

肌萎缩侧索硬化脊髓器官型培养模型的建立

刘卫刚 王晓娟¹ 肖向建² 马 征 宋学琴 王丽琴 李春岩*

(河北医科大学第二医院神经内科, 石家庄 050000; ¹北京同仁医院神经科, 北京 100730;

²河北省人民医院神经科, 石家庄 050000)

摘要 利用谷氨酸转运体抑制剂苏-羟天冬氨酸(THA)制备选择性运动神经元凋亡的肌萎缩侧索硬化(ALS)脊髓器官型培养模型。取出生后8天乳鼠腰段脊髓组织切成脊髓薄片, 在培养液中分别加入不同浓度THA, 用SMI-32免疫组化染色对脊髓腹角 α 运动神经元进行鉴定, calretinin免疫组化染色对背角中间神经元进行鉴定, 测定培养液中谷氨酸(Glu)、乳酸脱氢酶(LDH)的含量, 并与对照组比较。结果显示对照组 α 运动神经元数目恒定; THA引起培养液中剂量依赖性Glu、LDH含量增高和SMI-32阳性的 α 运动神经元数目减少, 脊髓背角的中间神经元损伤相对较轻; 100 μ mol/L THA组在体外培养4周后, 细胞外Glu含量增高, SMI-32阳性的 α 运动神经元数目较对照组明显减少, 背角的中间神经元数目无显著变化, 可以制成ALS脊髓器官型培养模型。

关键词 肌萎缩侧索硬化; 器官型培养; 苏-羟天冬氨酸; 谷氨酸

肌萎缩侧索硬化(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)是以选择性累及上、下运动神经元为特点的慢性、进行性神经系统变性疾病。90%以上为散发型, 患者多在病后3~5年内死亡。虽经一个多世纪的研究, 目前仍缺乏有效的治疗方法, 其原因可能在于该病选择性运动神经元损伤而引起细胞凋亡所致, 但机制不明^[1]。对ALS的病因及发病机制的探讨一直是神经学科领域的研究热点。为进一步寻找ALS的病因和有效的治疗方法, 实验模型的建立至关重要。越来越多的证据表明谷氨酸介导的兴奋毒作用是ALS发病的重要环节, 而谷氨酸转运体的丢失是导致细胞外谷氨酸增加的重要原因^[2,3]。本研究旨在利用脊髓器官型培养技术, 应用谷氨酸转运体抑制剂苏-羟天冬氨酸(threohydroxyaspartate, THA)建立脊髓运动神经元选择性凋亡的ALS体外培养模型, 为探讨谷氨酸在选择性运动神经元损伤中的作用, 研究ALS的发病机制和开发神经保护治疗药物提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验动物采用8日龄SD乳鼠, 购自中国医学科学院实验动物研究所; 培养液MS[50%MEM(含25 mmol/L Hepes)+25%热灭活马血清+25% Hanks平衡

盐溶液(含25.6 mg/ml葡萄糖)]; GBSS(Geys平衡盐溶液中含6.4 mg/ml葡萄糖); 实验仪器为CO₂培养箱、超净工作台、解剖显微镜、McIlwain组织切片机(加拿大GENEQ公司)、倒置显微镜、普通显微镜及分光光度计; THA购自Sigma公司; 组化试剂一抗分别为小鼠抗非磷酸化神经丝蛋白单克隆抗体(SMI-32)购自Sternberger Monoclonals公司; 小鼠抗钙网膜蛋白单克隆抗体(calretinin)购自NeuMarkers公司; 二抗生物素化马抗鼠购自Vector公司; SABC免疫组织化学试剂盒(即用型)购自武汉博士德公司; DAB显色试剂盒购自北京中山化学试剂公司; 谷氨酸(Glu)、乳酸脱氢酶(LDH)检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所; Millicell-CM insert购自Millipore公司。

1.2 脊髓薄片器官型培养方法^[4]

