

肌萎缩侧索硬化患者血清对器官型培养脊髓片的影响

李春岩 王晓娟 宋学琴 王丽琴 肖向建 刘卫刚 马峥

【摘要】目的 观察肌萎缩侧索硬化(ALS)患者的血清对器官型培养的脊髓片的影响,探讨ALS运动神经元损伤的机制。方法 取120只生后8d乳鼠的腰段脊髓切片240片做器官型培养,在培养液中分别加入健康对照血清(对照组120片)和含有较高浓度谷氨酸(Glu)的ALS患者血清(ALS组120片),培养4周,计数脊髓前角运动神经元和后角中间神经元的数目,琥珀酸脱氢酶(SDH)染色观察线粒体酶活性改变,测定培养液中乳酸脱氢酶(LDH)、Glu、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)的含量,两组间进行比较。结果 对照组脊髓片在体外生长良好,运动神经元(约15个/张脊髓片)和后角中间神经元(约40个/ 2.5mm^2)的数目稳定。而ALS组的脊髓片在培养4周时前角运动神经元的数目明显减少(约7个/张脊髓片),SDH染色明显减弱。用ALS患者血清干预后,培养液中LDH、MDA的含量在培养3周后较对照组分别升高了22.4%和48.2%,而SOD则下降了12.6%;ALS组培养液中的Glu含量在各时点均较对照组显著升高($P < 0.01$)。结论 Glu兴奋毒、自由基损伤在ALS的发病中起重要作用,脊髓的器官型培养技术为ALS损伤机制的探讨提供了有效手段。

【关键词】 肌萎缩侧索硬化; 脊髓; 谷氨酸; 自由基

Effects of serum in patient with amyotrophic lateral sclerosis on organotypic spinal cord cultures
LI Chun-yan*, WANG Xiao-juan, SONG Xue-qin, WANG Li-qin, XIAO Xiang-jian, LU Wei-gang, MA Zheng. *Department of Neurology, Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the effects of serum from a patient with amyotrophic lateral sclerosis (ALS) on organotypic spinal cord cultures and to study some mechanisms of selective motor neuron damage in ALS. **Methods** 240 organotypic spinal cord cultures were prepared using lumbar spinal cord slices from 120 8-day-old rats. Serum from healthy individual or ALS patient with high level of glutamate (Glu) was continuously added into the culture medium for 4 weeks. Ventral motor neurons survival was evaluated by monoclonal antibody SM F32, a nonphosphorylated neurofilament marker, immunohistochemistry staining, and interneurons in dorsal horn were identified by monoclonal anti-calretinin staining compared with controls. Mitochondrial function was observed by succinate dehydrogenase (SDH) enzyme chemical staining. Lactate dehydrogenase (LDH), Glu, super oxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) levels in culture medium were also measured. **Results** The spinal cord explants in control group could maintain an excellent organotypic cellular organization and a stable population of ventral motor neurons (about 15 motor per explant). However, the treatment for 4 weeks with patient's serum produced a significant loss of motor neurons (about 7 motor per explant) as compared with controls. The number of interneurons in the dorsal horn showed no significant difference and mitochondrial SDH activity in ventral horn was also inhibited. After being cultured for 3 weeks LDH and MDA were increased by 22.4% and 48.2% in culture medium of the patient serum-treated group, while SOD activity was slightly decreased by 12.6%. Glutamate levels in culture medium of ALS patient-treated group were continuously higher than the controls ($P < 0.01$). **Conclusion** Excitatory amino acid toxicity and free radicals injury might play an important role in pathological changes of ALS. Organotypic spinal cord culture should provide an effective way to study the mechanism of motor neuron selective damage in ALS.

