

二相酶诱导剂 D3T 对运动神经元的保护作用

刘晓云¹ 卜 晖¹ 李 哲¹ 李 彬¹ 孙萌萌¹ 李春岩^{1,2*}(¹河北医科大学第二医院神经内科, ²河北省心脑血管病研究所, 石家庄 050000)

摘要 研究二相酶诱导剂 3H-1,2-dithiole-3-thione (D3T)对体外培养的运动神经元的保护作用。选用生后7天的SD乳鼠脊髓腰段切成薄片进行体外培养,正常培养1周后分组干预,对照组只加入正常培养液,THA组于培养液中加入谷氨酸转运体抑制剂 threo-hydroxyaspartate(THA),D3T48h+THA组于培养液中加入不同浓度的D3T,48h后同时给予THA和相应浓度的D3T。D3T+THA组于培养液中同时给予THA和不同浓度的D3T。培养4周后观察运动神经元数量和超微结构变化。另外对培养1周后的脊髓薄片给予不同浓度的D3T,观察D3T干预48h后运动神经元数量与相应对照组之间的差异。结果显示D3T对THA引起的运动神经元的丢失有保护作用,且能够减轻THA引起运动神经元超微结构损害。由此认为,二相酶诱导剂D3T有望成为肌萎缩侧索硬化治疗的新切入点。

关键词 萎缩侧索硬化; D3T; 运动神经元; 脊髓

肌萎缩侧索硬化(ALS)是以选择性运动神经元丢失为特征的一种神经退行性疾病。临床表现为上、下运动神经元瘫痪。目前认为,多种因素参与了ALS上、下运动神经元丢失的病理过程。其中包括神经丝聚集、线粒体功能异常、氧化应激和谷氨酸的兴奋毒作用等^[1]。氧化应激在运动神经元变性中发挥重要的作用。脂质过氧化产物丙二醛和4-hydroxynonenal在ALS患者血清和脑脊液中都有升高的报道^[2]。而且,氧化应激与谷氨酸兴奋毒机制密切相关,进一步加重毒性作用,最终导致运动神经元死亡^[3]。因此,抗氧化剂和自由基清除剂在一定程度上能够提高运动神经元的存活。但是,对ALS病人,抗氧化剂并没有获得预期效果^[4]。最近,Kirby等^[5]报道核转录因子Nrf2(NF-E2-related factor 2)在突变的SOD1转基因鼠中存在调节异常。Nrf2作为调解抗氧化应答元件(antioxidant response element, ARE)的关键蛋白质,参与二相酶和抗氧化蛋白表达的调控。由此推测干预Nrf2/ARE信号通路可能成为ALS抗氧化治疗的新靶点。

3H-1,2-dithiole-3-thione (D3T)是一种二相酶诱导剂,用于化学致癌物引起的癌症的预防。它能够选择性作用于Nrf2-ARE通路,诱导二相解毒酶和抗氧化酶如:谷胱甘肽S转移酶(glutathione S-transferases, GST)、血红素加氧酶-1(heme oxygenase1, HO-1)、醌氧化还原酶(NADPH: quinone oxidoreductase, NQO1)的表达,提高细胞的抗氧化能力^[6]。为观察

D3T对选择性运动神经元丢失有无保护作用,我们利用器官型脊髓薄片培养技术建立了选择性运动神经元丢失的体外模型,以此为基础,对D3T干预下运动神经元存活数量和超微结构改变进行观察。

1 材料与方法

1.1 材料

D3T由美国Roswell Park Cancer Institute张岳生副教授惠赠,避光-20℃保存。Threo-hydroxyaspartate(THA)购于Sigma公司。马血清和Hank's液购于Gibco公司。Anti-neurofilament antibody (SMI-32)购于Stemberger Monoclonals公司。

1.2 器官型脊髓薄片培养

选用生后7天的SD乳鼠,在无菌的条件下断头取脊髓腰膨大部分,迅速分离神经根,用活组织切片机(Mickle Laboratory Engineering, Gomshall, Surrey, UK)将脊髓切成厚350 μm的薄片,将脊髓薄片转移至Gey's平衡盐溶液(含葡萄糖6.4 mg/ml)中,在显微镜下分离成单片后种植在插入式培养皿(30 mm Millicell-CM, Millipore公司)上,每孔5片,插入式培养皿放置在6孔板中,每孔加入1 ml培养液(含50% MEM, 25 mmol/L HEPES, 25%灭活马血清, 25%

