

# 原子力显微镜下观察急性压力损伤后 脊髓背根神经节神经元的结构变化

权 鑫, 叶正旭, 王宇清, 罗卓荆

(第四军医大学西京医院全军骨科研究所 710032 陕西省西安市)

**【摘要】目的:**利用脊髓背根神经节神经元细胞体外机械压力损伤模型,探讨单纯机械压力因素对背根神经节神经元细胞的损伤效应,尤其是细胞膜骨架蛋白的变化情况。**方法:**新生 SD 大鼠脊髓背根神经节神经元体外原代培养,利用多功能全自动细胞压力仪(国家实用新型专利 ZL 200820030390.7),将培养细胞分为 A、B、C、D 四组,其中 A 组为未施加机械压力损伤的对照组,B、C、D 组分别给予 0.3mPa、0.5mPa、0.7mPa 的压力损伤 10min,每组观察细胞爬片 6 个,于加压后培养 8h 取细胞爬片固定,送原子力显微镜检测,观察神经元细胞的细胞膜骨架蛋白纳米级变化情况,获取并分析胞膜表面颗粒高度分布数据及原子力显微镜图片。**结果:**对照组细胞膜表面平滑,无明显粗糙颗粒;0.3mPa 组细胞膜表面颗粒突起较对照组增多,膜颗粒总体高度增加,局部变粗糙,胞膜上蛋白高度分布直方图峰值右移;0.5mPa 组较 0.3mPa 组细胞膜粗糙度更加明显;0.7mPa 组膜表面蛋白颗粒总体高度较 0.3mPa 及 0.5mPa 组降低,粗糙颗粒减少,但出现胞膜骨架蛋白解聚与构像变化,胞膜出现孔道样改变。胞膜颗粒高度分布峰值、分布宽度及最高颗粒值的单因素方差分析显示,压力损伤各组间及损伤组与对照组均有统计学差异( $P<0.01$ )。**结论:**机械压力损伤因素可引起细胞膜骨架蛋白变化和表面颗粒高度变化,为压力损伤的细胞保护研究提供了实验数据。

**【关键词】**脊髓损伤;原子力显微镜;神经元细胞;细胞培养;机械压力

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2012.02.16

中图分类号:R683.2 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2012)-02-0165-05

**Structural changes of dorsal root ganglion neuron injured by acute mechanical pressure: an AFM observation/QUAN Xin, YE Zhengxu, WANG Yuqing, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2012, 22(2): 165-169**

**【Abstract】Objectives:** To investigate the spinal cord injury mechanism especially the nanoscale reaction of membrane skeleton protein in spinal cord injury under mechanical pressure by using the cultured dorsal root ganglion neuron cells in vitro and simulation of mechanical injury device. **Methods:** The primary culturing of dorsal root ganglion neuron cells from new born S-D rats was used, and the mechanical pressure on cultured cells was added by the multi-functional automatically mechanical pressure equipment (national patent of utility model, ZL 200820030390.7). The cells were divided to 4 groups, group A, B, C and D. The group A was tested as control group. The group B, C and D experienced 0.3mPa, 0.5mPa and 0.7mPa mechanical pressure for 10 min respectively. The cells were fixed by formaldehyde when cultured for 8 hours, the ultra structure of the cell membrane skeleton protein was observed by AFM (atom force microscope), with 6 different Petri dishes of cells for each group. The nanoscale reaction of membrane skeleton protein was observed, the corresponding data of the height of the membrane particle and roughness parameters as well as the AFM photos were acquired. **Results:** The cell membrane of the control group was smooth and not apparently rough. The 0.3mPa group showed the particle height of cell membrane increased apparently compared with the control group, the membrane surface seemed more rough, and the peak value of the histogram of the protein height

基金项目:国家自然科学基金青年项目资助(30901510)