【Key words】 Amyotrophic lateral sclerosis; Spinal cord; Glutamic acid; Free radicals

基金项目:河北省自然科学基金资助项目(303487)

作者单位:050000石家庄,河北医科大学第二医院神经内科[李春岩、王晓娟(现在首都医科大学北京同仁医院神经内科)、宋学琴、王丽琴、刘卫刚、马峥];河北省人民医院神经内科(肖向建)

谷氨酸 (Glu)的兴奋毒作用是肌萎缩侧索硬化 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS)选择性运动神经元损伤的重要机制^[1]。2002年 5月至 2004年 2月我们利用脊髓的器官型培养技术,观察含有较高浓度 Glu的 ALS患者血清对器官型培养的脊髓片的影响,从组织器官水平探讨 Glu在选择性运动神经元损伤中的作用机制。

材料和方法

1. 脊髓薄片器官型培养^[2]:共用 120只 8 d龄 SD乳鼠,断头,分离脊髓,剪断腰段脊髓的神经根,将腰髓切成 350 μm厚的薄片,6孔培养板内每孔放入 1 ml MS培养液,放置板插 (insert),用吸管将完好的脊髓片转移至 insert上,每个 insert放 5片,入 CO₂培养箱,每周换液 2次,共培养 240片。培养 8 d时开始干预,ALS组用含 25% ALS患者血清的 MS培养液进行培养;对照组用含 25%健康人血清的 MS培养液进行培养。于培养 2周、4周时做免疫组化染色和琥珀酸脱氢酶 (SDH)染色 (各时点样本数为 15),每周取培养液用于生化测定 (各时点样本数为 10)。

2. 脊髓片免疫组化染色:4%甲醛固定,0.6% TritonX-100浸透 10 min,5%马血清封闭 60 min,加入一抗 [抗非磷酸化神经丝单克隆抗体 SM F32 1 4000和抗钙网膜蛋白 (calretinin)抗体 1 60],4 摇床过夜,生物素化马抗鼠 IgG(1 2000)60 min,辣根酶标记链亲和素 (SABC) 60 min,DAB 显色,脱水、透明、封片。具备三个标准者 (在脊髓腹侧、SM F32阳性、胞体直径大于 25 μm)为 运动神经元^[3]。位于脊髓后角,calretinin阳性者定为中间神经元。20 镜下计数每个脊髓片前角 运动神经元的数目,40 镜下测定 2.5 mm²后角中间神经元的数目。

3. SDH染色:新鲜脊髓片用磷酸缓冲液冲洗 2

遍,入硝基四唑蓝孵育液室温避光孵育 60 min,10% 甲醛钙后固定 10 min,脱水、透明、封片。

4. 血清及培养液中乳酸脱氢酶 (LDH)、Glu、超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA)含量的测定:利用南京建成研究所提供的试剂盒,测定健康人和 ALS患者血清中及培养液中 LDH、Glu、SOD、MDA 的含量。

5. 统计学分析:测定结果以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 10.0统计软件进行方差分析。

结 果

1. 免疫组化染色 (表 1):培养 2周时对照组和 ALS组脊髓前角 运动神经元及后角的中间神经元数目均无明显差异。培养 4周时对照组脊髓片前角仍有 14个左右的 运动神经元被染成深棕色,其直径均在 25 μm 以上,突起细长,彼此形成突触联系 (图 1A),脊髓后角可见大量棕黄色着色中、小体积的中间神经元,细胞排列紧密 (图 1B);ALS组在培养 4周时 运动神经元的数目与对照组比较明显减少 (图 2A),而后角中间神经元的数目无明显减少 (图 2B)。

表 1 各时点脊髓前角 运动神经元 (个/张脊髓片)及后角中间神经元 (个/2.5 mm², n = 15)

分组	运动神经元		中间神经元	
	2周	4周	2周	4周
对照	15.6 ± 2.3	14.4 ± 3.2	41.4 ± 5.4	39.2 ± 7.9
ALS	13.6 ± 2.7	7.6 ± 2.3*	44.0 ± 5.1	38.6 ± 3.4

注:与对照组比较,* P < 0.01

2. 脊髓片 SDH染色:对照组脊髓片被染成均匀一致的紫蓝色,ALS组在培养 4周后脊髓片前角着色明显减弱,后角改变不明显 (图 3)。

3. LDH、Glu、SOD、MDA 含量测定:ALS患者血清中 LDH含量 1580U /L, SOD含量 124U /ml,均



图 1 对照组培养 4周时, 1A: SM F32组化染色显示脊髓前角见多个 运动神经元及其突起 ×100; 1B: calretinin组化染色示后角有大量小的中间神经元 ×200 图 2 ALS血清组培养 4周, 2A: SM F32组化染色显示脊髓前角 运动神经元数目明显减少 ×100; 2B: calretinin组化染色示后角中间神经元数目无明显减少 ×200 图 3 ALS血清组培养 4周脊髓前角 SDH染色明显减弱 ×40

