

· 综述 ·

微波辐射影响血脑屏障通透性的物质基础及相关研究方法

李翔 胡向军 彭瑞云

随着现代科学技术的迅猛发展,公众越来越多地暴露于各种电器(如移动电话)所带来的电磁辐射中,其中微波已成为人们日常生活中不可避免的一种电磁波污染源。据相关研究表明,中枢神经系统是微波作用的敏感靶部位之一。血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)作为介于血液和脑组织之间的重要防御结构,其通透性改变在微波辐射致脑损伤过程中具有重要作用。

近几十年来,有关微波辐射对血脑屏障通透性影响的研究主要集中在频率为 0.9 ~ 3.0 GHz,比吸收率(specific absorption rate, SAR)为 0.1 ~ 240 W/kg 体重范围内的连续波和脉冲波^[1]。本文根据目前检索到的文献,就微波辐射后 BBB 结构和功能的改变、微波对 BBB 通透性的影响机制以及相关的研究方法等进行综述。

微波辐射后 BBB 结构和功能改变

机体 BBB 有三层结构,即脑毛细血管内皮细胞(brain microvessel endothelial cells, BMECs)、基膜和胶质细胞足突。发挥屏障作用的主要是毛细血管内皮细胞,该细胞具有极高的跨内皮电阻,其细胞间有紧密连接(tight junction, TJ),缺乏窗口和胞饮泡等。

与其它因素所致 BBB 改变比较,目前关于微波辐射引发 BBB 病理改变的研究报道相对较少。在 20 世纪 80 年代初期,有研究结果发现,实验大鼠经微波辐射后,其 BBB 病理改变出现较早且恢复迅速,因此不易进行细致观察。近年来研究表明,实验大鼠经 10 ~ 100 mW/cm² 高功率微波辐射 2 ~ 5 min 后,均可导致其 BBB 结构发生改变,表现为脑部血管扩张、毛细血管周隙增宽、毛细血管内皮细胞 TJ 模糊、线粒体空化、星形胶质细胞足突水肿等;而 BBB 功能紊乱则表现为毛细血管内皮细胞吞饮小泡增加、对指示剂的通透性增加,神经细胞、胶质细胞和毛细血管内皮细胞均有损伤,导致实验大鼠混合型脑水肿。因此本文认为,实验动物经高强度微波辐射后,在 BBB 中起关键作用的毛细血管内皮细胞 TJ 结构将发生改变,脑部血管易出现严重病变,如水肿或出血等^[2,3]。

微波辐射影响 BBB 通透性的物质基础

微波辐射对 BBB 的损伤效应主要是其物理作用的结果,因此脑毛细血管内皮细胞间的 TJ 可能是使 BBB 通透性发生改变的重要部位。TJ 主要由跨膜蛋白和胞膜相关蛋白构成,目前已发现的 TJ 跨膜蛋白包括闭合蛋白(claudin)、咬合蛋白(ecludin)和连接黏附分子(junctional adhesion molecule, JAM);胞质附着蛋白包括闭锁小带蛋白(zonula occludens, ZO)和扣带蛋白^[4]。此外,细胞骨架(主要是微丝)也是组成 TJ 的重要部分^[5]。

许多因素均能引发 BBB 中 TJ 结构发生变化,但目前关于微波对其产生影响的报道较少。本实验室既往采用 30 和 100 mW/cm² 的高功率微波对实验大鼠进行 5 min 辐射,随后运用免疫组化、原位杂交及 RT-PCR 方法检测到大鼠脑皮质内 Occludin 和 ZO-1 基因表达水平降低,脑皮质和海马神经元胞浆内纤维生长因子-2(fibroblast growth factor-2, FGF-2)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、低氧诱导因子 1 α 亚基(hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)及诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)表达水平均增强,星形胶质细胞胶质纤维酸性蛋白(glio-fibrillary acidic protein, GFAP)表达增加^[1],提示上述因子均可能参与了微波辐射后 BBB 损伤的病理生理过程。近年来国内、外有学者对此进行了研究,发现其影响机制可能与下列因素有关。