第一作者简介:男(1984-),医学在读硕士,研究方向:脊柱脊髓损伤

电话:(029)84775573 E-mail:docquanxin@qq.com

通讯作者:罗卓荆 E-mail:zjluo@fmmu.edu.cn

on cell surface shifted rightly. The 0.5mPa group showed more severe changes than the 0.3mPa group. The 0.7mPa group showed the particle height of cell membrane protein decreased and became less rough, nevertheless, some porous channel occurred at the membrane. The statistical results of the peak value, the maximal value and the width of particle height value indicated that different mechanical pressure value produced different membrane roughness ( $P < 0.01$ ). **Conclusions:** Different mechanical pressures produce different membrane roughness as well as the membrane skeleton protein, which can supply basis for protection of injured cells.

**[Key words]** Spinal cord injury; Mechanical pressure; Cell culture; Neuron cells; Atomic force microscope

**[Author's address]** PLA Institute of Orthopaedics, Xijing Hospital, Fourth Military University, Xi'an, 710032, China

脊髓神经元细胞是神经系统的基本结构功能单位,通过接受、整合、传导和输出信息实现脊髓信息的交换。神经元细胞单纯机械损伤是脊髓外伤、脊柱退变疾病等的共同环节,但以往研究大多着眼于神经元与胶质细胞共培养或单纯胶质细胞损伤的体外研究<sup>[1-3]</sup>,单纯神经元细胞的机械压力损伤后细胞骨架纳米级结构变化还不明确。原子力显微镜(AFM)作为一种新兴的显微观测工具,在生物领域的应用日益广泛。在胞膜表面蛋白分布,胞膜扩展与胞吐等方面,原子力显微镜显示了其纳米级分辨的优越性<sup>[4]</sup>。本实验利用体外培养脊髓神经元细胞机械压力损伤模型,利用目前最先进的原子力显微镜检测技术,研究不同机械压力值损伤下细胞超微结构变化,尤其是胞膜骨架蛋白的纳米级结构变化,探讨机械压力损伤脊髓神经元细胞的机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物、试剂及主要设备

新生 1d SD 大鼠由第四军医大学实验动物中心提供。神经元专用培养液 Neurobasal 及添加剂 B27、谷氨酰胺、双抗购自美国 Gibco 公司,24 孔细胞培养板、多聚赖氨酸、4%多聚甲醛、0.25%胰酶、0.1%四型胶原酶购自 Sigma 公司。倒置相差显微镜(德国 Leica 公司),原子力显微镜 AFM (Veeco, 美国),AFM 配套图像分析软件 Nanoscope Analysis (Veeco, 美国)。

### 1.2 新生大鼠脊髓背根神经节神经元细胞的培养、纯化和鉴定

根据文献<sup>[5]</sup>的方法进行改良,取出生 1d SD 大鼠,75%酒精浸泡麻醉,置于冰块上,无菌条件下显微器械去除椎管内脊髓组织,暴露脊髓背根神经节,逐一取出背根神经节,小心剥除其上的血管及杂质,显微剪剪碎后,0.25%胰酶及 0.1%四型

胶原酶 37℃条件下混合消化 25min,细胞团块于 0℃ PBS 内静置洗涤 3 遍,0℃ DF12 培养液内静置终止消化 5min,1ml 枪头缓慢吹打 10 次,1100r/min 离心 5min,弃上清,吹打悬浮细胞悬液,以  $0.5 \times 10^5/\text{cm}^2$  的密度接种于包被有多聚赖氨酸的 24 孔培养板中,得到贴壁生长的细胞爬片。贴壁 6h 后全量换成神经元专用培养液 Neurobasal,培养第 3 天加入阿糖胞苷(终浓度为  $5\mu\text{g}/\text{ml}$ )作用 1~2d,抑制胶质细胞生长,提高神经元细胞纯度。培养第 5 天状态良好的细胞行倒置相差显微镜拍照,并行神经元特异性  $\beta$ -tubulin III 染色及细胞核 DAPI 双染,鉴定细胞类型并计算纯度。

