

· 基础研究 ·

电磁辐射对大鼠小脑蛋白激酶 C 活性及谷氨酸受体 2 蛋白质磷酸化的影响

刘勇 王登高 余争平 张广斌

【摘要】目的 研究电磁辐射对大鼠小脑蛋白激酶 C(PKC)活性和谷氨酸受体 2(GluR2)蛋白质磷酸化的影响,探讨电磁辐射对小脑运动性学习记忆的神经信号传导通路的损伤特点。**方法** 将 60 只健康成年雄性 Wistar 大鼠分为对照组 10 只和辐射组 50 只,辐射组又根据观察时间点分为辐射后 0,3,12,24 和 72 h 等 5 个亚组,每亚组 10 只。各辐射组给予 90 mW/cm² 的电磁辐射 20 min。测定电磁辐射后即刻大鼠的肛温,并计算比吸收率(SAR)值;采用改良的 TaKai 法检测 PKC 的活性,采用 Western blot 方法检测小脑 GluR2 蛋白质及其磷酸化水平。**结果** 电磁辐射后即刻,大鼠肛温升高 2.99℃,SAR 值为 8.66 W/kg。大鼠小脑 PKC 的活性在电磁辐射后即刻显著降低;GluR2 的表达水平在各观察时间点均无显著变化,但 GluR2 的磷酸化水平在电磁辐射后即刻显著降低,其他观察时间点无显著变化。**结论** 电磁辐射能够显著降低大鼠小脑 PKC 的活性和 GluR2 的磷酸化水平,从而对运动性学习记忆的神经信号传导通路产生损伤效应。

【关键词】 电磁辐射; 小脑; 蛋白激酶 C; 谷氨酸受体 2; 蛋白质磷酸化

Effects on activation of protein kinase C and phosphorylation of glutamate receptor 2 by electromagnetic irradiation in rat cerebellum LIU Yong, WANG Deng-gao, YU Zheng-ping, ZHANG Guang-bin. Department of Military Occupational Hygiene, the 3rd Military Medical University, Chongqing 400038, China

【Abstract】Objective To investigate the effects of electromagnetic irradiation on activation of protein kinase C (PKC) and phosphorylation of glutamate receptor 2 (GluR2) in rat cerebellum. **Methods** Sixty male Wistar rats were divided randomly into a control group and an electromagnetic exposure group (including 5 subgroups observed at different time points after the irradiation, eg. 0 hour, 3 hours, 12 hours, 24 hours and 72 hours after irradiation), with 10 rats in each group. All the rats in the exposure group were exposed to 90 mW/cm² electromagnetic irradiation for 20 minutes, their rectal temperature was detected immediately after irradiation and the specific absorption rate(SAR) value was calculated, activation of PKC was detected with improved TaKai method, the level of cerebellar GluR2 expression and phosphorylation (ser880) was detected by using Western blot. **Results** Immediately (0 hour) after exposure, the rectal temperature of rats increased 2.99℃, SAR value was 8.66 W/kg. When compared to the control group, it was found that there was no significant difference between the exposure group and the control group with regard to all the parameters at 3, 12, 24 and 72 hours after exposure, except that the cerebellar PKC activation and GluR2(ser 880)phosphorylation decreased significantly immediately after irradiation. **Conclusion** The electromagnetic irradiation has injurious effects on cerebellar signal pathway of for motor learning.

