

微波辐照对线粒体转录因子 A (Tfam) 转运的抑制作用

许商成 余争平 吴娟 裴莉萍 罗雪 陈纯海 何旻蒂 王源 姚权 钟敏

(第三军医大学劳动卫生学教研室 重庆 400038)

摘要 为了验证微波辐照对线粒体转录因子 A (Mitochondrial transcription factor A, Tfam) 转运的抑制作用, 本实验成功构建了 Tfam 表达载体 Tfam-pTNT, 并将其转入兔网织红裂解液中转录翻译成 Tfam 的前体蛋白 pre-Tfam, 并用同位素 S^{35} methionine 标记。将原代培养的大鼠大脑皮层神经元暴露于微波 15 min 后, 于辐照后 0 h、6 h、12 h、24 h、48 h 等五个时相点提取活性线粒体。通过转运分析 (Import assay), 结果发现, 微波辐照明显引起大脑皮层神经元线粒体 Tfam 前体蛋白 pre-Tfam 从胞浆向线粒体内的转运障碍, 而且呈时间依赖效应。本实验证实了微波辐照能显著抑制 Tfam 的转运, 揭示了微波引起神经元能量代谢障碍的新机制。

关键词 微波, 神经元, 转运分析, Tfam 转运

中图分类号 Q64, R112.4, R594.8

线粒体转录因子 A (Tfam) 是核编码的线粒体转录调控因子, 由胞浆转入线粒体后, 能够启动线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 的转录、复制和维持 mtDNA 的核样结构, 并且对 mtDNA 损伤修复具有重要调节作用^[1]。基因敲除实验证实, 特异性的敲除小鼠皮层、海马和中脑多巴胺神经元中的 Tfam, 神经元内 mtDNA 含量和 mtDNA 转录产物明显下降, 呼吸链严重受损, 最终引发线粒体功能紊乱和神经元死亡, 说明 Tfam 是调节神经元能量代谢, 维持线粒体功能的重要靶分子^[2,3]。

中枢神经系统被认为是电磁辐射敏感的靶器官, 微波可以通过影响线粒体能量代谢损伤神经系统^[4]。前期研究表明, 微波能够导致大鼠皮层神经元线粒体的 ATP 含量明显下降, 其机制可能是与抑制 Tfam 从胞浆向线粒体内的转运有关, 但需进一步证实^[5]。为此, 本实验通过对体外表达的 S^{35} methionine 标记的 Tfam 前体蛋白进行转运分析 (Import assay), 研究微波辐照对皮层神经元线粒体转运 Tfam 前体蛋白效率的影响, 为揭示微波引起神经元能量代谢障碍的机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 原代大鼠大脑皮层神经元的培养与微波辐照

按照文献[5]描述, 取当天出生的新生大鼠大

脑, 分离皮层, 将细胞接种在培养基中 (DMEM/F12 培养基 80%, 马血清 10%, 胎牛血清 10%, 青链霉素 2%)。第 2 天换 6 mL 的无血清维持培养基培养 (Neurobasal 98 mL, B27 2 mL, 谷氨酰胺 0.5 mmol/L), 每隔 2 天换 1/3 维持培养基, 于第 8 天将成熟的神经元接受微波辐照。培养神经元分为对照组 (C) 与微波辐照组, 其中辐照组分别于照射后 0 h、6 h、12 h、24 h、48 h 取材。对照组除不接收辐照源辐照外, 其它处理条件与处理组相同。每组辐照时间为 15 min。

1.2 原代大鼠大脑皮层神经元线粒体的提取

辐照后, 将收获的神经元 ($50\sim 60\times 10^6$) 置于 3 mL 冰冷的 IBC 中 [125 mmol/L 氯化钾, 10 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷/3-吗啉基丙磺酸 (Tris/MOPS), 0.1 mmol/L 乙二醇双四乙酸/三羟甲基氨基甲烷 (EGTA/Tris), 1 mmol/L 磷酸二氢钾, 1 μ g/mL 蛋白酶抑制剂片, pH 7.4] 里匀浆, 用杜恩斯 (Dounce) 匀浆器匀 40 下, 将匀浆液在 600g, 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min, 收集上清, 将上清在 7000 g, 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min。取沉淀, 并用 200 μ L 冰冷的 IBC 洗涤, 再进一步在 7000 g, 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min。沉淀即为线粒体, 将其溶于 SEM 溶液中 [250 mmol/L 蔗糖, 1 mmol/L 乙二醇四乙酸, 10 mmol/L 3-吗啉基丙磺酸-氢氧化钾 (MOPS-KOH), pH 7.2]。用 Lowry 法测新鲜线粒体浓度, 并立即进行转运分析 (import assay)。

