DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.01.004
第25卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 1
2003年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2003

文章编号:1000-5404(2003)01-0007-04

论著

微波辐射对离体培养人神经干细胞增殖、分化及凋亡的影响

李 巍[1],李成仁[1],蔡文琴[1],周德山[1],余争平[2] (第三军医大学:[1]基础医学部组织学与胚胎学教研室;[2]预防医学系劳动卫生学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 探索微波辐射对神经干细胞增殖、分化及凋亡的影响,为微波辐射的生物学效应提供基础资料。方法 利用细胞培养、流式细胞仪和细胞凋亡检测等技术,观察了微波辐射对神经干细胞增殖率的影响;5%胎牛血清诱导微波辐射后的神经干细胞分化,检测分化为神经元和胶质细胞比例及细胞凋亡情况,并观察了细胞的形态学变化。结果 微波辐射后神经干细胞的增殖率明显下降,细胞凋亡数明显增加,分化的神经元和胶质细胞的突起变短变粗、数量减少,但神经元和胶质细胞的分化比例未见明显变化。结论 微波辐射对神经干细胞有较大影响,且影响程度与微波辐射功率有一定的量效关系。

关键词:神经干细胞;微波辐射;影响
中图法分类号:Q813.11;R329.28;R594.8 文献标识码:A

Effects of microwave on proliferation, differentiation and apoptosis of human neural stem cells *in vitro*

LI Wei, LI Cheng-ren, CAI Wen-qin, ZHOU De-shan, YU Zheng-pin (Department of Histology and Embryology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the effects of microwave radiation on proliferation, differentiation and apoptosis of human neural stem cells(NSCs), so as to provide basic data on biological effects of microwave. Methods Proliferation of NSCs was observed after microwave radiation by cell culture, flow cytometry and TUNEL method. After the differentiation of NSCs induced by microwave radiation with 5% fetal bovine serum, the ratio of the differentiated neurons to glia cells, cell apoptosis and morphological changes were detected. Results After microwave radiation, proliferation of NSCs decreased significantly, but count of cell apoptosis increased significantly. Decreased shorter and thicker neurites of neurons and glia cells were found. There were no significant changes of the ratio of the differentiated neurons to glia cells. Conclusion Power-dependent microwave radiation may have great effect on neural stem cells.

Key words: neural stem cell; microwave radiation; effect

近年来,随着微波技术在各个领域的广泛应用,微波的生物学效应越来越引起人们的关注。许多资料表明,中枢神经系统对微波辐射是极为敏感的系统。近年来,人们用不同频率的连续波、脉冲波,从条件反射和行为,自发或诱发脑电活动,神经系统细胞的形态以及代谢等方面,开展了微波对中枢神经系统影响的研究。神经干细胞是近10年来神经系统的研究热点,它不仅存在于啮齿类动物或人的中枢神经系统内,具有自我更新和多向分化潜能,而且还可在体外培养、增殖、分化,是极具应用前景的神经系统的细胞研究模型。本研究用不同功率的微波,对体外培养的人神经干细胞进行照射,以了解微波对神经干细胞体外增殖、分化及凋亡的影响,为微波对神经系统的损伤研究提供基础资料。

1 材料和方法

1.1 材料

体外培养第5代的人神经干细胞(自制):DMEM/F12,B27。碱性成纤维细胞生长因子(bFGF),以上3种均购自Gibico公司,神经丝-200(NF-200),胶质纤维酸性蛋白(GFAP),细胞凋亡试剂盒,SABC检测试剂盒(博士德公司)、微波照射仪(劳动卫生学教研室提供)。

1.2 方法

将培养第5代的人神经干细胞分装在50 ml培养瓶中,5~

基金项目:国家"863"计划"830"主题重点课题资助项目(30270443)
作者简介:李 巍(1964-),女,四川省双流县人,博士,实验师,主要从事神经发育和再生方面的研究。电话:(023)68752229
通信作者:蔡文琴,电话:(023)68752233,E-mail:wenqin@public.cta.cq.cn
收稿日期:2002-09-10;修回日期:2002-12-12

