

氚照射对大鼠海马神经细胞黏附分子 L1、NCAM 表达的影响

王永生¹, 姚晓波², 蔡二朋³, 邱俊⁴, 吴翠萍⁵, 王明明¹

摘要 目的 探讨低剂量氚照射对大鼠海马神经细胞黏附分子 L1、神经细胞黏附分子(NCAM)表达的影响。方法 取 24 h 新生鼠脑海马细胞培养,培养第 7 天以 3.7×10^2 、 3.7×10^3 、 3.7×10^4 、 3.7×10^5 、 3.7×10^6 Bq/ml 终浓度氚水照射细胞 24 h,并设对照组(0 Bq/ml),活细胞工作站测定各

处理组细胞的迁移距离;Western blot 法、免疫细胞化学法检测各浓度氚水照射下神经细胞黏附分子 L1 及 NCAM 蛋白的表达情况。结果 神经细胞迁移距离测定结果显示,与对照组相比,受照组细胞迁移距离明显缩短,且随着氚水浓度的不断增加而逐渐缩短($P < 0.05$);Western blot 法、免疫细胞化学法检测显示受照组神经细胞黏附分子 L1、NCAM 蛋白表达含量均低于对照组,并随氚水浓度的升高表达量呈递减趋势($P < 0.05$)。结论 氚照射可致神经细胞黏附分子表达量减少进而可影响神经细胞的正常迁移。

关键词 大鼠;氚水;神经细胞黏附分子;神经细胞

中图分类号 R 811.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)08-1102-05

2015-03-11 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81273003);安徽省自然科学基金(编号:1208085MH162);安徽省教育厅自然科学基金(编号:KJ2011Z162)

作者单位:¹安徽医科大学临床医学院放射医学研究所,合肥 230032

²安徽省立医院核医学科,合肥 230032

³芜湖市第二人民医院影像科,芜湖 241000

⁴安徽省第二人民医院 MRI 室,合肥 230001

⁵肥东县人民医院呼吸科,合肥 230001

作者简介:王永生,男,硕士研究生;

王明明,男,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:wm-gene@163.com

脑中枢神经系统发育时期是哺乳动物胚胎发育的关键阶段,有研究^[1-2]表明这个时期的孕鼠暴露于低浓度氚水辐射下其后代会出现特征性的大脑皮质畸形以及成年后行为表现异常。日本原爆幸存者辐射流行病学调查^[3]表明,胎龄 8~15 周受照幸存者

Cerebral protective effect of isoflurane preconditioning for adult rat model with local cerebral ischemia

Qiu Yan¹, Dong Bin², Cai Xiaolan¹

(¹Dept of Anesthesiology, ²Dept of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital to Dalian Medical University, Dalian 116011)

Abstract Objective To investigate the brain protective effects of isoflurane preconditioning for local cerebral ischemia adult rat model by detecting HIF-1 α , HO-1 and Bcl-2 expression level. **Methods** 84 two-month old Sprague-Dawley male rats were randomly divided into sham group, ischemia-reperfusion group (MCAO group) and isoflurane preconditioning group (ISO group). ISO group was exposed to isoflurane for 30 min and then underwent a 90 min middle cerebral arterial occlusion (MCAO), while MCAO group underwent MCAO only. At 24 h after reperfusion all the groups were investigated by modified neurological severity score for neurological deficits, TTC staining for infarct percentage. Cerebral cortices were harvested for HIF-1 α , HO-1 and Bcl-2 protein expression level detection at 6 h, 24 h and 72 h after reperfusion using RT-PCR and western blot. **Results** The mNSS score and infarct percentage in ISO group decreased significantly compared with those of MCAO group at 24 h after reperfusion ($P < 0.05$). Compared with the MCAO group, ISO group had significantly up-regulated protein levels of HIF-1 α , HO-1 and Bcl-2 at 6 h and 24 h after reperfusion ($P < 0.05$). There was no difference between ISO group and MCAO group for 3 gene expression at 72 h ($P > 0.05$). **Conclusion** Isoflurane preconditioning plays short-term cerebral protective effect through the up regulation of HIF-1 α , HO-1 and Bcl-2 gene expression.

