

谷氨酸转运抑制剂对器官型培养脊髓片的影响*

肖向建** 王晓娟*** 王丽琴 宋学琴 刘卫刚 马 征 李春岩****

(河北医科大学第二医院神经内科, 石家庄 050000)

摘要 观察谷氨酸转运体抑制剂苏-羟天冬氨酸(Threo-hydroxyaspartate, THA)对器官型培养的脊髓片的影响,探讨谷氨酸在运动神经元损伤中的作用。取出生后 8 天乳鼠的腰段脊髓组织切片做脊髓器官型培养,在培养液中加入不同浓度 THA(50 μ mol/L、100 μ mol/L、500 μ mol/L),用神经元的特异性免疫组化染色剂 SMI-32,非磷酸化神经丝标记物,对脊髓腹角 α 运动神经元进行鉴定,用单克隆抗钙网膜蛋白(calretinin)抗体对背角中间神经元进行记数,测定培养液中乳酸脱氢酶(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 可以引起剂量依赖性的培养液中 LDH 含量增高和 α 运动神经元数目减少,而脊髓背角的中间神经元损伤相对较轻,其中 THA 100 μ mol/L 组在体外培养 4 周后出现类似于肌萎缩侧索硬化(ALS)的病理改变: α 运动神经元数目较对照组明显减少,而脊髓背角的中间神经元数目无显著变化。细胞外谷氨酸增高主要对运动神经元造成损伤,脊髓运动神经元较感觉神经元对谷氨酸的兴奋毒作用更加敏感。

关键词: 运动神经元病 器官型培养 苏-羟天冬氨酸 非磷酸化神经丝 钙网膜蛋白

谷氨酸(Glu)作为人体内最重要的兴奋性递质,在正常情况下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^[1]。但在脑和脊髓中任何引起胞外兴奋性氨基酸浓度异常增高的病理变化都会产生兴奋毒性。大量研究显示^[2,3]谷氨酸的兴奋毒作用是肌萎缩侧索硬化症选择性运动神经元损伤的重要机制之一。本研究旨在利用脊髓的器官培养技术,观察谷氨酸转运体抑制剂苏-羟天冬氨酸(Threo-hydroxyaspartate, THA)对器官型培养的脊髓片的影响,建立选择性死亡的体外脊髓器官型培养模型,为进一步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、开发神经保护治疗提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物

采用 8 日龄 Sprague-Dawley(SD)乳鼠(购自中国医学科学院实验动物研究所),分离脊髓进行体外培养,随机分为对照组和模型组。

1.1.2 培养液

MS (50%MEM-含 25mmol/L HEPES+25% 马血

清+25%Hanks 平衡盐液-含 25.6g/L 葡萄糖),GBSS (Geys 平衡盐液含 6.4g/L 葡萄糖);

1.1.3 实验仪器

CO₂ 培养箱、超净工作台、Micto 解剖显微镜、McIlwain 组织切片机、Millicell-CM insert、倒置显微镜、普通显微镜及分光光度计。

1.1.4 实验试剂

组化试剂一抗为单克隆小鼠抗非磷酸化神经丝单克隆抗体(SMI-32, Sternberger Monoclonals 公司)和抗钙网膜蛋白(calretinin)单克隆抗体(北京中山试剂公司),二抗为生物素化马抗鼠 IgG(Vector 公司),SABC 免疫组织化学试剂盒(北京中山试剂公司),DAB 显色试剂盒(北京中山试剂公司)。

1.2 脊髓薄片器官型培养方法

将 8 日龄 SD 乳鼠快速在酒精、碘酒、酒精中浸泡一下,断头,在无菌条件下快速分离、取出整条脊髓,显微镜下剪断腰膨大脊髓的神经根,用 McIlwain 组织切片机切成 350 μ m 厚的薄片,将腰膨大脊髓的

*河北省自然科学基金资助项目(303487)。

**河北省人民医院康复科。

***北京同仁医院神经内科。

****通讯作者, Tel:0311-7222725。

表 1 各组各时点脊髓腹角 α 运动神经元记数Table 1 The number of α motor neurons in ventral horn at different culture times

Group	1W	2W	4W	6W
Control	17.4±3.2	16.1±4.7	14.6±4.7	13.6±4.0
THA50	17.6±3.3	15.3±4.2	14.4±4.0	13.1±3.4
THA100	16.7±4.0	14.6±3.6	11.7±3.8*	8.7±3.6**
THA500	15.1±2.9	11.7±4.3*	7.6±3.2**	4.3±2.5**

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control group.

