

γ射线对小鼠记忆及IV型胶原表达的影响^①

张思琴¹, 陈少勇¹, 柴溶¹, 韦力^{2②}

(1. 广西医科大学口腔医学院, 广西 南宁 530021

E-mail: seaqingzhang@qq.com;

2. 广西医科大学人体解剖学教研室, 广西 南宁 530021)

摘要:目的 建立放射性脑损伤模型, 观察放射前后小鼠记忆、海马齿状回颗粒下层(SGZ)和室管膜下区(SVZ)IV型胶原的改变, 探索放射性脑损伤的发生机制, 探讨放射性脑损伤机制。**方法** 30只2月龄雌性昆明小鼠随机分为对照组、放射1d组、放射7d组, 每组各10只, 放射组给予⁶⁰Coγ射线照射, 10 Gy/次, 隔天照射, 共20 Gy。放射前、后分别采用Morris水迷宫观察小鼠记忆能力的变化, 于照射结束后1d、7d采用免疫组化方法观察海马齿状回的颗粒下层(subgranular zone, SGZ)和侧脑室的室管膜下区(subventricular zone, SVZ)内IV型胶原(Collagen IV)的表达变化情况。**结果** 与对照组相比, 放射后1d、7d组小鼠找到平台的时间明显延长, 而穿越平台次数显著减少($P < 0.01$); SGZ和SVZ区内IV型胶原数量减少、表达减弱($P < 0.05$)。**结论** 放射线干预可损害小鼠空间记忆能力, 其机制可能与IV型胶原降解影响血管新生有关。

关键词: IV型胶原; 海马齿状回; 室管膜下区; γ射线

中图分类号: R81; R338.64

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2018)04-0312-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2018.04.005

Effects of γ-rays on memory and expression of collagen IV in mice

Zhang Siqin¹, Chen Shaoyong¹, Chai Rong¹, Wei Li²

(1. College of Stomatology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China

E-mail: seaqingzhang@qq.com;

2. Department of Human Anatomy, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

Abstract: **Objective** The model of radiation brain injury was established to observe the changes of memory of mice with radiation brain injury and the changes of type IV collagen in the subgranular zone (SGZ) and subventricular zone (SVZ), and to explore the occurrence mechanism of radiation brain injury, so as to provide basis for its prevention and treatment. **Methods** Thirty 2-month-old female mice from Kunming were randomly divided into 3 groups: control group, 1 d after radiation group and 7 d after radiation group, with 10 cases in each group. The radiation groups were irradiated by ⁶⁰Coγ-ray, 10 Gy each time, every other day with the total dose of 20 Gy. The changes of mice memory ability before and after radiation were observed by Morris water maze. On 1 d and 7 d after the end of irradiation, the expression of collagen IV in subventricular zone (SVZ) and subgranular zone (SGZ) of hippocampal dentate gyrus were observed by immunohistochemical method. **Results** Compared with the control group, the time of finding the platform in the 1 d after radiation group and 7 d after radiation group prolonged and the times of crossing the platform decreased significantly ($P < 0.01$); the number of collagen IV positive cells in SGZ and SVZ reduced, and the expression weakened ($P < 0.05$). **Conclusion** Radiation intervention may damage the spatial memory ability of mice, and its mechanism may be related to the effect of type IV collagen degradation on angiogenesis.

Key words: collagen IV; hippocampal dentate gyrus; SVZ; γ-rays

① 基金项目: 广西教育厅科学基金(ZD2014031)

