

· 基础研究 ·

高功率微波对兔眼晶状体上皮细胞 P^{21WAF1} 及 Cyclin E 表达的影响

姜涛 王德文 张建 单清 高亚兵 彭瑞云 谷庆阳

【摘要】目的 观察高功率微波 (high power microwave, HPM) 对实验动物兔眼晶状体上皮细胞 P^{21WAF1}、Cyclin E 表达水平的影响,以探讨防护 HPM 眼损伤的机理及方法。方法 采用功率密度为 800 mW/cm² 的微波持续照射青紫兰兔眼组织 20 min,并于微波照射后 30 d, 90 d, 180 d 及 360 d 时应用免疫组化、原位杂交及图像分析技术对兔眼晶状体上皮细胞 P^{21WAF1}、Cyclin E 蛋白及其 mRNA 表达水平进行检测。结果 HPM 照射可影响晶状体上皮细胞的正常增殖过程;当 HPM 照射后 30 d 时, P^{21WAF1} 表达明显升高,对细胞增殖周期抑制作用增强; Cyclin E 表达则明显降低,其正性调节细胞生长作用减弱;当 HPM 照射后 90, 180 及 360 d 时,微波照射组上述各指标与对照组比较,差异均无显著性意义,而且各项指标的 mRNA 表达均与其蛋白表达同步且一致。结论 HPM 照射可干扰细胞正常的生长增殖周期进程,而晶状体上皮细胞增殖异常可能是导致白内障的重要原因之一。

【关键词】高功率微波; 晶状体; 上皮细胞; P^{21WAF1}; Cyclin E

Effects of high power microwave on expression of P^{21WAF1} and cyclin E in lens epithelial cells of rabbits

JIANG Tao, WANG De-wen, ZHANG Jian, SHAN Qing, GAO Ya-bing, PENG Rui-yun, GU Qing-yang. Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

【Abstract】Objective To investigate the effects of high power microwave (HPM) irradiation on the expression of P^{21WAF1} and cyclin E in lens epithelial cells of rabbits. Methods The eye tissues of rabbits were irradiated with 800mW/cm² HPM for 20 minutes. The expression of P^{21WAF1} and cyclin E proteins as well as their mRNAs in lens epithelial cells of rabbits was measured by use of immunochemistry method, in situ hybridization and image analysis at 30, 90, 180 and 360 days after irradiation. Results At 30 days after irradiation, the expression of P^{21WAF1} was increased significantly and the inhibitive effects of cell cycle were enhanced, while the expression of cyclin E was decreased, with its and the positive regulation effects of cell growth and proliferation weakened. There was no significant difference between HPM group and the control group at 90, 180 and 360 days after irradiation with regard to the above parameters. The expression of P^{21WAF1} and cyclin E proteins was consistent with their mRNA. Conclusion HPM irradiation might interfere the cell cycle of lens epithelial cells, and the abnormal proliferation of lens epithelial cells might be one of the important reasons of cataract.

【Key words】High power microwave; Lens; Epithelial cells; P^{21WAF1}; Cyclin E

白内障是全球主要的致盲性眼病之一。据相关资料统计,在白内障的诱因中,微波照射约占第 5 位^[1],且学者们对高功率微波 (high power microwave, HPM) 可导致白内障已达成共识^[2]。晶状体上皮细胞是维持晶状体正常结构、功能及代谢水平的重要组成部分,为其发育、增殖、分化及损伤修复提供物质保障及能量供给^[3]。P^{21WAF1} 属于周期素依赖性激酶抑制剂的 cip/kip 家族,是重要的细胞周期调控因子,它对细胞周期起广泛负性调控作用^[4]。而 Cyclin E 是周期素之一,亦是细胞周期重要的调控蛋白,对细胞周期起正性调控作用^[5]。本研究通过采用 HPM

照射青紫兰兔,观察其晶状体上皮细胞增生所致混浊与 P^{21WAF1} 及 Cyclin E 表达水平间的关系,探讨 HPM 照射导致白内障的发生机制,为科研、生产及临床等防治 HPM 损伤提供新的实验依据。

