

电磁辐射对 PC12细胞 G hr2蛋白质表达及磷酸化的影响

刘 勇,王登高,张广斌,余建华,王虚步

中图分类号: R818.7 文献标识码: A 文章编号: 1004-714X(2007)02-0135-02

【摘要】 目的 探讨电磁辐射对 PC12细胞 G hr2蛋白质表达及蛋白质磷酸化水平的影响。方法 对离体培养的 PC12细胞给予平均功率密度为 $90\text{ mW}/\text{cm}^2$ 的电磁波持续辐照 20 min,采用 western blot方法检测辐照后 0h、3h、12h、24h四个时相点 G hr2蛋白质表达及蛋白质磷酸化水平的变化。结果 电磁波辐照后 0h和 3h G hr2的蛋白质表达水平降低 ($P<0.05$),其余各时相点无显著变化;辐照后 0h G hr2的蛋白质磷酸化水平显著降低 ($P<0.01$),3h后逐渐恢复至正常水平。结论 平均功率密度为 $90\text{ mW}/\text{cm}^2$ 的电磁波持续辐照 20 min能够降低 PC12细胞 G hr2的蛋白质表达和蛋白质磷酸化水平。

【关键词】 电磁辐射; G hr2 蛋白质表达; 蛋白质磷酸化; PC12细胞

Effects of Electromagnetic Irradiation on the Level of G hr2 Protein Expression and Phosphorylation in PC12 Cells LIU Yong, WANG Deng-gao, ZHANG Guang-bin, et al. Department of Military Occupational Hygiene, The Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

【Abstract】 Objective To observe the effects of electromagnetic irradiation on the level of G hr2 protein and phosphorylation in PC12 cells. Methods The cultured PC12 cells were exposed to $90\text{ mW}/\text{cm}^2$ (average power density) electromagnetic wave for 20 min. The level of G hr2 protein and phosphorylation of PC12 cells were examined by western blot at 0 h, 3 h, 12 h, 24 h after irradiation. Results The level of G hr2 protein of PC12 cells decreased at 0 h and 3 h after irradiation. The level of G hr2 phosphorylation of PC12 cells decreased significantly at 0 h after irradiation. Conclusion $90\text{ mW}/\text{cm}^2$ (average power density) electromagnetic wave could lower the level of G hr2 protein and phosphorylation in PC12 cells.

【Key words】 Electromagnetic Irradiation; G hr2 Protein Expression; Phosphorylation; PC12 Cells

研究表明,急性电磁辐射具有明确的中枢神经损伤效应^[1,2]。但电磁辐射作为一种物理刺激因素是如何通过细胞信号传导系统来影响神经细胞功能活性的呢?相关机理的研究有待深入。近年来的研究发现,AMPA受体是存在于神经细胞内和细胞膜上参与神经细胞信号传导的一类重要受体^[3]。AMPA受体包括 G hr1、G hr2、G hr3和 G hr4等,其中主要是 G hr2通过其磷酸化的形式参与神经信号的传导^[4]。本实验通过检测电磁辐射后 PC12细胞 G hr2的蛋白质表达及其磷酸化水平的变化,探讨 G hr2的磷酸化与电磁辐射致中枢神经细胞损伤之间的关系。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂 CO₂培养箱(Harris USA),电磁辐射源(西安黄河厂);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);垂直电泳槽及电泳仪(Bio-Rad USA);蛋白转印槽(Bio-Rad USA);凝胶成像系统(Doc Gel 200 Bio-Rad USA);PC12细胞株由中国科学院药物研究所提供,抗 G hr2兔多克隆抗体(Santa Cruz);抗磷酸化 G hr2(Ser80/831)多克隆抗体(Santa Cruz);辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(北京中山)。

1.2 PC12细胞培养 PC12细胞 1×10^5 个/ml浓度接种于RPMI 1640培养液中,内含 10%小牛血清、 10×10^4 U/L青霉素、 10×10^4 U/L链霉素,置于 37℃,5% CO₂培养箱中培养,3~4 d后细胞处于对数生长期,用于实验。细胞培养瓶及培养板均预先以多聚赖氨酸处理。

1.3 实验分组 将生长良好的 PC12细胞随机分为对照组(0 mW/cm², 20 min)和电磁辐射组($90\text{ mW}/\text{cm}^2$, 20 min),各组又

