doi:10.11659/jjssx.03E016063

致死剂量微波辐照后小鼠肝超微结构及 HSP70 表达的变化

王小华[1],刘明树[1],刘淑芳[1],黄映雪[1],王瑞春[1],江 伟[1],杨 灶[1],齐宏基[1],周 舟[2],余争平[2] (1.重庆市公安局渝中区分局物证鉴定所,重庆 400013;2.第三军医大学劳动卫生学教研室,教育部电磁生物效应重点实验室,重庆 400038)

[摘 要] **目的** 观察致死剂量微波辐照后小鼠肝超微结构及热休克蛋白 70(HSP70)表达的变化,探讨其在法医学鉴定中的意义。**方法** 将昆明种小鼠分为正常对照组和辐照组,辐照组小鼠采用峰值功率密度为 129 W/cm^2 的微波全身一次辐照 30 min 致小鼠死亡后,立即用透射电镜观察小鼠肝的超微结构变化;采用反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法检测小鼠肝 HSP70 mRNA 表达变化,免疫印迹法检测小鼠肝 HSP70 蛋白表达变化。**结果** 致死剂量微波辐照后小鼠肝细胞胞浆点片状溶解,线粒体嵴和膜溶解消失;HSP70 mRNA 和蛋白水平表达显著上调,与正常组对照比较,差异具有极显著统计学意义($P<0.01$)。**结论** 微波辐照致死可导致小鼠肝细胞胞浆溶解、线粒体损伤、HSP70 mRNA 和蛋白水平表达明显上调,可作为微波辐照致死鉴定的重要参考指标。

[关键词] 微波;致死剂量;肝;HSP70

[中图分类号] R795.1 [文献标识码] A [收稿日期] 2016-03-06

Ultrastructural changes and HSP70 expression in mice liver after microwave irradiation with lethal dose

WANG Xiao-hua[1],LIU Ming-shu[1],LIU Shu-fang[1],HUANG Ying-xue[1],WANG Rui-chun[1],JIANG Wei[1],YANG Zao[1],QI Hong-ji[1],ZHOU Zhou[2],YU Zheng-ping[2] (1. Institute of Forensic Science,Yuzhong Branch of the Security of Chongqing Public Bureau,Chongqing 400013,China;2. Department of Occupational Hygiene,Third Military Medical University,Key Laboratory of Electromagnetic Biological Effects,Ministry of Education,Chongqing 400038,China)

Astract: Objective To investigate the ultrastructural changes and HSP70 expression in liver of mice after microwave irradiation with lethal dose and to explore the application of these indexes as the basis of medical identification in microwave irradiation induced death. **Methods** The mice were divided into the control group and the irradiation group. Mice of the irradiation group were induced death by whole body exposure to 129 W/cm^2 microwave irradiation for 30 minutes. The ultrastructure of liver was observed by transmission electron microscope;changes of the HSP70 mRNA and protein expression in liver were detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blotting respectively. **Results** Liver cytoplasm was observed dissolved with points and sheets and there were mitochondrial crest and membrane solution in the irradiation group. And the HSP70 mRNA and protein expression level increases significantly compared with the control group with statistically significant difference ($P<0.01$). **Conclusion** Death induced by microwave irradiation could lead to liver cytoplasm dissolution, mitochondria damage, mRNA and protein expression of HSP70 up-regulation, which may be used as important diagnostic indicators of microwave irradiation induced death.

