

电磁辐射对海马小胶质细胞及 JAK活化的影响

陈纯海, 杨学森, 郝玉通, 张广斌, 余争平

中图分类号: X591 文献标识码: A 文章编号: 1004-714X(2008)01-0129-03

【摘要】 目的 探讨电磁辐射后 JAK/STAT信号通路中 JAK家族 (JAKs) 蛋白磷酸化水平的变化与小胶质细胞活化之间的关系。方法 以 $90\text{ mW}/\text{cm}^2$ 的电磁波一次辐照大鼠 20 min 采用免疫组化方法检测海马脑区小胶质细胞 GSA- $\text{I}\beta 4$ 的表达情况, 采用 western blot 检测 JAKs 家族蛋白质在海马脑区磷酸化水平的变化。结果 电磁辐射后 3 h 至 24 h 大鼠海马脑区小胶质细胞 GSA- $\text{I}\beta 4$ 表达明显增高; Jak_1 、 Jak_2 、 Jak_3 蛋白磷酸化水平在电磁辐射后都有所升高, Jak_1 于辐照后即刻开始升高, 12 h 达到峰值, 而 Jak_2 磷酸化水平在辐照后即刻就达到峰值, 并且 24 h 内都维持在较高水平, Jak_3 仅在辐照后 3 h 以内明显升高, 72 h 后所有 JAK 家族成员蛋白磷酸化水平恢复至正常。结论 电磁辐射可明显诱导海马脑区小胶质细胞活化, JAK/STAT 信号转导系统的 Jak_1 、 Jak_2 、 Jak_3 磷酸化水平出现不同形式的升高, 表现为差别激活, 三条 JAK/STAT 信号通路在电磁辐射致小胶质细胞活化过程可能具有不同作用。

【关键词】 电磁辐射; JAK/STAT 信号通路; 海马; 小胶质细胞

The Effects of Electromagnetic Irradiation on Activation of Microglia and JAKs in Rat Hippocampus CHEN Chun-hai, YANG Xue-sen, HAO Yu-tong, et al. The Department of Occupational Hygiene, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

【Abstract】 Objective To determine the activation of microglia and the phosphorylation of JAKs (the upstream factors of JAK/STAT (Janus activated kinase/ signal transducers and activators of transcription) signaling pathway) after electromagnetic irradiation. Methods Rats were irradiated by $90\text{ mW}/\text{cm}^2$ EMF for 20 min . The phosphorylation of JAKs was determined by western blot at different time after electromagnetic irradiation. The activation of microglia was determined by immunohistochemistry. Results GSA- $\text{I}\beta 4$ was upregulated in microglia, which indicated microglia was activated after electromagnetic irradiation. The phosphorylation of Jak_1 , Jak_2 and Jak_3 in rat hippocampus was upregulated after electromagnetic irradiation. The phosphorylation of Jak_1 was upregulated after microwave exposure and peaked at 12 h. Jak_2 peaked at 0 h after electromagnetic irradiation and sustained in a high level. Jak_3 was slightly affected by electromagnetic irradiation. All the three members of JAKs return to normal at 72 h after electromagnetic irradiation. Conclusion Microglia cells was activated after electromagnetic irradiation. The phosphorylation of JAKs was upregulated by electromagnetic irradiation. It suggested that JAK/STAT signaling pathway was activated after electromagnetic irradiation, which indicated that JAK/STAT signaling pathway may participate in brain microglia activation induced by electromagnetic irradiation.