收稿日期: 2006-04-26 接受日期: 2006-08-29

河北省自然科学基金资助项目(No.303487)

*通讯作者。Tel: 0311-87222725, Fax: 0311-87064024, E-mail:

LCY5@yahoo.com.cn

Hanks' 平衡盐溶液含 25.6 mg/ml 葡萄糖, 2 mmol/L 谷氨酰胺。培养液 pH=7.2)。培养板放入二氧化碳培养箱(37.0 °C, 5% CO₂+95% 空气, Sanyo)。每周更换两次培养液。

1.3 药物干预

正常培养一周后, 脊髓薄片度过修复期, 性状稳定^[7], 给予药物干预, THA 组于培养液中加入 100 μmol/L THA, D3T48h+THA 组于培养液中加入 D3T (浓度分别为 15、30 μmol/L, 溶于 DMSO 中), 48 h 后同时给予 100 μmol/L THA 和相应浓度的 D3T。D3T+THA 组于培养液中同时加入 D3T(浓度分别为 15、30 μmol/L)和 100 μmol/L THA。对照组加入正常培养液, 溶剂对照 DMSO 组培养液中加入 0.1%DMSO, 每组 10~15 片。培养 4 周后取材, 光镜标本用 4% 多聚甲醛固定 30 min, 0.1 mol/L PB 冲洗 3 次, 4 °C 保存。电镜标本采用 2.5% 戊二醛固定, 4 °C 保存。另外, 对正常培养一周的脊髓薄片分别给予 D3T(浓度分别为 15、30 μmol/L, 溶于 DMSO 中)、0.1%DMSO、正常培养液, 干预 48 h 后用免疫组化方法显示运动神经元, 计数 3 组(分别为 D3T48 h 组、DMSO48h 组、对照组)运动神经元的数量。

1.4 免疫组织化学染色

各组脊髓片于 0.05 mol/L TBS 中浸泡(30 min), 10% 正常马血清温育(37 °C, 30 min), 再以马抗 SMI-32 抗体(1:4 000)温育(24 h, 4 °C)。随后用 ABC 法相应二抗和三抗(北京中山生物技术有限公司)各作用 1 h。最后以 0.05% DAB-0.01% H₂O₂ 显色 10 min。停显后脱水、透明、封固, 光镜观察。TBS 代替一抗为阴性对照。

1.5 电镜观察

切取前角组织块 1% 锇酸后固定 1 h, 丙酮梯度脱水, PBS 冲洗, Epon812 包埋, 超薄切片机切片, 枸橼酸铅及醋酸双氧铀染色, 透射电子显微镜观察。

1.6 统计学方法

各组运动神经元数量采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 结果应用 SAS 6.12 统计软件进行统计学分析。

2 结果

2.1 运动神经元数量变化

正常培养的对照组脊髓薄片在体外存活良好, 运动神经元多集中于脊髓前角外侧, 胞体大, 核中位, 突起长而丰富(18.63 ± 4.67)个/片($n=10$, 图 1)。与对照组相比, DMSO 作为溶剂对运动神经元的生长无影响(17.79 ± 6.40)个/片($n=11$, 图 2)。THA 组(7.50

± 4.88)个/片($n=10$, 图 3)运动神经元数量与对照相比明显减少, 运动神经元胞体相对较小, 突起减少。15、30 μmol/L D3T48h+THA 组中运动神经元数量分别为(16.59 ± 5.37)个/片($n=12$, 图 4)和(17.34 ± 4.65)个/片($n=15$, 图 5), 与 THA 组相比明显增加, 均有统计学意义。15、30 μmol/L D3T+THA 组运动神经元数量分别为(7.86 ± 3.96)个/片($n=12$)和(7.89 ± 3.73)个/片($n=11$, 图 6)与 THA 组相比无统计学差异(图 7)。