Key words isoflurane; preconditioning; cerebral protection; Bcl-2; HIF-1 α ; HO-1

神经元前体细胞增殖及增殖后的细胞从脑室迁移至大脑皮层的进程受到抑制,出现严重智力障碍。神经细胞的迁移过程涉及多种迁移相关因子参与,在这些迁移相关因子中神经细胞黏附分子 L1、神经细胞黏附分子(neural cell adhesion molecule, NCAM)作为细胞迁移受体分子在神经细胞轴突生长、神经纤维成束、突触可塑性等方面发挥重要作用^[4],而低浓度氚水 β 辐射对神经细胞黏附分子表达的影响鲜有报道。为此,该研究从神经细胞黏附分子 L1、NCAM 受低浓度氚水辐射后的表达情况来探讨氚对脑发育期间神经细胞迁移的影响及机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 72 只 SPF 级 Sprague-Dawley (SD) 大鼠,3 月龄,购自常州卡文斯实验动物有限公司,大鼠均饲养于本实验室动物房。

1.1.2 试剂及仪器 氚水(中国原子能科学研究院);DMEM/F12(1:1)和 B27(美国 Gibco 公司);EGF、bFGF、胰蛋白酶、多聚赖氨酸(Poly-L-lysine)、阿糖胞苷(Ara-c)、苏木精(美国 Sigma 公司);新生小牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司);L1 及 NCAM 抗体(英国 Abcam 公司);二抗羊抗兔 IgG(北京博奥生物有限责任公司); β -actin 抗体、HRP 标记的羊抗小鼠 IgG 抗体、免疫组化试剂盒、DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司);水合氯醛(上海生物工程有限公司);SW-CJ-4F 型超净工作台(苏州净化设备有限公司);BX-52 型光学显微镜成像系统(日本佳能公司);XS-212-201 型光学显微镜(南京光电集团股份有限公司);2123 型 CO₂ 孵箱(美国 Shellab 公司);Leica AF 6000 活细胞工作站。

1.2 方法

1.2.1 海马神经细胞的原代培养 取 24 h 内的新生 SD 大鼠,性别不限,置于无菌操作室内,剥离出海马组织,并用预冷 PBS 液冲洗后备用。将所获得的新生大鼠海马组织放入无菌玻璃皿中,用眼科剪将其适量剪碎后加入 0.125% 胰蛋白酶消化 20 min,加入同等体积胎牛血清终止消化。将消化后的液体装入一无菌小玻璃瓶放入低速离心机(1 000 r/min),离心 5 min 后在无菌操作台上弃去上清液,重新悬浮细胞,用血细胞计数板计数后分别接种在不含盖玻片和含盖玻片的 6 孔板中(6 孔板已提前使

用 0.25% 的多聚赖氨酸包被,灭菌双蒸水清洗 3 遍)种植密度 5×10^6 /皿,加入培养基 4 ml,置于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中。培养 24 h 后将培养液半换液,培养第 3 天时,加入阿糖胞苷(终浓度为 3 μ g/ml),24 h 后去除。此后每 2~3 d 全换液 1 次。

1.2.2 细胞照射和培养 将培养的神经细胞经 NF160 免疫组化染色证实纯度达 90% 以上。培养 7 d 后加入氚水使各培养孔氚水终浓度分别为 3.7×10^2 、 3.7×10^3 、 3.7×10^4 、 3.7×10^5 、 3.7×10^6 Bq/ml 照射 24 h 后进行实验,同时设细胞对照组。

1.3 活细胞工作站测定细胞迁移距离 用 Leica AF 6000 活细胞工作站分别观察各处理组神经细胞的迁移情况,各处理组观察 3 个细胞,每个细胞观察时间为 8 h,结果用 LAS-AF-LITE 2.3.0 软件进行分析。

1.4 Western blot 法检测 L1、NCAM 蛋白的表达

1.4.1 总蛋白提取及蛋白质定量 收集各实验组神经细胞,用预冷的 PBS 漂洗 2~3 次,按总蛋白提取试剂盒说明书步骤提取神经细胞内蛋白质。将总蛋白提取液取 5 μ l 样品加入 995 μ l 超纯水,于分光光度计下测量样本的各组蛋白质浓度。根据测出的样品蛋白浓度将其进行稀释,使各组样本的蛋白质终浓度一致。加入等体积蛋白上样缓冲液混合煮沸 8 min,适量分装, -80 °C 保存备用。

