

· 基础研究 ·

微波辐射对大鼠海马线粒体 COX 基因表达的影响

赵黎 彭瑞云 高亚兵 王水明 王晓民 徐新萍 王丽峰 董霖

【摘要】目的 探讨微波辐射后大鼠海马线粒体呼吸链相关基因细胞色素 C 氧化酶(COX)表达的变化。**方法** 采用 30 mW/cm² 微波辐射 30 只雄性 Wistar 大鼠,于辐射后 6 h、1 d、3 d 和 7 d 活杀取海马,采用逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)和图像分析检测大鼠海马组织 COX 亚基 I、II 和 IV mRNA 表达变化,通过 Western Blot 和图像分析检测大鼠海马组织 COX I 蛋白表达变化。**结果** 辐射后大鼠海马 COX I 与 II mRNA 变化规律相似,即与假辐射组相比,于辐射后 6 h 减少,1 d 增加,3 d 和 7 d 见恢复;COX IV mRNA 于辐射后 1 d 表达增加,3 d 和 7 d 见恢复;大鼠海马 COX I 蛋白于辐射后 6 h 略降低,1 d 显著降低($P < 0.05$),3 d 见增加,7 d 基本恢复。**结论** 微波辐射后大鼠海马线粒体呼吸链相关基因 COX 表达降低,可能参与其能量代谢障碍的病理生理过程。

【关键词】 微波辐射; 大鼠; 海马; 线粒体; 相关基因细胞色素 C 氧化酶

The changes of the COX gene expression in mitochondria in hippocampus of rats after exposure to microwave radiation ZHAO Li, PENG Rui-yun, GAO Ya-bing, WANG Shui-ming, WANG Xiao-ming, XU Xin-ping, WANG Ling-feng, DONG Ji. Institution of Radiation Medicine, Beijing 100850, China

Corresponding author: PENG Rui-yun, Email: pengry@nic.bmi.ac.cn

【Abstract】Objective To study gene expression of cytochrome c oxidase (COX) subunit in hippocampus of rats after microwave exposure. **Methods** Thirty male Wistar rats were exposed to microwave radiation at 30 mW/cm². Rats were sacrificed at 6 h, 1 d, 3 d and 7 d after exposure. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and image analysis were used to study the expression of COX I, II and IV mRNA. The expression of COX I protein was detected by Western Blot and image analysis. **Results** The changes of COX I and II mRNA had the similar regular pattern which were decreased at 6 h after exposure and increased at 1 d, while retrieved 3 d after. The expression of COX IV mRNA was increased at 1 d, while retrieved 3 d and 7 d after. The expression of COX I protein was a little decreased at 6 h, and decreased at 1 d significantly ($P < 0.05$), while increased at 3 d and retrieved at 7 d. **Conclusion** It manifested that COX I, II and IV of the mitochondria influenced energy production and participated in the process of dysbolism.

【Key words】 Microwave; Rat; Hippocampus; Mitochondria; COX

近年来,微波技术发展很快,其在军事与民用领域的应用日益广泛,同时,微波污染也是当今社会十分关注的问题。微波辐射环境污染已经成为继大气、水和噪声污染之后第四大公害。微波具有明显的中枢神经系统损伤效应,海马是微波辐射的敏感部位之一^[1],是重要的研究靶标,线粒体是最早出现病理改变的细胞器之一。传递电子和产生 ATP 是线粒体的主要功能,均与氧化磷酸化及其分子结构基础呼吸链密切相关^[2]。因此,本研究从大鼠海马线粒体呼吸链相关基因细胞色素 C 氧化酶(cytochrome c oxidase, COX) I、II 和 IV 转录水平及 COX I 翻译水平变化探讨微波辐射后线粒体能量代谢异常的分子机制。

材料与方法

一、实验动物分组及辐射方法

二级雄性 Wistar 大鼠 30 只,体重(200 ± 20)g,随机分为假辐射组($n = 6$)和 30 mW/cm² 辐射组($n = 24$),辐射组再依据辐射后 6 h、1 d、3 d 和 7 d 四个时间点,分为 4 个亚组($n = 6$)。辐射组大鼠采用脉冲微波源,辐射的平均功率密度为 30 mW/cm²。辐射台旋转以保证全身均匀辐射,辐射时间为 5 min。

