

微波诱导小胶质细胞活化后吞噬功能及 MFG-E8 表达的变化

何根林¹ 杨学森¹ 张广斌² 余争平²

¹ (第三军医大学热带医学研究所 重庆 400038)

² (第三军医大学劳动卫生学教研室电磁辐射医学防护教育部重点实验室 重庆 400038)

摘要 为探讨微波辐照致小胶质细胞活化后吞噬功能变化及其与 MFG-E8 表达的关系, 采用 60 mW/cm² 的脉冲微波辐照 N9 小胶质细胞, ELISA 技术测定 TNF- α 含量, 硝酸还原酶法测定 NO 含量, 免疫荧光检测 CD11b 和 MFG-E8, Western blot 检测 MFG-E8 蛋白表达。与正常对照组相比, 辐照后 3、12 h 小胶质细胞中 CD11b 的表达明显增加 ($p < 0.05$), TNF- α 和 NO 含量辐照后 1 h 即明显升高, 并持续至辐照后 24 h, 小胶质细胞吞噬功能在辐照后 3 h 至 6 h 增强 ($p < 0.05$), 12 h 反而低于正常对照组 ($p < 0.05$), 而 MFG-E8 蛋白表达与吞噬功能变化趋势相似。结果表明, 60 mW/cm² 的脉冲微波辐照可明显诱导小胶质细胞活化, 活化后小胶质细胞对凋亡细胞的吞噬功能出现先增强后减弱的变化, 而 MFG-E8 蛋白表达变化可能是其吞噬功能改变的主要原因之一。

关键词 微波, 小胶质细胞, 活化, 吞噬, MFG-E8

中图分类号 R594.8, R122.4

电磁辐射污染对人类健康危害不容忽视, 尤其是对中枢神经系统的影响更令人关注, 一些流行病学调查及相关研究发现, 长期较大剂量电磁辐射暴露与阿尔兹海默氏病 (Alzheimer's Disease, AD) 等神经退行性疾病的发生具有密切的相关性, 电磁辐射可能是 AD 的高危险因素之一^[1,2]。但具体作用机制仍不清楚。

小胶质细胞是中枢神经系统中的一类重要的胶质细胞, 在中枢神经系统中通过分泌和吞噬两种方式参与神经免疫调节。小胶质细胞的激活不仅是中枢神经系统 (CNS) 微环境变化最敏感的标志^[3], 且在 AD 等多种神经退行性疾病的发生过程中发挥着重要作用^[4]。有研究报道电磁辐射能够诱发中枢神经系统的多个区域发生了强烈胶质化反应^[5]。我们前期研究也发现微波可诱导小胶质细胞活化并影响其分泌功能^[6], 但有关微波辐射对小胶质细胞吞噬行为的影响还未见报道。

乳脂小球表皮生长因子 VIII (Milk fat globule epidermal growth factor 8, MFG-E8) 是一种乳汁脂肪小球表面的亲脂性糖蛋白, 广泛分布于多种组织

器官, 参与多种细胞间的相互作用。最近的研究发现, MFG-E8 是小胶质细胞吞噬清除脑内凋亡神经细胞的关键分子, 该进程的紊乱可能与神经退行性疾病有关^[7]。

本研究拟在前期研究的基础上, 观测微波辐照后小胶质细胞对凋亡细胞吞噬功能的变化以及 MFG-E8 蛋白表达的动态变化, 并结合小胶质细胞活化和促炎症反应, 进一步分析和探讨小胶质细胞在微波致中枢神经系统损伤中的作用。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

N9 小胶质细胞株由第三军医大学分子遗传教研室惠赠。Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) 培养基和胎牛血清 (GIBCO, 美国); Alexa Fluor 647 标记的 Annex-V (Biolegend, 美国); Mouse TNF- α ELISA 试剂盒 (eBioscience, 美国); NO 试剂盒 (南京建成, 中国); 大鼠抗小鼠 CD11b 单克隆抗体, 大鼠 IgG2b 同型对照抗体,

国家自然科学基金 (30970672、81172647) 资助

第一作者: 何根林, 男, 1982 年 10 月出生, 2009 年 7 月于重庆师范大学获得硕士学位, 主要从事特殊作业环境健康与危害研究

通信作者: 杨学森, Email: xuesenyi@gmail.com

收稿日期: 初稿 2011-09-14, 修回 2011-10-21

Dylight549 标记的山羊抗大鼠荧光抗体 (Serotec, 美国); 兔抗小鼠多克隆抗体 MFG-E8 (Santa Cruz, 美国); 磷脂酰丝氨酸 (PS), 小鼠来源 β -actin (Sigma, 美国); IRDye 800CW 标记的驴抗鼠荧光二抗, IRDye 680 标记的驴抗兔荧光二抗 (LI-COR, 美国)。

