论著

DOI: 10.16016/j.1000-5404.201411183

1 800 MHz 射频电磁场通过瞬时受体电位 C 通道影响原代大鼠皮层神经元突起生长

孙立庚,陈纯海,卢永辉,刘 川,何旻蒂,高 鹏,马秦龙,段维霞,李 敏,张 蕾,周 舟,余争平,钟 敏
(400038 重庆,第三军医大学军事预防医学院劳动卫生学教研室,电磁辐射医学防护教育部重点实验室)

[**摘要**] **目的** 研究 1 800 MHz 射频电磁场(radio frequency electromagnetic field,RF-EMF)对原代培养皮层神经元突起生长的影响,并通过瞬时受体电位 C 通道介导的钙内流,探讨 RF-EMF 对突起生长影响的机制。**方法** 将原代培养皮层神经元(primarily cultured cortical neurons,PCCNs)用随机数表法分为 4 组:假暴露(Sham)、Sham + SKF-96365、辐照组(RF)和 RF + SKF-96365 组。使用 sXc-1800 辐照系统,1 800 MHz 频率 talk 模式,5 min 开 10 min 关,比吸收率为 4 W/kg,辐照组辐照时间分别为 12、24 h 和 48 h。SKF-96365 干预处理是在维持培养基中加入 SKF-96365(5 μmol/L)后与假暴露组、RF 组进行相同的处理。辐照结束后即刻进行以下指标检测:①细胞活力(CCK-8 法)和 LDH 释放;②TRPC1、TRPC3 蛋白表达(Western blot);③钙库操纵性钙内流变化(store-operated calcium entry, SOCE)(激光共聚焦显微镜);④神经元突起总长度、初级突起数和分支数(Tuj-1 免疫荧光染色)。**结果** RF 组细胞活力和 LDH 释放与相应 Sham 组相比差异均无统计学意义($P>0.05$)。与 Sham 组比较,RF 组辐照 24 h 后,TRPC1 和 TRPC3 蛋白表达分别降低 24% 和 23%,SOCE 下降 54%,辐照 48 h 引起 PCCNs 突起总长度、初级突起数和分支数分别下降 20%、12%、31%,以上变化均有统计学意义($P<0.05$)。Sham + SKF-96365 组 SOCE 下降 24%,突起总长度、初级突起数、分支数分别下降 10%、12%、24%,与 Sham 组比较均有统计学意义($P<0.05$),而 RF + SKF-96365 组 SOCE 和突起总长度、突起数、分支数的变化与 RF 组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** RF-EMF 可引起原代皮层神经元突起长度、初级突起数和分支数减少,该效应可能与 TRPC1 和 TRPC3 通道蛋白表达降低和 TRPC 通道介导的钙信号减弱有关。

[**关键词**] 射频电磁场;瞬时受体电位 C;皮层神经元突起;Ca^{2+}
[**中图法分类号**] R322.81;R329.24;R339.57 [**文献标志码**] A

Effect of 1 800 MHz radiofrequency electromagnetic field on neurite growth of primarily cultured rat cortical neurons *via* TRPC channel

Sun Ligeng, Chen Chunhai, Lu Yonghui, Liu Chuan, He Mindi, Gao Peng, Ma Qinlong, Duan Wenxia, Li Min, Zhang Lei, Zhou Zhou, Yu Zhengping, Zhong Min (Department of Occupation Health, Key Laboratory of Electromagnetic Radiation Protection of Ministry of Education, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of 1 800 MHz radiofrequency electromagnetic field (RF-EMF) on neurite growth of primarily cultured cortical neurons (PCCNs), and discuss its possible mechanism *via* transient receptor potential canonical (TRPC) channel. **Methods** PCCNs were randomly

