

电离辐射对大鼠脑组织中稀醇化酶、S-100 蛋白表达的影响

涂 彧¹ 王利利² 周菊英² 崔凤梅¹ 秦颂兵² 徐晓婷²

¹ (苏州大学 放射医学与公共卫生学院 苏州 215123)

² (苏州大学 附属第一医院肿瘤放疗科 苏州 215006)

摘要 观察了超大剂量 6MeV 电子线照射后大鼠脑组织 NSE、S-100 蛋白的动态变化。对成熟的 (Sprague-dawle, SD) 大鼠用 6MeV 电子线进行 10Gy、20Gy 和 30Gy 全脑单次照射, 应用免疫组织化学法测定大鼠脑损伤后不同时间、不同剂量脑组织中稀醇化酶 (Neuro-specific enolase, NSE)、S-100 蛋白的相对含量。60 只大鼠随机分为对照组和实验组, 用 6MeV 电子线对实验组大鼠进行 20Gy 全脑单次垂直照射, 分别于照射后 1d、7d、14d 和 30d 处死大鼠, 取其脑组织, 用免疫组织化学法测定 NSE、S-100 蛋白的相对含量, 并与对照组进行比较。在上述时间点, 脑内海马区 S-100 和 NSE 表达有时间规律, 照射后 7d S-100 蛋白的表达和照射后 24h NSE 的表达组间存在一定差别。与对照组相比, 实验组大鼠脑组织中 NSE 表达显著下降 ($p<0.05$), S-100 表达显著升高 ($p<0.05$)。在照射后 7d, 上述各指标变化的幅度为 30Gy 组>20Gy 组>10Gy 组。电离辐射可诱导脑组织中 S-100 蛋白的表达, 同时下调 NSE 在神经元中的表达, 脑组织中 S-100 和 NSE 表达水平的变化可作为辐射诱导的急性脑损伤的敏感指标。

关键词 电离辐射, 脑损伤, NSE, S-100 蛋白

中图分类号 R811.74

放射治疗是头颈部恶性肿瘤的主要治疗手段之一, 放射造成的脑损伤已成为限制头颈部肿瘤的放疗剂量、影响疗效的重要因素。尽管现在采用三维适形和调强放射治疗对减少脑组织关键解剖部位的损害有一定的帮助, 但是中枢神经系统的辐射耐受剂量仍然是限制放疗疗效的主要因素之一。深入了解放射性脑损伤的发病机理, 将有助于提高正常脑组织的辐射耐受剂量或者是改进放射性脑损伤的治疗手段。目前认为, 细胞因子表达的改变是中枢神经系统放射损伤的重要因素之一^[1]。神经元特异性稀醇化酶 (Neuro-specific enolase, NSE) 和 S-100 蛋白作为反映中枢神经系统中神经元和胶质细胞损伤程度的重要指标, 已广泛应用于颅脑外伤、脑缺血、脑肿瘤等所致的脑损伤的研究, 而有关其在放射性脑损伤方面的研究却报道甚少。为此, 本工作观察了大鼠急性放射性脑损伤后脑组织中 NSE、S-100 蛋白表达的情况, 为放射性脑损伤的防护和治疗策略提供重要的实验依据。

1 材料和方法

1.1 动物及分组

成熟健康封闭群 (Sprague-dawle, SD) 大鼠,

由苏州大学动物实验中心提供, 体重为 (180±20)g, 雌雄各半, 于安静、温暖(22℃)、光线柔和的环境中饲养 48h 后, 随机分为空白对照组(12 只)和单纯照射组(30 只。其中 20Gy 组 12 只, 10Gy、30Gy 组各 3 只)。空白对照组和 20Gy 组, 分别于照射后 1d、7d、14d 和 30d, 每组取 3 只大鼠进行相关指标的检测; 10Gy 和 30Gy 组各 3 只, 于照射后 7d 进行相关指标的检测。接受照射的 SD 大鼠在照前经 20%乌拉坦 (5.0mL/kg) 腹腔注射麻醉, 对照组同样麻醉后放入相似的环境中, 不予照射。观察期间同样给予正常饮食。