将8日龄SD乳鼠快速在酒精、碘酒、酒精中浸泡一下, 迅速断头, 无菌条件下快速分离、取出整条脊髓, 解剖显微镜下分离并剪断腰段脊髓的神经根, 用McIlwain组织切片机切成350 μ m厚的薄片, 将腰段脊髓切片转移到GBSS中分离, 6孔

收稿日期: 2004-06-21 接受日期: 2004-08-15

河北省自然科学基金资助项目 (No.303487)

* 通讯作者。Tel: 0311-7222725, Fax: 0311-7064024, E-mail:

hblcy@yahoo.com.cn

培养板内每孔放入 1 ml MS, 并放置 Millicell-CM insert, 用吸管将脊髓片移至 insert 上, 每个 insert 上放 5 片, 吸去 insert 膜表面多余液体后, 放入 CO₂ 培养箱(37 °C, 5% CO₂, 95% 空气)。将脊髓片随机分为对照组和 50 μmol/L THA、100 μmol/L THA、500 μmol/L THA 组。每周换液 2 次, 对照组所换培养液仅为 MS, THA 组第 1 周换液为 MS, 从第 2 周开始, 所换培养液分别为以 MS 稀释的不同浓度的 THA(50、100、500 μmol/L)。将所换培养液收集并低温保存。各组分别于培养后的 1 周、2 周、4 周、6 周时取 3 个 insert 上的 15 个脊髓片免疫组化染色记数脊髓腹角 α 运动神经元数目、背角中间神经元数目。

1.3 免疫组化染色

脊髓片以 4% 多聚甲醛固定 30 min, 0.1mol/L PB 冲洗 3 次, 0.6% Triton X-100 浸透 10 min, 0.05 mol/L TBS 冲洗 3 次, 5% 马血清/TBS 冲洗 60 min, SMI-32(1:4000)或 calretinin(1:60) 4 °C 摇床过夜, 次日 TBS 冲洗 3 次, 每次 10 min, 加二抗生物素化马抗鼠(1:2000)60 min, SABC 60 min, TBS 冲洗 3 次, 每次 10 min, DAB 显色 3~10 min, TBS 冲洗 3 次, 每次 10 min, 脱水、透明、封片。以 TBS 代替一抗为阴性对照。位于脊髓腹角、SMI-32 阳性、胞体直径大于 25 μm 的神经元被确定为 α 运动神经元^[5]。位于脊髓背角、calretinin 阳性者定为中间神经元。利用目镜测微尺在 20× 镜下计数每个脊髓片腹角 α 运动神经元的数目并在 40× 镜下测定 2.5 mm²(5 mm × 5 mm 测微尺下的 4 个视野)面积后角中间神经元的数目。

1.4 培养液中 LDH 和 Glu 含量测定

测定培养 1 周、2 周、4 周、6 周时培养液中 LDH、Glu 的含量。每个时点取 10 份培养液进行测定。操作步骤严格按试剂盒说明进行。

1.5 统计分析

测定结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 10.0 统计软件分析, 检验水准取 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 倒置显微镜观察

对照组脊髓片在体外生长良好, 体积逐渐增大, 组织边缘有光晕, 培养存活率高, 达 90% 以上; 存活时间长, 最长可达 2 个月以上。脊髓片腹角透光性较背角强, 细胞相对较大, 细胞分布相对较稀疏; 背角较腹角暗淡且含有大量体积小、重叠、密集的细胞。50 μmol/L THA 组的脊髓片与正常培养组比较形态无明显差异; 100 μmol/L THA 组的脊髓片在培养 4 周后脊髓腹角明显变薄, 颜色变暗, 而背角变化不明显; 500 μmol/L THA 组则在培养后 2 周出现脊髓腹角、背角均变薄, 颜色变暗, 以腹角更明显, 培养至 6 周后, 脊髓腹角细胞稀疏, 边缘已无明显光晕。

