

# 头部 X 射线照射致认知障碍过程中小鼠海马小胶质细胞形态变化

张圆<sup>1</sup> 林祎<sup>1</sup> 吴琼<sup>3</sup> 刘政海<sup>2</sup> 李彩<sup>2</sup> 何洁<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(南华大学衡阳医学院肿瘤研究所肿瘤细胞和分子病理学湖南省重点实验室 衡阳 421001)

<sup>2</sup>(南华大学应用解剖与生殖研究所 衡阳 421001)

<sup>3</sup>(海南省热带脑科学研究与转化重点实验室 海口 571199)

**摘要** 探讨小胶质细胞在头部 X 射线照射所致认知障碍过程中的作用。18 只 ICR (Institute of Cancer Research) 小鼠随机分为对照组和头部辐照组, 头部辐照组小鼠接受 X 射线单次头部辐照至吸收剂量 10 Gy。辐照 56 d 后分别采用新旧事物识别实验和新旧位置识别实验检测小鼠认知功能; 免疫组织化学法检测小鼠海马小胶质细胞标记物 IBA-1 阳性细胞数目变化; Sholl Analysis 定量分析小胶质细胞形态变化; RT-PCR 检测海马 M1/M2 型小胶质细胞标记物 (CD16、INOS、CD68、CXCL10、Arg1、CD206) mRNA 水平表达变化。结果显示: 与对照组相比, 头部辐照组小鼠新事物时间辨别指数 ( $p < 0.01$ ) 和新位置时间辨别指数 ( $p < 0.05$ ) 均明显降低; 小鼠海马齿状回区 (Dentate gyrus, DG) IBA-1 阳性细胞数明显增加 ( $p < 0.05$ ); 小胶质细胞体变大, 突起回缩, 树突分支数与同心圆交点数目减少 ( $p < 0.05$ ); 小鼠海马 M1 型小胶质细胞标记物 CD68 表达上调 ( $p < 0.05$ ), M2 型小胶质细胞标记物 Arg1 表达下调 ( $p < 0.001$ )。头部 X 射线照射致认知障碍可能与小鼠海马小胶质细胞形态变化及小胶质细胞向 M1 型极化相关。

**关键词** 辐照, 小鼠, 海马, 认知障碍, 小胶质细胞

中图分类号 R818

DOI: 10.11889/j.1000-3436.2021.rj.39.060301

## Relationship between cognitive impairment induced by local radiation and morphological changes of hippocampal microglia

ZHANG Yuan<sup>1</sup> LIN Yi<sup>1</sup> WU Qiong<sup>3</sup> LIU Zhenghai<sup>2</sup> LI Cai<sup>2</sup> HE Jie<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(Cancer Research Institute, Key Laboratory of Cancer Cellular and Molecular Pathology of Hunan Provincial, Hengyang Medical College, University of South China, Hengyang 421001, China)

<sup>2</sup>(Clinical Anatomy & Reproductive Medicine Application Institute, School of Medicine, University of South China, Hengyang 421001, China)

<sup>3</sup>(Key Laboratory of Brain Science Research & Transformation in Tropical Environment of Hainan Province, Hainan Medical University, Haikou 571199, China)

**ABSTRACT** To investigate the role of microglia in the process of cognitive impairment caused by local ionizing

基金资助: 湖南省自然科学基金项目 (2019JJ40257、2019JJ40242、2019JJ50504) 资助

第一作者: 张圆, 女, 1997 年 3 月出生, 现为南华大学衡阳医学院病理学专业在读硕士研究生, 研究方向为神经生物学

通信作者: 李彩, 硕士, 讲师, E-mail: 375933697@qq.com; 何洁, 副教授, 硕士生导师, E-mail: hejie430@126.com

收稿日期: 初稿 2021-04-06; 修回 2021-05-18

Supported by the Natural Science Foundation of Hunan Province (2019JJ40257, 2019JJ40242, 2019JJ50504)

First author: ZHANG Yuan (female) was born in March 1997. Now she is a graduate student at the Department of Pathology of University of South China, majoring in neurobiology

Corresponding author: LI Cai, master's degree, lecturer, E-mail: 375933697@qq.com; HE Jie, associate professor, master's supervisor, E-mail: hejie430@126.com

Received 06 April 2021; accepted 18 May 2021

radiation, eighteen male mice from the institute of cancer research (ICR) were randomly divided into a control group (Control) and a head 10 Gy irradiation group (Irradiation, 10 Gy-IR). The head ionization irradiation group underwent X-ray (Siemens linear accelerator) single head irradiation illuminated to an absorbed dose of 10 Gy. Fifty-six days later, the new and old object recognition test and the new and old place recognition test were used to test the cognitive function of the mice; immunohistochemistry was used to detect the mouse hippocampal microglia marker (IBA-1) change; RT-PCR was used to detect changes at the mRNA level of hippocampal M1/M2 microglia markers (CD16, INOS, CD68, CXCL10, Arg1, CD206). The results showed that compared with the control group, the time discrimination index of new things ( $p<0.01$ ) and the time discrimination index of new positions ( $p<0.05$ ) of mice in the head ionization irradiation group were significantly reduced. The number of IBA-1 positive cells in the dentate gyrus (DG area) of the mouse hippocampus increased significantly ( $p<0.05$ ). The microglia in the hippocampal dentate gyrus of mice in the head ionization irradiation group increased in size. The protrusion retracted and the number of dendritic branches and the number of intersections of concentric circles decreased significantly ( $p<0.05$ ). The expression of M1-type microglia marker CD68 in the hippocampi of mice irradiated with the head was significantly upregulated ( $p<0.05$ ), whereas the expression of M2-type microglia marker Arg1 was significantly downregulated ( $p<0.001$ ). It is suggested that the cognitive impairment in mice caused by head X-ray irradiation may be related to the morphological changes in hippocampal microglia.