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(31270890)
[**通信作者**] 钟 敏,E-mail:zhmin993@163.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150121.1033.007.html(2015-01-21)

divided into 4 groups: sham group (without RF), sham + SKF-96365 (TRPC blocker) group, RF group, and RF + SKF-96365 group. PCCNs were exposed to RF continuously (5 min on and 10 min off) for 12, 24 and 48 h under 1 800 MHz frequency and talk model, and the specific absorption rate was 4 W/kg. Afterward, the correlation analysis was performed immediately as follows: (1) CCK-8 and LDH release, (2) Western blot analysis for protein expression of TRPC1 and TRPC3, (3) confocal laser scanning microscope-based calcium imaging analysis for store-operated calcium entry (SOCE), and (4) immunocytochemical analysis for neurite length, neurite number, and neurite branching number. **Results** The release of CCK-8 and LDH had no statistically significant difference between the RF group and the sham group ($P>0.05$). The expression of TRPC1 and TRPC3 proteins was reduced by 24% and 23%, respectively, and SOCE was reduced by 51% in the RF group after 24 h exposure to RF compared with the sham group. After 48 h exposure to RF, the neurite length, neurite number and neurite branching number were reduced by 20%, 12% and 31%, respectively, compared with the Sham group, and the differences were significant ($P<0.05$). SOCE was reduced by 24%, and the neurite length, neurite number and neurite branching number were reduced by 10%, 12% and 24%, respectively, in the sham + SKF-96365 group compared with the Sham group ($P<0.05$). The differences of the SOCE, neurite length, neurite number and neurite branching number between the RF + SKF-96365 group and the RF group were not significant ($P>0.05$). **Conclusion** RF-EMF may reduce the neurite length, neurite number, and neurite branching number of the PCCNs, which is related to low expression of TRPC1 and TRPC3 proteins and decrease of TRPC channel-mediated Ca^{2+} signals.

[**Key words**] radio frequency electromagnetic field; transient receptor potential canonical; neurite; Ca^{2+}

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (31270890). Corresponding author: Zhong Min, E-mail: zhmin993@163.com

如今无线通讯网络(频率为800 MHz~2.6 GHz)几乎与每个人的生活息息相关[1-2]。人们使用移动电话或暴露于移动电话发射的射频电磁场(radio frequency electromagnetic field,RF-EMF)的健康安全问题,已成为备受关注的公共卫生问题。神经系统是电磁场生物效应的靶系统之一,其效应机制也是该领域的研究热点。有研究表明长时间电磁辐射暴露会导致神经细胞突起生长减缓[3],而电磁辐射所致胞内钙离子浓度变化在其中发挥了重要作用[4]。

瞬时受体电位C(transient receptor potential canonical,TRPC)通道是一种在脑中有广泛表达的非选择性阳离子通道,在调节细胞内钙、钠、钾等离子稳态,维持细胞内环境离子平衡中发挥重要作用[5]。近年来研究发现,TRPC通道家族中多个通道蛋白如TRPC1、TRPC3都与神经突起生长、轴突导向调控有关[6-7]。本实验拟在1 800 MHz RF-EMF、比吸收率4 W/kg的暴露模型上,观察RF-EMF对原代皮层神经元突起生长的影响,并通过TRPC来探讨电磁辐射对神经元突起生长影响的机制,以期为揭示电磁辐射致神经损害效应的分子机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 0~3 d龄SPF级SD乳鼠购自第三军医大学实验动物中心。实验过程中对动物的处置符合动物伦理学标准。

1.1.2 主要试剂与仪器 胎牛血清(FBS)、Neurbasal培养基、B27神经生长因子(美国Gibco公司)。DMEM/F12培养基、Hank's液、D-Hank's液(美国HyClone公司)。LDH检测试剂盒(英国Roche公司)。SKF-96365(美国Sigma公司)。CCK-8检测试剂盒(日本岛津公司)。TRPC1一抗(美国Santa公司)。TUJ-1、TRPC3一抗(英国Abcam公司)。Fluo-4 AM染料(美国Invitrogen公司)。sXc-1800辐照系统(瑞士ITIS公司)。