二、海马线粒体制备

采用高纯度线粒体提取试剂盒(上海杰美基因医药有限公司)提纯线粒体。主要步骤如下:用刀片切碎组织,加入裂解液后涡旋震荡 5 s,匀浆后 4℃、3 000 r/min 离心 10 min,取上清 4℃、11 000 r/min 离心 10 min,取沉淀加入纯化液,4℃、16 000 r/min 离心 45 min,小心抽取中间乳黄色样品带加入保存液后

基金项目:军队医药卫生“十一五”专项基金(06Z065)

作者单位:100850 北京,军事医学科学院放射与辐射医学研究所

通讯作者:彭瑞云,Email: pengry@nic.bmi.ac.cn

4℃、11 000 r/min 离心 10 min。BCA 法蛋白定量,分装后 -20℃ 保存,保存时间不超过 2 周。

三、RT-PCR 方法检测海马组织中 COX I、II 和 IV mRNA

1. RNA 提取:采用 Trizol (美国 Invitrogen 公司) 一步法提取各组大鼠海马组织中总 RNA^[3]。

2. 反转录:以 RNA 为模板,禽类成髓细胞瘤病毒 (avian myeloblastosis virus, AMV) 逆转录酶合成 cDNA 第一链 (上海生工生物工程技术有限公司)。

3. PCR 扩增:以 cDNA 为模板,β-肌动蛋白 (β-actin) 为内参照,采用以下引物进行 PCR 扩增 (PCR reaction Mix, 天根生化科技有限公司), β-actin (上游为 5'-GGGTATGGAATCCTGTGG-3', 下游为 5'-TCTTGATCTTCATG GTGCTA-3', 166 bp); COX I (上游为 5'-GCTTCGGAAACTGACTTGTACC-3', 下游为 5'-GCTGCTAATACTGGCAGTGAGA-3', 415 bp); COX II (上游为 5'-AAGA CGCTACATCACCTAT-3', 下游为 5'-AAGACTACCCGATTATCAA-3', 385 bp); COX IV (上游为 5'-CTTATGTTGATCGGCGTGACTACC-3', 下游为 5'-CATGGACCA TTGGACACAGC-3', 454 bp)。反应条件为 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 72℃ 最后延伸 10 min, 21 或 26 个循环。退火温度分别为 β-actin 56℃、COX I 58℃、COX II 58℃、COX IV 56℃。扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳。

四、Western Blot 方法检测海马组织中 COX I 蛋白表达

40 μg 线粒体蛋白与变性缓冲液 [0.1 M Tris 碱缓冲液 (pH 6.8), 4% 十二烷基硫酸钠, 10% B-巯基乙醇, 20% 甘油, 0.01% 溴酚蓝, 双蒸水] 混合, 95℃ 加热 10 min, 冰上冷却或 -20℃ 保存, 行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (浓缩胶 5%, 分离胶 8%)。电泳结束后, 切下 Marker 所在的胶条, 样品所在的凝胶做转膜, 5% 脱脂奶粉常温封闭, 4℃ 过夜, 依次与鼠抗 COX I (1:500) 或兔抗 β-actin (1:1 000)、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 或羊抗兔 IgG (1:5 000) 作用, 常规曝光显影定影。

五、图像分析及定量方法

应用 CMIAS-II 图像分析仪 (德国 Leica 公司) 检测指标如下: (1) β-actin、COX I、II 和 IV RT-PCR 产物电泳条带 MOD 值, 然后以样本/内参照的比值表示 COX I、II 和 IV mRNA 表达水平; (2) COX I 和 β-actin Western Blot 结果扫描条带 MOD 值, 然后以样本/内参照的比值表示 COX I 蛋白表达水平。

六、统计学分析

数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SARS 8.0 版软件进行统计分析。

结 果

一、微波辐射后大鼠海马组织 COX I、II 和 IV mRNA 表达变化

1. COX I mRNA: 辐射后 6 h 大鼠海马 COX I mRNA 表达减少 ($P < 0.05$), 辐射后 1 d 增加, 3 d 和 7 d 逐渐恢复, 见图 1 及 4。表明微波辐射后大鼠海马 COX I mRNA 表达呈先减少后恢复的过程。

