

脂多糖对脊髓前角运动神经元的损伤作用

李彬¹ 董惠^{1,2} 李哲¹ 卜晖^{1,2} 刘晓云^{1,2} 孙萌萌¹ 李春岩^{1,2*}

(1 河北医科大学第二医院神经内科, 石家庄 050000; 2 河北省心脑血管病研究所, 石家庄 050000)

摘要 研究脂多糖(LPS)诱导的炎症反应对运动神经元的损伤作用及其机制。采用SD乳鼠脊髓器官型培养,分为单纯培养液组和不同浓度LPS组,应用免疫组化、酶活性测定、电镜等技术衡量神经元损伤程度。对LPS组分别给予细胞内钙离子螯合剂BAPTA-AM和NADPH氧化酶抑制剂apocynin,观察运动神经元数量和形态变化。结果显示LPS可以引起剂量和时间依赖性的运动神经元数量减少和培养液中乳酸脱氢酶含量增高,运动神经元超微结构改变明显,中间神经元损伤相对较轻。运动神经元缺乏钙网膜蛋白表达,而BAPTA-AM减轻运动神经元损伤,提示钙离子缓冲能力较低是其较易受损的原因之一。LPS可以引起NADPH氧化酶活性增高,而apocynin对LPS引起的运动神经元丢失有保护作用,说明NADPH氧化酶在炎症介导的运动神经元损伤中发挥着关键作用。

关键词 肌萎缩侧索硬化; 器官型培养; 脂多糖; 运动神经元; NADPH氧化酶

肌萎缩侧索硬化(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)是以选择性运动神经元受损为特点的慢性进行性变性疾病,目前病因及发病机制尚不十分清楚。越来越多的证据显示,运动神经元的选择性丢失并非细胞自主性的^[1-3]。在ALS患者和人类突变SOD1转基因鼠脊髓组织中,存在大量激活的小胶质细胞、反应性星型胶质细胞、炎性细胞因子以及趋化因子等^[4-7],并且ICAM-1表达增多和小胶质细胞激活等出现在大量运动神经元丢失之前^[5]。对ALS患者血清、皮肤及肌肉的分析结果显示机体存在广泛的炎症反应^[8-12]。在SOD1^{G37R}转基因小鼠中,给予脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)腹腔注射,激活天然免疫系统,可加速疾病的进展^[13]。这些均提示炎症反应可能参与了运动神经元损伤,但其确切作用及具体机制还不明确。

LPS是革兰氏阴性杆菌细胞壁的主要成分,通过Toll样受体4,激活机体的天然防御系统,引起炎症反应。本研究应用LPS,利用器官型脊髓薄片培养技术建立了炎症介导的运动神经元损伤的体外模型,并以此为基础,探讨运动神经元的损伤机制,为开发新的治疗策略提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料

马血清、Hanks'平衡盐液、最小基础培养基

(Gibco), LPS (Sigma), BAPTA-AM (Alexis), apocynin (Merck), 小鼠抗非磷酸化神经丝单克隆抗体 SMI-32 (Sternberger Monoclonals), 山羊抗钙(视)网膜蛋白(calretinin)多克隆抗体、兔抗p47^{phox}多克隆抗体和小鼠抗β-肌动蛋白多克隆抗体(Santa Cruz), 生物素化马抗小鼠IgG、兔抗山羊IgG和SABC试剂(Vector), DAB显色试剂盒(北京中山化学试剂公司), LDH测定试剂盒(南京建成生物工程研究所), BCA蛋白定量试剂盒(Novagen)。

1.2 脊髓器官型培养

参照Rothstein等^[14]及本室建立的方法^[15],将7日龄SD乳鼠在无菌条件下断头取出脊髓,解剖显微镜下迅速分离神经根,用活组织切片器(Mickle Laboratory Engineering, Gomshall, Surrey, UK)将腰段脊髓切成350 μm厚的薄片,将脊髓薄片转移到Gey's平衡盐液(含葡萄糖6.4 mg/ml)中分离成单片,6孔培养板内每孔加入1 ml培养液(50%MEM含25 mmol/L HEPES, 25%热灭活马血清, 25%Hanks'平衡盐液含25.6 g/L葡萄糖、2 mmol/L谷氨酰胺),并放置Millicell-CM insert,用吸管将脊髓片移至insert上,每孔5片,移去insert膜表面多余的液体,放入CO₂培

收稿日期: 2007-09-24 接受日期: 2007-11-12

国家自然科学基金资助项目(No.30670732)