【Key words】 Electromagnetic irradiation; Cerebellum; Protein kinase C; Glutamate receptor 2; Phosphorylation

研究表明,电磁辐射能够损害中枢神经的学习记忆系统^[1,2]。中枢神经系统有多种学习记忆功能类型,除了海马脑区具有学习记忆功能外,小脑已被证实是运动性学习记忆的主要功能脑区^[3]。突触长时程抑制(long term depression, LTD)是小脑运动性学习记忆功能的神经电生理基础^[4],小脑 LTD 的形成和保持受蒲肯野细胞上 α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA)受体的调控,AMPA 受体包括谷氨酸受体(glutamate receptor, GluR)1~4,其中

GluR 2 及其磷酸化在小脑 LTD 及运动性学习记忆过程中起核心作用^[5,6],而 GluR2 的磷酸化受蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC)的调控^[7]。本研究通过检测电磁辐射后大鼠小脑 PKC 活性和 GluR2 磷酸化的变化,探讨电磁辐射对小脑运动性学习记忆的神经信号传导通路的损伤特点。

材料与方法

一、主要仪器和试剂

仪器包括:德国 Heraeus 公司产 Biofuge22R 型低温超速离心机;美国产 Sartorius 电子天平;美国 Beckman 公司产 Du-640 型紫外分光光度计;美国 Bio-Rad

作者单位:400038 重庆,第三军医大学军事预防医学院劳动卫生学教研室

公司产垂直电泳槽、电泳仪、蛋白转印槽和 Doc Gel200 型凝胶成像系统;美国产 LS6500 型液闪测定仪;深圳产热电偶点温计。试剂包括:美国 Santa Cruz 公司产羊抗鼠 GluR2 多克隆抗体、羊抗鼠磷酸化 GluR2 (Ser880/831) 多克隆抗体和髓鞘碱性蛋白 (myelin basic protein, MBP);北京产 γ - 32 P-ATP 以及辣根过氧化物酶标记的兔抗山羊二抗和浓缩型联苯二胺 (diaminobenzidine, DAB) 试剂盒。

二、实验分组

60 只健康成年雄性 Wistar 大鼠,体重 180 ~ 220 g,由第三军医大学实验动物中心提供。分为对照组 10 只和辐射组 50 只,辐射组又根据观察时间点分为辐射后 0,3,12,24 和 72 h 等 5 个亚组,每亚组 10 只。

三、辐射处理

将辐射组大鼠置于反射系数近似为零的微波暗室内,以 S 波段电磁波进行全身均匀辐射 20 min,功率密度为 90 mW/cm²。暗室环境温度稳定于 (20 ± 2) °C,相对湿度稳定于 (60 ± 10) %。对照组大鼠置于相同环境下行假辐射。

四、肛温测定

辐射前和辐射后即刻用热电偶点温计 (精确度为 ±0.1 °C) 测定大鼠肛温,计算比吸收率 (specific absorption rate, SAR) 值。计算公式为: $SAR = 4186 \cdot C \cdot \Delta T/t$, 其中 C 为组织比热 [取 0.83 kcal/(kg · °C)], ΔT 为大鼠在辐照前和辐射后即刻的肛温变化值 (°C), t 为辐射时间 (s)。

五、小脑 PKC 的活性测定

采用改良的 TaKai 法^[8] 检测大鼠小脑 PKC 的活性。于相应时相点取大鼠小脑组织,用蛋白裂解液 (Tris · HCl 0.1 mol/L、乙二胺四乙酸 10 mmol/L、二硫苏糖醇 10 mmol/L、Aprotinin 500 μg/ml、Leupeptin 500 μg/ml、Pepstatin A 500 μg/ml、苯甲基磺酰氟化物 10 mmol/L) 提取组织蛋白质,用 Lowry 法进行蛋白质定量。取蛋白质样品 10 μg,加入激酶测定缓冲液 25 μl (含 AC-MBP) 和 γ - 32 P-ATP 5 μl, 30 °C 水浴作用 5 min。之后点样于 Whatman 滤膜上,用 1% 的磷酸 10 ml 洗涤 3 次, 80 °C 下烘干,加入 5 ml 闪烁液,测定 PKC 的放射活性。结果用 pmol/(mg · min) 表示,实验重复 3 次。