分为辐照后 0h、3h、12h和 24h四个时相点。

1.4 电磁辐射系统 将 PC12细胞置于反射系数近似为零的微波暗室内,以平均功率密度为 $90\text{ mW}/\text{cm}^2$ 的电磁波进行一次辐照 20 min。暗室环境温度及湿度由空调器、除湿机等调节保持恒定,温度稳定于 $(20\pm 2)^\circ\text{C}$,相对湿度稳定于 $(60\pm 10)\%$ 。

1.5 Western blot检测 PC12细胞 G hr2蛋白质表达及其磷酸化水平 于相应时相点将培养细胞离心提纯,以蛋白裂解液匀浆提取蛋白,Lowry法进行蛋白质定量。制备 10%分离胶和 5%的浓缩胶,以 40μg 总蛋白上样后进行电泳(100 V, 150 min),然后转印至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,封闭 2 h,一抗 4℃孵育过夜(稀释比例 1:200),洗涤 3次,辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(稀释比例 1:500) 37℃孵育 1 h,洗 3次,最后联苯二胺(DAB)显色,显色条带在 Bandscan 分析软件上测定灰度值,并进行定量分析,每次实验重复 6次。

1.6 统计学处理 实验数据采用 Microsoft Excel软件进行方差齐性检验和 t检验,实验结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示。

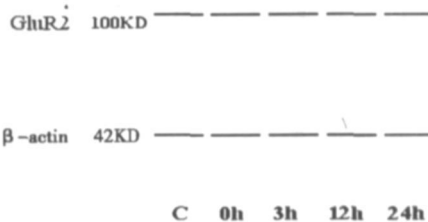


图 1 电磁辐射后各时相点 PC12细胞 G hr2的蛋白质表达水平的 western blot结果图

2 结果

2.1 电磁辐射后 PC12细胞一般情况观察 经 $90\text{ mW}/\text{cm}^2$ 电磁波辐照后 12 h以内 PC12细胞形态无明显变化,在辐照后 24 h PC12细胞的部分细胞突起回缩,少数细胞脱落,悬浮于培养

液中。每瓶 PC12 细胞在辐照后均测试其培养液的温度, 平均温度为 $(36.7 \pm 0.4) ^\circ\text{C}$, 较培养箱温度约低 $0.8 ^\circ\text{C}$ 。

2.2 电磁辐射后 PC12 细胞 GlnR2 的蛋白质表达水平 电磁辐

射后 0 h 和 3 h 组 PC12 细胞 GlnR2 的蛋白质表达水平较对照组降低 ($P < 0.05$), 12 h 和 24 h 组无显著变化 (见图 1、2 表 1)。

表 1 电磁辐射后各时相点 PC12 细胞 GlnR2 的蛋白质表达水平的平均结果 ($n = 6 \bar{x} \pm s$)

对照组	0h	3h	12h	24h
1.00 ± 0.21	0.67 ± 0.12 ¹⁾	0.79 ± 0.07 ¹⁾	0.93 ± 0.15	1.07 ± 0.18

注: 1) 与对照组相比 $P < 0.05$ 。

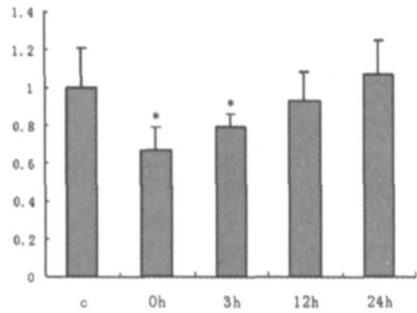


图 2 电磁辐射后各时相点 PC12 细胞 GlnR2 的蛋白质表达水平的平均结果图

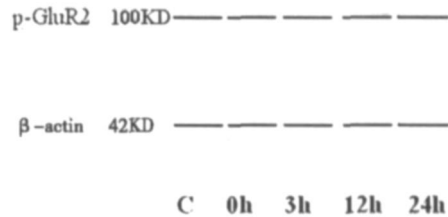


图 3 电磁辐射后各时相点 PC12 细胞 GlnR2 的蛋白质磷酸化水平的 western blot 结果图

表 2 电磁辐射后各时相点 PC12 细胞 GlnR2 的蛋白质磷酸化水平的平均结果 ($n = 6 \bar{x} \pm s$)

