

· 基础研究 ·

胶质细胞源性神经营养因子对肌萎缩侧索硬化症培养模型的保护作用

肖向建¹ 刘卫刚¹ 李 敏² 马 征² 李春岩²

摘要 目的: 利用肌萎缩侧索硬化症的脊髓片培养模型, 观察胶质细胞源性神经营养因子 (GDNF) 对运动神经元的保护作用。方法: 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, 随机分为对照组、模型组、不同浓度 GDNF 组 (1ng/ml, 5ng/ml 和 50ng/ml), 倒置显微镜观察脊髓片形态变化, SMI-32 免疫组化观察前角运动神经元数目的变化。结果: 对照组体外生长良好, 而模型组生长不良, SMI-32 阳性细胞较对照组减少, GDNF 各组脊髓运动神经元存活数目较模型组显著增多, 且具有量效关系。结论: GDNF 能保护运动神经元免受谷氨酸兴奋毒性的损伤。

关键词 胶质细胞源性神经营养因子; 肌萎缩侧索硬化; 谷氨酸; 脊髓

中图分类号: R744.8 R49 文献标识码: A 文章编号: 1001-1242(2007)-06-0506-03

GDNF protect the model of amyotrophic lateral sclerosis/XIAO Xiangjian, LIU Weigang, LI Min, et al.// Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007, 22(6): 506—508

Abstract Objective: Investigate the protective effects of glial cell derived neurotrophic factor (GDNF) on injured motor neurons mediated with glutamate. **Method:** Organotypic spinal cord cultures were made in 8-day-old rats. The slices were divided into 5 groups: control group, model group and GDNF 1ng/ml, 5ng/ml and 50ng/ml group. We inspected the morphologic changes with inverted microscope and calculated the number of spinal motor neurons with SMI-32 immunohistochemical staining. **Result:** The spinal cord slices of GDNF groups had good morphology similar to those of the control group. The number of SMI-32 positive α motor neurons decreased in model group compared with control group while GDNF groups dose-dependently increased compared with model group. **Conclusion:** GDNF could protect motor neurons from the glutamate excitotoxicity.

Author's address Dept. of Neurology, Hebei Provincial People's Hospital, 050091

Key words glial cell derived neurotrophic factor; amyotrophic lateral sclerosis; glutamate; spinal cord

肌萎缩侧索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 是中枢神经系统一种常见的慢性进行性变性疾病, 以进行性的肌肉无力为特点。目前该病的病因不明, 因此也缺乏行之有效的治疗方法。

我们在过去的实验中依据谷氨酸的兴奋毒性机制, 采用脊髓片培养技术, 用谷氨酸转运体抑制剂苏-羟天冬氨酸 (threo-hydroxyaspartate, THA) 制备了运动神经元损伤的体外器官型培养模型^[1]。本研究旨在在此模型的基础上, 观察胶质细胞源性神经营养因子 (glial cell derived neurotrophic factor, GDNF) 对谷氨酸介导的运动神经元损伤的保护作用, 以期为临床治疗 ALS 提供有力的实验和理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 实验动物: 出生 8 天的 Sprague-Dawley 乳鼠购自河北医科大学实验动物中心。

1.1.2 实验试剂: 培养液: MS (50% MEM—含 25

mmol/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); MEM、马血清、Hanks 液均购自 Gibco 公司。免疫组化试剂: 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), 二抗为生物素化马抗小鼠 IgG (Vector 公司), 辣根酶标记的链霉卵白素和 DAB 显色试剂盒 (北京中山公司)。人重组 GDNF 购自 Biotech 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 脊髓薄片器官型培养: 将 8 日龄 SD 乳鼠快速在 75% 乙醇、碘酒、75% 乙醇中浸泡消毒, 断头, 在无菌条件下快速分离、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, 用 McIlwain 组织切片机切成 350 μ m 厚的薄片, 将腰段脊髓的切片转移到 GBSS 中。6 孔培养板内每孔放入 1 ml 培养基