另外, 正常培养 1 周再继续培养 48 h, 运动神经元数量为(21.75 ± 3.20)个/片($n=11$, 图 8), DMSO48h 组运动神经元数量为(19.43 ± 4.60)个/片($n=10$, 图 9), 两组之间无统计学差异, $P>0.05$ 。15、30 μmol/L D3T48h 组运动神经元数量分别为(20.43 ± 5.57)个/片($n=10$, 图 10)、(22.04 ± 4.21)个/片($n=10$, 图 11)与正常对照组相比无统计学差异, $P>0.05$ (图 12)。

2.2 运动神经元超微结构改变

正常培养的脊髓薄片腹角运动神经元胞体大, 胞浆丰富, 核周质富含线粒体、微管、微丝, 核大浅染, 染色质疏松。细胞器结构正常或轻度变性, 线粒体膜完整, 嵴清晰, 粗面内质网、高尔基体基本正常(图 13), 有的神经元可见粗面内质网轻度扩张。染色质分布均匀或有边集。核膜完整, 神经丝、微管等细胞骨架在胞浆中分布均匀, 突起内排列呈整齐的束状。THA 组前角运动神经元内出现大量空泡变性, 线粒体肿胀, 内质网和高尔基体扩张(图 14)。而 D3T48h+THA 组运动神经元超微结构改变较 THA 组减轻, 线粒体结构基本正常, 粗面内质网轻度扩张, 空泡变性不明显。核仁清楚, 核膜完整, 染色质分布均匀或略有边集(图 15)。

3 讨论

谷氨酸兴奋毒作用与 ALS 发病密切相关, ALS 病人脑脊液中谷氨酸浓度升高并存在谷氨酸转运异常^[8]。其原因目前认为是由于 ALS 病人脊髓前角 GluR2 mRNA 编码缺陷^[9]和谷氨酸转运体 EAAT2 选择性丢失^[10]。在体、离体实验也进一步证实, 一定浓度的谷氨酸兴奋毒作用能够引起选择性运动神经元损伤^[11]。我们用 100 μmol/L THA 干预体外培养的脊髓薄片也观察到同样的病理改变^[12]。本实验中 100 μmol/L THA 干预的脊髓薄片运动神经元明显减少, 突起少而稀疏。超微结构上发现神经元内出现大量空泡变性, 线粒体肿胀, 内质网和高尔基体扩张。从而证实一定浓度 THA 能够导致运动神经元存活减

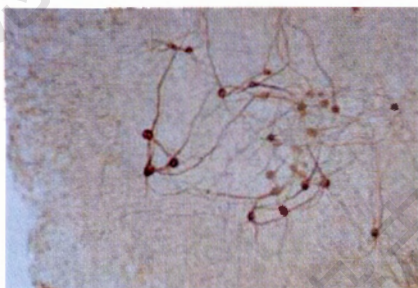


图1 对照组脊髓薄片腹角可见多个 SMI-32 阳性的运动神经元及丰富的突起(100 ×)

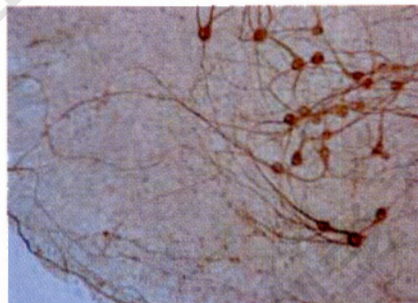


图5 30 μmol/L D3T48h+THA 组脊髓薄片腹角可见 SMI-32 阳性的运动神经元数目较 THA 组明显增加(100 ×)

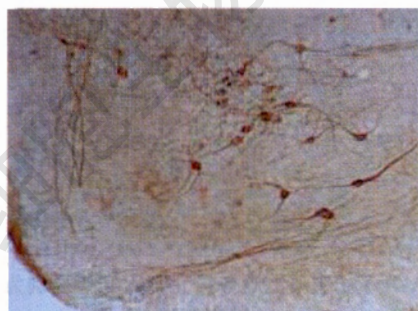


图2 DMSO 组脊髓薄片腹角可见多个 SMI-32 阳性的运动神经元及丰富的突起, 运动神经元数目与对照组相比无明显改变 (100 ×)