2.2 免疫组化染色结果

对照组脊髓片每片的两侧腹角均有 10~25 个左右 SMI-32 阳性的 α 运动神经元, 突起细长, 彼此形成突触联系(图 1), 数目不随培养时间的延长而减少; calretinin 染色见脊髓背角有大量中、小体积的中间神经元, 圆形或椭圆形, 细胞排列紧密, 有重叠(图 2), 而腹角 calretinin 染色多为阴性, 偶见数个小的运动神经元着色, α 运动神经元 calretinin 染色阴性。50 μmol/L THA 组各时点 SMI-32 阳性的 α 运动神经元及背角神经元数目均无明显减少。100 μmol/L THA 组 SMI-32 阳性的 α 运动神经元的数目随时间延长而逐渐减少, 培养 4 周后与对照组比较有显著性差异(图 3), 脊髓背角的中间神经元数目各时点均无明显减少(图 4)。500 μmol/L THA 组在培养 2 周后不仅有 SMI-32 阳性的 α 运动神经元数目的减少, 脊髓背角中间神经元的数目在培养 4 周后也有明显减少(表 1、表 2)。

2.3 培养液中 LDH、Glu 含量测定

对照组及 50 μmol/L THA 组各时点培养液中 LDH、Glu 含量无显著性变化, 而 100 μmol/L THA 组和 500 μmol/L THA 组 LDH、Glu 含量随培养时间延长而升高, 其中 100 μmol/L THA 组 LDH、Glu

表 1 各组各时点脊髓腹角 SMI-32 阳性的 α 运动神经元记数

	1 周	2 周	4 周	6 周
对照组	17.4 ± 3.2	16.1 ± 4.7	14.6 ± 4.7	13.6 ± 4.0
50 μmol/L THA 组	17.6 ± 3.3	15.3 ± 4.2	14.4 ± 4.0	13.1 ± 3.4
100 μmol/L THA 组	16.7 ± 4.0	14.6 ± 3.6	11.7 ± 3.8*	8.7 ± 3.6**
500 μmol/L THA 组	15.1 ± 2.9	11.7 ± 4.3*	7.6 ± 3.2**	4.3 ± 2.5**

* 与对照组比较, 差异有意义($P<0.05$)。** 与对照组比较, 差异有显著意义($P<0.01$)。

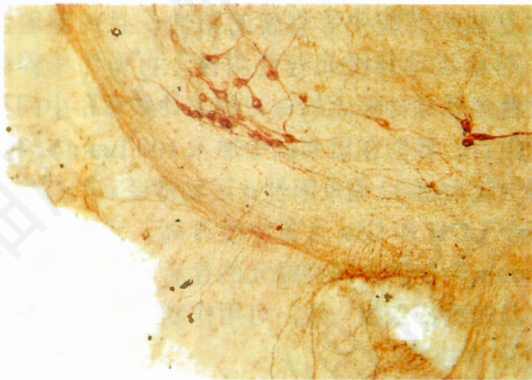


图1 体外培养4周时，脊髓腹角见多个SMI-32阳性的 α 运动神经元及其突起 (100 $\times$)

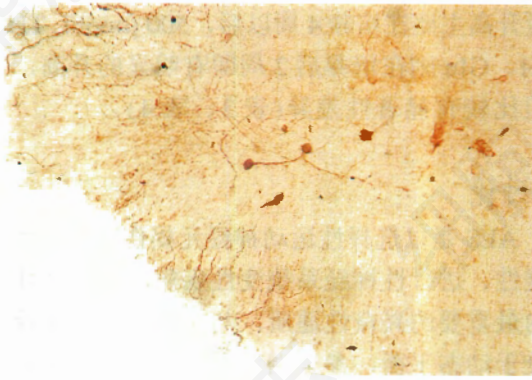


图3 100 $\mu\text{mol/L}$ THA 组培养4周脊髓片，脊髓腹角SMI-32阳性的 α 运动神经元数目明显减少 (100 $\times$)