1.2 方法

1.2.1 原代皮层神经元培养 原代培养皮层神经元(primarily cultured cortical neurons,PCCNs)的培养按照Xu等[8]的方法完成。PCCNs培养至第8天,以1×10^6/皿的密度接种于直径35 mm的培养小皿后进行分组实验。

1.2.2 实验分组和RF-EMF暴露模型 实验分为

假暴露组(Sham)、辐照组(RF)、Sham + SKF-96365 干预组及 RF + SKF-96365 干预组 4 组。辐照组在 sXc-1800 辐照系统下接受辐照:频率 1 800 MHz,比吸收率 4 W/kg,5 min 开、10 min 关,分别接受连续 12、24 h 和 48 h 辐照。未接受辐照的 PCCNs 为 Sham 组。SKF-96365(广泛用于拮抗 TRPC 通道介导的钙信号[8])干预处理是在维持培养基中加入 SKF-96365(5 μmol/L)后进行与辐照组、假暴露组相同的处理。

1.2.3 CCK-8 和 LDH 检测

1.2.3.1 CCK-8 检测 严格按照试剂盒说明书完成。细胞辐照后取上清加入 96 孔板,在 450 nm 波长测定各组光密度值。

1.2.3.2 LDH 检测 严格按照试剂盒说明书完成。辐照结束前 2 h 分别加入含 1% Triton X-100 的培养基和普通培养基做阳性和空白对照,辐照结束后取上清加入 96 孔板,在 625 nm 波长测定 $D(625)$ 值,LDH 释放率 = [样品 $D(625)$ 值 − 空白 $D(625)$ 值]/[阳性对照组 $D(625)$ 值 − 空白 $D(625)$ 值] × 100%。

1.2.4 Tuj-1 免疫荧光染色观察突起生长 以 1×10^6/皿密度将细胞接种至辐照小皿中制备细胞爬片,一抗 Tuj-1(1∶200 稀释),二抗 Alexa Fluor 555(1∶200 稀释)。突起生长分析参考相关文献[3,9]的方法。用 LAS AF Lite 图像软件分析每个神经突起生长的 3 个指标:每个神经元发出的突起总长度、从胞体发出的初级突起数和神经元突起上的分支数。如果相邻 2 个神经元突起有连接或者神经元细胞相重叠则不作记录。每次实验每组至少记录 20 个神经元图像,并进行 4 次独立实验。

1.2.5 Western blot 辐照结束后收集蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜,5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h,一抗 TRPC1(1∶1 000)、TRPC3(1∶1 000)、GAPDH(1∶2 000)4 ℃孵育过夜,二抗室温孵育 1 h,化学发光法曝光,采用 Image lab 软件分析计算各条带灰度值,以目的蛋白与内参蛋白 GAPDH 条带灰度值比值分析蛋白的表达量。

1.2.6 激光共聚焦显微镜观察 PCCNs 钙库操纵性钙内流(store-operated calcium entry,SOCE) 参考文献[10−11]方法,辐照结束后用 Hank's 液漂洗 3 遍,加入含 F127(0.02%)的 fluo-4 AM(5 μmol/L)工作液,37 ℃孵育 30 min,Hank's 液洗 3 遍,37 ℃孵育 20 min,用激光共聚焦显微镜检测。荧光探针 Fluo-4 AM 的激发波长是 494 nm,发射波长为 516 nm,以平均荧光强度变化反映细胞内游离钙浓度的相对水平。以 F 来表示荧光强度的变化,$F = \triangle f/f_{min}$,其中 $\triangle f$ 为 $f - f_{min}$,f 为实时荧光强度,f_{min} 为基线的荧光强度均值。各组在检测前换为含 EGTA(0.5 mmol/L)的D-Hank's 液 5 min;干预组在含 EGTA(0.5 mmol/L)D-Hank's 液中加入 SKF-96365(50 μmol/L)孵育 5 min,放置镜下扫基线 1 min 后加入钙库清空剂 Thapsigargin(TG)激活 SOCE,2 min 后加入 Ca^{2+}(2 mmol/L)记录 2 min 后结束。