一、跨膜蛋白 Occludin 和胞质附着蛋白 ZO

Occludin 是较早被分离出的 TJ 跨膜蛋白之一,它直接参与脑微血管内皮细胞 TJ 的形成,而 ZO 是第一个被证实的 TJ 胞质附着蛋白,它与 Occludin 的 C 端及 claudin 相互作用,将跨膜蛋白和细胞骨架连接在一起,是支持结构的物质基础。Kaya 等^[6]发现,微波辐射可以降低 TJ 跨膜蛋白 Occludin 和 ZO-1 的表达水平,从而增加 BBB 通透性。跨膜蛋白 Occludin 和胞质附着蛋白 ZO 作为 TJ 结构中的重要分子,也是微波辐射致 BBB 损伤中重点研究的对象之一,但目前公开报道仍不多见。

二、细胞因子 VEGF、HIF-1 α

VEGF 是近年来发现的一种促血管内皮细胞有丝分裂因子,在正常情况下脑内仅有少量表达。当受到某种损伤刺激(如缺氧、炎症、肿瘤等)时,机体 VEGF 表达水平增加,这可能是机体的一种内源性保护机制。HIF-1 作为机体适应缺氧环境公认的主要调节者之一,经微波辐射后其表达水平异常增加,提示这一物理因素有可能导致机体缺氧。Nordal 等^[7]发现,实验大鼠经微波辐射后,其脑皮质 VEGF 及 HIF-1 α 出现增量调节,并且机体 BBB 通透性明显增加,此实验结果证实了上述两种因子与微波辐射后 BBB 通透性改变有关。

三、星形胶质细胞相关分子 GFAP、iNOS 和 AQP-4

在 BBB 的三层结构中,星形胶质细胞足突也是一个关键部位。杨瑞等^[3]采用强度为 12 mW/cm² 微波辐射实验大鼠 3 d 后,发现其海马组织中沿星形胶质细胞突起分布的 GFAP 阳性表达水平显著增强。有文献报道,微波辐射可诱导 iNOS 表达增多,星形胶质细胞可通过 iNOS 生成过量的 NO,从而损伤血管内皮细胞,增加 BBB 通透性^[8]。水通道蛋白-4(aquaporin-4, AQP-4)是水通道蛋白膜中的一种,广泛分布于中枢神经系统的胶质细胞和室管膜上皮细胞中,尤其集中于星形胶质细胞足突处。Ke 等^[9]通过研究发现,在局灶性脑损伤中,当发生血管性脑水肿时,机体 BBB 通透性增加, AQP-4 表达增强;而当发生细胞毒性脑水肿时, BBB 未见损伤,同时 AQP-4 表达水平亦未见明显改

变,表明机体发生脑水肿时 AQP-4 升高可能与 BBB 的破坏存在直接联系。目前关于微波辐射对 AQP-4 的影响尚未见公开报道。

四、钙离子(Ca^{2+})

有实验研究发现,微波辐射能将细胞膜击穿并形成孔道,细胞外 Ca^{2+} 通过此类孔道进入细胞内,引起胞内 Ca^{2+} 水平升高^[10];而胞内 Ca^{2+} 水平升高可引起信号通路中的级联放大效应,通过激活细胞内蛋白激酶 A、蛋白激酶 C 和环磷酸腺苷反应元件结合蛋白等引起基因转录和表达水平改变,进而引发 BBB 构成分子表达及分布发生相应变化。上述通路是否真实存在、其效能如何等还需进一步研究。

五、其它因素

除上述作用因素外,维持 BBB 蛋白稳态的纤状肌动蛋白 F-actin 和细胞骨架中的微管蛋白以及基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase, MMP-9)等均与 BBB 的通透性密切相关^[11],但微波辐射对上述因子的影响尚鲜见公开报道。

关于微波辐射影响 BBB 通透性的研究方法

到目前为止,针对微波辐射影响 BBB 通透性的研究方法主要分为体内研究和体外研究两大类。

一、体内研究

即建立动物模型,采用完整动物进行实验,其优点是保持了器官的完整性,维持了器官本来的三维结构;但体内研究的缺点是实验中机体器官均不同程度受到损伤,并且实验过程较为繁杂。目前体内研究 BBB 通透性的方法主要有干-湿称重法、伊文思蓝染色法和硝酸镧电镜示踪法 3 种。

1. 干-湿称重法:以往在研究放射性脑损伤时,多采用干-湿称重法^[12]来判断 BBB 的破坏程度,即将实验动物断头处死取脑后吸去脑表面液体,称得湿重,然后再将其置入烘箱中烘干称得干重,两者之差与湿重之比即为脑含水量,从而判断 BBB 的破坏程度,但此方法结果有明显的滞后性和欠精确性等缺陷。因此近年来多数学者开始采用伊文思蓝(Evans blue, EB)作为体内研究 BBB 的示踪剂,效果较理想。