1.2 细胞培养及实验分组

N9 小胶质细胞按常规培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液中, 置于 5% CO_2 饱和湿度, 37℃ 培养箱内培养, 取对数生长期的细胞用于实验。培养细胞分为两组, 正常对照组 (Control 组): 与辐照组作相同处理, 但不接受微波辐照; 辐照组 (MW 组): 60 mW/cm² 的脉冲微波辐照 20 min 后取 0、1、3、6、12、24 h 时相点。

1.3 微波辐照处理

将培养有 N9 小胶质细胞的瓶/板置于反射系数近似为零的微波暗室内进行辐照, 辐射环境温、湿度由空调器、除湿机等调节保持恒定, 温度稳定于 (25±2)℃, 相对湿度稳定于 (60±10)%。将细胞瓶/板置于可透射微波的 37.5℃ 水浴专用辐射盒内, 在 H、E 场强均匀分布的平台上接受 X 波段、平均功率密度为 60 mW/cm² 的脉冲微波照射 20 min。

1.4 N9 细胞活化检测

采用流式细胞术检测小胶质细胞活化标志分子 CD11b。常规消化并离心收集正常对照组和辐照组细胞, 用无菌的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.2) 1500 r/min 离心清洗 5 min×3 次。山羊血清封闭, 4℃ 下作用 20 min。4℃ 孵育抗体各 1 h, 抗体依次为 CD11b 单克隆抗体或大鼠 IgG 2b 同型对照抗体 (1: 100), Dylight 549 标记的抗体。重悬于 250 μ L 用含 0.1% (w/v) 叠氮化钠和 1% (w/v) 牛血清白蛋白 (BSA) 的 PBS 中, 细胞密度 1×10^6 /mL。上机检测和定量分析在 BD 公司 FACSCalibur 系统完成。

1.5 N9 细胞分泌功能检测

N9 小胶质细胞接种培养于 25 cm² 的卡氏培养瓶中, 在辐照后不同时相点分别收集细胞培养上清液 200 μ L/瓶, 并分别按说明书操作检测 TNF- α 和 NO 含量。

TNF- α 检测: 包被液 100 μ L/孔密闭包被 96 孔板, 4℃ 孵育过夜。缓冲液清洗 5 次, 测定稀释剂室温阻断 1 h。取细胞培养液样品 100 μ L/孔加入 96 孔

板, 4℃ 孵育过夜。接着, 室温孵育 100 μ L/孔检测抗体 1 h, 辣根过氧化物酶标记的抗生物素蛋白 30 min, 四甲基联苯胺底物溶液 15 min, 最后加入 2 N H_2SO_4 中止液 50 μ L。酶标仪 450 nm 下测定每孔吸光度 (OD 值)。

NO 检测: 取培养液样品和标准液 100 μ L/孔分别加入 96 孔板, 再分别加入 50 μ L 还原型辅酶 I 和硝酸盐还原酶。30 min 后分别加入 100 μ L Greiss 试剂 I 和 II, 室温孵育 10 min。酶标仪 540 nm 下测定每孔 OD 值。

1.6 荧光吞噬颗粒制备与 N9 细胞吞噬功能检测

按每 300 μ L 无血清培养基, 加入 3 μ L 磷脂酰丝氨酸 (PS) 和 1 μ L Alexa Fluor 647 标记的 Annex-V, 置 EP 管中混匀, 室温避光反应 30 min。冰浴超声 5 次, 每次 10 s。500 r/min 离心, 取上清; 1000 r/min 离心, 取沉淀重悬, 重复离心 3 次。收集沉淀重悬于 300 μ L 无血清培养基, 即得到自制荧光吞噬颗粒液。

将 N9 细胞以 5×10^5 /mL 密度种植在 6 孔培养板内, 待细胞生长至 80% 融合状态时, 按 1.3 中的方法进行辐照处理。于相应时相点操作前 1 h, 分别向正常对照组和辐照组加入自制荧光吞噬颗粒液 300 μ L, 辐照后 3、6、12 h 时相点清洗, 收集细胞, 全波段荧光酶标仪 640 nm 下测定每孔 OD 值。