1.3 统计学分析

实验重复 3 次以上,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 软件统计进行独立样本 t 检验和单因素方差分析。

2 结果

2.1 1 800 MHz RF-EMF 暴露对 PCCNs 活力和 LDH 释放的影响

12、24、48 h 辐照后,神经元活力与 Sham 组相比均无明显变化($P > 0.05$,图 1)。RF-EMF 暴露 12、24、48 h,未引起 PCCNs 的 LDH 释放显著变化($P > 0.05$,图 2)。

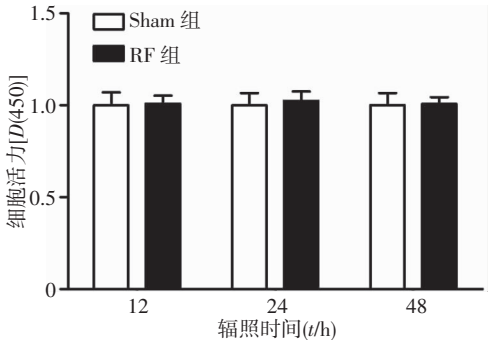


图 1 CCK-8 法检测 1 800 MHz RF-EMF 暴露对神经元活力影响

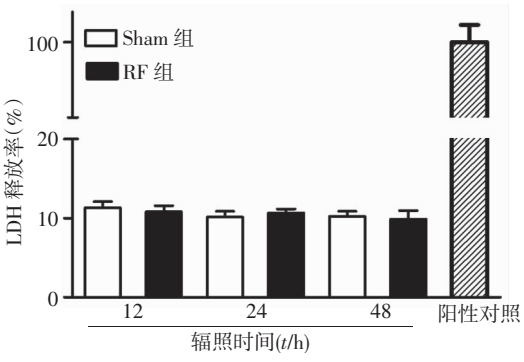


图 2 1 800 MHz RF-EMF 暴露对神经元 LDH 释放的影响

2.2 1 800 MHz RF-EMF 暴露和 SKF-96365 干预对 PCCNs 突起生长的影响

RF-EMF 暴露后神经元突起总长度降低了 20%、

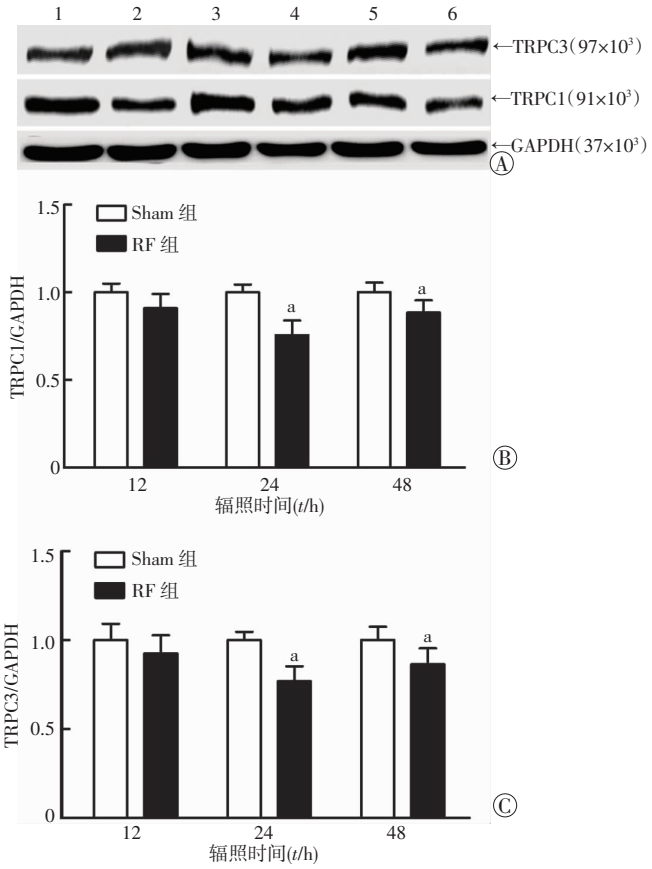
初级突起数减少了 12%、分支数减少了 31%，与 Sham 组比较差异均有统计学意义（$P<0.05$）。RF + SKF-96365 组突起总长度、初级突起数、分支数分别较 SHAM 组降低了 25%（$P<0.05$）、13%（$P<0.05$）、29%（$P<0.01$），并且 RF + SKF-96365 组与 RF 组比较，神经元突起总长度、初级突起数、分支数变化均无统计学意义（$P>0.05$）。Sham + SKF-96365 组突起总长度、初级突起数、分支数较 Sham 组分别降低了 10%（$P<0.05$）、12%（$P<0.05$）、24%（$P<0.01$，图 3）。

