

· 基础研究 ·

电磁脉冲辐射对原癌基因 c-fos 调控区的影响

赵梅兰 曹晓哲 王德文 刘杰 哈小琴 吴丹莉 张燕

【摘要】 目的 通过研究电磁脉冲 (electromagnetic pulse, EMP) 辐射对原癌基因 c-fos 调控区域的影响, 探讨其诱导细胞功能改变的机制。方法 构建 c-fos 启动区氯霉素乙酰化转移酶 (chloramphenicol acetyltransferase, CAT), 然后转染 HeLa 癌细胞株, 高场强 EMP 模拟源 (有界波模拟源) 辐射细胞, EMP 场强为 6×10^4 V/m, 脉冲上升时间为 20 ns, 脉宽为 30 μ s, 频率为 2.5 个脉冲/min, 辐射 2 min, 处理后 20 min 时观察细胞中 CAT 的活性。结果 EMP 辐射转染的细胞后 20 min, 转染了 P₅₀₀ (-711 ~ -223 bp) 和 P₂₅₀ (-362 ~ -100) 的 HeLa 细胞其 CAT 活性明显高于对照水平的活性 ($P < 0.01$)。结论 EMP 辐射可引起 c-fos 基因调控区的 -362 ~ -225 明显改变。

【关键词】 电磁脉冲; c-fos 基因; P₅₀₀-tkCAT; P₃₅₀-tkCAT; P₂₅₀-tkCAT

Effects of EMP on Regulatory Regions of c-fos Gene ZHAO Mei-lan, CAO Xiao-zhe, WANG De-wen, LIU Jie, HA Xiao-qin, WU Dan-li, ZHANG Yan. Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

【Abstract】 **Objective** To determine whether regulatory regions of c-fos gene were responsive to electromagnetic pulse (EMP) and to explore the possible underlying mechanisms. **Methods** HeLa cells were transiently transfected with plasmids containing upstream regulating regions of c-fos up to -700bp, coupled with the prokaryotic reporter gene CAT (chloramphenicol acetyl-transferase). Cells were exposed to EMP (simulator which provides 5 pulses/2 min with a high electric field intensity 60kV/m, 20-nsec rise time and 30ms pulse width.). CAT was measured by enzymatic determinations. Acetylated ¹⁴C-chloramphenicol was measured by thin layer chromatography. **Results** CAT expression above control levels in transfected cells (region -362 ~ -225bp) was observed at 20 min following exposure to EMP, especially in P500 (-711 ~ -223bp) and P250 (-362 ~ -100) group ($P < 0.01$). **Conclusion** EMP affects the regulation regions of c-fos gene.

【Key words】 Electromagnetic pulse; c-fos gene; P500-tkCAT; P350-tkCAT; P250-tkCAT

电磁辐射给人们带来的担忧越来越严重, 研究发现电磁辐射后可以引起部分特异蛋白或 mRNA 的改变, 而且可以发生于许多类型的细胞中^[1]。有的学者认为, 电磁场的生物效应可能直接发生在基因转录水平, 其原因是 RNA 的稳定性增加或 RNA 储存形式的释放^[2]。基因转录是细胞受外界因素作用后通过一系列信使传递的终端, 因此利用基因转录的特异改变, 可逐步往上研究以确定电磁场引起基因转录改变的每一个作用环节, 最终揭示电磁场与生物系统相互作用的机制。已有研究发现, 将不同种类的细胞暴露于 60 Hz 的电磁场中, c-myc 在转录水平明显增加, c-myc 转录增加与细胞内 Ca²⁺ 的增加呈正相关^[3]。在前期研究中, 我们发现电磁脉冲 (electromagnetic pulse, EMP) 可引起海马组织中 c-fos 蛋白的高表达^[4]。为探

讨 c-fos 蛋白的高表达机制, 我们将由 c-fos 基因启动区与氯霉素乙酰化转移酶 (chloramphenicol acetyltransferase, CAT) 构建的重组质粒转染 HeLa 细胞, 用 EMP 辐射后观察细胞中 CAT 的活性, 以深入理解 EMP 对 c-fos 基因及其表达的相互作用, 并对其机制进行初步探讨。