【Key words】 Electromagnetic Irradiation; JAK/STAT Signaling Pathway; Hippocampus; Microglia

随着微波日益广泛的应用, 电磁辐射已成为影响人类健康的四大环境污染之一, 有关电磁辐射生物效应的研究已成为现代卫生学工作者亟待解决的重要课题。目前研究表明, 一定剂量的电磁辐射具有明显的中枢神经损伤效应, 其中尤其以海马脑区最为敏感^[1,2], 电磁辐射不仅能影响学习记忆功能等神经行为功能, 还能引发脑内神经元凋亡等多种病理反应^[3]。但电磁辐射对小胶质细胞是否有影响, 以及有哪些细胞信号转导系统参与, 目前相关研究报道还较少。JAK/STAT (Janus activated kinase/ signal transducers and activators of transcription) 信号通路是近年来研究发现的广泛参与脑内许多重要病理生理过程的信号转导系统^[4]。本实验室前期研究也发现, 电磁辐射后神经细胞 Jak 家族基因出现差异表达^[5]。因此本研究通过观察电磁辐射后海马脑区小胶质细胞活化状态以及 JAK 家族蛋白活化水平的变化, 探讨该信号通路在电磁辐射所致海马脑区小胶质细胞活化过程中可能发挥的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 山羊来源的抗磷酸化 Jak_1 、 Jak_2 、 Jak_3 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司, 小鼠来源的抗 β -actin 单克隆

抗体、GSA- $\text{I}\beta 4$ 、RMSF、Leupeptin、Apoptin 均购自美国 Sigma 公司; HRP 标记的兔抗山羊抗体, HRP 标记的山羊抗小鼠抗体, DAB 显色试剂等购自中杉公司。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组 SPF 雄性 SD 大鼠, 体重 $180 \sim 220\text{ g}$ 由第三军医大学实验动物中心提供。实验动物随机分为两组, 对照组 ($0\text{ mW}/\text{cm}^2$, 20 min) 和辐照组 ($90\text{ mW}/\text{cm}^2$, 20 min), 辐照组观察电磁辐射辐照后 0 h、3 h、12 h、24 h、72 h 5 个时相点, 对照组和实验组每个时相点均观察 4 只动物。

1.2.2 动物电磁辐射暴露 电磁辐射暴露在反射近似零的微波暗室内进行, 辐照环境温度、湿度保持恒定。动物置于可透射电磁波的专用辐照盒内, 在 H 电场强均匀分布的平台上接受 20 min 一次全身辐照。

1.2.3 免疫组化检测海马脑区小胶质细胞 GSA- $\text{I}\beta 4$ 的表达 据实验要求, 于各时相点将大鼠麻醉, 4% 多聚甲醛经左心室灌注, 取全脑于 4% 的多聚甲醛中固定, 石蜡包埋, 常规切片 $5\mu\text{m}$ 。石蜡切片脱蜡、水化; 3% H_2O_2 甲醇溶液处理 20 min ; 正常兔血清封闭 30 min 倾去多余血清, 滴加 1:200 稀释的 GSA- $\text{I}\beta 4$ 一抗, 湿盒内 4°C 孵育过夜; PBS 洗 3 次, 每次 10 min 滴加 HRP 标记的抗 GSA- $\text{I}\beta 4$ 二抗, 室温孵育 2 h PBS 洗 3 次, 每次 10 min DAB 显色。

1.2.4 Western blot 检测大鼠海马脑区磷酸化 Jak_1 、 Jak_2 、 Jak_3 表达 大鼠经电磁辐射暴露后, 在各时相点断头, 分离双侧海马, 加入 1 ml 预冷总蛋白裂解液 (RIPA 含蛋白酶抑制剂与磷酸

基金项目: 国家自然科学基金项目 (项目编号: 30470418)