表 2 培养液中 LDH ($\times 10^3$ U/L)、Glu ($\mu\text{mol/L}$)、SOD ($\times 10^3$ U/L)、MDA ($\mu\text{mol/L}$)水平 ($n = 10$)

项目	对照组				ALS组			
	1周	2周	3周	4周	1周	2周	3周	4周
LDH	123.1 \pm 9.5	132.3 \pm 11.7	144.4 \pm 12.7	143.0 \pm 10.8	134.2 \pm 10.1	150.3 \pm 15.9	176.8 \pm 15.6*	178.8 \pm 13.7#
Glu	12.8 \pm 2.0	13.4 \pm 2.9	15.4 \pm 3.4	18.7 \pm 3.9	25.2 \pm 3.9#	30.1 \pm 4.4#	32.7 \pm 2.6#	37.6 \pm 6.8#
SOD	23.4 \pm 3.8	26.5 \pm 3.9	25.4 \pm 4.3	20.2 \pm 3.7	29.5 \pm 7.5	25.1 \pm 4.4	22.2 \pm 4.1	20.6 \pm 4.3
MDA	20.8 \pm 4.6	23.3 \pm 5.3	25.9 \pm 4.6	26.4 \pm 3.8	28.2 \pm 5.9	31.1 \pm 7.2	38.4 \pm 3.6#	42.3 \pm 5.8#

注:与对照组比较 * $P < 0.05$, # $P < 0.01$

在正常范围; Glu 含量 $112.8 \mu\text{mol/L}$, MDA 含量 88.7 nmol/L , 均较健康人明显升高。培养液中 LDH、Glu、SOD、MDA 含量见表 2: 对照组各时点 LDH、MDA 含量无显著性变化, ALS 组 LDH、MDA 含量随时间延长而升高, 在培养的 3、4 周与对照组比较差异有统计学意义 (分别升高了 22.4% 和 48.2%); 对照组各时点培养液中 Glu 含量少, ALS 组 Glu 含量随时间延长而升高, 均较对照组差异有统计学意义; 对照组各时点 SOD 含量无明显变化, ALS 血清组 SOD 随时间延长而略有下降, 差异无统计学意义。

讨 论

研究发现 Glu 兴奋毒作用是 ALS 发病的重要机制。有学者直接将 Glu 或含有高浓度 Glu 的 ALS 患者血清加入纯化培养的脊髓前角运动神经元中, 发现神经元在培养数小时后明显受损, 从体外证明了 Glu 对运动神经元的兴奋毒作用^[4,5]。但单细胞培养因其细胞成分单一, 难以模仿体内脊髓的构筑, 缺乏一定的说服力。因此我们在脊髓的器官型培养技术基础上, 应用 ALS 患者的血清对培养的脊髓片进行干预, 观察有无选择性的脊髓前角神经元的损伤, 并探讨其损伤的部分机制。结果发现将含有较高浓度 Glu 的 ALS 患者血清加入到器官型培养液中干预 4 周, 出现培养液中 Glu 含量增高的同时伴有 LDH 含量的显著升高, 提示组织损伤明显, 免疫组化染色显示培养 4 周时脊髓前角运动神经元较对照组明显减少, 而后角中间神经元变化不明显, 证明 Glu 主要诱发了运动神经元的损伤, 在培养体系完整、有胶质细胞支持的情况下, 运动神经元发生的是迟发性损伤, 这一结果与国外学者在单细胞纯化培养体系中观察到的急性损伤不同。

Glu 的受体分为两大类: 离子型受体和代谢型受体。离子型受体又分为 3 型: N-甲基-D-天冬氨酸 (NMDA) 受体、氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙氨酸

