

脊髓薄片器官型培养及组织化学鉴定方法研究[▲]

王晓娟* 宋学琴 王丽琴 肖向建** 刘卫刚 马 征 李春岩

【摘要】 目的 探讨脊髓薄片器官型培养的方法及其腹角 α 运动神经元、背角中间神经元的鉴别。方法 利用出生 8d 乳鼠的腰段脊髓组织切片建立脊髓器官型培养模型,并用神经元的特异性 SMI-32 和 Calretinin 单克隆抗体进行免疫组化染色,对脊髓腹角 α 运动神经元和背角中间神经元加以鉴定,测定培养液中乳酸脱氢酶(LDH)的含量。结果 脊髓片在体外生长良好,形态完整,α 运动神经元和背角中间神经元的数目及各时点培养液中 LDH 含量恒定,脊髓片可存活 2 个月以上。结论 脊髓的器官培养技术为研究脊髓生理、病理改变及神经保护提供了有效的方法。

【关键词】 脊髓 器官型培养 非磷酸化神经丝 乳酸脱氢酶 钙网膜蛋白

A study on organotypic spinal cord slice culture and histochemical identification

Wang Xiaojuan, Song Xueqin, Wang Liqin, et al

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

【Abstract】 Objective To develop a method of organotypic culture of spinal cord slice and to establish ways to differentiate ventral α-motor neuron and dorsal interneuron. **Methods** The slice cultures were prepared with lumbar spinal cord from 8-day-old rat. The survival of α-motor neuron was evaluated by immunohistochemical staining with monoclonal antibody SMI-32, a nonphosphorylated neurofilament marker. The interneurons in dorsal horn were identified by monoclonal anti-calretinin staining. Lactate dehydrogenase (LDH) levels in culture medium were also measured. **Results** The spinal cord explants could be maintained in the culture for more than 2 months with excellent cellular organization and stable populations of ventral α-motor neurons and dorsal interneurons. The levels of LDH at different culture times have no significant difference. **Conclusions** Organotypic spinal cord slice cultures may provide an effective method for physiological and pathological changes, and neuroprotection of spinal cord study.

【Key words】 Spinal cord Organotypic culture Nonphosphorylated neurofilament Lactate dehydrogenase Calretinin

我们自 2002 年 9 月至 2003 年 3 月利用脊髓薄片器官型培养技术,建立能在体外长期存活的稳定的脊髓培养模型,并对该模型进行鉴定,为进一步的基础和临床研究提供新的实验方法,报告如下。

对象与方法

一、材料

1. 实验动物:8 日龄 SD 乳鼠(购于河北医科大学实验动物中心)。

2. 培养液:MS[50%MEM(含 25mmol/L HEPES)+25%马血清+25%Hanks 平衡盐液(含 25.6mg/ml 葡萄糖)],GBSS(Geys 平衡盐液含 6.4mg/ml 葡萄糖)。

3. 实验仪器:CO₂ 培养箱、超净工作台、MCIL 组织切片机、Millipore Millicell-CM insert、倒置显微

镜、普通显微镜。

4. 组化试剂:一抗为小鼠抗非磷酸化神经丝单克隆抗体(SMI-32, Sternberger Monoclonals 公司)和小鼠抗钙网膜蛋白单克隆抗体(Calretinin, Neumarks 公司),二抗为生物素化马抗小鼠 IgG(Vector 公司),SABC 免疫组织化学试剂盒(即用型,武汉博士德公司),DAB 显色试剂盒(北京中山化学试剂公司)。

二、脊髓薄片器官型培养方法

将 SD 乳鼠断头,无菌条件下快速分离,取出整条脊髓,解剖显微镜下剪断腰段脊髓的神经根;用

▲ 本课题为河北省自然科学基金资助项目(编号 303487) 石家庄,河北医科大学第二医院神经内科(邮编 050000)

