

肌萎缩侧索硬化培养模型中星形胶质细胞的变化

李敏^{1,2}, 马征², 李春岩²

[摘要] 目的 应用脊髓器官型培养模型制备选择性运动神经元死亡的肌萎缩侧索硬化(ALS)体外模型,探讨星形胶质细胞在 ALS 发病中的作用。方法 脊髓器官型培养采用 8 日龄 SD 大鼠的腰段脊髓,在培养液中加入浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 的苏-羟天冬氨酸(THA),建立 ALS 脊髓器官型培养模型;用神经元特异的 SMF-32 和星形胶质细胞特异的 GFAP 染色,并对细胞计数。结果与对照组相比,THA 100 $\mu\text{mol/L}$ 组的脊髓前角以及周边的白质中星形胶质细胞明显增生,增生的程度随用药时间的延长而增加,且伴随细胞数量的增加,其形态也发生改变。结论 THA 干预制造的 ALS 模型中,在前角位置有明显的星形胶质细胞增生,且增生的时间明显早于运动神经元的丢失。

[关键词] 肌萎缩侧索硬化;器官型培养;星形胶质细胞

Changes of Astrocyte in the Cultural Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis LI Min, MA Zheng, LI Chun-yan. The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei, China

Abstract: **Objective** To establish the model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) with selective motor neuron disorder by organotypic spinal cord cultures, and analyze the role of astrocyte in the pathogenesis of ALS. **Methods** Organotypic spinal cord cultures were prepared using lumbar spinal cord slices from 8-day-old SD rat pups. The threohydroxyaspartate (THA) was applied into culture medium to establish ALS organotypic spinal cord cultures model. Motor neurons survival was evaluated by monoclonal SMF-32 immunohistochemical staining and glial fibrillary acidic protein staining to show astrocyte survival. **Results** Compared with the control group, there was significantly astrogliosis in the anterior horn and surrounding white matter in THA 100 $\mu\text{mol/L}$ group, and the level of gliosis was increased followed the elongation of THA interference time. With the increasing of the number of astrocyte, the morphology of astrocyte was changed. **Conclusion** There is significantly astrogliosis in the anterior horn and the time of astrogliosis is markedly earlier than the time of motor neuron loss in the ALS model intervened with THA.

Key words: amyotrophic lateral sclerosis (ALS); organizational cultures; astrocytes

[中图分类号] R746.4 [文献标识码] A [文章编号] 1006-9771(2006)12-1052-02

[本文著录格式] 李敏,马征,李春岩. 肌萎缩侧索硬化培养模型中星形胶质细胞的变化[J]. 中国康复理论与实践,2006,12(12):1052-1053.

肌萎缩侧索硬化(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)是一种选择性上下运动神经元受累神经系统变性疾病,自 1869 年由 Charcot 首次报道以来,至今对其病因及发病机制尚未明了,且无有效的治疗方法。病因学研究显示,20% 的家族性 ALS(familial amyotrophic lateral sclerosis, FALS)发病与超氧化物歧化酶 1(superoxide dismutase-1, SOD1)突变有关。而占绝大多数的散发性 ALS(sporadic amyotrophic lateral sclerosis, SALS)的病因至今不清,可能的机制有谷氨酸毒性、细胞骨架紊乱、线粒体功能障碍和氧化损伤等^[1]。越来越多的证据显示,谷氨酸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,但其对 ALS 的起病、进展起着至关重要的作用,也是核心环节。抗谷氨酸药物力如呋临床治疗 ALS 的中度有效性也证明了这一点^[2]。本实验室参照 Rothstein 的方法,利用脊髓器官型培养技术,结合谷氨酸兴奋毒机制,在培养的脊髓片中加入适当浓度的谷氨酸转运体抑制剂苏-羟天冬氨酸(threohydroxyaspartate, THA)抑制谷氨酸转运,使细胞外谷氨酸的堆积对运动神经元造成损伤而感觉神经元不受影响,制备 ALS 的体外培养模型,并进一步探讨选择性运动神经元损

伤后星形胶质细胞的变化。

1 材料与方法

1.1 主要材料与仪器 实验动物为 8 日龄 SD 乳鼠(购自河北医科大学实验动物中心)。培养试剂:培养液 MS(含 25 mmol/L Hepes 的 50% MEM;25% 马血清;含 25.6 g/L 葡萄糖的 25% Hanks 平衡盐液);含 6.4 g/L 葡萄糖的 Geys 平衡盐液(GBSS),调节 pH 值在 7.2 左右;组化试剂:小鼠抗非磷酸化神经丝单克隆抗体 SMF-32(Sternberger Monoclonals 公司);兔抗胶原纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)多克隆抗体(北京中山化学试剂公司);生物素化马抗鼠 IgG(Vector 公司);生物素化羊抗兔 IgG(即用型,武汉博士德公司);SABC 免疫组织化学试剂盒(北京中山公司);DAB 显色试剂盒(北京中山化学试剂公司)。实验仪器、设备:培养孔;CO₂ 培养箱;万级净化装置;MCIL 活组织切片机。