**KEYWORDS** Irradiation, Mice, Hippocampal, Cognitive impairment, Microglia  
**CLC** R818

放射疗法是治疗原发性和继发性脑肿瘤的有效方法之一<sup>[1]</sup>。然而，随着颅脑肿瘤发病率及确诊率的增加，各种放疗技术和影像检查手段的迅速发展与广泛应用，放射治疗所致并发症的发病率也呈上升趋势<sup>[2]</sup>。头部辐照后诱发的认知功能障碍是整个或部分脑部放疗的常见并发症，出现学习、记忆、空间信息处理等海马依赖性功能的缺陷，严重影响患者远期生活质量<sup>[3]</sup>。中枢神经系统损伤反应的关键参与者之一的小胶质细胞占脑实质内细胞总数的10%~15%，其影响大脑发育，维持神经元生存环境，对损伤进行应答和修复<sup>[4-5]</sup>。同时，小胶质细胞激活后释放出的炎性因子可介导神经元损伤，破坏中枢神经系统稳态，在多种神经系统疾病发生、发展过程中扮演重要角色<sup>[6]</sup>。小胶质细胞通过经典途径被激活，经历M1极化并分泌大量活性氧和有害介质，例如白介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 和一氧化氮 (NO)，可促进中枢神经系统炎症反应并加速神经元死亡。在神经炎症后期，通过替代激活途径极化为M2表型的小胶质细胞可以分泌精氨酸酶-1 (Arg-1)、白介素-10 (IL-10) 和其他抗炎因子，这将减弱由于过度炎症反应造成的突触损伤，并促进轴突的再生<sup>[7-8]</sup>。小胶质细胞的功能与其形态变化密切相关，然而在头部辐射所致认知障碍过程中，脑内小胶质细胞的形态学变化往往被忽视。

受周围环境的影响，小胶质细胞呈现多种表型。在稳定状态下，小胶质细胞是由多个分支和突起组成的分叉细胞，能覆盖很长的距离并监测大脑的功能状态；在压力或病理状况，小胶质细胞从分叉状变形为变形虫形状<sup>[9-10]</sup>。然而，以往对小胶质细胞活化后形态改变缺少定量研究。Sholl Analysis以细胞胞体为圆心，画一系列同心圆，得到随离胞体距离变化的突起交点 (Intersections) 个数，以此来反映细胞的复杂性，进而定量分析小胶质细胞形态变化的分析方法<sup>[11]</sup>。因此，进一步研究小胶质细胞在头部电离辐射所致认知障碍小鼠海马内的形态变化，有助于进一步理解小胶质细胞的功能。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

离子钙结合衔接分子1 (Ionized calcium binding adaptor molecule-1, IBA-1) 单克隆抗体 (Abcam, ab5076); 生物素化兔抗羊抗体 (CW BIO, CW0107); 兔血清 (武汉博士德, AR0010); ABC试剂盒 (Vector, PK-4000); DAB显色试剂盒 (中山金桥, ZLI-9019); 三羟甲基氨基甲烷 (北京博奥拓达科技公司); 甘氨酸 (北京博奥拓达科技公司); 逆转录试剂盒 (美国 Thermo

公司); PCR 试剂盒 (日本 TAKARA 公司); Triton X-100 (美国 Sigma 公司)。西门子 ONCOR 型直线加速器 (德国 SIEMENS 公司); BX-51 型光学显微镜 (日本 Nikon 仪器公司); YZ90000 型旷场装置 (上海永州实验设备公司); ABI7500 型荧光定量 PCR 仪 (美国 Thermo 公司)。

## 1.2 动物分组与辐照条件

将购买于湖南斯莱克景达实验动物有限公司动物 (动物合格证号: 2019-0004) 的 8 周龄雄性 ICR 小鼠 (体重 35~40 g) 随机分为对照组 (Control) 和头部辐照组 (Irradiation, IR), 每组 9 只。采用 6 mV 高能 X 射线头部局部辐照至吸收剂量 10 Gy, 构建放射性认知功能障碍模型, 剂量率 3 Gy/min。对照组在相同的辐照环境下, 不辐照。

## 1.3 新旧事物识别实验

利用小鼠对新鲜的事物表现出更强的探索欲望及好奇心的原理, 以检测小鼠区分新旧事物的能力, 从而反映小鼠认知功能。辐照后 56 d 进行新旧事物识别实验, 检测小鼠认知功能。实验分为训练阶段和测试阶段。训练阶段: 放置两个形状、质地相同的物体于旷场对称位置处, 小鼠由旷场正中放入, 进行 5 min 物体识别训练, 然后取出小鼠, 用 75% 乙醇擦拭实验装置。测试阶段: 在训练结束 1 h 后, 将旷场内的其中一个物体更换为另一质地、形状颜色完全不同的新物体, 但两物体在旷场中的位置仍然保持不变, 再次将小鼠由旷场正中放入, 让其自由探索 5 min, 并通过连接到自动跟踪系统 (上海欣软信息技术有限公司 SuperMaze) 的摄像机记录其 5 min 内对两物体的总探索时间。按公式 (1) 计算新事物识别指数, 该指标越高代表小鼠记忆能力越好。

$$\text{新事物识别指数} = \frac{\text{新物体探索时间} - \text{旧物体探索时间}}{\text{新物体探索时间} + \text{旧物体探索时间}} \times 100\% \quad (1)$$