材料和方法

一、试剂

RNA 酶为 Sigma 公司产品。DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)、胰蛋白酶、马血清和胎牛血清为 GIBCO 公司产品。6 孔培养板为 Costar 公司产品。质粒的纯化试剂盒为 Promega 公司的 DNA 纯化试剂盒。P₅₀₀-tkCAT、P₃₅₀-tkCAT、P₂₅₀-tkCAT 均由法国 Harel-Bellan 博士 (Laboratoire 'Oncogenese, Differentiation et Transduction du Signal') 惠赠。试剂: 0.1 mol/L 的 CaCl₂ 100 ml; LB 培养基 (蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, NaCl 5 g) 1 000 ml, 高压灭菌; 半固体培养基 (取 LB 培养剂 200 ml, 加入 15 g/L 的琼脂粉) 经高

基金项目: 解放军“十五”指令课题基金资助 (No. 01L023)

作者单位: 100850 北京, 军事医学科学院放射医学研究所实验病理研究室 (赵梅兰、曹晓哲、王德文、刘杰、张燕), 实验血液室 (哈小琴、吴丹莉)

压灭菌;氨苄青霉素 1/1 000。溶液 I: 50 mmol/L 葡萄糖, 25 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH8.0); 10 mmol/L EDTA (pH8.0), 高压灭菌 15 min, 4℃ 冰箱内保存。溶液 II: 0.2 mol/L NaOH (临用前用 10 mol/L 储存液稀释), 1% SDS。溶液 III: 5 mol/L 乙酸钾 60 ml, 冰乙酸 11.5 ml, 水 28.5 ml, 4℃ 冰箱内保存。所配制的液体中钾为 3 mol/L, 乙酸根为 5 mol/L。

二、细胞系和培养条件

用于转染的细胞系为 HeLa 细胞系 (中国科学院细胞生物研究所)。细胞培养于 10% 马血清和 10% 胎牛血清的 DMEM 中。

三、EMP 辐射条件

用于生物学研究的高场强 EMP 模拟源^[5] (有界波模拟源), 场强幅度为 6×10^4 V/m, 脉冲上升时间为 20 ns, 脉宽为 30 μ m, 辐射脉冲频率为 2.5 个脉冲/min, 辐射 2 min, 共 5 个脉冲。

四、质粒的扩增及纯化

1. 感受态的制备: ①用 JM109 杆菌 LB 培养基 (不含抗生素), 摇菌 24 h, 加新的 LB 培养基, 继续摇菌 4 h; ②以 4 000 r/min、4℃ 离心 10 min 后, 加预冷 (4℃) 的 CaCl_2 , 如此重复 3 次; ③最后 4℃ 放置 24 h。

2. 质粒的转化: 制备好的感受态 + 质粒在冰上放置 30 min, 42℃ 热激 90 s 后入 LB 培养基 (无抗生素), 37℃ 放置 1 h, 再入 LB 培养基 (含氨苄青霉素), 37℃ 过夜, 感受态增殖成菌落。

3. 质粒的扩增: 用接种针挑选菌落, 接种入 3 个试管内, 用摇床 (200 r/min, 37℃) 摇菌 7 ~ 8 h 后进行质粒的提取。

4. 质粒的提取: 采用碱裂解法提取质粒, 摇好的 3 管菌, 离心 1 min (10 000 r/min), 加碱裂解液及蛋白沉淀液, 离心 5 min (13 000 r/min), 沉淀 DNA (95% 乙醇、冰上放置 5 min), 离心后用 70% 乙醇洗涤, 干燥后纯水溶解, -20℃ 保存。

5. 质粒大小的鉴定: 将提取的质粒及 DNA 标志, 用 0.7% 琼脂糖进行电泳以鉴定质粒大小 (图 1)。

6. 质粒的纯化: 冻存的转有质粒的 JM109 菌株, 接种 LB 培养基, 37℃ 振荡过夜, 离心 10 min (4 000 r/min), 收集菌体。悬浮细胞 (cell resuspension solution), 振荡器彻底溶解, 加细胞裂解液 (cell lysis solution), 室温放置 20 min 后加终止液 (neutrolization solution), 离心 15 min (4 500 r/min), DNA 纯化树脂, Maxi 过滤柱内过滤, 乙醇洗涤后加水 (65 ~ 70℃) 溶解 DNA, 离心 5 min (4℃, 2 500 r/min), 然后进行质粒含量和纯度测定。