1.4.2 Western blot 步骤 配置 10% 分离胶和 5% 浓缩胶,取 20 μ l 总蛋白上样,经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳后,转移到 PVDF 膜上,5% 脱脂奶封闭 1~2 h, TBST 洗 3 次;加入一抗 L1(1:1 000)、NCAM(1:1 000);4 °C 封闭过夜, TBST 洗 3 次;加二抗羊抗兔 IgG(1:5 000)室温孵育 1 h, TBST 洗 3 次;ECL 工作液发光显影,定影晾干。

1.4.3 图像分析 分别对各组 Western blot 结果进行图像扫描,从各组随机抽取 3 张扫描图像,以 Quantity-One 生物学图像分析系统进行目的条带半定量分析,各条带累积光密度(integral optical density, IOD)值/ β -actin 的 IOD 值,得到一相对强度(relative intensity, RI),通过各处理组 RI 值的比较可得出蛋白表达的变化规律。

1.5 免疫细胞化学染色法检测 L1、NCAM 蛋白的表达 4% 多聚甲醛固定细胞,室温 15 min, 0.5% TritonX-100 孵育 20 min, 3% 双氧水封闭内源性过氧

化物酶,室温 15 min,正常山羊血清处理,工作液室温孵育 10~15 min,弃去上清液,一抗于 37 °C 孵育 2~3 h,生物素化二抗 37 °C 孵育 10~15 min,辣根过氧化物酶标记的链亲和素 37 °C 孵育 10~15 min, DAB 显色,苏木精复染细胞核,脱水,封片。常规设立阴性对照。各组每张盖玻片分别任意选取 3 个不同视野的细胞,于 400 倍镜下拍照,用 Image Pro Plus 软件进行阳性染色的平均光密度值分析。免疫组织化学染色以细胞质和(或)细胞膜出现黄棕色颗粒为阳性。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行单因素方差分析(ANOVA),两两比较采用 Dunnett-*t* 检验。

2 结果

2.1 神经细胞迁移距离 迁移距离测定结果显示,与对照组相比,各受照组神经细胞迁移距离普遍缩短($F = 47.553, P < 0.01$),并且随着氡水浓度的逐渐升高呈现递减的趋势。见图 1、表 1。

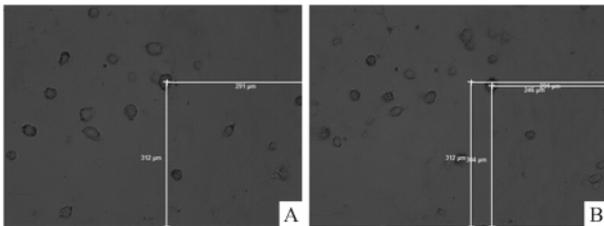


图 1 神经细胞迁移过程

A: 神经细胞原始位置; B: 同一神经细胞迁移 3 h 后的位置

表 1 不同浓度氡水照射下神经细胞的迁移距离($n = 3, \bar{x} \pm s$)

氡水浓度(Bq/ml)	迁移距离(μm)
对照组	108.734 ± 13.242
3.7×10^2	78.383 ± 7.707 **
3.7×10^3	64.053 ± 4.715 **
3.7×10^4	52.533 ± 2.315 **
3.7×10^5	37.703 ± 6.203 **
3.7×10^6	21.302 ± 4.978 **

与对照组比较: ** $P < 0.01$

2.2 Western blot 检测结果 与对照组相比,受照组细胞随着氡水浓度的增加,神经细胞表达的 L1、NCAM 蛋白含量逐渐降低,L1 蛋白各组 RI 值比较,差异有统计学意义($F = 74.520, P < 0.01$); NCAM 蛋白各组 RI 值比较,差异有统计学意义($F = 12.466, P < 0.01$)。见图 2。