② 通信作者, E-mail: weilea@yahoo.com

放射性脑损伤(radiation brain injury, RBI)是头颈部肿瘤放射治疗过程中最常见的并发症,长期以来严重地困扰着临床医生。海马齿状回的颗粒下层(subgranular zone, SGZ)和侧脑室的室管膜下区(subventricular zone, SVZ)是成年哺乳动物神经发生的主要部位,也是对辐射最敏感的区域^[1-2],目前关于放射线对IV型胶原表达的影响报道甚少,本课题组前期研究发现放射对脑血管内皮细胞有直接损伤作用^[3],也有报道指出放射诱导脑血管损伤的是继发性脑损伤的重要原因^[4],然而其机制尚未清楚。为此,本研究建立RBI模型,观察放射后脑内SGZ和SVZ区IV型胶原变化,从影响脑血管基膜的角度来探讨RBI的机制,为防治RBI提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂与仪器 兔抗小鼠IV型胶原多克隆抗体(Abcam公司);5%BSA(北京索莱宝公司);二氨基联苯胺(Abcam公司);驴抗兔IgG(Abcam公司);电子分析天平(赛多利斯,北京);CWXJ80型⁶⁰Co远距离治疗机(山东烟台);Morris水迷宫(中国医学科学院);HM500高级双制冷切片(德国Leica公司);计算机图像分析仪(DMR+Q550)(德国Leica公司)。

1.1.2 实验动物及分组 由广西医科大学实验动物中心提供30只雌性昆明小鼠(实验动物机构许可证号:SCXK桂2014-0002),2月龄,体重25~30g。采取随机数字表原则将小鼠分为对照组(control group, Con)、放射1d组(1d after radiation group, Irr-1)、放射7d组(7d after radiation group, Irr-7),每组10只,昼夜交替环境下饲养,自由饮水和摄食,定期检测环境卫生。

1.2 方法

1.2.1 放射性脑损伤动物模型的建立 使用3.5%水合氯醛(350mg/kg)腹腔注射麻醉小鼠,待小鼠麻醉后,将放射组小鼠固定在自制的“放疗定位罩”中,使其身体和头部均不能移动。照射野上界为眼后毗连线,下界为双耳后连线,避开双眼、鼻腔和口腔,照射源为⁶⁰Co γ 射线,照射剂量10Gy/次,隔天照射,照射两次,累计剂量共达20Gy。对照组小鼠麻醉后置于同样环境中,但不予照射^[5]。

1.2.2 Morris水迷宫行为学测试 Morris水迷宫由圆形水池、移动平台、电脑摄像记录仪等组成。池壁、池底和平台均为黑色,水池分I、II、III及IV四个象限,将移动平台固定放在第三象限中心水中,平台顶部没于水面下1cm,水温保持在(25±1)℃。为了减少应激反应,在记忆测试前5d对各组所有实验小鼠进行记忆学习训练,将每组小鼠按照第一天测试的顺序于

上下午分别从两个不同象限面向池壁入水,如果小鼠60s内找到并爬上平台后让其在平台上休息15s,若是小鼠在60s内没有找到平台则由测试人员将它引导到平台之上,休息15s。学习训练结束后,开始进行空间记忆测试:分别于放射结束后1d、7d去除平台,将II象限为入水点,将小鼠面向池壁放进水中,记录其在120s内第1次穿过平台位置的时间、穿越平台次数、游泳速度及游泳轨迹^[6]。

1.2.3 脑组织切片的制作 水迷宫实验结束后,对实验的小鼠进行常规灌注处死,其中对照组10只小鼠和放射1d组的10只小鼠于放射后1d灌注取脑;放射7d组10只小鼠于放射后7d灌注取脑,并将取出小鼠脑组织放进10%甲醛过夜后,再放置30%蔗糖溶液(0.1mol/L, pH值为7.4的PBS液配制)4℃条件下浸泡,直至脑组织沉于瓶底后,放入-80℃冰箱保存,在恒冷式冰冻切片机上作连续冠状冰冻切片(厚为30 μ m),每隔3片选取1片,将切好的脑冰冻切片置于PBS液中待用,每组每只编号的小鼠随机选取如图1所示脑片1张,进行Collagen IV免疫组织化学染色。

