

[文章编号] 1000- 4718(2005)02- 0414- 03

# 实验性变态反应性脑脊髓炎大鼠模型的复制\*

李 勇<sup>1</sup>, 郑荣远<sup>2</sup>, 李剑敏<sup>3</sup>, 王小同<sup>1</sup>, 邵 蓓<sup>2</sup>, 金 嵘<sup>2</sup>, 杨学志<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>温州医学院第二附属医院神经内科, 温州医学院第一附属医院 <sup>2</sup>神经内科, <sup>3</sup>病理科, 浙江 温州 325000)

**[摘 要]** 目的: 观察不同的遗传背景(远交系和近交系)和饲养环境对 Wistar 大鼠实验性变态反应性脑脊髓炎(EAE)发病率的影响, 摸索 EAE 模型制作的实验方法与技术。方法: 采用动物行为学、常规 HE 和 LFB 染色方法, 观察不同的遗传背景和饲养环境下豚鼠全脊髓匀浆诱导大鼠 EAE 的发病情况与中枢神经系统(CNS)的病理变化。结果: (1) 动物行为学的改变: 各组大鼠 EAE 发病率、潜伏期和症状评分无显著差异, 但近交系组发病大鼠可出现四肢瘫痪。(2) 病理学改变: 每组发病大鼠 CNS 内可见不同程度的炎性细胞浸润; 髓鞘染色可见广泛的神经髓鞘变性、脱失; 而其中近交系组的 5 只 EAE 大鼠髓鞘脱失部位大多局限在炎症改变明显的血管套周围的白质区。结论: 远交系与近交系, 或清洁级与普通级的 Wistar 大鼠的 EAE 的发病率无明显差异, 而远交系与近交系的不同遗传背景可能会影响大鼠 EAE 的体征和病理表现。

**[关键词]** 脑脊髓炎, 实验性自身免疫性; 动物模型; 遗传学

**[KEY WORDS]** Encephalomyelitis, experimental autoimmune; Animal model; Genetics

**[中图分类号]** R363 **[文献标识码]** A

大鼠实验性变态反应性脑脊髓炎(experimental allergic encephalomyelitis, EAE)是急性播散性脑脊髓炎(acute disseminated encephalomyelitis, ADEM)经典的动物模型。目前国内成功建立了 Wistar 大鼠 EAE, 但报道的 EAE 发病率差异较大<sup>[1,2]</sup>。本实验采用动物行为学、常规 HE 和 LFB 染色观察动物的发病情况与中枢神经系统(CNS)的病理变化, 观察不同的遗传背景(远交系和近交系)和饲养环境对 Wistar 大鼠 EAE 发病率的影响。

## 材 料 和 方 法

### 1 动物和药品

Wistar 大鼠, 雌性, 7- 8 周龄, 150- 190 g, 上海医科大学实验动物部提供近交系的清洁级 10 只和普通级(清洁级大鼠转移到开放环境饲养 7 d)20 只; 河北省实验动物中心提供远交系的普通级 10 只。8- 9 周龄豚鼠 10 只, 雌雄不拘, 300- 400 g, 由上海医科大学实验动物部提供。卡介苗(bacillus calmette- guerin, BCG)和百日咳疫苗(bordetella pertussis vaccine, BPV)购自卫生部上海生物制品研究所, 羊毛脂和液体石蜡购自中国医药(集团)上海化学试剂公司。

### 2 完全福氏佐剂(complete Freund adjuvant, CFA)的配制

将羊毛脂和液体石蜡按 1: 2(体积)的比例混合共热至 70℃熔融混匀, 配成不完全福氏佐剂(incomplete Freund adjuvant, IFA)。临用前每毫升 IFA 加入 BCG 10 mg 混匀制成 CFA。

### 3 豚鼠全脊髓匀浆- 完全福氏佐剂的配制

豚鼠处死后, 迅速取出脊髓, 用生理盐水制成 50%(重量/体积)的豚鼠全脊髓匀浆(spinal cords homogenate of guinea pig, GPSCH), 再与等量的 CFA 混匀后制成油包水型乳剂。

### 4 动物分组和诱导方法

大鼠分为 4 组, 每组 10 只: A 组为清洁级(上海)组; B 组为普通级(上海)组; C 组为普通级(上海)+ BPV 组; D 组为普通级(河北)组。每只大鼠脚垫皮下注射 0.4 mL 由 GPSCH 和 CFA 配成的抗原乳剂, C 组每只大鼠在脚垫皮下注射抗原乳剂的同时, 皮下加注 BPV 0.25 mL。