### 1.3 培养细胞急性压力损伤加载及原子力显微镜观察

利用全自动细胞体外压力冲击仪(图 1,获国家实用新型专利 ZL 200820030390.7),对培养得到的神经元活细胞爬片进行体外急性压力加载,将培养细胞分为 A、B、C、D 四组,其中 A 组为未施加机械压力损伤的对照组,B、C、D 组分别给予



图 1 多功能细胞体外压力冲击仪

**Figure 1** Multi-functional automatically mechanical pressure equipment (national patent of utility model, ZL 200820030390.7)

0.3mPa、0.5mPa、0.7mPa 的压力损伤 10min, 每组观察细胞爬片 6 个, 于加压后培养 8h 行 4%多聚甲醛固定, 送原子力显微镜检测。各检测样本依次行 PBS 及蒸馏水洗涤, 风干后细胞爬片固定于检测台上待检。原子力显微镜采用轻敲模式, 横向分辨率 1nm, 纵向分辨率 0.5nm。每组细胞爬片先扫描到明确的单个背根神经节神经元细胞, 再在该细胞膜表面选定一  $2.5 \times 2.5 \mu\text{m}$  区域, 重新放大扫描, 获取该区域的图片和表面颗粒参数。利用原子力显微镜配套分析软件 Nanoscope Analysis 分析该区域内膜表面颗粒高度分布直方图, 观察细胞膜表面拓扑结构纳米级变化情况, 了解细胞膜骨架蛋白的动态变化情况。

#### 1.4 统计学处理

所有数据应用 SPSS 13.0 软件处理, 以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。方差齐时采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验; 方差不齐时采用 Kruskal-Wallis 检验, 多重比较采用 Nemenyi 法检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 神经元鉴定结果

倒置相差显微镜观察细胞爬片, 可见神经元胞体呈圆形或椭圆形等, 神经突起呈网状结构(图 2)。神经元特异性染色  $\beta$ -tubulin III 及细胞核 DAPI 双染显示神经元细胞纯度  $\geq 95\%$ (图 3)

### 2.2 原子力显微镜观察图像

与未施加急性压力的对照组相比, 各压力组的神经元细胞膜粗糙度增加, 拓扑结构发生改变, 表面颗粒及突起凹陷增多, 0.7mPa 时胞膜出现孔道样结构。纳米级的颗粒高度统计直方图分布有明显差异(图 4~7)。

### 2.3 细胞膜表面颗粒高度分布直方图与统计数据

随着压力损伤值的增高, 细胞膜表面颗粒逐渐增多, 膜颗粒总体高度增加, 粗糙度增加, 胞膜上蛋白高度分布直方图峰值右移, 压力值到 0.7mPa 时膜表面蛋白颗粒总体高度反而降低, 粗糙度降低, 但胞膜出现孔道样改变。胞膜颗粒高度分布峰值、分布宽度及最大颗粒值的单因素方差分析显示, 压力损伤组间及损伤组与对照组间均有统计学差异( $P < 0.01$ )(图 8~11, 表 1)。

## 3 讨论

急性脊髓损伤的致伤机制复杂, 排除综合因素, 逐一研究生物化学、机械物理等损伤机制, 是深化研究脊髓损伤机制的发展方向。单纯压力损伤模型方面大致分为几种: 流体剪切力加载、硅胶膜牵张力加载、直接压力加载、液压加载等<sup>[7]</sup>。文献报导有关节面软骨细胞、颞合关节软骨细胞、PC12 细胞、神经胶质细胞等<sup>[8-11]</sup>的压力损伤研究, 研究的重点大多在机械压力损伤细胞引起的功能与大体形态改变及死亡、凋亡等, 利用原子力显微镜优势对脊髓背根神经节神经元细胞膜的纳米级研究鲜见。