表 2 各组各时点脊髓背角中间神经元记数

Table 2 The number of interneurons in dorsal horn at different culture times

Group	1W	2W	4W	6W
Control	45.3±9.0	46.6±7.3	44.4±7.2	42.4±5.6
THA50	44.2±8.8	43.8±7.1	41.7±5.0	40.2±5.0
THA100	48.5±7.7	43.5±5.2	42.1±6.2	39.6±6.5
THA500	47.6±7.3	41.8±6.0	36.4±7.2*	28.5±5.9**

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control group.

表 3 各组各时点培养液中 LDH 含量(U/dl)比较

Table 3 The level of LDH (U/dl) in culture medium at different culture times

Group	1W	2W	4W	6W
Control	153±10.6	149±12.6	154±16.6	151±14.2
THA50	158±11.2	146±11.7	149±12.3	146±12.8
THA100	149±12.1	160±14.1	177±21.5*	198±25.5**
THA500	155±13.7	182±23.3**	195±25.6**	210±27.3**

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control group.

切片转移到 GBSS 中,分离成单片,转移至 Millicell-CM insert 上,将 insert 放 6 孔培养板中,每孔加 1ml MS,放入 CO₂ 培养箱(37℃,5%CO₂+95%空气)^[4],每周换液 2 次。对照组培养液仅为 MS,THA 组则在培养 1 周后分别加入 THA,使培养液中 THA 的终浓度分别为 50、100、500 $\mu\text{mol/L}$,记为 THA50、THA100、THA500 组,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 脊髓免疫组化染色

培养后的脊髓片以 4%多聚甲醛固定 30min,0.1mol/L PB 冲洗 3 次,0.6% Triton X-100 浸透 10min,0.05mol/L TBS 洗 3 次,5% 马血清/TBS 60min 阻断非特异性染色,单克隆抗体 SMI-32(1:4000)和单克隆抗体 calretinin(1:60),4℃摇床过夜,次日 TBS 洗 10min×3,加二抗生物素化马抗鼠 IgG(1:2000)60min,SABC 60min,TBS 洗 10min×3,DAB 显色 3-10min,TBS 洗 10min×3,脱水、透明、封片。以

TBS 代替一抗为阴性对照。具备三个标准者(位于脊髓的腹侧、SMI-32 阳性、胞体直径大于 25 μm)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 2.5mm²(5mm×5mm 测微尺下的 4 个视野)面积下后角中间神经元的数目。

1.4 培养液中乳酸脱氢酶(LDH)含量测定

利用南京建成生物工程研究所提供的 LDH 检测试剂盒,测定培养 1 周、2 周、4 周、6 周时培养液中 LDH 的含量。操作步骤严格按试剂盒说明进行。

1.5 统计分析

测定结果均以均数±标准差表示,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。在相差显微镜下可见培养脊髓片的后角较前角暗淡,含有大量的体积小、重叠、密集的细胞,而脊髓腹角透光性较背角强,细胞相对较大,细胞分布相对较稀疏。THA50 组的脊髓片与正常培养组比较形态无明显异常;THA100 组的脊髓片在培养 4 周后脊髓前角明显变薄,颜色逐渐变暗,而后角变化不明显;THA500 组则在培养后 2 周即出现脊髓腹角、背角均变薄,颜色变暗,且以腹角更为明显,培养至 6 周后,脊髓腹角细胞稀疏,边缘已无明显光晕。

2.2 组化染色结果

经 SMI32 染色显示,对照组培养的脊髓片每片的两侧腹角均有 10~25 个左右的 α 运动神经元被染成深棕色,其直径均在 $25\mu\text{m}$ 以上,突起细长,彼此形成突触联系(图版 I,图 1A),数目不随培养时间的延长而明显减少。THA50 组各时点 α 运动神经元数目无显著减少,THA100 组 α 运动神经元的数目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(图版 I,图 2A),而 THA500 组在培养 2 周后即有 α 运动神经元数目的减少(表 1)。calretinin 染色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(图版 I,图 1B),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。THA50 组及 THA100 组背角中间神经元数目均无显著变化(图版 I,图 2B),而 THA500 组脊髓背角中间神经元的数目在培养 4 周后开始有明显减少(表 2)。

2.3 培养液中 LDH 含量测定

结果显示对照组及 THA50 组各时点培养液中 LDH 含量无显著性变化,而 THA100 组和 THA500 组 LDH 含量随时间延长而升高,其中 THA100 组 LDH 含量升高主要在培养 4 周以后,而 THA500 组 LDH 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)。