2. 伊文思蓝染色法:EB 是一种深蓝色的粉末状染料,入血后即迅速完全与白蛋白结合,白蛋白的相对分子质量为 67 000,正常情况下不能透过 BBB。当机体因各种因素导致 BBB 通透性增加时,结合 EB 的白蛋白可通过 BBB 进入脑组织内,在荧光显微镜下呈红色荧光反应。王琦等^[13]采用静脉注射 EB 的方法,在荧光显微镜下观察到脉冲式电磁辐射能诱发实验大鼠 BBB 开放,其脑组织局部呈现荧光斑,随着脉冲次数(25~200 次)的增加,荧光斑数量也逐步增加、面积增大。Gyung 等^[11]采用相同方法,向实验大鼠静脉内注射 EB 后,在荧光显微镜下观察到外渗的 EB 在血管周围和神经细胞膜上显示为红色荧光,其强弱水平随 BBB 破坏程度不同而各异。除上述研究进行的定性观察外,EB 染色法还可用于定量分析。唐宇平等^[12]采用伊文思蓝甲酰胺法,通过分光光度计(波长 632 nm)测定上清液 OD 值,根据标准曲线计算出各时间点 EB 含量,从而观察不同组别间的 BBB 损伤差异。由于此方法检测 BBB 通透性的精确度较高,因此被广为应用。

3. 硝酸镧电镜示踪法:镧离子是一种高密度重金属离子,粒径约 4 nm,在机体正常情况下不能通过细胞膜与细胞 TJ。当因外界各种因素致脑损伤后,细胞发生水肿, BBB 开放,细胞膜的通透性

明显增大,使得镧颗粒得以通过 TJ、细胞膜、线粒体膜等膜系统,从而分布于细胞间隙及神经组织内,在透射电镜下表现为黑色致密颗粒,可以示踪病理情况下 BBB 中 TJ 的开放状态。王昊等^[14]利用动物低压舱,模拟 5 000 m 高空低压环境使大鼠急性缺氧暴露 5 h 后,立即对其心脏灌注硝酸镧固定液,制成大鼠 BBB 通透性改变模型,并提取组织标本置于透射电镜下观察其形态学变化,发现镧颗粒通过大鼠脑皮质毛细血管内皮细胞膜并沉积于血管周围,弥漫分布于脑神经细胞、间质细胞间隙中,神经细胞膜上也有附着;而正常对照组大鼠镧颗粒仅滞留于大脑皮质毛细血管腔内。Luciana 等^[15]也采用硝酸镧作为检测 BBB 通透性的示踪剂,得到与上述实验一致的结果。可见,硝酸镧作为检测 BBB 中 TJ 开放状态的示踪剂,已被国内、外学者广泛认可并采用。

目前体内研究微波辐射影响 BBB 通透性主要采用上述三种经典方法,其中干-湿称重法可测定脑含水量,硝酸镧和伊文思蓝都能用作指示剂,可客观、准确检测 BBB 中 TJ 的开放状态,也有文献称采用荧光素钠或辣根过氧化物酶等物质进行 BBB 通透性研究,但相关的报道较为少见^[15]。

二、体外研究

建立体外模型进行研究的优点包括:研究部位直观明确、细胞培养周期短且能长期生存发育等;不足之处在于缺乏细胞真实的生长环境,不能很好地模拟体内实际状况。目前体外研究 BBB 通透性的方法主要包括以下 3 种。

1. 脑微血管片段模型:1973 年有学者成功分离了脑微血管片段,并且发现在新鲜分离的血管片段中,脑毛细血管内皮细胞结构特点(如具有低通透性的 TJ、缺少窗孔结构等)均得到了较好保留^[16]。此后直至 90 年代,新鲜分离的脑微血管片段曾被广泛用于离体 BBB 模型研究。

