

· 基础研究 ·

高功率微波辐射后大鼠海马组织中 N-甲基-D-天冬氨酸受体表达的变化及其意义

魏丽 彭瑞云 高亚兵 王水明 马俊杰 王德文 胡文华 苏镇涛 杨国山

【摘要】目的 观察高功率微波(HPM)辐射后大鼠海马 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体表达的变化及其意义。**方法** 采用 10 mW/cm² 和 100 mW/cm² HPM 辐射 110 只 Wistar 雄性大鼠,于辐射后 6 h、1 d、7 d、14 d 和 28 d 活杀取海马组织,采用免疫组化、原位杂交和图像分析等技术分析海马组织中 NMDA 受体——NR1、NR2A 和 NR2B 的蛋白及 mRNA 含量的变化。**结果** 10 mW/cm² 及 100 mW/cm² HPM 辐射后,可见大鼠海马神经元固缩等病理变化,100 mW/cm² 组的病变较 10 mW/cm² 组严重,且恢复迟。2 个辐射组的 NR1、NR2A 及 NR2B 的表达均增强;10 mW/cm² 组辐射后 6 h,NMDA 受体表达始见增加,1 d 达高峰,28 d 基本恢复;100 mW/cm² 组照后 6 h,NMDA 受体表达始见增加,7 d 达高峰,28 d 基本恢复,且与 10 mW/cm² 组相比,100 mW/cm² 组增高明显,恢复较迟。NR1mRNA 变化规律与其蛋白表达类似。**结论** 10 mW/cm² 及 100 mW/cm² HPM 辐射可造成大鼠海马神经元损伤,使 NMDA 受体表达上调,参与 HPM 致海马组织损伤的病理生理过程。

【关键词】 高功率微波辐射; 海马; N-甲基-D-天冬氨酸受体; 免疫组化; 原位杂交

The expression of n-methyl d-aspartate receptor in the hippocampi of rats after high power microwave radiation WEI Li, PENG Rui-yun, GAO Ya-bing, WANG Shui-ming, MA Jun-jie, WANG De-wen, HU Wen-hua, SU Zhen-tao, YANG Guo-shan. Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

【Abstract】 Objective To investigate the expression of n-methyl d-aspartate receptor(NMDAR) in the hippocampi of rats after high power microwave radiation(HPMR). **Methods** One hundred and ten healthy Wistar male rats were irradiated with HPMR at a mean power density of 10 mW/cm² or 100 mW/cm², then sacrificed at 6 h, 1 d, 7 d, 14 d and 28 d after irradiation. The expression of NMDA receptor protein and its mRNA were measured by using immunohistochemistry, in-situ hybridization and image analysis. **Results** Karyopyknosis and other pathological changes were observed, and these were more severe after 100 mW/cm² radiation than after 10 mW/cm² radiation. The expression levels of receptor proteins NR1, NR2A and NR2B were increased in both groups, beginning at 6 h, peaking at 1 to 7 days, and recovering by the 28th day. The expression of NR1 mRNA was similar to that of NR1 protein. **Conclusion** Injuries to hippocampal neurons and altered NMDAR expression result from HPMR at either 10 mW/cm² or 100 mW/cm². NMDAR may contribute to the pathology of radiation injuries to hippocampal tissues.

【Key words】 High power microwaves; Hippocampus; n-Methyl d-aspartate receptor; Immunohistochemistry; In-situ hybridization

随着经济的发展,微波辐射对人体健康的影响逐渐受到重视。已有学者研究发现,微波辐射后,受孕大鼠出现脑内充血、水肿、神经元变性、慢性炎细胞侵入、局部神经元坏死和神经胶质增生等^[1]。另有学者发现,微波辐射后大鼠的学习和记忆功能发生改变^[2,3]。海马组织是与学习记忆功能密切相关的脑区,N-甲基-D-天冬氨酸(N-Methyl-D-Aspartate,NMDA)受体通道通透钙离子,钙离子能激活胞内多种酶,进而触发各类复杂的生化和生理反应。关于高功率微波(high power microwave,HPM)辐射后 NMDA 受体参与海马组织损伤的报

道较为少见。为此,本研究拟用免疫组化、原位杂交和图像分析等技术对 HPM 辐射后大鼠海马神经元中 NMDA 受体——NR1、NR2A 和 NR2B 的基因表达进行研究,以探讨 HPM 辐射后海马损伤的发生机制。