1.7 免疫荧光检测 N9 细胞 CD11b 和 MFG-E8 的表达

分别于辐照后 3、6、12 h 时相点小心取出长满小胶质细胞的盖玻片, 置于 Chamber 上, PBS 冲洗, 4% 多聚甲醛固定, 1% Triton X-100 通透液作用 15 min, 山羊血清封闭工作液室温封闭 30 min, 37℃ 孵育抗体各 1 h。抗体依次为 CD11b 单克隆抗体 (1: 100), 多克隆抗体 MFG-E8 (1: 100), Dylight 549 标记的抗体 (1: 200) 和 FITC 标记的抗体 (1: 200)。抗荧光淬灭的封片剂封片, 激光共聚焦显微镜下观察拍照。

1.8 MFG-E8 蛋白表达水平检测

采用蛋白质免疫印迹法, 于微波辐照后相应时相点提取细胞总蛋白, Lowry 法测蛋白质含量。制备 10% 分离胶和 5% 的浓缩胶, 以 100 μ g 总蛋白上样进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (100 V, 150 min), 将凝胶中的蛋白电转印至硝酸纤维素 (NC) 膜上, 在含 5% 脱脂奶粉的 Tris 盐缓冲液 (TBS) 中封闭 2 h, 然后再将膜置于兔抗小鼠多克隆抗体 MFG-E8

(1:1000) 中 4℃ 过夜, 取出以 TTBS 洗 4 次, 每次 10 min。IRDye 680 标记的驴抗兔荧光二抗 (1 : 5000) 室温 1 h。IRDye 800CW 标记的驴抗鼠荧光二抗, TTBS 洗 4 次, 每次 10 min, β -actin 作为免疫对照, 检测方法与 MFG-E8 检测方法相一致。信号检测在 Odyssey 红外荧光扫描成像系统上完成, 显色条带在 Image J 1.42 分析软件上进行灰度值的测定和分析。

1.9 统计分析

数据采用 SPSS 13.0 软件进行方差分析和 t 检验, 实验结果用“均数 $\pm$ 标准差”($\bar{x} \pm s$) 表示。

2 结果

2.1 微波辐照致 N9 细胞活化情况

小胶质细胞活化后表达多种蛋白和表面标记分子, CD11b 是其中具有代表性的一种^[8], 它的表达量的增加能直接反应小胶质细胞活化程度^[9]。由图 1 可以看出, 正常对照组也有少量阳性标记小胶质细胞, 显示出基准的荧光强度。辐照后 3 h 阳性表达的小胶质细胞出现增加 ($p < 0.05$); 12 h 明显高于正常对照组 ($p < 0.01$)。

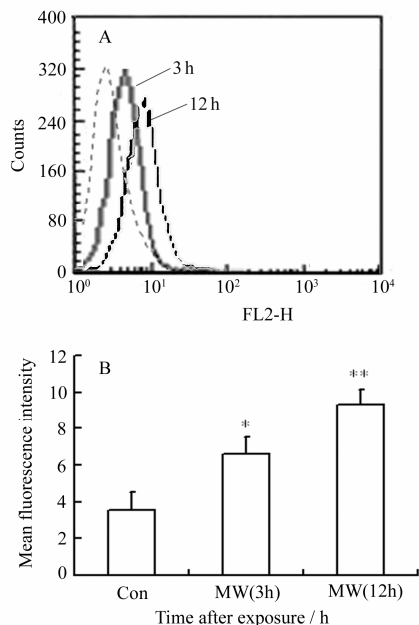


Fig.1 The effect of microwave exposure on CD11b expression in N9 cells confirmed by flow cytometry analysis. (A) Representative histograms for CD11b expression after exposure. The dashed lines represent the control group. (B) Mean fluorescence intensity of CD11b shows averaged values from three independent experiments as normalized to the control. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs. control

2.2 微波辐照后 N9 细胞促炎症细胞因子的分泌

微波辐照能诱导小胶质细胞活化并分泌促炎症细胞因子。由图 2 可见, 与正常对照组比较, TNF- α 含量在辐照后 1 h 即明显升高 ($p < 0.05$), 3 h 时达高峰, 随后逐渐恢复, 6 h 后又不断增加, 于 12 h 达到第二峰值, 且 24 h 时依然高于对照水平, 差异均有统计学意义。NO 含量在辐照后 1 h 开始升高 ($p < 0.05$), 此后持续升高, 于辐照后 6 h 达到峰值, 随后呈现平稳的低幅下调趋势, 24 h 时仍然处于高分泌水平, 差异均有明显的统计学意义 ($p < 0.01$)。