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

6 ml 培养液/瓶，约含 50～100 个克隆/ml，分别置于微波辐射室用功率为 30 mW/cm²，60 mW/cm²，90 mW/cm² 的微波辐射 20 min，辐射后的细胞吸入离心管内，800～1 000 r/min 低速离心 5 min，收集细胞集落做以下实验。

1.2.1 微波辐射后神经干细胞克隆形成率检测 取一部分上述微波辐射后的神经干细胞，用滴管吹打数次细胞悬液，尽量使神经干细胞集落吹散。然后将细胞悬液作梯度倍数稀释，以适当细胞密度接种于 35 mm 培养皿中，一般可按每皿 50～100 个细胞或小集落的密度，接种于 2 ml 条件培养液中置 CO_2 孵箱内 37℃、5%CO_2 饱和湿度下培养，每天观察并将培养皿放置在一张带网格的透明胶片上，在倒置显微镜下，计数克隆数，用下列公式计数克隆形成率：

$$克隆形成率(\%) = \frac{克隆数}{接种细胞数} \times 100$$

1.2.2 流式细胞仪计数辐射后神经干细胞分化成神经元和星形胶质细胞的数量 取辐射后的神经干细胞悬液，用条件培养基(DMEM/F12、5% 胎牛血清)稀释、置入底部涂有多聚赖氨酸的 150 ml 培养瓶中，5～6 ml 培养基/瓶，5×10^5～10^6 个细胞/ml。置 CO_2 培养箱内，37℃、5% CO_2 和饱和湿度下培养，6～7 d 后，用 0.5% 的胰蛋白酶消化细胞，用滴管吹打，使贴壁细胞全部脱落，收集细胞培养液于离心管内，用 800～1 000 r/min 离心 5 min，弃上清液，收集沉淀细胞于 1.5 ml 离心管中，用 4% 多聚甲醛固定 4～12 h，低速离心，0.1 mol/L PBS 冲洗 3 次，10 min/次，每次均低速离心 5 min；NF-200（1∶1 000），GFAP(1∶100)，孵育 8～12 h，室温，低速离心 5 min；0.1 mol/L PBS 冲洗 3 次，10 min/次，低速离心 5 min；用荧光素标记的二抗处理细胞 30～60 min，37℃，低速离心 5 min，0.1 mol/L PBS 冲液 3 次，流式细胞计数仪检测。

1.2.3 微波辐射后神经干细胞分化的 NF-200 及 GFAP 的免疫组化染色 取辐射后神经干细胞，分别置入 35 mm 培养皿中(预先置有涂有多聚赖氨酸的盖玻片)，加条件培养液 2 ml(DMEM/F12，5% 胎牛血清)、20～30 个细胞集落/皿、CO_2 孵箱、37℃、5%CO_2 和饱和湿度环境下，培养 6～7 d 后，收集贴有细胞的盖玻片，4% 多聚甲醛加 3% 苦味酸固定后，用 NF-200，GFAP 行常规 SABC 一硫酸镍胺增强法显色。

1.2.4 微波辐射后神经干细胞分化的细胞凋亡检测 神经干细胞分化实验同 1.2.3，取有神经干细胞分化细胞的盖玻片，用 4% 多聚甲醛加 3% 苦味酸固定 30 min，0.1 mol/L PBS 冲洗 3 次，5～10 min/次；0.3% Triton-X-100/PBS 孵育 30 min，室温；TBS 洗 3 次，5～10 min/次；加标记缓冲液 20 μl/片，以保持切片湿润，按每张切片取 TdT 和 DIG-d-UTP 各 1 μl，加入 18 μl 标记缓冲液中混匀，甩去切片上多余液体应加标记液 20 μl 片，置样品于温盒中，37℃标记 2 h。TBS 洗 2 min/次；加封闭液 50 μl/片，室温 30 min，甩掉封闭液，不洗；用封闭液 1∶100 稀释生物素化抗地高率抗体；50 μl/片加至标本片上。置样品于温盒中，37℃反应 30 min，TBS 洗 2 min/3 次。用 TBS 1∶100 稀释 SABC（不能用封闭液稀释）：取 1 ml TBS 加 SABC10 μl，混匀后加至切片 37℃反应 30 min，TBS 洗 5 min，4 次。DAB— 硫酸镍铵增强法显色，伊红轻度复染。脱水，透明，封固，显微镜观察。