材料与方法

一、实验动物与分组

二级雄性 Wistar 大鼠 110 只,体重(180±20)g,由军事医学科学院实验动物中心提供并统一饲养。根据辐射平均功率密度的不同,将大鼠分为假辐射组(10 只)、10 mW/cm² 辐射组(50 只)和 100 mW/cm² 辐射组(50 只),其中 10 mW/cm² 辐射组和 100 mW/cm² 辐射组再根据取材时间分为辐射后 6 h、1 d、7 d、14 d 和 28 d 5 个亚组,每亚组 10 只动物。

基金项目:全军“十五”杰出中青年科研基金(No. 04J016)

作者单位:100850 北京,军事医学科学院放射与辐射医学研究所病理室

通讯作者:彭瑞云

二、辐射方法

采用 HPM 模拟源进行全身均匀照射,大鼠置于特制的有机玻璃盒中固定,假辐射组、10 mW/cm² 辐射组和 100 mW/cm² 辐射组平均功率密度分别为 0, 10 和 100 mW/cm², 辐射时间均为 5 min。

三、动物处理及病理观察

大鼠经腹腔注射 1% 戊巴比妥钠 (30 mg/kg 体重) 麻醉后打开胸腔, 暴露心脏, 经左心室插管至升主动脉, 用微型蠕动泵先灌注肝素化生理盐水 100 ml, 然后继续灌注含 4% 多聚甲醛的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 值 7.4) 约 150 ml。断头并剥离脑组织后做如下处理: (1) 梯度蔗糖脱水后制备冰冻切片, 备做 NR1 和 NR2 免疫组化检测和原位杂交技术检测; (2) 用 10% 缓冲福尔马林固定 1 周后, 常规梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 浸蜡, 以石蜡包埋, 制作 5 mm 厚切片, 60℃ 温箱烤片 1 周后行 HE 染色^[4], 光镜下观察海马组织结构改变。

假辐射组动物于辐射后 1 d, 10 mW/cm² 辐射组和 100 mW/cm² 辐射组动物于辐射后 6 h、1 d、7 d、14 d 和 28 d 活杀取海马组织, 每组每次处死 10 只动物 (其中用于制备冰冻切片 5 只, 用于制备石蜡切片 5 只)。

四、免疫组织化学检测 NR1、NR2A 和 NR2B

主要试剂为: 羊抗 NMDA 受体 NR1 亚单位抗体购自 Santa Cruz 公司, 兔抗 NMDA 受体 NR2A 及 NR2B 亚单位抗体均购自武汉博士德生物工程有限公司, 过氧化物酶标记的链霉卵白素 (streptavidin-peroxidase, SP) 试剂盒和 3,3-二氨基联苯胺 (3,3-diaminobenzidine, DAB) 染色剂购自北京中山生物公司, 其它相关试剂均为国内产品。

参照梁晓俐^[5]推荐的方法并加以改进进行免疫组织化学染色, 主要步骤如下: 取上述冰冻切片, 用体积分数为 3% 的 H₂O₂ 浸泡 10 min; 微波修复抗原; 然后分别滴加羊抗 NMDA 受体 NR1 (1:200), 兔抗 NMDA 受体 NR2A (1:200) 及 NR2B (1:200), 4℃ 过夜; 分别滴加 Biotin-兔抗羊 IgG (1:100) 和 Biotin-羊抗兔 IgG (1:100), 37℃ 孵育 45 min; 滴加辣根酶标记链霉卵白素 (1:100), 37℃ 孵育 45 min, DAB 显色; 苏木素复染, 脱水, 透明, 封片。同时设置阴性对照 (不加一抗)。细胞膜和细胞浆有棕黄色颗粒为阳性, 胞核复染成浅蓝色。

五、原位杂交技术检测 NR1 mRNA

主要试剂为: NMDA 受体 NR1 原位杂交检测试剂盒 [包括胃蛋白酶、预杂交液、NMDA 受体 NR1 寡核苷酸探针杂交液、封闭液、生物素化鼠抗地高辛、链霉亲和素-生物素-碱性磷酸酶复合物 (streptavidin-biotin-alkaline phosphatase, SABC-AP)、5-溴-4-氯-3-吲哚-磷酸/硝基苯硫氨酸酯 (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium, BCIP/NBT)、核固红和水溶性封片