1 河北省人民医院神经内科, 石家庄, 050091

2 河北医科大学第二医院神经内科

作者简介: 肖向建, 男, 博士, 主治医师

收稿日期: 2006-11-06

MS, 并放置 Millicell-CM 培养板插件, 用吸管将完好的脊髓片转移至 insert 上, 每个 insert 上放 5 片, 移去 insert 膜表面多余的培养液, 入 CO₂ 培养箱 (37℃, 5% CO₂+95% 空气) 培养, 每周换液 2 次。

1.2.2 实验分组: 按同批随机分配的原则, 将脊髓片分为 5 组。对照组: 培养基使用正常培养液 MS; 模型组: 在培养 1 周后加入 THA, 使 THA 终浓度为 100 μmol/L; GDNF 组: 于培养后的 1 周在加入 THA 的同时加入 GDNF, 使 GDNF 的终浓度分别为 1 ng/ml、5 ng/ml 和 50 ng/ml。继续培养 3 周后, 每组取 2 个 insert 上的 10 个脊髓片计数前角运动神经元数目。

1.2.3 形态学观察: 在倒置显微镜下观察培养中的脊髓片, 每周 2 次, 观察培养液有无变黄或混浊, 了解脊髓片的生长和存活情况, 观察组织边缘是否完整, 有无光晕, 有无脱落细胞, 组织中心有无坏死。

1.2.4 免疫组化染色步骤: 培养后的脊髓片以 4% 多聚甲醛固定 30 min, 0.1 M PB 冲洗 3 次, 10% 马血清/TBS 60 min 阻断非特异性染色, 单克隆抗体 SMI-32 (1:4000) 含 0.5% Triton X-100 在 4℃ 摇床过夜, 次日 TBS 洗 10 min×3, 加二抗生物素化马抗小鼠 (1:1000) 25℃ 60 min, TBS 洗 10 min×3, (1:200) 辣根酶标记的链霉卵白素 25℃ 60 min, TBS 洗 10 min×3, DAB 显色 3—10 min, TBS 洗 10 min×3, 脱水、透明、封片。以 TBS 代替一抗为阴性对照。

1.2.5 脊髓前角运动神经元的计数: 具备三个标准者被确定为 α 运动神经元^[2]: ①位于脊髓的腹侧; ② SMI-32 阳性; ③胞体直径大于 25 μm。利用目镜测微尺在 10 倍镜下计数每个脊髓片腹角 α 运动神经元的数目。

1.3 统计学分析

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 α=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, 培养液清亮透明, 在倒置显微镜下可见体积逐渐增大, 变薄, 组织边缘整齐、清楚, 有一层光晕。THA100 组的脊髓片在培养 4 周时脊髓腹角明显变薄, 颜色逐渐变暗, 而背角变化不明显; 对照组以及 GDNF 各组则可见脊髓片腹角一直透光性良好, 光晕明显, 无变暗或团状黑色坏死区。

2.2 SMI-32 免疫组化染色结果

可见在对照组脊髓片腹角有数个 SMI-32 阳性

的神经元, 胞浆被染成深棕色, 细胞体积较大, 其直径均在 25 μm 以上, 突起细长, 彼此形成突触联系。模型组阳性的 α 运动神经元数目较少, 每侧只有 3—7 个, 而 GDNF 各组 α 运动神经元数目较模型组显著增多, 具有明显的剂量依赖关系, 其中 1 ng/ml 浓度的 GDNF 就可保护脊髓运动神经元, 使其存活数目显著增加, 而 GDNF 50 ng/ml 组可完全抵抗 THA 介导的兴奋毒性损伤, 使 α 运动神经元数目达到正常对照组水平 (表 1, 图 1, 见前置彩色插页 10)。

表 1 在不同培养液中 α 运动神经元数目的比较

组别	样本	α 运动神经元细胞数目
对照组	10	17.2±4.16
模型 (THA100)	10	9.70±3.20 ^①
GDNF 1 ng/ml	10	12.90±3.41 ^②
GDNF 5 ng/ml	10	15.5±4.74 ^③
GDNF 50 ng/ml	10	18.1±4.48 ^③

①与对照组比较 $P<0.01$; 与模型组比较: ② $P<0.05$, ③ $P<0.01$

3 讨论

肌萎缩侧索硬化是以选择性累及上、下运动神经元为特点的慢性、进行性神经系统变性疾病。主要特征为选择性侵犯运动神经元, 出现进行性加重的肌肉萎缩、肌无力及锥体束征。ALS 是致死性疾病, 患者多于发病后 1—5 年死亡。