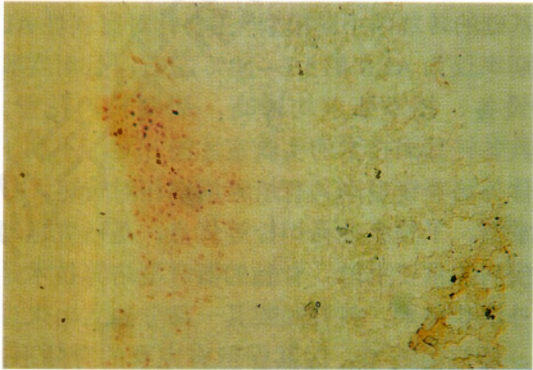


图2 体外培养4周时，calretinin组化染色示背角有大量中间神经元 (100 $\times$)

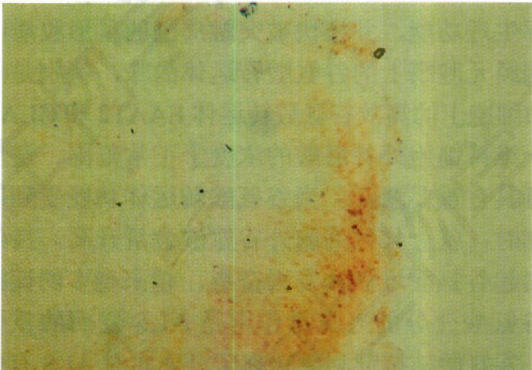


图4 100 $\mu\text{mol/L}$ THA 组培养4周脊髓片，calretinin组化染色背角中间神经元数目无明显减少 (100 $\times$)

表2 各组各时点脊髓背角中间神经元记数

	1周	2周	4周	6周
对照组	45.3 $\pm$ 9.0	46.6 $\pm$ 7.3	44.4 $\pm$ 7.2	42.4 $\pm$ 5.6
50 $\mu\text{mol/L}$ THA 组	44.2 $\pm$ 8.8	43.8 $\pm$ 7.1	41.7 $\pm$ 5.0	40.2 $\pm$ 5.0
100 $\mu\text{mol/L}$ THA 组	48.5 $\pm$ 7.7	43.5 $\pm$ 5.2	42.1 $\pm$ 6.2	39.6 $\pm$ 6.5
500 $\mu\text{mol/L}$ THA 组	47.6 $\pm$ 7.3	41.8 $\pm$ 6.0	36.4 $\pm$ 7.2**	28.5 $\pm$ 5.9**

**与对照组比较，差异有显著意义($P<0.01$)。

表3 各组各时点培养液中LDH含量比较 (U/dl, $\bar{x} \pm s$)

	1周	2周	4周	6周
对照组	153 $\pm$ 10.6	149 $\pm$ 12.6	154 $\pm$ 16.6	151 $\pm$ 14.2
50 $\mu\text{mol/L}$ THA 组	158 $\pm$ 11.2	146 $\pm$ 11.7	149 $\pm$ 12.3	146 $\pm$ 12.8
100 $\mu\text{mol/L}$ THA 组	149 $\pm$ 12.1	160 $\pm$ 14.1	177 $\pm$ 21.5*	198 $\pm$ 25.5**
500 $\mu\text{mol/L}$ THA 组	155 $\pm$ 13.7	182 $\pm$ 23.3**	195 $\pm$ 25.6**	210 $\pm$ 27.3**

*与对照组比较，差异有意义($P<0.05$)。 **与对照组比较，差异有显著意义($P<0.01$)。

表4 各组各时点培养液中Glu含量比较 (U/dl, $\bar{x} \pm s$)

	1周	2周	4周	6周
对照组	1.3 $\pm$ 0.8	1.5 $\pm$ 0.6	1.7 $\pm$ 0.7	1.4 $\pm$ 0.6
50 $\mu\text{mol/L}$ THA 组	1.4 $\pm$ 0.7	1.8 $\pm$ 0.8	2.0 $\pm$ 0.7	2.1 $\pm$ 1.0
100 $\mu\text{mol/L}$ THA 组	1.2 $\pm$ 0.5	2.1 $\pm$ 0.6	3.5 $\pm$ 0.8*	4.6 $\pm$ 1.1**
500 $\mu\text{mol/L}$ THA 组	1.8 $\pm$ 0.6	3.2 $\pm$ 0.9*	4.0 $\pm$ 1.2**	5.6 $\pm$ 1.5**