*通讯作者。Tel/Fax: 0311-87064024, E-mail: hblicy5@yahoo.com.cn

养箱(37 °C, 5%CO₂+95% 空气)培养, 每周换液 2 次。

1.3 药物干预

培养 1 周后, 脊髓薄片度过修复期, 性状稳定^[14], 进行干预。对照组为单纯培养液, LPS 组则在培养 1 周后加入 LPS, 使培养液中 LPS 的终浓度分别为 1、10、30、60 μg/ml, 各组分别于培养后 2、3、4 周时取 3 个 insert 上的 15 个脊髓片计数脊髓腹角运动神经元数量和背角中间神经元数量。并收集各时间点培养液, 于 -20 °C 保存待测。

选取 30 μg/ml LPS 组进行药物干预实验。脊髓片体外培养 1 周后, 分别给予单纯培养液、LPS(30 μg/ml)、细胞内钙离子螯合剂 BAPTA-AM(10 μmol/L)加 LPS(30 μg/ml)和 NADPH 氧化酶抑制剂 apocynin (0.5 mmol/L)加 LPS(30 μg/ml), 干预 2 周后用免疫组化方法显示运动神经元, 计数各组(每组 15 片)运动神经元数量。

1.4 脊髓片免疫组化染色

培养后的脊髓片以 4% 甲醛固定 30 min, 0.1 mol/L PB 漂洗 3 次, 0.05 mol/L TBS 中浸泡 30 min, 10% 马血清封闭 1 h, SMI-32 (1 : 4 000)或抗钙(视)网膜蛋白抗体(1 : 60) 4 °C 摇床过夜, 次日 TBS 洗 3 次, 每次 10 min, 加生物素化马抗小鼠 IgG (1 : 1 000)或生物素化兔抗山羊 IgG (1 : 200)1 h, TBS 洗 3 次, 每次 10 min, SABC 1 h, TBS 洗 3 次, 每次 10 min, DAB 显色, 终止显色后脱水、透明、封片。TBS 代替一抗为阴性对照。具备 3 个标准者(位于脊髓腹侧、SMI-32 阳性、胞体直径大于 25 μm)为运动神经元。位于脊髓背角, 钙(视)网膜蛋白阳性者定为中间神经元。10× 物镜下计数每个脊髓片前角运动神经元数量, 40× 物镜下测定 4 个 0.015625 mm² 大小视野面积下后角中间神经元的数量。

1.5 培养液中乳酸脱氢酶(LDH)含量测定

利用 LDH 检测试剂盒, 测定培养 2、3 和 4 周时培养液中 LDH 含量。原理为 LDH 能催化乳酸生成丙酮酸, 丙酮酸与 2, 4-二硝基苯肼反应生成丙酮酸二硝基苯腙, 在碱性溶液中呈棕红色, 通过比色可求出酶活力。操作步骤严格按试剂盒说明进行。

1.6 电镜观察

随机抽取体外培养 3 周的单纯培养液组和 30 μg/ml LPS 组脊髓片, 每组 2 片, 迅速切出腹角和背角, 分入戊二醛前固定 4 h, 磷酸盐缓冲液冲洗, 1% 锇酸后固定 2 h, 丙酮梯度脱水, Epon812 包埋, 超薄切片机切片, 枸橼酸铅及醋酸双氧铀染色, 透射电镜观察。

1.7 Western 印迹

提取培养 3 周的单纯培养液组、30 μg/ml LPS 组及 0.5 mmol/L apocynin 和 30 μg/ml LPS 同时干预组脊髓薄片组织的胞浆、胞膜蛋白, BCA 法测定蛋白质浓度, SDS-PAGE 分离蛋白质, 湿转法将蛋白质从凝胶中转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 加入兔抗 p47phox 多克隆抗体(1 : 200)及小鼠抗 β-肌动蛋白多克隆抗体(1 : 1 000), 4 °C 温育过夜, TPBS 漂洗 5 次, 加入相应的荧光标记二抗, 室温温育 1 h, TPBS 漂洗 4 次, PBS 漂洗 1 次洗去 Tween-20, 用 Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR)在 700、800 μm 波长下检测信号强度。

1.8 统计学分析

数据表示用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$), 采用 SPSS13.0 统计软件进行统计学分析。

2 结果

2.1 运动神经元及中间神经元数量变化

正常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, 突起长而丰富(图 1A)。1 μg/ml LPS 组各时点运动神经元数量无显著变化, 10 μg/ml LPS 组运动神经元数量随时间延长而逐渐减少, 在培养 4 周后与对照组比较有显著性差异, 而 30、60 μg/ml LPS 组分别在培养 3 周和 2 周后出现运动神经元数量的减少(图 1B, 图 2), 部分运动神经元的胞体形态不规则, 突起较短(图 1B)。而脊髓背角中间神经元数量及形态无明显变化(图 3)。

