

硫酸镁对大鼠神经干细胞辐射所致凋亡的影响

刘萍¹ 涂彧²

¹ (江苏扬州苏北人民医院 扬州 225001)

² (苏州大学放射医学与防护学院 苏州 215123)

摘要 探讨硫酸镁对大鼠神经干细胞辐射损伤的保护作用。取新生大鼠神经干细胞进行培养,用免疫荧光法进行神经干细胞的鉴定后用含有不同浓度硫酸镁的培养基培养神经干细胞,选择出硫酸镁的合适浓度为0.00125 g/mL。将神经干细胞分为空白对照组、实验对照组(照射)和实验组(照射+硫酸镁)。分别用2和4 Gy ⁶⁰Co γ 射线对实验对照组和实验组进行照射,分别于照射后24、48和72 h用流式细胞仪对各组神经干细胞凋亡率进行检测,同时采用透射电镜对神经干细胞凋亡形态进行观察。与空白对照组比较,实验对照组各时间点神经干细胞的凋亡率明显升高, ($t_{(2\text{ Gy}, 72\text{ h})}=30.60$, $t_{(4\text{ Gy}, 72\text{ h})}=31.85$, $p<0.05$), 细胞呈现出明显的凋亡形态,并可见凋亡小体。与实验对照组比较,实验组各时间点神经干细胞的凋亡率明显降低, ($t_{(2\text{ Gy}, 72\text{ h})}=9.08$, $t_{(4\text{ Gy}, 72\text{ h})}=10.12$, $p<0.05$), 且细胞形态损伤明显减轻。硫酸镁能降低电离辐射对神经干细胞的凋亡率,减轻电离辐射所致神经干细胞核损伤的形态。

关键词 神经干细胞, 电离辐射, 硫酸镁

中图分类号 R811.5, R329.2, R811.74

细胞凋亡是机体为保持自身组织稳定、调控自身细胞的增殖和死亡之间的平衡、由基因控制的细胞主动性死亡过程。电离辐射可使自由基产额增加,导致DNA损伤、重要功能基团破坏、蛋白质和膜的脂质结构和功能变化,从而导致细胞凋亡^[1]。镁离子含量的下降是导致中枢神经系统继发性损伤的因素之一,且其下降的幅度与组织损伤的程度成正比,伤前或伤后补充镁离子可减轻中枢神经系统继发性损伤,显著改善创伤后的神经功能^[2,3]。现代放射生物学观点认为,辐射引起的脑损伤并非特异性的,其发生机制与组织学改变类似外伤、缺氧等引起的中枢神经系统损伤^[4]。本实验通过对不同实验组神经干细胞凋亡率及凋亡形态的研究,进一步证实硫酸镁对神经干细胞电离辐射损伤的保护作用。

1 实验材料和方法

1.1 主要试剂

DMEM/F12 培养基、B27、表皮生长因子(EGF)、成纤维细胞生长因子(bFGF)均购于美国 invitrogen 公司;小鼠抗大鼠巢蛋白(nestin)单克隆抗体(美国 Chemicon 公司);TRITC、FITC 标

记的二抗(美国 Chemicon 公司);胶质纤维酸性蛋白(GFAP)抗体、神经元烯醇化酶(NSE)抗体、DAPI 为(美国 R & D 进口分装)。

1.2 实验动物及分组

SD 新生大鼠,由苏州大学实验动物中心提供,将培养的神经干细胞分为空白对照组、实验对照组(单纯照射组)、实验组(照射+硫酸镁)。使用本实验室 GWXJ80/⁶⁰Co 型治疗机对神经干细胞进行照射,剂量率为0.08 Gy/min。

1.3 神经干细胞原代培养

取新生24 h内的SD大鼠,利用神经干细胞原代培养的方法,通过消毒、断头取脑、切碎吹打、离心等步骤,再加入无血清培养基(DMEM/F12、2%B27、EGF20 ng/mL、bFGF20 ng/mL),轻轻吹打混匀细胞,经200目筛网过滤制成单细胞悬液,以 $10^5/\text{mL}$ 接种于培养瓶中,置37℃、5%CO₂培养箱中培养。