*与对照组比较，差异有意义($P<0.05$)。 **与对照组比较，差异有显著意义($P<0.01$)。

含量升高主要在培养4周以后, 500 $\mu\text{mol/L}$ THA 组 LDH、Glu 则在培养后2周即有明显的升高, 与对照组比较有显著性差异(表3、表4)。

3 讨论

ALS 是以选择性运动神经元损伤而凋亡为特点的慢性、进行性神经系统变性疾病。谷氨酸作为人体内最重要的兴奋性递质, 与抑制性神经递质的活动处于动态平衡, 参与调节脑和脊髓发育过程中神经网络联系的建立, 并与运动调节、感知、学习、记忆和情感等高级神经活动有关^[6]。在正常情况下突触前神经元释放的谷氨酸作用于突触后神经元仅发挥生理功能, 并很快被突触周围的星形胶质细胞和神经元胞膜上的谷氨酸转运体清除, 特别是星形胶质细胞上的高效谷氨酸转运体 EAAT2 和 GLAST, 对于维持细胞外谷氨酸的浓度于正常范围、避免兴奋毒具有重要意义。当谷氨酸转运体功能受到明显抑制时, 就会导致细胞外谷氨酸含量升高, 持续进展引起谷氨酸堆积诱发兴奋毒。越来越多的证据表明谷氨酸介导的兴奋毒作用是 ALS 发病的重要环节。谷氨酸拮抗剂利鲁唑临床已证实对 ALS 有中等程度的保护作用, 从而进一步证实谷氨酸的兴奋毒作用是 ALS 发病的重要机制。

THA 是谷氨酸转运体的抑制剂, 它可以抑制星形胶质细胞对细胞外谷氨酸的转运, 使细胞外、突触间隙中谷氨酸的浓度持续升高^[7]。LDH 是参与能量代谢重要的酶之一, 其释放至细胞外的多少与组织损伤程度有关。我们在器官型培养的脊髓薄片培养液中持续加入不同浓度的 THA, 结果发现可以引起剂量依赖性的脊髓腹角 SMI-32 阳性的 α 运动神经元数目减少和培养液中 Glu 和 LDH 含量升高, 而背角中间神经元的损伤相对较轻。提示 THA 引起的 Glu 浓度的升高产生了兴奋毒, 造成了运动神经元的损伤, 使 SMI-32 阳性的 α 运动神经元数目减少。在免疫组化鉴定中, 所用的 SMI-32 免疫组化染色具有敏感度高, 特异性强等优点, 可以很好的显示神经系统运动神经元的胞体、树突和某些较粗大的轴突^[5], 成为器官型培养的脊髓运动神经元特异标记物。Calretinin 作为胞质性钙结合蛋白在脊髓背角中有广泛的表达^[8], 位于神经元胞体或其突起中,

表达呈强阳性或中等程度的阳性, 且细胞着色清晰, 而 α 运动神经元着色阴性, 可作为培养的脊髓片背角感觉神经元的标记物来计数背角中间神经元的数目。我们在培养液中加入 100 $\mu\text{mol/L}$ THA, 既可引起 SMI-32 免疫阳性 α 运动神经元的减少及培养液中 LDH 和 Glu 含量中度升高, 又不影响背角 calretinin 阳性的中间神经元的存活, 与 ALS 病人的生化及病理特点相一致, 可用作制备 ALS 的脊髓器官型培养模型。