作者单位: 第三军医大学预防医学系电磁辐射医学防护教育部重点实验室, 重庆 400038

作者简介: 陈纯海 (1981~), 男, 湖北潜江人, 硕士, 助教, 研究方向: 电磁辐射神经生物效应。

通讯作者: 杨学森 (1972~), 男, 重庆市人, 博士, 副教授。

化酶抑制剂), 匀浆后, 提取大鼠海马脑组织总蛋白, Lowry法测蛋白质含量。采用 8% 分离胶, 5% 的浓缩胶, 以 100 μg 总蛋白上样进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 将凝胶中的蛋白转印于 PVDF 膜, 在含 5% 脱脂奶粉的 TBST 液中封闭 3 h 然后膜再置于山羊抗磷酸化的 Jak1、Jak2、Jak3 多克隆抗体 (1:200) 中 4℃ 过夜, 取出以 TBST 洗 4 次, 每次 10 min。TBST 稀释的 HRP 标记的抗山羊二抗 (1:300) 室温 1 h TBST 洗 4 次, 每次 10 min。DAB 显色。β-actin 检测方法 与 JAK 检测方法相一致。显色条带在 Quantity One 分析软件上测定灰度值, 并进行定量分析。每次实验重复四次, 选取有代表性的 Western blot 电泳结果作图 示。

1.3 统计分析 实验数据采用 SPSS13.0 软件进行统计分析, 取 P<0.05 为相差显著, 实验结果用均数 ± 标准差 (x±s) 表示。

2 结果

2.1 辐照对肛温和比吸收率的影响 用热电偶点温计测定大鼠在辐照前后即刻肛温, 计算各组大鼠比吸收率 (SAR 值), 计算公式如下:

$$SAR=4186\ C\Delta T/t$$

公式中 C 组织比热, 取 0.83 kcal/kg℃; ΔT 大鼠在辐射前后肛温变化值; t 辐照时间 (s)。由表 1 可知, 对照组假性辐照 20 min 后大鼠辐照前后肛温无明显改变 (P<0.05), 而电磁波辐照 20 min 后大鼠肛温较辐照前升高 2.76℃, 其 SAR 值为 11.21 W/kg 提示 90 mW/cm² 电磁辐射对动物存在明显热效应。

表 1 电磁辐射后大鼠肛温及 SAR 值变化 (x±s)

组别	辐照前 (℃)	辐照后 (℃)	ΔT (℃)	SAR (W/kg)
对照组	36.6±0.4	36.2±0.5	—	—
辐照组	36.5±0.3	38.9±0.6 ¹⁾	2.8±0.6	8.3±1.7

注: 1) 与对照组比较 P<0.01

2.2 电磁辐射诱导大鼠海马脑区小胶质细胞活化 以凝集素 GSA-B4 进行免疫组化染色, 观察电磁辐射后大鼠中枢神经系统海马脑区小胶质细胞活化状态。正常对照组也有少数 GSA-B4 阳性染色细胞, 颜色也较浅, 细胞形态不够清晰, 胞体较小, 周围有细小的分支。辐照后即刻阳性染色细胞开始增多, 胞体较大。辐照后 3h 阳性染色细胞明显增多, 颜色深染, 形态清楚, 胞体增大, 有明显突起和树枝样分支。12h 后仍有较多的阳性染色细胞。24h 后阳性染色细胞进一步增多, 突起减少, 部分细胞呈杆状。72h 后阳性染色细胞数量及细胞形态恢复至对照组水平。见图 1 至图 4。

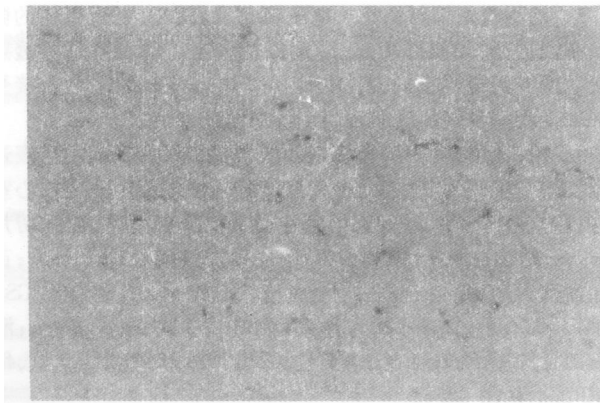


图 1 对照组大鼠海马脑区小胶质细胞 GSA-B4 免疫组化染色 (×200)