材料与方法

一、实验动物

共选取成年健康青紫兰兔 11 只,雌雄各半,体重 2.0 ~ 2.5 kg,所有动物均于实验前饲养 1 个月,即单笼饲养,自由饮水,定时喂料等,而后将其随机分为 2 组,其中微波照射组 8 只,对照组 3 只。

二、实验方法

本研究所采用的高功率微波发射源可发射频率 1 618.1 MHz ~ 3 236.2 MHz 的脉冲波,脉宽 0.25 ~

基金项目:全军“十五”指令性课题 (No. 01L023)

作者单位:100850 北京,军事医学科学院放射医学研究所 (姜涛 现工作单位:100037 海军总医院海战伤研究中心)

0.50 μ s, 波长 3.2 cm。当进行 HPM 照射时,将实验动物置于特制木质兔笼中,调整兔眼部与发射源间的垂直距离为 84 cm,经微波功率探头检测,发现兔眼部 HPM 的平均功率密度为 800 mW/cm²,共持续照射 20 min。微波照射组动物分别于 HPM 照射后 30, 90, 180 及 360 d 时经耳缘静脉注入 10 ml 空气处死,每次各处死 2 只动物(先后共有 8 只兔被处死),取 4 只眼球进行实验研究。对照组 3 只动物未经 HPM 照射处理,均于正常饲养 360 d 后处死取材,取材部位及方法同上。

三、检测方法

实验动物眼组织用 10% 中性福尔马林固定液固定,制成石蜡切片,进行光镜观察并照相。采用 SP 免疫组织化学法检测经 HPM 照射后兔眼晶状体上皮细胞 P^{21WAF1} 及 Cyclin E 蛋白表达情况的变化。P^{21WAF1} 单克隆抗体(NCL-WAF1)由 Novocastra 公司出品,工作浓度为 1:30; Cyclin E 单克隆抗体(M-20)由 Santa Cruz Bio 公司出品,工作浓度为 1:100;免疫组化试剂盒由福州迈新生物技术开发公司提供。应用原位杂交法检测经 HPM 照射后兔眼晶状体上皮细胞 P^{21WAF1} 及 Cyclin E mRNA 表达的变化,地高辛标记 cRNA 探针由北京大学医学部病理学系提供,试剂盒由北京中山生物技术有限公司提供;同时设置探针阴性对照及检测系统对照。

四、结果判定和图像分析

实验动物眼组织 P^{21WAF1} 及 Cyclin E 免疫组化检测阳性表达主要位于细胞核部位,即胞核呈棕黄色颗粒、背景不着色为阳性;而 P^{21WAF1} 及 Cyclin E mRNA 原位杂交检测阳性表达主要位于细胞质内,以胞质呈紫蓝色、胞核复染呈浅蓝色为阳性。选择切片中具有代表性的视野,并在高倍镜($\times 400$)下连续观察 5 个视野,应用 CMAS-II 图像分析仪对阳性细胞的图像进行积分光密度(IOD)检测及定量分析。

五、统计学处理

所得实验数据经 SAS 6.12 统计软件进行重复测量的方差分析及 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异具有显著性意义。

结 果

本研究发现,实验动物兔晶状体上皮细胞 P^{21WAF1} 及 Cyclin E 蛋白免疫组化检测阳性表达主要位于细胞核内,少数细胞质呈弱阳性反应。当实验动物兔眼组织经 HPM 照射后 30, 90, 180 及 360 d 时,其各阶段晶状体上皮细胞 P^{21WAF1} 蛋白表达结果见图 1,发现经 HPM 照射后 30 d 时, P^{21WAF1} 含量显著增加($P < 0.01$),随后下降至正常; Cyclin E 蛋白表达结果见图

