

· 基础研究 ·

微波辐射对大鼠海马神经元的损伤效应及其机制研究

杨瑞 彭瑞云 高亚兵 王水明 胡文华 徐心萍 苏镇涛 胡向军 徐天昊

【摘要】目的 观察微波辐射对海马神经元的损伤效应及其对细胞膜和 $[Ca^{2+}]$ 的影响,以探讨微波致海马损伤的机制。**方法** 采用 10 mW/cm^2 微波辐射源辐射原代培养的海马神经元,采用 MTT 法测定细胞活力;流式细胞仪检测细胞凋亡和坏死率;Fluo232AM 荧光探针负载、激光共聚焦显微镜扫描测定神经元胞内游离钙离子浓度;原子力显微镜观察细胞膜的改变。**结果** 辐射后 6 h,海马神经元生长活力下降($P < 0.01$);辐射后 1 d,细胞凋亡和坏死率增加($P < 0.01$);辐射后即刻,神经元内 $[Ca^{2+}]$ 荧光强度增加($P < 0.01$),细胞膜穿孔。**结论** 微波辐射后海马神经元生长活力下降,凋亡和坏死率增加;神经元膜穿孔及胞内 $[Ca^{2+}]$ 增加是其损伤重要机制。

【关键词】 微波; 海马神经元; 凋亡与坏死; $[Ca^{2+}]$; 原子力显微镜

The effect of microwaves on hippocampal neurons in vitro and its mechanism YANG Rui, PENG Rui-yun, GAO Ya-bing, WANG Shui-ming, HU Wen-hua, XU Xin-ping, SU Zhen-tao, HU Xiang-jun, XU Tian-hao. Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China

【Abstract】 Objective To investigate the effects of microwaves on hippocampal neurons (HNs) and changes in the cellular membrane (CM) and the concentration of Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) in vitro, and to explore the mechanisms involved. **Methods** Cultured HNs were exposed to 10 mW/cm^2 microwave irradiation. The survival rates (SRs) of HNs were detected with MTT, and cell apoptosis and necrosis rates (CANRs) were measured using Flow Cytometer. $[Ca^{2+}]_i$ was determined using a Fluo232AM fluorescent probe and laser scanning confocal microscopy, and the CMs were observed by means of atomic force microscopy (AFM). **Results** Intracellular $[Ca^{2+}]_i$ was increased and CM perforation was observed after microwave exposure (ME). The SR of HNs was significantly decreased at 6 h after ME ($P < 0.01$), but CANRs were significantly increased at 24 h after ME ($P < 0.01$). **Conclusion** The decrease in SRs and the increase in CANRs in HNs can be caused by ME, and its mechanism may involve CM perforation and the increase of $[Ca^{2+}]_i$ in HNs.

【Key words】 Microwaves; Hippocampal neurons; Apoptosis; Necrosis; Calcium ions; Atomic force microscopy

随着微波技术的广泛应用,微波辐射的生物效应及其作用机制研究已成为生物物理领域的重要课题之一。大量的研究表明,微波辐射可影响脑的功能,尤其是引起人及实验动物学习和记忆能力的下降^[1,2]。然而微波对大鼠海马神经元的损伤效应及其机制尚不清楚。为此,本研究经微波辐射后,采用四唑盐比色法(tetrazolium salt colorimetric assays, MTT)、流式细胞术、激光扫描共聚焦显微镜、原子力显微镜等技术,探讨海马神经元损伤效应、细胞膜及细胞内 $[Ca^{2+}]$ 的改变在其损伤中的可能机制。

材料与方法

一、材料

1. 主要试剂:Annexin-V 细胞凋亡检测试剂盒购自北京宝赛生物技术有限公司;Fluo-3-AM 为 Molecular Probes 公司产品;兔抗 NSE 和 GFAP IgG 购自北京中山生物技术有限公司。

2. 主要设备:美国 BIO-RAD 公司产 Model 550 酶联免疫检测仪、美国 B-D 公司产 FACS Calibur 流式细胞仪、Bio-Rad 公司产 Radianc 2100™ 激光扫描共聚焦显微镜、Nikon 公司产 TE300 倒置显微镜、日本 SHIMADZU 公司产 SPM-9500J3 原子力显微镜。