对照组	0h	3h	12h	24h
1.00 ± 0.17	0.48 ± 0.22 ¹⁾	0.96 ± 0.15	0.89 ± 0.09	1.02 ± 0.14

注: 1) 与对照组相比 $P < 0.01$ 。

2.3 电磁辐射后 PC12 细胞 GlnR2 的蛋白质磷酸化水平 电磁辐射后 0 h 组 PC12 细胞 GlnR2 的蛋白质磷酸化水平较对照组显著降低 ($P < 0.01$), 3 h、12 h 和 24 h 组无显著变化 (图 3、4 表 2)。

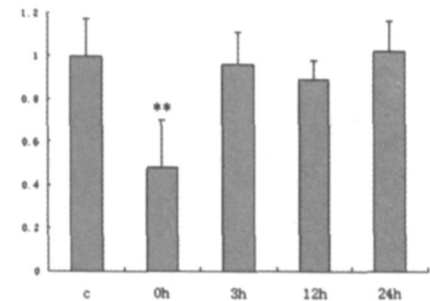


图 4 电磁辐射后各时相点 PC12 细胞 GlnR2 的蛋白质磷酸化水平的平均结果图

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^[5]。蒲肯野氏细胞是小脑皮层唯一的传出性神经元, 在小脑学习记忆过程中起核心作用^[6]。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基础^[7], 蒲氏细胞突触后膜上的 GlnR2 是 LTD 形成过程中最为关键的蛋白质分子^[8]。GlnR2 通过自身的磷酸化改变, 将神经信号从突触前膜传递到突触后膜, 并最终形成学习记忆^[9]。本实验使用的 PC12 细胞模型是被广泛用于研究神经细胞功能活性的一种细胞模型。实验结果显示, 电磁辐射后 GlnR2 的蛋白质表达水平有所下降, 而 GlnR2 的蛋白质磷酸化水平更是出现显著降低, 说明本实验的电磁辐射剂量对 PC12 细胞造成了损伤, 这种损伤在蛋白质的磷酸化水平更为严重。由于 GlnR2 的磷酸化是 GlnR2 完成神经信号传导的重要生理变化, 根据本实验结果, 我们推测电磁辐射对 GlnR2 磷酸化过程的破坏将使小脑无法形成正常的 LTD, 从而导致小脑运动性学习记忆功能障碍。这一推测有待

于进一步的研究证实。

参考文献:

[1] Lai H, Horita A, Guy AW. Microwave irradiation affects radial-arm maze performance in rats [J]. Bioelectromagnetics, 1994, 15 (2): 95-104.

[2] 杨学森, 龚茜芬, 张广斌, 等. 电磁辐射对大鼠学习记忆和海马神经元的影响 [J]. 解剖学研究, 2004, 26 (4): 261-264.

[3] Watanabe K, Kageawa M, Ichisuke Y, Uzuki A. A mechanism underlying AMPA receptor trafficking during cerebellar long-term potentiation [J]. PNAS, 2005, 102 (49): 17846-17851.

[4] Jordan PS, Kogo T, Ying S, et al. Targeted In Vivo Mutations of the AMPA Receptor Subunit GlnR2 and Its Interacting Protein PICK1 Eliminate Cerebellar Long-Term Depression [J]. Neuron, 2006, 49: 845-860.

[5] David JL. Neuroscience: from molecules to memory in the cerebellum [J]. Science, 2003, 301: 1682-1685.

[6] John PW, Hidetoshi Y, Zeng XH, et al. Normal motor learning during pharmacological prevention of Purkinje cell long-term depression [J]. PNAS, 2005, 102 (47): 17166-17171.

[7] Koekkoek SKE, Hulscher HG, Dortland BR, et al. Cerebellar LTD and learning-dependent timing of conditioned eyelid responses [J]. Science, 2003, 301: 1736-1739.

[8] Tanaka H, Grooms SY, Bennett MV, et al. The AMPAR subunit GlnR2: still front and center-stage [J]. Brain Research, 2000, 886: 190-207.

[9] Hee JG, Jordan PS, Richard LH, et al. Requirement of AMPA receptor GlnR2 phosphorylation for cerebellar long-term depression [J]. Science, 2003, 300: 1751-1755.

(收稿日期: 2006-10-13)