* 现在北京同仁医院神经内科

** 现在河北省人民医院康复科

MCIL组织切片切成 350 μm 厚的薄片,将腰段脊髓的切片转移到 GBSS 中,在室温下仔细分离成单片;6孔培养板内每孔放入 1ml 培养基 MS,并放置 Millipore Millicell-CM insert。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,置入 CO₂ 培养箱,每周换液 2 次^[1]。

三、免疫组化方法

培养的脊髓片以 4%多聚甲醛固定 30min,0.1 mol/L PB 冲洗 3 次;0.6%TritonX-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 $^{\circ}\text{C}$ 摇床过夜;0.05mol/LTBS 洗 10min 3 次,加二抗生物素化马抗鼠 (1:2000)60 min,SABC 60min,0.05mol/L TBS 洗 10min 3 次,DAB 显色 3~10min,0.05mol/L TBS 洗 10min 3 次,脱水、透明、封片。以 TBS 代替一抗为阴性对照。

四、形态学观察

观察体外培养 1、2、4、6 周时每个脊髓片腹角 α 运动神经元的数目,并测定 5mm \times 5mm 下的 4 个视野面积下背角中间神经元的数目。每个时点取存活的 3 个 insert 上的 15 个脊髓片进行研究。

五、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、2、4、6 周时培养液中 LDH 含量。各时点样本数为 15 个。

六、统计学方法

采用 SPSS 10.0 统计软件,行方差分析。

结 果

脊髓片在体外生长良好,面积逐渐增大,组织边缘有光晕,共培养脊髓片 150 片,存活 137 片,培养存活率高达 90%以上;存活时间长,均在 2 个月以上,最长可达 3 个月以上。在显微镜下可见培养脊髓片的背角较腹角暗淡,含有大量的体积小、重叠、密集、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,前正中裂较后正中沟明显。

SMI-32 组化染色可见每个脊髓片腹角均有 10~25 个左右的 α 运动神经元被染成深棕色,其直径均在 25 μm 以上,突起细长(图 1),培养的第 1~6 周 α 运动神经元的数目无明显差异,见表 1。脊髓背

角可见大量非特异性淡棕色着色的中、小体积的中间神经元,细胞排列紧密,有重叠。

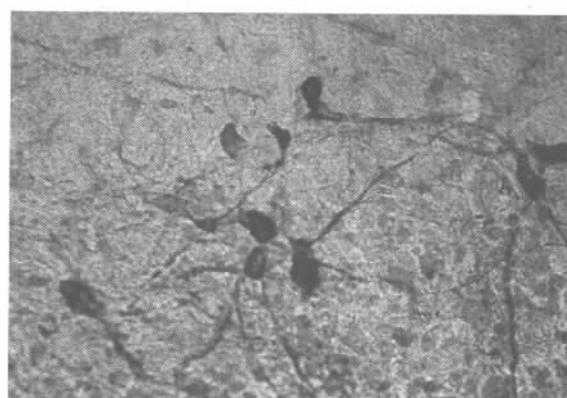
Calretinin 组化染色见双侧脊髓背角有大量胞浆内棕黄色着色的中、小体积的中间神经元,圆形或椭圆形,着色清晰,细胞排列紧密,有重叠,在两侧背角呈现出两条密集的细胞群(图 2),培养各时点中间神经元计数无明显差异。而脊髓腹角 Calretinin 染色多为阴性,偶见数个小的神经元着色,未见明显阳性着色的 α 运动神经元。

培养第 1~6 周,脊髓培养液中 LDH 的含量较恒定,各时点无显著性差异,见表 1。

表 1 体外培养各时脊髓片 α 运动神经元和背角中间神经元计数及培养液中 LDH 含量比较

项目	1周	2周	4周	6周	F值
样本数(个)	15	15	15	15	-
α 运动神经元计数(个)	17.4 \pm 3.2	16.1 \pm 4.7	14.9 \pm 5.0	13.6 \pm 4.0	2.341
背角中间神经元计数(个)	44.2 \pm 8.8	43.8 \pm 7.1	44.4 \pm 7.2	42.4 \pm 5.6	1.485
LDH含量(U/dl)	153 \pm 10.6	149 \pm 12.6	154 \pm 16.6	151 \pm 14.2	1.083