3. 实验动物:Wistar 雄性大鼠 30 只,鼠龄为出生后 12 h 内,体重(8 ± 1)g,由军事医学科学院实验动物中心提供。

二、方法

(一) 海马神经元原代培养、鉴定与分组

取上述大鼠,麻醉后,断头取脑用 75% 乙醇浸泡 5 min,剥离海马并置于解剖液中,用含 0.125% 胰蛋白

基金项目:全军“十一五”专项项目(No. 06Z065);国家 863 基金
作者单位:100850 北京,军事医学科学院放射与辐射医学研究所
通讯作者:彭瑞云

酶 37℃ 消化,将组织块移入适量种植液中,离心半径 6 cm,1 000 r/min 离心,去上清,再加适量种植液,过滤,台盼蓝染色观察存活率(一般 >90%)。将细胞按 5×10^5 个/ml 的密度接种在多聚赖氨酸包被的培养皿中,置于 37℃,5% 的 CO₂ 培养箱内。24 h 后将种植液换为饲养液,以后每周半量换液 2 次。为抑制非神经元过度增殖,在培养的第 4 天向培养基中加入适量阿糖胞苷(每皿中加其储备液 30 ~ 50 μ l,终浓度为 3 ~ 5 μ g/ml),培养 10 d 后使用。采用神经元特异性烯醇化酶(neuron specific enolase, NSE)和胶质纤维酸性蛋白 A(glial fibrillary acidic protein, GFAP)抗体,以免疫组化 SP 法进行神经元鉴定。随机将细胞分为对照组($n = 15$)和辐射组($n = 15$)。

(二) 细胞辐射方法

辐射组的细胞经 10 mW/cm² 的微波模拟源进行辐射,辐射时间为 5 min。对照组细胞仅放在辐射台上,不进行辐射。

(三) MTT 法检测海马神经元活力的改变

将神经元培养于 96 孔板中,培养 10 d 后进行微波辐射,辐射后 6 h、1 d 和 3 d 进行 MTT 染色^[3],主要步骤为:(1)向 96 孔培养板的每孔中加入 MTT 溶液 20 ml;(2)5% CO₂ 孵箱内继续培养 4 h;(3)培养液全部吸出,每孔中再加入 150 μ l DMSO;(4)振荡 10 min,使结晶充分溶解;(5)用美国 BIO-RAD 公司 Model 550 酶联免疫检测仪在 570 nm 波长下测量读取光密度(OD 值)。

(四) 流式细胞仪检测神经元凋亡与坏死率

参照 Koopman 的方法^[4]并加以改进,主要步骤为:(1)50 ml 培养瓶中按 5×10^5 个/ml 密度接种神经元;(2)培养 10 d 后进行微波辐射;(3)辐射后 1 d,将细胞用 0.25% 胰酶消化;(4)调整细胞浓度为 5×10^6 个/ml;(5)取 1 ml 细胞,1 000 r/min 4℃ 离心 5 min,弃上清;(6)将细胞重悬于 200 μ l 结合缓冲液,加入 10 μ l Annexin V-FITC 和 5 μ l PI,混匀反应 15 min;(7)加入 300 μ l 结合缓冲液,上机检测。

(五) 激光扫描共聚焦显微镜检测神经元内 [Ca²⁺]

激光扫描共聚焦显微镜检测神经元内 [Ca²⁺]^[5],主要步骤为:(1)35 mm 培养皿中按 5×10^5 个/ml 密度接种神经元;(2)培养 10 d 后进行微波辐射;(3)辐射后即刻,缓冲液漂洗 3 次;(4)Fluo-3-AM (20 mM) 37℃ 孵育 30 min;(5)加 0.5 ml 缓冲液,放置于激光扫描共聚焦显微镜上,以 3 ~ 6 s 的间隔连续扫描细胞,总时间 1 ~ 4 min。随机选取胞突完整的神经元,对照组和辐射组各采集 30 个以上细胞,所得图像和数据由计算机收集分析,即得每个细胞内 [Ca²⁺]_i 的相对荧

光强度值。

(六) 原子力显微镜检测神经元细胞膜结构

原子力显微镜检测神经元细胞膜结构^[6],辐射后即刻进行检测,细胞用 PBS 洗,1.5% 戊二醛固定,把贴有细胞的培养皿用剪刀剪下,粘在原子力显微镜(日本 SHIMADZU 公司,型号 SPM-9500J3)的样品台上,放入样品室内,进行接触式连续扫描,观察细胞膜的变化。SPM-online 2.45 软件控制扫描,SPM-offline 2.2 软件进行分析。

三、统计学分析

所测数据均以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,用 SPSS 11.0 分析软件对各组实验数据的均值进行 Dunnett t 检验。