1.2 照射方法及剂量的确认

照射的 SD 大鼠麻醉后, 俯卧固定于自制的“工”型木架上, 西门子 KD-2 型直线加速器 6MeV 电子线行全脑垂直照射, 剂量率为 200cGy/min, 源皮距为 100cm, 在 10cm×10cm 的限光筒特制的铅模中, 照射野大小为 2.0cm×2.0cm。照射前以指型电离室 (Farmer-FC23-C) 在 30cm×30cm 的水模中水下 1cm 作吸收剂量测量, 剂量仪为 Scanditronix-Wellhofer 公司的 DOSE-1 型。于照射之前校正, 保证大鼠脑部的吸收剂量为

国家自然科学基金 (30670638) 资助

第一作者: 涂彧, 男, 1965 年 7 月出生, 2002 年毕业于苏州大学放射医学系, 获放射医学博士学位, 副教授, 硕士生导师, 主要研究方向: 放射卫生与防护

收稿日期: 初稿 2007-01-29, 修回 2007-03-19

10Gy、20Gy、30Gy。各组照射大鼠均采用单次剂量照射。

1.3 组织切片的制备

实验大鼠以 20%乌拉坦腹腔麻醉后,开胸经左心室至升主动脉插管,先以 250mL 生理盐水快速冲洗血液,随后用 4℃ 4%的多聚甲醛 0.01mol/L 的磷酸盐缓冲液 (Phosphate buffered saline, PBS) pH=7.4, 250mL 灌注固定。灌毕,标记前囟,取全脑,按常规冰冻切片要求处理脑组织。用冰冻切片机 (Leica CM1900 德国) 于前囟后 1.7mm 起作全脑连续冠状切片,片厚 25 μ m,切片分为 10 套,漂置 0.01mol/L 的 PBS 中,置 4℃ 冰箱待用,取其中 4 套进行下面免疫组织化学染色和对照染色。

1.4 免疫组织化学染色

按照免疫组织化学链霉素亲和素-生物素-过氧化物酶复合法 (Streptomycin-avidin-biotin- peroxidase complex, SABC) 法进行抗 S-100 和 NSE 免疫组织化学反应。其中, S-100、NSE 和即用型 SABC 免疫组织化学试剂盒均购自武汉博士德生物工程公司。

1.5 免疫组织化学对照实验

1.5.1 免疫组织化学对照实验 取两套上述全脑切片,用 0.01mol/L 的 PBS 代替兔抗鼠 S-100、NSE

第一抗体,再按 SABC 法进行免疫组织化学染色。

1.6 结果判定

阳性显色为棕黄色, S-100 主要在星形胶质细胞的胞浆, 稀醇化酶 (Neuro-specific enolase, NSE) 主要在神经元的胞浆中。计数方法: 选择海马为观察部位, 进行 S-100 和 NSE 免疫反应阳性细胞计数, 在脑海马区每只大鼠脑片上选取彼此相同层面的切片 5 张, 在 10 $\times$ 40 倍显微镜下, 每张切片取 5 个具有代表性的视野 (在相对应层面切片上所选取的视野一致), 分别计数 S-100 和 NSE 阳性细胞。

1.7 数据处理

全部数据采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 根据本实验数据资料, 组间分析采用单因素方差分析, 所用软件为社会科学统计包 (Statistical package for social science, SPSS) 10.0 版本, $p < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠脑组织 NSE、S-100 蛋白表达情况检测。

从表 1 的数据资料可见, 脑组织受到照射后 24h NSE 免疫反应阳性细胞数即显著减少 ($p < 0.05$), 至 30d 时在海马区已基本看不到 NSE 免疫反应阳性细胞, 同时发现海马区神经元损伤程度亦呈进行性的加重。

Table 1 Expression of NSE and S-100 protein positive cells in rat brain in different time by 20Gy irradiation (cells/microscopic visual field, $\bar{x} \pm s$)