为了进一步明确背角中间神经元的存活情况, 对脊髓薄片进行了钙(视)网膜蛋白染色。可见脊髓背角有大量胞浆内棕黄色着色的中、小体积的中间神经元, 圆形或椭圆形, 细胞排列紧密, 有重叠, 腹角钙(视)网膜蛋白染色多为阴性, 偶见数个小的神经元着色(图 4)。1、10、30 μg/ml LPS 组在培养 2~4 周以及 60 μg/ml LPS 组在培养 3 周内背角中间神经元数量与对照组相比无显著变化(图 5, 图 6), 60 μg/ml LPS 组中间神经元数量在培养 4 周后开始减少(图 6)。

2.2 培养液中 LDH 含量

正常对照组各时点培养液中 LDH 含量无显著性变化, 而 LPS 组随应用剂量及时间的增加, LDH 含量逐渐升高。10 μg/ml LPS 组在培养 4 周后出现 LDH 含量增高, 而 30、60 μg/ml LPS 组 LDH 在培养后 3

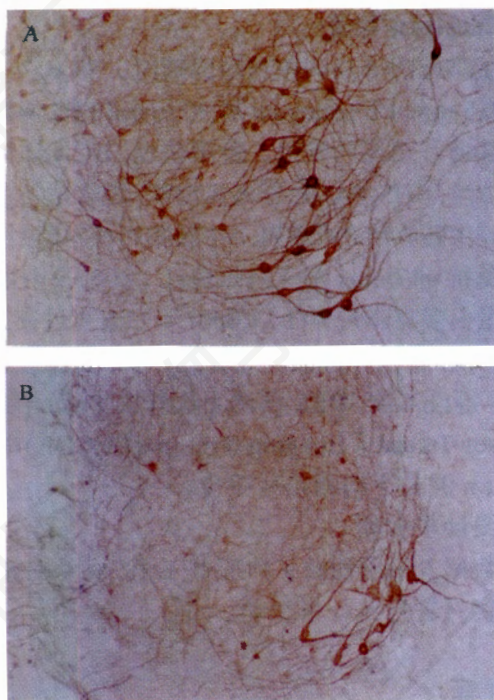


图1 脊髓薄片腹角运动神经元 SMI-32 免疫组化染色(100×)
A: 对照组(培养3周); B: 30 µg/ml LPS 组(培养3周)。

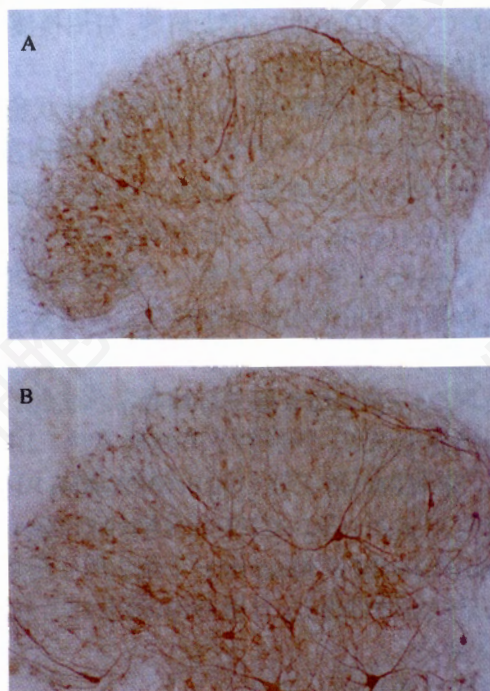


图3 脊髓薄片背角中间神经元 SMI-32 免疫组化染色(100×)
A: 对照组(培养3周); B: 30 µg/ml LPS 组(培养3周)。

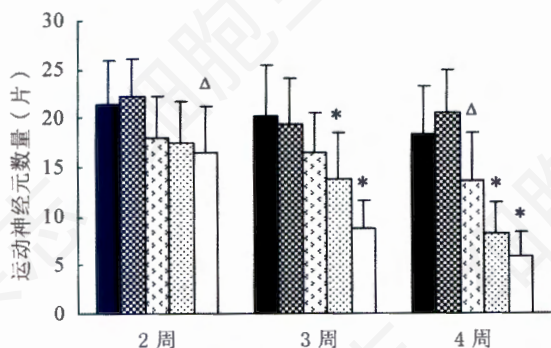


图2 各组各时点脊髓腹角运动神经元计数($\bar{x} \pm s$, $n=15$)
■: 对照组; ▨: 1 µg/ml LPS; ▩: 10 µg/ml LPS; ▤: 30 µg/ml LPS; □: 60 µg/ml LPS。与对照组相比, $\Delta P < 0.05$; 与对照组相比, $* P < 0.01$ 。