剂] 购自武汉博士德生物工程有限公司, 焦磷酸二乙脂 (diethylpyrocarbonate, DEPC) 为北京天象邦定生物医学联合体公司产品, 其它相关试剂均为国内产品。

参照 Le 等^[6]的方法并加以改进进行原位杂交技术检测, 主要步骤如下: 冰冻切片于常温下复温后, 放入 3% H₂O₂ 中室温孵育 20 min, 以灭活内源性酶; 于切片中滴加以 3% 柠檬酸稀释的胃蛋白酶, 加预杂交液于 37℃ 下作用 20 min; 加杂交液, 并加盖膜, 37℃ 过夜; 依次加封闭液、生物素化鼠抗地高辛、SABC-AP、BCIP/NBT, 显色, 水溶性封片剂封片。同时设置探针对照 (杂交液中不加探针, 其余各步同上) 和检测对照 (不加抗地高辛抗体, 其余各步同上)。阳性杂交信号为紫蓝色颗粒, 位于细胞浆内。

六、图像分析及定量方法

在光镜下 (×400), 应用 CMAS-II 图像分析仪对上述免疫组化和原位杂交结果进行 NR1、NR2A、NR2B 和 NR1mRNA 的积分光密度 (IOD) 和平均光密度 (MOD) 的测定。

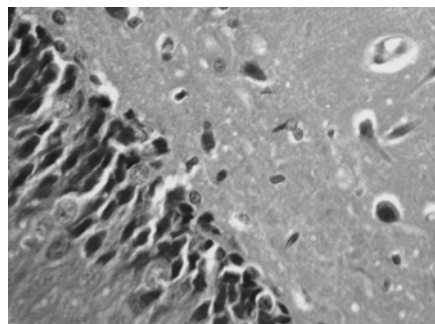
七、统计学分析

数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SAS 8.0 版软件进行统计分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、HPM 辐射后大鼠海马组织结构的变化

假辐射组大鼠海马为正常组织结构。10 mW/cm² 及 100 mW/cm² 辐射组均可见大鼠海马锥体细胞层和颗粒细胞层部分神经元固缩、变形, 略呈三角形, 胞核嗜碱性增强, 染色加深, 部分可见核裂解, 胞浆嗜酸性增强, 偶见胞质减少, 神经元细胞间隙增加; 部分胶质细胞固缩深染; 血管结构基本正常, 部分血管周间隙可见增宽 (图 1)。10 mW/cm² 辐射组于辐射后 1 d 病变最严重, 7 d 时始见恢复; 100 mW/cm² 辐射组于辐射后 7 d 病变最严重, 14 d 始见恢复, 且病变较 10 mW/cm² 辐射组重, 恢复较迟。

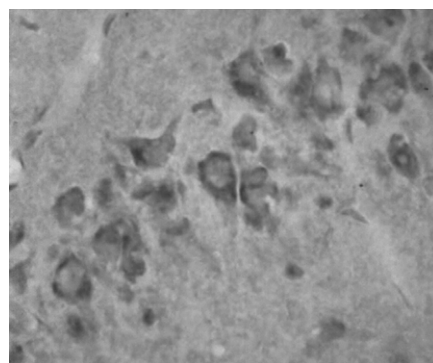


注: 大鼠海马锥体细胞层和颗粒细胞层部分神经元固缩、变形, 略呈三角形, 胞核嗜碱性增强, 染色加深, 部分血管周间隙增加

图 1 10 mW/cm² 辐射组 HPM 辐射后 1 d (HE 染色, ×400)