7. 质粒的沉淀: 将质粒溶液入 1 ml (2 倍体积) 4℃ 的无水乙醇, 加 1/10 体积的乙酸钠 (3 mol/L, pH 5.2)

150 ml, -20℃ 放置过夜, 然后离心 15 min (12 000 r/min, 4℃) 自然干燥, 用水溶解后, -20℃ 保存。

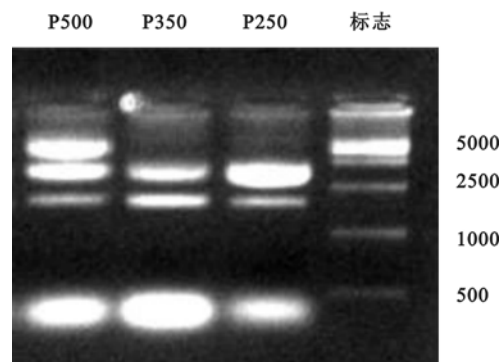


图 1 鉴定质粒的大小的电泳观察

五、细胞转染

将指数期生长的 HeLa 细胞 (4×10^5 /ml) 接种入 6 孔培养板内, 加 DMEM 在 5% 的 CO_2 、37℃ 条件下培养 24 h; 用无血清、无抗生素的 DMEM 冲洗 6 孔培养板内的细胞 2 次, 加入质粒脂质体混合液, 放入 37℃、5% CO_2 培养箱中培养 24 h; 往每孔细胞中加入含 20% 血清的 DMEM 培养液, 在 37℃、5% CO_2 培养箱中培养 24 h; 吸去 DMEM/质粒/脂质体复合物, 再加入新鲜的含 10% 血清的 DMEM 培养液, 入 37℃、5% 的 CO_2 培养箱继续培养 24 h。

六、EMP 辐射及细胞收取

设立对照孔和辐射孔, 对照孔用双层锡箔纸上下包裹, 进行 EMP 辐射。辐射后 20 min, 分别用 0.01 mol/L 的 PBS 按 2 ml/孔洗涤 2 次, 每孔中加入 1 ml TEN 溶液 (由 Tris、EDTA、NaCl 组成: 40 mmol/L Tris · HCl, pH 7.5; 1 mmol/L EDTA, pH8.0; 150 mmol/L NaCl), 将细胞置于冰上 5 min。用橡胶细胞刮子将细胞从培养皿上刮出并将其转入一只 1.5 ml 的微量离心管中, 冰浴 5 min。在 4℃ 条件以 12 000 r/min 的速度离心细胞 1 min, 弃上清, 用 100 μ l 冰冷的 0.25 mol/L、pH 为 7.5 的 Tris · HCl 缓冲液悬浮细胞。在 -70℃ 冻结细胞 5 min, 之后 37℃ 融解 5 min, 重复 3 次后 12 000 r/min、4℃ 条件下离心 5 min, 移出上清并标记, -20℃ 保存, 以备检测 CAT 活性。

七、CAT 检测

取以上提取液在 65℃ 温浴 10 min, 每管内加入 70 ml 的 CAT 反应液 [CAT 反应混合液的组分: 1 mol/L Tris · HCl (在 800 ml 水中溶解 121 g Tris 碱, 用浓盐酸将 pH 值调为 7.8) 20 ml; 14 C 标记的氯霉素 30 ml; 乙酰辅酶 A 20 ml], 37℃ 温浴 2 h。然后每管内加入 1 ml 乙酸乙酯振荡 10 s, 离心 5 min (12 000 r/min, 4℃), 吸取上液相自然蒸发干燥。乙酸乙酯复溶, 在 25 mm 厚的薄层层析 (TLC) 硅胶板的起点处点样, 在氯仿: 甲醇

(95:5) 的 TLC 缸内进行层析,当前沿达到 TLC 板顶部的 75% 处停止层析,在室温下晾干,TLC 板曝光于 X 光片, -70℃ 放置约 5 d 后取出冲洗。