## 1.4 新旧位置识别实验

新旧位置识别实验被广泛用于检测小鼠海马依赖性的空间记忆能力。辐照后 56 d 进行新旧位置识别实验。试验分为训练阶段和测试阶段。训练阶段: 将两个形状、质地完全相同的物体成对

角线位置放置在旷场装置中, 将小鼠由旷场正中放入, 让小鼠自由探索, 5 min 后取出小鼠, 用 75% 乙醇擦拭实验装置。测试阶段: 间隔 1 h 后更换旷场中一个物体位置, 另一个物体位置保持不变。使用连接有自动跟踪系统 (上海欣软信息技术有限公司 SuperMaze) 的摄像机记录其 5 min 内对两个位置上物体的总探索时间。按公式 (2) 计算新位置识别指数, 该指标越高代表小鼠记忆能力越好。

$$\text{新位置识别指数} = \frac{\text{新位置探索时间} - \text{旧位置探索时间}}{\text{新位置探索时间} + \text{旧位置探索时间}} \times 100\% \quad (2)$$

## 1.5 免疫组织化学染色

实验方法参照文献 [12]。10% 水合氯醛 (10 mg/kg) 腹腔注射, 依次采用生理盐水和 4% 多聚甲醛进行心脏灌注固定, 取脑置于 4% 多聚甲醛中浸泡固定 24 h。经 15% 和 30% 蔗糖溶液梯度脱水处理。进行冠状连续冷冻切片, 片厚 30  $\mu\text{m}$ 。磷酸盐缓冲液 (PBS) 漂洗 10 min  $\times$  3 次, 后续实验皆用此法进行漂洗。3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  浸泡 28 min, 漂洗; 5% 的兔血清室温封闭 2 h 后, 加入羊抗 IBA-1 多克隆抗体 (1: 1 000), 室温下孵育 2 h 后于 4  $^\circ\text{C}$  过夜; 次日复温 1 h, 漂洗; 生物素化兔抗山羊 IgG 二抗 (1: 1 000) 室温孵育 2 h, 漂洗; 加入提前配好的三抗 (AB 液, 1: 200, Vector 公司) 中孵育 2 h, 漂洗; 最后进行 DAB 染色, 贴片, 晾干, 依次经 75% 乙醇、95% 乙醇、100% 乙醇脱水、100% 二甲苯脱脂及中性树脂胶封片。光学显微镜下统计海马 DG 区 IBA-1 阳性细胞数。

## 1.6 RT-PCR

实验方法参照文献 [13]。使用 10% 水合氯醛 (10 mg/kg) 麻醉后, 分离小鼠大脑, 分离海马并冷冻在 -80  $^\circ\text{C}$ 。根据 Trizol<sup>®</sup> 试剂 (CW BIO) 说明书提取总 RNA。RNA 纯度通过  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  吸收比确定。使用 RevertAid<sup>TM</sup> First Strand cDNA 合成试剂盒 (Fermentas) 将 1  $\mu\text{g}$  总 RNA 进行 cDNA 合成。并将 cDNA 存储在 -20  $^\circ\text{C}$ 。采用 TAKARA 试剂盒进行操作, 采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法对基因的表达水平进行相对定量分析。GAPDH 基因表达用作内部对照。使用两步 PCR 方案, PCR 循环条件如下: 在 95  $^\circ\text{C}$  下 30 s 进行预变性, 然后在 95  $^\circ\text{C}$  下 10 s 和 60  $^\circ\text{C}$  下

30 s进行40个循环的PCR反应。引物设计见表1。

表1 PCR引物序列  
Table 1 Target sequences of PCR

引物Primer	上游Forward	下游Reverse
GAPDH	GGGTGTGAACCACGAGAAAT	AGAGTCTTCTGGGCGGCAGT
ARG1	CATATCTGCCAAAGACATCGTG	GACATCAAAGCTCAGGTGAATC
CD206	CCTATGAAAATTGGGCTTACGG	CTGACAAATCCAGTTGTTGAGG
CD16	TCACTGTCCAAGACCCAGCA	CACTGCAAACAGGAGGCACA
INOS	TGCCACGGACGAGACGGATAG	CTCTTCAAGCACCTCCAGGAACG
CD68	GAAATGTCACAGTTCACACCAG	GGATCTTGGACTAGTAGCAGTG
CXCL10	CAACTGCATCCATATCGATGAC	GATTCCGGATTTCAGACATCTCT

## 1.7 Sholl analysis分析

实验方法参照文献 [14]。使用奥林巴斯 (Olympus) 显微镜 (奥林巴斯, 日本) 和 zven2.6. blue 软件拍摄 40× (物镜) 照片。图像以 2 464× 2 056 像素密度拍摄。然后在 imageJ 中导入图像并处理, 自动提取背景, 然后随机裁剪每个图像, 从每个图像中提取一个具有代表性的 300 dpi 样本, 并将每个图像转换为 8-bit, 然后进行细胞骨架化处理进行 Sholl 分析, 每只小鼠分析 18~20 个细胞。