1.2.5 统计学方法 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 统计学软件处理，两组间差异比较选用 t 检验。

2 结果

2.1 微波辐射后对神经干细胞克隆形成率及分化的影响

用不同功率的微波辐射神经干细胞后，结果显示，在辐射功率为 60 mW/cm² 和 90 mW/cm² 组，神经干细胞的克隆形成率明显下降，与正常组相比相差非常显著($P<0.01$)，见表 1。

表 1 微波辐射对神经干细胞克隆形成率的影响($n=10$，$\bar{x} \pm s$)

Tab 1 The effects of microwave radiation on rate of NSCs clone formation($n=10$，$\bar{x} \pm s$)

	Rate of clone forming(%)
Normal	38.47±2.08
30 mW/cm²	30.36±1.96
60 mW/cm²	13.14±1.82
90 mW/cm²	8.89±1.87 **

**: $P<0.01$ *vs* Normal group

2.2 微波辐射对神经干细胞分化的影响

主要表现在对神经干细胞贴壁情况上，微波辐射功率越大，细胞或细胞集落贴壁越少，死亡细胞越多，大量细胞悬浮在培养基中，但一旦细胞贴壁分化，对分化后所形成的神经元和星形胶质细胞比例影响较小，通过流式细胞仪检测，没有统计学意义($P>0.05$)，见表 2。从形态来看，微波辐射后，神经干细胞分化的神经元和神经胶质细胞的突起变短、变粗，有的细胞胞质内，可见空泡样结构，见图 1，2。

表 2 微波辐射后神经干细胞分化神经元和星形胶质细胞数率(%，$n=10$，$\bar{x} \pm s$)

Tab 2 The rate of neurons or astrocytes in NSCs differentiated cells after microwave radiation(%，$n=10$，$\bar{x} \pm s$)

	NF-200	GFAP
Normal	32.86±2.78	47.34±3.14
30 mW/cm²	30.42±2.57	49.86±3.09
60 mW/cm²	31.78±3.06	48.33±3.67
90 mW/cm²	30.72±2.93	49.48±2.98

2.3 微波辐射后，神经干细胞分化过程中的细胞凋亡

用 TUNEL 检测试剂盒染色后，再经流式细胞仪检测，结果：微波辐射后，神经干细胞分化 7 d 时，细胞凋亡随微波辐射功率的增加($P<0.01$)，细胞凋亡率增加，见表 3。

表 3 微波辐射后神经干细胞分化过程中的细胞凋亡率($n=10$，$\bar{x} \pm s$)

Tab 3 The apoptosis rate in NSCs differentiated cells after microwave radiation($n=10$，$\bar{x} \pm s$)

	Rate of apoptosis cell(%)
Normal	0.54±0.23
30 mW/cm²	2.02±0.45
60 mW/cm²	4.53±0.36 **
90 mW/cm²	5.38±0.58 **

**: $P<0.01$ *vs* Normal group

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

在 TUNEL 染色的神经干细胞分化的玻片上, 凋亡细胞的形态, 表现为核固缩, 染色质边聚, 有时形成半月状和环状, 细胞体积缩小, 偶见凋亡小体, 凋亡细胞主要分布在神经干细胞团内, 在放射状已分化的细胞处也可见到, 见图 3~6。