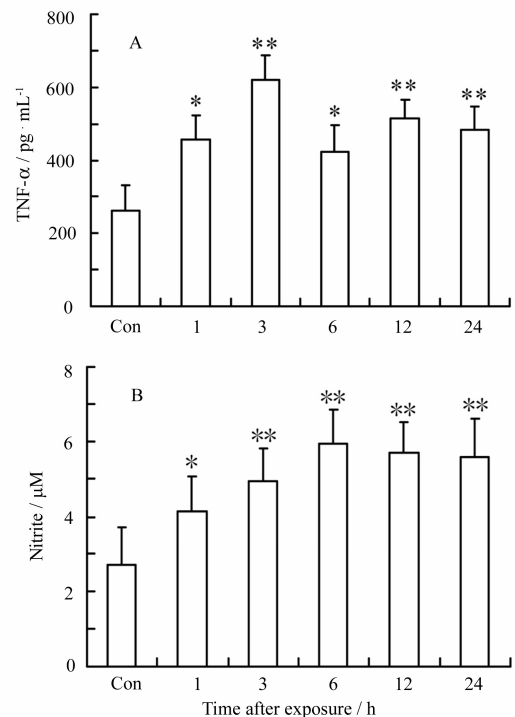


Fig.2 The concentration of TNF- α (A) and the amount of nitrite (B) was determined. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs. control

2.3 微波辐照对小胶质细胞吞噬功能的影响

为进一步探明微波辐照诱导小胶质细胞促炎症反应过程中吞噬功能的变化, 我们进行了微波辐照后 N9 细胞吞噬荧光颗粒的试验。激光共聚焦显微镜下观察发现, 与正常对照组比较, 辐照组于辐照后 3 h 细胞吞噬的荧光信号明显增强 ($p < 0.05$), 6 h 达到峰值 ($p < 0.01$), 12 h 明显下降 ($p < 0.05$), 均具有统计学意义 (图 3)。

2.4 微波辐照后 N9 细胞 CD11b 和 MFG-E8 的共定位观察

采用激光共聚焦观察发现, 正常对照组细胞中,

CD11b 和 MFG-E8 弱表达。微波辐照后 3 h 阳性表达的小胶质细胞明显增加, 并且在 6 h 达到峰值, 12 h 后有所恢复, 辐照后 CD11b 的荧光强度变化情况与前期实验得出结果一致。吞噬信号分子

MFG-E8 的分布和表达呈现出随着细胞活化程度的改变而变化的趋势。MFG-E8 的荧光强度在辐照后 3 h 出现增强, 6 h 达到峰值, 12 h 低水平表达 (图 4), 表现出与吞噬功能变化趋势的高度一致性。

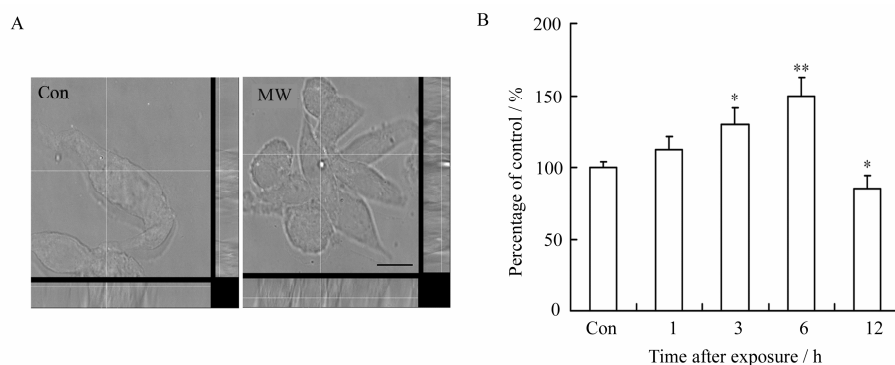


Fig.3 Stimulation of phagocytosis by microwave irradiation in N9 cells: (A) Immunofluorescence labeling of phagocytic bioparticles in N9 cells; (B) Phagocytosis assays is shown relative to that with control group, which was taken as 100. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs. control. Scale bar 10 μm