1.4 神经干细胞的鉴定

取第2代培养5 d的神经干细胞,接种于放有

国家自然科学基金(30670638)、江苏高校优势学科建设工程资助项目、江苏省放射医学与防护重点实验室

第一作者:刘萍,女,1984年3月出生,2010年在苏州大学放射医学与防护学院获硕士学位,放射医学专业

通信作者:涂彧, Email: tuyu@suda.edu.cn

收稿日期:初稿 2012-04-06, 修回 2012-05-16

经0.1%多聚赖氨酸包被过夜的盖玻片的24孔板中,培养24 h,吸去培养基,用免疫荧光的方法进行神经干细胞的鉴定。

1.5 CCK-8 检测神经干细胞的增殖

神经干细胞经原代培养后,继续培养换液,7 d后传代吹散为单个神经干细胞,神经干细胞分组处理后,将神经干细胞种植入96孔板中,继续培养,种板后24、48和72 h,分别将各组培养基吸弃,每孔加入100 μ L的CCK-8与D-hank's液的混合液(1:9),在37℃培养箱中继续培养4 h后,在酶标仪上检测各组的吸光度。

1.6 流式细胞仪检测神经干细胞凋亡率

神经干细胞原代培养,经传代后分组处理,分别在24、48和72 h收集细胞,1 000 r/min离心5 min, PBS洗涤细胞两次,再次1 000 r/min离心5 min,收集 $1\times 10^5-5\times 10^5$ 细胞,加入500 μ L的Annexin V Binding Buffer悬浮细胞,再加入5 μ L Annexin V-FITC混匀后,加入5 μ L Propidium Iodide,混匀;避光、室温反应10 min后,用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.7 透射电镜观察神经干细胞凋亡形态的改变

将神经干细胞分组处理后,迅速放入预冷的2.5%戊二醛固定液中,4℃保存于2.5%戊二醛固定

液中,备作透射电镜。样品通过锇酸固定、丙酮脱水、包埋剂包埋、固化、切片、枸橼酸铅染色染色、透射电子显微镜观察,拍照等步骤观察神经干细胞凋亡形态。

1.8 统计学处理

采用SAS 8.0统计软件包进行 t 检验分析,实验数据均以 $(\bar{x}\pm s)$ 表示, $p<0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 不同浓度硫酸镁对神经干细胞增殖的影响

神经干细胞原代培养传代后,相同密度的神经干细胞,用不同浓度的硫酸镁进行神经干细胞的培养,培养过程中,在倒置显微镜下观看,相同时间内加入不同浓度的硫酸镁培养基培养的神经干细胞,其形成的克隆球密度明显不同。CCK-8结果显示,当硫酸酶的浓度为0.00125和0.0025 g/mL时,不同时间点其吸光度均明显高于空白对照组并有统计学意义($t_{(0.00125\text{ g/mL}, 72\text{ h})}=6.92$, $t_{(0.0025\text{ g/mL}, 72\text{ h})}=8.46$, $p<0.05$),而当硫酸镁的浓度为0.005 g/mL、0.01 g/mL时,不同时间点其吸光度均明显小于空白对照组并有统计学意义($t_{(0.005\text{ g/mL}, 72\text{ h})}=2.5$, $t_{(0.01\text{ g/mL}, 72\text{ h})}=6.86$, $p<0.05$,见表1)。

Table 1 The absorbance of A value cultured by different concentrations of magnesium sulfate at different time ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

Concentrations of magnesium sulfate / $\text{g}\cdot\text{nL}^{-1}$	24 h	48 h	72 h
0	0.26 $\pm$ 0.02	0.29 $\pm$ 0.06	0.32 $\pm$ 0.04
0.00125	0.36 $\pm$ 0.02	0.42 $\pm$ 0.05	0.50 $\pm$ 0.02
0.0025	0.33 $\pm$ 0.02	0.40 $\pm$ 0.06	0.54 $\pm$ 0.02
0.005	0.24 $\pm$ 0.03	0.25 $\pm$ 0.02	0.27 $\pm$ 0.01
0.01	0.14 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.05

Note: $p<0.05$, vs. Control group, $t_{(0.00125\text{ g/mL}, 72\text{ h})}=6.92$, $t_{(0.0025\text{ g/mL}, 72\text{ h})}=8.46$, $t_{(0.005\text{ g/mL}, 72\text{ h})}=2.5$, $t_{(0.01\text{ g/mL}, 72\text{ h})}=6.86$.