## 1.8 统计学分析

采用 Graph Pad Prism 6.0 软件进行统计学分析并绘图, 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 实验数据采用两组之间比较, 采用 *t* 检验,  $p < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 头部辐照对小鼠认知功能的影响

#### 2.1.1 新旧事物识别实验检测小鼠认知功能

按流程图 1(a) 所示, 采用剂量率为 3 Gy/min、能量为 6 MV 的 X 射线进行单次 10 Gy 头部辐照, 构建头部辐射所致认知功能障碍模型, 并在辐照后 56 d 用新旧事物识别实验和新旧位置识别实验来检测小鼠认知功能。图 1 (b) 为新旧事物识别实验中小鼠活动轨迹图。如图 1 (c) 所示, 与对照组 ( $25.770 \pm 4.347$ ) 相比, 头部辐照组 ( $3.447 \pm 3.801$ ) 小鼠新事物时间辨别指数明显降低 ( $p < 0.01$ ), 差异有统计学意义。头部辐照组小鼠对新事物的辨别指数降低, 表明头部辐照小鼠出现认知功能障碍。

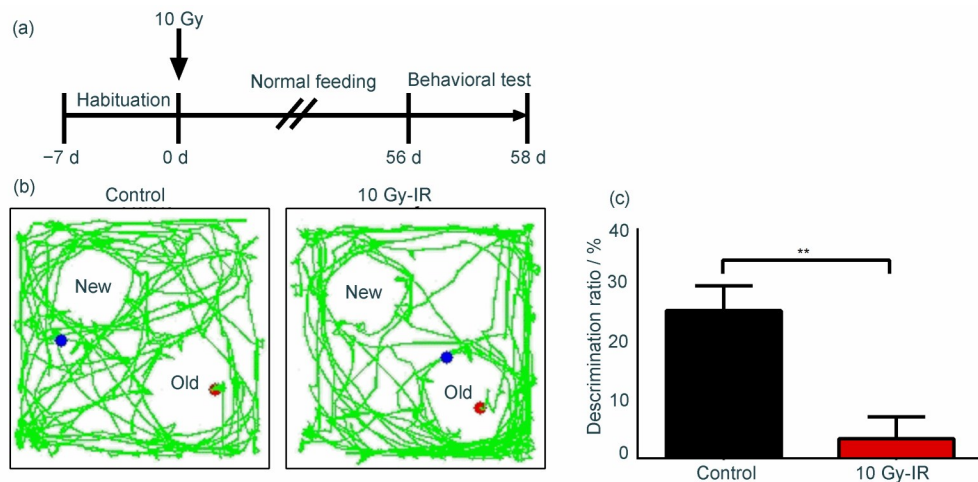


图1 头部辐照对小鼠新旧事物识别实验的影响:(a)实验流程图;(b)小鼠活动轨迹图;(c)头部辐照对小鼠新事物时间辨别指数影响;\*\* $p < 0.01$ ,与对照组相比

Fig.1 Effects of head irradiation on the novelty object recognition test in mice: (a) the experimental flowchart; (b) the movement trajectory diagram of mice; (c) the discrimination ratio in the Novelty object recognition test; \*\* $p < 0.01$  vs. control group

### 2.1.2 新旧位置识别实验检测小鼠认知功能

辐照后 56 d 进行新旧位置识别实验, 结果如图 2 所示, 与对照组 (18.500±5.970) 相比, 头部辐照组 (-6.161±5.796) 小鼠新位置时间辨别指数

明显降低 ( $p < 0.05$ ), 差异有统计学意义。头部辐照组小鼠对新位置的辨别指数降低, 表明头部辐照小鼠出现认知功能障碍。

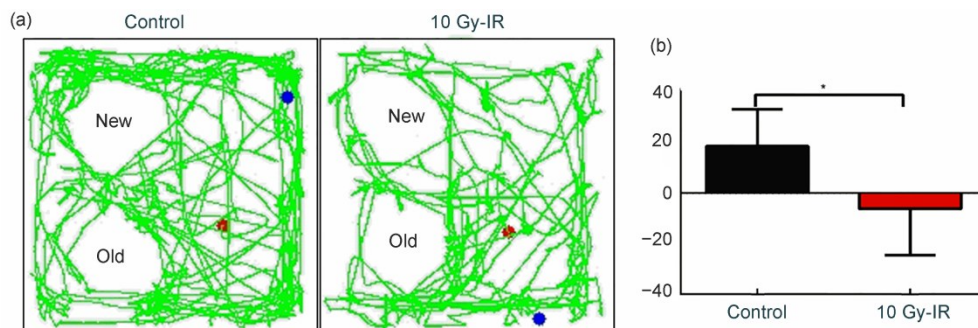


图 2 头部辐照对小鼠新旧位置识别实验的影响:(a)小鼠活动轨迹图;(b)头部辐照对小鼠新位置时间辨别指数影响; \* $p < 0.05$ , 与对照组相比

Fig.2 Effects of head irradiation on the Novelty Place Recognition test in mice: (a) the movement trajectory diagram of mice; (b) the discrimination ratio in the Novelty Place Recognition test; \* $p < 0.05$  vs. control group

