

微波辐射对家兔小脑蛋白激酶 C 转位和激活的影响

刘 勇, 黄尉初, 刘大星, 程绪浩

中图分类号: TL816⁺ 文献标识码: A 文章编号: 1004-714X(2011)04-0394-02

【摘要】 目的 探讨微波辐射对家兔小脑神经元蛋白激酶 C 转位和激活的影响。方法 30 只二级日本大耳白家兔随机分为对照组和微波辐射组(包括辐射后 0、3、24 和 72 h 等四个时相组)。辐射组给予平均功率密度为 90 mW/cm² 的 S 波段微波持续辐射 30 min, 测定辐射前和辐射后即刻家兔的肛温并计算比吸收率值; 改良的 TaKai 法分别检测小脑神经元胞膜和胞浆中 PKC 的活性变化。结果 微波辐射后 0 h 家兔肛温升高 2.41 °C, SAR 值为 4.65 kcal/kg; 小脑神经元胞浆中的 PKC 活性没有明显变化, 而胞膜中的 PKC 活性在微波辐射后 0 h 显著降低。结论 90 mW/cm² 微波辐射 30 min 可导致家兔机体产生明显热效应, 并抑制小脑神经元中 PKC 的转位和激活。

【关键词】 微波辐射; 小脑; 蛋白激酶 C; 家兔

Effects on Translocation and Activation of Cerebellar Protein Kinase C in Rabbit by Microwave Irradiation. LIU Yong, HUANG Wei-chu, LIU Da-xing, CHENG Xu-hao. *Center for Disease Control and Prevention of Jinan Military Region, Jinan 250014 China.*

【Abstract】 Objective To investigate the effects of microwave irradiation on translocation and activation of protein kinase C (PKC) in rabbit cerebellum. **Methods** Thirty rabbits were divided randomly into control and microwave irradiation group (including 0 hour, 3 hours, 12 hours, 24 hours and 72 hours subgroups after irradiation), rabbits of microwave irradiation group were exposed to 90 mW/cm² S frequency range microwave irradiation for 30 minutes, rectal temperature were detected immediately after irradiation and specific absorption rate (SAR) value were calculated, PKC activity of cerebellar neuron endochylema and cytolemma were detected with improved TaKai method. **Results** Rectal temperature of rabbits increased 2.41 °C after irradiation, and SAR value was 4.65 Kcal/kg. PKC activity of cerebellar neuron endochylema have no significant change, but PKC activity of cerebellar neuron cytolemma decreased significantly after irradiation. **Conclusion** After 90 mW/cm² microwave irradiation for 30 min, heating effect was produced in the rabbit body, and the capability of cerebellar PKC translocation and activation decreased significantly.

【Key words】 Microwave Irradiation; Cerebellum; Protein Kinase C; Rabbit

研究表明,微波辐射对中枢神经系统的学习记忆功能具有明确的损伤效应^[1]。中枢神经系统有多种学习记忆类型,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^[2]。蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 能够调节多种细胞的代谢、生长、增殖和分化,在跨膜信号传递过程中起着重要作用。近年来,PKC 活性在小脑运动性学习记忆中的作用机制成为国内外神经科学领域的研究热点之一^[3]。本研究采用平均功率密度为 90 mW/cm² 的 S 波段微波持续辐射家兔 30 min,检测微波辐射前后家兔小脑神经元 PKC 的活性水平,探讨微波辐射对小脑神经元 PKC 转位和激活的作用规律。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂 低温超速离心机 (Biofuge 22R Heraeus, Germany); 电子天平 (Sartorius, USA); 紫外分光光度计 (Du-640 Beckman, USA); 液闪测定仪 (LS6500, USA); 热电偶点温计 (深圳赛博); r-³²P-ATP (北京亚辉); AC-MBP (Santa Cruz, USA)。

1.2 实验动物及分组 30 只二级日本大耳白家兔,雌雄各半,体质量 (2.14 ± 0.35) kg。实验分为对照组和微波辐射组,辐射组又设定辐射后 0、3、24 和 72 h 等四个时相组,每个时相组 6 只家兔。

1.3 微波辐射处理 将辐射组家兔固定在专用丙烯酸甲酯有机玻璃辐射盒中,置于反射系数为零的辐射暗室内,在旋转平台上以平均功率密度为 90 mW/cm² 的 S 波段微波进行全身均