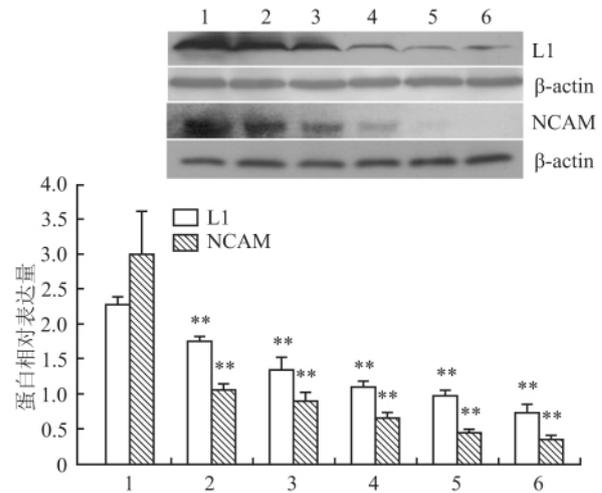


图 2 Western blot 法检测 L1、NCAM 蛋白的表达情况

1: 对照组; 2: 3.7×10^2 Bq/ml; 3: 3.7×10^3 Bq/ml; 4: 3.7×10^4 Bq/ml; 5: 3.7×10^5 Bq/ml; 6: 3.7×10^6 Bq/ml; 与对照组比较: ** $P < 0.01$

2.3 免疫细胞化学染色法检测结果 与对照组相比,受照组神经细胞平均光密度值普遍低于对照组,并随着氡水浓度的不断增加而逐渐降低,神经细胞 L1、NCAM 蛋白平均光密度值比较,差异有统计学意义($F = 53.968, P < 0.01$; $F = 19.736, P < 0.01$)。见图 3。

3 讨论

在中枢神经系统发育过程中,神经细胞迁移过程是复杂并被精细调控的,神经细胞在接受胞外信号后,将信号传递至胞内,最终到达胞内细胞骨架,通过微管、微丝及神经细胞黏附分子等共同作用完成整个迁移过程,到达大脑特定部位,构成复杂的神经网络体系,进而发挥正常的脑功能。在神经细胞迁移过程中,任何环节出现异常都会影响到神经细胞最终的正确定位。细胞迁移距离结果显示,神经细胞受氡水照射后,其迁移距离较对照组明显缩短,并且随着氡水浓度的不断增大迁移距离逐渐缩短。

神经细胞黏附分子 L1、NCAM 属于免疫球蛋白超家族,是一种结构复杂的跨膜糖蛋白,通过亲同性和异同性结合介导细胞与细胞之间及细胞与细胞外基质之间的相互作用,能够多个分子共同作用于细胞外区域,在细胞质内也可以与细胞骨架蛋白 actin 可逆的结合^[5]。目前的研究^[6-8]表明,L1 及 NCAM 充当整合素、生长因子的共同受体的同时也作为一种受体排斥的轴突导向分子。在促进神经细