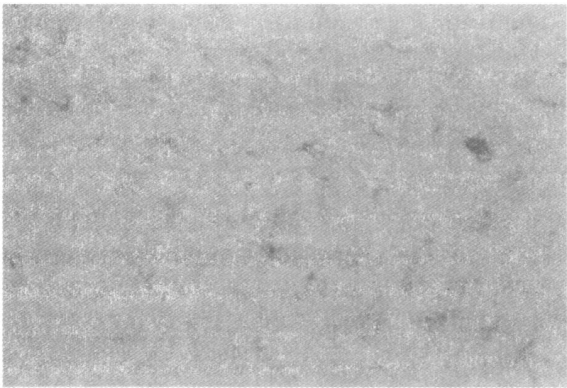


图 2 电磁辐射后 0h 大鼠海马脑区小胶质细胞 GSA-B4 免疫组化染色 (×400)

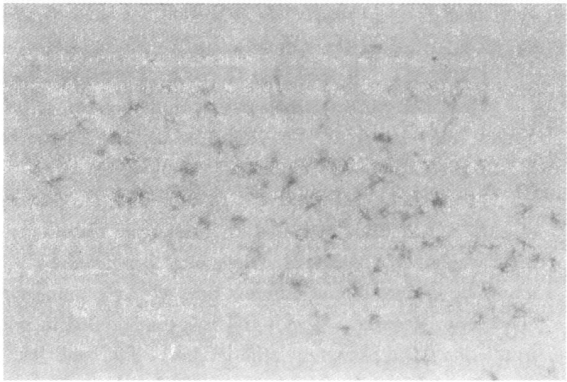


图 3 电磁辐射后 3h 大鼠海马脑区小胶质细胞 GSA-B4 免疫组化染色 (×200)

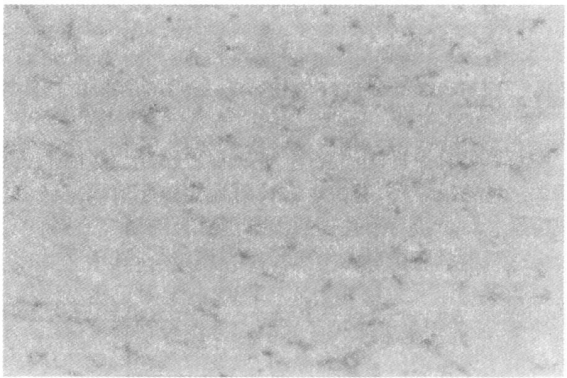
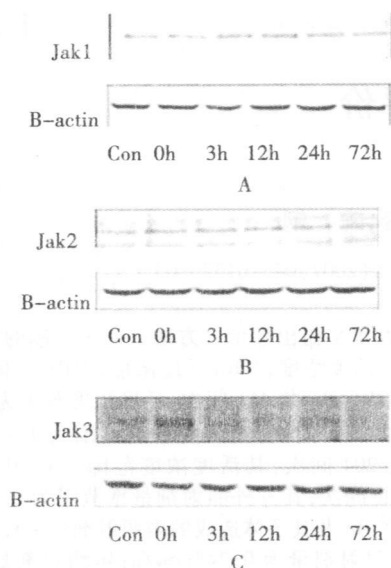


图 4 电磁辐射后 24h 大鼠海马脑区小胶质细胞 GSA-B4 免疫组化染色 (×200)

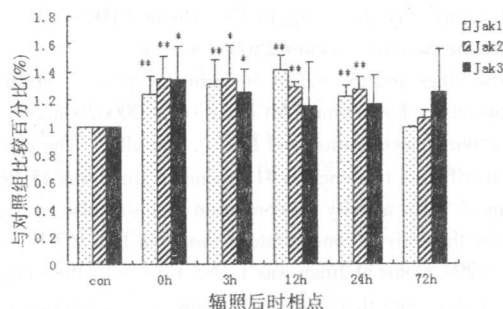
2.3 电磁辐射对大鼠海马脑区 Jaks 蛋白质磷酸化水平的影响 电磁波辐照后大鼠海马 Jak1、Jak2、Jak3 蛋白质磷酸化的 Western blot 结果见图 5。