Groups	1d		7d		14d		30d	
	Control group	Irradiation group	Control group	Irradiation group	Control group	Irradiation group	Control group	Irradiation group
NSE	60.65 $\pm$ 8.09	42.60 $\pm$ 9.50 ⁽¹⁾	58.70 $\pm$ 8.81	18.70 $\pm$ 5.66 ⁽¹⁾	59.05 $\pm$ 9.59	5.55 $\pm$ 4.27 ⁽¹⁾	59.53 $\pm$ 10.26	2.1 $\pm$ 2.1 ⁽¹⁾
S-100	72.10 $\pm$ 9.87	75.70 $\pm$ 10.19	71.70 $\pm$ 9.34	96.75 $\pm$ 15.05 ⁽¹⁾	73.85 $\pm$ 8.76	126.20 $\pm$ 18.23 ⁽¹⁾	72.85 $\pm$ 8.99	147.90 $\pm$ 10.37 ⁽¹⁾

⁽¹⁾ $p < 0.05$, vs Control group

脑组织受到照射后, 在观察的各个时间点, 脑海马区 S-100 蛋白免疫反应阳性细胞数量呈进行性

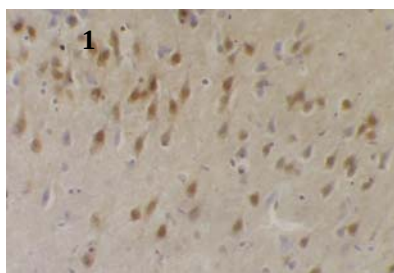


Fig.1 The NSE immunoreactive neurons in brain of control rat groups (SP $\times$ 400)

增加, 同时伴有 S-100 蛋白免疫反应星形胶质细胞的胞体增大和突起增多 (见图 1), 与对照组 (见图 2) 相比具有明显差异 ($p < 0.05$)。

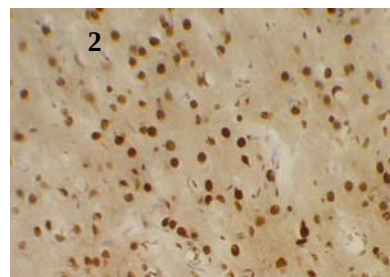


Fig.2 The NSE immunoreactive neurons decrease in brain of experimental rat groups on the 7d after radiation (SP $\times$ 400)

从表2可以看到,大鼠在接受10Gy、20Gy、30Gy全脑照射后7d(见图3),与0Gy组(见图4)相比,脑组织中NSE阳性细胞数减少,S-100蛋白阳性细胞数增多,且NSE、S-100蛋白阳性细胞数变化的程度为30Gy组>20Gy组>10Gy组。表明脑

组织在受到照射后,可导致组织中NSE表达的减少和S-100蛋白表达的升高,这种改变的程度与接受照射的剂量有关。继而反应了脑组织在接受电离辐射早期即存在神经元和神经胶质细胞的损伤。

Table 2 Expression of NSE and S-100 protein positive cells in rat brain after 7d by different dose level irradiation (cells/microscopic visual field, $\bar{x} \pm s$)

	0Gy	10Gy	20Gy	30Gy
NSE ⁺	58.70±8.81	33.25±5.22 ⁽¹⁾	18.70±5.66 ⁽¹⁾	9.15±3.96 ⁽¹⁾
S-100	71.70±9.34	83.65±9.42 ⁽¹⁾	96.75±15.05 ⁽¹⁾	106.20±15.25 ⁽¹⁾

⁽¹⁾ $p < 0.05$, vs 0Gy group

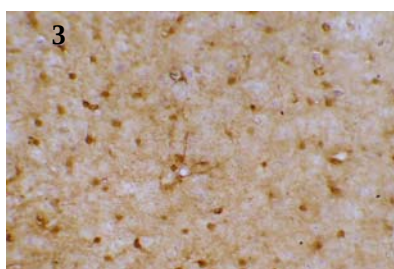


Fig.3 The S-100 protein immunoreactive glial cells increase in brain of experimental rat groups on the 7d after radiation (SP×400)