Keywords: microwave;lethal dose;liver;HSP70

高能量微波作为一种新型的高能电磁辐射,已经广泛应用于军事、国防、通讯等各个领域,对人体健康有极其重要的影响。微波辐照致死亡不仅可出现于生产过程直接大剂量暴露泄漏,也可能出现于高能量微波武器的攻击,因此微波辐照致死成为法医学鉴定的新内容已成趋势。由于微波辐射看不见、摸不着,对法医学鉴定提出了极大的挑战[1]。其中,迫切需要解决的就是明确致死性微波辐照后主要组织器官的病理生理变化特点。既往研究表明,微波辐照会产生明显的热效应,且存在明显的剂量依赖效应关系[2]。肝是机体中功能较多、含水较丰富的主要器官,是高能量微波致机体损伤的重要敏感器官之一。微波辐照致死作为一种急性死亡,可诱导肝细胞内早期应急相关因子的表达。HSP70 (heat shock proteins 70,HSP70)是 HSP 家族的主要成员,广泛参与机体的保护功能,对于生物体抵抗和适应不良环境有着十分重要的意义[3]。如在不良环境中,细胞内出现蛋白质变性,当其变性过多就会威胁细胞的生存,而此时出现的变性蛋白可诱导 HSP70 大量合成,HSP70 能使变性蛋白恢复活性,从而保证细胞活性[4-5]。微波辐照致死后肝 HSP70 的表达及变化目前未见文献报道。本研究观察致死剂量微波辐照致小鼠肝超微结构的变化,并从 mRNA 和蛋白水平检测 HSP70 表达的改变,探讨微波辐照致死的小鼠肝病理生理变化特点,为微波辐照致死的法医学鉴定提供部分参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂与仪器 H-7500 透射电子显微镜(日本 Hitachi 公司)、电镜台式低温高速离心机(德国 Heraeus 公司)、PCR 仪(美国 MJ PTC-100)、垂直电泳

槽及电泳仪、蛋白转印槽和凝胶图像成像系统 Gel 2000(美国 Bio-Rad 公司)、微波辐源(加拿大原子能公司)。Taq DNA 聚合酶和 M-MuLV 逆转录酶,Oligo d(T)18 和 DNA ladder(美国 NSBC 公司)HSP70 羊抗鼠多克隆抗体和兔抗羊 IgG(美国 Santa Crus 公司)

1.1.2 实验动物及分组 3 周龄雄性昆明种同窝小鼠 40 只,体质量(15.13 ±0.28)g,动物合格证编号为 SYXK(渝)2012-0002,由第三军医大学实验动物中心提供。将小鼠平均分为辐照组和正常对照组,每组 20 只。

1.2 方法

1.2.1 微波辐照及取材 辐照组在无反射微波暗室内接受峰值功率为 129 W/cm^2 微波全身辐照 30 min 致小鼠死亡;对照组不进行微波辐照,颈椎脱臼法处死小鼠。小鼠死亡后即刻取出肝脏,切取小块(1 mm ×1 mm ×2 mm)放入 4% 戊二醛固定液中备行透射电镜观察。

1.2.2 透射电镜观察 小鼠肝脏组织块经 4% 戊二醛固定,常规处理后制成超薄切片并电子染色,切片在 H-7500 透射电子显微镜下观察。

1.2.3 RT-PCR 按异硫氰酸胍提取法提取总 RNA 后进行逆转录反应:取总 RNA 0.5 μg,70 ℃变性5 min 后冷却,加入 M-MuLv 逆转录酶,在总体积 20 μl 的反应体系中 37 ℃水浴 60 min,随后 70 ℃变性 10 min,冷却至 4 ℃用于 PCR。HSP70 引物由 primer 3 设计:上游引物 5'-CTCGTGCGTGGGCGTGTTCC-3',下游引物 5'-TGGGCCTTGTAGTTCACCTG-3',扩增片段为 285 bp;设 β-actin 阳性产物为 PCR 内参照,β-actin 引物序列:上游引物 5'-CACCATCTTCCAGGAGCGAG-3',下游引物 5'-TCACGCCACAGTTTCCCGGA-3',扩增片段为 372 bp,反应体系 25 μl,反应条件 94 ℃ 2 min,94 ℃ 30 s,58 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,35 cycles,72 ℃延长 10 min。电泳结束后,在凝胶成像仪下观察并拍照。将电泳凝胶置于 Gel Dc 2000 凝胶图像分析系统,PCR 产物量以吸光度(A)值×面积表示。