2.3　1 800 MHz RF-EMF 暴露对 TRPC1、TRPC3 通道蛋白表达的影响

1 800 MHz RF-EMF 暴露 12 h，TRPC1 和 TRPC3 蛋白表达与 Sham 组比较分别降低 9% 和 7%，但差异无统计学意义（$P>0.05$）。暴露 24、48 h 后，TRPC1 蛋白表达较 SHAM 组分别降低了 24%、12%（$P<0.05$），TRPC3 蛋白表达与 SHAM 组相比分别降低了 23%、14%（$P<0.05$，图 4）。

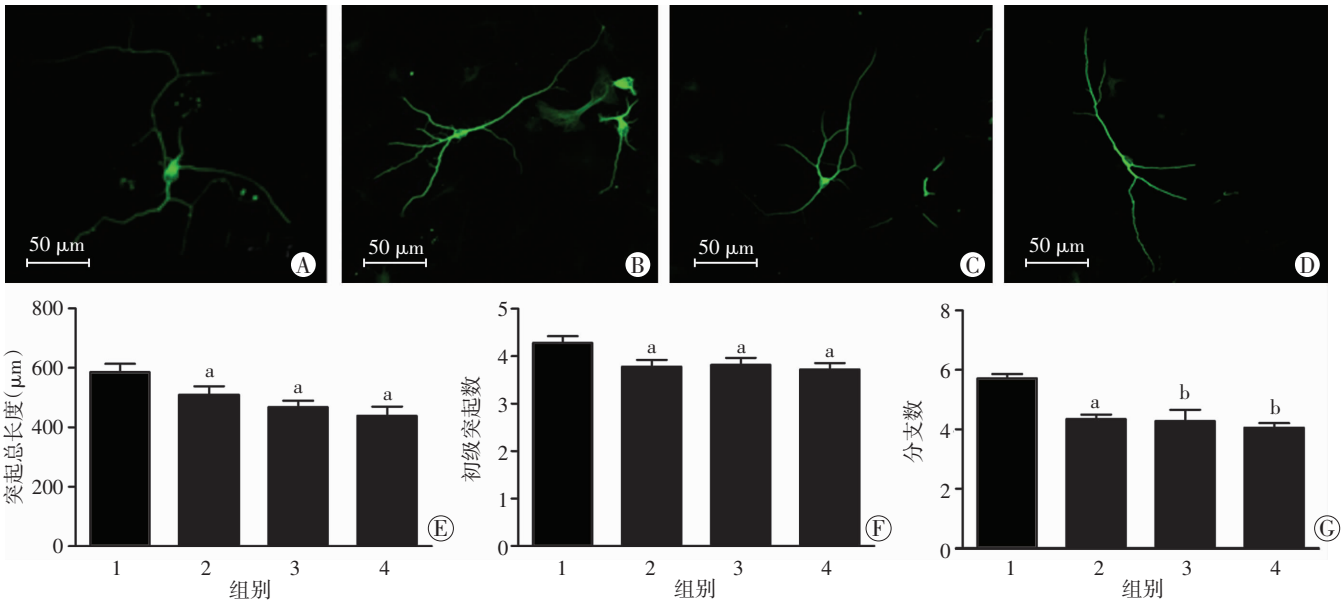
2.4　1 800 MHz RF-EMF 暴露对 SOCE 的影响

RF 组 SOCE 较 Sham 组降低了 54%（$P<0.05$）；RF + SKF-96365 组较单纯 RF-EMF 暴露组降低 20%，2 组间 SOCE 变化并无显著差异（$P>0.05$）。Sham + SKF-96365 组 SOCE 降低了 24%，与 Sham 组比差异有统计学意义（$P<0.05$）；RF 组 SOCE 水平较 Sham + SKF-96365 组减少 39%，差异有统计学意义（$P<0.05$，图 5）。