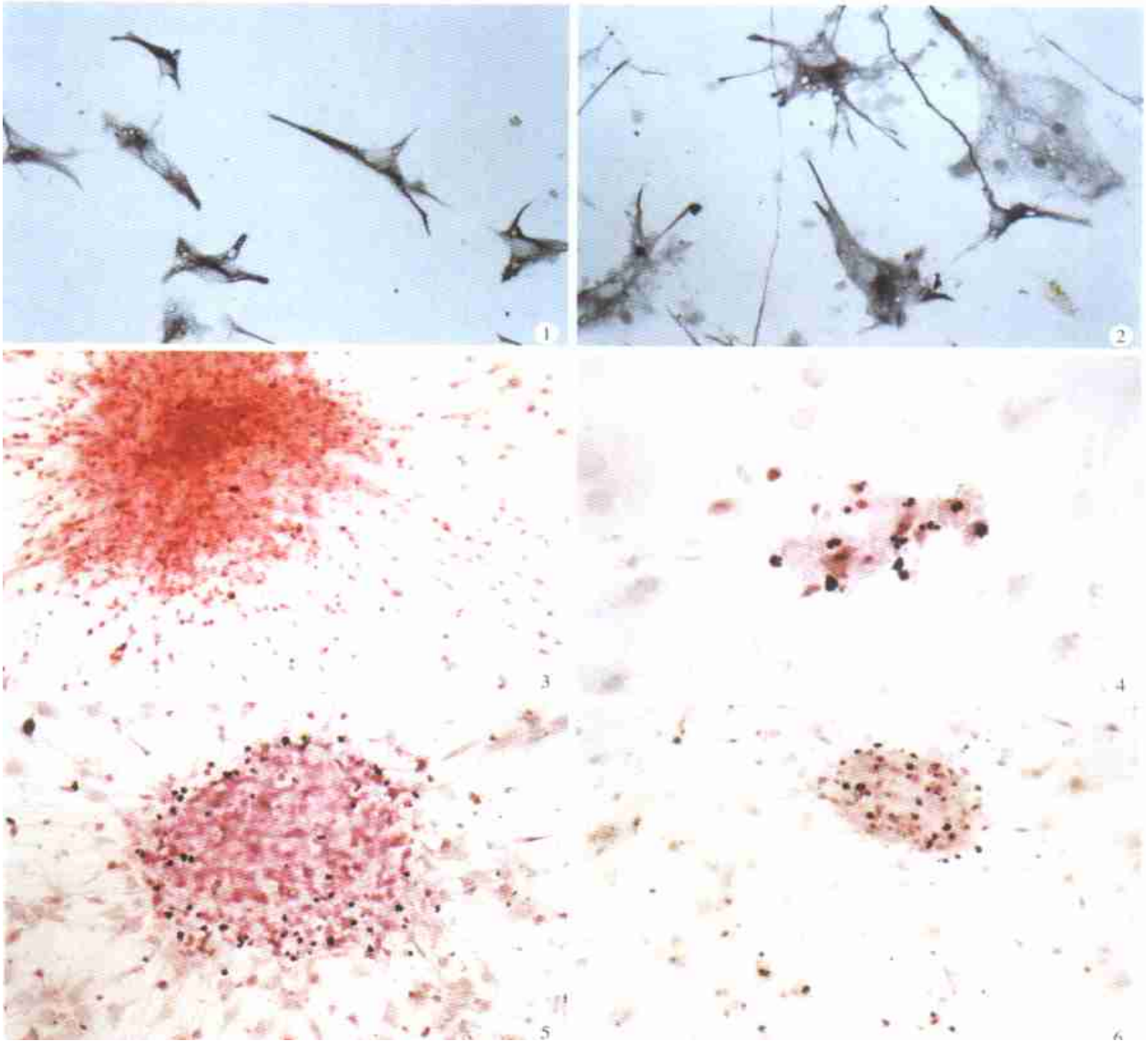


图 1　90 mW/cm² 微波辐射后, 人 NSCs 分化 14 d, NF-200 阳性细胞　(SABC-硫酸镍胺增强法× 400)