1.2.4 Western 检测蛋白表达 100 mg 肝组织加入蛋白裂解液 100 μl,匀浆,冰点孵育 30 min,4 ℃ 13 000 rpm离心 20 min,将上清液移入另一 EP 管内,紫外分光光度法进行蛋白定量,-70 ℃保存备用。60 μg 总蛋白以电压 60 V、10% Tris-甘氨酸十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 1.5 h 后,转移槽 80 V 转移1 h蛋白转印至 PVDF 膜,转印后将 PVDF 膜免疫反应后置于 LumiGLO 化学发光试剂中反应,常规方法显影定影,将显色清晰条带的 PVDF 膜置 Gel Dc 2000 凝胶图像分析系统扫描测得的蛋白条带 Volume 值(A ×mm^2),结果以样本 Volume 值/对照 Volume 值表示。

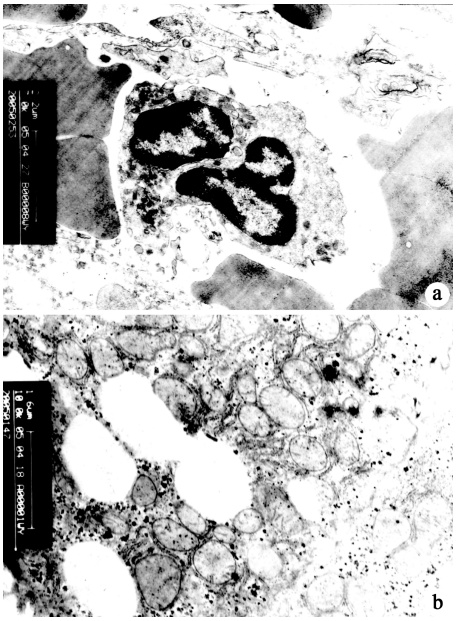
1.3 统计学处理

数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,以 SPSS 10.0 统计软件包进行组间单因素方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义,$P<0.01$ 为差异有极显著性统计学意义。

2 结果

2.1 电镜下观察小鼠肝细胞超微结构特点

正常肝细胞胞质含丰富的内质网、线粒体,肝窦内可见红细胞,肝血窦正常,肝细胞血窦面可见较多的微绒毛。核卵圆形,核仁明显,1 ~2 个,核膜下可见少量染色质。129 W/cm^2 辐照后死后胞质内出现明显片状溶解坏死,空泡形成,粗面内质网减少,染色质明显边集,核仁不明显,线粒体嵴和膜溶解消失(图 1)。

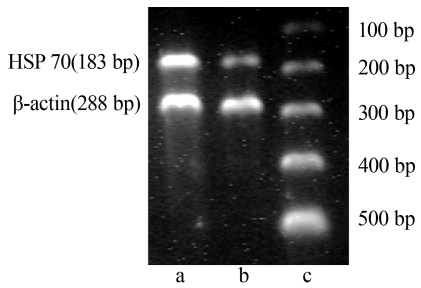


a:胞浆片状溶解,细胞核边集;b:大脂肪空泡,线粒体嵴和膜溶解

图 1 肝组织的超微结构变化(×7 000)

2.2 小鼠肝脏组织 HSP70mRNA 表达情况

结果如图 2 所示,129 W/cm^2,30 min 微波辐照死亡后,小鼠肝组织 HSP70 mRNA 的光密度值为(0.483 ± 0.018),对照组的光密度值(0.134 ±0.029)。与对照组比较,微波辐照死后小鼠肝组织 HSP70 的 mRNA 表达明显升高,差异具有极显著性统计学意义($P<0.01$)。

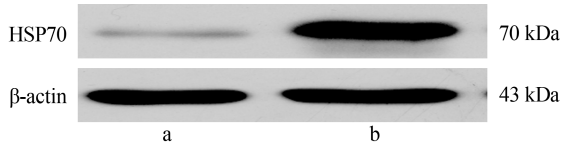


a:辐照死亡组;b:正常对照组;c:DNA ladder

图 2 小鼠肝脏组织 HSP70 mRNA 的表达

2.3 小鼠肝组织 HSP70 蛋白表达情况

如图 3 所示,129 W/cm^2,30 min 微波辐照死后肝组织 HSP70 蛋白的光密度值为(0.294 ±0.027),对照组的光密度值(0.114 ±0.031)。与对照组相比,辐照死亡组小鼠肝脏组织 HSP70 的蛋白表达明显提高,差异具有极显著性统计学意义(P <0.01)。