六、小脑 GluR2 蛋白质及其磷酸化水平的测定

采用 Western blot 方法检测小脑 GluR2 及其磷酸化水平。于相应时相点取大鼠小脑组织,以蛋白质裂解液提取蛋白质,Lowry 法进行蛋白质定量。制备 10% 分离胶和 5% 的浓缩胶,以 100 μg 总蛋白质上样后进行电泳 (100 V, 150 min), 然后转印至聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene difluoride, PVDF) 膜上,封闭 2 h, 加入一抗于 4 °C 下孵育过夜 (1:2000), 洗涤 3 次, 加入辣根过氧化物酶标

记的二抗 (1:400) 于 37 °C 下孵育 1 h, 洗涤 3 次, 最后以 DAB 显色, 显色条带在 Bandscan 分析软件上测定灰度值, 并进行定量分析, 实验重复 3 次。

七、统计学分析

实验结果用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 应用 SPSS 10.0 版统计软件进行 t 检验, 设定 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、电磁辐射对大鼠肛温和 SAR 的影响

给予 90 mW/cm² 电磁辐射 20 min 后, 大鼠在辐射结束后即刻的肛温平均升高 (2.99 ± 0.05) °C, SAR 值为 (8.66 ± 0.15) W/kg, 见表 1, 表明该剂量的电磁辐射对大鼠产生了明显热效应。

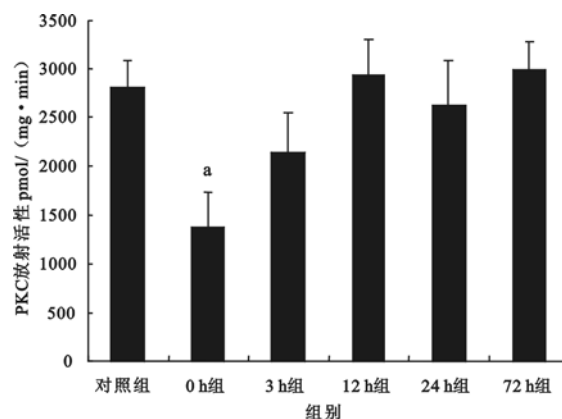
表 1 90 mW/cm² 电磁辐射后即刻各组大鼠肛温和 SAR 值的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	肛温 (°C)			SAR (W/kg)
		辐射前	辐射后即刻	ΔT	
对照组	10	37.00 ± 0.12	37.05 ± 0.10	0.05 ± 0.02	—
辐射组	10	37.01 ± 0.13	40.01 ± 0.13 ^a	2.99 ± 0.05	8.66 ± 0.15

注: 与对照组相比, ^a $P < 0.05$

二、电磁辐射对大鼠小脑 PKC 活性的影响

给予 90 mW/cm² 电磁辐射 20 min 后, 大鼠小脑 PKC 的活性在辐射结束后 0 h 显著降低 ($P < 0.05$), 其余各时相点与对照组相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 1。



注: 与对照组相比, ^a $P < 0.05$

图 1 电磁辐射后各组大鼠小脑 PKC 活性的变化

三、电磁辐射对大鼠小脑 GluR2 及其磷酸化水平的影响

电磁辐射对大鼠小脑 GluR2 蛋白质表达水平的影响: 给予 90 mW/cm² 电磁辐射 20 min 后, 大鼠小脑 GluR2 蛋白质表达水平在电磁辐射结束后 0 h 和 3 h 有所降低, 但与对照组相比, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 2, 3。

电磁辐射对大鼠小脑 GluR2 磷酸化水平的影响:

给予 90 mW/cm^2 电磁辐射 20 min 后,大鼠小脑 GluR2 磷酸化水平在电磁辐射后 0 h 显著降低 ($P < 0.05$), 3 h 基本恢复至正常水平,与对照组相比,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见图 4,5。

