

研究报告

大鼠腰椎腹侧神经根牵拉模型的建立

刘吉宏^{1,2}, 葛立军², 陈焱², 张勇², 陆嘉琦², 刘爱莲², 李宁², 孙怀昌¹, 王建飞^{1,2,*}

(1. 扬州大学兽医学院, 扬州 225009; 2. 葛兰素史克(上海)医药研发有限公司, 整合生物科技平台, 上海 201203)

【摘要】 目的 为了研究肌萎缩侧索硬化症致病机理和药物研发, 建立第4腰椎腹侧神经根牵拉大鼠模型, 并用脑源性神经营养因子作为阳性药物进行模型的有效性验证。**方法** 首先对5只SD雄性大鼠进行手术, 一周后用抗胆碱乙酰转移酶抗体进行免疫组织化学染色观察脊髓前角运动神经元数量的变化; 预实验证明手术模型成功后, 将40只7周龄SD雄性大鼠随机分为四组, 两组模型对照组及两个脑源性神经营养因子治疗组(手术后立刻预防性给药组和手术后一周治疗性给药组)。使用抗胆碱乙酰转移酶免疫组织化学染色观察运动神经元数量的变化。**结果** 大鼠手术后恢复良好, 临床观察无异常。染色结果证明手术牵拉后, 造成明显的脊髓前角运动神经元变性死亡。与对照组相比, 用脑源性神经营养因子治疗的神经根牵拉动物, 不管是预防性给药还是手术1周后再进行治疗性给药都达到了良好的治疗效果, 胆碱乙酰转移酶染色阳性神经元细胞数量显著增加($P < 0.0001$), 结果分别为17.85%比93.06%; 26.6%比87.27%。**结论** 成功的建立大鼠第4腰椎腹侧神经根牵拉模型, 为肌萎缩侧索硬化症的研究提供了一种有价值的动物模型。

【关键词】 神经根牵拉; 脑源性神经因子; 肌萎缩侧索硬化症; 大鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2018) 01-0101-06

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2018.01.016

Establishment of a rat model of lumbar spinal root avulsion

LIU Jihong^{1,2}, GE Lijun², CHEN Yan², ZHANG Yong², LU Jiaqi², LIU Ailian², LI Ning²,
SUN Huaichang¹, WANG Jianfei^{1,2,*}

(1. College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225001, China. 2. Integrated Biological Science Platform, GlaxoSmithKline (China) R&D Co. Ltd., Shanghai 201203)

Corresponding author: WANG Jian-fei. E-mail: jianfei.j.wang@gsk.com

【Abstract】 Objective To establish a rat model of spinal root avulsion and to validate the model by brain-derived neurotrophic factor (BDNF) treatment. **Methods** To evaluate the motor neuron loss, 5 male SD rats were used to undergo spinal root avulsion surgery. One week later, the number of motor neurons in the ventral horn of the spinal cord was assessed by histopathology using immunohistochemical staining with a choline acetyl transferase (ChAT) antibody. After this pilot study, 40 male SD rats at 7 weeks of age were randomly divided into 4 groups: two control groups, BDNF preventive and treatment groups. **Results** All rats recovered well post-surgery and no obvious abnormality was observed. Compared with the contralateral side, the number of motor neurons in the ipsilateral avulsed side was significantly decreased at one week after surgery (20.06%, $P < 0.05$). Compared with the control group, there was a significant increase in ChAT positive neurons in the BDNF preventive group (17.85% vs. 93.06%, $P < 0.0001$) or BDNF treatment group (1 week after surgery) (26.94% vs. 86.87%, $P < 0.0001$), indicating that the motor neurons were effectively protected by BDNF. **Conclusions** A rat model of spinal root avulsion is successfully established, which can be valuable for studies of amyotro-

[作者简介] 刘吉宏(1982-), 男, 博士研究生, 研究方向: 实验动物兽医。E-mail: jsyzljh@163.com

[通信作者] 王建飞(1964-), 男, 博士, 研究方向: 实验动物比较医学及分子生物学。E-mail: jianfei.j.wang@gsk.com。

phic lateral sclerosis and drug discovery efforts.