2.2 硫酸镁对大鼠神经干细胞辐照后凋亡率的影响

用流式细胞仪进行神经干细胞凋亡率检测发现,神经干细胞经2和4 Gy ^{60}Co γ 射线照射后,照射剂量率0.08 Gy/min,与空白对照组相比,神经干细胞凋亡率在各时间点明显增加,差异有统计学意

义($t_{(2\text{ Gy}, 72\text{ h})}=30.60$, $t_{(4\text{ Gy}, 72\text{ h})}=31.85$, $p<0.05$),并随着照射剂量增大,神经干细胞凋亡率明显增加。单纯照射组与照射+硫酸镁组相比,照射+硫酸镁组神经干细胞各剂量组、各时间点凋亡率较单纯照射组比较,凋亡率明显降低,差异有统计学意义($t_{(2\text{ Gy}, 72\text{ h})}=9.08$, $t_{(4\text{ Gy}, 72\text{ h})}=6.86$, $p<0.05$,见表2)。

Table 2 The apoptosis of neural stem cell at different time irradiated by different doses / % ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Groups	24 h	48 h	72 h
Control group	3.66±0.41	5.68±0.31	6.96±0.73
2 Gy experimental control group	21.62±1.05	35.19±0.69	28.71±0.99
2 Gy experimental group	16.30±0.89	25.61±0.80	22.90±1.24
4 Gy experimental control group	28.59±0.44	36.78±0.87	31.49±1.13
4 Gy experimental group	14.61±0.4	22.34±0.94	22.82±0.90

2.3 神经干细胞鉴定

原代细胞接种后2—3 d可见大多数细胞分裂成小的细胞团,由单个细胞增殖而来,到7 d生长成数十个甚至数百个集落。培养的细胞克隆贴壁24 h后进行干细胞特异性抗体 nestin 免疫荧光染色,结果显示在原代培养形成的神经球中大部分细胞表达 nestin 阳性,传代培养后形成的细胞克隆,仍表达 nestin 阳性(见图1)。

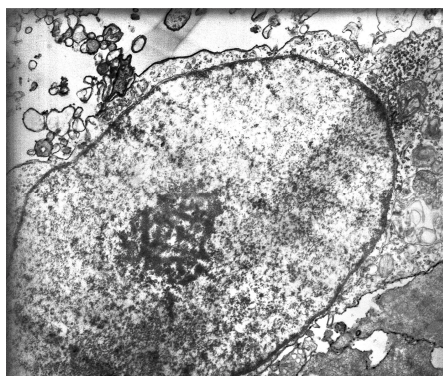


Fig.1 The neural stem cell morphology of blank control group ($\times 10\,000$)

2.4 硫酸镁对大鼠神经干细胞辐照后细胞凋亡形态的影响

神经干细胞经射线照射后可以观察到神经干细胞的凋亡。从上面实验可以看出,不同剂量的 γ 射线照射后,神经干细胞有不同程度的凋亡率。本实验通过透射电镜观察2 Gy γ 射线对神经干细胞的损伤,以及硫酸镁对2 Gy γ 射线照射后神经干细胞损伤的保护作用。空白对照组图1神经干细胞核仁清晰,核膜完整,无核仁深染及核边集现象。单纯照射组24 h时间点见图2、48 h时间点见图3神经干细胞。可见明显的细胞凋亡,细胞体积缩小,与周围细胞脱离,细胞质密度增加,核质浓缩,核仁边集,核膜核仁破碎,同时在细胞核周围能看见凋亡小体。照射+硫酸镁组24 h时间点见图4、48 h时间点见图5神经干细胞,与空白对照组相比,有轻度的核仁边集,核质浓缩,但较实验对照组