对 Jaks 蛋白质磷酸化的 Western blot 结果进行统计学分析, 见图 6 电磁辐射能够上调大鼠海马脑区 Jak1、Jak2、Jak3 的蛋白磷酸化水平, 但三者磷酸化水平的变化形式又互不相同。海马脑区磷酸化 Jak1 在辐照后 0h 即可检测到明显升高, 且在 24h 以内均高于对照组, 12 h 达到峰值, 与对照组相比, 升高了约 41% (P<0.01), 72h 基本恢复至正常水平。海马脑区 Jak2 磷酸化水平在辐照后 0h 即到达峰值, 与对照组相比, 升高了约 36% (P<0.01), 此后逐渐降低, 但一直维持在较高水平, 且与对照组相比有显著性差异 (P<0.05), 至 72h 恢复到正常水平。而 Jak3 磷酸化水平在辐照后 0h 和 3h 明显高于对照组 (P<0.05), 12h 后与对照组相比差异无显著性。



注: A Jak1, B Jak2, C Jak3

图5 电磁辐射对大鼠海马 Jaks 磷酸化水平的影响



n=4, 与对照组比较, *P<0.05, **P<0.01

图6 电磁辐射后大鼠海马 Jak1 磷酸化水平变化

3 讨论

实验发现电磁辐射能够明显诱导小胶质细胞活化,并且在辐照后 3h 24h 出现活化高峰。小胶质细胞是中枢神经系统(CNS)内潜在的吞噬细胞,当 CNS 出现各种病理变化如脑缺血或脑损伤后,细胞内外离子失衡、神经递质紊乱、多种可溶性炎症细胞因子表达、氧自由基的生成均可导致小胶质细胞激活。小胶质细胞的激活被认为是 CNS 微环境变化最敏感的标志^[6]。小胶质细胞的活化对中枢神经系统来说是一把双刃剑,它既可以吞噬受损的神经元,减轻脑内炎症反应的程度,具有一定保护作用^[7];然而异常活化的小胶质细胞又可释放多种细胞毒素和炎症介质,分泌细胞因子,从而加重炎症反应的程度,并引起神经元凋亡、坏死^[8]。课题组前期的实验发现,电磁辐射后 3h 到 24h 海马神经元出现比较明显的细胞凋亡^[3],结合两者时相变化的一致性,提示电磁辐射诱导海马神经元出现凋亡等病理损伤可能与小胶质细胞的活化导致的继发损伤有关。

JAK/STAT 上游分子 JAKs 是胞浆内一类非受体酪氨酸激酶家族,主要包括 Jak1、Jak2、Jak3、Tyk2 四个成员。最近的许多研究表明, JAK/STAT 信号传导通路在中枢神经系统中也发挥着许多重要作用,一些研究者在脑内的神经元和胶质细胞中检测到 Jak1、Jak2、Jak3 不同程度的表达^[9]。并且在中枢神经损伤过程中,如脑缺血、脑外伤以及脑内炎症反应等情况下, JAKs 家族蛋白质及其下游分子 STAT 蛋白质表达以及磷酸化水平都出现明显变化,特别是在活化的胶质细胞里某些 JAKs 和 STATs 有高表达,且这种高表达与胶质细胞活化的程度表现为明显正相关^[10]。更多实验证实, JAK/STAT 信号通路参与调节了脑内小胶质细胞的活化过程和小胶质细胞活化后的功能。如神经节苷脂可激活脑内 Jak1、Jak2 进而激活 Stat1、Stat3 而使小胶质细胞活化^[11];而 IL-3 可激活脑内 Jak2、Stat5 进而诱导