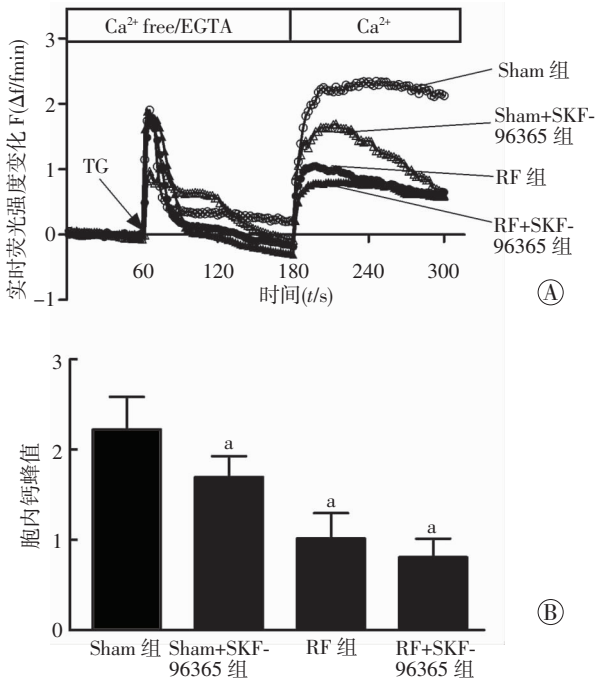
A：Western blot 结果　1：Sham 组 12 h，2：RF 组 12 h，3：Sham 组24 h，4：RF 组 24 h，5：Sham 组 48 h，6：RF 组 48 h；B：TRPC1 蛋白表达半定量分析；C：TRPC3 蛋白表达半定量分析　a：$P<0.05$，与 Sham 组比较

图 4　1 800 MHz RF-EMF 不同暴露时间对 TRPC1 和 TRPC3 蛋白表达的影响



A～D：Tuj-1 免疫荧光染色；A：Sham 组；B：Sham + SKF-96365 组；C：RF 组；D：RF + SKF-96365 组；E：辐照对各组神经元突起总长度的影响；F：辐照对各组神经元初级突起数的影响；G：辐照对各组神经元突起分支数的影响　1：Sham 组；2：Sham + SKF 96365 组；3：RF 组；4：RF + SKF-96365 组；a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与 Sham 组比较