a:正常对照组;b:辐照死亡组

图 3 小鼠肝组织 HSP70 的蛋白表达

3 讨论

微波辐射损伤主要发生于职业性损伤与灾害事故。微波辐射致死的人体解剖资料目前未见报道,在法医鉴定实践中除了了解微波接触史、接触剂量、屏蔽措施、临床症状和病变等资料外,应在微波致死各器官的病理改变和分子表达变化寻找诊断指标。暴露于微波场中的机体,身体各部所受辐射的功率虽大致相同,但因机体各部位组织特性不同,吸收的能量也不等。水是一种极性分子,含水量高的组织,其介电常数和电导率远远高于含水量低的组织,因而受辐射的影响也较大。肝是人体最大、功能最多的腺体器官,参与体内消化、代谢、排泄、解毒和免疫等过程,其中以代谢机能最为重要。由于组织含水量丰富,肝对微波热效应损伤具有高度敏感性。微波辐照具有明显的热效应,对肝细胞的损伤机理主要是促进胞膜脂质过氧化,造成胞内自由基等活性氧代谢产物的蓄积并抑制细胞内抗氧化系统的功能,还原型谷胱甘肽耗竭、SOD 表达下调,造成 DNA 损伤与诱导肝细胞坏死与调亡;诱导肝网状内皮细胞合成释放 TNF-a、IL-1、IL-6 等致炎细胞因子[2]。微波致肝损伤与热效应显著相关,辐照后体温变化的幅度与组织病理学损伤程度一致[2]。本研究采用功率为 129 W/cm^2 的微波整体辐照致小鼠死亡后,肝细胞胞质内出现明显片状溶解坏死,空泡形成,粗面内质网减少,染色质明显边集,核仁不明显,线粒体脊和膜溶解消失,这与既往的研究报道微波引起损伤的表现基本一致[1-2]。

HSP 是细胞或生物体在应激原,特别是高温、氧化应激等条件诱导下,高效表达的一组高度保守的蛋白质,广泛分布于各种生物体内[6-8],按相对分子量的大小及同源程度,热休克蛋白可分为 HSP70、HSP90、小分子 HSP 及泛素 4 个家族。最早确定的 HSP 生物学功能是与调节机体的耐热性有关,当细胞受热或其他应激时能获得耐热性或抗性,以保护细胞自身免疫受损。正常生理状态时,细胞内具有功能活性的蛋白质是以一种天然的、适当折叠的构象存在,然而在蛋白质合成前期,多肽链的组装、跨膜转运等许多重要过程,都需要暂以未折叠或部分折叠的形式存在,这种未折叠的形式会使蛋白分子结构的某些活性区如疏水基团暴露于外,并可能与其自身或其他多肽链结构域相互作用引起蛋白质的积聚,干扰细胞功能运转。热休克蛋白属于分子伴侣蛋白家族,在错误折叠蛋白的重新折叠和指导蛋白酶降解的过程中起着十分重要的作用,如维持细胞蛋白自稳,提高细胞对应激原的耐受性,使细胞维持正常的生理功能等。HSP70 还参与许多细胞的正常生理过程,如蛋白质从初生链合成到多亚基复合体折叠、装配的整个生物合成,蛋白质向内质网的易位,分解错装的蛋白等[9-11]。同时 HSP70 有抗细胞凋亡的功能。有害应激如热应激、氧化应激等可以导致细胞程序性死亡,即凋亡。应激诱导的细胞凋亡需要激活细胞内应激激酶(Jun N-terminal kinase,JNK),HSP70 水平增高可以阻断信号通路,抑制应激诱导的 JNK 激活,从而减少细胞的凋亡[12]。同时,还有研究表明 HSP70 可以显著提高细胞耐热性,当热应激时,HSP70 可迅速大幅度被诱导,且广泛存在于细胞骨架内外,与核仁和细胞膜结合,提高机体对热的耐受力[13]。HSP70 还参与形成细胞浆的骨架结构,这些结构的形成可以提高机全细胞对应激反应的耐受力[14-15]。本次实验结果表明小鼠肝脏在受到致死剂量微波辐照后迅速激活了 HSP70 的基因表达和蛋白翻译,这有助于显著增强机体在受到热损伤时的保护作用。