【Key words】 spinal root avulsion; brain-derived neurotrophic factor; BDNF; amyotrophic lateral sclerosis; rats

Conflict of interest statement: We declare that we have no conflict of interest statement.

肌萎缩侧索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 是一种进行性致死性神经系统变性疾病、选择性累及脊髓前角细胞和大脑神经皮质运动神经元^[1]。患者常因呼吸困难、肺部感染、全身衰竭而死亡。全球每 90 min 就有一名 ALS 患者去世,被列为五大绝症之一^[2-3]。关于 ALS 疾病的啮齿类动物模型目前主要是利用转基因技术生产一些特定位点突变的转基因动物模型,如: *SOD1* 转基因小鼠、*TDP-43* 转基因小鼠, *Wobbler* 基因突变模型等,用于药物筛选^[4-8]。脑源性神经营养因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF) 是在脑内合成的一种蛋白质,它广泛分布于中枢神经系统内,在中枢神经系统发育过程中,对神经元的存活、分化、生长发育起重要作用,并能防止神经元受损伤死亡、改善神经元的病理状态、促进受损伤神经元再生及分化等生物效应,而且也是成熟的中枢及周围神经系统的神经元维持生存及正常生理功能所必需^[9-13]。然而,转基因动物因在动物发病过程,基因拷贝数目容易改变,不同性别发病过程不一等方面的原因,给科学研究及药物测试带来很大的困扰^[14]。本文介绍一种手术诱导 ALS 大鼠模型,腹侧神经根牵拉 (spinal root avulsion, SRA) 模型,并用 BDNF 治疗以验证模型的重复性和可靠性。SRA 模型是脊柱外牵拉不同位置神经根的一种轴索显微外科术的动物模型,主要引起脊髓腹前角中运动神经细胞由于缺少神经营养因子而变性死亡^[15-19]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 SD 雄性大鼠 45 只,体重 180 ~ 200 g, 6 周龄,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司【SCXK(沪) 2013-0016】。手术及动物的饲养于上海西普尔-必凯实验动物设施内进行【SYXK(沪) 2013-0058】。采用常规大鼠饲料喂养, IVC 饲养, 自由活动和饮食。动物饲养室 12 h/12 h 昼夜交替, 温度为 (21 ± 1) °C。本实验所有操作均符合中华人民共和国《实验动物管理条例》, 并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀, 实验方案通过了葛兰素史克(上海)医药研发有限公司机构动物饲养管

理和使用委员会 (Institute of Animal Care and Use Committee, IACUC) 审查批准, 批准号为 AUP0091。

1.1.2 试剂与仪器

莱卡实体显微镜 (M651), VMR 小动物专用吸入麻醉机 (Matrs VMR-VIP 3000), 异氟烷 (深圳市瑞沃德生命科技有限公司), 福尼辛葡甲胺 (镇痛剂, 齐鲁动物保健品有限公司), 水浴恒温 T-pump (Gaymar-TP 650), MRE025 导管 (美国 Braintree 科学公司)。微型泵 Mini-pump 2002 (Alzet 2002 minipump), human BDNF (Novoprotein, Lot: E20130422B)。

1.2 实验方法

1.2.1 模型的建立

SPF 级 SD 雄性大鼠 5 只, 行脊髓腹侧神经根牵拉后, 1 周安乐死大鼠, 取出脊髓第 3 ~ 6 腰段进行组织处理和抗胆碱乙酰转移酶 (choline acetyl transferase, ChAT) 抗体染色分析。