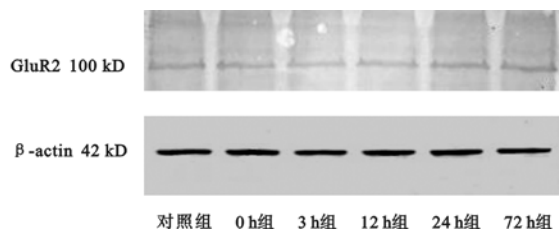


图 2 电磁辐射后大鼠小脑 GluR2 蛋白质表达水平的 Western blot 电泳图

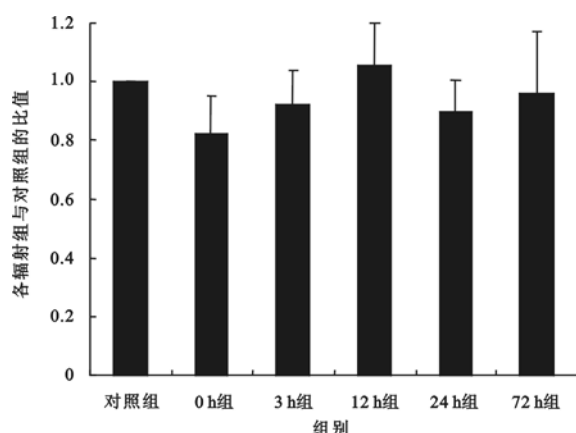


图 3 电磁辐射后大鼠小脑 GluR2 蛋白质的表达水平

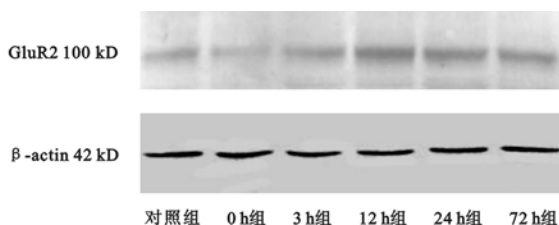
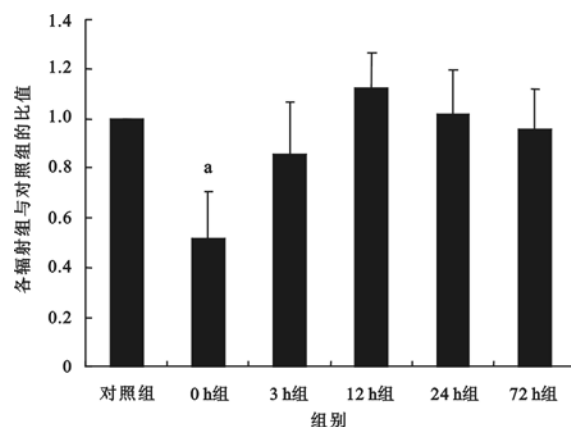


图 4 电磁辐射后大鼠小脑 GluR2 磷酸化蛋白质表达水平的 Western blot 电泳图



注:与对照组相比,^a $P < 0.05$

图 5 电磁辐射后大鼠小脑 GluR2 蛋白质磷酸化的水平

讨 论

中枢神经系统是对电磁辐射最为敏感的靶器官之一,其造成的最典型损伤效应为学习记忆功能障碍。大量研究发现^[9, 10],无论是急性大剂量还是慢性小剂量的电磁辐射均可导致动物学习记忆能力明显下降。因此,探讨电磁辐射致学习记忆功能障碍的分子机制,具有十分重要的现实意义。

神经科学研究表明,小脑不仅是维持机体平衡的重要器官,也是运动性学习记忆的主要功能脑区^[11]。运动性学习记忆是对复杂的程序性活动进行学习并形成记忆的过程,有别于海马脑区的学习记忆^[12]。运动性学习记忆功能在体育运动(如舞蹈、球类运动等)和军事活动(如操纵精密仪器或电子设备等)中都具有重要意义。蒲肯野细胞是小脑皮质唯一的传出性神经元,在小脑学习记忆过程中起核心作用^[13]。突触的 LTD 是小脑运动性学习记忆功能的神经电生理学基础^[14],蒲肯野细胞突触后膜上的 GluR2 是 LTD 形成过程中最为关键的蛋白质分子^[15]。GluR2 在 PKC 的作用下发生丝氨酸 880 位点的磷酸化,磷酸化的 GluR2 将神经信号从突触前膜传递到突触后膜,并最终形成学习记忆^[16, 17]。