图6 30 μmol/L D3T+THA 组脊髓薄片腹角可见 SMI-32 阳性的运动神经元数目较 THA 组无明显增加(100 ×)



图3 THA 组脊髓薄片腹角可见 SMI-32 阳性的运动神经元数目较对照组明显减少(100 ×)

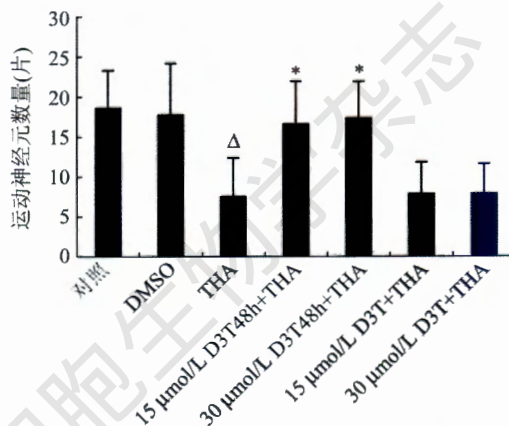


图7 D3T 对 THA 诱导的运动神经元损伤的影响($\bar{x} \pm s$) 与对照组相比, THA 组运动神经元数目明显减少, $\Delta P < 0.05$ 。与 THA 组比较, D3T48h+THA 组运动神经元数目明显增加, $*P < 0.05$ 。而 D3T+THA 组运动神经元数目无明显增加, $P > 0.05$ 。

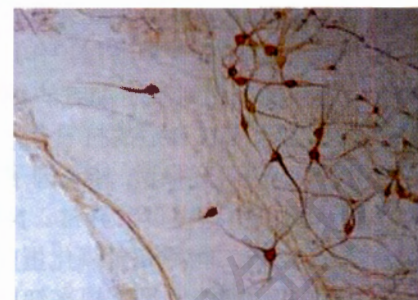


图4 15 μmol/L D3T48h+THA 组脊髓薄片腹角可见 SMI-32 阳性的运动神经元数目较 THA 组明显增加(100 ×)

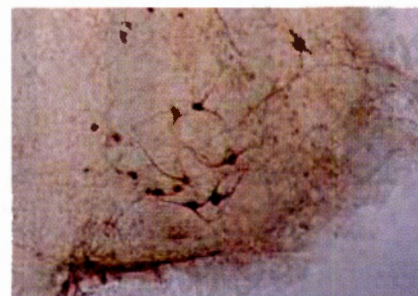


图8 对照组脊髓薄片腹角可见多个 SMI-32 阳性的运动神经元及突起 (100 ×)



图9 DMSO48h组脊髓薄片腹角可见多个SMI-32阳性的运动神经元及突起,运动神经元数目与对照组相比无明显改变(100×)

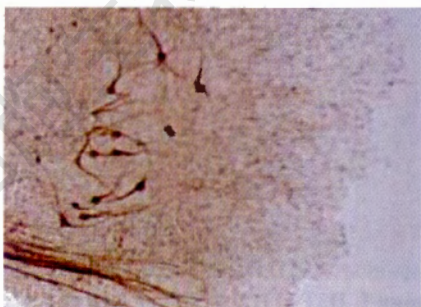


图10 15 μmol/L D3T48h组脊髓薄片腹角可见SMI-32阳性的运动神经元数目较对照组无明显改变(100×)



图11 30 μmol/L D3T48h组脊髓薄片腹角SMI-32阳性的运动神经元数目较对照组无明显改变(100×)

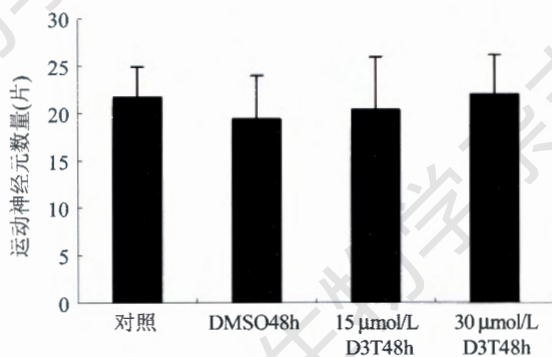


图12 D3T干预48h对运动神经元数量的影响($\bar{x} \pm s$)
与对照组相比, DMSO48h组运动神经元数目无明显增多或减少, $P > 0.05$ 。与对照组比较, D3T48h组运动神经元数目也无明显变化, $P > 0.05$ 。