相比,其损伤程度明显减轻,虽能看见凋亡小体,但其数量较实验对照组比较明显减少。

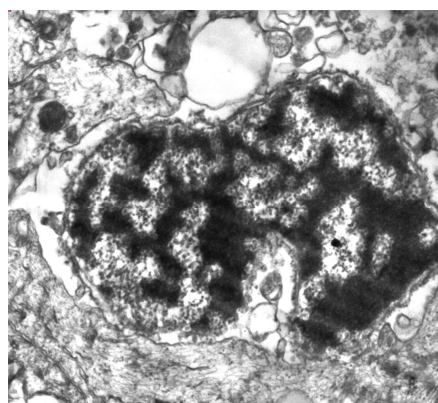


Fig.2 The neural stem cell morphology of experimental control group at 24 h after irradiation

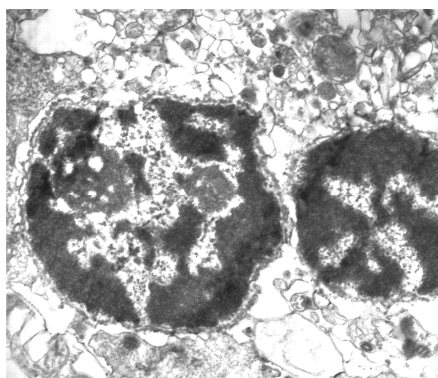


Fig.3 The neural stem cell morphology of experimental control group at 48h after irradiation ($\times 10\,000$)

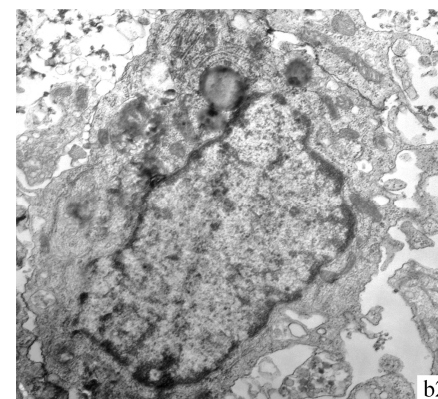


Fig.4 The neural stem cell morphology of experimental group at 24h after irradiation

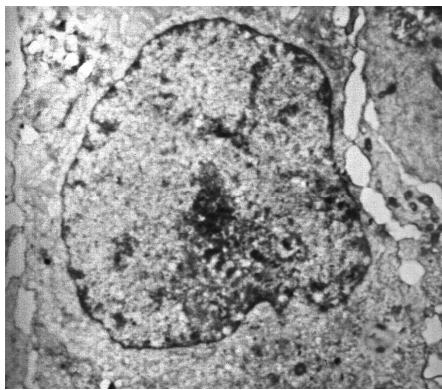


Fig.5 The neural stem cell morphology of experimental group at 48h after radiation ($\times 10\,000$)

3 讨论

为了研究镁离子对神经系统的保护作用, 本实验选用神经干细胞作为实验对象, 因为神经干细胞作为神经系统的干细胞, 在神经系统受损后, 具有神经再生功能, 如果神经干细胞在损伤过程中得到很好的保护, 那么神经系统就具有更强的修复能力。

本实验首先使用 CCK-8 法检测不同浓度硫酸镁对神经干细胞增殖的影响, 为进一步开展实验寻找出合适的硫酸镁浓度。实验证实当硫酸镁浓度为 0.00125 及 0.0025 g/mL 时, 各时间点神经干细胞的吸光度明显较未加入硫酸镁高, 说明活细胞的数量较未加入硫酸镁组多, 即细胞增殖增加。但当硫酸镁的浓度大于 0.005 g/mL 时, 各时间点吸光度较未加入硫酸镁组明显降低, 说明其活细胞数量减少, 即细胞增殖减少。因此, 当浓度为 0.00125 g/mL 时, 神经干细胞的增殖情况最好, 所以选择此浓度为后续实验的药物浓度。