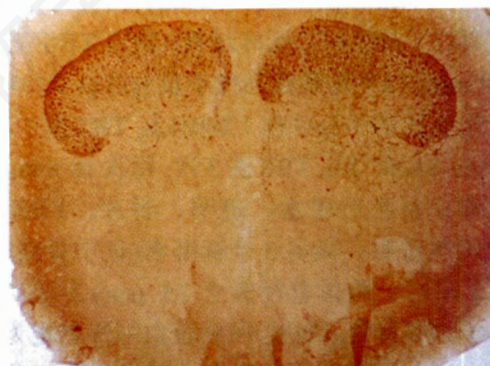


图4 脊髓薄片背角中间神经元钙(视)网膜蛋白免疫组化染色(40×)

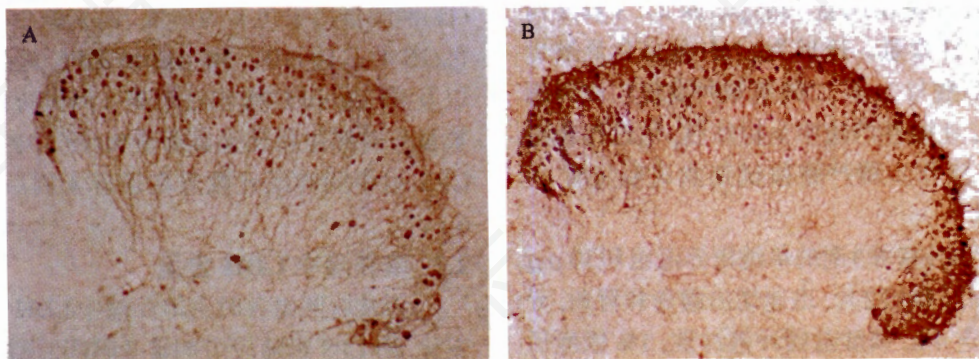


图5 脊髓薄片背角中间神经元 calretinin 免疫组化染色(100×)
A: 对照组(培养3周); B: 30 µg/ml LPS 组(培养3周)。

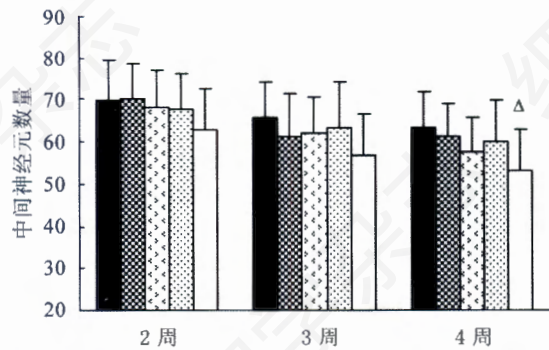


图6 各组各时点脊髓背角中间神经元计数($\bar{x} \pm s$, $n=15$)

■: 对照组; ▨: 1 µg/ml LPS; ▩: 10 µg/ml LPS; ▪: 30 µg/ml LPS; □: 60 µg/ml LPS。与对照组相比, $\Delta P < 0.05$ 。

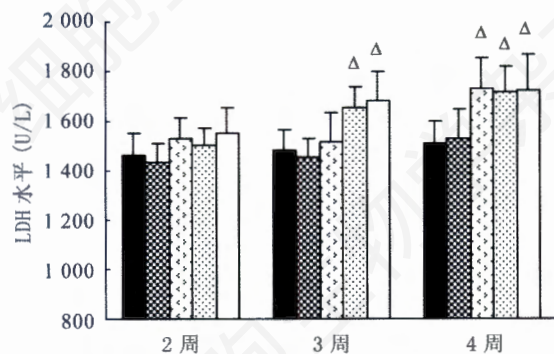


图7 各组各时点培养液中LDH水平($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

■: 对照组; ▨: 1 µg/ml LPS; ▩: 10 µg/ml LPS; ▪: 30 µg/ml LPS; □: 60 µg/ml LPS。与对照组相比, $\Delta P < 0.05$ 。

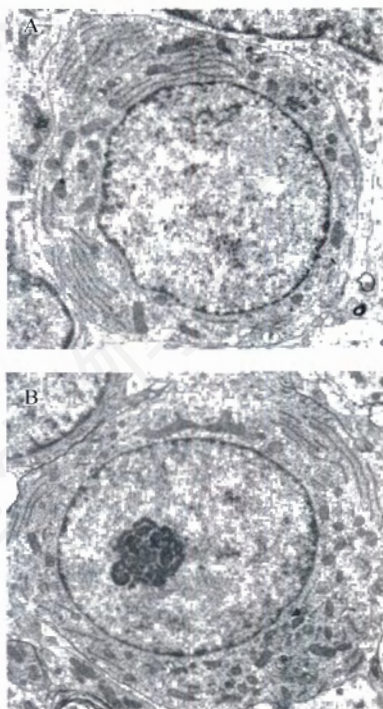


图8 脊髓薄片背角中间神经元超微结构(6 000 \times)