1.2 脊髓薄片器官型培养^[3]和分组 无菌条件下将 SD 乳鼠快速断头、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,切成 350 μm 厚的薄片,将切片转移到 GBSS 后,用吸管将完好的脊髓片转移至培养孔中,放入 CO₂ 培养箱培养(37℃, 5% CO₂ + 95% 空气)。对照组培养液仅为 MS, THA 组则在培养 1 周后加入 100 $\mu\text{mol/L}$ THA,标记为 THA 100 组,各组分别于培养后的 1 周、2 周、3 周、4 周时取出,进行免疫组化检测。

1.3 脊髓片免疫组化染色^[4] 培养后的脊髓片以 4% 多聚甲

作者单位:1. 河北医科大学附属第二医院,河北石家庄市 050000; 2. 北京武警总医院神经干细胞移植科,北京市 100039。作者简介:李敏(1978-),女,河北蠡县人,住院医师,硕士,主要研究方向:运动神经元变性病。

醛固定,0.6% Triton X-100 浸透,10% 马血清/ TBS/ PBS 60 min 阻断非特异性染色,加入一抗,次日加二抗、SABC、DAB 显色。以 TBS/ PBS 代替一抗为阴性对照。

1.4 星形胶质细胞计数 在 40× 镜下计数体外培养 2 周、3 周和 4 周时对照组与 THA100 组的脊髓片腹角位置处的星形胶质细胞,每个时点取 2 个培养孔上的 10 个脊髓片进行计数(在脊髓片腹角位置随机取 4 个不同的视野,计数每个视野中的星形胶质细胞)。

1.5 统计学处理 所得数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 10.0 统计软件进行 *t* 检验。

2 结果

2.1 脊髓薄片器官型培养 对照组脊髓片生长良好,体积逐渐增大,组织边缘有光晕,存活率达 90% 以上,存活时间最长可达 2 个月以上,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,而脊髓前角透光性较后角强,细胞相对较大,细胞分布相对较稀疏,前正中裂较后正中沟明显。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。

2.2 SM-32 组化染色 对照组脊髓片每片的两侧腹角共有 15~20 个 α 运动神经元被染成深棕色(见封三图 1.1),其直径均在 25 μ m 以上,突起细长,彼此形成突触联系,脊髓后角可见大量淡棕色着色的中、小体积的中间神经元,细胞排列紧密,有重叠。THA100 组 α 运动神经元的数目随时间延长而逐渐减少(见封三图 1.2),在培养 4 周后与对照组比较差异有非常显著性意义($P < 0.01$),见表 1,而脊髓背角的中间神经元数目各时点均无明显减少^[5]。

2.3 GFAP 组化染色 对照组脊髓片中存在呈棕色的 GFAP 标记的星形细胞,在白质中较明显。培养 3 周后的脊髓前角星形胶质细胞的数量明显增多,至培养 4 周后 GFAP 阳性细胞数目又减少,星形胶质细胞的形态无明显改变(见封三图 1.3)。THA100 组在培养 2 周后星形胶质细胞数量增多,至培养 4 周时细胞数量增加更加明显,细胞体积增大且突起变长(见封三图 1.4);THA 干预 2 周后,THA100 组的星形细胞数量继续增多,体积继续增大,与对照组比较差异有非常显著性意义($P < 0.01$),见表 1。

表 1 不同培养时期的脊髓腹角星形胶质细胞计数($\bar{x} \pm s$)

组别	2 周	3 周	4 周
对照组	27.9 \pm 7.03089	60.4 \pm 13.32666	33.6 \pm 6.979335
THA100 组	64.7 \pm 12.40116 ^a	100.8 \pm 23.54570 ^a	142.3 \pm 27.54007 ^a

