

孕期补碘性高碘对子鼠脑细胞凋亡的影响

周明¹, 雷方², 张富昌³, 王振林²

【摘要】 目的: 观察不同孕期补碘所引起的高碘对子鼠脑凋亡及调节基因表达的影响情况。**方法:** 受精大鼠分成 3 个组, 2 个高碘组分别在受孕 0 d 和 7 d 一次性经口灌胃给予 1 ml/kg. bw 40 %碘化油、对照组给予同剂量食用豆油。用免疫组化法测定 21、28、35 d 龄子鼠海马 bcl-2、bax 蛋白表达; TUNEL 法测定 35 d 龄子鼠神经元细胞凋亡状况。**结果:** 与对照组比较, 在海马各亚区, 两个高碘组 bcl-2 蛋白表达减少, bax 蛋白表达增多; 高碘 I 组凋亡指数增高, 高碘 II 组指数虽增高但无统计学意义。**结论:** 孕期补碘性高碘可使子鼠海马神经细胞凋亡增加, 作为凋亡调控基因 bcl-2、bax 可能参与了高碘诱导海马神经元凋亡的过程。

【关键词】 孕期; 高碘; 脑; bcl-2; bax; 凋亡

【中图分类号】 R15

【文献标识码】 A

【文章编号】 1003-8507(2006)12-2225-03

THE EFFECT OF EXCESS IODINE CAUSED BY SUPPLYING IODINE DURING GESTATION ON BRAIN APOPTOSIS AND GENE EXPRESSION OF FILIAL RATS. ZHOU Ming, LEI Fang, ZHANG Fuchang, et al. School of Public Health, Nanjing Medical University, Nanjing, 210029.

Abstract : Objective : To observe the effect of excess iodine caused by supplying iodine during different gestation period on the neuron apoptosis and gene expression of filial rats. **Methods :** Fertilized rats were divided into three groups, 40 % iodide oil was injected into two high iodine group's stomach through mouth with 1ml/kg. bw at day 0 and day 7 respectively. At the same time, edible bean oil was injected into control group by the same way. For PN21、PN28、PN35 offspring, the expressions of bcl-2 and bax gene were measured by immunohistochemistry. For PN35 offspring, the neuron apoptosis were examined by TUNEL. **Results :** Compared with control group, in hippocampus CA₁, CA₃, DG region, the expression intensity of bcl-2 of high iodine group decreased, but expression intensity of bax increased; the apoptosis index of the first group increased, although the second group was higher than control group, but there was no statistical significance. **Conclusion :** Excess iodine caused by supplying iodine during gestation can cause hippocampus neuron apoptosis increase of the filial rats. As a regulative and control gene of PCD, bcl-2 and bax may participate in this process.

Key words : Gestation; Excess iodine; Brain; bcl-2; bax; Apoptosis

孕妇碘缺乏可引起胎儿精神发育迟滞。我国严重缺碘的秦巴山区, 尽管食用加碘盐, 但血清甲状腺素测定结果显示, 仍有约 50 % 孕妇乳母低于正常值下限^[1], 因此, 在缺碘严重地区的孕妇除食用碘盐外, 应额外补充碘剂以预防碘缺乏对子代健康造成的危害。但一次性给予碘油制剂后, 可在体内形成一过性的高碘, 考虑到胎儿对环境条件的改变十分敏感, 尽管世界卫生组织认为在孕期的任何时候补碘都是安全的^[2], 但鉴于目前绝大多数高碘与智力关系的动物实验研究结果均显示高碘对脑发育有不良影响, 应慎重考虑孕期补碘对子代智能发育的安全性。本文采用给不同孕期的大鼠一次性经口灌胃给予碘油制剂, 观察孕期补碘性高碘对子鼠脑细胞凋亡及调节基因表达的影响, 旨在对高碘影响脑发育的机制方面进行探讨, 为孕妇合理补碘提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物与分组 健康 SD 大鼠 60 只, ♀:♂ = 2:1, 体重 180~220 g (西安交通大学医学院实验动物中心提供)。实验前适应性饲养 1 周。随后每晚 11 时将动物以雌雄 2:1 合笼, 次日晨 7 时检查阴栓, 做阴道涂片。若发现精子, 即为受精鼠, 确定为妊娠 0 d, 共检出受精鼠 30 只, 然后依随机化原则将其平均分成 3 组: 高碘 I 组 (0 d 灌胃) 和 II 组 (7 d 灌胃) 及对照组。高碘组动物按 1 ml/kg. bw 用 40 %碘化油 1 次性经口灌胃, 对照组按同样标准用食用豆油 1 次性经口灌胃, 自然分娩。分别于 21、28、35 d 取脑做石蜡切片, 用于各项指标检测。