(AMPA)受体和海人藻酸 (KA)受体。目前认为, 非 NMDA 受体与慢性兴奋毒机制关系密切^[6]。运动神经元有大量的非 NMDA 受体, 易被 Glu 激活发生兴奋毒作用。细胞外 Glu 含量的升高在一定范围不会造成运动神经元的损伤, 因为星形胶质细胞的细胞膜上存在着高效的 Glu 转运蛋白^[7], 但当细胞外 Glu 长期大量升高时, Glu 转运体不足以清除多余的 Glu 就会造成细胞毒性, 这可能是我们观察到 ALS 患者血清干预 2 周时无明显运动神经元损伤, 而 4 周后损伤明显的原因。

自由基损伤在 ALS 发病中也有至关重要的作用, 当自由基产生过多或机体抗氧化功能下降时, 自由基在体内大量堆积, 对生物体具有高度毒性。我们发现 ALS 患者血清 SOD 的含量处于正常高界, 而血清中 MDA 含量较健康人明显升高。提示自由基的大量产生参与了 ALS 的发病, 体内虽产生大量 SOD 仍不足以消除自由基的损伤, 导致 MDA 水平显著性升高。培养液中加入含有大量 Glu 的 ALS 患者血清后, 反映线粒体功能的 SDH 染色明显减弱, 培养液中 SOD 含量逐渐下降, MDA 含量明显升高, 提示在培养体系中 Glu 诱导了大量的自由基的产生, 促进了脂质过氧化。这一氧化损伤过程为自我加强、级联放大, 一旦开启, 反应将持续进行下去, 形成瀑布式连锁反应, 对脊髓前角运动神经元造成不可逆性损害。自由基损伤可以说是 Glu 发挥兴奋毒作用的重要途径。

培养体系中脊髓后角的损伤不明显, 提示后角的感觉神经细胞抗兴奋毒和氧化损伤的机制较前角完善, 后角神经元中含有较少的非 NMDA 受体和较多的抗氧化酶系统及钙缓冲蛋白^[8], 如 calretinin 等, 能有效的抵制兴奋性氨基酸、自由基和钙超载的损伤。

Glu 兴奋毒作用可能不是 ALS 发病的始动因素, 而是多种病因作用的最后通路, 但它对于 ALS 的起病、进展起着至关重要的作用, 也是核心环节。

抗 Glu 药物 2-氨基-6-三氟甲氧基苯并噻唑临床治疗 ALS 的有效性也证明了这一点^[9]。我们应用含有大量的 Glu 的 ALS 患者的血清干预器官型培养的脊髓片造成了选择性脊髓前角运动神经元的损伤,由此也证实了 Glu 的兴奋毒作用及随之诱发的一系列损伤的下游事件。利用脊髓的器官型培养技术对 Glu 兴奋毒机制的探讨所获得的肯定结果,也为此项技术的推广及今后神经保护剂的筛选、抗损伤机制的研究提供了重要手段。

参 考 文 献

- 1 Guegan C, Przedborski S. Programmed cell death in amyotrophic lateral sclerosis. *J Clin Invest*, 2003, 111: 153-161.
- 2 王丽琴,王晓娟,肖向建,等. 脊髓薄片器官型培养的方法研究. *实验生物学报*, 2004, 37: 55-57.
- 3 Carriedo SG, Yin HZ, Weiss JH. Motor neurons are selectively vulnerable to AMPA/Kainate receptor-mediated injury in vitro. *J Neurosci*, 1996, 16: 4069-4079.

- 4 Iwasaki Y, Ichikawa Y, Igarasi O, et al. T-588 protects motor neuron death against glutamate-induced neurotoxicity. *Neurochem Res*, 2003, 28: 1829-1832.
- 5 Ajit GT, Corse AM, Coccia CF, et al. NAALADase inhibition protects motor neurons against chronic glutamate toxicity. *Eur J Pharmacol*, 2003, 471: 177-184.
- 6 Saroff D, Delfs J, Kuznetsov D, et al. Selective vulnerability of spinal cord motor neurons to non-NMDA toxicity. *Neuroreport*, 2000, 11: 1117-1121.
- 7 Gadea A, Lopez-Cokme AM. Glial transporters for glutamate, glycine and GABA1. Glutamate transporters. *J Neurosci Res*, 2001, 63: 453-560.
- 8 Lasb P, Lipski J, Nicholson LF. Calcium-binding proteins in motoneurons at low and high risk for degeneration in ALS. *Neuroreport*, 2000, 11: 3305-3308.
- 9 Miller RG, Mitchell JD, Lyon M, et al. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*, 2003, 4: 191-206.