小胶质细胞活化^[12]。

本研究发现电磁辐射后海马脑区 Jak 家族成员出现差别激活,结果表明 Jak1、Jak2、Jak3 在电磁辐射诱导的小胶质细胞活化中可能具有不同的作用。Jak1 在辐照后即刻开始活化,于 12h 达峰值,并持续到 24h 而 Jak2 在辐照后即刻即出现显著活化,且一直维持在较高水平,说明两者在诱导小胶质细胞活化过程中所发挥的作用并不完全一致, Jak2 可能主要参与了急性期的反应,而 Jak1 可能主要与小胶质细胞的继发性激活关系密切。而 Jak3 的变化趋势与 Jak1、Jak2 均不一样,只在 0h 3h 有显著变化,这与小胶质细胞活化时相点不完全一致。Jak3 在成年鼠脑内表达量极少,但在机体受到电离辐射等一些刺激后,表达量会很快增高^[13],这与本次实验的结果基本相符,其升高后所发挥的具体功能不明,但并不排除 Jak3 也可能参加了急性期小胶质细胞的活化过程,这有待以后的实验进一步验证。

参考文献:

- [1] JOHN A, ANDREAD, CHOU CK, Sheikh A, Johnson et al. Microwave effects on nervous system [J]. Bioelectromagnetics Supplement 2003 6: S107-S147.
- [2] ZAGHLOUL Ahmed and ANDRZEJ Wieraszko. Modulation of learning and hippocampal neuronal plasticity by repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) [J]. Bioelectromagnetics 2006 27: 288-294.
- [3] 杨学森, 龚茜芬, 张广斌, 等. 电磁辐射对大鼠学习记忆和海马神经元的影响 [J]. 解剖学研究, 2004 26(2): 124-126.
- [4] JASON S Ravings, KRISTIN M, ROSTER, et al. The JAK/STAT signaling pathway [J]. Journal of cell science, 2004 117: 1281-1283.
- [5] 杨学森, 余争平, 张广斌, 等. 电磁辐射致小鼠海马神经细胞基因表达谱差异 [J]. 中国公共卫生, 2005 2: 35-36.
- [6] KREUTZBERG G W. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS [J]. Trends Neurosci, 1996 19: 312-318.
- [7] STOLZING A, WENGNER A, GRUNET. Degradation of oxidized extracellular proteins by microglia [J]. Arch Biochem Biophys 2002 400(2): 171-179.
- [8] MN K J, DU J, JOE E. Plasminogen-induced IL-1 β and TNF- α production in microglia is regulated by reactive oxygen species [J]. Biochem Biophys Res Commun 2003 312(4): 969-974.
- [9] CLAUDIO De-Frja, LUCIANO Confi, LORENZO Magrassi et al. Members of the JAK/STAT Proteins Are Expressed and Regulated During Development in the Mammalian Forebrain [J]. Journal of Neuroscience Research 1998 54: 320-330.
- [10] RAWAN Satriomq, KELLIE K Bowen, RAGHU Venugant. JAK2 and STAT3 activation contributes to neuronal damage following transient focal cerebral ischemia [J]. Journal of Neurochemistry 2006 98: 1353-1368.
- [11] OHN Soon Kip, EUN Jung Park, EUN-hye Jo et al. JAK-STAT Signaling Mediates Gangliosides-induced Inflammatory Responses in Brain Microglial Cells [J]. The Journal of Biological Chemistry 2002 277(43): 40594-40601.
- [12] BRIGHT John J, CHANDRAMOHAN Natarajan, SUBRAMANIAM Srikan et al. Signaling Through JAK2-STAT5 Pathway Is Essential for IL-3-Induced Activation of Microglia [J]. GLIA 2004 45: 188-196.
- [13] ASHRAF S, MAHMOUD, SHELLEY Atkins et al. Early Gene Expression Profile in Mouse Brain after Exposure to Ionizing Radiation [J]. Radiation Res 2006 165: 142-154.

(收稿日期: 2007-09-03)