方差分析:不同时间相比 $P > 0.05$



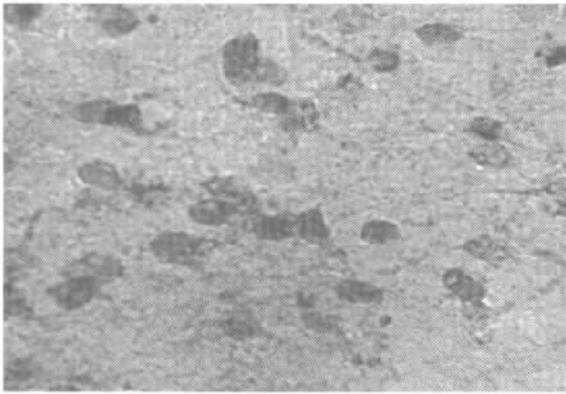
($\times 200$)

图 1 SMI-32 组化染色显示体外培养 4 周的脊髓片的腹角多个 α 运动神经元及其突起

讨 论

一、脊髓薄片器官型培养的特点

神经组织的体外培养方法是由 Harrison 于 1907 年首创,由于其具有简化细胞生长环境、明确生长条件、便于施加实验因素及容易获得活体直接



(×200)

图 2 Calretinin 组化染色显示脊髓背角密集的中间神经元

观测结果等优点, 已成为研究神经系统结构和功能的有效手段^[2]。脊髓组织的体外培养技术长期以来一直集中在植块培养上, 直至 10 余年前, 由于活组织切片机的应用才创建了脊髓切片的器官培养技术, 因其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, 与体内的生理环境相似, 而成为国际神经科领域的一个研究热点。脊髓薄片器官型培养对于研究脊髓生理、病理和疾病, 特别是为研究肌萎缩侧索硬化(ALS)提供了重要的技术手段^[3]。

二、SMI-32 组化染色运动神经元的鉴别

SMI-32 单克隆抗体为源于小鼠的抗神经丝抗体 IgG₁, 可与大多数哺乳动物神经丝重链亚单位的非磷酸化表位发生反应, 若表位发生磷酸化时则不能反应。阳性染色可以很好地显示神经系统神经元的胞体、树突和某些较粗大的轴突^[4]。脊髓运动神经元含有丰富的非磷酸化的神经微丝重链亚单位, 可用 SMI-32 识别。由于 SMI-32 免疫细胞化学染色具有高敏感度, 并显示良好的神经元形态, 目前已代替过去常用的抗乙酰胆碱酯酶抗体, 作为脊髓运动神经元标记物。具备 3 个标准者 (位于脊髓的腹侧、SMI-32 阳性、胞体直径 > 25μm) 被确定为 α 运动神经元^[5]。本组研究发现体外器官型培养的脊髓片中 α 运动神经元的数目比较恒定, 维持在每片 10 ~ 25 个左右, 不随时间的延长而明显减少, 且经 SMI-32 组化染色后 α 运动神经元及其突起着色清晰, 容易辨认, 为研究与运动神经元有关的疾病如 ALS 提供了有利条件。

三、Calretinin 组化染色背角中间神经元的鉴别

SMI-32 组化染色虽也可使脊髓片背角的中间神经元着色, 但由于这些神经元中神经丝含量相对

较少, 染色欠清晰, 故不利于计数。Calretinin 是胞质性钙结合蛋白(calcium-binding proteins, CaBP)的一种, 属于肌钙蛋白 C 超家族, 含有 5 个 EF 钙结合区, 相对分子质量约为 31 500。我们发现在培养的脊髓片中 Calretinin 具有区域特异性分布的特征, 在脊髓背角中有广泛的表达, 一般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, 而脊髓腹角仅见少量小的阳性神经元, 大体积的 α 运动神经元均为阴性。因此 Calretinin 可以用来作为培养的脊髓片背角感觉神经元的标记性抗原。Calretinin 作为感觉神经元胞质内蛋白质的主要组成成分在细胞内起钙缓冲或钙传感作用^[6,7]。