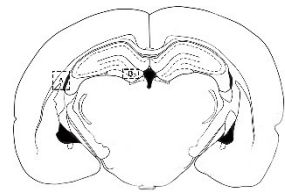


图1 脑切片

注:A:SVZ区;B:SGZ区

1.2.4 免疫组织化学染色检测 柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0)修复(98℃水浴5min);修复后切片用PBS冲洗(5min×3次)、3%的H₂O₂室温下清除内源性过氧化物酶20min;再室温下5%胎牛血清室温封闭20min后,置于兔抗小鼠Collagen IV多克隆抗体(1:400)4℃过夜,第2d,用PBS冲洗(5min×4次)后,放入驴抗兔IgG(1:500)中,室温孵育1h, DAB显色,每组小鼠的冰冻切片按照一个方向铺在同一张载玻片上,晾干后进行脱水封片,显微镜下观察。

1.2.5 IV型胶原统计方法 在DMR+Q550计算机图像分析仪上,切片经放大400倍后,取0.0025mm²面积计数SGZ和SVZ区IV型胶原数,每个标本计数3次,取平均值。

1.2.6 统计学方法 采用SPSS 20.0和GraphPad Prism 6.0对实验结果进行统计软件分析,数据用(\bar{x} ±s)表示,多组样本均数比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),两两比较采用LSD-t检验, P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Morris 水迷宫空间探索实验结果 放射前后各组小鼠第 1 次穿过平台位置的时间、穿越平台次数、游泳速度及游泳轨迹(见图 2),从图中可知,与对照组相比,放射 1 d、7 d 组小鼠第 1 次穿过平台位置的时间明显延长,而穿越平台的次数减少 ($P < 0.01$,见图 2A、图 2B),而放射后 1d、7d 组的小鼠之间差异并无统计学意义 ($P > 0.05$,见图 2A、图 2B);各组小鼠游泳速度差异无统计学意义 ($P > 0.05$,见图 2C)。

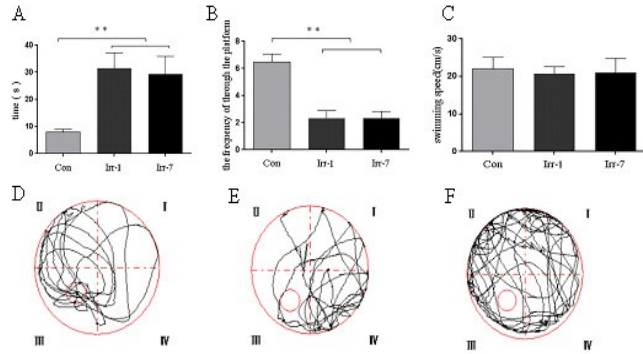


图 2 小鼠照射前后 Morris 水迷宫的检测

注:A:第一次穿越平台的时间,B:穿越平台的次数,C:游泳速度。D~F:游泳轨迹,其中 D:对照组,E:放射后 1 d 组,F:放射后 7 d 组;与对照组相比, ** $P < 0.01$ ($n = 10$)

2.2 IV 型胶原蛋白在三组小鼠脑 SGZ 及 SVZ 的表达情况 IV 型胶原阳性表达呈棕褐色条索状,表达于脑微血管基膜上(见图 3)。放射后 1 d、7 d 组小鼠脑 SGZ、SVZ 的 IV 型胶原表达降低,其 IV 型胶原数量少于对照组,差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05);放射 1 d、7 d 组小鼠之间的 IV 型胶原数量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)(见图 4)。

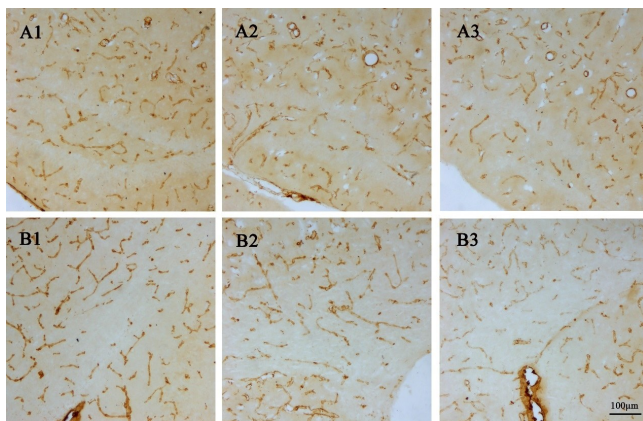


图 3 IV 型胶原在 SGZ 和 SVZ 的表达(免疫组化, $\times 100$)