1.2.2 用 BDNF 治疗

SPF 级 SD 雄性大鼠 40 只, 随机分为 4 组, 每组 10 只: 分别为预防对照组、预防给药组、术后 1 周给药对照组、术后 1 周给药治疗组。大鼠进行脊髓腹侧神经根牵拉后, 分别于手术立刻或手术 1 周后用 BDNF (12 µg/d) 治疗 (将 BDNF 于使用前 1 d 装入微型泵, 过夜平衡以备用) 2 周, 对照组用 PBS。治疗 2 周后取材, 动物麻醉后使用生理盐水和 4% 的多聚甲醛 (paraformaldehyde, PFA) 灌注, 取出脊髓第 3 ~ 6 腰段进行 ChAT 染色分析。整个动物给药及后续病理实验均采用双盲方式。

1.2.3 手术步骤

使用吸入异氟烷麻醉大鼠 (诱导浓度: 5%; 维持浓度: 2% ~ 3%), 背部剃毛并消毒, 将动物放置于手术恒温热垫上, 用手指感触两侧髂骨嵴, 在与两侧髂骨嵴连线中点处做一个长约 2 cm 的背部皮肤正中切口, 离脊柱大约 5 mm 的位置纵向切开左侧背长肌及韧带, 切口长度在 1.5 cm 左右, 随后在实体显微镜下分离暴露第 5 腰椎的左侧乳突及横突, 并用小剪刀去除部分乳突及大部分横突板, 以暴露粗大的第四神经索, 在第四腰椎的锥孔处用微型钳分离第 4 腰椎神经根 (含背侧和腹侧) 周围的组织, 将其从锥孔中拉出少许, 含有背根神经节的为背侧根,

另外一条为腹侧根,随后用微型止血钳小心的将腹侧根完全拉出,整个腹侧根的长度在 2 cm 左右。在造模后运动神经元变化的实验研究中,腹侧神经元牵拉后,缝合肌肉关闭伤口,注射氟尼辛 5 mg/(kg·d)进行镇痛处理,术后 48 h 内,紧密观察动物情况,预防手术感染。样品采集时先使用吸入异氟烷将大鼠麻醉(诱导浓度:5%;维持浓度:2%~3%),随后使用 0.9% 生理盐水和 4% PFA 灌注,在解剖显微镜下取出脊髓第 3~6 腰段进行后续组织处理和 ChAT 染色分析。而在 BDNF 治疗的实验中,牵拉后,立即从第 4 椎间孔中插入一个连接到微型渗透泵(Alzet 2002 minipump)的 MRE025 导管到蛛网膜下腔后,缝合肌肉关闭伤口,微型泵埋于颈部皮下,以 0.5 μ L/h 的速率进行髓鞘内给药,持续 14 d。在不同的时间终点,灌注后取出脊髓第 3~6 腰段进行染色分析。

1.2.4 术后护理

术后 48 h 内给大鼠皮下注射福尼辛葡甲胺 5 mg/(kg·d),并将动物置于 37℃ 的恒温热垫上直到完全苏醒,苏醒后的大鼠 3~5 只群体饲养。

1.2.5 胆碱乙酰转移酶(ChAT)免疫组织化学染色

脊髓经 4% 多聚甲醛固定,OCT 包埋剂包埋以及冰冻切片后(每片 30 μ m),进行 ChAT 免疫组织化学染色。一抗为抗 ChAT 抗体,(Millipore 公司),1:500 稀释;二抗为生物素标记的驴抗羊 IgG(In-vitrogen 公司)1:1000 稀释。冰冻切片经 PBS 冲洗后,滴加 3% 过氧化氢去离子水室温孵育 20 min;滴加一抗,4℃ 过夜;接下来滴加二抗,室温孵育 10 min;然后用抗生物素蛋白-生物素复合物孵育 30 min;二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)显色后(每步中间均用 0.3% PBST 冲洗三次,每次 5 min)苏木精复染;中性树胶封片;最后成片用 ScanScope XT(Leica Biosystem)扫描,并用 ImageScope(Leica Biosystem)截图。

1.2.6 ChAT 阳性神经元计数

ChAT 染色用于标记脊髓前角运动神经元。分别计数手术侧和手术对侧脊髓前角 ChAT 阳性神经细胞。每只动物分析了 16 张 ChAT 染色的切片。整个病理染色及后续数据分析采用双盲方式。