3 讨论

肌萎缩侧索硬化(ALS)是以选择性运动神经元损伤为特点的致死性疾病,90%以上为散发型,病因不清,对 ALS 选择性运动神经元损伤的病因、发病机制及神经保护因素的探讨一直是神经科领域的研究热点。

大量证据表明谷氨酸兴奋毒机制在 ALS 的发病中起着重要作用。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^[1]。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膜上的谷氨酸转运体快速清除,特别是星形胶质细胞上存在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、避免兴奋毒性具有重要意义^[6]。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性。

THA 作为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]。我们在器官型培养的脊髓薄片培养液中分别加入不同浓度的 THA,结果发现可以引起剂量依赖性的脊髓腹角 α 运动神经元数目减少和培养液中 LDH 含量的升高。LDH 是能量代谢的一种重要酶,当组织器官受损时,可以升高,其升高程度与组织损伤程度呈正相关关系。我们应用 THA 后引起脊髓培养液中 LDH 持续升高,并可见 α 运动神经元数目减少,提示 THA 造成了运动神经元的损伤,使 α 运动神经元数目减少,而不是染色差异所致。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^[9],已替代过去常用的抗乙酰胆碱酯酶抗体,而成为器官型培养的脊髓运动神经元标记物。而 calretinin 作为胞质内一种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抗原来计数背角中间神经元的数目。我们在培养液中加入 THA 使终浓度为 $100\mu\text{mol/L}$ 时既可引起 SMI-32 免疫阳性 α 运动神经元的减少及培养液中 LDH 含量中度升高,又不影响背角中间神经元的存活,这与 ALS 的病理特点相一致,可以用作制备迟发性选择性运动神经元损伤的脊髓器官型培养模型。

谷氨酸介导的选择性运动神经元损伤的机制

并不完全清楚。目前的研究多倾向于它是通过激活非 NMDA 受体 (AMPA 受体和 KA 受体) 来发挥细胞毒性作用的^[9]。Glu 作用于受体后, 导致 Ca^{2+} 内流, 生成大量的自由基和线粒体内 Ca^{2+} 超载, 且 Ca^{2+} 超载也是运动神经元死亡的重要原因。激活了一系列的降解酶, 如蛋白激酶 C、蛋白酶、NOS 等使蛋白质分解, 自由基生成增加及脂质过氧化致神经元自行溶解。过量的 Ca^{2+} 也可激活核酸内切酶, 使 DNA 裂解及核崩解。这些均会造成运动神经元的损伤。

THA 抑制谷氨酸转运、升高细胞外 Glu 的浓度为什么仅仅对脊髓腹角的运动神经元造成严重损伤? 其原因可能是由于运动神经元体积大, 具有很高的代谢活性, 而谷胱甘肽等抗氧化酶水平相对低下, 易发生氧化损害; calretinin 等钙结合蛋白在脊髓腹角 α 运动神经元中表达极少或缺如, 我们在免疫组化染色中也观察到 α 运动神经元 calretinin 染色阴性, 缺乏对钙超载的缓冲作用^[10]; 运动神经元有很长的轴索和复杂的细胞骨架结构, NF 含量多, 易发生磷酸化或硝酸化而损害^[11]; 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; 运动神经元缺乏胶质细胞所有的 cGMP 依赖的蛋白激酶, 不能反馈地抑制激活的 NOS, 易受 NO 增多引起的损害^[12]等多方面因素累积的结果。

本研究利用脊髓器官型培养模型从组织器官水平证实了谷氨酸转运受抑制对脊髓运动神经元造成的选择性损伤, 也证明了脊髓运动神经元较感觉神经元对兴奋毒机制更加敏感, 这可能是 ALS 中运动神经元选择性损伤的主要原因。实验中所用的脊髓器官型培养技术具有培养周期相对较短, 易操作, 干预条件易调控等优点, 与单细胞培养相比, 此种培养保留有完整的脊髓形态、恒定的运动神经元数目及其突触联系和周围的组织结构, 更接近体内的生理环境, 为研究运动神经元疾病特别是肌萎缩侧索硬化 (ALS) 提供了重要的技术手段。