注:a.与对照组比较, $P < 0.01$ 。

3 讨论

本实验中对对照组脊髓片中存在呈棕色的 GFAP 标记的星形细胞,在白质中较明显,培养 3 周后的脊髓前角星形胶质细胞的数量明显增多,至培养 4 周后,GFAP 阳性细胞数目又减少,星形胶质细胞的形态无明显改变。THA100 组在培养 2 周后星形胶质细胞数量增多,至培养 4 周时细胞数量增加更显著,细胞体积增大且突起变长;THA 干预 2 周后,星形细胞的数量继续增多,体积继续增大。与对照相比,THA100 组的脊髓片在 THA 干预 1 周后就有反应性的星形胶质细胞增生,主要在灰质前角,周边白质也表现一定的增生,而星形胶质细胞

的形态也发生变化,呈现高营养状态,胞体增大,突起延长。另外,在脊髓背角位置也发现浓染的星形胶质细胞,主要集中在后角胶质质。这种反应性星形胶质细胞增生的增生程度随着 THA 干预时间的延长而逐渐增强。正常培养的对照组在培养 3 周后也出现反应性星形胶质细胞增生。

ALS 患者脊髓前角中的反应性星形胶质细胞增生被认为继发于运动神经元的丢失。但本实验结果显示,在 THA 干预 1 周后即有反应性星形胶质细胞增生。在我们以前的研究中,运动神经元的丢失往往出现在 THA100 干预后的第 3 周,因此,本实验反应性星形胶质细胞增生出现的时间远早于运动神经元的丢失,而且星形胶质细胞随着 THA 干预时间的延长,不仅数量增加,体积也明显增大。这种反应性星形胶质细胞增生可能起源于细胞的高营养状态,细胞肿胀的原因可能是受损的运动神经元释放到细胞外的 K^+ 浓度增加^[6]。

本研究结果还显示,无论是 THA 干预组还是对照组,脊髓白质中也呈现反应性星形胶质细胞增生,而且这种白质部位的反应性星形胶质细胞增生早于前角位置。造成这种远隔部位的反应性增生的原因,可能是白质中的细胞对损伤较为敏感,或者是由于一些毒性物质或信号通过一些细胞外途径,或通过缝隙连接传递到远隔部位而引起^[7]。另外,对照组培养 3 周后星形胶质细胞也有明显的增生,但增生程度明显低于 THA100 组,至 4 周时又趋于正常。这种现象的产生可能是星形胶质细胞对损伤的一种保护性反应,因为脊髓切片本身对脊髓就是一种损伤,在脊髓外伤、缺血时也有类似的增生情况。

通过本实验我们认为,早期的反应性增生的星形胶质细胞通过代谢调节或者分泌一些营养因子等保护神经元免于兴奋毒损伤和氧化应激损伤;长期的(星形)胶质细胞反应可能是诱发 ALS 运动神经元损伤的一种因素,或者是加重运动神经元损伤以至于死亡的一种因素。

[参考文献]

[1] Wang GJ, Chung HJ, Schnuer J, et al. Dihydrokainate-sensitive neuronal glutamate transport is required for protection of rat cortical neurons in culture against synaptically released glutamate[J]. Eur J Neurosci,1998a,10:2523—2531.

[2] Miller RG, Mitchell JD, Lyon M, et al. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/ motor neuron disease (MND) [J]. Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord,2003,4(3):191—206.

[3] Rothstein JD, Jin L, Dykes-Hoberg M, et al. Chronic inhibition of glutamine uptake produces a model of slow neurotoxicity[J]. Proc Natl Acad Sci,1993,90(14):6591—6595.

[4] Van Westerlaak MGH, Joosten EAJ, Gribnau AAM, et al. Chronic mitochondrial inhibition induces glutamate-mediated corticomotoneuron death in an organotypic culture model[J]. Exp Neurol,2001,167(2):393—400.

[5] Cluskey S, Ramsden DB. Mechanisms of neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis[J]. J Clin Pathol Mol Pathol,2001,54:386—392.

[6] Norenberg MD. Astrocyte responses to CNS injury[J]. J Neuropathol Exp Neurol,1994,53:213—220.

[7] Rami A, Volkmann T, Winckler J. Effective reduction of neuronal death by inhibiting gap junctional intercellular communication in a rodent model of global transient cerebral ischemia[J]. Exp Neurol,2001,170:297—304.

(收稿日期:2006-04-19)



图1.1 正常对照细胞培养4周后切片周围运动神经元的数量 (400 ×)



图1.2 THA 干预4周后切片周围运动神经元的数量 (400 ×)



图1.3 正常对照细胞培养4周后星形胶质细胞形态和数量改变 (400 ×)



图1.4 THA 干预4周后星形胶质细胞形态改变 (400 ×)



图2.1 培养3周的BMSCs (100 ×)



图2.2 人BMSCs诱导培养3周形态学变化 (100 ×)