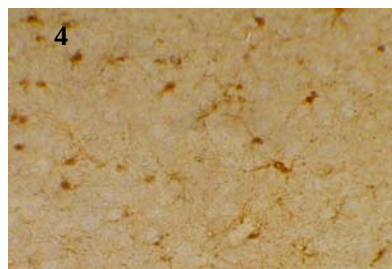


Fig.4 The S-100 protein immunoreactive glial cells in brain of control rat groups (SP×400)

3 讨论

在该实验中,本文通过脑组织NSE免疫组织化学半定量分析。结果显示,脑组织接受电离辐射后24h,代表神经元NSE免疫组织化学反应的阳性细胞数较空白对照组明显减少($p < 0.05$)。脑组织在受照射后7d,随着照射剂量的升高,NSE阳性细胞数减少的程度也增大,亦即脑组织受射线损伤越重,NSE阳性细胞数减少的程度也越大。表明神经元受辐射后胞浆中的NSE表达减少,且减少的程度随脑组织受射线损伤的程度而明显。究其原因可能是由于神经元细胞受到自由基、活性氧的攻击,致使神经元合成NSE的能力降低或经损伤的细胞膜漏出至血液和脑脊液中,同时也说明了NSE是反映神经元早期损伤的一个灵敏指标。随着伤后时间的延长,阳性细胞数量持续下降,直至伤后30d后基本上在海马区内看不到NSE阳性细胞。这可能是由于随着照射后观察时间的延长神经元受到所谓的继发性损害较重,几乎丧失了合成NSE的能力或经损伤的细胞膜全部漏出所致。这也从另外一个角度反映了控制NSE合成的某些关键基因位点对辐射非常敏感,如果能筛选出这些关键基因将对辐射检测和剂量估算有非常重要的现实意义。另外,电离辐射造成了脑组织中NSE的表达减少,进而可间接影响脑内的糖代谢,使脑组织的能量合成降低,进一步加重了脑组织的损伤程度。

生理浓度的S-100蛋白主要发挥神经营养因子样作用,在神经元发育和损伤时维持其活力。而在某些病理情况下,致伤因子作用于星形胶质细胞可引起S-100 β 蛋白的大量合成和分泌,过度表达的S-100 β 对神经组织则具有不利影响,它可能通过(1)诱导磷酸肌醇的水解,促使细胞外钙离子内流和原癌基因地表达;(2)抑制多种蛋白激酶的底物磷酸化;(3)作为胶原原性的有丝分裂原影响细胞骨架的聚合和解聚,从而诱导细胞的凋亡和坏死^[2,3]。在我们的实验中,可观察到脑组织受照射后海马区S-100蛋白持续增加,并显著高于对照组($p < 0.05$)。这说明电离辐射可诱导S-100蛋白的表达,在放射性脑损伤中S-100蛋白可能通过上述途径参与诱导神经细胞的凋亡、坏死和水肿,从而参与脑组织受照射后神经细胞损伤和死亡的病理过程^[4]。

在这里值得一提的是,S-100蛋白具有钙调作用。1992年,Barger等^[5]给鼠注射S-100蛋白后测定细胞内钙的变化,结果发现S-100蛋白能刺激神经胶质细胞和神经元内钙增加,推测它存在于神经细胞内可能参与了储存和转运细胞内钙。1993年,Fano等^[6]通过体外细胞模型证实了S-100蛋白能引起细胞内钙离子增高。而细胞内Ca²⁺超载是目前多数学者公认的导致脑损伤后细胞死亡的“共同通道”^[7]。在以往的研究中发现,脑组织在受到20Gy的射线照射后24h脑组织中Ca²⁺含量较正常对照组即有明显升高($p < 0.05$),在整个观察期(照射后一个月)仍处于

较高水平^[8]。结合本研究的实验结果发现, S-100 蛋白与脑组织中 Ca^{2+} 的含量在同一剂量照射后的各个观察时间点及不同照射剂量的同一个观察时间点呈同步增加。进一步证实, 脑组织受到电离辐射后, S-100 蛋白的过度表达, 可以导致钙离子浓度持续升高, 在不适当时期或钙离子浓度升高超过神经细胞耐受范围后, 则可能导致神经毒性, 从而参与了辐射致脑组织细胞损伤和死亡的分子病理过程。