### 2.2 头部辐照对小鼠海马小胶质细胞标记物 IBA-1 表达的影响

头部辐照后小鼠海马齿状回区 (DG 区) IBA-1 免疫组化结果如图 3 所示。相比于对照组

(16.270±1.428), 头部辐照组 (25.430±3.670) 海马 IBA-1 标记的阳性细胞数明显增加 ( $p < 0.05$ ), 说明头部辐照增加了小鼠海 DG 区 IBA-1 阳性细胞数目。

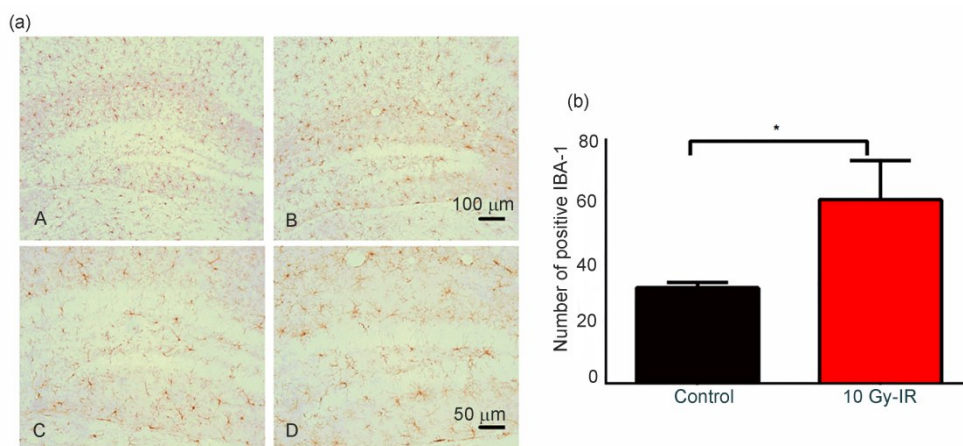


图 3 头部辐照对小鼠海马 DG 区小胶质细胞表达的影响:(a)小鼠海马 DG 区 IBA-1 免疫组化染色结果,A 和 C 为对照组,B 和 D 为头部辐照组;(b)海马 DG 区 IBA-1 阳性细胞统计学结果; \* $p < 0.05$ , 与对照组相比较

Fig.3 Effects of head irradiation on IBA-1 positive cells in the DG of hippocampus: (a) the results of IBA-1 immunohistochemistry images, A and C are control group; B and D are 10 Gy-IR group; (b) the numbers of IBA-1 positive cells in the hippocampal DG of mice statistical analysis for each group; \* $p < 0.05$  vs. control group

### 2.3 头部辐照对小鼠海马 DG 区小胶质细胞形态的影响

如图 4 (a) 所示, 根据随机取样原则, 对各组小鼠海马 DG 区小胶质细胞进行 Sholl analysis 分析, 定量分析小胶质细胞形态改变情况。两因素方差分析显示, 如图 4 (b) 所示, 与对照组 (1~

90  $\mu\text{m}$ ) 相比, 头部辐照组 (1~70  $\mu\text{m}$ ) 小鼠海马 DG 区小胶质细胞突起变短; 且在 70~80  $\mu\text{m}$ , 与对照组小鼠相比, 头部辐照组小鼠的小胶质细胞突起与同心圆上的交叉点个数减少 ( $p < 0.05$ ), 说明头部辐照后小鼠海马 DG 区小胶质细胞形态复杂性降低。

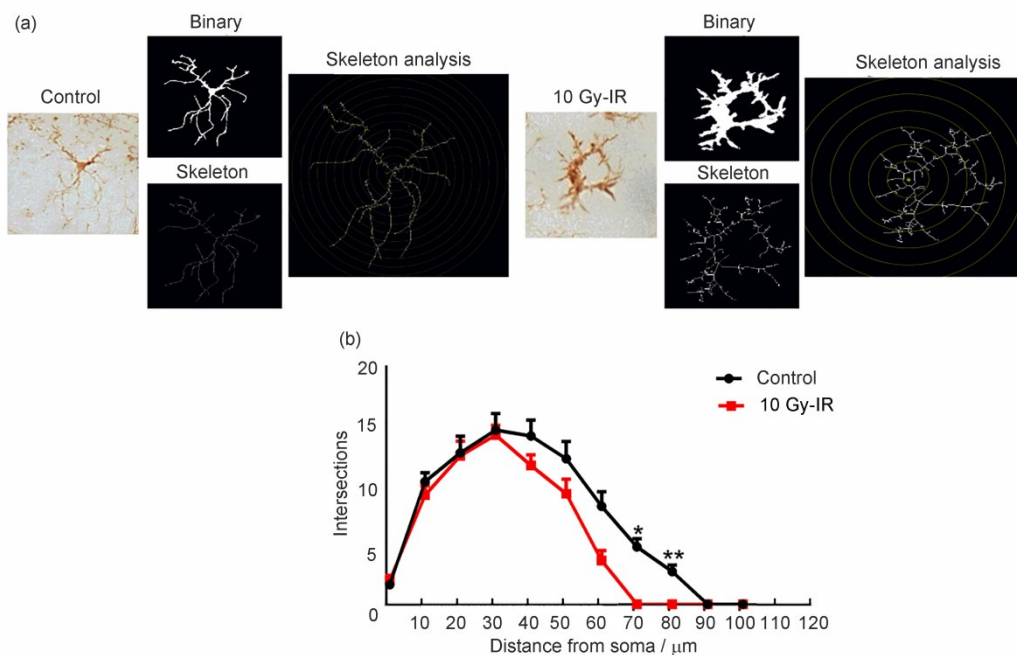


图4 头部辐照对小鼠海马DG区小胶质细胞形态变化的影响:(a)Sholl analysis分析小鼠海马DG区小胶质细胞形态示意图;(b)小胶质细胞形态分析统计结果;\* $p < 0.05$ ,与对照组相比较