图 3　1 800 MHz RF-EMF 暴露和 SKF-96365 处理对 PCCNs 突起生长的影响



A:各组$[Ca^{2+}]_i$实时荧光强度变化;B:峰值统计 a:$P<0.05$,与 Sham 组比较

图5 1 800 MHz RF-EMF 暴露对 SOCE 的影响

3 讨论

已有研究表明电磁辐射可以引起动物学习记忆功能下降,职业流行病学调查也发现长期暴露于电磁场的职业人员可出现头昏头痛、注意力不集中、记忆力减退、睡眠障碍等症状。突触是中枢神经系统发挥功能的基本功能结构,是神经元之间信息传导的形态学基础[12],而突起是突触的物质基础。研究电磁场暴露对神经元突起生长的影响及其机制,是探索电磁辐射对神经系统影响的重要切入点。已有研究观察到电磁辐射对神经元突起生长的影响,Chen 等[3]发现 RF-EMF 暴露后干细胞中 Hes1 蛋白表达上调抑制了 Ngn1 和 NeuroD 的表达,造成干细胞神经突起生长受损;Del-Vecchio 等[13]发现 RF-EMF 暴露导致 SN56 细胞系和皮层神经元中 β-thymosin 基因 mRNA 表达增高,造成两种细胞中突起生长受损。近年来在对瞬时受体电位通道的研究中,TRPC1、TRPC3 亚族为代表的 TRPC 通道家族在发挥神经突起生长、轴突导向调控中的作用多有报道[5-7,14]。Heo 等[4]发现,在 PC12 细胞系中,过表达 TRPC1 可促进细胞系突起生长;Wu 等[15]发现,H19-7 细胞分化时 TRPC1、TRPC3 基因表达增加,加强了 SOCE 水平,且 SOCE 的增强在细胞分化过程中是必需的。由于其产生和发展机制目前仍未完全阐明,手机频段 1 800 MHz RF-EMF 是否影响神经元突起生长尚不清楚。因此,TRPC 通道在该效应中有何作用是值得我们探究的问题。

本研究实验观测到 1800 MHz RF-EMF 暴露 48 h 引起神经元突起总长度、初级突起数和分支数较假暴露组显著降低,同时,发现 TRPC1、TRPC3 的蛋白表达从辐照 24 h 开始显著下降。TRPC 是膜定位的离子通道,作为一类新发现的细胞 Ca^{2+} 摄入途径,越来越多的研究证实,TRPC 通道家族是介导 SOCE 的重要成员之一[16-20],并主要依赖钙库操纵来激活,通过介导钙信号行使对细胞的调节功能。在观察到 RF-EMF 致 TRPC1、TRPC3 蛋白表达下降的基础上,实验还进一步发现 RF-EMF 暴露导致细胞内 SOCE 显著下降,但这一效应是否有 TRPC 通道参与并不清楚。通过加入 TRPC 阻断剂 SKF-96365 后测 SOCE 发现,与假暴露组加入 SKF-96365 后能显著降低 SOCE 不同的是,RF-EMF 组加入 SKF-96365 并未进一步增强 RF-EMF 引起 SOCE 下降的效应,提示电磁辐射影响了包括 TRPC 通道功能在内的钙离子通道,从而削弱、干扰了 SKF-96365 对 TRPC 的阻断作用,间接说明 RF-EMF 所致 SOCE 下降与 TRPC 通道功能受累有关,其中电磁辐射所致 TRPC1、TRPC3 表达下降是原因之一。SKF-96365 与电磁场联合暴露的实验中,神经元突起生长与钙成像所得到的变化趋势一致,单纯电磁场或 SKF-96365 暴露均可引起神经元突起生长被显著抑制,而电磁场与 SKF-96365 并不会产生叠加效应,说明神经元突起生长受抑与电磁场通过影响 TRPC 功能进而引起 SOCE 降低有关。

综上所述,本实验模型下,电磁辐射引起的包括 TRPC1、TRPC3 蛋白表达受抑在内的 TRPC 通道功能受累,参与电磁场作用所致 SOCE 减少的生物效应,是电磁辐射影响神经元突起生长的原因之一。调控突起生长和 SOCE 的因素较多,本实验仅从 TRPC 通道途径对电磁辐射突起生长 SOCE 之间的关联进行了初步探索。实验发现,射频电磁场暴露引起的 SOCE 下降作用明显强于 SKF-96365 对 SOCE 的抑制作用,说明射频电磁场对钙通道的影响除了作用在 TRPC 位点,还有其他途径,这需要后续的研究工作进行更加深入的探讨。

参考文献:

[1] ICT Data and Statistics. The world in 2011: ICT facts and figures [EB/OL]. (2012-02-28) [2014-12-14]. http://

www. itu. int/ITU-D/ict/facts/2011/material/ICTFactsFigures2011. pdf.

[2] Telecommunication Development Sector. Exploring the Value and Economic Valuation of SpEctrum. [EB/OL]. (2012-04-10) [2014-12-14]. http://www. itu. int/ITU-D/treg/broadband/ITU-BB-Reports_SpectrumValue. pdf#search = ALL%283G%20lte%202G%20%29.