匀辐射 30 min。将对照组家兔置于相同环境中进行假辐射处理。暗室环境温度 (20 ± 2) °C,相对湿度 (60 ± 10) %。

1.4 肛温测定 辐射前和辐射后即刻用热电偶点温计测定家兔肛温,计算比吸收率 (specific absorption rate, SAR) 值。计算公式为: $SAR = 4186 C \Delta T / t$ 公式中: C 为组织比热,取 0.83 (kcal/kg · °C); ΔT 为家兔在辐照前和辐射后即刻的肛温变化值 (°C); t 为辐射时间 (s)。

1.5 小脑 PKC 的活性测定 改良的 TaKai 法检测小脑 PKC 的活性。于相应时相点取家兔小脑组织,用蛋白裂解液 (Tris, HCl 0.1 mol/L, EDTA 10 mmol/L, DTT 10 mmol/L, Aprotinin 500 µg/ml, Leupeptin 500 µg/ml, Pepstatin A 500 µg/ml, PMSF 10 mmol/L) 分别提取胞浆和胞膜蛋白质,Lowry 法进行蛋白质定量。分别取胞浆和胞膜蛋白质样品 10 µg,加入激酶测定 buffer 25 µl (含 AC-MBP) 和 r-³²P-ATP 5 µl,30 °C 水浴作用 5 min。之后点样于 Whatman 滤膜上,用 1% 磷酸 10 ml 洗涤三次,80 °C 烘干,加入 5 ml 闪烁液,测定 PKC 的放射性。结果用 pmol · mg⁻¹ · min⁻¹ 表示,每次实验重复 3 次。

1.6 统计学处理 实验结果用均数 ± 标准差表示,数据采用 spss17.0 软件进行统计分析,取 P < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 微波辐射对家兔肛温和比吸收率的影响 由表 1 可知,给予 90 mW/cm² 微波辐射 30 min 后,家兔肛温平均升高 2.41 °C, SAR 值为 4.65 kcal/kg。表明该剂量的微波辐射导致家兔机体产生了明显热效应。

表 1 微波辐射前后家兔肛温的变化和 SAR 值

组别	肛温(℃)			SAR 值 (kcal/kg)
	辐射前	辐射后	ΔT	
对照组	37.00 ± 0.33	37.00 ± 0.31	0	0
辐射组	37.00 ± 0.34	39.41 ± 0.37 ¹⁾	2.41 ± 0.38	4.65 ± 0.36

注:1) 与对照组相比, $P < 0.05$ 。

2.2 微波辐射对家兔小脑神经元胞浆中 PKC 活性的影响 图 1 的结果表明 给予 90 mW/cm² 微波辐射 30 min 后 家兔小脑神经元胞浆中 PKC 的活性在辐射结束后的各时相组结果与对照组相比 差异均没有统计学意义。

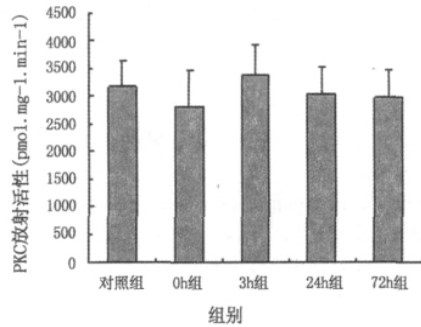
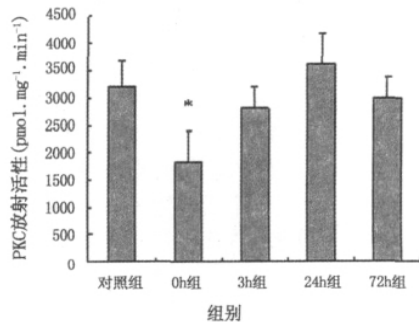


图 1 家兔小脑神经元胞浆中 PKC 的活性变化

2.3 微波辐射对家兔小脑神经元胞膜中 PKC 活性的影响 图 2 的结果表明 给予 90 mW/cm² 微波辐射 30 min 后 家兔小脑神经元胞膜中 PKC 的活性在辐射结束后 0 h 显著降低($P < 0.05$) 其余各时相组与对照组相比差异没有统计学意义。表明该剂量的微波辐射对家兔小脑神经元胞膜中 PKC 活性有显著影响。