1.3 数据处理及统计分析

用 GraphPad5 PRISM(GraphPad Software, Inco, San Diego, Calif., USA)统计软件进行分析,统计结果以“means $\pm$ SEM”表示,差异显著性比较用 t 检

验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 术后临床监测

术后未见动物死亡,大鼠恢复良好,未见异常临床症状。

2.2 SRA 模型的建立

ChAT 染色结果见图 1。图 1 A 中,绿色点显示为 ChAT 染色阳性细胞。ChAT 染色阳性细胞计数结果见图 1B。与手术对侧相比,1 周后在脊髓前角有 20.06% 的运动神经元细胞变性死亡,差异有显著性($P < 0.05$)。图 1B 中** $P = 0.0013$ 。

2.3 用 BDNF 预防性给药结果

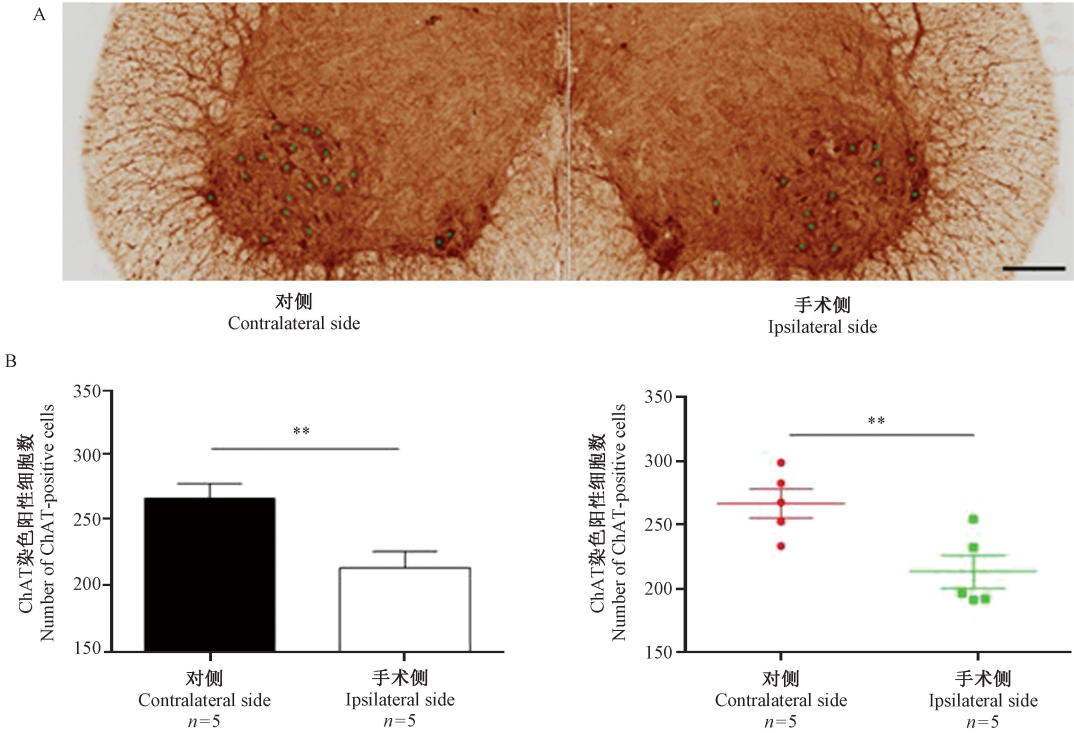
SRA 手术后立即用 BDNF 进行预防性治疗,结果如图 2、3 所示。与对照组(PBS)相比,BDNF 预防性给药组的 ChAT 染色阳性神经元显著增加($P < 0.0001$);与对侧相比,百分率分别为 17.85%,93.06%;说明 BDNF 对于运动神经元具有保护作用。该实验中,一共有 6 只大鼠的样品没有用于最后的数据分析,原因是其中有 1 只大鼠取材时发现手术周围和脊髓有炎症,4 只大鼠部分染色切片损坏,1 只大鼠植入微型渗透泵失败。