注:A1:对照组,SGZ;B1:对照组,SVZ;A2:放射后 1 d 组,SGZ;B2:放射 1 d 组,SVZ;A3:放射后 7 d 组,SGZ;B3:放射 7 d 组,SVZ

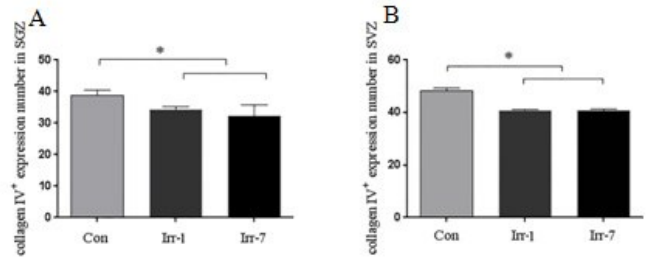


图 4 各组小鼠 IV 型胶原表达量比较

注:A:IV 型胶原的数量,SGZ;B:IV 型胶原的数量,SVZ;与对照组相比,* $P < 0.05$ ($n = 10$)

3 讨论

全脑照射治疗 (whole-brain radiotherapy, WBRT) 是广泛用于治疗头颈部恶性肿瘤最有效的方法之一,但是它在杀死肿瘤细胞的同时,也会不可避免的对正常周围脑组织造成损伤,有多达 50% 经过 WBRT 治疗的脑癌幸存者会发展为正常脑组织的迟发性辐射诱导的损伤,并且儿科病例占该群体的很大一部分。近年来,随着 3D-适形和强度调制放射治疗的发展和应用,两者都更准确地向肿瘤递送辐射,有助于减少周围正常组织损伤。尽管如此,而 RBI 仍然是 WBRT 常见且严重的并发症,RBI 的患者出现认知功能障碍、学习记忆功能缺陷等症状,严重影响了患者的生活质量^[7-8]。因此,理解和探索 RBI 的机制至关重要。

IV 型胶原是构成脑微血管基膜的主要成分之一,对促进新生血管成熟和维持血脑屏障的正常生理功能至关重要^[9],因此可用它来观察脑血管基膜的情况。Giannoni P 等^[10]使用 Collagen IV 免疫组化染色来观察阿尔茨海默病小鼠模型脑微血管基底层形态,并通过共聚焦显微镜来定位活化的 Iba-1 炎性小胶质细胞,结果显示微血管基底膜损伤的同时也伴随着 Iba-1 炎性小胶质细胞的浸润。动物实验表明^[11]上调脑出血后血肿周围 IV 型胶原的表达后可促进内皮细胞的增殖及迁移及加速微血管的新生。本研究中放射后小鼠脑的 SGZ 和 SVZ 中 IV 型胶原表达降低,结果表明 γ 射线可能损伤了脑血管基膜。Rubioaraiz A 等^[12]给大鼠腹腔注射 3,4-亚甲二氧基甲基苯丙胺来活化小胶质细胞和提高 IL-1 β 表达水平以引发神经炎症反应,结果发现血脑屏障基膜上层粘连蛋白和 IV 型胶原表达明显降低,从而影响血脑屏障的通透性和完整性。

本研究通过 Morris 水迷宫实验发现,与对照组相比,放射后小鼠第一次穿越平台的时间明显延长,穿越平台的次数显著减少,而放射后 1 d、7 d 组的小鼠之间并没有差异,说明 γ 射线照射后小鼠的空间记忆能力明显下降;我们实验还发现,放射后小鼠脑的 SGZ

(下转第 323 页)

145.

- [16] Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial - mesenchymal transition [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(3): 178-196
- [17] Han ML, Zhao YF, Tan CH, et al. Cathepsin L upregulation-induced EMT phenotype is associated with the acquisition of cisplatin or paclitaxel resistance in A549

cells[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2016, 37(12): 1606-1622.