四、培养液中 LDH 含量变化

LDH 广泛存在于机体各种组织器官中, 是能量代谢中的一种重要酶。当机体组织病变或损伤时, 体液中 LDH 的含量可出现显著的变化, 已作为检测组织损伤的一项重要生化指标。对于体外培养的脊髓组织, 国外也用作检测损伤程度的生化指标。本组脊髓片中除了有恒定的运动神经元数目, 培养液中 LDH 的含量也维持在比较恒定的水平, 提示此种器官型培养能够模拟神经组织的生理环境, 对神经组织的生长没有明显的损伤作用。

目前, 我们应用的活组织切片机切取出生后大鼠已成熟的脊髓进行培养, 存活率达 90% 以上。存活时间达 2 个月以上^[8], 并可利用免疫组化方法对腹角 α 运动神经元和背角感觉中间神经元进行鉴别, 建立了成熟脊髓薄片的器官培养技术, 为长期研究脊髓生理、病理改变提供了有效的方法, 也为进一步的基础和临床神经保护研究提供了新方法。

参 考 文 献

1. Rothstein JD, L Jin, Dykes-Hoberg M, et al. Chronic inhibition of glutamine uptake produces a model of slow neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci*, 1993, 90:6591 - 6595.
2. Bar PR. Motor neuron disease in vitro: the use of cultured motor neurons to study amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Pharmacol*, 2000, 405(1-3):285.
3. Kaal EC, Vlug AS, Versleijin MW, et al. Chronic mitochondrial inhibition induces selective motoneuron death in vitro: a new model for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*, 2000, 74:1158 - 1165.
4. Gotow T, Tanaka J. Phosphorylation of neurofilament H subunit as related to arrangement of neurofilaments. *J Neurosci Res*, 1994, 37: 691 - 713.
5. Carriedo SG, Yin HZ, Weiss JH. Motor neurons are selec-

tively vulnerable to AMPA/Kainate receptor-mediated injury in vitro. *J Neurosci*, 1996, 16:4069 - 4079.

6. Rintoul GL, Raymond LA, Baimbridge KG. Calcium buffering and protection from excitotoxic cell death by exogenous calbindin-D28K in HEK 293 cells. *Cell Calcium*, 2001, 29:277 - 287.

7. Paxinos G, Carrive P, Hongqin W, et al. *Chemoarchitecture Atlas of*

the Rat Brainstem. London: Academic Press. 1999:243 - 244.

8. 杨 浩, 王春婷, 鞠 躬. 不同方法纯化体外培养脊髓神经元的比较. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2000, 9:258 - 260.

(收稿:2004-08-12)

· 短篇报道 ·

多发性硬化的临床特点和治疗

孙庆利 谢汝萍

多发性硬化(multiple sclerosis, MS)是中枢神经系统多灶性脱髓鞘性疾病。我们自 1981 年至 2003 年共收治 MS 108 例,其中 3 例经尸检证实,现将结果报告如下。

临床资料

本组 108 例,男 39 例,女 69 例;首次发病年龄为 10 ~ 74 岁,平均(36.12 ± 13.13)岁;发作次数为 1 ~ 7 次,平均 2.4 次。急性起病 53 例,亚急性起病 34 例,慢性起病 21 例。病程 1 个月 ~ 27 年,平均 4.54 年。95 例肢体瘫痪;66 例深、浅感觉减退或消失;55 例在病程中出现视力障碍;15 例复视;11 例眼球震颤;4 例饮水呛咳、吞咽困难;面瘫 3 例,上睑下垂及双瞳孔不等大各 2 例;听力下降 2 例;精神障碍 4 例。