Fig.4 Effects of head irradiation on morphological change of IBA-1 positive cells in the DG of hippocampus: (a) result of Sholl analysis of morphological cells in the DG of hippocampus morphology; (b) morphological analysis of microglia; \* $p < 0.05$  vs. control group

## 2.4 头部辐照对小鼠海马M1/M2型小胶质细胞标记物mRNA表达的影响

$t$  检验分析如图5所示,与对照组( $1.000 \pm 0.087$ )相比,头部辐照组( $1.539 \pm 0.191$ )小鼠海马M1型小胶质细胞标记物CD68 mRNA的表达上调( $p < 0.05$ )。与对照组( $1.000 \pm 0.131$ )相比,头部辐照组( $0.427 \pm 0.049$ )小鼠海马M2型小胶质细胞标记物ARG1 mRNA的表达下调( $p < 0.001$ )。

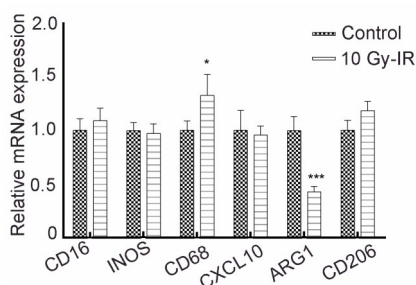


图5 头部辐照对小鼠海马M1/M2型小胶质细胞标记物mRNA表达的影响;\* $p < 0.05$ ,\*\*\* $p < 0.001$ ,与对照组相比较  
Fig.5 Effects of head irradiation on the mRNA expression of M1/M2 microglia markers in the hippocampus of mice; \* $p < 0.05$ ,\*\*\* $p < 0.001$  vs. control group

## 3 讨论

头部辐照所致认知障碍是多数接受局部或全

脑放疗癌症患者的一个不可忽视的晚期并发症,严重影响着这些患者的远期生活质量<sup>[15]</sup>,但其具体机制尚不明确。头部辐照所致认知障碍的发生发展与许多因素有关,除了与颅脑肿瘤等疾病本身进展状况相关,同时也与放射治疗的一些辐射参数(如吸收剂量大小、辐射能量、剂量率等)相关<sup>[16]</sup>。在动物实验中,有研究发现,使用单次10 Gy的X射线头部辐照后2个月,用Morris水迷宫检测小鼠认知功能,小鼠表现出明显的认知功能障碍<sup>[17]</sup>。因此,本研究采用剂量率为3 Gy/min、能量为6 MV的X射线进行单次10 Gy头部辐照,构建头部辐射所致认知功能障碍模型,并在辐照后56 d用新旧事物识别实验和新旧位置识别实验来检测小鼠认知功能。结果显示:头部辐照组小鼠对新事物或新位置的辨别指数降低,头部辐照所致认知障碍模型建立成功。

作为对电离辐射敏感的靶细胞之一,小胶质细胞在辐射所致认知障碍的发生和转归中的重要意义不可忽视<sup>[18]</sup>。相关研究显示,过氧化物酶体增殖物激活受体 $\alpha$ (PPAR- $\alpha$ )能通过负调节活化B细胞 $\kappa$ 轻链增强子的核因子(NF- $\kappa$ B)途径和激活蛋白-1(AP-1)途径来抑制辐射诱导的小胶质细胞炎症反应从而减轻辐射引起的认知损害<sup>[19]</sup>。通过

给予辐照后小鼠喂养含集落刺激因子-1受体(CSF1R)抑制剂PLX5622的食物,来减少照射后的小胶质细胞数目,能使小鼠认知功能改善<sup>[20]</sup>。本研究通过免疫组织化学法检测到头部辐照小鼠海马小胶质细胞标记物IBA-1阳性细胞数的表达增加,与文献报道一致<sup>[21]</sup>。众所周知,小胶质细胞的功能和形态变化是密不可分的,小胶质细胞能快速响应大脑生理或病理变化进而发生相应形态学改变<sup>[22]</sup>。在生理条件下,成熟的小胶质细胞呈胞体小、分枝精细且长的形态,从而使它们能够筛查脑实质中是否有入侵的病原体或损害。病理条件下,小胶质细胞从高度分支状迅速转变为阿米巴样细胞型,这使它们能迅速迁移至受损部位吞噬细胞碎片或细菌等。因此,小胶质细胞形态变化作为反应大脑功能状态正常与否的指标,引起人们广泛关注。2018年,Young等<sup>[23]</sup>发表了一篇用Sholl analysis分析小胶质细胞形态的文章,表明小胶质细胞形态(如细胞分支数目、细胞分支长度、分支点数目等)可以被量化为连续变量,为小胶质细胞形态学的研究提供定量分析手段。Wadhwa等<sup>[24]</sup>发现使用咖啡因和莫达非尼不仅能通过抑制小胶质细胞激活,改善大鼠睡眠剥夺时的神经炎症和焦虑行为,同时用Sholl analysis分析小胶质细胞形态,发现使用咖啡因/莫达非尼能改善由于睡眠剥夺所致大鼠小胶质细胞突起变短、分支数减少等形态变化。过往关于辐射所致认知障碍的相关研究中人们主要关注小胶质细胞所介导的神经炎症、神经元凋亡或神经元死亡等功能变化,相对忽视脑内小胶质细胞的形态变化,且对小胶质细胞活化后形态改变缺少定量研究。本研究通过Sholl analysis分析小鼠海马DG区小胶质细胞形态,结果表明,头部辐照小鼠海马DG区小胶质细胞突起变短;小胶质细胞突起与同心圆的交叉点个数减少,小胶质细胞形态复杂性降低。