2.4 用 BDNF 治疗性给药结果

SRA 手术后 1 周后再用 PBS 或 BDNF 进行治疗性给药 2 周。结果如图 4 和图 5 所示,与对照组(PBS)相比,BDNF 治疗给药组的 ChAT 染色阳性神经元细胞显著增加($P < 0.0001$),与对侧相比,百分率分别为 26.94%,86.87%;说明 BDNF 对运动神经元具有很强的保护作用。该实验手术中 2 只动物因麻醉死亡未计入结果统计。

3 讨论及应用

目前 ALS 作为运动神经元疾病的一种,尚未有完全治愈的药物,又因其病程发展迅速,使患者丧失了最基本的生活能力,给病人带来了极大的痛苦,给家庭和社会都带来沉重的负担^[2-3,20]。根据不同的假说,科学家们建立了多种 ALS 动物模型,如:神经微丝基因动物模型,神经毒性动物模型,免疫介导动物模型,而且随着基因组学的发展,还成功构建了基因突变动物模型如:SOD1 基因突变模型,TDP-43 基因突变模型,Wobbler 基因突变模型等,来研究 ALS 的发病机制及治疗措施^[21]。今年中国科学家还成功构建了猪的 SOD1 基因突变模型为揭示 ALS 疾病机

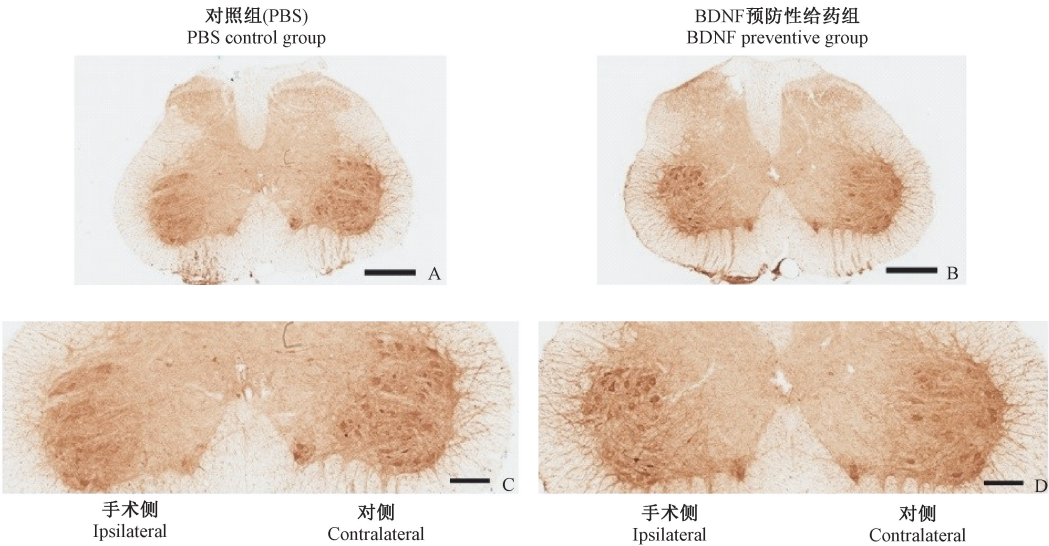


注：A. 脊髓的 ChAT 染色,绿色点显示为 ChAT 染色阳性细胞,bar = 200 μm ;B. 脊髓切片 ChAT 染色阳性细胞结果分析.** $P = 0.0013$ 。

图 1 SRA 手术 1 周后脊髓的 ChAT 染色阳性细胞计数(A)及结果分析(B)

Note. A: ChAT stained section of the spinal cord. ChAT positive cells were labeled green dots, scale bar in the figure 1 A = 200 μm . B: Data analysis of the number of ChAT positive cells in the spinal cord tissue at one week after surgery. ** $P = 0.0013$.

