DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.11.022
第25卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 11
2003年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 200

文章编号:1000-5404(2003)11-0987-03

论著

微波对大鼠脑线粒体细胞色素C氧化酶亚基转录水平的影响

谢 燕[1],江海洪[2],龚茜芬[1],张广斌[1],卢 波[1],徐 庆[1],余争平[1] (第三军医大学:[1]预防医学系劳动卫生学教研室,[2]科研部,重庆 400038)

提 要:目的 观察微波辐照对大鼠大脑皮层和海马组织线粒体编码基因COXⅠ和核编码基因COXⅣmRNA表达水平的影响,探讨微波辐照是否影响线粒体能量代谢。方法 平均功率密度为3 mW/cm^{2}和30 mW/cm^{2}微波急性辐照大鼠1 h后,应用RT-PCR检测大鼠大脑皮层和海马组织COXⅠ和COXⅣ基因转录水平的变化。结果 3 mW/cm^{2}微波辐照后0、3、24 h,大鼠脑海马和大脑皮层COXⅠ、COXⅣ mRNA表达无显著变化。30 mW/cm^{2}微波辐照后0、3、24 h,大鼠脑海马和大脑皮层COXⅠmRNA表达均明显降低,而COXⅣmRNA表达无显著变化。结论 微波辐照下调大鼠大脑皮层和海马线粒体编码基因COXⅠmRNA表达,并存在剂量依赖关系,表明微波辐照可能会引起线粒体能量代谢障碍。

关键词:微波;线粒体;细胞色素C氧化酶;基因表达
中图法分类号:R322.81;R329.23;R363.12 文献标识码:A

Effects of microwave irradiation on mitochondrial cytochrome C oxidase subunits mRNA in rat brain

XIE Yan, JIANG Hai-hong, GONG Qian-fen, ZHANG Guang-bin, LU Bo, XU Qing, YU Zheng-ping (Department of Military Labor Hygiene, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the molecular mechanism of mitochondrial injury induced by microwave irradiation. Methods Rats were exposed to microwave irradiation for 1 hour at average power density of 3 mW/cm^2 or 30 mW/cm^2. After microwave irradiation, changes of COXⅠ and COXⅣ mRNA expression level in cerebral cortex and hippocampus in rats were determined by RT-PCR. Results After 3 mW/cm^2 microwave irradiation for 0, 3 and 24 h, no significant changes of COXⅠ and COXⅣ mRNA expression levels in cerebral cortex and hippocampus in rats were found. However, after 30 mW/cm^2 microwave irradiation for 0, 3 and 24 h, COXⅠ mRNA expression in cerebral cortex and hippocampus in rats decreased significantly, but no significant change of COXⅣ mRNA expression levels was found. Conclusion Microwave irradiation can down-regulate COXⅠ gene encoded by mitochondrial DNA in cerebral cortex and hippocampus in rats in a dose-dependent manner.

Key words: microwave; mitochondria; cytochrome C oxidase; gene expression

当代人的生活与微波技术的应用密切相关。随着工业化和信息化社会的到来,微波通讯和微波电器等得到了迅猛发展,人类生存环境越来越多地受到电磁辐射污染(移动电话、雷达、微波炉等),微波辐射环境污染已经成为大气污染、水污染、噪声污染之后新的第四大公害。微波辐射污染的危害,与前三类环境污染所造成的危害截然不同,它具有危害隐蔽性强、污染范围广、缺乏有效的治理手段等特点。微波对生物体的生物效应及其机制的研究是目前生物电磁学的前沿课题。Akgely等[1~3]在不同实验中发现电磁辐射可致动物学习记忆、行为等功能障碍。这是否与微波辐照引起脑能量代谢障碍有关,有待进一步研究。本研究从大鼠脑组织线粒体DNA编码基因COXⅠ(Cytochrome c oxidaseⅠ, COXⅠ)、核编码基因COXⅣ(Cytochrome c oxidase Ⅳ, COXⅣ)转录水平变化来探讨微波辐照影响线粒体能量代谢的分子机制及微波的损伤特点。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组与微波辐照

采用Wistar系健康雄性大鼠6只(第三军医大学实验动物中心提供),体质量(180±20) g,随机分为对照组(Control, C)和微波辐照组,每组3只。实验动物置微波暗室内进行微波

作者简介:谢 燕(1968-),女,四川省西昌市人,博士,讲师,主要从事物理因素与健康方面的研究,发表论文7篇。电话:(023)68752289

收稿日期:2002-08-23;修回日期:2002-09-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