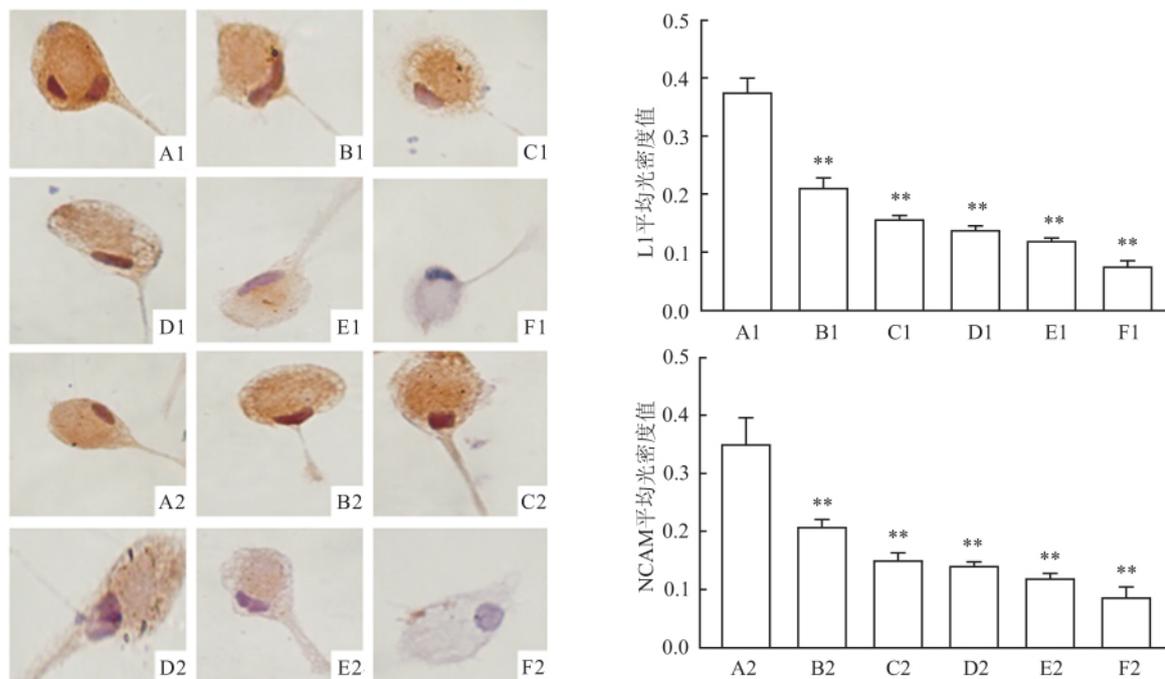


图3 免疫细胞化学法检测 L1、NCAM 蛋白的表达情况 ×400

A: 对照组; B: 3.7×10^2 Bq/ml; C: 3.7×10^3 Bq/ml; D: 3.7×10^4 Bq/ml; E: 3.7×10^5 Bq/ml; F: 3.7×10^6 Bq/ml; 1: L1; 2: NCAM; 与对照组比较: ** $P < 0.01$

胞突触生长 神经细胞目标识别及神经细胞的正确迁移等过程中起着重要作用。

L1 主要影响大脑皮层颗粒细胞的迁移过程^[9], 在神经细胞发育和突触形成中都起着非常重要的作用, 可通过同源性机制或与其他蛋白分子, 如整合素、纤粘连蛋白受体和蛋白聚糖等异性结合共同介导神经细胞的黏附。L1 还可通过锚蛋白与细胞骨架相连, 参与细胞迁移运动过程及可在膜内通过它的寡聚甘露糖与 NCAM 结合, 通过调节细胞黏附的作用来影响神经细胞正常的迁移过程。NCAM 主要通过介导同源相邻细胞黏附来影响神经细胞的正常迁移过程, 其主要通过三种机制^[10]: ① 两个 NCAM 分子各自的 Ig III 结构域的相互作用; ② 两个 NCAM 分子的免疫球蛋白结构域反平行结合; ③ 两个 NCAM 分子上的 IgI 和 Ig II 结构域的交互结合。这种同源性结合可介导细胞内的信号转导途径, 过程可能与成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor, FGF) 受体有关。NCAM 可以和 FGF 受体上与 NCAM 同源的结构域相结合来调节 FGF 活性, 进一步激活磷脂酶 $C\gamma$ 产生甘油二酯, 通过电压依赖性钙通道诱导 Ca^{2+} 内流, 促进神经细胞轴突生长, 最终影响神经细胞的迁移过程。相关研究^[11]表明电离辐射可导致 L1、NCAM 的表达含量降低进

而影响大脑神经细胞的迁移过程, 导致迁移障碍。先前的研究^[12]也显示孕鼠脑受氚 β 射线辐射后, 其神经细胞的 L1、NCAM 的含量普遍降低, 妨碍了神经细胞的正常迁移, 导致脑机能发生障碍。本研究表明, 神经细胞受氚水照射后, L1、NCAM 表达量较对照组明显减低, 并且呈现出随氚水浓度不断增大而逐渐降低的趋势, 这与细胞迁移距离的结果及先前的研究结果是相一致的, 提示氚水可通过影响神经细胞黏附分子 L1、NCAM 的表达来影响发育期间脑神经细胞的正常迁移过程。

综上所述, 氚水照射可下调仔鼠脑内神经细胞黏附分子 L1、NCAM 的表达, 影响神经细胞黏附及神经细胞轴突生长等方面来妨碍神经细胞的正常迁移, 通过研究氚水照射对发育中脑的影响可以深入了解氚辐射如何影响神经细胞迁移使神经细胞定位异常而最终导致脑机能障碍的机制, 为日后预防氚的危害、治疗氚辐射损伤及制定安全卫生法规和标准、管理决策提供重要实验依据。

参考文献

- [1] Fushiki S, Matsushita K, Yoshioka H, et al. In utero exposure to low-doses of ionizing radiation decelerates neuronal migration in the