Fig. 1 Number of ChAT positive cells (A) and data analysis (B) of the spinal cord tissues at one week after spinal root avulsion surgery



注：A、C. 对照组(PBS)；B、D. BDNF 预防性给药组；A、B 中 bar = 500 μm ；C、D 中 bar = 200 μm 。

图 2 用 PBS 或 BDNF 预防性治疗 2 周后脊髓的 ChAT 染色

Note. A & C: PBS control group. B & D: BDNF preventive group. Scale bars in A & B = 500 μm ; scale bars in the C and D = 200 μm .

Fig. 2 Histological changes of the spinal cord tissue of the PBS or BDNF preventive treatment groups at 2 weeks after surgery(ChAT staining)

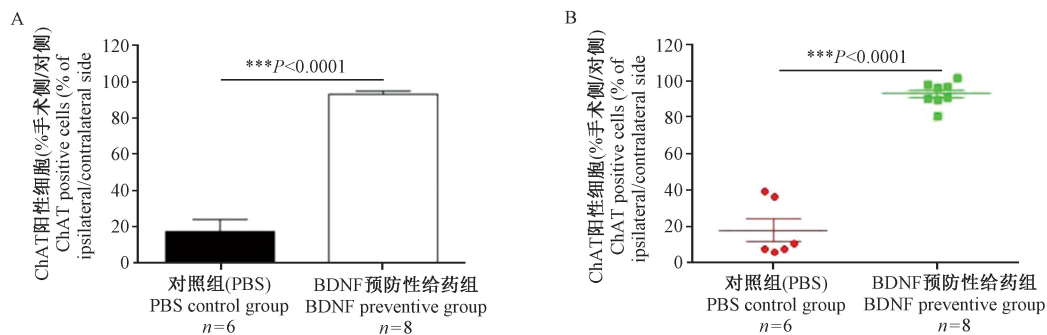
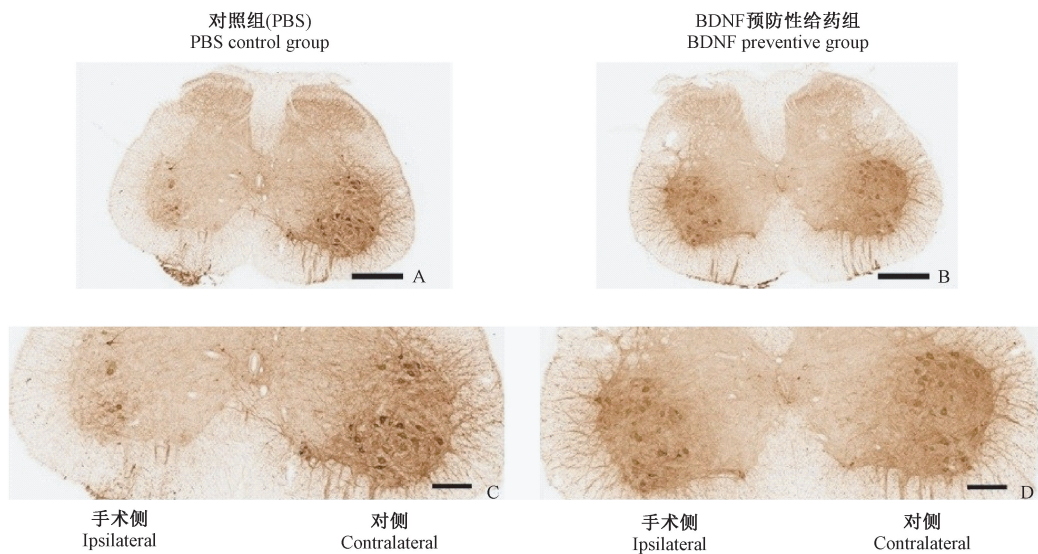


图 3 PBS 或 BDNF 预防性治疗 2 周后 ChAT 染色阳性细胞结果分析

Fig.3 Data analysis of ChAT positive neurons (% of ipsilateral side/contralateral side) in the spinal tissues of PBS and BDNF preventive treatment group at 2 weeks after surgery



注：A、C. 对照组 (PBS)；B、D. BDNF 预防性给药组；A、B 中 bar = 500 μm；C、D 中 bar = 200 μm。

图 4 PBS 或 BDNF 治疗性给药 2 周后脊髓的 ChAT 染色

Note. A & C: PBS control group. B & D: BDNF treatment group. Scale bars in A and B = 500 μm. Scale bars in C and D = 200 μm.