### 5 神经症状评分

参考有关标准进行症状评分<sup>[3]</sup>: 0 分: 无明显异常; 1 分: 尾巴无力; 2 分: 后肢无力; 3 分: 后肢麻痹; 4 分: 四肢麻痹或死亡。

### 6 病理组织学观察

动物麻醉后断头处死, 取出脑组织, 4% 多聚甲醛固定; 同时颈、胸、腰椎各取一段放入 4% 多聚甲醛固定后, 再分离出颈、胸、腰髓, 取脊髓的横断面和纵切面与固定好的脑组织进行常规石蜡包埋, 每隔 20 μm 间断性连续切片, 同时进行常规 Hematoxylin- eosin(HE)染色(切片厚 5 μm)和 luxol fast blue(LFB)髓鞘染色(切片厚 10 μm)。观察脑与脊髓的病理变化。

**6.1 HE 染色** 取切片脱蜡和脱水, 苏木素染色, 盐酸乙醇分化, 氨水反蓝, 伊红复染; 梯度乙醇脱水; 二甲苯透明; 中性树脂固封。

**6.2 LFB 髓鞘染色** 取切片石蜡行脱蜡、脱水, 然后固蓝染色烤片, 碳酸锂和乙醇风化至灰白界线分明为止, 自来水洗至不再褪色; 然后再用苏木素染色, 以下步骤同 HE 染色。

### 7 统计学处理

发病潜伏期和症状评分以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 采

[收稿日期] 2003- 12- 23 [修回日期] 2004- 03- 21

\* [基金项目] 浙江省重点学科基金资助项目(No. xxf 99005)

E- mail: lywilson@163.com

用单因素方差分析,与同一对照组比较采用 Dunnet' *t* 检验,发病率的比较采用  $\chi^2$  检验。

## 结 果

### 1 动物行为学的改变

A 组 B 组和 C 组的发病大鼠从免疫后第 10 d 开始,相继出现食欲不振、活动减少、体重下降、尾巴无力、松弛、下垂、麻痹;步履蹒跚、后肢无力、麻痹等症状。但 D 组发病大鼠从免疫后第 12 d 开始,相继出现上述症状,在此期间 4/5 发病大鼠症状可进一步加重,出现四肢麻痹,甚至濒死状态。症状均可自行缓解,且缓解过程非常迅速(图 1.2)。各组大鼠 EAE 发病率及潜伏期见表 1,行为学改变评分值见表 2。

### 2 病理组织学改变

每组 EAE 发病大鼠 CNS 内可见不同程度的炎性细胞浸润,主要表现为血管套形成,室管膜和室管膜下炎性细胞浸润、噬神经现象;神经细胞肿胀、变性、坏死;胶质细胞增生、小结形成等(图 3.4)。髓鞘染色发现广泛的神经髓鞘变性、脱失,但轴突相对完整,以脊髓、小脑和脑干等为著;而其中 D 组的 5 只 EAE 大鼠髓鞘脱失部位大多局限在炎症改变明显

的血管套周围的白质区(图 5.6)。

表 1 不同组别 Wistar 大鼠 EAE 的发病情况

Tab 1 The incidence of EAE in Wistar rats in different group ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

| Group | Latency (dpi)             | Incidence |
|-------|---------------------------|-----------|
| A     | 12.60 ± 1.52              | 3/10      |
| B     | 13.60 ± 1.14              | 5/10*     |
| C     | 12.60 ± 1.14 <sup>▲</sup> | 5/10      |
| D     | 14.80 ± 1.09 <sup>▲</sup> | 5/10      |

Dpi: days post-immunization; \*  $P > 0.05$  vs A; <sup>▲</sup>  $P > 0.05$  vs B.

表 2 不同组别 Wistar 大鼠 EAE 临床高峰期的症状观察

Tab 2 The mean clinical score of EAE in Wistar rats in different group at the peak stage ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

| Group | Incidence | 16 dpi                   | 18 dpi                   |
|-------|-----------|--------------------------|--------------------------|
| A     | 3/10      | 2.33 ± 1.15              |                          |
| B     | 5/10      | 2.40 ± 0.89              |                          |
| C     | 5/10      | 2.20 ± 1.09 <sup>▲</sup> |                          |
| D     | 5/10      |                          | 2.50 ± 1.51 <sup>▲</sup> |

<sup>▲</sup>  $P > 0.05$  vs B.