辐照，辐照室温度(24±2) ℃，湿度50%～70%(环境的温、湿度用设备保持恒定)。用平均功率密度为3 mW/cm^{2}和30 mW/cm^{2}微波一次性全身辐照大鼠1 h。于辐照后0、3、24 h，大鼠断头，分离大脑皮层、海马，置液氮保存备用。

1.2 主要仪器与试剂

PCR仪(MJ PTC-100，美国)，Du-640紫外分光光度计(Beckman美国)，凝胶扫描仪(SANYO日本)，凝胶图像成像系统(DOC Gel 2000型，Biorad，美国)等。焦碳酸二乙酯/DEPC，3-N-马啡啉丙磺酸/MOPS，β-巯基乙醇购自Sigma；异硫氰酸胍，Taq DNA聚合酶(上海生工)，M-MuLV逆转录酶(Promega)，RNase抑制剂(BM)，DDT(Gibco)等。

1.3 脑组织总RNA的提取

采用异硫氰酸胍法提取大脑皮层、海马组织总RNA。RNA提取的有关物品均经DEPC处理。其A_{260}/A_{280}在1.8～2.0。

1.4 RT-PCR检测

微波辐照后大鼠大脑皮层和海马组织COXⅠ和COXⅣ基因表达的变化应用RT-PCR检测，按以下要求操作。总RNA经逆转录合成cDNA后，进行PCR扩增，并以β-Actin作为内参照，COXⅠPCR循环条件为95 ℃ 30 s，56 ℃ 30 s，72 ℃ 1 min，循环31次；COXⅣPCR循环条件为95 ℃ 30 s，61 ℃ 30 s，72 ℃ 1 min，循环40次。β-Actin扩增条件同COXⅣ。COXⅠ，COXⅣ，β-actin扩增的片段长度为381 bp，364 bp，250 bp。引物设计序列分别为：

COXⅠ 5′-GCTGCTAATACTGGCAGTGAGA-3′
5′-GCTTCGGAAACTGACTTGTACC-3′
COXⅣ 5′-GGCAGCAGTGGCAGAATGTTGG-3′
5′-ACAAGCGCAGTGAAGCCGATGA-3′
β-Actin 5′-TTGTTACCACCTGGGACGATATGG-3′
5′-GATCTTGATCTTCATTGCTAGGG-3′

取4 μl PCR产物在1.7%凝胶上电泳，用凝胶成像系统扫描分析，记录各条带光密度，结果以各个检测基因与自身β-Actin条带密度比值与对照组比较表示。

1.5 统计学分析

实验结果用$\bar{x}\pm s$表示，采用Microsoft Excel软件进行t检验。

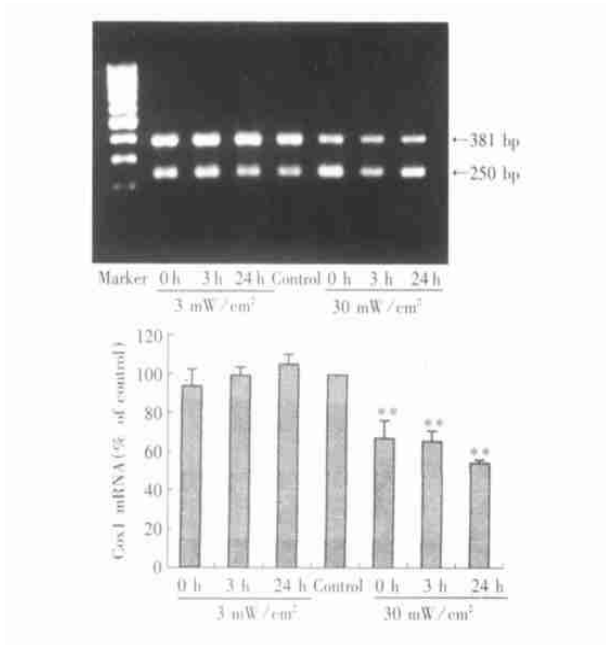
2 结果

2.1 平均功率密度为3 mW/cm^{2}和30 mW/cm^{2}微波辐照对大鼠脑海马COXⅠmRNA表达的影响

由图1可知30 mW/cm^{2}微波急性辐照后各时相点海马COXⅠmRNA表达明显降低($P<0.01$)，而3 mW/cm^{2}微波急性辐照对海马COXⅠmRNA表达的影响不明显($P>0.05$)。