A: 对照组(培养3周); B: 30 µg/ml LPS组(培养3周)。

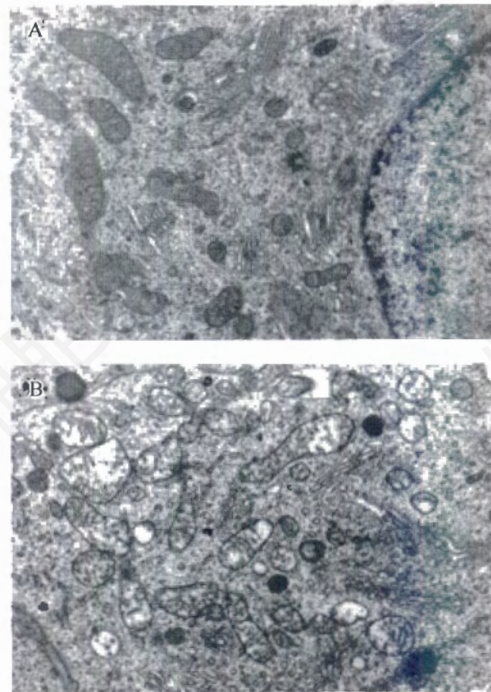


图9 脊髓薄片腹角运动神经元超微结构(12K \times)

A: 对照组(培养3周); B: 30 µg/ml LPS组(培养3周)。

周即开始增高,与对照组比较有显著性差异(图7)。

2.3 超微结构改变

对照组和30 µg/ml LPS组培养3周后背角中间神经元形态正常(图8)。对照组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。线粒体膜完整,嵴清晰,粗面内质网、高尔基体基本正常(图9A),有的神经元可见高尔基体轻度扩张,核膜完整,核仁清楚,染色质分布均匀或有边集,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。LPS组腹角运动神经元空泡变性,线粒体肿胀、嵴断裂,内质网和高尔基体扩张(图9B),有的神经元胞核染色质边集,胞浆电子密度增加。

2.4 BAPTA-AM干预后运动神经元数量变化

脊髓薄片体外培养1周后,同时应用10 µmol/L BAPTA-AM和30 µg/ml LPS进行干预,与单纯应用LPS组相比,运动神经元存活数量明显增加,胞体形态规则,突起增多(图10)。

2.5 NADPH氧化酶亚基p47phox含量的变化

Western结果显示,应用30 µg/ml LPS组,胞膜蛋白p47phox含量明显增加,与对照组相比差异有统计学意义,而胞浆蛋白p47phox含量变化不明显,与对照组相比差异无显著性;0.5 mmol/L apocynin和