原子力显微镜(AFM)可以定量观察神经元的胞膜、细胞器和细胞骨架, 在神经发生和神经损伤领域提供研究手段。所要求的观察标本可以是生理状态下的活细胞, 也可以是固定过的标本, 检测样本制备简单, 不需做特殊处理, 不受荧光抗体强弱的影响, 提供超高轴向和垂直分辨率(纳米级), 精确量化各轴向上的高度, 并可以进行 3D 还原成像<sup>[11]</sup>。细胞膜基本结构为磷脂双分子层镶嵌蛋白大分子, 蛋白大分子与膜内层的胞内骨架结构相连, 其结构单位为纳米级的。Fen 等<sup>[12]</sup>通过红细胞的胞膜及骨架的原子力显微镜观察提示, 原子力显微图像中突出的部分即灰度较高的部分为膜骨架蛋白大分子, 凹陷的部分即灰度较低的部分为膜磷脂双分子层。不同机械压力损伤组细胞膜表面的原子力显微镜观测, 提供了高分辨率的膜表面拓扑结构图像, 并为定量分析膜表面颗粒提供了可能, 为我们研究机械压力损伤细胞的机制, 尤其是机械压力信号转换为胞内生物化学信号的机制, 何种结构参与信号转换, 以怎样的形式实现转换, 提供了重要的线索。

细胞膜基本结构为磷脂双分子层镶嵌蛋白大分子, 蛋白大分子与膜内层的胞内骨架结构相连。Fen 等<sup>[12]</sup>通过红细胞的胞膜及骨架的原子力显微镜观察提示, 原子力显微图像中突出的部分即灰度较高的部分为膜骨架蛋白大分子, 凹陷的部分即灰度较低的部分为膜磷脂双分子层。目前原子力显微镜配套软件所获取胞膜表面粗糙参数均不一致, 还没有一个统一的评价标准来描述膜表面粗糙度的差异<sup>[13]</sup>。本实验通过配套软件分析结果, 取固定区域内胞膜表面颗粒分布峰值、颗粒高度最大值及最大最小值之间差值, 来描述分析不同



机械压力条件下神经元细胞膜骨架蛋白的颗粒高度差异,探讨粗糙度随机机械损伤值的变化而产生变化的规律。

实验所用细胞体外压力加载装置是在 Yousefian 氏<sup>[14]</sup>细胞液压加载装置基础上改进形成的,不同压力损伤组的原子力显微镜观测结果显示,0.3mPa 组、0.5mPa 组神经元胞膜蛋白高度分布与空白对照组明显不同,表现为膜表面粗糙度增高,膜蛋白颗粒高度与直径增大,提示压力损伤可能导致膜骨架蛋白的分解与重排,介导细胞膜表面骨架蛋白的水解、变形<sup>[15,16]</sup>。0.5mPa 损伤组的膜表面蛋白高度分布较 0.3mPa 组明显右移,即平均高度增加,但分布宽度缩窄,提示提高压力损伤

值后胞膜反应变化更加明显但高度分布更加趋于集中,到 0.7mPa 损伤组时,胞膜蛋白高度降低,且高度值更趋于均一,但纳米级分辨率的原子力显微镜胞膜照片可见胞膜出现明显孔道样改变,形成胞膜穿孔,提示 0.7mPa 损伤组已明显引起胞膜结构破坏,超出胞膜蛋白压力承受界值,神经元细胞结构功能改变,可能会激活细胞坏死凋亡通路,引起细胞破坏。各压力加载组与空白对照组的颗粒高度分布峰值、高度最大值及最大最小之间差值比较均有统计学差异( $P<0.01$ )。