国家自然科学基金“900MHz 电磁波暴露对大鼠中枢神经细胞 Tfam 作用通路影响的研究” (30270348) 资助

第一作者: 许商成, 男, 1982 年 9 月出生, 2005 年毕业于第三军医大学, 2005 年至今硕博连读, 攻读第三军医大学劳动卫生与环境卫生学专业博士学位, 助教, 主要从事电磁辐射分子生物学研究

通讯联系人: 钟敏

收稿日期: 初稿 2008-10-29, 修回 2008-12-24

1.3 Tfam 质粒的构建和前体蛋白的表达

将大鼠反向转录脱氧核糖核酸 (complementary deoxyribonucleic acid, cDNA) 用 Tfam 特异性的克隆引物进行扩增, 上下游引物分别为 (CCGCTCGA-GATAGTCGTCGGCCCGAGGGATG) 和 (GGGGTACCAGAAAGTCACTTCAGTCTGTCTACACCA)。上下游引物分别含有限制性内切酶 XhoI 和 KpnI 的酶切位点, 用 NEB 公司限制性内切酶 XhoI 和 KpnI 酶切后, 将其亚克隆到 Promega 公司 pTNT 质粒中, 进行测序验证。测序正确的重组质粒 Tfam-pTNT 转入 Promega 公司兔网织红转录和翻译系统 rabbit coupled reticulocyte lysate system 中, 进行 Tfam 的蛋白表达, 同时向反应体系中, 加入 PE 公司放射性 [35S] methionine 对表达的蛋白进行标记。合成的 Tfam 前体蛋白用免疫印迹 (Western blot, WB) 进行检测。

1.4 荧光 Western blot 检测兔网织红裂解系统 Tfam 蛋白的表达

将兔网织红裂解液中重组质粒 Tfam-pTNT 的表达产物在 12% 的 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺变性胶中恒流 20 mA, 电泳 1.5 h。电泳完毕后, 用 150 mA 的恒流, 1 h 将蛋白转至 NC 膜上, 5% 脱脂牛奶封闭 3 h, 分别用 anti-Tfam (1:500) 一抗和抗羊荧光二抗 (1:5000) 孵育。孵育完毕后, 最后将 NC 膜置于 Odessey 红外荧光扫描成像仪中扫描。

1.5 Tfam 转运分析 (Import assay)

按照文献[6], 先将 100 μ L 的新鲜提取的线粒体在 30 $^{\circ}$ C 预温, 然后与 25 μ L 前体蛋白 S³⁵-Tfam 进行孵育, 同时向反应体系中加入外源性的三磷酸腺苷 (Adenosine triphosphate, ATP), 终浓度为 2 mol/L。在 30 $^{\circ}$ C 反应 15 min, 反应完毕后用 10 μ g/mL 的真菌霉素 (Valinomycin) 终止反应。然后离心, 12, 000g, 4 $^{\circ}$ C, 离心 5 min, 取沉淀。将沉淀用 25 μ L 1 \times SDS buffer 溶解并于 20% 的 SDS-PAGE 胶中分离, 然后, 干胶曝光, 定量。

2 结果

2.1 线粒体转录因子 A (Tfam) 表达质粒的构建与鉴定

构建 Tfam 表达质粒, 是体外表达 Tfam 前体蛋白的前提。本实验采用 pTNT 作为表达载体, 是因为该载体含有 5' 端的 -globin 引导序列和 3' 端

poly(A)30 尾, 能增强 Tfam 蛋白在体外的表达。将扩增产物 Tfam 与环状质粒 cpTNT 用 XhoI 和 KpnI 双酶切后, 用 T4 连接酶进行连接, 如图 1 所示, 琼脂糖电泳表明 Tfam 与环状质粒 cpTNT 重组成新的质粒 cTfam-pTNT, 对其用 XhoI 和 KpnI 双酶切进行再鉴定, 得到了 Tfam 产物 (1048 bp) 和线性 pTNT (2871 bp), 如图 2 所示, 表明 Tfam 表达质粒构建成功。挑选多个单克隆, 送于 Invitrogen 公司测序, 选取 Tfam 序列中没有突变的重组质粒进行以下实验。