1.2 主要试剂 兔抗大鼠 bcl-2 多克隆抗体、兔抗大鼠 bax 多克隆抗体、SABC 免疫组化试剂盒、细胞凋亡检测试剂盒等均购于武汉博士得生物工程有限公司。

1.3 主要仪器 石蜡切片机、QWin550CW 型图像信号采集与分析系统 (德国 Leica 公司)。

1.4 Bcl-2 及 bax 免疫组化 使用标记亲和素-生物素法, 操作按试剂盒说明进行。每个指标各选 8 张切片, 分别于 40 倍光学显微镜下随机选择海马 CA₁、CA₃、DG 各 4

【基金项目】 国家科技部“十五”科技计划项目 (2001BA901A49)

【作者单位】 1. 南京医科大学公共卫生学院, 南京, 210029; 2. 西安交通大学医学院; 3. 西北大学

【作者简介】 周明 (1978~), 男, 硕士, 助教, 主要从事妇幼营养研究。

个视野，用图像分析仪测定各亚区 bcl - 2、bax 蛋白表达的平均灰度值。

1.5 细胞凋亡检测 使用 TUNEL 法，操作按试剂盒说明进行。每个剂量组选出 8 张切片，分别于 40 倍光学显微镜下随机选择海马 CA₁、CA₃、DG 各 4 个视野，计数 TUNEL 阳性神经元细胞，以凋亡指数（apoptosis index, AI）来反映各组海马各亚区神经元细胞凋亡的状况。AI = （视野内凋亡细胞个数/ 视野内所有神经细胞） ×100 %。

1.6 数据处理 采用 SPSS10.0 建立数据库并使用单因素方差分析进行统计。

2 结果

2.1 海马不同亚区 bcl - 2 蛋白表达 光镜下观察 bcl - 2 蛋白免疫组化反应物质为棕黄色，细胞呈胞浆着色。在皮层、海马各个区均可见到 bcl - 2 蛋白表达阳性神经元细胞，海马结构中除锥体细胞和颗粒细胞外其它细胞很少表达。对平均灰度值做统计分析，实验组与对照组比较差异有统计学意义，见表 1~3。

表 1 21 d 仔鼠海马神经元 bcl - 2 蛋白表达平均灰度值的比较

分组	脑片数	DG 区	CA3 区	CA1 区
I 组	8	139.66 ±4.85 *	137.32 ±6.19	145.76 ±5.16 *
II 组	8	132.56 ±7.75	137.04 ±3.93	142.01 ±3.78
对照组	8	129.54 ±8.32	136.25 ±3.25	140.05 ±4.01

注：* 为与对照组比较，F = 4.25，3.54，P < 0.05

表 2 28 d 仔鼠海马神经元 bcl - 2 蛋白表达平均灰度值的比较

分组	脑片数	DG 区	CA3 区	CA1 区
I 组	8	143.34 ±2.70 *	148.94 ±2.38 *	142.71 ±6.07 *
II 组	8	135.22 ±5.36 *	140.44 ±2.18 *	138.03 ±5.63
对照组	8	129.09 ±5.84	135.04 ±2.43	135.10 ±5.96

注：* 为与对照组比较，F = 17.50，72.26，3.40，P < 0.05

表 3 35 d 仔鼠海马神经元 bcl - 2 蛋白表达平均灰度值的比较

分组	脑片数	DG 区	CA3 区	CA1 区
I 组	8	155.13 ±8.52 *	129.27 ±1.91 *	144.96 ±1.84 *
II 组	8	146.87 ±4.00 *	120.16 ±6.39 *	140.38 ±4.37 *
对照组	8	120.96 ±3.35	97.81 ±6.92	131.36 ±3.40

注：* 为与对照组比较，F = 76.44，68.11，33.76，P < 0.05

2.2 海马不同亚区 bax 蛋白表达 光镜下观察 bax 蛋白免疫组化反应物质为棕黄色，细胞呈胞浆着色。在皮层、海马各个区均可见到 bax 蛋白表达阳性神经元细胞，海马结构中除锥体细胞和颗粒细胞外其它细胞很少表达。对平均灰度值做统计分析，实验组与对照组比较差异有统计学意义（表 4~6）。

2.3 海马结构细胞凋亡改变 TUNEL 阳性神经元细胞可见细胞核内有棕黄色颗粒，各组的 DG、CA₃、CA₁ 区均可见 TUNEL 阳性神经元细胞，主要分布于锥体细胞和颗粒

细胞层，对照组相应脑区的神经元细胞仅可见极少量 TUNEL 阳性神经元细胞，且着色浅淡。与对照组比较，高碘 I 组凋亡指数增高，高碘 II 组指数虽有增高但差异无统计学意义，见表 7。