Fig 1　After 90mW/cm2 microwave radiation, differentiated human NSCs at 14th day, NF-200 immunopositive cells　(SABC-Nickel ammonium sulfate enhancement× 400)

图 2　90 mW/cm² 微波辐射后, 人 NSCs 分化 14 d, GFAP 阳性细胞　(SABC-硫酸镍胺增强法× 400)

Fig 2　After 90 mW/cm² microwave radiation, differentiated human NSCs at 14th day, GFAP immunopositive cells　(SABC-Nickel ammonium sulfate enhancement× 400)

图 3　正常情况下, 人 NSCs 分化 7 d, 凋亡细胞(紫黑色)　(TUNEL× 100)

Fig 3　Differentiated human NSCs at 7th day, apoptosis of cells(violet darkness)　(TUNEL× 100)

图 4　30 mW/cm² 微波辐射, 人 NSCs 分化 7 d, 凋亡细胞(紫黑色)　(TUNEL× 400)

Fig 4　After 30 mW/cm² microwave radiation, differentiated human NSCs at 7th day, apoptosis of cells(violet darkness)　(TUNEL× 400)

图 5　60 mW/cm² 微波辐射, 人 NSCs 分化 7 d, 凋亡细胞(紫黑色)　(TUNEL× 200)

Fig 5　After 60 mW/cm² microwave radiation, differentiated human NSCs at 7th day, apoptosis of cells(dark)　(TUNEL× 200)

图 6　90 mW/cm² 微波辐射, 人 NSCs 分化 7 d, 凋亡细胞(紫黑色)　(TUNEL× 400)

Fig 6　After 90 mW/cm² microwave radiation, differentiated human NSCs at 7th day, apoptosis of cells(dark)　(TUNEL× 400)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

3 讨论

随着微波技术在通讯、雷达、探测、电视、核物理等领域的广泛应用，微波辐射对作业人员的影响也日益引起人们的关注。微波照射生物体时能穿透组织产生热和非热的生物效应，而人体中枢神经系统是反映微波损伤较敏感的系统之一。已有的研究表明，微波辐射对中枢神经系统的形态学和功能学等多方面产生较大影响，但微波辐射对神经干细胞的影响，作者未见文献报道。

3.1 微波辐射对神经干细胞的增生、分化的影响

本实验用不同功率的微波辐射离体培养第5代的人胚胎脑皮层神经干细胞，结果发现，微波辐射强度与神经干细胞的受损程度密切相关，微波辐射功率越高，神经干细胞的增殖、分化能力越差，死亡细胞数目越多，在诱导细胞分化时，细胞很难贴壁，且分化后的神经元和神经胶质细胞突起变短、变粗。这可能与微波辐射后，细胞的遗传物质、代谢物质、细胞膜等均受到严重损伤有关。张剑宁等[1]将大鼠暴露于2 450 MHz量级7 mW/cm^{2}微波辐射装置4 h，实验后24 h处死并检测有关指标，结果发现微波辐射后大鼠海马CA1区组织Na^+-K^+-ATP酶、Ca^{2+}-ATP酶活性明显降低，并伴有Na^+、Ca^{2+}含量升高和K^+含量下降。微波辐射后海马CA1区组织ATP酶活性抑制可引起神经元细胞内的N^+、Ca^{2+}聚积，K^+流失，离子内环境紊乱，从而导致神经元损害。近年来，Ca^{2+}在神经元损害过程中的作用已日益受到重视，细胞内Ca^{2+}聚积可激活磷脂酶，导致膜磷脂降解产生游离脂肪酸、前列腺素和白三烯等破坏细胞功能；Ca^{2+}增高还可使Ca^{2+}调节的蛋白酶、腺苷酸环化酶等功能失调，线粒体氧化磷酸化失偶联，能量生成减少，导致神经元代谢紊乱[2,3]。一定时间的微波辐照可改变细胞膜粘度。细胞内Ca^{2+}浓度的维持与膜结构和功能有关，合适的细胞膜粘度是膜功能正常发挥的一个重要条件。经过一定微波辐照，细胞膜粘度可发生改变，表现出明显的时间和剂量依从性，说明微波交变电磁场作用于膜上离子物质或偶极子蛋白质分子，改变膜脂固有的运动方式，影响膜结构和功能，破坏了物质转运的基础，导致细胞代谢失常。