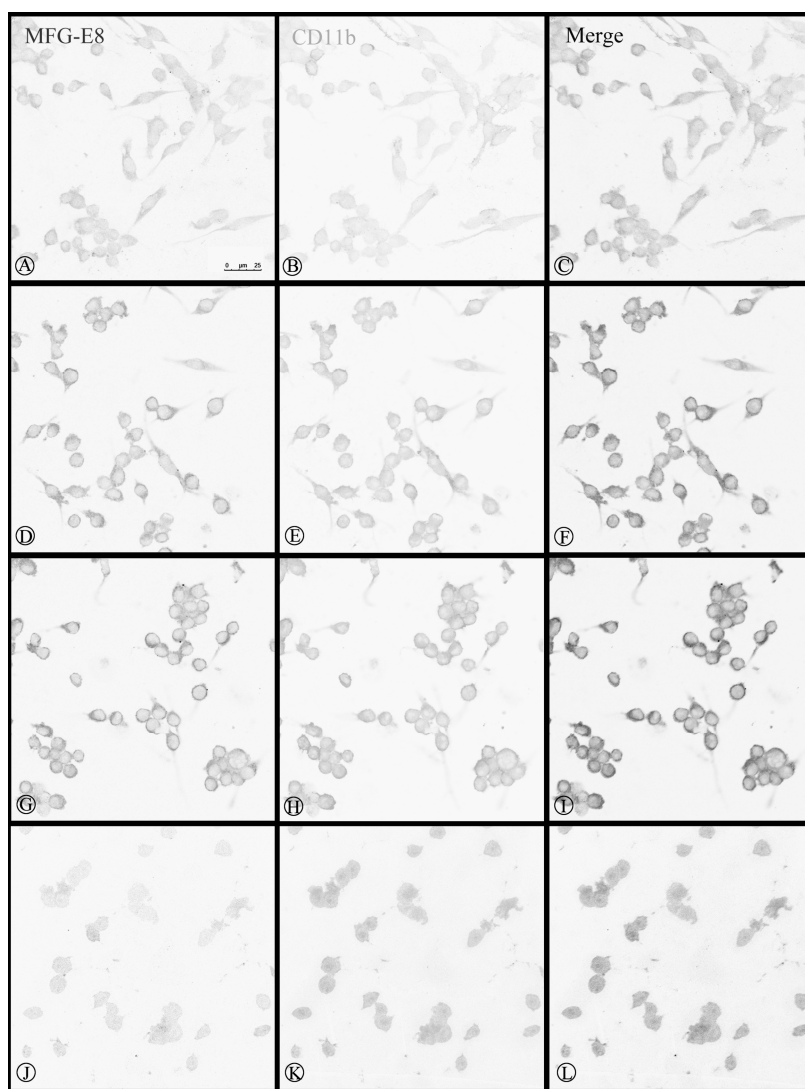


Fig.4 Localization of MFG-E8 (A, D, G, J) and CD11b (B, E, H, K) immunoreactivity in activated N9 cells. (A-C) Untreated cultures were used as a control. (D-F) 3 h after exposure. (G-I) 6 h after exposure. (J-L) 12 h after exposure. Scale bar 25 μm

2.5 微波辐照后 N9 细胞 MFG-E8 蛋白表达

以 β -actin 为内参, 计算 MFG-E8 蛋白荧光灰度值与正常对照组的比值, 得出相应组别每个时相点 MFG-E8 蛋白表达相对强度, 并进行统计学分析。结果提示, 微波辐照能够上调 N9 细胞 MFG-E8 蛋白表达水平, 而正常对照组 MFG-E8 蛋白表达水平较低 (图 5)。辐照后 1 h MFG-E8 蛋白表达开始增加, 并于辐照后 3 h 达到峰值, 且至辐照后 6 h 一直维持在较高的水平 ($p < 0.05$)。随后, MFG-E8 蛋白表达下降, 至辐照后 12 h 已低于正常对照组的表达水平。

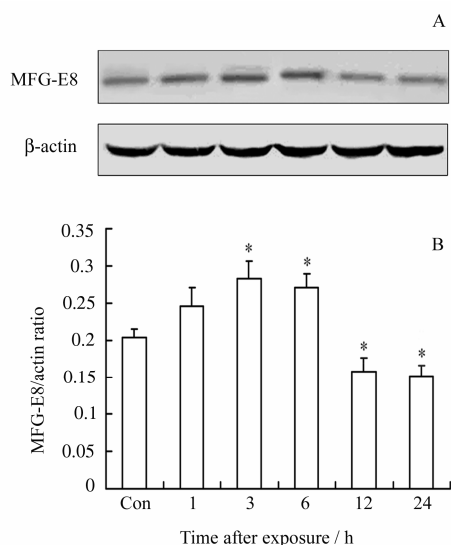


Fig.5 Changes in the pattern of MFG-E8 expression in N9 cells after microwave exposure: (A) Western blot analysis showing MFG-E8 expression; (B) The amount of MFG-E8/actin ratio was determined by densitometric analysis. * $p < 0.05$ vs control