表 4 21 d 仔鼠海马神经元 bax 蛋白表达平均灰度值的比较

分组	脑片数	DG 区	CA3 区	CA1 区
I 组	8	138.20 ±4.70	151.75 ±5.85 *	165.36 ±3.08 *
II 组	8	140.14 ±4.04	145.20 ±4.76 *	158.79 ±2.41 *
对照组	8	141.31 ±2.32	126.54 ±2.93	128.15 ±2.62

注：* 为与对照组比较，F = 62.72，427.19，P < 0.05

表 5 28 d 仔鼠海马神经元 bax 蛋白表达平均灰度值的比较

分组	脑片数	DG 区	CA3 区	CA1 区
I 组	8	123.96 ±4.76 *	127.60 ±9.13 *	125.09 ±6.55 *
II 组	8	130.21 ±4.16 *	131.68 ±9.56	128.31 ±5.88 *
对照组	8	159.41 ±2.40	137.57 ±3.56	136.58 ±3.59

注：* 为与对照组比较，F = 187.90，3.21，9.34，P < 0.05

表 6 35 d 仔鼠海马神经元 bax 蛋白表达平均灰度值的比较

分组	脑片数	DG 区	CA3 区	CA1 区
I 组	8	92.52 ±3.25 *	102.88 ±1.78 *	89.72 ±7.40 *
II 组	8	104.22 ±3.10 *	105.10 ±2.84 *	97.31 ±4.85 *
对照组	8	125.72 ±2.47	113.70 ±4.02	117.61 ±5.23

注：* 为与对照组比较，F = 259.05，28.56，47.24，P < 0.05

表 7 35 d 仔鼠大脑海马结构神经元凋亡指数 AI

分组	脑片数	DG 区	CA3 区	CA1 区
I 组	8	10.67 ±2.09 *	8.21 ±1.20 *	9.85 ±2.06 *
II 组	8	7.09 ±1.61 *	5.61 ±1.36	6.05 ±1.46
对照组	8	6.02 ±1.55	4.49 ±1.39	4.42 ±1.32

注：* 为与对照组比较，F = 15.26，16.77，23.01，P < 0.05

3 讨论

Gavieli 等于 1992 年建立 TUNEL 即 DNA 断裂的原位末端标记法，它是检测单个细胞早期出现凋亡现象的较好方法。该法特异性强、灵敏度高，在形态上尚未发生典型凋亡细胞也可以显示，特别适用于检测发生频率较低的凋亡^[3]。许多基因通过自身编码的蛋白发挥诱导或抑制凋亡的作用，bcl - 2 和 bax 是一对正负凋亡调节基因，在中枢和外周神经系统的神经元及甲状腺组织中均有表达^[4]。bcl - 2 基因能阻遏多系统及多种损伤和刺激引起的细胞凋亡，延长细胞的生存期。bax 蛋白既能和 bcl - 2 形成异源二聚体使 bcl - 2 蛋白失活，对细胞凋亡有促进作用，又可以自身形成同源二聚体，直接促进凋亡^[5]。bcl - 2/ bax 的比值决定细胞对凋亡刺激的易感性，决定细胞的生与死。bcl - 2 表达下调，bax 蛋白过量表达，bcl - 2/ bax 下降则促进细胞

(下转第 2230 页)

的推广和正确使用), 减少歧视等。营造有利于预防和控制艾滋病的社会环境, 以建立起有效的艾滋病社会支持体系控制艾滋病的蔓延。

以上各方面的实施, 要依靠多部门的协调合作, 方能建立起适合于本地的社区关怀支持模式。

[参考文献]

- [1] 姜乾金. 医学心理学 [M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2004. 89 - 90.
- [2] 中英性病艾滋病防治合作项目办公室. 四川、云南艾滋病社区关怀与支持形势分析报告 [R]. 北京: 2001. 5 - 52.
- [3] 何华先. PLWHAS 的社区关怀与家庭关怀 [J]. 实用预防医学, 2003, 10 (6): 1030 - 1032.
- [4] Chesney MA, Chambers DB, Taylor JM, et al. Social support, distress, and well - being in older men living with HIV infection [J]. J Acquir Immune Defic Syndr, 2003, 33 (suppl 2): S185 - 193.
- [5] 薛华. 家庭对病人的社会支持与作用 [J]. 护理论坛, 2004, (11): 25.
- [6] Remor E. Social support and quality of life in the HIV infection

[J]. Aten primaria 2002, 30 (3): 143 - 148.