Fig 1 Rat with EAE: tail paralysis.

图 1 EAE 大鼠:尾巴麻痹

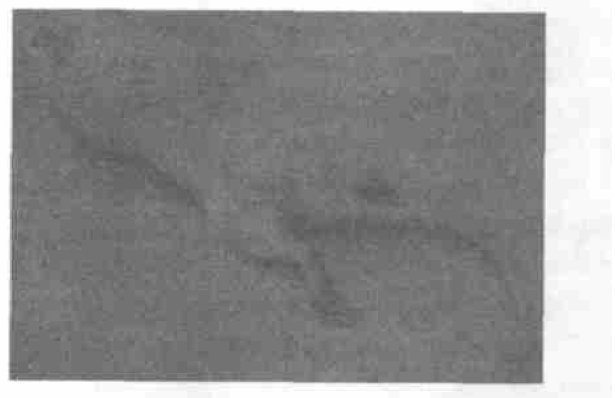


Fig 2 Rat with EAE: both hind leg paralysis.

图 2 EAE 大鼠:双后肢麻痹

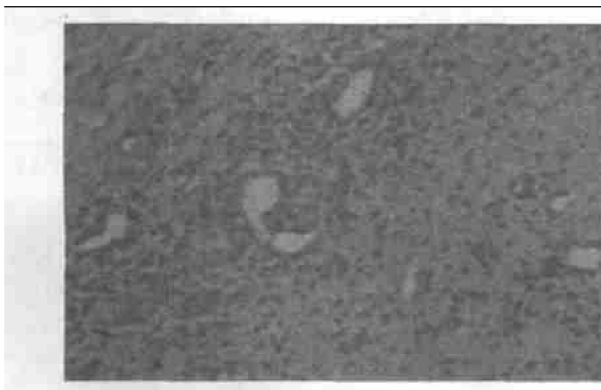


Fig 3 Cervical of rat with EAE: stained by HE, infiltration and perivascular cuffing with mononuclear cell ( $\times 200$ ).

图 3 EAE 大鼠颈髓 HE 染色,大量炎症细胞浸润,血管套形成

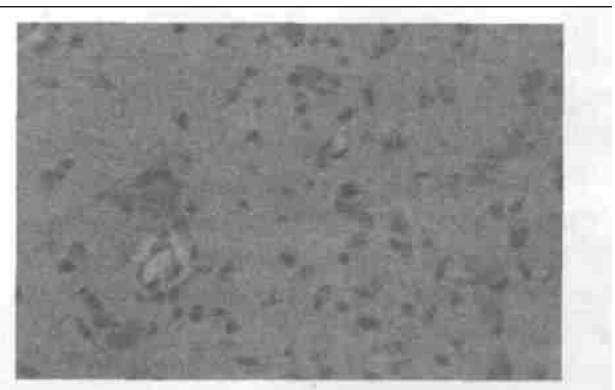


Fig 4 Cervical of rat with EAE: stained by HE, infiltration with mononuclear cell, necrosis of neuron ( $\times 400$ ).

图 4 EAE 大鼠颈髓 HE 染色,炎症细胞浸润,噬神经现象,神经细胞坏死

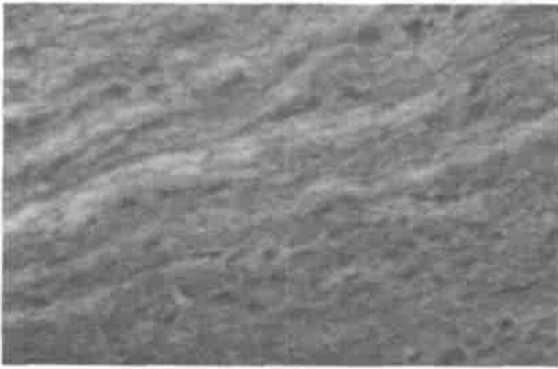


Fig 5 Cervical of rat with EAE: stained by LFB, extensive demyelinating sheaths or foci ( × 200 ).