2. 脑毛细血管内皮细胞模型:体外培养的脑毛细血管内皮细胞模型较之前阶段的模型具有明显优点,首先培养的内皮细胞可在体外融合成致密单层细胞,细胞间紧密相连,与在体状态非常相似;其次内皮细胞可长期处于存活状态,并保留一定的生理机能。Franke 等^[17,18]将人工培养的猪脑毛细血管内皮细胞作为体外 BBB 模型,然后采用频率为 1 800 MHz 的全球移动通信系统(global system for mobile communication, GSM)对该模型进行辐射,整个模型在平均电场强度为 3.4~34.0 V/m(最大值为 1.8 W/kg 体重)的环境下连续接受辐射 84 h,并确保未发生热效应。实验结果发现移动电话信号辐射对体外 BBB 模型未造成明显影响;但该模型也有一定缺陷,现已证实离体培养的脑毛细血管内皮细胞已部分丧失了其在体状态下的一些重要特性,如 TJ 通透性增高、特异性抗原表达水平减弱等,且这些问题将随细胞的传代而进行性加重。

3. 脑毛细血管内皮细胞和星形胶质细胞共同培养模型:有研究表明,将人脐静脉内皮细胞移植到裸鼠脑内,也可形成具有完整 BBB 特性的微血管^[19]。这一发现提示星形胶质细胞是形成 BBB 的一个必要条件,同时也解释了为何离体培养的脑毛细血管内皮细胞会逐渐丧失 BBB 特性,并为解决这一问题提供了解决方案,即将星形胶质细胞和脑毛细血管内皮细胞共同培养。Schirmacher 等^[20]采用由小鼠星形胶质细胞和猪脑毛细血管内皮细胞制成的 BBB 模型来检测其通透性,发现经 800 MHz 微波辐射后, BBB 通透性增加。除微波实验外, Terasaki 等^[21]也采用胶质细胞与脑毛细血管内皮细胞共培养的方法进行新药通道的

开发研究,以探寻药物通过 BBB 并作用于脑组织的新途径。由于星形胶质细胞可诱导内皮细胞形成 TJ 并产生较高的跨内皮阻抗,与体内 BBB 结构基础较接近,加之一种新型微孔底膜插入式培养皿的出现,可以预测此类体外 BBB 模型拥有广阔的发展前景。

综上所述,针对微波影响 BBB 通透性的研究方法历经了从宏观到微观,由在体到离体的不同发展阶段,随着科学技术的不断提高,关于微波辐射对 BBB 通透性影响及其机制的研究将会进入一个新的发展阶段。

展 望

BBB 通透性改变是中枢神经系统功能紊乱的病理基础,通过对微波辐射后 BBB 通透性改变进行研究,可以从作用机制方面深入探讨微波辐射对中枢神经系统的影响;然而由于微波的各种参数不同、研究所采用的实验方法各异以及生物系统本身的复杂性和个体差异性,致使各项实验结果缺乏重复性和一致性。因此,如何完善微波辐射影响 BBB 通透性的研究方法、在实验中寻找敏感指标显得尤为重要,特别是须尽快建立起有效的体外模型,以弥补体内模型的局限性,全方位研究不同参数微波及不同辐射时间对 BBB 通透性的影响,更深入、系统地探讨 BBB 损伤的作用机制。

参 考 文 献

- [1] 王旭,胡向军,彭瑞云.微波辐射对血脑屏障的影响.中华物理医学与康复杂志,2005,27:505-506.
- [2] 王旭,胡向军,彭瑞云,等.高功率微波辐射对大鼠血脑屏障的影响.军事医学科学院院刊,2006,3:24-27.
- [3] 杨瑞,彭瑞云,高亚兵,等.高功率微波辐射对大鼠海马的损伤效应.中华劳动卫生职业病杂志,2004,22:211-214.
- [4] Gonzalez-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, et al. Tight junction proteins. Prog Biophys Mol Biol, 2003, 81:1-44.
- [5] Ballabh P, Braun A, Nedergaard M, et al. The blood-brain barrier: an overview structure regulation and clinical implications. Neurobiol Dis, 2004, 16:1-13.
- [6] Kaya M, Palanduz A, Kalayci R, et al. Effects of lipopolysaccharide on the radiation-induced changes in the blood brain barrier and the astrocytes. Brain Res, 2004, 1019:105-1112.
- [7] Nordal RA, Nagy A, Pintilie M, et al. Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 target genes in central nervous system radiation injury: a role