2,发现经 HPM 照射后 30 d 时, Cyclin E 蛋白含量显著减少($P < 0.05$),随后上升至正常。而 P^{21WAF1} mRNA 及 Cyclin E mRNA 原位杂交检测阳性反应主要位于细胞质中,经 HPM 照射后 30, 90, 180 及 360 d 时,其各个阶段晶状体上皮细胞 P^{21WAF1} mRNA 表达结果见图 3,发现经 HPM 照射后 30 d 时, P^{21WAF1} mRNA 含量显著增加($P < 0.01$),随后下降至正常; Cyclin E mRNA 表达结果见图 4,发现经 HPM 照射后 30 d 时, Cyclin E mRNA 含量显著减少($P < 0.05$),随后上升至正常。

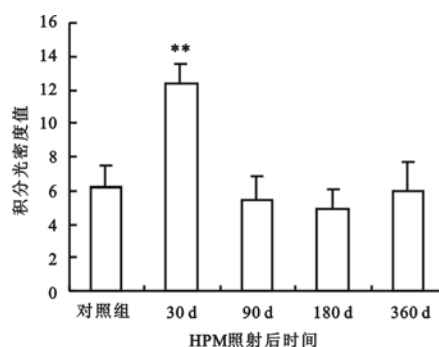


图1 HPM照射后不同时间兔晶状体上皮细胞 P^{21WAF1} 的表达
注:与对照组比较, ** $P < 0.01$

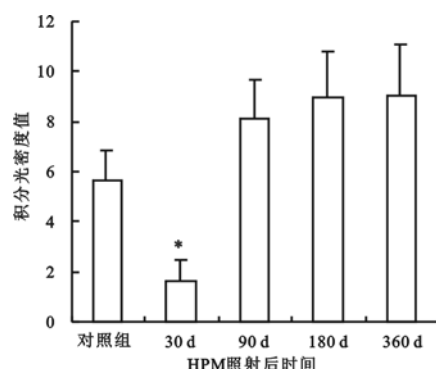


图2 HPM照射后不同时间兔晶状体上皮细胞 Cyclin E 的表达
注:与对照组比较, * $P < 0.05$

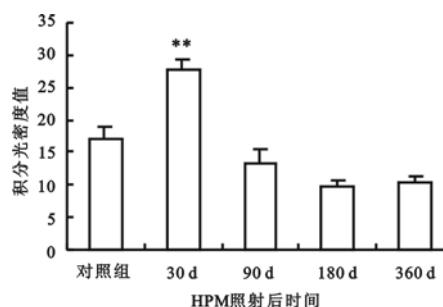


图3 HPM照射后不同时间兔晶状体上皮细胞 P^{21WAF1} mRNA 的表达
注:与对照组比较, ** $P < 0.01$

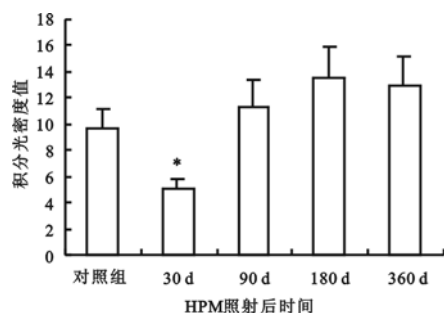


图4 HPM照射后不同时间兔晶状体上皮细胞 Cyclin E mRNA 的表达
注:与对照组比较, * $P < 0.05$

讨 论

相关资料表明,微波照射对视觉系统的影响主要涉及角膜、晶状体及视网膜等组织^[6,7],其中晶状体对微波照射尤为敏感。晶状体由透明纤维蛋白构成,含水量高,无血管分布,孤立存在于房水之中,易吸收微波能量而导致损伤,因而是微波照射的重要敏感靶器官^[8]。 P^{21WAF1} 是周期素依赖性激酶抑制剂中的一种,它能抑制 Cyclin E-CDK 复合物生成,负性调节 CDK 功能,使 Rb 蛋白不能发生磷酸化,抑制细胞周期 G_1/S 期转换进程,如其含量升高,可使细胞生长停滞在 G_1 期^[4],故在细胞增殖中发挥负性调控功能。当实验动物兔眼组织经 HPM 照射后 90, 180 及 360 d 时,微波照射组动物晶状体上皮细胞 P^{21WAF1} 蛋白表达与对照组比较虽略有下降,但差异无显著性意义,而当 HPM 照射后 30 d 时,晶状体上皮细胞 P^{21WAF1} 蛋白表达呈一过性显著增高($P < 0.01$),此时原位杂交法检测其 mRNA 含量也得到了与蛋白表达检测相一致的结果。