Fig.4 Histological changes of spinal cord tissues of the PBS or BDNFc treatment groups at 2 weeks after surgery (ChAT staining)

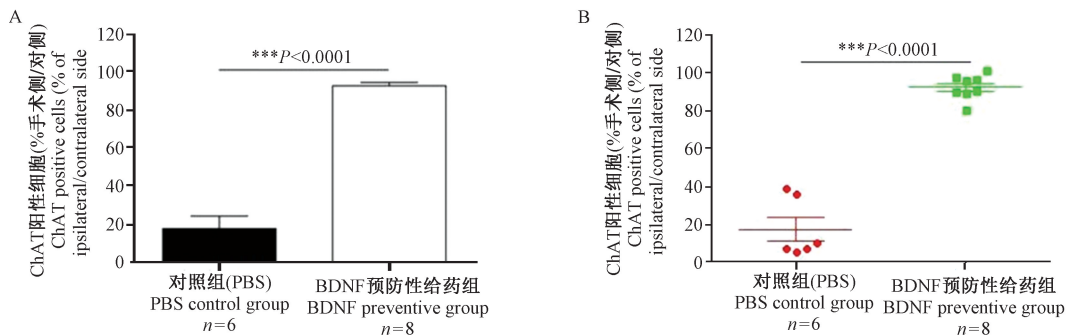


图 5 PBS 或 BDNF 治疗性给药 2 周后 ChAT 染色结果分析

Fig.5 Data analysis of ChAT positive neurons (% of surgery side/contralateral side) in the PBS and BDNF treatment groups at 2 weeks after surgery

理和开发治疗药物提供了新的动物模式^[22]。本研究主要是建立了通过轴索外手术牵拉第 4 腰椎腹侧神经根来直接导致脊髓前角运动神经元变性死亡来模拟 ALS 疾病的一种动物模型。

本研究发现,大鼠手术后恢复良好,临床观察无异常。ChAT 染色结果说明牵拉后造成明显的运动神经元变性死亡。随后我们又研究用 BDNF 治疗 SRA 动物,发现不管是预防性给药还是术后 1 周后再进行治疗性给药都达到了良好的治疗效果,ChAT 染色阳性神经元细胞均显著增加 ($P < 0.0001$),结果分别为 17.85% 比 93.06%; 26.94% 比 86.87%。

综上所述,SRA 动物模型为轴索外手术模型,由于无需打开脊柱,操作简便,能显著的引起脊髓前角运动神经元的变性死亡,且用 BDNF 治疗后能有效保护运动神经元,可重复性强,为揭示 ALS 疾病机理和开发治疗药物提供了有价值的动物模式。

【致谢】高巍、郑春艳、郭建军、金诗怡为本实验提供了实验技术支持,徐燕梅博士为本实验提供了统计学分析,在此深表感谢。

参 考 文 献(References)