结 果

一、微波辐射后海马神经元形态的变化及鉴定

海马神经元于 12 h 后贴壁生长,第 4 天时,细胞伸出细丝状神经突起。生长至 10 d 时,细胞状态最好,呈圆形、三角形,胞体饱满,立体感强,突起丰富,交织成网状。生长至 20 d 时,细胞逐渐萎缩,坏死,脱落,至 30 d 时,基本无存活细胞。

免疫细胞化学鉴定显示,NSE 阳性细胞占绝大多数,阳性部位位于胞浆中,并沿神经突起分布。NSE 阳性细胞胞体呈近圆形,突起丰富、细长,相互交织成网状。GFAP 阳性细胞偶见,阳性部位位于胞浆中,沿细胞突起分布。GFAP 阳性细胞胞体粗大,呈不规则型,扁平,缺乏立体感,细胞突起粗大而短,不相互交织。表明培养的细胞绝大多数为神经元。

二、微波辐射后海马神经元生长活力的改变

辐射组辐射后 6 h,细胞活力显著下降($P < 0.01$),辐射后 1 d 时基本恢复至对照组水平(图 1)。

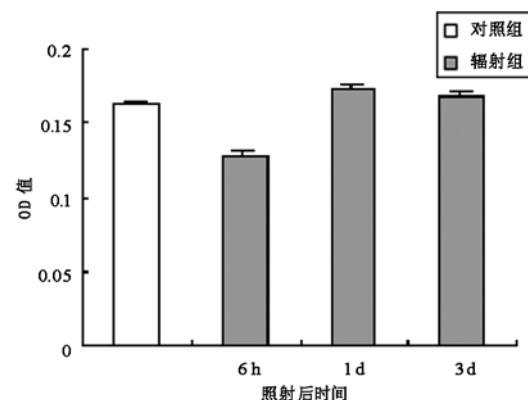


图 1 10 mW/cm² 微波辐射对海马神经元生长活力的影响

三、微波辐射后海马神经元凋亡和坏死率

辐射组辐射后 24 h,神经元凋亡和坏死率均明显增加,与对照组比,差异有统计学意义($P < 0.01$),具体情况见图 2。

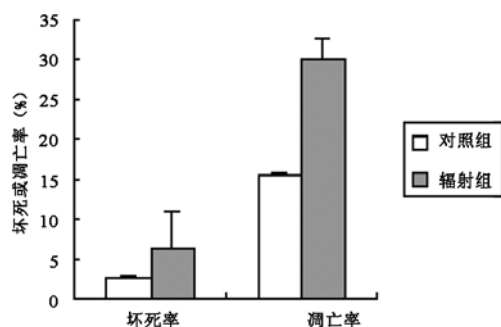


图 2 10 mW/cm² 微波辐射后 1 d 对海马神经元坏死和凋亡的影响

四、微波辐射后海马神经元内 [Ca²⁺] 的变化

辐射组辐射后即刻, 细胞内 [Ca²⁺] 显著升高 ($P < 0.01$), 结果见图 3。

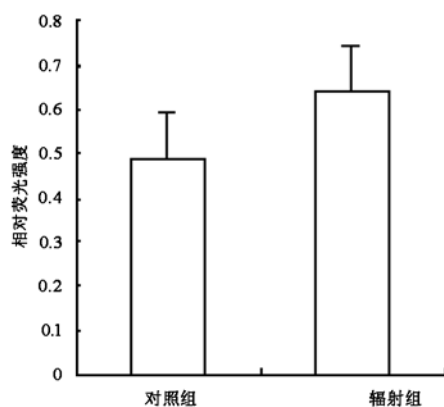


图 3 10 mW/cm² 微波辐射后即刻海马神经元内 [Ca²⁺] 的变化

五、微波辐射后海马神经元细胞膜结构的变化

对照组细胞膜表面光滑平整 (图 4a), 辐射后即刻, 细胞膜表面粗糙不平, 有多量凹陷和穿孔现象 (图 4b)。

讨 论

一、微波辐射后大鼠海马神经元损伤特点

为了研究微波对海马损伤效应及其机制, 我们建立了神经元体外培养模型。神经组织成分复杂, 尽管海马组织以神经元为主, 但还有少量的胶质细胞成份, 如星形胶质细胞, 故对培养 10 d 的细胞进行鉴定^[7], 证明所培养的细胞绝大多数为神经元。对生长良好的海马神经元, 本研究采用 MTT 法检测微波辐射后细胞生长活力的改变, 发现微波辐射后 6 h, MTT 值明显下降, 1 d 时恢复至对照组水平, 表明微波可以导致神经元的损伤。