3 讨论

微波辐射对中枢神经系统的潜在影响越来越引起广泛的关注。大量的研究提示微波辐射能够引起一系列的中枢神经系统结构和功能的改变, 包括脑组织水肿、神经元凋亡、学习记忆等神经行为功能障碍^[10-12]。前期研究发现, 微波致中枢神经损伤不仅仅局限于神经元, 该进程还涉及了小胶质细胞的活化^[6]。活化的小胶质细胞通过分泌和吞噬两种方式参与中枢神经的免疫调节, 而目前在微波神经损伤领域, 对其吞噬功能变化研究鲜有报道。本实验采用平均功率密度为 60 mW/cm^2 脉冲微波辐照离体培养的 N9 小胶质细胞, 结果发现微波辐照后 MFG-E8 蛋白表达开始增加, 并持续 6 h 高水平表达, 随后反而低于正常水平, 吞噬功能表现出先增

强后减退的趋势, 提示除促炎反应外, 吞噬功能减退也是小胶质细胞过度活化产生损伤作用的另一重要原因。

小胶质细胞活化后表现为细胞形态的变化, 特异性标志物的改变以及诱导分泌多种细胞因子, 如 $\text{TNF-}\alpha$ 、 IL-6 、 $\text{IL-1}\beta$ 以及活性氧中间产物如 NO 及超氧化物等, 造成炎症损伤和神经元凋亡。研究表明, $\text{TNF-}\alpha$ 可促进小胶质细胞的细胞溶解作用及其它促炎性细胞因子、抗炎性细胞因子的产生, 从而形成一个正反馈环路, 加重炎症反应^[13]; 病理条件下, 胶质细胞诱导的内源性 NO 在中枢神经系统中过量释放, 可明显诱导细胞凋亡, 表现出很强的神经毒性作用^[14]。因此, $\text{TNF-}\alpha$ 和 NO 被认为是活化的小胶质细胞激活促炎症反应的标志^[15]。本实验发现, 微波辐照后 3 h N9 小胶质细胞被明显激活, 并持续活化到 12 h 且活化状态趋强。检测小胶质细胞培养的上清液发现, 辐照后 $\text{TNF-}\alpha$ 含量迅速增加, 3 h 时达高峰, 随后有所恢复, 6 h 后又不断增加, 而后一直维持在较高水平; NO 释放持续增加, 6 h 时达高峰, 随后一直处于高水平。结果提示, 微波辐照可诱导激活小胶质细胞, 随着其活化进程的加剧, 促炎因子不断被释放和累积, 进而促发中枢神经炎症损伤。

中枢神经系统中活化的小胶质细胞能通过迁移、变形对炎性细胞、凋亡细胞进行吞噬, 这样既可以抑制释放炎症前因子, 还可以减少凋亡细胞释放更多的自身免疫性抗原物质, 避免炎症反应等继发性损害^[16]。生理程度的炎症环境下, 细胞吞噬功能得以强化, 而持续活化的小胶质细胞吞噬能力反而降低^[17]。研究表明, 小胶质细胞对凋亡细胞的吞噬主要通过特异性识别凋亡细胞外翻的磷脂酰丝氨酸 (PS)^[18], 因此本研究通过小胶质细胞对 PS 荧光颗粒的吞噬反应小胶质细胞对凋亡细胞的吞噬能力。本实验研究发现, 微波辐照后 3 h 细胞吞噬的荧光信号明显增强, 6 h 达到峰值, 12 h 明显下降。联系辐照后细胞活化后分泌情况发现, 微波辐照后初期小胶质细胞逐步释放 $\text{TNF-}\alpha$ 和 NO, 且均维持在较低水平, 可能是有利于形成良好的神经保护的炎症微环境, 细胞吞噬功能得以强化; 而后期的持续活化维持了 $\text{TNF-}\alpha$ 和 NO 高水平, 炎症加重, 吞噬功能下降, 其原因可能部分归咎于离体培养的小胶质细胞缺乏 CNS 免疫抑制^[19]。

活化的小胶质细胞对凋亡细胞的吞噬能力依赖于一种或多种吞噬信号分子的表达, 如 MFG-E8、髓细胞触发受体 2 (triggering receptor expressed on myeloid cells-2, TREM-2)^[20]和生长停止特异基因 6