八、图像和统计学分析

利用 CMIAS-II 图像分析仪对 CAT 活性斑点的图像学参数——积分光密度和面积测定分析,最后结果用 SPSS 8.0 统计软件进行方差分析。

结 果

结果见图 2。EMF 辐射转染的细胞后 20 min,转染了 P₅₀₀ (-711 ~ -223 bp) 和 P₂₅₀ (-362 ~ -100) 的 Hela 细胞,其 CAT 活性明显高于对照水平的活性 ($P < 0.01$)。图像分析结果见图 3,4 和表 1。

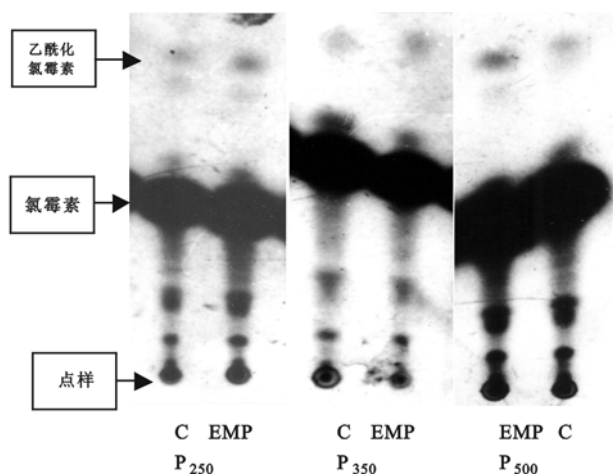


图 2 CAT 放射自显影图

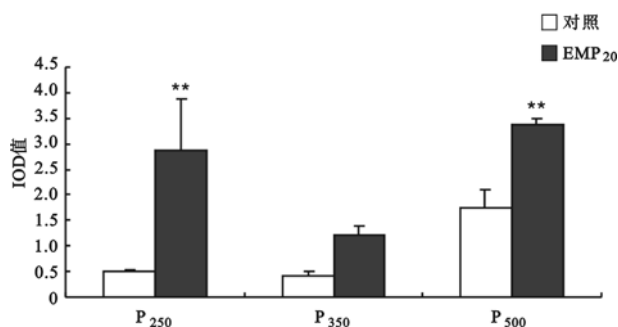


图 3 各质粒 CAT 斑点的积分光密度

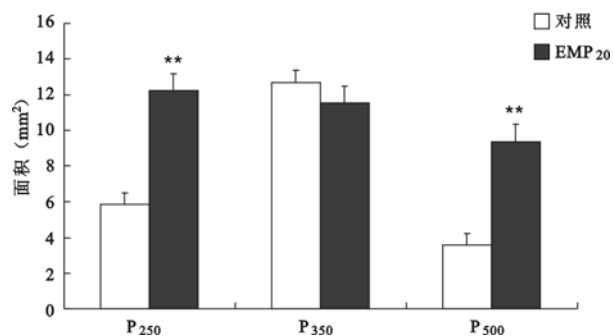


图 4 各质粒 CAT 斑点的面积直方图

表 1 EMP 辐射对各质粒 CAT 斑点的积分光密度和面积的影响 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

质粒	CAT 斑点积分光密度 (IOD)		CAT 斑点面积 (mm ²)	
	对照	EMP	对照	EMP
P ₂₅₀	0.49 ± 0.05	2.87 ± 1.01 *	5.84 ± 0.89	12.22 ± 1.93 *
P ₃₅₀	0.423 ± 0.07	1.23 ± 0.15	12.687 ± 0.39	11.52 ± 0.54
P ₅₀₀	1.75 ± 0.34	3.37 ± 0.12 *	3.563 ± 1.34	9.37 ± 0.95 *

注: 经方差分析, * $P < 0.01$

讨 论

对哺乳动物基因调控的了解,主要来自野生型和突变型的假定顺式作用调控要素的活性测定实验。直接测定 mRNA 的丰度和结构的方法比较繁琐,因此一般都不直接测定顺式作用要素调节转录速率的能力,而是把顺式作用要素与编码某种新的酶活性的报道基因(如氯霉素乙酰转移酶, CAT 基因)相连。在转染过程中累积酶活性的强弱,即可作为衡量顺式作用要素转录调控能力的标志。最常见的 CAT 分析方法需借助¹⁴C-标记的氯霉素与从被转染细胞制备的细胞裂解物一起温育时发生的反应,在硅化的玻璃板上进行薄层色谱(silica gel thinlayer chromatography)分离乙酰化(acetylated chloramphenicol forms)和非乙酰化的氯霉素(parent forms of chloramphenicol),将玻璃板对 X 光片进行曝光,从而定性估计 CAT 的活性^[6]。