2.2 平均功率密度为3 mW/cm^{2}和30 mW/cm^{2}微波辐照对大鼠大脑皮层COXⅠmRNA表达的影响

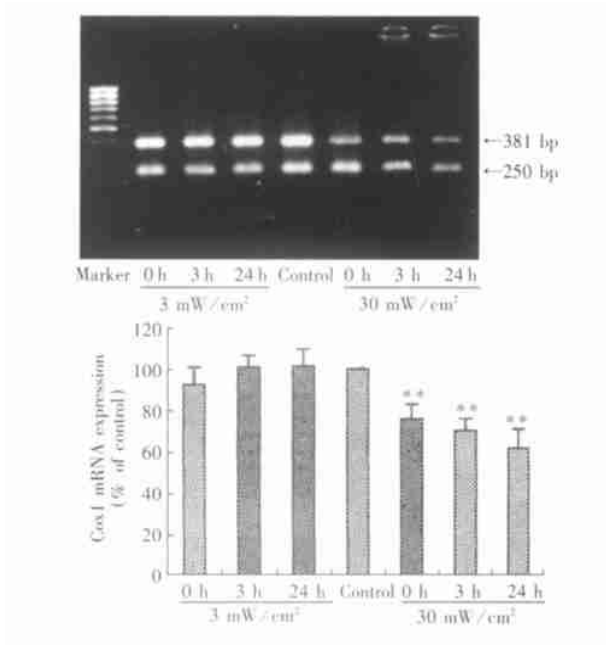
由图2可知30 mW/cm^{2}微波辐照后各时相点皮层COXⅠmRNA表达明显降低($P<0.01$)，而3 mW/cm^{2}微波急性辐照对大脑皮层COXⅠmRNA表达的影响不明显，其变化规律同2.1海马($P>0.05$)。



**：$P<0.01$ *vs* control

图1 微波辐照对大鼠脑海马COXⅠmRNA表达的影响

Fig 1 Effect of microwave irradiation on COXⅠ mRNA expression in the hippocampus of rats



**：$P<0.01$ *vs* control

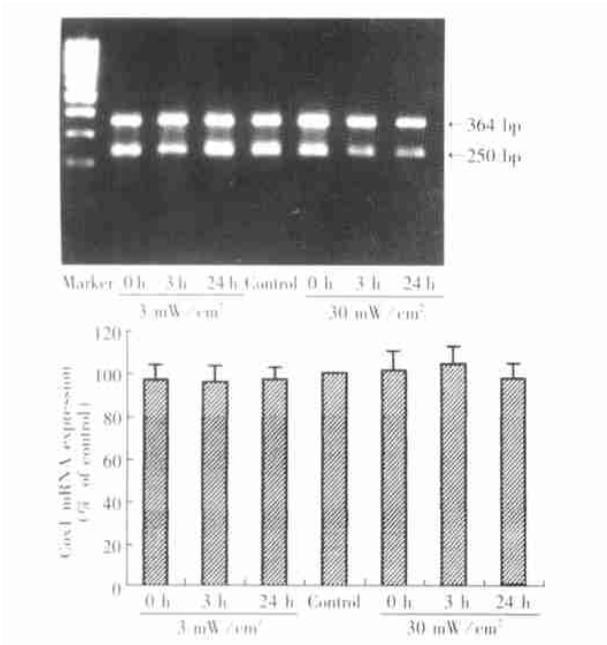
图2 微波辐照大鼠大脑皮层COXⅠmRNA表达的影响

Fig 2 Effect of microwave irradiation on COXⅠ mRNA expression in the cerebral cortex of rats

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.3　平均功率密度为 3 mW/cm^2 和 30 mW/cm^2 微波辐照对大鼠大脑海马、皮层 COX Ⅳ mRNA 表达的影响