细胞膜蛋白作为细胞的基本结构,介导了细胞与外界基质的物质交换与信号传递,是细胞内外物质交换的一道重要屏障。本实验细胞膜蛋白

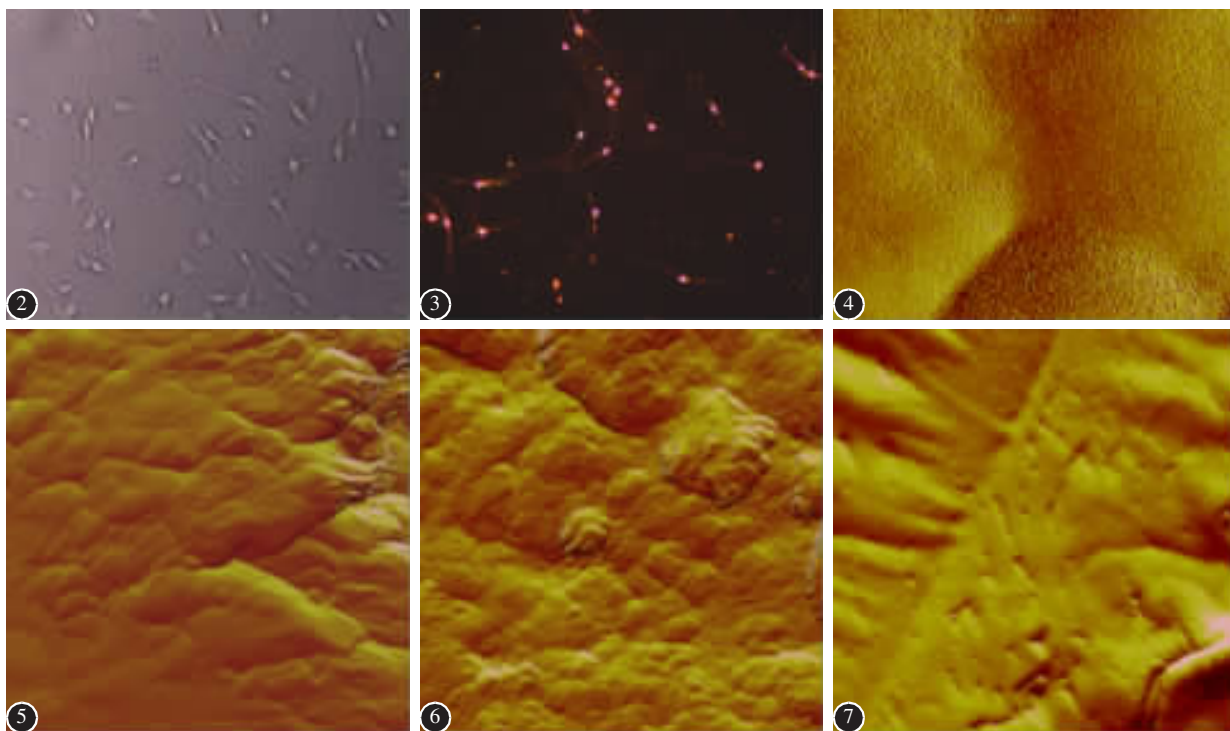


图 2 新生大鼠脊髓背根神经节神经元细胞原代培养图(倒置相差显微镜  $\times 100$ ) 图 3 神经元特异性染色  $\beta$ -tubulin III 及细胞核 DAPI 双染( $\times 100$ ,纯度 $\geq 95\%$ ) 图 4 对照组细胞(置入压力舱内但未加压力)爬片固定样本示胞膜表面较平坦,无明显粗糙颗粒( $2.5 \times 2.5 \mu\text{m}$ ,下同) 图 5 0.3mPa 组固定样本示与对照组比较,胞膜粗糙度增加,拓扑结构发生改变,表面颗粒及突起凹陷增多 图 6 0.5mPa 组固定样本示胞膜粗糙改变更加明显,表面颗粒数目增加 图 7 0.7mPa 组固定样本示膜表面颗粒粗糙程度未明显增加,但胞膜出现明显孔道样改变