上述现象说明:实验动物兔眼组织经 HPM 照射后,其晶状体上皮细胞 P^{21WAF1} 蛋白及其 mRNA 表达增强,干扰了细胞的正常分裂,抑制了细胞周期 G_1/S 期的转换进程,发挥了广泛的负性调节作用,从而使细胞增殖速率减慢。当 HPM 照射后 90 ~ 360 d 时,此时晶状体上皮细胞经自行修复后,其 P^{21WAF1} 蛋白及 mRNA 表达水平逐渐降低直至恢复正常, P^{21WAF1} 抑制作用减弱,使上皮细胞 G_1/S 期转换进程加快,从而促使细胞增殖速率增快,致使细胞生长由停滞状态转为增殖状态,细胞分裂及 DNA 合成加速,最终导致晶状体上皮细胞增生活跃。由 HPM 照射所导致的兔眼晶状体上皮细胞 P^{21WAF1} 蛋白及 mRNA 表达水平异常波动,破坏了正常的细胞周期时程,使细胞周期时快、时慢,从而引起上皮细胞的增殖分裂及 DNA 合成发生异常,而这种异常即可能是导致晶状体白内障发生、发展的重要原因^[9]。 P^{21WAF1} 作为潜在的抑制基因,同时又是控制细胞周期的内部元件,对广泛 CDK 具有抑制功能,在经 HPM 照射后初期, P^{21WAF1} 主要对晶状体上皮细胞表现

为抑制功能,提示在微波诱发白内障的发生、发展过程中, P^{21WAF1} 可能起着重要作用。

Cyclin E 是一种周期素,在细胞增殖周期中具有重要调控功能,对细胞周期具有正性调控作用^[5],同时 Cyclin E 也是一种具有高度保守序列的蛋白质,于细胞生长 G_1 晚期开始与 CDK2 结合,其表达量增加,在 G_1/S 转换期时形成 Cyclin E-CDK2 复合物,此时 Cyclin E 的表达量及复合物的量均达到峰值,形成的活性 Cyclin E-CDK2 复合物极不稳定,半衰期较短,当细胞进入 S 期时即迅速分解,Cyclin E-CDK2 复合物在细胞周期 $G_1 \rightarrow S$ 期转换过程中起重要调节作用。当 HPM 照射后 30 d 时,晶状体上皮细胞 Cyclin E 蛋白含量与其 mRNA 表达量与对照组比较,均明显降低(均 $P < 0.05$),该现象表明 HPM 照射干扰了上皮细胞的正常分裂及蛋白合成,使细胞处于抑制状态,增殖减弱,延长了细胞周期时间。随着 HPM 照射后时间的延长,Cyclin E 蛋白及其 mRNA 表达均逐渐增加,当 HPM 照射后 90, 180 及 360 d 时,实验动物兔晶状体上皮细胞 Cyclin E 蛋白及其 mRNA 表达均恢复正常,细胞周期时间也将缩短,细胞增殖速度加快。