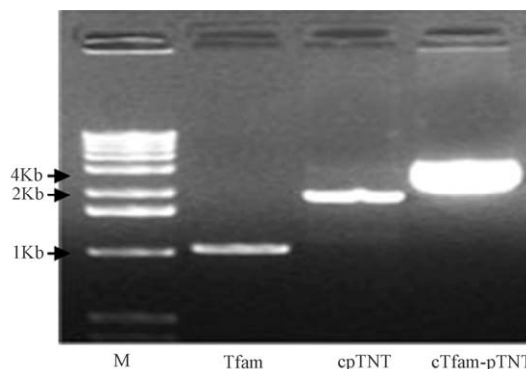


Fig.1 Ligation of Tfam and pTNT vector (M, Marker)

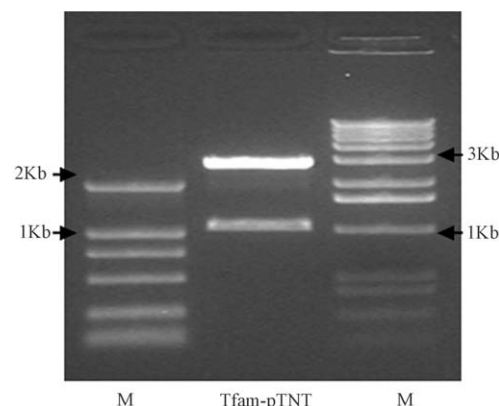


Fig.2 Digestion of recombinated Tfam-pTNT vector (M, Marker)

2.2 线粒体转录因子 A (Tfam) 前体蛋白的表达与标记

将重组质粒 Tfam-pTNT, 置于 rabbit coupled reticulocyte lysate system 进行体外表达, 该兔网织红裂解液系统含有基因转录和翻译所需的转录酶和氨基酸等成分, 体系能够在体外对质粒 Tfam-pTNT 进行转录和翻译, 使其表达成蛋白, 由于 Tfam 表达后没有转入线粒体中, N-端没有被剪切掉, 前体蛋白 pre-Tfam, 分子量为 29 KD。用 western blot 进行验证, 如图 3 所示, 在 29 KD 处, 兔网织红裂

解液中有蛋白表达,与含有 Tfam 蛋白的阳性参照基本处于同一位置。而且用放射自显影进行检测,表明该 29 KD 的 synthesized Tfam 重组蛋白确带有放射性同位素 S^{35} methionine 的表达,如图 4 所示,证明重组质粒 Tfam-pTNT 在兔网织红裂解液中表达成 Tfam 前体蛋白 pre-Tfam,并且成功地被 S^{35} methionine 标记。

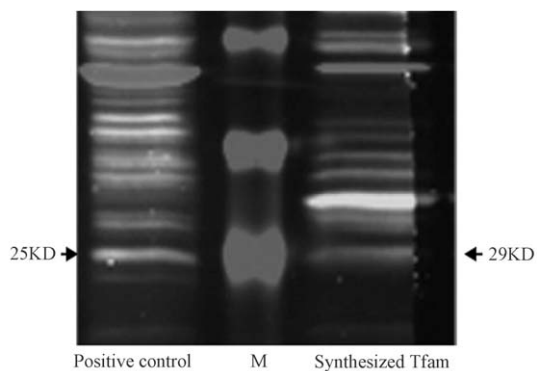


Fig.3 Examination the expression of synthesized Tfam by Western blot (M, Marker)