**Figure 2** The primary culture of dorsal root ganglia neuron cells from new born S-D rats (inverted phase contrast microscope  $\times 100$ ) **Figure 3** The neuron specific immunohistochemistry staining of  $\beta$ -tubulin III and counter staining with DAPI ( $\times 100$ ,purity $\geq 95\%$ ) **Figure 4** The cell membrane of the control group was smooth and not apparently rough ( $2.5 \times 2.5 \mu\text{m}$ , the same below) **Figure 5** The 0.3mPa group showed that the particle height of cell membrane increased apparently compared with the control group, the membrane seemed more rough, the topographic structure changed **Figure 6** The 0.5mPa group displayed much more severe changes than the 0.3mPa group, the number of the membrane particles increased **Figure 7** The 0.7mPa group showed the number of membrane particles decreases, became less rough, nevertheless, some porous channel like structure occurs at the membrane

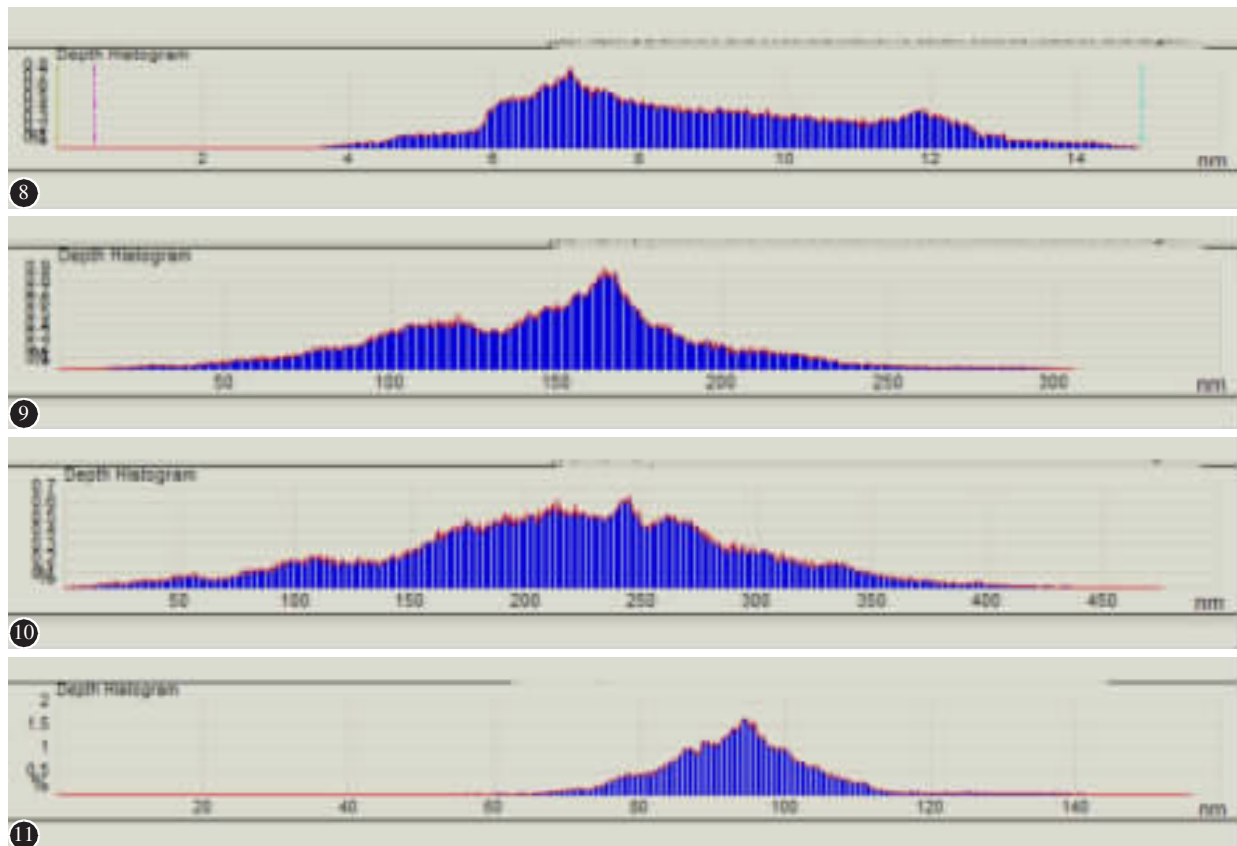


图 8 对照组细胞爬片固定后细胞表面颗粒高度分布直方图(横轴为颗粒高度,纵轴为对应的分布百分比),大多膜表面颗粒分布在 4~14nm 之间 图 9 0.3mPa 组细胞表面颗粒高度分布直方图(横轴为颗粒高度,纵轴为对应的分布百分比),大多膜表面颗粒分布在 50~250nm 之间 图 10 0.5mPa 组细胞表面颗粒高度分布直方图(横轴为颗粒高度,纵轴为对应的分布百分比),大多膜表面颗粒分布在 50~400nm 之间,较 0.3mPa 组更加粗糙 图 11 0.7mPa 组细胞表面颗粒高度分布直方图(横轴为颗粒高度,纵轴为对应的分布百分比),大多膜表面颗粒分布在 60~140nm 之间

**Figure 8** Histogram of the protein height distribution on cell surface of control group (the horizontal axis presents the height of particles, the longitudinal axis presents the percentage of the corresponding height, the same below), most of particle height distributed from 4–14nm **Figure 9** Histogram of the protein height distribution on cell surface of 0.3mpa group, the particle height distributed from 50–250nm **Figure 10** Histogram of the protein height distribution on cell surface of 0.5mPa group, the particle height distributed from 50–400nm, seemed much more rough than 0.3mPa group **Figure 11** Histogram of the protein height distribution on cell surface of 0.7mPa group, the particle height distributed from 60–140nm

表 1 胞膜表面颗粒分布峰值、颗粒高度最大值及最大最小值之间差值