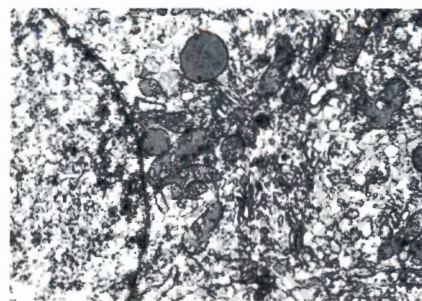


图13 对照组脊髓前角运动神经元超微结构正常(20K×)

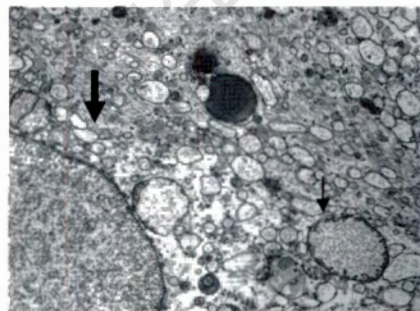


图14 THA组脊髓前角运动神经元超微结构表现为明显的空泡变性, ↓示空泡变性, ↓示线粒体肿胀(10K×)

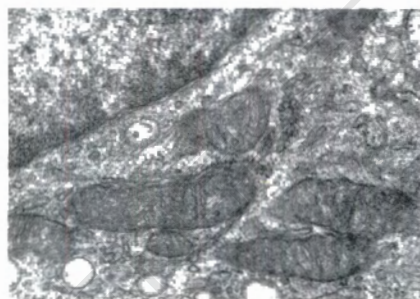


图15 30 μmol/L D3T48h+THA组前角运动神经元超微结构基本正常,有少量空泡,线粒体肿胀不明显(25K×)

少,超微结构损害。

在谷氨酸兴奋毒作用中,氧化应激的存在也不容忽视。氧化修饰谷氨酸转运体是导致谷氨酸转运功能下降的主要因素之一^[3],而且兴奋毒引起钙超载导致线粒体损伤自由基释放增多是神经元损伤的主要病理过程。给予抗氧化剂具有神经保护作用。但维生素E等抗氧化剂并没有达到治疗ALS的目的^[4]。所以研究人员一直致力于寻找合适的抗氧化剂能够用于ALS的治疗。最近的研究报道,转录因子Nrf2在突变的SOD1转基因鼠中存在调节异常。Nrf2作为ARE的关键蛋白质,参与二相酶和抗氧化蛋白表达的调控,上调Nrf2/ARE通路能够显著提高细胞的抗氧化能力^[6]。本实验应用的二相酶诱导剂D3T是一种从十字花科蔬菜中提取出来的化合物,现已证明D3T

与巯基有较强的亲和力, 所以能够与细胞内的 Keap1 上的巯基结合, 促进 Keap1 与 Nrf2 解离, 解离后的 Nrf2 磷酸化并向核内转移, 与 GST、NQO1、HO-1 等多种二相解毒酶和抗氧化酶基因上的共同序列 ARE 结合, 从而增加二相解毒酶和抗氧化酶的表达, 提高细胞的抗氧化能力^[13]。尽管 D3T 的半衰期很短, 但是由其诱导的酶的表达可持续升高几天^[6]。所以我们对 THA 诱导的运动神经元损伤给予 D3T 提前干预, 产生了保护运动神经元的作用, 运动神经元存活数量明显增加, 突起也较 THA 组丰富, 神经元超微结构损伤减轻。而且, 这种保护作用发挥在 THA 诱导的运动神经元损伤过程中, 正常培养一周脊髓片性状稳定, 故单纯在培养 1 周后给予 D3T 48 h 并没有发现明显的保护作用。我们推测 D3T 提前干预对 THA 诱导的运动神经元的保护作用是由于 D3T 提高了抗氧化酶的表达, 从而增加了细胞的抗氧化能力。而 D3T 与 THA 同时干预由于尚未诱导抗氧化酶的表达而 THA 的毒性作用已存在, 无法对抗 THA 的毒性作