大量研究表明谷氨酸的兴奋毒性机制是 ALS 运动神经元变性死亡的主要机制之一。我们应用谷氨酸转运体抑制剂 THA (100 μmol/L) 抑制星形胶质细胞对细胞外谷氨酸的转运, 使突触间隙谷氨酸的浓度持续升高, 制备了脊髓前角运动神经元损伤而后角中间神经元保留的 ALS 器官型培养模型, 该模型是目前国际上公认的 ALS 培养模型^[3]。

GDNF 是由大鼠胶质细胞系 B49 的无血清培养基, 经浓缩纯化得到的蛋白因子。最早的研究发现, GDNF 对中枢多巴胺能神经元具有营养作用, 可促进大鼠胚胎中脑多巴胺能神经元的存活、分化, 并增强其摄取多巴胺的能力。后来的研究发现, GDNF 在多种组织中均有表达, 它不仅对多巴胺能神经元有作用, 还对神经系统胆碱能运动神经元的存活、分化、发育和再生、修复等具有较强的营养作用^[4]。它是迄今为止发现的对处于濒死状态的运动神经元最有效的存活因子。

我们的实验发现, GDNF 对谷氨酸介导的运动神经元损伤有明显的保护作用, 可使体外培养的脊髓片保持良好的形态, 防止脊髓前角细胞变性、死亡, GDNF 组运动神经元数目较 THA 模型组数目显著增多, 且具有明显的量效关系。

关于 GDNF 对运动神经元发挥营养作用的机

制, 目前的研究显示, 在神经元的细胞膜上分布着 GDNF 受体 α (GDNF family receptors alpha, GFR α s), 其中 GFR α_1 是 GDNF 的主要受体^[5], 它与糖基磷脂酰肌醇(GPI)结合后形成 GPI-GFR α 复合体, GDNF 和这种复合体结合后, 引起一种跨膜的酪氨酸激酶受体-RET 的自磷酸化^[6], 从而启动信号向细胞内传导, 在细胞内 GDNF-GFR α_1 -RET 复合体又通过 PI3-激酶途径发挥 GDNF 的神经营养作用^[7]。

尽管 GDNF 对运动神经元具有无与伦比的营养支持作用, 但目前, 仍只处于实验室研究阶段, 而未能临床上广泛应用, 这主要是由于 GDNF 作为一种大分子蛋白质, 难以透过血脑屏障, 使其临床应用受到限制。目前如何促进内源性 GDNF 的释放, 已经成为研究神经营养因子的热点。有研究发现, 将病毒转载体 rhGDNF 基因, 转入到受损脊髓或运动神经元可观察到明显的神经元修复及再生^[8]。这为 GDNF 开创了一条新的研究途径, 使得 GDNF 在临床上广泛应用成为可能。

(上接 489 页)

等方面有重要作用^[11], GABA 有调节 Glu、DA、NE、5-HT 等递质的释放, 损伤后可引起严重的皮质功能障碍^[12], 这两种递质在嗅球、嗅结节、杏仁核和中隔区都有表达; Ach 是与学习记忆关系最为密切的神经递质, 在嗅球和梨状皮质的嗅神经感觉功能及可塑性方面起着重要的作用, 胆碱能功能的紊乱对正常的嗅觉记忆功能也会产生重要的影响^[13]。

本实验神经行为学研究证明丁香酚有改善昆明鼠的学习记忆功能的作用, 进一步神经形态学研究发现丁香酚改善小鼠学习记忆与皮质、海马 ChAT、Glu 等递质的改变有关。这些结果表明, 药物丁香酚可能是通过嗅球的神经冲动把信息传递到海马, 影响嗅觉传导的信号改变而增强学习记忆功能, 为进一步研究嗅觉吸入的神经药理学提供了线索, 也说明了嗅觉通路和学习记忆之间存在相关性。