**Table 1** The statistical results of the peak value, the maximal value and the width of

|                                       | particle height value                          |                                              |                                 |
|---------------------------------------|------------------------------------------------|----------------------------------------------|---------------------------------|
|                                       | 胞膜表面颗粒高度分布峰值<br>the peak value of the particle | 颗粒高度最大值<br>the maximal value of the particle | 差值<br>the width of the particle |
| 对照组(A组)<br>control group(group A)     | 10.17±2.93                                     | 14.50±1.87                                   | 10.00±1.41                      |
| 0.3mPa 组(B组)<br>0.3mPa group(group B) | 161.00±7.29 <sup>①</sup>                       | 301.67±7.71 <sup>①</sup>                     | 270.17±7.41 <sup>①</sup>        |
| 0.5mPa 组(C组)<br>0.5mPa group(group C) | 241.17±6.31 <sup>①②</sup>                      | 436.00±11.52 <sup>①②</sup>                   | 423.17±5.27 <sup>①②</sup>       |
| 0.7mPa 组(D组)<br>0.7mPa group(group D) | 94.17±4.71 <sup>①②③</sup>                      | 136.17±6.1 <sup>①②③</sup>                    | 80.67±3.50 <sup>①②③</sup>       |

注:①与 A 组比较  $P<0.01$ ;②与 B 组比较  $P<0.01$ ;③与 C 组比较  $P<0.01$

①Compared with group A,  $P<0.01$ , ②Compared with group B,  $P<0.01$ , ③Compared with group C,  $P<0.01$

的纳米级显微观察可以推断,胞膜与脂质相连的膜骨架蛋白参与了机械压力信号的生物学转换的感受,转导。膜蛋白通过自身结构的改变,可能激活与其相连的下游细胞内骨架结构及其他胞内结构,如整合素蛋白等,产生一定的细胞内生物学效应,将外界机械力学信号转换为生物学信号。这为进一步研究膜机械感受蛋白的类型以及力学损伤细胞的信号转换机制的深入研究提供了实验数据与思路。