图 5 EAE 大鼠颈髓 luxol fast blue 髓鞘染色



Fig 6 Cerebellum of rat with EAE: stained by LFB, demyelinating around perivascular cuffing with mononuclear cell ( × 100 ).

图 6 EAE 大鼠小脑 luxol fast blue 髓鞘染色

### 讨 论

目前,曹翠丽等<sup>[1]</sup>和邢清和等<sup>[2]</sup>已成功建立了对 EAE 相对敏感 Wistar 大鼠 EAE 模型,但所报道 Wistar 大鼠对 EAE 敏感性差别很大,实验结果的差别可能与 Wistar 大鼠的不同遗传背景和饲养环境有关,也可能与研究者采用不同的实验方法和技术有关。但本实验未发现不同组别的大鼠,不管是远交系与近交系,清洁级与普通级,它们在 EAE 发病率上呈显著差异,而在体征与病理表现上有所不同,这与邢清和等<sup>[2]</sup>报道 GPSCH- CFA 诱导 Wistar 大鼠 EAE 发病率和病理变化的结果相似;与曹翠丽等<sup>[1]</sup>报道的远交系 Wistar 大鼠 EAE 体征四肢麻痹结果相似。

Hartung 等<sup>[4]</sup>认为,影响 EAE 发病的多种因素包括食物、药物和感染等,如果在环境中剔除这些诱发因素,在相同的条件下致敏,同种系大鼠清洁级的较普通级的 EAE 发病率就低,制作 EAE 模型选用普通级动物即可。

与曹翠丽等<sup>[1]</sup>报道用 BCG 原浆制成 CFA 不同,本实验采用冻干的 BCG 来代替强毒人型结核杆菌,自行制成 CFA,并与 GPSCH 混合而成抗原乳剂,成功建立了 Wistar 大鼠 EAE 模型。CFA 除了有佐剂生物学作用外,它还可能对血脑屏障 (blood brain barrier, BBB) 有破坏作用<sup>[5]</sup>。在实验中表明,CFA 不宜太粘稠,否则在制备免疫抗原时,阻力大,不易混匀,接种时易堵针和跑针,使接种的抗原量不充分,可能会导致大鼠 EAE 的发病率下降。而且 GPSCH 一定要新鲜制备,应于当天使用,否则抗原的有效成分降解,也可能导致 EAE 诱发的失败。EAE 作为多发性硬化的经典动物模型,现已被公认,它是由针对 CNS 髓鞘发生免疫攻击的 T 细胞介导的自身免疫过程。BPV 作为免疫促进剂可以增强细胞和体液免疫功

能,刺激 T 细胞增殖,增强抗原的免疫原性,加速诱导免疫应答,提高免疫水平,对 EAE 有明显的促发作用<sup>[2]</sup>。但本实验未发现 BPV 有此作用,这可能与我们的实验选用的 BPV 质量 (保存条件不适) 有关。

总之,以 GPSCH- CFA 可成功诱发 Wistar 大鼠的 EAE 模型,具有 EAE 典型的临床表现和组织学改变,但远交系与近交系,或清洁级与普通级的 Wistar 大鼠 EAE 的发病率无显著差别影响,远交系和近交系的 Wistar 大鼠 EAE 的体征和 CNS 病理学改变有差异,因此应根据实验需要选择不同遗传背景的大鼠。

### [参 考 文 献]

- [ 1 ] 曹翠丽,王 惠,马常升,等. 实验性变态反应性脑脊髓炎模型的建立[J]. 解剖学杂志, 2001, 24(1): 77- 80.
- [ 2 ] 邢清和,郑荣远,王永铭,等. Wistar 大鼠过敏性脑脊髓炎模型的建立[J]. 上海医科大学学报, 2000, 27(6): 471- 473.
- [ 3 ] Degano AL, Bucher AE, Roth GA, et al. Suppression of acute experimental allergic encephalomyelitis by intraperitoneal administration of synatosomal antigens [ J ]. J Neurosci Res, 1998, 53(2): 187- 193.
- [ 4 ] Hartung HP, Rieckmann P. Pathogenesis of immune- mediated demyelination in the CNS [ J ]. J Neural Transm Suppl, 1997, 50(2): 173- 181.
- [ 5 ] Namer IJ, Steibel J. Antibody directed against mannan of the mycobacterium tuberculosis cell envelope provokes blood- brain barrier breakdown [ J ]. J Neuroimmunol, 2000, 103 (1): 63- 68.