- [18] Yang HW, Lee SA, Shin JM, et al. Glucocorticoids ameliorate TGF- β 1-mediated epithelial-to-mesenchymal transition of airway epithelium through MAPK and Snail/Slug signaling pathways[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 3486.

收稿日期:2018-04-24;修回日期:2018-07-21

(上接第314页)

和SVZ区IV型胶原数量减少,而放射后1d、7d组的小鼠IV型胶原数量并没有显著差异,这提示放射线可能通过引起脑血管基膜IV型胶原的降解,降低血管密度,引起小鼠记忆能力下降,但并没有随着时间的延长而加重,也可能是我们所观察的时间短。Warrington JP等^[13]报道WBRT后引起的海马区的学习记忆下降与放射后血管密度降低以及血管再生受到损害有密切的关系。因而,若能使用药物减轻放疗后血管基膜IV型胶原的降解,促进血管新生,这对于放射性脑损伤的治疗及预后可能有重要临床意义,但放射后血管基膜IV型胶原降解的具体机制仍不明确,尚待进一步探讨。

参考文献:

- [1] Ming GL, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions[J]. *Neuron*, 2011, 70(4): 687-702.
- [2] Naseri S, Moghahi SMHN, Mokhtari T, et al. Radio-Protective Effects of Melatonin on Subventricular Zone in Irradiated Rat: Decrease in Apoptosis and Upregulation of Nestin[J]. *J Mol Neurosci*, 2017, 63(2): 198-205.
- [3] 甘浪舸,李祥攀,阮林,等.循环内皮细胞和放射性脑损伤的关系[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2007, 14(5): 352-354, 372.
- [4] Moore ED, Kooshki M, Wheeler KT, et al. Differential expression of Homer1a in the hippocampus and cortex likely plays a role in radiation-induced brain injury[J]. *Radiation Research*, 2014, 181(1): 21-32.
- [5] 符植琳,张思琴,徐杨,等.放射性脑损伤模型小鼠纤维蛋白原的变化[J]. *中国组织工程研究*, 2018, 22(12): 1889-1894.

- [6] 陈晨,张思琴,韦力,等.海带多糖调节小鼠小胶质细胞活化保护放射损伤后的海马记忆功能[J]. *神经解剖学杂志*, 2018, 34(3): 327-333.
- [7] Castellino SM, Ullrich NJ, Whelen MJ, et al. Developing interventions for cancer-related cognitive dysfunction in childhood cancer survivors[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2014, 106(8): 2-10.
- [8] Greene-schloesser D, Moore E, Robbins ME. Molecular pathways: radiation-induced cognitive impairment [J]. *Clinical Cancer Research*, 2013, 19(9): 2294-2300.
- [9] 杨蕙,杜青,赵洪庆,等.左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁大鼠海马血脑屏障紧密连接蛋白、IV型胶原蛋白和 α -平滑肌肌动蛋白表达的影响[J]. *中草药*, 2015, 46(21): 3214-3218.
- [10] Giannoni P, Arango-lievano M, Neves ID, et al. Cerebrovascular pathology during the progression of experimental Alzheimer's disease[J]. *Neurobiology of Disease*, 2016, 88: 107-117.
- [11] 罗娟,唐涛,吴季,等.益气活血法对脑出血大鼠脑组织IV型胶原表达的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2011, 31(15): 2882-84.
- [12] Rubio-Araiz A, Perez-Hernandez M, Urrutia A, et al. 3, 4-Methylenedioxyamphetamine (MDMA, ecstasy) disrupts blood-brain barrier integrity through a mechanism involving P2X7 receptors[J]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2014, 17(8): 1243-1255.
- [13] Warrington J P, Ashpole N, Csiszar A, et al. Whole brain radiation-induced vascular cognitive impairment: mechanisms and implications[J]. *Journal of Vascular Research*, 2013, 50(6): 445-457.

收稿日期:2018-07-17;修回日期:2018-08-06