二、HPM 辐射后大鼠海马 NMDA 受体 NR1、NR2A 和 NR2B 的改变

假辐射组海马神经元胞浆中 NR1、NR2A 和 NR2B 均为淡棕黄色,呈弱阳性表达。10 mW/cm² 和 100 mW/cm² 辐射组经 HPM 辐射后,大鼠海马神经元胞浆中 NR1、NR2A 和 NR2B 表达在一定时间内均有不同程度的增加(图 2)。10 mW/cm² 辐射组辐射后 6 h, NR1 表达始见增加,1 d 达高峰($P < 0.01$),28 d 基本恢复至正常水平;100 mW/cm² 辐射组辐射后 6 h, NR1 始见增加,MOD 于 1 d 达高峰($P < 0.01$),IOD 于 7 d($P < 0.01$)达高峰,28 d 基本恢复至正常水平。定量分析结果见表 1。10 mW/cm² 辐射组辐射后 6 h, NR2A 表达始见增加,1 d 达高峰($P < 0.01$),28 d 基本恢复至正常水平;100 mW/cm² 辐射组辐射后 6 h, NR1 始见增加,于 7 d 达高峰($P < 0.01$),28 d 基本恢复至正常水平。定量分析结果见表 2。10 mW/cm² 辐射组辐射后 6 h, NR2B 表达始见增加,MOD 于 7 d 达高峰($P < 0.01$),IOD 于 1 d 达高峰($P < 0.01$),28 d 基本恢复至正常水平;100 mW/cm² 辐射组辐射后 6 h, NR2B 始见增加,MOD 于 14 d 达高峰($P < 0.01$),IOD 于 7 d 达高峰($P < 0.01$),28 d 基本恢复至正常水平。定量分析结果见表 3。



注:大鼠海马组织神经元胞浆中 NR1 呈棕黄色颗粒,阳性表达,胞核苏木素复染呈淡蓝色

图 2 10 mW/cm² 辐射组 HPM 辐射后 1 d(SP 免疫组化染色, ×400)

三、HPM 辐射后大鼠海马 NR1 mRNA 的改变

假辐射组大鼠海马组织见神经元胞浆中 NR1 mRNA 呈弱阳性表达。10 mW/cm² 辐射组经 HPM 辐射后 6 h,始见海马神经元 NR1 mRNA 含量增加,1 d 达高峰($P < 0.01$),28 d 基本恢复至正常水平;100 mW/cm² 辐射组经 HPM 辐射后 6 h,始见海马神经元 NR1 mRNA 含量增加,MOD 于 7 d 达高峰($P < 0.01$),IOD 于 7 d 达高峰($P < 0.01$),28 d 基本恢复至正常水平。其定量分析结果见表 4。

表 1 HPM 辐射后不同时间点大鼠海马组织中 NR1 的改变($\bar{x} \pm s$)

组 别	MOD($\times 10^{-2}$)					IOD				
	6 h	1 d	7 d	14 d	28 d	6 h	1 d	7 d	14 d	28 d
假辐射组	—	4.80 ± 0.84	—	—	—	—	4.34 ± 0.20	—	—	—
10 mW/cm ² 辐射组	6.20 ± 0.84*	7.00 ± 0.71 [#]	6.60 ± 0.11*	5.60 ± 0.11	5.20 ± 0.84	5.27 ± 0.54*	6.04 ± 0.70 [#]	5.32 ± 0.49*	5.17 ± 0.38*	4.66 ± 0.27
100 mW/cm ² 辐射组	6.40 ± 0.11*	7.20 ± 0.84 [#]	6.80 ± 0.13 [#]	6.40 ± 0.89*	5.00 ± 0.12	5.39 ± 0.26 [#]	5.65 ± 0.48 [#]	5.97 ± 0.46 [#]	4.95 ± 0.30*	4.71 ± 0.25

注:与假辐射组相比,* $P < 0.05$,[#] $P < 0.01$

表 2 HPM 辐射后不同时间点大鼠海马组织中 NR2A 的改变($\bar{x} \pm s$)

组 别	MOD($\times 10^{-2}$)					IOD				
	6 h	1 d	7 d	14 d	28 d	6 h	1 d	7 d	14 d	28 d
假辐射组	—	4.60 ± 0.89	—	—	—	—	3.31 ± 0.23	—	—	—
10 mW/cm ² 辐射组	5.20 ± 0.84	6.80 ± 0.45 [#]	6.60 ± 0.55*	5.80 ± 0.84	4.80 ± 0.84	3.54 ± 0.22	5.48 ± 0.45 [#]	4.15 ± 0.52*	3.70 ± 0.38*	3.58 ± 0.32
100 mW/cm ² 辐射组	5.40 ± 0.55	6.60 ± 0.11*	7.40 ± 0.89 [#]	6.60 ± 0.89*	5.60 ± 0.89	3.61 ± 0.14	5.42 ± 0.32 [#]	6.43 ± 0.25 [#]	5.42 ± 0.38 [#]	3.41 ± 0.34