在研究硫酸镁对电离辐射后神经干细胞凋亡的影响时, 选择硫酸镁的药物浓度为 0.00125 g/mL。通过本次实验可以发现, 细胞经过 2 Gy、4 Gy γ 射线照射后, 各时间点与未照射组比较凋亡率明显增加, 具有统计学差异。证明电离辐射损伤后, 能使神经干细胞凋亡增加。在一定范围内照射剂量增大时其凋亡率也明显增加, 且随着时间的改变, 其凋亡率也有明显变化。为了检测硫酸镁对神经干细胞的保护作用, 在神经干细胞照射前 24 h 在培养基中加 1.25 mg/L 的硫酸镁, 在细胞培养 24 h 后分别予以 2 Gy、4 Gy γ 射线照射, 在照射后 24 h、48 h、72 h 时间点分别检查其细胞的凋亡率, 与照射未加药组比较, 凋亡率明显降低, 具有统计学意义。说明硫酸镁能使电离辐射所致细胞凋亡明显降低, 进一步说明早期应用硫酸镁能减轻电离辐射对神经干细胞的辐射损伤。

从照射后神经干细胞核的形态也可进一步说明硫酸镁对神经干细胞的保护作用。把实验对照组与空白对照组相比, 神经干细胞核的形态, 可见明显的细胞凋亡, 细胞体积缩小, 与周围细胞脱离, 细胞质密度增加, 核质浓缩, 核仁边集, 核膜核仁破碎, 同时在细胞核周围能看见凋亡小体。通过透射电镜对神经干细胞核形态的观察, 也进一步证实了硫酸镁的辐射防护作用。实验组与实验对照组相比, 有轻度的核仁边集, 核质浓缩, 但较实验对照组相比, 其损伤程度明显减轻, 虽能看见凋亡小体, 但其数量较实验对照组明显减少。

镁离子之所以能够降低电离辐射所致神经干细胞的凋亡, 与镁离子的生理功能有关。但镁离子的神经保护作用机制目前仍不清楚。其降低凋亡率的机制可能与以下几个方面有关: (1) 镁离子被认为是一种内源性的 N-甲基-D-天门冬氨酸 (NMDA) 受体非竞争性拮抗剂, 在神经系统中, 谷氨酸受体包括 NMDA 受体和非 NMDA 受体两大类, 其中以 NMDA 受体的作用为重要, 在生理条件下, 镁离子以电压依赖方式通过阻断 NMDA 受体偶联的离子通道, 防止 Na^+ 、 Ca^{2+} 内流, K^+ 外流, 维持细胞膜上 Na^+ - K^+ -ATP 酶的活性来维持细胞内外离子稳态, 防止钙超载和细胞水肿^[5-8], 减少 Ca^{2+} 内流所致的细胞损伤。(2) 同时镁离子是大量参与机体新陈代谢、氧化反应、酶作用底物磷酸化、蛋白及磷脂合成等关键酶及第二信使-细胞内腺苷酸环化酶 (cAMP) 所必须的激活剂和调节剂, 在生理活动的条件中发挥重要作用^[9,10]。(3) 镁离子还对 DNA 结构的稳定性起重要作用, 细胞内低镁可使 DNA 的双链发生解旋, 导致稳定性降低, 细胞内 DNA 碎片增加^[11]。(4) 镁离子具有抑制脂质过氧化, 清除自由基的功能, 减少 ROS 对细胞所致的损伤^[12]。镁离子通过对电离辐射后细胞内外离子的调节、稳定 DNA 及调节某些参与凋亡的细胞因子或细胞内信使, 降低电离辐射所致细胞凋亡。

参考文献

- 1 Adriana H F, Cheng K C, Desiree E, *et al.* Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis [J]. *J Exp Med*, 1994, **180**(2): 525-535
- 2 Temkin N R, Anderson G D, Winn H R, *et al.* Magnesium sulfate for neuroprotection after traumatic brain injury: a Randomized Controlled Trial [J]. *Lancet Neurol*, 2007, **6**(1): 29-38
- 3 Enomoto T, Osugi T, Satoh H, *et al.* Pre-injury magnesium treatment prevents traumatic brain injury-induced