#### 4 参考文献

- DeRidder M, Simon MJ, Siman R, et al. Traumatic mechanical injury to the hippocampus in vitro causes regional caspase-3 and calpain activation that is influenced by NMDA receptor subunit composition[J]. *Neurobiol Dis*, 2006, 22(1): 165-176.
- Vandevord PJ, Leung LY, Hardy W, et al. Up-regulation of reactivity and survival genes in astrocytes after exposure to short duration overpressure[J]. *Neurosci Lett*, 2008, 434(3): 247-252.
- LaPlaca MC, Cullen DK, McLoughlin JJ, et al. High rate shear strain of three-dimensional neural cell cultures: a new in vitro traumatic brain injury model[J]. *J Biomech*, 2005, 38(5):1093-1105.
- Iseru DF, Anghelina M, Agarwal S, et al. Changes in surface topologies of chondrocytes subjected to mechanical forces: an AFM analysis[J]. *J Struct Biol*, 2008, 162(3): 397-403.
- Sui F, Zhang CB, Yang N, et al. Anti-nociceptive mechanism of baicalin involved in intervention of TRPV1 in DRG neurons in vitro[J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 129(3): 361-366.
- Brown TD. Techniques for mechanical stimulation of cells in vitro: a review[J]. *J Biomech*, 2000, 33(1): 3-14.
- Zhang M, Wang JJ, Chen YJ. Effects of mechanical pressure on intracellular calcium release channel and cytoskeletal structure in rabbit mandibular condylar chondrocytes [J].*Life Sci*, 2006, 78(21): 2480-2487.
- Wu MJ, Gu ZY, Sun W. Effects of hydrostatic pressure on cytoskeleton and BMP-2, TGF- $\beta$ , SOX-9 production in rat temporomandibular synovial fibroblasts[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2008, 16(1): 41-47.
- Wilson RG Jr, Zimmerman S, Zimmerman AM. The effects of hydrostatic pressure-induced changes on the cytoskeleton and on the regulation of gene expression in pheochromocytoma (PC-12) cells[J]. *Cell Biol Int*, 2001, 25(7): 667-677.
- Cullen DK, Simon CM, LaPlaca MC, et al. Strain rate-dependent induction of reactive astrogliosis and cell death in three-dimensional neuronal astrocytic co-cultures [J]. *Brain Res*, 2007, 1158(7): 103-115.
- McNally HA, Rajwa B, Sturgis J, et al. Comparative three-dimensional imaging of living neurons with confocal and atomic force microscopy[J]. *J Neurosci Methods*, 2005, 142(2): 177-184.
- Liu F, Mizukami H, Sarnaik S, et al. Calcium-dependent human erythrocyte cytoskeleton stability analysis through atomic force microscopy [J]. *J Struct Biol*, 2005, 150(2): 200-210.
- Moroz VV, Chernysh AM, Kozlova EK, et al. Comparison of red blood cell membrane microstructure after different physicochemical influences: atomic force microscope research [J]. *J Crit Care*, 2010, 25(539): 1-12.
- Yousefian J, Firouzian F, Shanfeld J, et al. A new experimental model for studying the response of periodontal ligament cells to hydrostatic pressure[J]. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 1995, 108(4): 402-408.
- Girasole M, Pompeo G, Cricenti A, et al. Roughness of the plasma membrane as an independent morphological parameter to study RBCs: a quantitative atomic force microscopy investigation[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1768(5): 1268-1276.
- Girasole M, Pompeo G, Cricenti A, et al. The how, when, and why of the aging signals appearing on the human erythrocyte membrane: an atomic force microscopy study of surface roughness[J]. *Nanomedicine*, 2010, 6(6): 760-768.

(收稿日期:2011-06-13 修回日期:2011-07-13)

(英文编审 蒋欣/贾丹彤)

(本文编辑 彭向峰)