注:与假辐射组相比,* $P < 0.05$,[#] $P < 0.01$

表 3 HPM 辐射后不同时间点大鼠海马组织中 NR2B 的改变($\bar{x} \pm s$)

组 别	MOD($\times 10^{-2}$)					IOD				
	6 h	1 d	7 d	14 d	28 d	6 h	1 d	7 d	14 d	28 d
假辐射组	—	5.00 ± 0.71	—	—	—	—	4.18 ± 0.16	—	—	—
10 mW/cm ² 辐射组	5.20 ± 0.13	7.20 ± 0.13 [#]	7.80 ± 0.84 [#]	6.60 ± 0.55 [#]	5.60 ± 0.89	5.09 ± 0.10 [#]	6.10 ± 0.18 [#]	5.07 ± 0.48*	4.582 ± 0.55	4.29 ± 0.52
100 mW/cm ² 辐射组	5.60 ± 0.11	5.40 ± 0.89	7.20 ± 0.13*	8.80 ± 0.84 [#]	6.40 ± 0.11 [#]	5.02 ± 0.69	6.10 ± 0.41 [#]	6.43 ± 0.32 [#]	5.67 ± 0.22 [#]	4.55 ± 0.38

注:与假辐射组相比,* $P < 0.05$,[#] $P < 0.01$

表 4 HPM 辐射后不同时间点大鼠海马组织中 NR1 mRNA 的改变($\bar{x} \pm s$)

组 别	MOD($\times 10^{-2}$)					IOD				
	6 h	1 d	7 d	14 d	28 d	6 h	1 d	7 d	14 d	28 d
假辐射组	—	6.80 ± 0.84	—	—	—	—	5.34 ± 0.48	—	—	—
10 mW/cm ² 辐射组	7.20 ± 0.84	8.00 ± 0.71 [#]	7.80 ± 0.84*	7.60 ± 0.55*	6.20 ± 0.45	6.01 ± 0.54*	6.68 ± 0.46*	6.16 ± 0.45	5.84 ± 0.49	5.65 ± 0.52
100 mW/cm ² 辐射组	7.00 ± 0.71	8.00 ± 0.71*	8.40 ± 0.55 [#]	7.40 ± 0.89	6.40 ± 0.55	5.91 ± 0.47*	7.61 ± 0.37 [#]	7.74 ± 0.46 [#]	6.54 ± 0.35*	5.77 ± 0.49

注:与假辐射组相比,* $P < 0.05$,[#] $P < 0.01$

讨 论

NMDA 受体广泛分布于中枢神经系统中,海马及皮质最多,纹状体次之。NMDA 受体是中枢神经系统最重要的兴奋性氨基酸受体之一,为配体和电压双重依赖的离子通道,对钙离子具有高通透性。NMDA 受体包含 NR1、NR2 和 NR3,其中 NR1 是组成 NMDA 受体的必需单位,有 8 种亚型,具有甘氨酸识别位点;NR2 是调节单位,有 4 个亚单位(2A-2D),其有谷氨酸识别位点;NR3 有 2 个亚单位(3A-3B),其功能目前尚不明确^[7]。关于电磁辐射后 NMDA 受体改变的报道较少,且结论不一。隋建峰等^[8]用脉冲微波对孕期大鼠进行辐射,发现 NMDA 受体通道活性降低,表现为通道电导、开放时间程和开放概率下降。李玉红等^[9]采用电磁脉冲辐射大鼠后,发现 NMDA 受体亲和力升高,受体密度下降。

迄今为止,关于 HPM 辐射后海马神经元 NMDA 受体表达的量-效关系和动态变化规律少见报道,尤其是采用定量方法进行的相关研究尚未见报道。为此,本研究采用病理学、免疫组化、原位杂交及图像分析等技术,观察到海马组织在 HPM 辐射后出现神经元固缩、变形,血管周间隙增宽等损伤性病理变化,并且发现 NMDA 受体 NR1、NR2A 及 NR2B 亚单位在辐射后均呈现不同程度的增高后恢复的变化规律,NR1 mRNA 水平也有类似的变化趋势。这表明 HPM 辐射可导致海马神经元 NMDA 受体 NR1、NR2A 和 NR2B 表达增加,这可能参与了海马神经元损伤的病理生理过程。