注:* 与对照组相比 $P < 0.05$ 。

图 2 家兔小脑神经元胞膜中 PKC 的活性变化

3 讨论

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^[4]。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 它有别于海马脑区的学习记忆^[5]。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。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学基础^[6] 小脑 LTD 的形成和保持受蒲肯野细胞上 AMPA(α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) 受体的调控。

AMPA 受体在中枢神经系统内主要介导快速的兴奋性突触传递 在信号传导、神经发育以及突触的可塑性(包括学习和记忆) 等方面都起着至关重要的作用。AMPA 受体磷酸化改变是该受体发挥功能的主要形式。AMPA 受体包括谷氨酸受体

(glutamate receptor ,GluR) 1、2、3 和 4 等四种亚型 在小脑神经元中主要表达 GluR2。因此 小脑的运动性学习记忆功能主要通过 GluR2 的磷酸化来实现。研究发现 ,GluR2 的磷酸化主要由 PKC 来完成 其作用位点在 GluR2 的 C 末端的丝氨酸 880 位点处。

PKC 是一类钙离子和磷脂依赖性的蛋白激酶 在中枢神经系统的细胞跨膜信号传递过程中起着十分重要的作用。PKC 通过催化多种蛋白质上的丝氨酸或苏氨酸的磷酸化 调节多种细胞的代谢、生长、增殖和分化。PKC 广泛分布于多种组织、器官和细胞中。在细胞处于静息状态时 ,PKC 主要存在于胞浆中 当细胞受到内外因素的刺激后 ,PKC 以钙离子依赖的形式从胞浆中移位到细胞膜上 此过程称之为转位。一般将 PKC 的转位作为 PKC 激活的标志^[7]。PKC 是小脑 GluR2 磷酸化的限速酶 在小脑 LTD 过程中起着重要作用。

中枢神经系统是微波辐射最为敏感的靶器官 其学习记忆功能障碍是最典型的损伤效应。大量研究发现 无论是急性大剂量还是慢性小剂量的微波辐射均可导致动物学习记忆能力明显下降^[8]。因此 探讨微波辐射致学习记忆功能障碍的分子机理 具有十分重要的现实意义。本实验结果显示 家兔在微波辐射后肛温显著升高、PKC 的转位和激活水平显著降低。PKC 作为一种蛋白激酶 其功能活性受诸多因素的调控 而环境温度恒定是最基本的前提。因此 本实验中微波辐射所产生的热效应可能是 PKC 转位和激活能力降低的始动物理因素 由于微波辐射导致动物体温明显升高 使得 PKC 的转位和激活水平降低 最后将导致 GluR2 的磷酸化效率下降并影响小脑的 LTD 过程和运动性学习记忆功能。

参考文献:

- [1] John AD , Eleanor RA , John O. Behavioral and cognitive effects of microwave exposure [J]. Bioelectromagnetics , 2003 , 24: 39 - 62.
- [2] Jordan PS , Kogo T , Ying S , et al. Targeted in vivo mutations of the AMPA receptor subunit GluR2 and its interacting protein PICK1 eliminate cerebellar long-term depression [J]. Neuron , 2006 , 49: 845 - 860.
- [3] McDonald BJ , Chung HJ , Haganir RL. Identification of protein kinase C phosphorylation sites within the AMPA receptor GluR2 subunit [J]. Neuropharmacology , 2001 , 41: 672 - 679.
- [4] Welsh JP , Yamaguchi H , Zeng XH , et al. Normal motor learning during pharmacological prevention of Purkinje cell long-term depression [J]. Proc Natl Acad Sci USA , 2005 , 102: 17166 - 17171.
- [5] Koekkoek SKE , Hulscher HC , Dordland BR , et al. Cerebellar LTD and learning-dependent timing of conditioned eyelid responses [J]. Science , 2003 , 301: 1736 - 1739.
- [6] Hee JC , Jordan PS , Richard LH , et al. Requirement of AMPA receptor GluR2 phosphorylation for cerebellar long-term depression [J]. Science , 2003 , 300: 1751 - 1755.
- [7] Newton AC. Protein kinase C: structure , function , and regulation [R]. J Bio Chemis , 1995 , 270(48) : 28495 - 28498.
- [8] Zhavoronkov LP , Kolganova OI , Dubovik BV , et al. Effects of microwave radiation on conditioned behavior of rats [J]. Radiat Biol Radioecol , 2003 , 43(1) : 75 - 81.

(收稿日期:2011-03-03)