所谓电磁辐射(electromagnetic radiation)就是由电磁波长等于或大于紫外线,其光量子 and 电磁场强度较弱,不足以使分子解离的电磁辐射构成,故又称非电离辐射(nonionizing radiation),主要包括紫外线、可见光红外线、微波、低频电磁波等^[7]。EMP(electromagnetic pulse)属于高能非电离(电磁)辐射中的一种,能量集中、超宽频带,几乎覆盖电磁波谱的所有频段^[4,5,8-10]。EMP 对人体细胞的作用以非热效应为主,且集中在细胞膜上^[8,9]。组织细胞在瞬间 EMP 的作用下,可在细胞膜原有静息电位的基础上产生 1 个 100 mV 的增强跨膜电位,使膜内大分子产生不可逆的构形改变。EMP 还可使细胞膜产生不可逆性电击穿而发挥其致伤效应。电磁辐射在理论上可通过多种方式影响细胞,而且有多种途径,最有说服力的一种方式便是影响细胞表面事件,如通过细胞信号通路^[11]进入细胞内而影响细胞的功能。

电磁场(electromagnetic fields, EMF)可影响 c-fos 上游调控区,具有时间依赖性(time dependent),或称之为时相性,与促有丝分裂因素以及其它诱因引起的时相性表达类似。EMP 也属于 EMF 辐射,故本研究的目的是确定 c-fos 基因的调控区是否受 EMP 的影响,并利用转染细胞来增加检测分析的敏感性。由于对 c-fos 基因广泛深入的研究,使得其成为研究 EMP

	-711 ~ -363	-362 ~ -298	-298 ~ -289	-287 ~ -224	-225 ~ -99	-97 ~ -77	-76 ~ -62	-63 ~ -57	-56 ~ +42
P ₅₀₀ -tkCAT	-711 ~ -223								
P ₃₅₀ -tkCAT	-711 ~ -362								
P ₂₅₀ -tkCAT	-362 ~ -100								

图 5 c-fos 基因调控区

辐射效应的最好模型。fos 蛋白是一个早期的转录蛋白^[11,12]。许多诱因均可特异地影响 c-fos 的上游调控区,从而引起 c-fos 快速短暂的表达。各质粒中包含的 c-fos 启动子区域如图 5 所示,细线代表各质粒在 c-fos 调控区的位置。

Rao^[13]应用带有 c-fos 启动子的 CAT 的质粒(-700 ~ +42)转染 Hela 细胞,然后用 60 Hz,60 mG 的低强度 EMF 辐射 5 min,发现 CAT 蛋白的表达明显增高,高峰大约在 20 min(增加达 25%),40 min 时降至基础水平^[11]。然而,国内外至今未见 EMP 对 c-fos 影响的报道。本研究结果显示 c-fos 调控区 -700 ~ -225(P₅₀₀)经 EMP 辐射后 20 min,CAT 的表达明显增加,而这一区域包含有 SRE 和 AP1 结合位点。-711 ~ -362(P₃₅₀)直接与 TAATA 框相连,且 EMP 辐射后 CAT 表达未见明显升高,提示这个区域对 EMP 不敏感,这与 Rao^[13]的实验结果略有不同,可能与我们采用的 EMP 的能量较高、所含电磁辐射频谱较广等性质与 Rao 所采用的低强度 EMF 明显不同所致。分析 P₂₅₀(-362 ~ -100)结果,CAT 的表达受 EMP 的影响与 EMP 辐射转染有 P₅₀₀的细胞结果相似。

本文结果说明,EMP 辐射细胞后可引起 c-fos 表达明显升高,其调控区 -362 ~ -225 起着非常重要的作用。

参 考 文 献

- Phillips JL, Haggren W, Thomas WJ, et al. Magnetic field-induced changes in specific gene transcription. *Biochem Biophys Acta*, 1992, 1132:140-144.