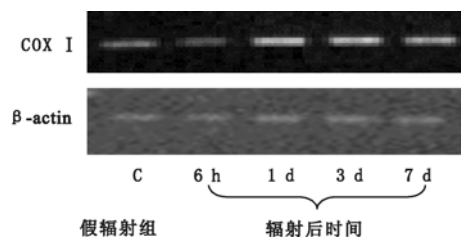


图 1 微波辐射后大鼠海马组织 COX I mRNA 表达变化

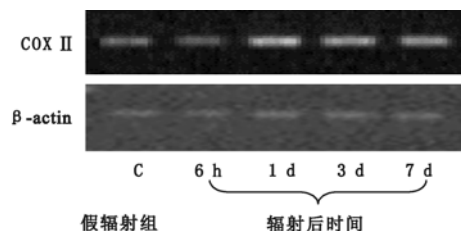


图 2 微波辐射后大鼠海马组织 COX II mRNA 表达变化

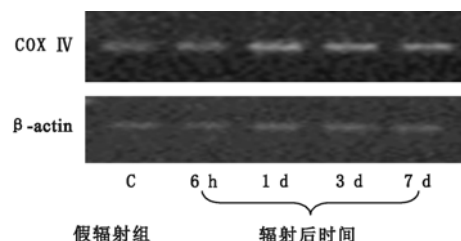


图 3 微波辐射后大鼠海马组织 COX IV mRNA 表达变化

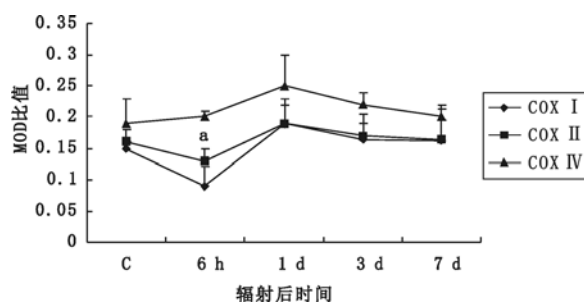


图 4 微波辐射后大鼠海马组织 COX I、II 和 IV 与 β-actin mRNA MOD 比值变化

2. COX II mRNA: 辐射后大鼠海马 COX II mRNA 与 COX I mRNA 变化规律相似, 即与假辐射组相比, 于辐射后 6 h 减少, 辐射后 1 d 增加, 3 d 和 7 d 逐渐恢复, 见图 2 及 4。表明微波辐射后大鼠海马 COX II mRNA 呈先减少后恢复的过程。

3. COX IV mRNA: 辐射后 1 d 大鼠海马 COX IV mRNA 表达增加, 3 d 和 7 d 逐渐恢复, 见图 3 及 4。表明微波辐射后大鼠海马 COX IV mRNA 表达呈先增加后恢复的过程。

4. 图像分析结果: 图像分析结果与电泳结果一致。

二、微波辐射后大鼠海马组织 COX I 蛋白表达变化

辐射后 6 h, 大鼠海马 COX I 与假辐射组相比略降低, 1 d 显著降低 ($P < 0.05$), 3 d 见增加, 7 d 基本恢复, 见图 5 及 6。表明微波辐射后大鼠海马内 COX I 蛋白的表达呈先降低后恢复的过程。