- for vascular endothelial growth factor. Clin Cancer Res, 2004, 10: 3342-3353.
- [8] 范有明,高钰琪,张国斌,等.缺氧对大鼠大脑皮质星形胶质细胞 iNOS mRNA 表达的影响.中国应用生理学杂志,2003,19:12-15.
- [9] Ke C, Poon WS, Ng HK, et al. Heterogeneous responses of aquaporin-4 in oedema formation in a replicated severe traumatic brain injury model in rats. Neurosci Lett, 2001, 301:21-24.
- [10] Wieraszko A. Dantrolene modulates the influence of steady magnetic fields on hippocampal evoked potentials in vitro. Bioelectromagnetics, 2000, 21:175-182.
- [11] Gyung W, Gasche Y, Grzeschik S, et al. Neurodegeneration in striatum induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: role of matrix metalloproteinase-9 in early blood-brain barrier disruption. Neuroscience, 2003, 23:8733-8742.
- [12] 唐宇平,蔡定芳,刘军,等.大黄改善急性脑出血大鼠血脑屏障损伤的水通道蛋白-4 机理研究.中国中西医结合杂志,2006,26:152-156.
- [13] 王琦,任东青,邝芳,等.脉冲式电磁辐射对大鼠血脑屏障影响的量效关系.疾病控制杂志,2003,7:401-404.
- [14] 王昊,沈俊,王庆蓉,等.血脑屏障通透性改变的动物模型建立.航空军医,2001,29:237-238.
- [15] Luciana P, Carla B, Alice M. Mechanisms involved in the blood-brain barrier increased permeability induced by phoneutria nigriventer spider venom in rats. Brain Res, 2004, 27:38-47.
- [16] 田成林,蒲传强.血脑屏障模型的建立与评价.国外医学神经病学神经外科学分册,2002,29:97-100.
- [17] Franke H, Streckert J, Bitz A, et al. Effects of universal mobile telecommunications system (UMTS) electromagnetic fields on the blood-brain barrier in vitro. Radiat Res, 2005, 164:258-269.
- [18] Franke H, Ringelstein EB, Stogbauer F. Electromagnetic fields (GSM 1800) do not alter blood-brain barrier permeability to sucrose in models in vitro with high barrier tightness. Bioelectromagnetics, 2005, 26:529-535.
- [19] Akiyama H, Kondoh T, Kokunai T, et al. Blood-brain barrier formation of grafted human umbilical vein endothelial cells in athymic mouse brain. Brain Res, 2000, 858:72-176.
- [20] Schirmacher A, Winters S, Fischer S, et al. Electromagnetic fields (1.8 GHz) increase the permeability to sucrose of the blood-brain barrier in vitro. Bioelectromagnetics, 2000, 21:338-345.
- [21] Terasaki T, Ohtsuki S, Hori S, et al. New approaches to in vitro models of blood-brain barrier drug transport. Drug Discov Today, 2003, 8:944-954.

(修回日期:2007-08-19)

(本文编辑:易 浩)

· 消息 ·

首届亚洲和大洋洲物理医学与康复医学学术会议将在中国举办

由亚太地区物理医学与康复医学学会主办、中国康复医学会和中华医学会物理医学与康复学分会承办的第一届亚洲和大洋洲物理医学与康复医学学术会议(1st Conference of the Asian Oceania Society of Physical and Rehabilitation Medicine)将于2008年5月16-19日在南京召开。这将在中国举办的第一个国际性物理医学与康复医学学术组织的大型国际学术会议。

本次学术大会的主题是“传统与现代结合,为残疾者塑造更好的明天”。大会将邀请众多国际知名专家和学者做精彩的学术报告。会议将以大会报告、分会报告、专题研讨、继续教育讲座、壁报交流、卫星会议、产品展示会等多种形式交叉进行。届时,大会还将进行优秀青年论文奖评选活动。大会正文活动已经正式展开,凡是有关物理医学与康复医学领域的基础理论和临床应用研究的新成果和新进展的文章,均在欢迎之列。请登陆大会网站了解有关投稿事项和投稿。凡被大会录取的论文摘要,均将刊登在 Journal of Rehabilitation Medicine 2008 年 4 月份增刊上,该刊是 SCI 收录的学术刊物。

会议日期:2008 年 5 月 16-19 日;会议地点:南京钟山宾馆;会议语言:英语(部分分会场采用中文交流形式);会议咨询热线:010-62174061,62103104,62180141;会议网址:www.aocprm2008.com;秘书处:北京市海淀区学院南路 86 号东楼 717, 100081, 中国国际科技会议中心;传真:10-62180141/2, Email: info@aocprm2008.com;投稿及注册:请登录 www.aocprm2008.com 进行网上投稿注册。