- Goodman R, Weisbrot D, Uluc A, et al. Transcription in *Drosophila melanogaster* salivary gland cells is altered following exposure to low frequency electromagnetic fields: Analysis of chromosome 3R. *Bioelectromagnetics*, 1992,13:111-118.
- Wallaczek J, Liburdy R. Non-thermal 60Hz sinusoidal magnetic-field exposure enhances ⁴⁵Ca²⁺ uptake in rat thymocytes. Dependence on mitogen activation. *FEBS Lett*, 1990,271:157-160.
- 赵梅兰,曹晓哲,王德文,等. 电磁脉冲对海马 C-FOS 表达的影响. *军事医学科学院院刊*,2001,25:195-197.
- 赵梅兰,曹晓哲,王德文,等. 高场强电磁脉冲模拟器及其生物学研究. *国防科技大学学报*,2000,22(Suppl):17-22.
- Gorman CM, Moffat LF, Howard BH. Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyl-transferase in mammalian cells. *Mol Cell Biol*,1982,2:1044-1051.
- Fedorowski A, Steciwko A. Biological effects of non-ionizing electromagnetic radiation. *Med Pr*, 1998,49:93-105.
- 曹晓哲,赵梅兰,王德文. 电磁脉冲照射对培养大鼠垂体细胞上清中 LDH、AST、CHE、K⁺ 和 Na⁺ 的影响. *解放军医学杂志*,2002,27:933-935.
- Loginov VA. Change in charge of the erythrocyte membrane during exposure to a pulsed electromagnetic field. *Biofizika*,1991,36:614-620.
- Seaman RL, Belt ML, Doyle JM, et al. Ultra-wideband electromagnetic pulses and morphine-induced changes in nociception and activity in mice. *Physiol Behav*, 1998,65:263-270.
- Liburdy RP, Callahan DE, Harland J, et al. Experimental evidence for 60Hz magnetic fields operating through the signal transduction cascade; effects on calcium influx and C-MYC mRNA induction. *FEBS Lett*, 1993,334:301-308.
- Doucet J, Squinto SP, Bazan NG. Fos-Jun and the primary genomic response in the nervous system: possible physiological role and pathophysiological significance. *Mol Neurobiol*, 1990,4:27-55.
- Rao S, Henderson AS. Regulation of c-fos is affected by electromagnetic fields. *J Cell Biochem*, 1996,63:358-665.

(修回日期:2003-06-16)

(本文编辑:熊芝兰)

· 征稿 ·

中华医学会物理医学与康复学分会 2004 年全国会议征文通知

中华医学会物理医学与康复学分会定于 2004 年 9 月在美丽的江城——武汉举办全国神经康复学术会议。本次会议将是全国神经康复及相关学科的一次盛大聚会,欢迎广大康复科、神经内外科以及其他相关学科和领域的人员投稿并与会。

征文范围 (1)神经康复基础研究;神经可塑性、神经损伤与再生、神经损伤后功能重组、神经损伤后功能恢复机理;(2)神经康复功能评定研究;包括神经肌肉电生理学评定、生物力学评定、言语评定、认知功能和心理评定;康复结局预测与评定;(3)临床神经康复治疗的方法和机制;包括物理治疗、作业治疗、言语治疗、心理治疗、传统中医治疗方法和各种辅助器具的应用等;(4)神经康复护理;(5)社区神经康复;(6)与神经康复相关的研究。

征文要求 (1)论文必须具有科学性、先进性和实用性,未在公开发行的刊物上发表,Word 文档打印,并附个人简历;(2)稿件注明作者姓名、工作单位、详细地址及邮编;(3)投递方式:请附软盘或通过电子邮件投稿;(4)论文截止日期:2004 年 7 月 1 日,以邮戳为准,过期者不再采用,也不能载入会议论文汇编;(5)如无文章但愿意参加会议者,可寄本人简历,组委会将酌情邀请参加。

联系地址 (430030)武汉市汉口解放大道 1095 号同济医院康复医学科 尤春景;电话:(027)83662477;E-mail:cjyou21cn@sohu.com。