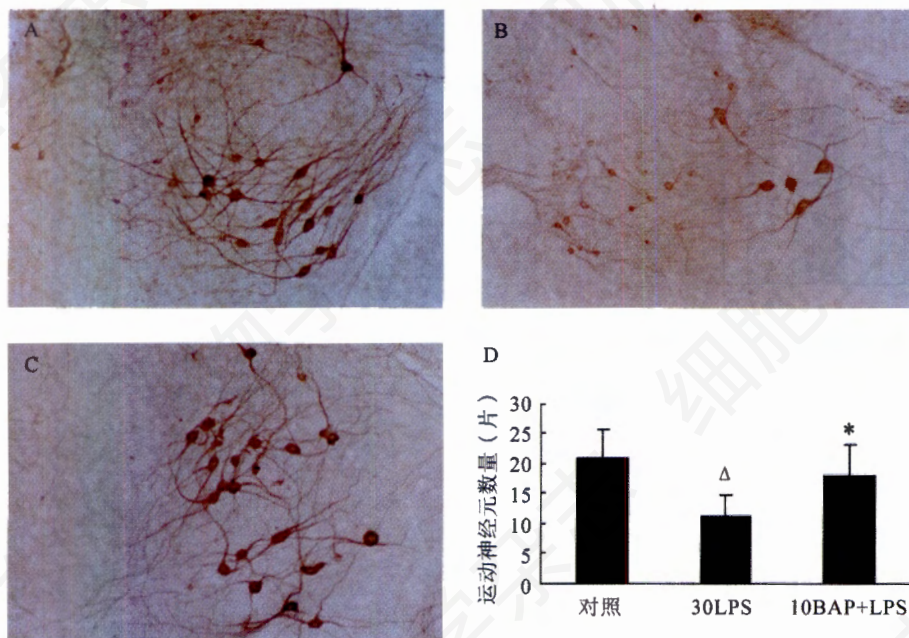


图10 BAPTA-AM对LPS诱导的运动神经元损伤的影响

A~C: 脊髓薄片腹角运动神经元 SMI-32 免疫组化染色(100×)。A: 对照组; B: 30 μg/ml LPS组; C: 10 μmol/L BAPTA-AM 和 30 μg/ml LPS 同时干预组; D: 各组脊髓腹角运动神经元计数($\bar{x} \pm s$, n=15)。与对照组相比, $\Delta P < 0.01$; 与 30LPS 组相比, $* P < 0.01$ 。30LPS: 30 μg/ml LPS; 10BAP+LPS: 10 μmol/L BAPTA-AM+30 μg/ml LPS。

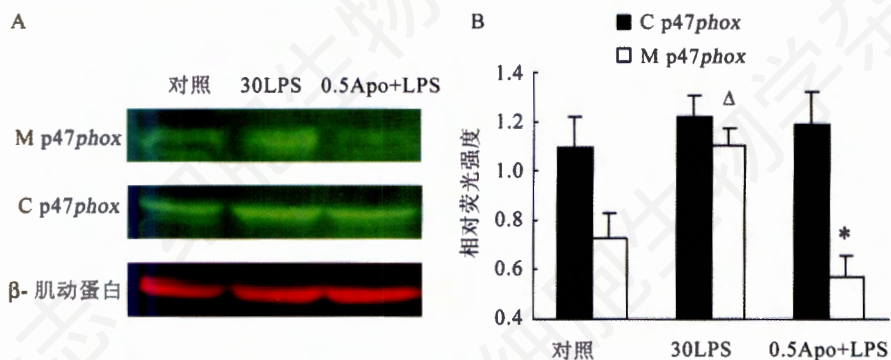


图11 Western 印迹法分析 p47phox 水平

A、B: LPS 和 apocynin 干预后对培养脊髓薄片组织胞浆、胞膜蛋白 p47phox 的影响。与对照组相比, $\Delta P < 0.01$; 与 30LPS 组相比, $* P < 0.01$ 。30LPS: 30 μg/ml LPS; 0.5Apo+LPS: 0.5 mmol/L apocynin+30 μg/ml LPS。M p47phox: membranous p47phox; C p47phox: cytosolic p47phox。

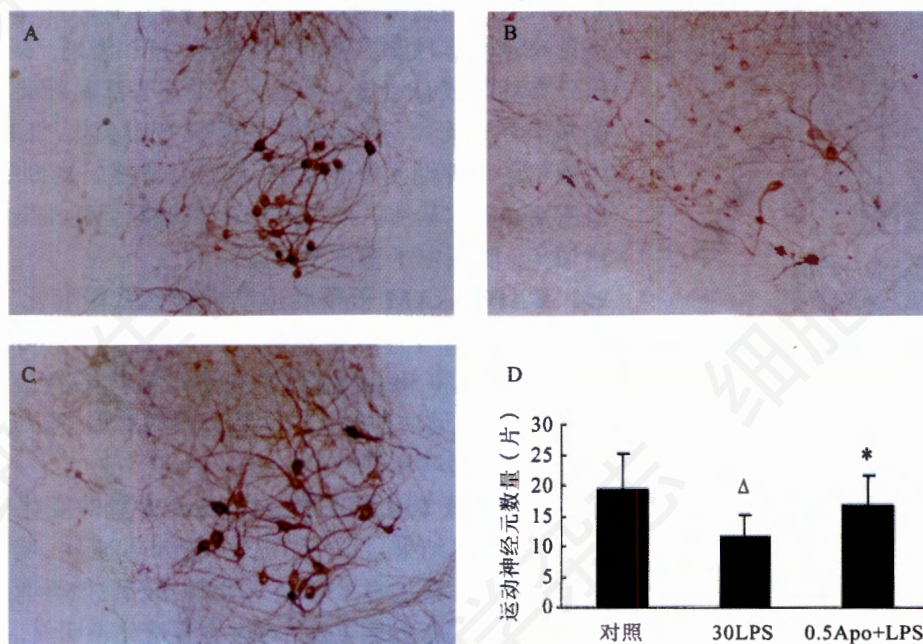


图12 Apocynin 对 LPS 诱导的运动神经元损伤的影响

A~C: 脊髓薄片腹角运动神经元 SMI-32 免疫组化染色(100×)。A: 对照组; B: 30 μg/ml LPS组; C: 0.5 mmol/L apocynin 和 30 μg/ml LPS 同时干预组; D: 各组脊髓腹角运动神经元计数($\bar{x} \pm s$, n=15)。与对照组相比, $\Delta P < 0.01$; 与 30LPS 组相比, $* P < 0.01$ 。30LPS: 30 μg/ml LPS; 0.5Apo+LPS: 0.5mmol/L apocynin+30 μg/ml LPS。