由于以往的有关脑外伤、缺血缺氧性脑病的研究中已证实海马的病变是比较典型的, 同时发现在放射性脑损伤中海马的损伤发生最早, 再加上海马是动物高级神经活动的重要部位^[9], 故本实验选用海马区作为观察部位。另外, 脑是由多种密切联系的细胞组成的整体, 研究证实, 在辐射所致的脑损伤的发病过程中, 除了靶细胞少突胶质细胞和血管内皮细胞外, 其它各种神经胶质细胞和神经元也起了重要作用, 这与文献^[10]报道一致。同时, 在急性放射性脑损伤时, 随着神经元的坏死、神经髓鞘的崩解及血脑屏障的破坏, 脑组织中的某些蛋白质如 NSE、S-100 可释放到脑脊液和血液中, 通过对其在血液中含量的检测, 可以为临床上早期发现和预防放射性脑损伤提供实验依据, 对放射性脑损伤的早期治疗有重要的现实意义, 这将是我們下一步的工作。

参考文献

- 1 Belka C, Budach W, Kortmann R D, *et al.* British Journal of Cancer, 2001, **85**(9): 1233-1239
- 2 Loy D N, Sroufe A E, Pelt J L, *et al.* Neurosurgery, 2005, **56**(2): 391-397
- 3 Van Eldik L J, Wainwright M S. Restor Neurol Neurosci, 2003, **21**(3-4): 97-108
- 4 邱勇, 石梅, 魏丽春, 等. 中国神经科学杂志, 2002, **18**(2): 495-510
QIU Yong, SHI Mei, WEI Lichun, *et al.* Chin J Neurosci, 2002, **18**(2): 495-510
- 5 Barger S, Van Eldik L, Biol Chem, 1992, **267**(5): 9689-9694
- 6 Fano G, Mariggio M, Angelela P, *et al.* Neuroscience, 1993, **53**(4): 919-925
- 7 Matsuda T, Arakawa N, Takuma K, *et al.* J Pharmacol Exp Ther, 2001, **298**(1): 249-256
- 8 涂戡, 周菊英, 王利利. 辐射研究与辐射工艺学报, 2005, **23**(3): 185-188
TU Yu, ZHOU Juying, WANG Lili. J Radiat Res Radiat Process, 2005, **23**(3): 185-188
- 9 Monje M L, Palmer T. Curr Opin Neurol, 2003, **16**(2): 129-134
- 10 Liscak R, Vladyka V, Novotny J Jr, *et al.* J Neurosurg, 2002, **97**(5): 666-673

Expression of neuro-specific enolase and S-100 protein in sprague-dawle rat brain tissue irradiated by 6MeV electron beam

TU Yu¹ WANG Lili² ZHOU Juying² CUI Fengmei¹ QIN Songbing² XU Xiaoting²

¹ (Department of Medical Radioprotection, School of Radiation Medicine and Public Health, Suzhou University, Suzhou 215123)

² (Department of Radiation Oncology, The First Affiliated Hospital to Suzhou University, Suzhou 215006)

ABSTRACT The work is to study the expression of NSE and S-100 protein in SD rat brain tissue irradiated by 6MeV electron beam. The whole brain of the Sprague-Dawley rats were irradiated with single dose of 10Gy, 20Gy and 30Gy by 6MeV electron. Immunohistochemical method was used to measure the contents of S-100 and NSE in brain tissue. One-ANOVA was used for analysis. The expression of S-100 and NSE after whole brain irradiation was time-dependent. Compared with that of control group, there was an increase of expression of S-100 D7 after irradiation during the observed time ($p < 0.05$). On the contrary, there was a decrease of NSE 24h after radiation, disappearing nearly at D30 ($p < 0.05$). The indexes above were changed with the different dose levels at 7d after radiation. Radiation can induce the expression of S-100, as well as inhibit the expression of NSE on radiation-induced acute brain injury. The changes of the expression of S-100 and NSE on the brain can act as indexes of acute brain injury induced by radiation.

KEYWORDS Radiation effects, Brain injuries, Neuro-specific enolase (NSE), S-100 protein

CLC R811.74