- [1] Bruijn LI, Miller TM, Cleveland DW. Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS [J]. *Annu Rev Neurosci*, 2004, 27:723 - 749.
- [2] Chio A, Calvo A, Moglia C, et al. Phenotypic heterogeneity of amyotrophic lateral sclerosis: A population based study [J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2011, 82(7): 740 - 746.
- [3] Creemers H, Grupstra H, Nollet F, et al. Prognostic factors for the course of functional status of patients with ALS: a systematic review [J]. *J Neurol*, 2015, 262: 1407 - 1423
- [4] Muller FL, Liu Y, Jernigan A, et al. MnSOD deficiency has a differential effect on disease progression in two different ALS mutant mouse models [J]. *Muscle Nerve*, 2008, 38 (3): 1173 - 1183.
- [5] Nardo G; Trolese MC; Tortarolo M, et al. New insights on the mechanisms of disease course variability in ALS from mutant SOD1 mouse models [J]. *Brain Pathol*, 2016, 26: 237 - 247
- [6] Zhang YJ, Xu YF, Cook C, et al. Aberrant cleavage of TDP - 43 enhances aggregation and cellular toxicity [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2009, 106(18): 7607 - 7612.
- [7] Le NTT, Chang L, Kovlyagina I et al. Motor neuron disease, TDP - 43 pathology, and memory deficits in mice expressing ALS - FTD-linked UBQLN2 mutations [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2016, 113(47): E7580-E7589.
- [8] Moser JM, Bigini P, Schmitt-John T. The wobbler mouse, an ALS animal model [J]. *Mol Genet Genomics*, 2013, 288: 207 - 229.
- [9] Yan Q, Elliott J, Snider WD. Brain-derived neurotrophic factor

rescues spinal motor neurons from axotomy-induced cell death [J]. *Nature*, 1992, 360(6406): 753 - 755.

- [10] Jea HS, Yang F, Ji Y, et al. Role of pro-brain-derived neurotrophic factor (proBDNF) to mature BDNF conversion in activity-dependent competition at developing neuromuscular synapses [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2012, 109(39): 15924 - 15929.
- [11] Lu B, Nagappan G, Guan X, et al. BDNF-based synaptic repair as a disease-modifying strategy for neurodegenerative diseases [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2013, 14(6): 401 - 416.
- [12] Henriques A, Pitzer C, Schneider A. Neurotrophic growth factors for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis: Where Do We Stand? [J]. *Front Neurosci*, 2010, 4(32): 1 - 14.
- [13] Kishino A, Ishige Y, Tatsuno T, et al. BDNF prevents and reverses adult rat motor neuron degeneration and induces axonal outgrowth [J]. *Exp Neurol*, 1997, 144(2): 273 - 286.
- [14] Perrin S. Preclinical research: make mouse studies work [J]. *Nature*, 2014, 507(7493): 423 - 425.
- [15] Koliatsos VE, Price WL, Pardo CA, et al. Ventral root avulsion: an experimental model of death of adult motor neurons [J]. *J Comp Neurol*, 1994, 342(1): 35 - 44.
- [16] Chai H, Wu W, So KF, et al. Long-term effects of a single dose of brain-derived neurotrophic factor on motoneuron survival following spinal root avulsion in the adult rat [J]. *Neurosci Lett*, 1999, 274(3): 147 - 150.
- [17] He JW, Hirata K, Kuraoka A, et al. An improved method for avulsion of lumbar nerve roots as an experimental model of nitric oxide-mediated neuronal degeneration [J]. *Brain Res Protoc*, 2000, 5(3): 223 - 230.
- [18] Wu W, Li L, Yick LW, et al. GDNF and BDNF alter the expression of neuronal NOS, c-Jun, and p75 and prevent motoneuron death following spinal root avulsion in adult rats [J]. *J Neurotrauma*, 2003, 20(6): 603 - 612.
- [19] Chu TH, Wu W. Neurotrophic factor treatment after spinal root avulsion injury [J]. *Central Cent Nerv Syst Agents Med Chem*, 2009, 9: 40 - 55
- [20] Duncan MW. Role of the cycad neurotoxin BMAA in the amyotrophic lateralsclerosis-parkinsonism dementia complex of the western Pacific [J]. *Adv Neurol*, 1991, 56: 301 - 310.
- [21] Green SL, Tolwani RJ. Animal models for motor neuron disease [J]. *Lab Anim Sci*, 1999, 49(5): 480 - 487.
- [22] Yang HQ, Wang GH, Sun HT, et al. Species-dependent neuropathology in transgenicSOD1 pigs [J]. *Cell Res*, 2014, 24(4): 464 - 481.

[收稿日期] 2017 - 07 - 03