本实验发现微波辐照致死后肝脏超微结构的变化,以及肝脏 HSP70 基因和蛋白表达显著增强,可以为微波辐照致死的法医学诊断提供部分参考依据。

[参考文献]

[1] Hao YH, Zhao L, Peng RY. Effects of microwave radiation on brain energy metabolism and related mechanisms[J]. Mil Med Res, 2015, 2:4. doi:10.1186/s40779-015-0033-6.

[2] 郝玉通,裴莉萍,陈纯海,等. 微波暴露对大鼠海马脑区热休克蛋白 70 表达的影响[J]. 中华劳动卫生职业病杂志,2009,27(9):553-556. doi:10.3760/cma.j.issn.1001-9391.2009.09.010.

[3] Semenkov VF, Michalski AI, Sapozhnikov AM. Heating and ultraviolet light activate anti-stress gene functions in humans[J]. Front Genet, 2015, 6:245. doi:10.3389/fgene.2015.00245.

[4] Misa-Agustiño MJ, Leiro-Vidal JM, Gomez-Amoza JL, et al. EMF radiation at 2450 MHz triggers changes in the morphology and expression of heat shock proteins and glucocorticoid receptors in rat thymus[J]. Life Sci, 2015, 127:1-11. doi:10.1016/j.lfs.2015.01.027.

[5] Balakrishnan K, Murali V, Rathika C, et al. Hsp70 is an independent stress marker among frequent users of mobile phones[J]. J Environ Pathol Toxicol Oncol, 2014, 33(4):339-347. doi:10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.2014011761.

doi:10.11659/jjssx.11E015167

阿魏酸钠对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护

刘 辉,杨初蔚,刘宇飞 (大连医科大学附属第二医院急诊科,辽宁 大连 116023)

[摘 要] **目的** 探讨阿魏酸钠对大鼠心肌缺血再灌注模型心肌功能的影响。**方法** 选取60只7~8周龄[平均(7.26±0.36)周]SD大鼠,随机平均分为假手术组、心肌再灌注组以及阿魏酸钠组,每组20只;比较灌注后各组大鼠心肌功能指标的变化情况。**结果** 与假手术组比较,再灌注组以及阿魏酸钠组的左室舒张末压(LVESP)、大鼠心室最大压力(±dp/dmax)显著下降,差异具有统计学意义($P<0.05$);再灌注2 h时LVESP、±dp/dmax的下降程度再灌注组明显高于阿魏酸钠组,差异具有统计学意义($P<0.05$);各组大鼠的LVEDP与假手术组比较,呈升高趋势,再灌注2 h后,阿魏酸钠组明显低于再灌注组,差异具有统计学意义($P<0.05$);与假手术组比较,再灌注组与阿魏酸钠组的大鼠凋亡细胞比例明显升高,阿魏酸钠组Fas阳性表达比例明显低于再灌注组,差异均具有统计学意义($P<0.05$);大鼠血液中LDH以及CK-MB的含量均明显升高,再灌注组明显高于阿魏酸钠组,差异具有统计学意义($P<0.05$);与假手术组比较,心肌再灌注组和阿魏酸钠组SOD含量明显降低,但阿魏酸钠组的降低程度低于再灌注组,差异具有统计学意义($P<0.05$);而MDA的含量却上升,但阿魏酸钠组的升高程度低于再灌注组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 阿魏酸钠在一定程度上可以恢复心肌再灌注模型大鼠心肌功能的损伤。

[关键词] 阿魏酸钠;心肌缺血再灌注;心肌功能;损伤;保护
[中图分类号] R969;R364 [文献标识码] A [收稿日期] 2015-11-25

Effect of sodium ferulate injection on myocardial function in rat model with myocardial ischemia and reperfusion