国际上目前针对 ALS 的实验模型研究主要集中在转基因动物模型和体外细胞(或组织、器官)培养模型上。以 Cu/Zn SOD 基因突变和神经丝过度磷酸化为基础的转基因小鼠模型^[9]主要针对家族性 ALS, 其发病率仅为 ALS 的 5%~10% 左右, 且对实验条件、设备、技术要求均较高, 周期长, 花费大, 只有具备转基因技术的实验室才能开展, 不利于推广。体外培养模型则具有培养周期相对较短, 技术容易掌握, 干预条件易调控等优点, 是研究运动神经元疾病的重要手段。脊髓的器官型培养技术是借助体外培养技术, 将脊髓或其一部分独立出来进行培养、研究的技术。因其保留有完整的脊髓形态、恒定的运动神经元数目及和周围组织结构的突触联系, 与体内的生理环境相似, 成为探讨脊髓形态发生、构筑特点、生理功能及病理改变等一系列问题的重要途径, 特别是为研究 ALS 提供了重要的技术手段。本实验室利用脊髓薄片器官型培养技术建立了能在体外长期存活的 ALS 脊髓器官型培养模型, 为进一步研究 ALS 的发病机制、寻求新型神经保护剂治疗提供了基础。

参考文献 (References)

- [1] Guegan C *et al.* *J Clin Invest*, 2003, **111**: 153
- [2] Niebroj-Dobosz I *et al.* *Acta Neurol Scand*, 1999, **100**: 6
- [3] Ono S *et al.* *J Neurol Sci*, 1999, **167**: 121
- [4] Rothstein JD *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**: 6591
- [5] Carriedo SG *et al.* *J Neurosci*, 1996, **16**: 4069
- [6] 郭淮莲. 肌萎缩侧索硬化症的神经保护。见: 董为伟主编。神经保护的基础与临床, 北京: 科学出版社, 2002, 312
- [7] Kidd FL *et al.* *Neuropharmacology*, 2000, **39**: 725
- [8] Laslo P *et al.* *Neuroreport*, 2000, **11**: 3305
- [9] Morrison BM *et al.* *J Exp Zool*, 1998, **282**: 32

Establishment of Organotypic Culture Model of Spinal Cord for Amyotrophic Lateral Sclerosis

Wei-Gang Liu, Xiao-Juan Wang¹, Xiang-Jian Xiao², Zheng Ma, Xue-Qin Song, Li-Qin Wang, Chun-Yan Li*

(Department of Neurology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China;

¹Department of Neurology, Beijing Tongren Hospital, Beijing 100730, China;

²Department of Neurology, the People's Hospital of Hebei Province, Shijiazhuang 050000, China)

Abstract In this study, we developed a cultured organotypic spinal cord model of selective motor neuron death for amyotrophic lateral sclerosis (ALS), using threohydroxyaspartate (THA), a inhibitor of glutamate transport. Cultured organotypic spinal cord slices were prepared from lumbar spinal cords of 8-day-old rat pups. Various concentrations of THA were continuously added into the culture medium. Ventral α -motor neuron survival was evaluated by culture morphology and SMI-32 immunohistochemistry staining. Interneurons in dorsal horn were identified by calretinin immunohistochemistry staining. Glutamate (Glu) and lactate dehydrogenase (LDH) levels in culture medium were measured. The results showed that the spinal cord slices in the control group could maintain excellent organotypic cellular organization and a stable population of ventral SMI-32 positive α -motor neurons. THA could produce a slow dose-dependent loss of SMI-32 positive α -motor neurons and a elevation of Glu, LDH levels in culture medium. After the slices cultured 4 weeks *in vitro*, 100 μ mol/L THA resulted in the loss of SMI-32 positive α -motor neurons, increase of Glu level and no significant change of inter-neurons in the dorsal horn, which could be acted as an effective organotypic culture model of ALS.

Key words amyotrophic lateral sclerosis; organotypic culture ; threohydroxyaspartate; glutamate

Received: June 21, 2004 Accepted: August 15, 2004

This work was supported by the Natural Science Foundation of Hebei Province (No.303487)

*Corresponding author. Tel: 86-311-7222725, Fax: 86-311-7064024, E-mail: hblcy@yahoo.com.cn