- hippocampal ERK activation, neuronal loss, and cognitive dysfunction in the radial-arm maze test [J]. *J Neurotrauma*, 2005, **22**(7): 783-792
- 4 Tofilon P J, Fike J R. The radioresponse of the central nervous system: a dynamic process [J]. *Radiat Res*, 2000, **153**(4): 357-370
 - 5 Zhang L, Rzigalinski B A, Ellis E F, *et al.* Reduction of voltage-dependent Mg^{2+} blockade of NMDA current in mechanically injured neurons [J]. *Science*, 1996, **274** (5294): 1921-1923
 - 6 Vink R. Magnesium and brain trauma [J]. *Magnesium & Trace Elements*, 1991-1992, **10**(1): 1-10
 - 7 涂戡, 周菊英, 王利利. $MgSO_4$ 对大鼠急性放射性脑损伤后钙超载的抑制作用[J]. *中华放射医学与防护杂志*, 2005, **25**(4): 339-341
TU Yu, ZHOU Juying, WANG Lili. Inhibitory effect of $MgSO_4$ on calcium overload after radiation induced brain injuries [J]. *Chin J Radiol Med Prot*, 2005, **25**(4): 339-341
 - 8 袁文佳, 涂戡, 崔凤梅, 等. 硫酸镁对大鼠急性放射性脑损伤后脑 NMDA 受体及血清 NSE 的影响[J]. *苏州大学学报(医学版)*, 2009, **12**(2): 224-226
YUAN Wenjia, TU Yu, CU Fengmei, Effect of $MgSO_4$ on NMDA receptor in brain tissue and serum NSE in rats with radiation-induced acute brain injury [J]. *Suzhou University Journal of Medical Science*, 2009, **29**(2): 224-226
 - 9 Vink R, McIntosh T K, Demediuk, *et al.* Decline in intracellular free Mg^{2+} is associated with irreversible tissue injury after brain trauma [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1988, **263**(2): 757-761
 - 10 Anastassopoulou J, Theophanides T. Magnesium-DNA interaction and the possible relation of magnesium to carcinogenesis: Irradiation and free radicals [J]. *Critical Reviews in Oncology Hematology*, 2002, **42**(1): 79-91
 - 11 White R E, Hartzell H C. Magnesium ions in cardiac function: Regulator of ion channels and second messengers [J]. *Biochem Pharmacol*, 1989, **38**(6): 859-867
 - 12 王利利, 涂戡, 周菊英, 等. 6MeV 电子线照射后大鼠脑阻滞自由基的变化[J]. *中国血液流变学杂志*, 2006, **16**(3): 335-337
WANG Lili, TU Yu, ZHOU Juying. Variation of free radicals content in SD rat brain tissues irradiated 6 MeV electron beam [J]. *Chinese Journal of Hemorheology*, 2006, **16**(3): 335-337

Study on the apoptosis effect of $MgSO_4$ on the radiation-induced neural stem cell of rats injury

LIU Ping¹ TU Yu²

¹(Subei People's Hospital of Jiangsu province, Yangzhou 225001, China)

²(Department of Medical Radioprotection, School of Radiation Medicine and Public Health, Suzhou University, Suzhou 215123, China)

ABSTRACT To explore the neuroprotective effect of magnesium sulfate on the apoptosis of neural stem cells induced by radiation, neural stem cells were obtained from newborn sprague-dawley rats cerebral hemisphere, and the identification of neural stem cell was done by immunofluorescence after culturing for 24 h. Neural stem cells were cultured by different concentrations of magnesium sulfate and the right concentration of magnesium sulfate was chosen to be 0.00125 mg/mL. In the experiment the neural stem cells were randomly divided into 3 groups: blank control group, experimental control group (radiation) and experimental group (radiation and treated with magnesium sulfate). The whole neural stem cells of experimental control group and experimental group were irradiated by a dose of 2 Gy or 4 Gy with γ -rays. The apoptosis were detected at different time after irradiation in the range of 24 h, 48 h, and 72 h, respectively. The CCK-8 and the morphology of neural stem cells were observed by TEM. Compared with blank control group, the apoptosis rate of experimental control group significantly increased ($t_{(2Gy, 72h)}=30.60$, $t_{(4Gy, 72h)}=31.85$, $p<0.05$). Compared with control group, the apoptosis rate of experimental group significantly decreased ($t_{(2Gy, 72h)}=9.08$, $t_{(4Gy, 72h)}=9.08$, $p<0.05$). Accordingly, magnesium sulfate can decrease apoptosis rate and reduce the injury of neural stem cells in the early stage after irradiation.

KEYWORDS Neural stem cell, Magnesium sulfate, Ionizing radiation

CLC R811.5, R329.2, R811.74