为了进一步检测微波辐射后神经元的死亡方式, 本研究通过 PI 和 Annexin-V 双标记, 采用流式细胞术检测其凋亡与坏死情况, 发现 10 mW/cm² 微波辐射后 24 h, 凋亡和坏死率 ($P < 0.01$) 均明显增加, 且细胞死亡以凋亡为主, 提示凋亡是微波辐射引起大鼠海马神经元死亡的方式之一, 并且可能是其主要的死亡方式。

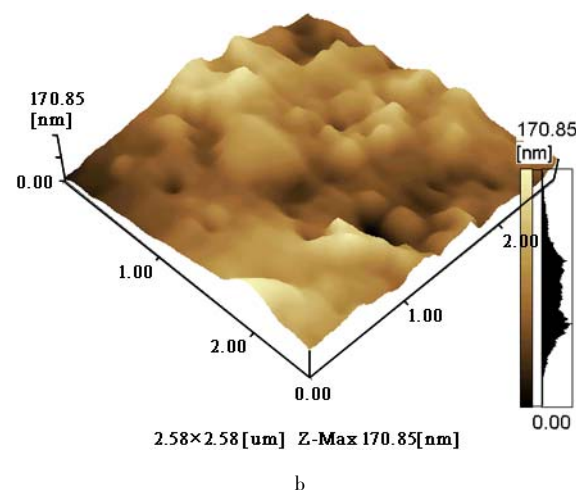
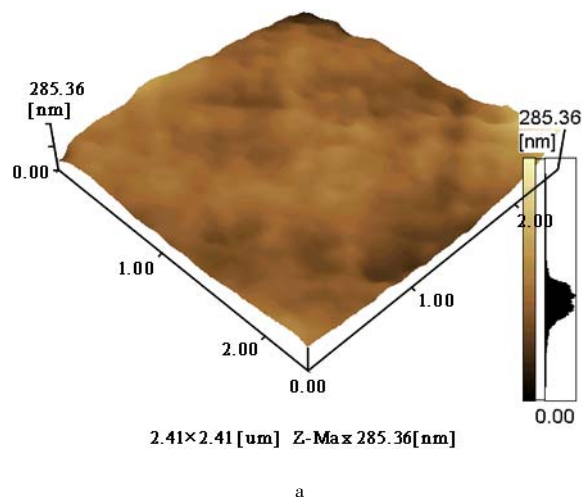


图 4 微波辐射后即刻 AFM 观察海马神经元细胞表面结构

二、细胞膜穿孔在微波辐射后海马神经元损伤中的作用

高强度的电磁辐射会对细胞膜和细胞核造成不可逆性电击穿, 膜结构破裂, 细胞死亡, 组织损伤^[8]。本实验室前期研究发现电磁脉冲辐射可导致下丘脑神经细胞膜出现电穿孔^[9], 但微波辐射对海马神经元的作用鲜见报道。本研究证实 10 mW/cm² 的微波辐射后即刻, 海马神经元出现电穿孔现象: 细胞膜表面粗糙不平, 有多量凹陷和穿孔出现。电穿孔导致细胞膜形态结构的改变, 可能会引起细胞膜上相关蛋白、离子通道及受体的改变, 进一步影响细胞内离子浓度、神经递质含量和细胞器结构等的改变。前期实验证实, 微波可对大鼠海马功能和形态结构造成损伤, 神经递质含量发生改变, 电穿孔可能是其机制之一。

三、细胞内 [Ca²⁺] 参与微波辐射所致海马神经元损伤

大量研究证明, 脑组织受到损伤, 可引起细胞内钙超载, 进而导致细胞发生凋亡、坏死等改变, 钙超载是脑组织损伤时重要的病理生理过程。电磁辐射可以调

整 Ca^{2+} 在钙通道的流动,改变细胞内钙离子的浓度,并且可以调整细胞膜上的电压门控钙通道,降低细胞膜对钙离子的通透性,从而减少神经递质的释放^[10]。但微波辐射对海马神经元胞浆内 $[\text{Ca}^{2+}]$ 的影响未见报道。本实验发现,微波辐射后即刻,细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$ 显著升高,这一改变可能和学习记忆功能障碍及海马组织结构的损伤密切相关。

综上,本研究结果表明,微波辐射后体外培养海马神经元生长活力下降,凋亡和坏死率增加,且凋亡为其主要死亡方式;海马神经元膜穿孔及胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$ 增加是其损伤重要机制。