参 考 文 献

- [1] 董为伟主编. 神经保护的基础与临床, 北京: 科学出版社 2002 年 5 月, 第一版, 115.
- [2] Guegan, C.&S.Przedborski, 2003, Programmed cell death in amyotrophic lateral sclerosis. *J.Clin.Invest.*, **111**(2):153-161.
- [3] Niebroj-Dobosz, I.&P.Janik, 1999, Amino acids acting as transmitters in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurol. Scand.*, **100**(1): 6-10.
- [4] 王丽琴、王晓娟、肖向建、宋学琴、李春岩, 2004, 脊髓薄片器官型培养的方法研究. *实验生物学报*, **37**(1): 55-57.
- [5] Carriedo, S.G., H.Z.Yin & J.H.Weiss, 1996, Motor neurons are selectively vulnerable to AMPA/Kainate receptor-mediated injury in vitro. *J. Neurosci.*, **16**: 4069-4079.
- [6] Gadea, A.&A.M. Lopez-Colome, 2001, Glial transporters for glutamate, glycine and GABA I. Glutamate transporters. *J. Neurosci. Res.*, **63**(6): 453-560.
- [7] Kidd, F.L. & J.T. Isaac, 2000, Glutamate transport blockade has a differential effect on AMPA and NMDA receptor-mediated synaptic transmission in the developing barrel cortex. *Neuropharmacology*, **39**(5): 725-732.
- [8] Laslo, P., J. Lipski & L.F.Nicholson, 2000, Calcium-binding proteins in motoneurons at low and high risk for degeneration in ALS. *Neuroreport*, **11**(15): 3305-3308.
- [9] Saroff, D., J.Delfs & Geula.C.Kuznetsov, 2000, Selective vulnerability of spinal cord motor neurons to non-NMDA toxicity. *Neuroreport*, **11**(5): 1117-1121.
- [10] Rowland, L.P. & N.A.Shneider, 2001, Medical Progress: Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N. Engl. J. Med.*, **344**(22): 1688-1700.
- [11] Strong, M.J., 1999, Neurofilament metabolism in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.*, **169**(1-2): 170-177.
- [12] Urushitani, M., R.Inoue, T.Nakamizo, H.Sawada, H.Shibasaki & S.Shimohama, 2000, Neuroprotective effect of cyclic GMP against radical-induced toxicity in cultured spinal motor neurons. *J. Neurosci. Res.*, **61**(4): 443-448.