在本研究中,实验动物兔眼晶状体 P^{21WAF1} 及 Cyclin E 表达量一高一低的不同变化,反映上述 2 种调控因子在细胞周期中所起的截然不同的调控作用。有学者认为,高表达的 Cyclin E 可加速细胞生长 G_1 期的进程^[10],从而缩短细胞周期时间,加速细胞增殖,同时 Cyclin E 表达与细胞增殖抗原 Ki-67 表达具有显著正相关性,因此提示高表达的 Cyclin E 可作为判断细胞增殖水平的一项指标。当 HPM 照射后 90, 180 和 360 d 时,Cyclin E 蛋白及其 mRNA 表达水平与对照组比较,虽没有显著性差异,但较照射初期有明显反弹、升高现象。而如果晶状体上皮细胞 Cyclin E 表达量升高,其正性调控细胞周期作用将会加强,以促进细胞生长由 $G_1 \rightarrow S$ 期转换,使细胞增殖活性旺盛。晶状体上皮细胞在实验 30 d 后由抑制态转为活跃态,从而使上皮细胞增生引起晶状体混浊,导致白内障发生,这一点已被本研究病理学观察所证实。研究 P^{21WAF1} 及 Cyclin E 在实验动物兔眼晶状体上皮细胞中表达水平的变化,可直接或间接反映其蛋白和基因的变化规律,以便了解该 2 种细胞周期调控因子在微波诱发白内障发生、发展过程中所处的地位及所起的作用,为进一步揭示 HPM 照射的眼损伤机制提供新的依据及切入点。

参 考 文 献

- 1 刘学东. 微波对眼的照射损伤. 眼外伤职业眼病杂志, 1999, 21: 77-78.
- 2 姜槐, 叶国钦, 主编. 微波高频对健康的影响与生物学效应. 北京: 人民卫生出版社, 1985. 181-191.

- 3 Lipman RM, Tripathi BJ, Tripathi RC. Cataracts induced by microwave and ionizing radiation. *Surv Ophthalmol*, 1988, 33:200-210.
- 4 Ewen ME, Sluss HK, Sherr CJ, et al. Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell*, 1993, 73:487-497.
- 5 Koff A, Cross F, Fisher A, et al. Human cyclin E, a new cyclin that interacts with members of the CDK2 gene family. *Cell*, 1991, 66:1217-1228.
- 6 李昌吉, 詹承烈, 唐茂云, 等. 微波致兔晶体超微结构的改变. *华西医科大学学报*, 1988, 2:200-203.
- 7 李昌吉, 詹承烈, 唐茂云, 等. 微波致角膜和视网膜损害的实验研究. *眼外伤职业性眼病*, 1989, 11:141-142.

- 8 George MW, Carl HS. Health effects of nonionizing radiation. *Envir Med*, 1990, 74:489-507.
- 9 Kuwabara T, Kinoshita JH, Cogan DG. Electron microscopic study of galactose-induced cataract. *Surv Ophthalmol*, 1969, 8:133-149.
- 10 Resnitzky D, Gossen M, Bujard H, et al. Acceleration of the G₁/S phase transition by expression of cyclin D₁ and E with an inducible system. *Mol Cell Biol*, 1994, 14:1669-1679.

(收稿日期:2003-09-20)

(本文编辑:易 浩)

· 短篇论著 ·

微波组织凝固联合中药治疗宫颈糜烂

谢珍

我院自 2000 年 12 月 ~ 2002 年 6 月采用微波组织凝固联合中药疗法治疗宫颈糜烂 180 例, 疗效满意, 报道如下。

一、资料与方法

依据《妇产科学》^[1]宫颈糜烂的诊断标准进行诊断, 并判断患者宫颈糜烂程度。所有患者先行宫颈刮片和白带常规检查, 排除宫颈恶性病变, 对有滴虫、霉菌感染或其他病原体所致阴道炎症患者, 均在对症治愈后列为观察对象。经门诊确诊为宫颈糜烂的患者 180 例, 已婚者 160 例(有生育史者 145 例, 无生育史者 15 例), 未婚有性生活史者 20 例。将 180 例患者分为 3 组, A 组 60 例, 年龄 20 ~ 61 岁, 平均 36.4 岁; 病程 2 个月 ~ 5 年, 平均 2.0 年; B 组 60 例, 年龄 22 ~ 63 岁, 平均 38.21 岁; 病程 3 个月 ~ 5 年, 平均 2.25 年; C 组 60 例, 年龄 21 ~ 61 岁, 平均 37.59 岁; 病程 3 个月 ~ 5 年, 平均 2.32 年。3 组间差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。3 组患者均于月经干净后 3 d 开始治疗。