参 考 文 献

- 1 赵梅兰,马强,曹晓哲,等. 电磁脉冲对大鼠学习记忆能力和长时程增强的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2001, 23: 69-71.
- 2 Wang B, Lai H. Acute exposure to pulsed 2450-MHz microwaves affects water-maze performance of rats. Bioelectromagnetics, 2000, 21: 52-56.
- 3 Dias N, Nicolau A, Carvallo GS, et al. Miniaturization and application of the MTT assay to evaluate metabolic activity of protozoa in the presence of toxicants. Basic Microbiol, 1999, 39: 103-108.
- 4 Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, et al. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. Blood, 1994, 84: 1415-1420.
- 5 Grondahl T, Langmoen IA. Confocal laser scanning microscopy used to monitor intracellular Ca^{2+} changes in hippocampal CA1 neurons during energy deprivation. Brain Res, 1998, 785: 58-65.
- 6 刘智良,徐如祥. 抑制 p38MARK 信号通路对海马神经元毒性损伤的保护作用. 中华神经医学杂志, 2003, 2: 194-198.
- 7 Jang YK, Park JJ, Lee MC, et al. Retinoic acid-mediated induction of neurons and glial cells from human umbilical cord-derived hematopoietic stem cells. J Neurosci Res, 2004, 75: 573-584.
- 8 张弘,王保义,刘长军,等. 鸡红细胞在弱的瞬态电磁脉冲作用下的电穿孔研究. 微波学报, 2000, 16: 92-95.
- 9 曹晓哲,王德文,赵梅兰,等. 电磁脉冲辐照所致下丘脑神经细胞膜穿孔的原子力显微镜研究. 军事医学科学院院刊, 2003, 27: 416-419.
- 10 Schwab BL, Guerini D, Didszun C, et al. Cleavage of plasma membrane calcium pumps by caspases: a link between apoptosis and necrosis. Cell Death Differ, 2002, 9: 818-831.

(修回日期:2006-07-12)

(本文编辑:阮仕衡)

· 基础研究 ·

电针刺激筋缩穴对癫痫大发作和癫痫持续状态动物模型脑电图的影响

庄明华 白晔 丁山 黄芷荷 郭美云 秦达念

【摘要】目的 观察电针刺激筋缩穴对癫痫大发作和癫痫持续状态动物模型脑电图的影响。**方法** 选用成年大耳白家兔 40 只,分为对照组、模型组与电针组。家兔开颅后用青霉素皮质内注射,制备急性癫痫大发作和癫痫持续状态动物模型。电针组采用电针刺激筋缩穴,观察其对癫痫大发作和癫痫持续状态动物模型脑电图的影响。**结果** 模型组脑皮质电图显示,癫痫发作波波幅和频率较高。电针刺激癫痫动物模型筋缩穴时,家兔脑皮质电图的癫痫发作波波幅下降、频率降低;电针刺激解除后约 30 min,脑电图显示癫痫波波幅有所恢复,发作频率有集中的趋势。**结论** 电针刺激筋缩穴可抑制癫痫大发作和癫痫持续状态,减轻癫痫发作频率或强度。

【关键词】 电针; 筋缩穴; 脑电图; 癫痫模型

癫痫(epilepsy)是神经内外科及儿科常见病,属难治性疾病;尤其是癫痫大发作和癫痫持续状态在临床紧急情况下的处理较为困难,重者可导致死亡。既往有文献报道^[1,2],电针刺激可在临床紧急状况下抑制和控制癫痫大发作。为了进一步证实电针治疗对癫痫大发作和癫痫持续状态的抑制和控制作用,我们采用青霉素皮质内注射制备急性癫痫动物模型,用电针刺

刺激筋缩穴,观察其对癫痫大发作和癫痫持续状态动物脑电图的影响,现报道如下。

材料与方法

一、实验动物

选用第一军医大学实验动物中心提供的成年雄性大耳白家兔 40 只,体重 2~3 kg,分为电针组 15 例,模型组 15 例和对照组 10 只。

二、主要仪器与设备

上海产 G6805-1 型电针仪由汕头大学医学院第二附属医院针灸科提供;脑定位仪由汕头大学医学院生理教研室提供;美国产 Voyageur 型数字脑电图仪,由汕头大学医学院第二附属医

基金项目:广东省教育厅立项资助课题(No. 9921);广东省卫生厅立项资助课题(No. A1999419)

作者单位:515041 汕头,汕头大学医学院第二附属医院神经外科(庄明华、丁山),针灸科(白晔),电生理室(黄芷荷、郭美云);汕头大学医学院生理教研室(秦达念)