(Growth-arrest specific gene 6, Gas 6)^[21]等。其中, MFG-E8 被认为是一种识别凋亡细胞吞噬信号的重要桥联受体^[18]。小胶质细胞产生和分泌 MFG-E8 通过 COOH-末端因子 VIII 同源区域特异性识别并结合到凋亡细胞表面的 PS 信号后, MFG-E8 分子又通过 NH2-末端 EGF 样区域结合到小胶质细胞 $\alpha\beta 3$ 整合素上, 使小胶质细胞和凋亡细胞间形成连接, 从而介导小胶质细胞对凋亡细胞吞噬。研究发现, 内源性 MFG-E8 产生不足的小鼠会出现细胞吞噬功能障碍和促炎症反应^[22]。本实验研究发现, 微波辐照后前期能够上调 N9 细胞 MFG-E8 蛋白表达水平, 在辐照后 3 h 达到峰值, 6 h 后表达量不断下降, 12h 反而低于对照组水平。微波辐照后小胶质细胞 MFG-E8 蛋白表达模式与吞噬功能变化极为相似, 初期小胶质细胞活化, 不断表达 MFG-E8, 刺激了小胶质细胞发挥 CNS 免疫功能; 后期的持续活化造就了过度的炎症环境, MFG-E8 蛋白表达反而下降, 发生吞噬功能的减退。结果提示, 微波辐照对 MFG-E8 表达的影响介导了小胶质细胞吞噬凋亡细胞能力的改变。

将小胶质细胞活化水平变化规律与分泌功能、吞噬功能的变化趋势结合分析, 发现活化水平变化与分泌功能变化趋势基本一致, 而吞噬功能变化呈现先增强后减退的趋势。究其原因可能是微波辐照致小胶质细胞活化后初期, 促炎症因子分泌量低, 细胞吞噬能力增强, 主要发挥着凋亡细胞清除和损伤细胞修复的神经保护作用。反之, 后期的持续活化, 促炎症因子含量维持较高水平, MFG-E8 表达下降, 细胞吞噬能力衰退, 产生继发性损伤效应。由此推测, 微波辐照致小胶质细胞活化后吞噬功能其及相关蛋白 MFG-E8 表达的变化依赖于炎症微环境的改变, 而长期存在的微波刺激下, 小胶质细胞吞噬功能减退与促炎症反应加重可构成循环, 形成了神经退行性疾病的炎症微环境, 从而导致疾病或损伤进程的加重。因此, 后续研究还应对小胶质细胞分泌功能和吞噬功能的关系进行深入研究, 以期揭示微波辐照致中枢神经损伤修复的分子机制, 为其预防及治疗提供理论基础。

参考文献:

- 1 Qiu C, Fratiglioni L, Karp A, *et al.* Occupational exposure to electromagnetic fields and risk of Alzheimer's disease [J]. *Epidemiol*, 2004, **15**(6): 687-694
- 2 Ana M G, Antonio S, Santiago P H. Occupational exposure to extremely low frequency electric and magnetic fields and Alzheimer disease: a meta-analysis [J]. *Int J Epidemiol*, 2008, **37**(2): 329-340
- 3 Kreutzberg G W. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS [J]. *Trends Neurosci*, 1996, **19**(8): 312-318
- 4 Block M L, Zecca L, Hong J S. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms [J]. *Nat Rev Neurosci* 2007, **8**(1): 57-69
- 5 Mausset-Bonnefont A L, Hirbec H, Bonnefont X, *et al.* Acute exposure to GSM 900-MHz electromagnetic fields induces glial reactivity and biochemical modifications in the rat brain [J]. *Neurobiol dis*, 2004, **17**: 445-454
- 6 杨学森, 郝玉通, 何根林, 等. 微波诱导小胶质细胞的促炎症反应 [J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2010, **28**(6): 401-404
YANG Xuesen, HAO Yutong, HE Genlin, *et al.* Relationship between activation of microglia and Jaks phosphorylation induced by microwave irradiation [J]. *Chin J Ind Hyg Occup Dis*, 2010, **28**(6): 401-404
- 7 Fuller A D, Van Eldik L J. MFG-E8 regulates microglial phagocytosis of apoptotic neurons [J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2008, **3**(4): 246-256
- 8 Ling E A, Wong W C. The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts [J]. *Glia*, 1993, **7**: 9-18
- 9 Roy A, Fung YK, Liu XJ, *et al.* Up-regulation of microglial CD11b expression by nitric oxide[J]. *J Biol Chem*, 2006, **281**: 14971-14980
- 10 范凌云, 吕星, 张成岗. 微波致中枢神经系统损伤研究进展 [J]. *中华航空航天医学杂志*, 2004, **15**(1): 59-61
FAN Lingyun, LÜ Xing, ZHANG Chenggang. Progress of studies on central nervous system injury induced by microwave irradiation [J]. *Chin J Aerospace Med*, 2004, **15**(1): 59-61
- 11 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): 91-94
YANG Xuesen, GONG Qianfen, ZHANG Guangbin, *et al.* Influence of electromagnetic irradiation on learning and memory ability and pathological changes of hippocampus neuron in rats [J]. *Anat Res*, 2004, **26**(2): 91-94
- 12 陈纯海, 屈占东, 杨学森, 等. 妊娠期和哺乳期连续微波辐射对小鼠学习记忆功能的影响与甲状腺激素作用研究 [J]. *辐射研究与辐射工艺学报*, 2009, **27**(3): 161-166
CHEN Chunhai, QU Zhandong, YANG Xuesen, *et al.* The influence of microwave irradiation during lactation and