MRI 检查 87 例,其中 78 例有脱髓鞘改变。脊髓内异常 59 例,其中颈髓受累 37 例,胸髓受累 33 例,颈、胸段脊髓同时受累 14 例,腰髓受累 3 例。11 例脊髓肿胀。大脑异常 41 例,脑干异常 27 例,小脑异常 12 例。

接受激素和(或)丙种球蛋白治疗者 98 例。大剂量甲泼尼龙冲击治疗 42 例,单独使用地塞米松治疗 35 例,单独使用丙种球蛋白治疗 11 例,先后使用甲泼尼龙及丙种球蛋白治疗 10 例。四组疗效分别为 83.3%、62.9%、81.8%、90.0%。

讨 论

本组发病年龄高峰在 20 ~ 40 岁,占全部患者的 60.2%。首次发病年龄最高 74 岁,为女性患者,有缓解-复发史,大脑、脑干、脊髓有多个脱髓鞘病灶,为典型的 MS 患者。此例患者为国内已报道患者中首次发病年龄最大者^[1]。本组患者以急性起病者为最多,病程相对较短,其平均病程比黄德晖等^[2]报道的 2.36 年长,但明显短于欧美等西方国家的报道。

根据临床症状、体征和影像学检查,可以发现本组中病变最常累及的部位是脊髓,其次是视神经、大脑、脑干、小脑。脊髓损害中以颈髓损害最多见,其次为胸髓,腰髓损害很少。

本组中 25 例于治疗后 10 ~ 40d 复查 MRI,6 例于治疗后 10d 病灶有所缩小,3 例有新病灶出现,其中 1 例在原病灶缩小的同时出现新病灶。17 例于治疗后 40d 病灶缩小。6 例

于治疗前行增强 MRI 扫描,其中 2 例于治疗后 40d 增强消失,同时其临床症状也有改善。由此可见,MRI 可以作为监测 MS 患者病情和评价治疗效果的指标。原有病灶的缩小和增强效应的消失可作为病情好转的指标之一。

本组 MRI 上脊髓病灶最短影响 2 个节段,最长 11 个节段。这与 2001 年 MS 新的诊断标准不符^[3]。新标准指出 MRI 上脊髓病灶无或很少有肿胀,长度不应超过 2 个椎体,而本组中脊髓肿胀者并不少见,且病灶长度明显超过 2 个椎体,说明国外新的诊断标准不完全适用于我国 MS 患者。

甲泼尼龙冲击组的疗效明显高于地塞米松组 ($P < 0.05$)。前者对改善肢体瘫痪、痛性痉挛、肢体麻木等症状比地塞米松组快,且不良反应轻。因此,甲泼尼龙冲击治疗可以作为 MS 急性期有效的治疗方法。其他两组的疗效与甲泼尼龙组相近,但由于例数较少,其疗效的比较需进一步观察。对于不适宜甲泼尼龙冲击治疗的患者,可以采用丙种球蛋白治疗。

总之,本组 MS 患者的特点是好发于中青年,起病急,多数有缓解-复发史,病程短,脊髓和视神经受累最多。MRI 检查可作为监测 MS 病情变化和治疗的指标,甲泼尼龙冲击或丙种球蛋白治疗有效。

参 考 文 献

1. 刘焯霖,梁秀龄,张 成,主编.神经遗传病学.第 2 版.北京:人民卫生出版社. :477 - 501.
2. 黄德晖,吴卫平,蒲传强,等.多发性硬化 226 例临床分析.中国神经免疫学和神经病学杂志, 2003, 10:152 - 155.
3. McDonald WI, Compston A, Edan G, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the international panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol*, 2001, 50: 121 - 127.

(收稿:2004-06-04)

北京大学第三医院神经内科(邮编 100083)