有研究表明,NMDA 受体与长时程增强(long-term potentiation, LTP)及学习记忆过程关系密切^[10,11]。包含 NR1 和 NR2 或 NR3 的 NMDA 受体在突触传递和可塑性以及学习和记忆中起着重要的作用^[12]。海马是与动物学习和记忆功能密切相关的脑区,在海马组织神经元中,主要以 NR2A 和 NR2B 的亚单位为主。位于兴奋性突触内的大量 NMDA 受体,对突触参与学习和记忆功能时产生的突触效能及对神经发展过程中突触的形成起着重要的调节功能^[13]。本课题组的前期研究认为,HPM 可导致受辐射大鼠的学习和记忆功能发生改变,使氨基酸类神经递质产生变化^[14]。这表明 NMDA 受体参与了 HPM 辐射致学习和记忆损伤的病理生理机制,其原因可能主要是通过调节氨基酸类神经递质的变化,影响突触后 NMDA 受体的表达,从而导致海马神经元突触可塑性的改变及学习记忆功能损

伤。当然,此过程中可能还有更多其它的调节蛋白和因子参与,其机制尚需进一步的研究和探讨。

综上所述,HPM 辐射可造成大鼠海马组织损伤,进而导致其学习和记忆障碍。同时,HPM 辐射后,NMDA 受体 NR1、NR2A 和 NR2B 亚单位蛋白及基因发生不同程度的变化,表明其参与了海马神经细胞损伤的发生和发展过程。

参 考 文 献

- 1 Inaloz SS, Dasdag S, Ceviz A, et al. Acceptable radiation leakage of microwave ovens on pregnant and newborn rat brains. Clin Exp Obstet Gynecol, 1997, 24: 215-219.
- 2 Yamaguchi H, Tsuruta G, Ueno S, et al. 1439 MHz pulsed TDMA fields affect performance of rats in a t-maze task only when body temperature is elevated. Bioelectromagnetics, 2003, 24: 223-230.
- 3 Wang B, Lai H. Acute exposure to pulsed 2450-MHz microwaves affects water-maze performance of rats. Bioelectromagnetics, 2000, 21: 52-56.
- 4 陈浩宇, 高亚兵, 彭瑞云. 一种改进的大鼠脑组织灌注固定方法. 军事医学科学院院刊, 2002, 26: 208-210.
- 5 梁晓俐, 主编. 病理学基础与实验技术. 北京: 军事医学科学出版社, 2004. 192-213.
- 6 Le GP, Dumas S, Volle GE, et al. An efficient method to detect calcitonin mRNA in normal and neoplastic rat c-cells (medullary thyroid carcinoma) by in situ hybridization using a digoxigenin labeled synthetic oligodeoxyribonucleotide probe. J Histochem Cytochem, 1993, 41: 389-395.
- 7 Loftis JM, Janowsky A. The N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2B: localization, functional properties, regulation, and clinical implications. Pharmacol Ther, 2003, 97: 55-85.
- 8 隋建峰, 吴宗耀, 熊鹰, 等. 脉冲微波孕期辐射致仔鼠海马神经元 N-甲基-D-天冬氨酸受体通道的变化. 中华理疗杂志, 2000, 23: 150-152.
- 9 李玉红, 李锦, 苏瑞斌, 等. 电磁脉冲对大鼠海马 N-甲基-D-天门冬氨酸受体活性的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2004, 26: 388-391.
- 10 Castellano C, Cestari V, Ciamei A. NMDA receptors and learning and memory processes. Curr Drug Targets, 2001, 2: 273-283.
- 11 Gnegy ME. Ca^{2+} /calmodulin signaling in NMDA-induced synaptic plasticity. Crit Rev Neurobiol, 2000, 14: 91-129.
- 12 Fukaya M, Kato A, Lovett C, et al. Retention of NMDA receptor NR2 subunits in the lumen of endoplasmic reticulum in targeted NR1 knock-out mice. Proc Natl Acad Sci, 2003, 100: 4855-4860.
- 13 Scott DB, Michailidis I, Mu Y, et al. Endocytosis and degradative sorting of NMDA receptors by conserved membrane-proximal signals. J Neurosci, 2004, 24: 7096-7109.
- 14 王丽峰, 胡向军, 彭瑞云, 等. 高功率微波辐射后小鼠行为学变化研究. 中国行为医学科学, 2005, 14: 32-34.

(修回日期: 2006-11-12)

(本文编辑: 吴倩)

欢迎订阅《中华物理医学与康复杂志》