A 组: 常规消毒外阴, 将药粉(由苦参 20 g、黄柏 30 g、硼砂 20 g、血竭 20 g、冰片 6 g、白矾 30 g、乳香和没药各 15 g 等中草药或中成药碾制而成的细末)均匀地喷在糜烂面上, 覆盖整个糜烂面。于每月月经干净 3 d 后用药, 每日 1 次, 15 次为 1 个疗程, 治疗 3 个疗程。

B 组: 按宫颈手术常规消毒法消毒后, 采用国产 HF-900C 型微波治疗仪, 频率 2 450 MHz, 治疗功率 80 W。将微波探头接触糜烂面, 根据糜烂范围先从宫颈管外口开始点灼, 依次均匀地点灼整个糜烂面, 使糜烂面变为乳白色凝固层(如有避孕环应避开), 每点点灼 2 ~ 3 s, 治疗 1 次。

C 组: 中药治疗同 A 组, 用药 1 周后, 采用 B 组治疗方法行微波治疗 1 次, 术后以药粉喷涂糜烂面, 以后隔日喷涂药粉 1 次, 治疗 1 周。

3 组患者均禁性生活和免阴道冲洗 4 周, 于治疗结束后 2 个月, 且月经干净后 3 d 复查。

疗效标准: 痊愈——宫颈表面及外口光滑, 糜烂面消失, 无瘢痕及炎症; 显效——病变范围缩小 2/3 以上; 有效——病变范围缩小 1/3; 无效——治疗前、后无变化。

统计学分析采用 t 检验。

二、结果

治疗结束后, 3 组患者疗效情况见表 1。

表 1 3 组患者疗效比较(例)

组别	例数	痊愈	显效	有效	无效	痊愈率(%)
A 组	60	32	19	7	2	53.3 [*]
B 组	60	38	17	4	1	63.3 ^{**△}
C 组	60	51	7	2	0	85.0

注: * 与 C 组比较, $P < 0.01$; ** 与 C 组比较, $P < 0.01$; Δ 与 A 组比较, $P < 0.01$

三、讨论

微波所产生的热效应可使组织蛋白变性凝固, 并具有较好的止血作用。微波组织凝固治疗宫颈糜烂已得到大多同仁的肯定^[2,3], 但调节阴道清洁度是提高微波疗效的关键。

宫颈糜烂属于中医“带下”的范围, 多由湿热下注或血瘀内阻所致。治宜清热解暑, 化瘀消肿, 祛腐生肌。方中苦参、黄柏可清热、燥湿、解毒, 白矾、硼砂敛疮除死肌, 血竭止血、生肌敛疮、散瘀止痛, 冰片清热消肿、凉血止痒、祛腐生肌。诸药合用达清热解暑、化瘀消肿、止血止痛、祛腐生肌之功效。其精细粉剂易溶解、易吸收, 以消炎、收敛、止血的效果最为显著。

微波虽能迅速地使病变组织坏死、脱落, 但术后愈合时间长, 持续水样分泌物常会继发外阴炎、阴道炎等病症; 同样, 药物治疗也有见效慢、疗程长、易复发等缺点。两者联合使用, 可弥补各自的缺点, 既缩短疗程, 又加快创面的愈合, 且不产生瘢痕及粘连, 值得推广使用。

参 考 文 献

- 1 乐杰, 主编. 妇产科学. 第 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 1997. 254-255.
- 2 成述昌, 王秀媛, 姜军, 等. 微波热凝固治疗慢性宫颈糜烂. *中华物理医学与康复杂志*, 2001, 23:110.
- 3 莫玉瑶, 张红军. 微波组织凝固治疗宫颈糜烂 1 628 例. *中华物理医学与康复杂志*, 2003, 25:10.

(修回日期:2003-11-23)

(本文编辑:阮仕衡)