- developing rat brain [J]. *Int J Radiat Biol*, 1996, 70(1): 53 – 60.
- [2] Streffer C, Shore R, Konermann G, et al. Biological effects after prenatal irradiation (embryo and fetus). A report of the International Commission on Radiological Protection [J]. *Ann ICRP*, 2003, 33(1–2): 5–206.
- [3] J Valentin. Human evidence on the effects of in-utero radiation exposure on neurological and mental processes [M] // ICRP Publication 30: Limits for Intakes of Radionuclides by Workers. Oxford: Pergamon Press Ltd, 1981, 40(4): 477–84.
- [4] Schmid R S, Maness P F. L1 and NCAM adhesion molecules as signaling coreceptors in neuronal migration and process outgrowth [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2008, 18(3): 245–50.
- [5] Maness P F, Schachner M. Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration [J]. *Nat Neurosci*, 2007, 10(1): 19–26.
- [6] Kleene F, Mzoughi M, Joshi G, et al. NCAM-induced neurite outgrowth depends on binding of calmodulin to ncam and on nuclear import of ncam and fak fragments [J]. *J Neurosci*, 2010, 30(32): 10784–98.
- [7] Hansen R K, Christensen C, Korshunova I, et al. Identification of NCAM binding peptides promoting neurite outgrowth via a heterotrimeric G-protein-coupled pathway [J]. *J Neurochem*, 2007, 103(4): 1396–407.
- [8] Polo-Parada L, Bose C M, Plattner F. Distinct roles of different neural cell adhesion molecule (NCAM) isoforms in synaptic maturation revealed by analysis of NCAM 180 kDa isoform-deficient mice [J]. *J Neurosci*, 2004, 24(8): 1852–64.
- [9] Cohen N R, Taylor J S, Scott L B, et al. Errors in corticospinal axon guidance in mice lacking the neural cell adhesion molecule L1 [J]. *Curr Biol*, 1998, 8(1): 26–33.
- [10] Ditlevsen D K, Kolkova K. Signaling pathways involved in NCAM-induced neurite outgrowth [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2010, 663: 151–68.
- [11] Sun X Z, Zhang R, Cui C, et al. Expression of neural cell adhesion molecule L1 in the brain of rats exposed to X-irradiation in utero [J]. *J Med Invest*, 2003, 50(3–4): 187–91.
- [12] 姚晓波, 王永生, 邱俊, 等. 氟宫内照射对大鼠神经细胞分布及脑机能的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2014, 49(10): 1371–5.

Effects of irradiation from tritiated water on the expression of neural cell adhesion molecule L1 and NCAM of hippocampus in rats

Wang Yongsheng¹, Yao Xiaobo², Cai Erpeng³, et al

(¹*Institute of Radiation Medicine, School of Clinical Medicine, Anhui Medical University, Hefei 230032;*

²*Dept of Nuclear Medicine, Anhui Provincial Hospital, Hefei 230031;*

³*Dept of Radiology, The Second People's Hospital, Wuhu 241000)*

Abstract Objective To explore the effects of low concentrations of tritium irradiation using tritiated water on the expression of neural cell adhesion molecule L1 (L1) and neural cell adhesion molecule (NCAM) *in vitro*. **Methods** Hippocampal neuron cells from neonatal Sprague-Dawley (SD) rats (24 h) were primarily cultured in DMEM for 7 d, followed by exposure to tritiated water at concentrations of 3.7×10^2 , 3.7×10^3 , 3.7×10^4 , 3.7×10^5 , 3.7×10^6 Bq/ml for 24 h respectively, and cells without tritium irradiation served as control group (0 Bq/ml). Live Cell Imaging System was performed to detect neuronal migration capacity. Western blot and immunocytochemistry (ICC) were used to measure the expression levels of neural cell adhesion molecule L1 and NCAM. **Results** The migration distance of irradiated neural cells was significantly shorter than that of the control group and declined gradually with increasing tritiated water (HTO) concentrations ($P < 0.05$); Western blot and ICC showed that the expression of L1 and NCAM were both presented a dose-dependent decrease in hippocampal neuron cells when irradiated by tritium ($P < 0.05$). **Conclusion** Neurons exposed to tritium irradiation are probably undergoing the decreased expression of neural cell adhesion molecules, further leading to abnormal neuronal migration.

Key words rats; tritiated water; neural cell adhesion molecule; neural cell