综上所述，微波作用于细胞，可改变细胞膜结构和功能，造成细胞内Ca^{2+}、cAMP浓度发生变化，进而对细胞代谢产生影响，也可改变DNA结构，抑制细胞增殖，杀伤细胞。

3.2 微波辐射导致神经干细胞凋亡

细胞凋亡（Apoptosis）是1972年Kerr等首先提出的一种不同于细胞坏死（Necrosis）的细胞死亡方式，是指在某些生理或病理条件下细胞接受到某种信号的触发后主动参与并遵循一定程序的较慢的死亡过程，又称为程序化细胞死亡（Programmed cell death，PCD）。它在胚胎发生、器官发育、免疫应答、细胞信息传递、神经细胞退化、肿瘤的发生等方面具有十分重要的作用，因此近来颇受人们的重视，也取得了很多突破[4,5]。从本实验结果来看，在正常情况下，神经干细胞在分化过程中也存在极少数细胞凋亡，但在微波辐射后，凋亡细胞数目增加，且与微波辐射程度有密切的量效关系。微波辐射功率越大，凋亡细胞数越多。微波辐射导致细胞凋亡的机制还很不清楚。可能是：①微波使DNA发生断裂、染色体发生畸变，并存在剂量-效应关系。细胞虽有修复基因对受损的DNA进行修复，但因DNA损伤修复相关酶PARP活性降低，不可避免地也有DNA不能被修复，这样就有可能在p53等基因的调控下使细胞步入凋亡状态。②信号传导通路的破坏，有研究者认为，诱导细胞凋亡的因子或刺激因素是通过第二信使系统传递信号，主要途径为磷脂酶C（PLC）和腺苷环化酶（Adenylate cyclase）系统。cAMP作为第二信使，是受体-G蛋白-Ac/Gc信号偶联系统的重要组成部分，cAMP作用于cAMP依赖的蛋白激酶（激酶A），使后者催化各种底物磷酸化，引起一系列包括细胞代谢等生物学效应。③癌基因和抑癌基因的作用目前研究认为细胞凋亡的触发是一个级联式（Cascade）基因表达的结果，有许多基因参与这一过程，其中包括多种癌基因与抑癌基因。

参与细胞凋亡的因素很多，本实验只观察到了微波辐射导致神经干细胞分化时细胞凋亡增加，但其确切的机制还有待进一步研究。

参考文献：

[1] 张剑宁，章 翔，易声禹，等. 微波辐射对海马CA1区神经元的损害及其防治[J]. 中华神经外科杂志，1999，15(1)：18-20.

[2] 王 勇，宁竹之，王登高. 微波辐照对小鼠离体淋巴细胞Ca^{2+}、细胞内环磷酸腺苷及DNA合成的影响[J]. 中华劳动卫生职业病杂志，1998，16(2)：117-119.

[3] 曹兆进，张洪桥，陶 勇，等. 微波辐射对小白鼠脂质过氧化作用及神经递质含量的影响[J]. 卫生研究，2000，29(1)：28-29.

[4] Lee Y，Chong M J，McKinnon P J，*et al*. Ataxia telangiectasis mutated-dependent apoptosis after genotoxic stress in the developing nervous system is determined by cellular differentiation status[J]. J Neurosci，2001，21(17)：6687-6693.

[5] Chapman R S，Lourenco P C，Tonner E，*et al*. Suppression of epithelial apoptosis and delayed mammary gland involution in mice with a conditional knockout of Stat3[J]. Genes Dev，1999，13(19)：2604-2616.

（编辑 陈聪连）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net