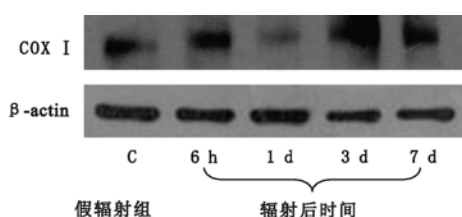


图 5 辐射后大鼠海马组织 COX I 蛋白表达水平变化

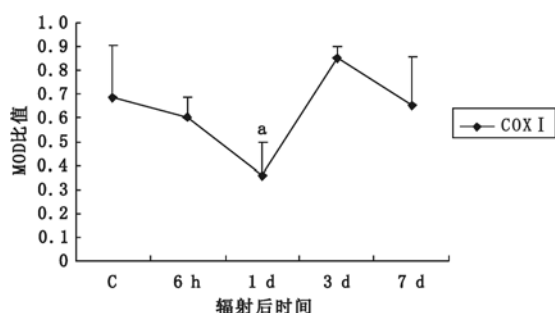


图 6 辐射后大鼠海马组织 COX I 与 β -actin MOD 比值变化

讨 论

线粒体作为细胞内进行呼吸和能量转换的场所, 其正常功能的发挥与氧化磷酸化作用密切相关, 而线粒体呼吸链是氧化磷酸化的分子结构基础。COX 作为线粒体呼吸链电子传递的终末复合物, 是整个呼吸链的限速酶^[2]。由于神经元活性与有氧能量代谢的密切关系, 使 COX 成为神经元的内源性代谢标志, 其功能的丧失意味着呼吸电子链的中断及氧化磷酸化障碍^[4]。哺乳动物 COX 由 13 个亚基组成, 各亚基在 COX 活性发挥中扮演不同的角色, 其中 COX I 构成酶催化中心, COX II 是结合细胞色素 c 的中心部位, 二者均由线粒体基因组编码, COX IV 通过多个 ATP、ADP 结合位点, 参与能荷对酶活性的调节, 由细胞核基因组编码^[5]。功能各异的各亚基是细胞内外环境改变、代谢需求变化等生理或病理因素对 COX 活性调节的分子基础。

有研究采用 3 mW/cm^2 和 30 mW/cm^2 微波辐射大鼠 1 h, 发现大鼠海马及皮质 COX I mRNA 表达降低, COX IV mRNA 表达未见显著变化, 3 mW/cm^2 组变化均不明显, 表明其间可能存在剂量依赖关系^[6]。但微波辐射对 COX 几个大亚基转录及蛋白水平影响的动态变化规律尚未见报道。

本研究采用 30 mW/cm^2 微波辐射大鼠, 见海马组织 COX I 和 II mRNA 在辐射后 6 h 表达减少, 辐射后 1 d 增加, 3 d 和 7 d 见恢复, 而 COX IV mRNA 于辐射后 1 d 表达增加, 3 d 和 7 d 见恢复, COX I 蛋白表达于辐射后 3 d 降低, 7 d 基本恢复, 提示在转录水平上微波辐射对线粒体基因组编码亚基损伤效应更明显, 且转录和翻译水平均受到影响, 可能由此导致酶的活性改变, 并最终引起能量代谢障碍, 而核基因组编码亚基可能通过发挥调节作用促使损伤恢复。辐射后, 酵解增强, 产生的乳酸通过 NAD、黄素单核苷酸体系对 COX 有间接激动作用。COX 亚基活性在组织中出现表达一致性, 可能是核和线粒体转录水平的协同作用所致, COX I mRNA 的表达下降, 从一定程度上反映了线粒体基因组的功能障碍, 提示细胞能量合成受阻, 从而可能引起膜电位丧失, 膜通透性加大。COX 的表达紊乱, 其机制也可能与氧自由基增多有关^[7]。

组织中大量 mRNA 被转录, 但有可能使被翻译成相关蛋白质时间延迟, 故蛋白表达在 3 d 时出现降低; 同时, 在线粒体基因组与核基因组可能有不同的调节方式, 其详尽机制尚待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Tattersall JE, Scott IR, Wood SJ, et al. Effects of low intensity radio frequency electromagnetic fields on electrical activity in rat hippocampal slices. *Brain Res*, 2001, 904: 43-53.
- [2] 汪堃仁, 薛绍白, 柳惠图. 细胞生物学. 2 版. 北京师范大学出版社, 2004: 167-202.
- [3] Xiang CC, Chen M, Ma L, et al. A new strategy to amplify degraded RNA from small tissue samples for microarray studies. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31: 53-58.
- [4] Grossman LI, Schmidt TR, Wildman DE, et al. Molecular evolution of aerobic energy metabolism in primates. *Mol Phylogenet Evol*, 2001, 18: 26-36.
- [5] Chandrasekaran K, Hatanpää K, Rapoport SI, et al. Decreased expression of nuclear and mitochondrial DNA-encoded genes of oxidative phosphorylation in association neocortex in Alzheimer disease. *Brain Res Mol Brain Res*, 1997, 44: 99-104.
- [6] 谢燕, 江海洪, 龚茜芬, 等. 微波对大鼠脑线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基转录水平的影响. *第三军医大学学报*, 2003, 25: 987-989.
- [7] 陆松敏. mtDNA 与缺血缺氧性细胞损伤及疾病的关系. *中国病理生理杂志*, 2001, 17: 1104-1105.

(修回日期: 2007-12-11)

(本文编辑: 阮仕衡)