LIU Hui, YANG Chu-wei, LIU Yu-fei (Department of Emergency, Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian Liaoning 116023, China)

Abstract: Objective To explore the effect of sodium ferulate injection on myocardial function in rat model with myocardial ischemia and reperfusion. **Methods** Selected 60 rats aged 7~8 weeks (7.26±0.36 weeks averagely) and randomly divided them into the sham group, myocardial reperfusion group, and the sodium ferulate group, with 20 rats in each group. Observed the changes of the cardiac function indexes of the two groups after perfusion. **Results** Compared with the sham group, the degree of LVESP and ±dp/dmax decreased significantly ($P<0.05$) in the myocardial reperfusion group and the sodium ferulate group. The descending degree of LVESP and ±dp/dmax 2 hours after reperfusion in the reperfusion group was significantly higher than that in the sodium ferulate group ($P<0.05$). Compared with

[基金项目] 辽宁省优秀人才培育项目(2014023018)
[通信作者] 刘宇飞,E-mail:l_yf2013@163.com

[6] Naka KK, Vezyraki P, Kalaitzakis A, et al. Hsp70 regulates the doxorubicin-mediated heart failure in Hsp70-transgenic mice[J]. Cell Stress Chaperones, 2014, 19(6): 853-864. doi:10.1007/s12192-014-0509-4.
[7] 管四炎,胡涌亮,余 斌,等. 热休克蛋白70在脊髓损伤患者血清中的表达及临床意义[J]. 中国临床药理学杂志, 2015, 31(10): 830-832. doi:10.13699/j.cnki.1001-6821.2015.10.020.
[8] Klein G, Kobylak N, Lindner B, et al. Assembly of lipopolysaccharide in Escherichia coli requires the essential LapB heat shock protein[J]. J Biol Chem, 2014, 289(21): 14829-14853. doi:10.1074/jbc.M113.539494.
[9] Le Quément C, Nicolaz CN, Habauzit D, et al. Impact of 60-GHz millimeter waves and corresponding heat effect on endoplasmic reticulum stress sensor gene expression[J]. Bioelectromagnetics, 2014, 35(6): 444-451. doi:10.1002/bem.21864.
[10] Rimoldi S, Lasagna E, Sarti FM, et al. Expression profile of six stress-related genes and productive performances of fast and slow growing broiler strains reared under heat stress conditions[J]. Meta Gene, 2015, 6: 17-25. doi:10.1016/j.mgene.2015.08.003.
[11] Andocs G, Meggyeshazi N, Balogh L, et al. Upregulation of heat shock proteins and the promotion of damage-associated molecular pattern signals in a colorectal cancer model by modulated electrohyperthermia[J]. Cell Stress Chaperones, 2015, 20(1): 37-46. doi:10.1007/s12192-014-0523-6.
[12] Valbonesi P, Franzellitti S, Bersani F, et al. Effects of the exposure to intermittent 1.8 GHz radio frequency electromagnetic fields on HSP70 expression and MAPK signaling pathways in PC12 cells[J]. Int J Radiat Biol, 2014, 90(5): 382-391. doi:10.3109/09553002.2014.892225.
[13] Bettaieb A, Averill-Bates DA. Thermotolerance induced at a mild temperature of 40 ℃ alleviates heat shock-induced ER stress and apoptosis in HeLa cells[J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1853(1): 52-62. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.09.016.
[14] Dores-Silva PR, Barbosa LR, Ramos CH, et al. Human mitochondrial Hsp70 (mortalin): shedding light on ATPase activity, interaction with adenosine nucleotides, solution structure and domain organization[J]. PLoS One, 2015, 10(1): e0117170. doi:10.1371/journal.pone.0117170.
[15] Afrazi A, Sodhi CP, Good M, et al. Intracellular heat shock protein-70 negatively regulates TLR4 signaling in the newborn intestinal epithelium[J]. J Immunol, 2012, 188(9): 4543-4557. doi:10.4049/jimmunol.1103114.

(编辑:魏 源)