越来越多的研究证实,在中枢神经系统中小胶质细胞激活存在异质性,可分为两种相反的类型:促炎性M1型和免疫抑制性M2型。小胶质细胞暴露于促炎细胞因子 $\gamma$ 干扰素(IFN- $\gamma$ )、TNF- $\alpha$ 和细菌或细胞碎片后会朝着促炎(M1)表型极化,表达高水平的诱导型一氧化氮(iNOS)促进一氧化氮(NO)产生,介导中枢神经系统炎症反应并加速神经元死亡。小胶质细胞通过替代途径激活后朝着抑炎(M2)表型极化,该状态诱导抗炎细胞因子IL-4、IL-10、IL-13、转化生长因子 $\beta$

(Tgfb)、Arg1的表达,在过敏反应、寄生虫清除、炎症抑制、组织重塑、血管生成和免疫调节等方面发挥着重要作用<sup>[25]</sup>。不同表型的小胶质细胞起着损伤和保护的双重作用。脊髓损伤相关研究表明,在脊髓损伤早期阶段小胶质细胞以M2型为主,而在损伤的后期主要为M1型,仅小部分是M2型。缺氧预处理条件下,间充质干细胞释放的外泌体miR-216a-5p可通过抑制Toll样受体4(TLR4)的活性,使小胶质细胞从M1向M2表型转移,从而调节TLR4/NF- $\kappa$ B/PI3K/AKT信号级联,促进脊髓损伤后小鼠的功能恢复<sup>[26]</sup>。然而,在辐射所致认知障碍过程中,小胶质细胞M1/M2表型变化尚不明确,本研究通过RT-PCR检测发现,头部辐照小鼠海马小胶质M1型标记物CD68 mRNA表达上调,M2型标记物Arg1 mRNA表达下调,结合Sholl分析结果提示,在辐射所致认知障碍过程中,活化小胶质细胞向M1型(促炎表型)极化,我们推测头部X射线照射致认知障碍可能与小鼠海马小胶质细胞形态变化及小胶质细胞向M1型极化相关。

## 4 结论

采用X射线单次头部辐照至吸收剂量10 Gy,建立头部辐射所致认知障碍模型,以模拟临床颅内肿瘤患者长期多次放射治疗所致认知障碍。与对照组相比,头部辐照组小鼠新事物时间辨别指数和新位置时间辨别指数均明显降低;海马区IBA1阳性细胞数明显增加;小胶质细胞体变大,突起回缩,树突分支数与同心圆交点数目减少,海马M1型小胶质细胞标记物CD68表达上调,M2型小胶质细胞标记物Arg1表达下调。综上,我们得出结论:头部X射线照射致认知障碍可能与小鼠海马小胶质细胞形态变化及小胶质细胞向M1型极化相关。

## 参考文献

- Chen L J, Zhang R G, Yu D D, *et al.* Shenqi fuzheng injection ameliorates radiation-induced brain injury[J]. *Current Medical Science*, 2019, **39**(6): 965-971. DOI: 10.1007/s11596-019-2129-9.
- Wang T M, Shen G P, Chen M Y, *et al.* Genome-wide association study of susceptibility loci for radiation-induced brain injury[J]. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 2019, **111**(6): 620-628. DOI: 10.1093/