参考文献

- [1] Roman FS, Truchet B, Chaillan FA, et al. Olfactory associative discrimination: a model for studying modifications of synaptic efficacy in neuronal networks supporting long-term memory[J]. Rev Neurosci, 2004, 15 (1):1—17.
- [2] Aleksandrova IY, Kuvichkin VV, Kashparov IA, et al. Increased level of beta-amyloid in the brain of bullectomized mice[J]. Biochemistry (Mosc), 2004, 69(2):176—180.
- [3] Bobkova NV, Nesterova IV, Dana R, et al. Morpho-functional changes of neurons in temporal cortex in comparison with spatial memory in bullectomized mice after treatment with

参考文献

- [1] 肖向建, 王晓娟, 刘卫刚, 等. 大鼠选择性运动神经元死亡的脊髓器官型培养模型的建立[J]. 基础医学与临床, 2004, 24(6):687—691.
- [2] Carriedo SG, HZ Yin, JH Weiss. Motor neurons are selectively vulnerable to AMPA/Kainate receptor-mediated injury in vitro [J]. J Neurosci, 1996, 16:4069—4079.
- [3] Maragakis NJ, Jackson M, Ganel R, et al. Topiramate protects against motor neuron degeneration in organotypic spinal cord cultures but not in G93A SOD1 transgenic mice [J]. Neurosci Lett, 2003, 338(2):107—110.
- [4] Keir SD, Xiao X, Li J, et al. Adeno-associated virus-mediated delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor protects motor neuron-like cells from apoptosis [J]. J Neurovirol, 2001, 7 (5):437—446.
- [5] Garces A, Haase G, Airaksinen MS, et al. GFR alpha 1 is required for development of distinct subpopulations of motoneuron [J]. J Neurosci, 2000, 20(13):4992—5000.
- [6] Jing S, Wen D, Yu Y, et al. GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF [J]. Cell, 1996, 85(7):1113—1124.
- [7] Soler RM, Dolcet X, Encinas M, et al. Receptors of the glial cell line-derived neurotrophic factor family of neurotrophic factors signal cell survival through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in spinal cord motoneurons [J]. J Neurosci, 1999, 19(21):9160—9169.
- [8] Sakurai M, Abe K, Hayashi T, et al. Adenovirus-mediated glial cell line-derived neurotrophic factor gene delivery reduces motor neuron injury after transient spinal cord ischemia in rabbits [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2000, 120(6):1148—1157.
- [9] minerals and ascorbates [J]. Morfologia, 2003, 123(3):27—31.
- [4] Christen-Zaech S, Kraftsik R, Pillevuit O, et al. Early olfactory involvement in Alzheimer's disease [J]. Neurol Sci, 2003, 30(1):20—25.
- [5] Bensky D, Gamble A. In: Chinese Herbal Medicine Planta Medica (revised version) [M]. Seattle: Eastland Press, 1993. 415—416.
- [6] Davis RL. Olfactory learning [J]. Neuron, 2004, 44(1):31—48.
- [7] Fell J, Klaver P, Elger CE, et al. The interaction of rhinal cortex and hippocampus in human declarative memory formation [J]. Rev Neurosci, 2002, 13(4):299—312.
- [8] Burbach JP. The 2004 Nobel Prize for Physiology or Medicine for research into smell receptors and the organization of the olfactory system [J]. Ned Tijdschr Geneesk, 2004, 148 (52):2576—2579.
- [9] Lopez-Mascaraque L, de Castro F. The olfactory bulb as an independent developmental domain [J]. Cell Death Differ, 2002, 9(12):1279—1286.
- [10] Insausti R, Marcos P, Arroyo-Jimenez MM, et al. Comparative aspects of the olfactory portion of the entorhinal cortex and its projection to the hippocampus in rodents, nonhuman primates, and the human brain [J]. Brain Res Bull, 2002, 57 (3-4):557—560.
- [11] Balschun D, Manahan-Vaughan D, Wagner T, et al. A specific role for group I mGluRs in hippocampal LTP and hippocampus-dependent spatial learning [J]. Learn Mem, 1999, 6(2):138—152.
- [12] Vicini S, Ortinski P. Genetic manipulations of GABA_A receptor in mice make inhibition exciting [J]. Pharmacol Ther, 2004, 103(2):109—120.
- [13] Wilson DA, Fletcher ML, Sullivan RM. Acetylcholine and olfactory perceptual learning [J]. Learn Mem, 2004, 11(1):28—34.