[3] Chen C H, Ma Q L, Liu C, *et al*. Exposure to 1800 MHz radiofrequency radiation impairs neurite outgrowth of embryonic neural stem cells[J]. Sci Rep, 2014, 4: 5103.

[4] Heo D K, Chung W Y, Park H W, *et al*. Opposite regulatory effects of TRPC1 and TRPC5 on neurite outgrowth in PC12 cells[J]. Cell Signal, 2012, 24(4): 899 – 906.

[5] Shapovalov G, Lehen'kyi V, Skryma R, *et al*. TRP channels in cell survival and cell death in normal and transformed cells [J]. Cell Calcium, 2011, 50(3): 295 – 302.

[6] Reboreda A, Jimenez-Diaz L, Navarro-Lopez J D. TRP channels and neural persistent activity[J]. Adv Exp Med Biol, 2011, 704: 595 – 613.

[7] Clapham D E, Runnels L W, Strubing C. The TRP ion channel family[J]. Nat Rev, 2001, 2(6): 387-396.

[8] Xu S, Zhou Z, Zhang L, *et al*. Exposure to 1800 MHz radiofrequency radiation induces oxidative damage to mitochondrial DNA in primary cultured neurons [J]. Brain Res, 2010, 1311: 189 – 196.

[9] Radio N M, Mundy W R. Developmental neurotoxicity testing *in vitro*: models for assessing chemical effects on neurite outgrowth[J]. Neurotoxicology, 2008, 29(3): 361 – 376.

[10] Qiu C, Fratiglioni L, Karp A, *et al*. Occupational exposure to electromagnetic fields and risk of Alzheimer's disease [J]. Epidemiology, 2004, 15(6): 687 – 694.

[11] Shirakawa H, Sakimoto S, Nakao K, *et al*. Transient receptor potential canonical 3 (TRPC3) mediates thrombin-induced astrocyte activation and upregulates its own expression in cortical astrocytes [J]. J Neurosci, 2010, 30(39): 13116 – 13129.

[12] Halassa M M, Fellin T, Haydon P G. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease[J]. Trends Mol Med, 2007, 13(2): 54 – 63.

[13] Del-Vecchio G, Giuliani A, Fernandez M, *et al*. Continuous exposure to 900MHz GSM-modulated EMF alters morphological maturation of neural cells [J]. Neurosci Lett, 2009, 455(3): 173 – 177.

[14] Li H S, Xu X Z, Montell C. Activation of a TRPC3-dependent cation current through the neurotrophin BDNF[J]. Neuron, 1999, 24(1): 261 – 273.

[15] Wu X, Zagranichnaya T K, Gurda G T, *et al*. A TRPC1/TRPC3-mediated increase in store-operated calcium entry is required for differentiation of H19-7 hippocampal neuronal cells[J]. J Biol Chem, 2004, 279(42): 43392 – 43402.

[16] Li M, Chen C, Zhou Z, *et al*. A TRPC1-mediated increase in store-operated Ca^{2+} entry is required for the proliferation of adult hippocampal neural progenitor cells[J]. Cell Calcium, 2012, 51(6): 486 – 496.

[17] Moran M M, Xu H, Clapham D E. TRP ion channels in the nervous system[J]. Curr Opin Neurobiol, 2004, 14(3): 362 – 369.

[18] Pedersen S F, Owsianik G, Nilius B. TRP channels: An overview[J]. Cell Calcium, 2005, 38(3/4): 233 – 252.

[19] Minke B. TRP channels and Ca^{2+} signaling[J]. Cell Calcium, 2006, 40(3): 261 – 275.

[20] Worley P F, Zeng W, Huang G N, *et al*. TRPC channels as STIM1-regulated store-operated channels[J]. Cell Calcium, 2007, 42(2): 205 – 211.

(收稿:2014-11-19;修回:2014-12-14)

(编辑 吴培红)