- jnci/djy150.
- 3 王贞, 罗诗诗, 牛磊, 等. 电离辐射激活海马星形胶质细胞诱导小鼠认知功能障碍[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2019, **37**(1): 010301. DOI: 10.118899/j.1000-3426.2019.rj.37.010301.  
WANG Zhen, LUO Shishi, NIU Lei, *et al.* Ionizing radiation induces cognitive dysfunction by activating astrocytes in mice[J]. Journal of Radiation Research and Radiation Processing, 2019, **37**(1): 010301. DOI: 10.118899/j.1000-3426.2019.rj.37.010301.
  - 4 Kettenmann H, Hanisch U K, Noda M, *et al.* Physiology of microglia[J]. Physiological Reviews, 2011, **91**(2): 461-553. DOI: 10.1152/physrev.00011.2010.
  - 5 Hickman S, Izzy S, Sen P, *et al.* Microglia in neurodegeneration[J]. Nature Neuroscience, 2018, **21**(10): 1359-1369. DOI: 10.1038/s41593-018-0242-x.
  - 6 Madore C, Yin Z R, Leibowitz J, *et al.* Microglia, lifestyle stress, and neurodegeneration[J]. Immunity, 2020, **52**(2): 222-240. DOI: 10.1016/j.immuni.2019.12.003.
  - 7 Luo X Q, Li A, Yang X, *et al.* Paeoniflorin exerts neuroprotective effects by modulating the M1/M2 subset polarization of microglia/macrophages in the hippocampal CA1 region of vascular dementia rats via cannabinoid receptor 2[J]. Chinese Medicine, 2018, **13**(1): 1-17. DOI: 10.1186/s13020-018-0173-1.
  - 8 Liu X L, Zhang M M, Liu H N, *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes attenuate cerebral ischemia-reperfusion injury-induced neuroinflammation and pyroptosis by modulating microglia M1/M2 phenotypes[J]. Experimental Neurology, 2021, **341**: 113700. DOI: 10.1016/j.expneurol.2021.113700.
  - 9 Orihuela R, McPherson C A, Harry G J. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states[J]. British Journal of Pharmacology, 2016, **173**(4): 649-665. DOI: 10.1111/bph.13139.
  - 10 Chen T, Bosco D B, Ying Y, *et al.* The emerging role of microglia in neuromyelitis optica[J]. Frontiers in Immunology, 2021, **12**: 616301. DOI: 10.3389/fimmu.2021.616301.
  - 11 Bird A D, Cuntz H. Dissecting sholl analysis into its functional components[J]. Cell Reports, 2019, **27**(10): 3081-3096.e5. DOI: 10.1016/j.celrep.2019.04.097.
  - 12 Zhong X, Cao W, Zhao H, *et al.* MicroRNA-32-5p knockout eliminates lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice through inhibition of astrocyte overactivity[J]. Brain, Behavior, and Immunity, 2020, **84**: 10-22. DOI: 10.1016/j.bbi.2019.11.001.
  - 13 Wang Z, Zhong X L, Xu Y, *et al.* Irradiation increases brain-derived neurotrophic factor precursor signaling in the mouse hippocampus[J]. Neurobiology of Learning and Memory, 2020, **171**: 107186. DOI: 10.1016/j.nlm.2020.107186.
  - 14 Niu L, Luo S S, Xu Y, *et al.* The critical role of the hippocampal NLRP3 inflammasome in social isolation-induced cognitive impairment in male mice[J]. Neurobiology of Learning and Memory, 2020, **175**: 107301. DOI: 10.1016/j.nlm.2020.107301.
  - 15 Makale M T, McDonald C R, Hattangadi-Gluth J A, *et al.* Mechanisms of radiotherapy-associated cognitive disability in patients with brain tumours[J]. Nature Reviews Neurology, 2017, **13**(1): 52-64. DOI: 10.1038/nrneurol.2016.185.
  - 16 Greene-Schloesser D, Robbins M E. Radiation-induced cognitive impairment-from bench to bedside[J]. Neuro-Oncology, 2012, **14**(suppl\_4): iv37-iv44. DOI: 10.1093/neuonc/nos196.
  - 17 Zhang J, Li J, Zhu Y, *et al.* Forced running exercise mitigates radiation-induced cognitive deficits via regulated DNA hydroxymethylation[J]. Epigenomics, 2020, **12**(5): 385-396. DOI: 10.2217/epi-2019-0370.
  - 18 Krukowski K, Feng X, Paladini M S, *et al.* Temporary microglia-depletion after cosmic radiation modifies phagocytic activity and prevents cognitive deficits[J]. Scientific Reports, 2018, **8**(1): 7857. DOI: 10.1038/s41598-018-26039-7.
  - 19 Schnegg C I, Kooshki M, Hsu F C *et al.* PPARdelta prevents radiation-induced proinflammatory responses in microglia via transrepression of NF-kappaB and inhibition of the PKCalpha/MEK1/2/ERK1/2/AP-1 pathway[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2012, **52**(9): 1734-1743. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.02.032.
  - 20 Acharya M M, Green K N, Allen B D, *et al.* Elimination of microglia improves cognitive function following cranial irradiation[J]. Scientific Reports, 2016, **6**: 31545. DOI: 10.1038/srep31545.
  - 21 Liao H, Wang H X, Rong X M, *et al.* Mesenchymal stem cells attenuate radiation-induced brain injury by inhibiting microglia pyroptosis[J]. BioMed Research International, 2017, **2017**: 1948985. DOI: 10.1155/2017/

- 1948985.
- 22 Karperien A, Ahammer H, Jelinek H F, *et al.* Quantitating the subtleties of microglial morphology with fractal analysis[J]. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2013, **7**: 3. DOI: 10.3389/fncel.2013.00003.
- 23 Young K, Morrison H. Quantifying microglia morphology from photomicrographs of immunohistochemistry prepared tissue using imageJ[J]. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 2018(136): 57648. DOI: 10.3791/57648.
- 24 Wadhwa M, Chauhan G, Roy K, *et al.* Caffeine and modafinil ameliorate the neuroinflammation and anxious behavior in rats during sleep deprivation by inhibiting the microglia activation[J]. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2018, **12**: 49. DOI: 10.3389/fncel.2018.00049.
- 25 Peng H, Geil Nickell C R, Chen K Y, *et al.* Increased expression of M1 and M2 phenotypic markers in isolated microglia after four-day binge alcohol exposure in male rats[J]. *Alcohol*, 2017, **62**: 29-40. DOI: 10.1016/j.alcohol.2017.02.175.
- 26 Liu W, Rong Y, Wang J, *et al.* Exosome-shuttled miR-216a-5p from hypoxic preconditioned mesenchymal stem cells repair traumatic spinal cord injury by shifting microglial M1/M2 polarization[J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2020, **17**(1): 47. DOI: 10.1186/s12974-020-1726-7.