30 $\mu\text{g/ml}$ LPS 同时干预组, 胞膜蛋白 p47phox 含量与 LPS 组相比明显减少, 差异有统计学意义(图 11)。

2.6 Apocynin 干预后运动神经元数量变化

为了进一步明确 NADPH 氧化酶在炎症介导的运动神经元损伤中的作用, 我们观察了 30 $\mu\text{g/ml}$ LPS 组应用 apocynin 干预后运动神经元的数量及形态改变。结果显示, 同时应用 0.5 mmol/L apocynin 组, 比单纯应用 LPS 组, 运动神经元数量增加, 胞体形态良好, 突起较丰富(图 12)。

3 讨论

近年来的研究显示神经炎症是 ALS 发病机制中的关键事件之一^[16,17], 在神经变性疾病的病程进展过程中可能发挥着至关重要的作用^[18]。抗炎药物米诺环素显著延长了人类 ALS 动物模型 SOD1^{G37R} 转基因小鼠的生存期^[19], 更引起了人们对该领域研究的重视。

适当的炎症反应可以促进组织修复, 然而, 当炎症反应过度或长期持续存在时, 则可能加重组织损伤。本实验采用脊髓器官型培养技术研究炎症反应与神经毒性的关系, 此种培养方法保留有完整的脊髓水平组织结构和细胞间突触联系, 较单细胞培养更接近在体生理环境, 是探讨脊髓病理生理改变的一条重要途径。我们在脊髓薄片培养液中持续加入不同浓度的 LPS, 可以引起剂量、时间依赖性的脊髓腹角 SMI-32 阳性的运动神经元数量减少和培养液中 LDH 含量升高, 而背角中间神经元的损伤相对较轻, 超微结构观察也进一步证实了上述结果。从而证实一定程度的炎症反应能够导致运动神经元存活数量减少, 超微结构损害。30 $\mu\text{g/ml}$ LPS 作用 2 周后, 可引起 SMI-32 阳性运动神经元减少, 而并不影响中间神经元的存活, 与 ALS 的病理特点相一致, 可用作制备 ALS 的脊髓器官型培养模型。在后续的研究中, 我们采用该剂量 LPS 进行干预, 探讨炎症介导的运动神经元损伤的作用机制以及药物干预治疗。

在本实验中, 我们观察到运动神经元较中间神经元对炎症介导的神经毒性更易感, 推测运动神经元对钙离子缓冲能力较低是其较易受损的原因之一。钙(视)网膜蛋白对钙离子具有很强的缓冲能力, 免疫组化结果显示运动神经元缺乏钙(视)网膜蛋白表达, 而中间神经元钙(视)网膜蛋白高表达, 支持上述观点。此外, 我们还应用了一种细胞内钙离子螯合剂 BAPTA-AM, 与 LPS 同时进行干预, 结果运动神经元受损程度明显减轻, 存活数量增加, 进一步验证了钙

离子缓冲能力的高低是决定神经元对炎症介导的毒性作用易感性的重要因素之一。

NADPH 氧化酶, 即尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶, 由多个亚基组成。在某些因素的刺激下, 其胞浆中的亚单位 p47phox、p67phox 等转位到胞膜上, 并与膜上的亚单位 gp91phox 和 p22phox 结合, 形成具有催化活性的酶复合体, 生成超氧阴离子(O_2^-)。而 O_2^- 又可转化生成 H_2O_2 、 $\cdot\text{OH}$ 和 HOCl 等活性氧(ROS), 直接作用于线粒体, 损伤神经元。部分 O_2^- 与 NO 反应生成毒性更强的过氧化亚硝酸盐(ONOO^-), 造成更加严重的神经元损伤。另外, NADPH 氧化酶来源的 ROS 可以调控与免疫炎症相关的基因表达, 导致神经免疫炎症因子 TNF- α 等的产生^[20]。因此认为 NADPH 氧化酶在氧化应激和炎症反应中均发挥着关键作用, 而这两者又参与了 ALS 运动神经元损伤的病理过程。由此推测, NADPH 氧化酶有可能介导了对运动神经元的毒性作用。新近的研究报道, NADPH 氧化酶在 ALS 患者和 SOD1^{G93A} 转基因鼠脊髓中被激活^[21]。