用所以不能发挥保护作用。具体机制我们将在下一步证实。

总而言之, 本实验从形态学的角度证实了二相酶诱导剂 D3T 在谷氨酸兴奋毒引起的运动神经元损伤中的保护作用, D3T 能够提高运动神经元的存活, 所以上调 Nrf2/ARE 通路有望成为 ALS 治疗的新靶点。

参考文献 (References)

- [1] Cleveland DW *et al.* *Nat Rev Neurosci*, 2001, **2**: 806
- [2] Bogdanov M *et al.* *Free Radic Biol Med*, 2000, **29**: 652
- [3] Rao SD *et al.* *J Neurosci*, 2003, **23**: 2627
- [4] Desnuelle C *et al.* *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*, 2001, **2**: 9
- [5] Kirby J *et al.* *Brain*, 2005, **128**: 1686
- [6] Kwak MK *et al.* *Mol Cell Biol*, 2002, **22**: 2883
- [7] Rothstein JD *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**: 6591
- [8] Rothstein JD *et al.* *N Engl J Med*, 1992, **326**: 1464
- [9] Takuma H *et al.* *Ann Neurol*, 1999, **46**: 806
- [10] Rothstein JD *et al.* *Ann Neurol*, 1995, **38**: 73
- [11] Vandenberghe W *et al.* *J Neurosci*, 2000, **20**: 123
- [12] 刘卫刚等. *细胞生物学杂志*, 2004, **26**: 635
- [13] Zhang Y *et al.* *Mol Cancer Ther*, 2004, **3**: 885

Neuroprotective Potential of Phase II Enzyme Inducer D3T on Motor Neuron Survival *in Vitro*

Xiao-Yun Liu¹, Hui Bu¹, Zhe Li¹, Bin Li¹, Meng-Meng Sun¹, Chun-Yan Li^{1,2*}

¹Neurology Department of the Second Hospital of Hebei Medical University,

²Cardio-cerebral Vascular Research Institute of Hebei Province, Shijiazhuang 050000, China)

Abstract In this study, we want to investigate the role of phase II enzyme inducer 3H-1,2-dithiole-3-thione (D3T) on motor neuron survival. The organotypic spinal cord cultures were prepared from 7 day old rat pup lumbar spinal cords. Lumbar spinal cords were collected under sterile conditions, sectioned transversely at 350 μm intervals. Slices were placed on the inserts. After 1 week in culture, the threo-hydroxyaspartate (THA) group, treated with THA alone to achieve a final concentration of 100 $\mu\text{mol/L}$. For the D3T48h+THA group, tissues were treated with D3T to achieve a final concentration of 15, 30 $\mu\text{mol/L}$, 48 hour later, the same concentration D3T and 100 $\mu\text{mol/L}$ THA were added to the medium. For the D3T+THA group, tissues were treated with D3T to achieve a final concentration of 15, 30 $\mu\text{mol/L}$ and 100 $\mu\text{mol/L}$ THA were added simultaneously. 0.1%DMSO was added to the drug solubilizer control, no drugs added to the control group. After 4 weeks in culture, tissue were harvested, the number of motor neurons and the ultrastructure of motor neuron were observed by immunohistochemistry and electromicrography. We also compared D3T48h (add D3T 48 h after 7 day culture) group with control (no drug add after 7 day culture) by counting the number of motor neuron. The results showed that D3T can prevent THA-induced motor neuron death, increase motor neuron survival. It suggested that D3T have neuroprotective potential on THA-induced motor neuron death. Phase II enzyme inducer may provide a novel neuroprotective strategy for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis.

Key words amyotrophic lateral sclerosis; 3H-1,2-dithiole-3-thione; motor neuron; spinal cord

Received: April 24, 2006 Accepted: August 29, 2006

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

*Corresponding author Tel: 86-311-87222725, Fax: 86-311-87064024, E-mail: LCY5@yahoo.com.cn