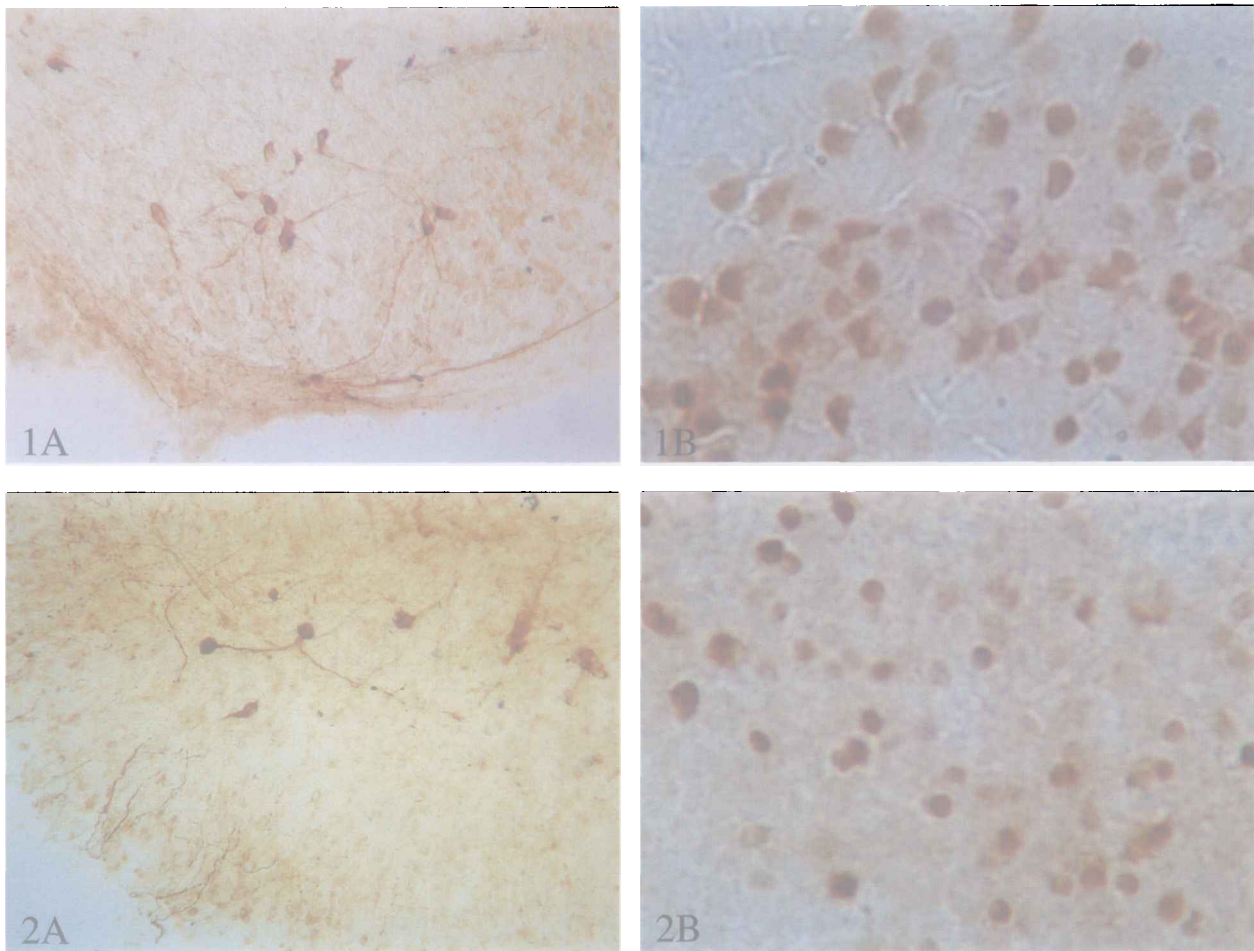


图 版 I

- 图 1 体外培养 4 周时, SMI-32 组化染色显示脊髓腹角见多个 α 运动神经元及其突起(1A $\times 100$); Calretinin 组化染色示背角有大量小的中间神经元(1B $\times 200$)。
- 图 2 THA100 组培养 4 周脊髓片, 脊髓腹角 α 运动神经元数目明显减少 (2A $\times 100$), 背角中间神经元数目无明显减少(2B $\times 200$)。

PLATE I

- Fig.1 SMI-32-positive α motoneurons with long neurites were located in the ventral horn of the slice (1A $\times 100$), many small-sized calretinin-positive interneurons were located in the dorsal horn of the slice cultured for 4 weeks(1B $\times 200$).
- Fig.2 Treated with THA 100 $\mu\text{mol/L}$ for 4 weeks, the number of SMI-32-positive α motoneurons in ventral horn was decreased (2A $\times 100$) while small-sized calretinin-positive interneurons number had no significant changes in dorsal horn (2B $\times 200$).

EFFECTS OF GLUTAMATE TRANSPORT INHIBITOR ON ORGANOTYPIC CULTURED SPINAL CORD SLICES*

XIAO Xiang Jian WANG Xiao Juan WANG Li Qin SONG Xue Qin LIU Wei Gang
MA Zheng LI Chun Yan

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

ABSTRACT This study was aimed at investigating the effect of glutamate on motor neurons in organotypic cultured spinal cord slices treated by threohydroxyaspartate (THA), an inhibitor of glutamate transporter. The spinal cord cultures were prepared using lumbar spinal cord slices from 8-day-old rat. Various concentration of THA (50 $\mu\text{mol/L}$, 100 $\mu\text{mol/L}$, 500 $\mu\text{mol/L}$) was added into the culture medium respectively. Ventral α -motor neurons survival was evaluated by immunohistochemistry staining monoclonal antibody SMI-32, a nonphosphorylated neurofilament marker, and interneurons in dorsal horn were identified by monoclonal anti-calretinin antibody staining. Lactate dehydrogenase (LDH) level in the culture medium was also measured. The spinal cord slices in the control group could maintain excellent organotypic cellular organization and a stable population of ventral α -motor neurons. THA caused a slow dose-dependent loss of α -motor neurons and an increase in LDH enzyme activity in the culture medium while dorsal interneurons were less damaged. 100 $\mu\text{mol/L}$ THA resulted in a significant decrease in α -motor neurons after cultured for 4 weeks. On the contrary, the interneurons in the dorsal horn were less affected. It was also observed in patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Excess Glu mainly caused selective α -motor neuron death, and motoneurons were more sensitive to glutamate excitotoxicity than sensory neurons in the spinal cord.

Key words: Motor neuron disease. Organotypic culture. Threohydroxyaspartate. Non-phosphorylated neurofilament. Calretinin