本实验中, 我们发现应用 LPS 后, 胞膜中 p47phox 含量明显增加, 表明在脊髓薄片培养中加入 LPS 可引起 NADPH 氧化酶活性增高。并且进一步对 LPS 诱导的炎症反应介导的运动神经元损伤给予 NADPH 氧化酶的特异性抑制剂 apocynin 进行干预, 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 LPS 组丰富。蛋白质印迹结果显示, apocynin 可以抑制 p47phox 亚基从胞浆转位到胞膜, 从而抑制 NADPH 氧化酶的激活, 减少 ROS 的产生, 进而阻断过量 ROS 的直接毒性作用及其信号转导作用, 发挥减轻运动神经元损伤的作用。本研究证明了 NADPH 氧化酶在炎症介导的运动神经元损伤中的关键作用, 并提示抑制 NADPH 氧化酶的过度激活可能成为 ALS 治疗的新切入点。

参考文献(References)

- [1] Lino MM *et al.* *J Neurosci*, 2002, **22**: 4825
- [2] Clement AM *et al.* *Science*, 2003, **302**: 113
- [3] Boillée S *et al.* *Science*, 2006, **312**: 1389
- [4] Henkel JS *et al.* *Ann Neurol*, 2004, **55**: 221
- [5] Alexianu ME *et al.* *Neurology*, 2001, **57**: 1282
- [6] Sasaki S *et al.* *Neurosci Lett*, 2000, **291**: 44
- [7] Nguyen MD *et al.* *Ann Neurol*, 2001, **50**: 630
- [8] Baron P *et al.* *Muscle Nerve*, 2005, **32**: 541
- [9] Losy J *et al.* *Neurol Neurochir Pol*, 2001, **35**: 57
- [10] Poloni M *et al.* *Neurosci Lett*, 2000, **287**: 211
- [11] Murakami N *et al.* *Muscle Nerve*, 1999, **22**: 889

- [12] Ono S *et al. J Neurol Sci*, 2001, **187**: 27
[13] Nguyen MD *et al. J Neurosci*, 2004, **24**: 1340
[14] Rothstein JD *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**: 6591
[15] 刘晓云等. *细胞生物学杂志*, 2007, **29**: 135
[16] McGeer PL *et al. Muscle Nerve*, 2002, **26**: 459
[17] Weydt P *et al. Neuroreport*, 2005, **16**: 527
[18] Block ML *et al. Prog Neurobiol*, 2005, **76**: 77
[19] Kriz J *et al. Neurobiol Dis*, 2002, **10**: 268
[20] Qin L *et al. J Biol Chem*, 2004, **279**: 1415
[21] Wu DC *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**: 12132

Lipopolysaccharide-induced Motor Neuron Injury in the Anterior Horn of Spinal Cord

Bin Li¹, Hui Dong^{1,2}, Zhe Li¹, Hui Bu^{1,2}, Xiao-Yun Liu^{1,2}, Meng-Meng Sun¹, Chun-Yan Li^{1,2*}

¹Department of Neurology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China;

²Cardiocerebrovascular Disease Institute of Hebei Province, Shijiazhuang 050000, China)

Abstract The present study was undertaken to investigate the mechanisms involved in lipopolysaccharide (LPS)-induced motor neuron injury. Organotypic spinal cord slice cultures were treated with medium alone or LPS with different concentrations. Neuron injury was measured using immunohistochemistry, enzyme activity assay and electromicroscopy. In addition, LPS group was treated with BAPTA-AM and apocynin respectively, and motor neuron survival was evaluated by SMI-32 immunohistochemistry. The results showed that LPS could induce dose- and time- dependent loss of motor neurons and elevation of LDH concentrations in the culture medium. The ultra-structure of motor neurons showed obvious changes. In contrast, interneurons in the dorsal horn were impaired slightly. Motor neuron lacked the expression of calretinin, and BAPTA-AM ameliorated motor neuron injury, indicating that the low capacity of Ca²⁺ buffering is one of the factors responsible for the vulnerability of motor neurons. NADPH oxidase was activated upon LPS challenge and apocynin had neuroprotective potential on LPS-induced motor neuron death, suggesting that NADPH oxidase may play an important role in inflammation-mediated motor neuron injury.

Key words amyotrophic lateral sclerosis; organotypic culture; lipopolysaccharide; motor neuron; NADPH oxidase

Received: September 24, 2007

Accepted: November 12, 2007

This work was supported by the Natural Science Foundation of China (No.30670732)

*Corresponding author. Tel/Fax: 86-311-87064024, E-mail: hblicy5@yahoo.com.cn