- gestation on the role of thyroid hormone in dysfunction of learning and memory with mice [J]. *J Radiat Res Radiat Process*, 2009, **27**(3): 161-166
- 13 Bezzi P, Domercq M, Brambilla L, *et al.* CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNF α : amplification by microglia triggers neurotoxicity [J]. *Nat Neurosci*, 2001, **4**: 702-710
 - 14 Vincent V A M, Tilders F J H, Van Dam A-M. Production, regulation and role of nitric oxide in glial cells [J]. *Mediat Inflamm*, 1998, **7**: 239-255
 - 15 Mir M, Tolosa L, Asensio V J, *et al.* Complementary roles of tumor necrosis factor alpha and interferon gamma in inducible microglial nitric oxide generation [J]. *J Neuroimmunol*, 2008, **204**(1-2): 101-109
 - 16 Massimo R, Carlo P, Marisa A, *et al.* Glia activation and cytokine increase in rat hippocampus by kainic acid-induced status epilepticus during postnatal development [J]. *Neurobiol Dis*, 2003, **14**(3): 494-503
 - 17 Napoli I, Neumann H. Microglial clearance functions in health and disease [J]. *Neuroscience*, 2009, **158**(3): 1030-1038
 - 18 Hanayama R, Tanaka M, Miwa K, *et al.* Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes [J]. *Nature*, 2002, **417**: 182-187
 - 19 Neumann H. Control of glial immune function by neurons [J]. *Glia*, 2001, **36**(2): 191-199
 - 20 Takahashi K, Rochford C D P, Neumann H. Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2 [J]. *J Exp Med*, 2005, **201**: 647-657
 - 21 Hall M O, Obin M S, Heeb M J, *et al.* Both protein S and Gas6 stimulate outer segment phagocytosis by cultured rat retinal pigment epithelial cells [J]. *Exp Eye Res*, 2005, **81**: 581-591
 - 22 Hanayama R, Tanaka M, Miyasaka K, *et al.* Autoimmune disease and impaired uptake of apoptotic cells in MFG-E8-deficient mice [J]. *Science*, 2004, **304**(5): 1123-1124

Dynamic changes of phagocytic function and MFG-E8 expression in microwave-activated N9 microglial cells

HE Genlin¹ YANG Xuesen¹ ZHANG Guangbin² YU Zhengping²

¹ (Institute of Tropical Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

² (The Department of Occupational Hygiene, Key Laboratory of Electromagnetic Radiation Protection, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

ABSTRACT In order to investigate the effects of microwave on the dynamic changes of phagocytic function and Milk Fat Globule Factor-E8 (MFG-E8) expression in microglia, N9 microglial cells were irradiated with a 20-min exposure to 60 mW/cm² pulsed microwave or a sham treatment. TNF- α and NO were measured using enzymelinked immunosorbent assay (ELISA) and the nitrate reductase method, respectively. Microglial marker CD11b and the bridging molecule, MFG-E8 was assessed via immunoreaction. Expression of MFG-E8 protein was evaluated by western blotting. CD11b positive N9 cells were significantly increased at 3 h and 12 h ($p < 0.05$). The secretion of TNF- α and NO were significantly increased at 1 h after microwave exposure ($p < 0.05$), then maintained at a high level for 24 h. Phagocytic function was enhanced at 3 h and 6 h after microwave exposure ($p < 0.05$), then decreased, even lower than the sham group at 12 h ($p < 0.05$). The expression pattern of MFG-E8 was similar with the phagocytic function. These results indicate that microwave can obviously activate microglia, the ability of the phagocytosis of apoptotic cells is increased first, and then decreased in the over-activated microglia. MFG-E8 expression pattern may be responsible for the radiation-induced change of microglial phagocytosis.

KEYWORDS Microwave, Microglia, Activation, Phagocytosis, MFG-E8

CLC R594.8, R122.4