- [7] 傅小鲁, 吴德彬, 欧智勇, 等. 同伴教育对艾滋病的预防效果及评价 [J]. 现代预防医学, 2002, 29 (6): 803 - 805.
- [8] 孙洁, 李武营, 韩丹, 等. 河南省两县农民艾滋病健康教育及效果评估 [J]. 中华流行病学杂志, 2004, 25 (10): 855.
- [9] 郑莉, 郑世凡, 张云, 等. 一个社区干预前后对 HIV/AIDS 社区歧视转变的分析 [J]. 中国艾滋病性病, 2003, 9 (3): 165 - 167.
- [10] van Servellen G, Lombardi E. Supportive Relationships and Medication Adherence in HIV - Infected, Low - Income Latinos [J]. West J Nurs Res. 2005, 27 (8): 1023 - 1039.
- [11] 廖菁, 熊俊浩, 师庆科, 等. HIV 感染者/AIDS 病人及家属的社会支持状况调查 [J]. 美国中华健康卫生杂志, 2003, 6 (6): 16 - 18.
- [12] 石作宏, 胡绍源, 袁飞, 等. 开展 HIV/AIDS 社区支持与关怀可持续性发展的探索 [J]. 贵州医药, 2004, 28 (10): 948 - 949.
- [13] 向德平, 陈琦. 艾滋病患者的社区支持 [J]. 学术论坛, 2004, (3): 141 - 144.

[收稿日期] 2005 -12 -21

(上接第 2226 页)

凋亡, 否则反之^[6]。本研究观察到各龄仔鼠高碘组与对照组比较, bcl - 2 蛋白染色强度降低, bax 蛋白染色强度增高, 提示 bax、bcl - 2 可能参与了高碘诱导海马神经元细胞凋亡的过程。

大量研究证实海马是学习记忆的高级中枢之一。由于海马与学习记忆有密切关系, 以及它广泛的纤维联系, 加之它具有相对简单而高度有序化的层状结构, 故其被广泛用作研究学习记忆的模型部位。有学者认为高碘对神经系统的毒性作用可能和神经元凋亡有关, 杨长春等实验发现高碘通过诱发大脑皮质、海马细胞凋亡的发生而对中枢神经系统造成损伤, 进而影响其功能活动, 并且认为 bcl - 2 及 bax 基因是参与高碘诱发病和甲状腺细胞凋亡调控的重要基因, bax 基因过度表达和 bcl - 2 基因表达下调以及由此引起的 bcl - 2/bax 比值降低可能在高碘诱发病和甲状腺细胞凋亡过程中起重要作用^[7,8]。本研究 TUNEL 染色切片可见, 各组的 DG、CA₃、CA₁ 区均可见 TUNEL 阳性神经元细胞, 对照组相应脑区的神经元细胞仅可见极少量 TUNEL 阳性神经元细胞, 且着色浅淡。提示高碘可引起幼鼠海马神经元细胞凋亡, 而发育期海马神经元的过度凋亡必然会影响海马细微形态结构及突触联系的建立, 进一步损害动物的学习记忆行为。

由于细胞凋亡对机体生长发育、维持细胞总体数量平衡及机体内稳态等具有重要作用, 神经细胞过度凋亡必然会对其结构及功能造成损害。深入研究补碘性高碘对脑细

胞凋亡的基因调控机制, 有助于从基因水平认识它对中枢神经系统损伤的机制, 有望对其防治提出新的思路。

[参考文献]

- [1] 张志峰, 王振林, 张瑞娟, 等. 秦巴山区孕妇乳母碘营养状况 [J]. 中国地方病学杂志, 2001, 20: 201 - 203.
- [2] Delange F. Administration of iodized oil during pregnancy: a summary of the published evidence [J]. Bull world health organ, 1996, 74: 101.
- [3] Garieli Y, Sherman V, Ben - Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation [J]. J cell Biol, 1992, 119: 493 - 498.
- [4] Krajewski S, Krajewska M, Shabai A, et al. Immunohistochemical determination of in vivo distribution of bax, a dominant inhibitor of bcl - 2 [J]. Am J Pathol, 1994, 145: 1323 - 1336.
- [5] Steller H. Mechanism and genes of cellular suicide [J]. Science, 1995, 267: 1445 - 1449.
- [6] Oltvai ZN, Mlliman CL, Korsmeyer SJ. bcl - 2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, bax that accelerates programmed cell death. cell [J]. 1993, 74: 609 - 619.
- [7] 杨长春, 尹桂山, 朱惠民, 等. 高碘对豚鼠脑和甲状腺细胞凋亡影响的实验研究 [J]. 中国地方病学杂志, 2000, 19: 342 - 344.
- [8] 杨长春, 尹桂山, 崔灵光. 高碘对豚鼠脑和甲状腺细胞凋亡及调节基因表达的影响 [J]. 中华预防医学杂志, 2000, 34: 95 - 97.

[收稿日期] 2005 -11 -14