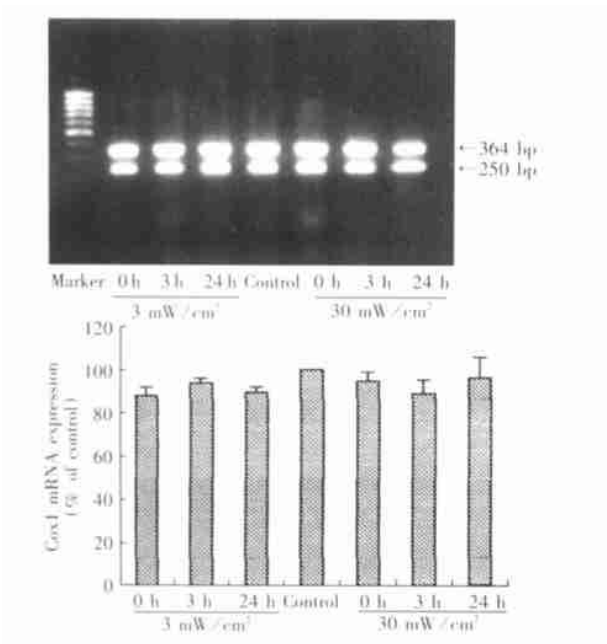
由图 3、图 4 可知, 无论高剂量还是低剂量微波辐照后各时相点脑海马、皮层 COXⅣmRNA 表达无显著变化($P>0.01$)。



**: $P<0.01$ *vs* control

图 3　微波辐照对大鼠大脑海马 **COXⅣmRNA** 表的影响

Fig 3　Effect of microwave irradiation on COXⅣmRNA expression in the hippocampus of rats



**: $P<0.01$ *vs* control

图 4　微波辐照对大鼠大脑皮层 **COXⅣ mRNA** 表达的影响

Fig 4　Effect of microwave irradiation on COXⅣmRNA expression in the cerebral cortex of rats

3　讨论

线粒体是细胞氧化磷酸化产生能量的场所, 线粒体呼吸链是由核 DNA 和线粒体自身 DNA 共同编码的复合物构成的。细胞色素 C 氧化酶是线粒体呼吸链电子传递的终末复合物, 是线粒体能量代谢的两个关键酶之一, 一旦受损, 线粒体功能降低, 导致 ATP 合成减少, 并且还可能导致线粒体呼吸链电子单价泄漏增强而产生更多的活性氧 ROS(Reactive oxidase species, ROS)产物, 介导 PCD(Programmed cell death, PCD)信号转导通路的活化, 严重者将导致细胞死亡(凋亡或坏死)。Cox 由多个亚基的复合物镶嵌在线粒体内膜上, 其中大亚基Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ由线粒体基因编码并定位合成, 具有酶催化活性[2], 其在 $\Delta\psi H$ 的产生机制中起直接的控制作用, 与质子消耗和质子泵有关; 其余十个小亚基由细胞核基因组编码合成, 然后进入线粒体, 此部分起调节线粒体催化亚基的活性。COX 是由线粒体基因组与核基因组各自编码的亚基共同组成的复合物, 其被认为是研究线粒体和核两基因组之间转录、翻译及其调节等相互作用的一个典型。本实验结果表明, 微波辐照后海马和皮层线粒体 COXⅠ mRNA 表达明显降低, 存在明显的剂量依赖关系, 表现为微波的功率窗效应。微波辐照后海马和大脑皮层 COXⅣmRNA 表达无显著性变化。微波对基因转录水平的损伤具有选择性作用, 如本实验微波对线粒体 COXⅠ 基因的转录水平具有损伤作用, 而对 COXⅣ基因的转录水平无影响, 并且表明微波对核基因组和线粒体基因组的转录水平的损害不具有协同作用。可能是线粒体基因组相对于核基因组, 缺乏组蛋白的保护, 更加易受到损害。根据本研究结果还提示, 用平均功率密度低于 3 mW/cm^2 脉冲微波辐照时, 对大鼠大脑皮层、海马组织核基因组和线粒体基因组的转录水平不会造成损害, 临床上可以此强度作为辐射安全剂量应用, 此与文献[3, 4]报道基本一致。

参考文献:

[1] Akyel Y, Hunt E L, Gambrill C, *et al*. Immediate post-exposure effect of high-peak-power microwave pulses on operant behavior of Wistar rats[J]. Bioelectromagnetics, 1999, 12(3): 183－195.

[2] Kadenbach B, Barth J, Akgun R, *et al*. Regulation of mitochondrial energy generation in health and disease[J]. Biochim Biophys Acta, 1995, 1271(1): 103－109.

[3] 齐志恒. 新编物理治疗学[M]. 北京: 华夏出版社, 1993. 270.

[4] 骆松明, 金西铭, 徐秀玲, 等. 微波对内耳、眼、脑影响的实验研究[J]. 上海第二医科大学学报, 1995, 15(4): 306－309.

(编辑　张大春)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net