蒲肯野细胞上 GluR2 磷酸化及其后续的内化过程,是小脑运动性学习记忆的核心环节和共同通路。因此,如果 GluR2 的磷酸化受阻,必将导致小脑 LTD 和学习记忆功能障碍。本实验结果显示,大鼠在电磁辐射后即刻肛温显著升高、PKC 的活性和 GluR2 磷酸化水平显著降低。GluR2 磷酸化水平降低将直接影响小脑学习记忆的神经电生理学基础——突触的 LTD 过程,而电磁辐射后 PKC 活性降低直接导致了 GluR2 磷酸化水平降低。PKC 作为一种蛋白激酶,其功能活性受诸多因素的调控,而内环境温度的恒定是最基本的前提。因此,我们推测本实验中电磁辐射所产生的热效应可能是 PKC 活性降低和 GluR2 蛋白质磷酸化异常的始动物理因素,由于电磁辐射导致动物体温明显升高,使得 PKC 的活性降低,最终导致 GluR2 的磷酸化效率下降。

综上所述,电磁辐射可能通过降低 PKC 的活性,导致 GluR2 的磷酸化受阻,最终影响小脑学习记忆的神经电生理学基础——突触 LTD 过程,对小脑运动性学习记忆的神经信号传导通路产生损伤效应。

参 考 文 献

- [1] D'Andrea JA, Adair ER, de Lorge JO. Behavioral and cognitive effects of microwave exposure. Bioelectromagnetics, 2003, Suppl 6: 39-62.
- [2] 杨瑞,彭瑞云,王德文. 电磁辐射对学习和记忆功能的影响. 中华

- 物理医学与康复杂志,2002,24:762-764.
- [3] Linden DJ. Neuroscience: from molecules to memory in the cerebellum. *Science*,2003,301:1682-1685.
- [4] Ito M. Cerebellar long-term depression: characterization, signal transduction, and functional roles. *Phys Rev*,2001,81:1143-1195.
- [5] Song I, Huganir RL. Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity. *Trends Neurosci*,2002,25:578-588.
- [6] Steinberg JP, Takamiya K, Shen Y, et al. Targeted in vivo mutations of the AMPA receptor subunit GluR2 and its interacting protein PICK1 eliminate cerebellar long-term depression. *Neuron*,2006,49:845-860.
- [7] McDonald BJ, Chung HJ, Huganir RL. Identification of protein kinase C phosphorylation sites within the AMPA receptor GluR2 subunit. *Neuropharmacology*,2001,41:672-679.
- [8] Takai Y, Kishimoto A, Iwasa Y, et al. Calcium-dependent activation of a multifunctional protein kinase by membrane phospholipids. *J Biol Chem*,1979,254:3639-3695.
- [9] Wang BM, Lai H. Acute exposure to pulsed 2450-MHz microwaves affects water-maze performance of rats. *Bioelectromagnetics*,2000,21:52-56.
- [10] Cobb BL, Jauchem JR, Adair ER. Radial arm maze performance of rats following repeated low level microwave radiation exposure. *Bioelectromagnetics*,2004,25:49-57.
- [11] Kishimoto Y, Kano M. Endogenous cannabinoid signaling through the CB1 receptor is essential for cerebellum-dependent discrete motor learning. *J Neurosci*,2006,26:8829-37.
- [12] Hideyuki O, Tomoo H, Evan B. Learning and memory. *Proc Natl Acad Sci USA*,2000,97:12403-12404.
- [13] Welsh JP, Yamaguchi H, Zeng XH, et al. Normal motor learning during pharmacological prevention of Purkinje cell long-term depression. *Proc Natl Acad Sci USA*,2005,102:17166-17171.
- [14] Koekkoek SKE, Hulscher HC, Dortland BR, et al. Cerebellar LTD and learning-dependent timing of conditioned eyelid responses. *Science*,2003,301:1736-1739.
- [15] Tanaka H, Grooms SY, Bennett MVL, et al. The AMPAR subunit GluR2: still front and center-stage. *Brain Res*,2000,886:190-207.
- [16] Chung HJ, Steinberg JP, Huganir RL, et al. Requirement of AMPA receptor GluR2 phosphorylation for cerebellar long-term depression. *Science*,2003,300:1751-1755.
- [17] Matsuda S, Mikawa S, Hirar H, et al. Phosphorylation of serine-880 in GluR2 by protein kinase C prevents its C terminus from binding with glutamate receptor-interacting protein. *J Neurochem*,1999,73:1765-1768.

