数的影响[J].辽宁中医药大学学报,2015. DOI: 10.13194/j.issn.1673-842x.2015.12.010.
- [7] 包汇慧,耿雪,贾旭东,等.环磷酰胺对大鼠脾细胞抑制作用的研究[J].毒理学杂志,2014. DOI: 10.16421/j.cnki.1002-3127.2014.03.022.
- [8] 严健. $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T淋巴亚细胞亚群在肿瘤患者外周血中检测的临床意义[J].检验医学,2013,10(28):901-903.
- [9] DIEDERICHSEN AC, HJELMBORG JV, CHRISTENSEN PB. Prognostic value of the $CD4^+/CD8^+$ ratio of tumour infiltrating lymphocytes in colorectal cancer and HLA-DR expression on tumour cells[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2003,52(2):423-428.
- [10] 曹雪涛.医学免疫学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2015:197-250.
- [11] SIEMION IZ, KLUCZYK A, CEBRAT M. The peptide molecular links between the central nervous and the immune systems[J]. *Amino Acids*, 2005,29(3):161-176.
- [12] 薄剑,赵瑜,李红华,等.胸腺五肽在白血病患者治疗过程中免疫调节方面的临床研究[J].解放军药学报,2008,24(2):142-144.
- [13] 左朋飞,韩香,刘璐.胸腺五肽的合成及临床应用进展[J].天津药学,2008,20(1):53-57.
- [14] 高静.胸腺五肽肺部吸入粉雾剂的研制及其药效学研究[D].上海:第二军医大学,2005.
- [15] 李晗.胸腺五肽干粉吸入剂的研究[D].北京:军事医学科学院,2014.
- [16] 杨颖,蔡玟,黄志彪,等.环磷酰胺致小鼠免疫功能低下模型建立与评价[J].中国公共卫生,2008,24(5):581-583.

(收稿日期:2018-03-02 修回日期:2018-05-14)

(编辑:邹丽娟)