(收稿日期: 2004-06-25)

(本文编辑:陈秀华)

· 病例报告 ·

双侧内囊区脑梗死致闭锁综合征一例报告

周盛年 魏先森

患者男, 58岁, 于 2003年 7月 18日出现右侧肢体活动无力, 颅脑磁共振成像 (MR) 示左侧额顶脑白质梗死。在我院治疗 35 d 病情好转出院, 当时右侧肢体肌力 ~ 级, 可有自主活动, 意识清醒, 语言功能正常。出院后行康复治疗, 于第 3 天出现四肢抽搐, 并伴短暂意识丧失, 经治疗后意识转清, 但右侧肢体功能逐渐恶化。一周后类似症状再次发作, 出现频繁抽搐并伴短暂意识丧失, 随后出现中度昏迷。于 9月 10日入我院 ICU 治疗, 颅脑 MR 示右侧基底节区、放射冠区及颞叶急性脑梗死; 左侧基底节区、放射冠区陈旧性脑梗死。给予促进代谢、营养神经细胞以及积极的康复治疗, 患者病情稳定, 双侧肢体无自主运动, 不能张口、伸舌, 不能吞咽, 饮水呛咳, 能理解简单的语言和手势, 以睁闭眼睑和眼球运动示意。既往有冠心病史 8 年, 高血压病史 5 年, 否认心脏瓣膜病史。

查体: 血压 140/90 mm Hg (1 mm Hg = 0.133 kPa), 自主呼吸, 节律规整, 心界无扩大, 各心脏瓣膜区未闻及杂音。颈软, 眼睑无下垂, 瞳孔大小正常, 眼球可向各个方向运动, 无震颤, 直接、间接对光反射灵敏, 角膜反射、调节反射存在; 两侧鼻唇沟相等, 口角无歪斜, 软腭无萎缩, 悬雍垂居中, 咽喉反射存在。四肢无自主运动, 呈废用性肌萎缩, 肌张力均增高, 肌力 级。双侧 Babinski 征 (+)。

讨论 闭锁综合征 (lock-in syndrome) 的主要特点是患者意识存在, 但运动功能几乎全部丧失。其病理基础是两侧皮质脊髓束和部分皮质核束受累, 运动传出通路的完整性被破坏, 上、下运动神经元失去联系; 但患者的感觉通路可保持完整, 能感知周围环境, 并且借助睁闭眼睑等与周围建立联系, 进行交流。该综合征最常见的病变部位在两侧脑桥, 即经典的闭锁综合征; 也可因其他部位病变所致, 如双侧内囊、双侧大脑脚以及双侧周围神经。因此国内有学者将该综合征分为内囊型、大脑脚型、脑桥型和周围神经型。此患者的颅脑 MR 显示两侧基底节区、放射冠区脑梗死, 两侧脑桥区未见明显异常。结合此患者病史, 可发现由于先后发生的多次脑梗死, 累及了两侧内囊区、放射冠区绝大部分的下行纤维, 使上、下运动神经元的联系中断, 而非因两侧脑桥病变所致, 故此患者应为内囊型闭锁综合征。

该患者存在眼球的水平运动, 这与以下因素有关: (1) 脑桥内的眼球侧视运动中枢, 即旁中线网状结构未受累及, 保持完整; (2) 传导皮质到、对脑神经的纤维恢复功能, 重建了皮质对动眼、滑车和展神经核的支配联系。

非脑桥区病变所致的闭锁综合征在临床上较为少见, 对这类疾病的诊断和治疗应该引起临床医师的重视。

(收稿日期: 2004-12-21)

(本文编辑:包雅琳)

作者单位: 250012 济南, 山东大学齐鲁医院神经内科 (Email: zsnian@jn.sd.public.cn)