(修回日期:2007-05-20)

(本文编辑:吴倩)

· 短篇论著 ·

重症肌无力的针电极肌电图研究

尹厚民 冯蔚 程源深

重复性神经电刺激是大多数实验室用于诊断和研究重症肌无力(myasthenia gravis, MG)最常用的方法之一,在国内已有较多年的使用历史和研究。近20年来国外临床研究报道,部分MG患者的面肌及肢带肌针电极肌电图(electromyography, EMG)显示有短小时限的运动单位电位(motor unit potentials, MUP)出现^[1-4],但主要以单一参数进行研究为主。MG的针电极EMG研究在国内少见。本研究旨在进一步了解MG患者近端肌肉的针电极EMG多个参数的改变,对其电生理的特点和机制进行初步探讨。

一、资料与方法

(一)研究对象

选取我院2005年9月至2006年8月门诊或病房收治的确诊为MG的患者36例,其中男18例,女18例;年龄为18~78岁,平均45.67岁;病程1个月~30年,平均3.28年;按Osserman分型均为II型;新斯的明试验阳性30例;乙酰胆碱受体抗体(acetylcholine receptor, AChR)检测阳性5例;胸部CT检查发现胸腺增生8例;3 Hz低频重复神经电刺激均出现衰减反应。

(二)方法

1. 电生理检测方法:所有患者均取一侧肢体的三角肌和股

四头肌内侧头(其中1例取双侧肢体)进行针电极EMG测定。使用丹麦产四通道肌电/诱发电位仪进行测试,采用同心圆针电极记录。EMG测定内容包括完全放松时观察有无自发电位,轻收缩测定20个MUP的时限、波幅、面积、面积/波幅及多相波,重收缩测定募集相及其幅度。自发电位采用灵敏度为100 μ V/D,扫描速度为20 ms/D,轻收缩测定采用灵敏度为100 μ V/D,扫描速度为5 ms/D,募集相测定采用灵敏度1 mV/D,扫描速度为20 ms/D。滤波范围10 Hz~10 kHz。

2. 判断标准:同一块肌肉发现2处以上自发电位为异常;MUP的时限、波幅、面积、面积/波幅与我院测定的正常标准值进行比较^[5],结果异常百分比=(测定值-均值)/均值 $\times$ 100%,如果时限缩短>20%,波幅降低>20%,面积缩小>20%,面积/波幅减少>20%即为异常减少;股四头肌内侧头多相波数>20%,三角肌多相波数>30%,均为异常增多;重收缩时出现1~2 mV幅度的干扰相为病理性干扰相。以上异常条件任何一块肌肉符合4个以上(含4个)为肯定肌源性损害表现,符合3个异常条件为拟诊肌源性损害表现,符合2个异常条件为可能肌源性损害表现,符合1个异常条件为疑诊肌源性损害表现。

(三)统计学分析

所有患者资料整理后均输入SPSS 10.0版统计软件并进行资料复查,计数资料采用Chi-square检验,非正态分布数据采用