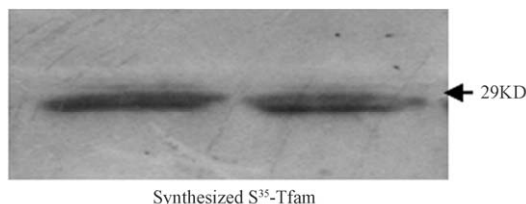


Fig.4 Labeling the synthesized Tfam with S^{35} -methionine

2.3 微波对线粒体转录因子 A (Tfam) 转运的影响

由于 Tfam 前体蛋白 pre-Tfam 只有转入线粒体内才能修饰成为成熟的 Tfam,为了研究微波对 Tfam 转运的影响,因此,采用了转运分析 (Import assay) 先用微波辐照皮层神经元,然后提取神经元的活性线粒体,立即将其与 Tfam 的前体蛋白 (pre-Tfam) 进行孵育,看 pre-Tfam 进入线粒体的情况。通过成熟蛋白 Tfam 与前体蛋白 pre-Tfam 的比值来反映微波对 Tfam 转运的影响。如图 5 所示,微波辐照对 pre-Tfam 转入线粒体成为 Tfam 有显著的影响,并且呈时间依赖关系,在 48 h 进入线粒体内成为成熟蛋白 Tfam 的量几乎检测不到,证明微波辐照明显抑制了 Tfam 的转运。

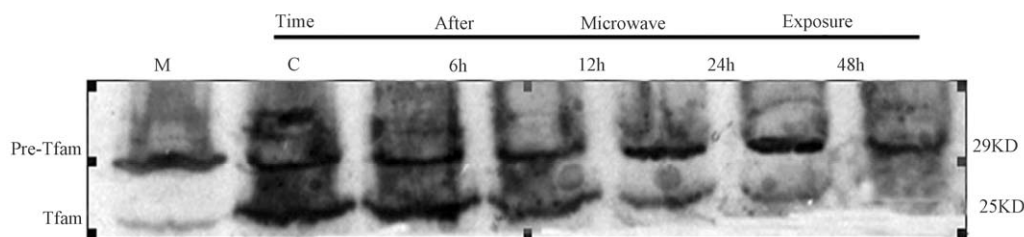


Fig.5 The effect of microwave on pre-Tfam import (M, Marker; C, Control)

3 讨论

中枢神经系统是电磁辐射敏感的靶器官之一,而线粒体对微波辐照的敏感性比其它细胞器高。既往研究表明,电磁辐射急性辐照均能引起大鼠脑组织能量代谢障碍^[4]。我们前期研究也证实微波辐照 15 min 后,大鼠大脑皮层神经元中 ATP 含量随着照后时间的延长表现明显下降,而且这一损伤可能与 Tfam 的转运障碍有关,但是仍需进一步证实^[5]。为此,本实验中我们成功地构建了 Tfam 体外表达载体 Tfam-pTNT,并且在兔网织红裂解液中表达含有 S^{35} methionine 标记的 Tfam 前体蛋白 pre-Tfam,然后采用转运分析 (Import assay),证明了微波辐照能明显抑制 Tfam 的转运,揭示了微波致神经元能量代谢障碍新机制。

线粒体蛋白转运 (Mitochondrial protein import) 是维持线粒体结构和功能的基础。蛋白的转运障碍

直接影响线粒体蛋白的功能,造成线粒体功能紊乱和疾病的发生^[7]。文献表明,在应激的情况下,比如在过氧化氢、电离辐射和除草剂等刺激下及衰老过程中,氧化应激能明显抑制线粒体蛋白的转运。氧化应激是微波重要的生物学效应之一,微波引起 Tfam 的转运障碍可能与氧化应激有关。Tfam 从胞浆向线粒体内转运,前体蛋白 pre-Tfam 的前导肽序列、胞浆中分子伴侣 cHSP70、外膜表面受体 Tom20、外膜转位酶复合体核心分子 Tom40、内膜转位酶复合体 Tim23、基质中 mtHSP60 和线粒体的膜电位 ($\Delta\Psi_m$) 都发挥着重要作用^[8],任何环节受损均会导致 Tfam 转运障碍。微波引起的氧化应激可能通过抑制线粒体膜受体 (如 Tom20^[9]) 或造成膜电位 ($\Delta\Psi_m$) 下降^[7] 来引起 Tfam 转运障碍,具体机制仍需进一步探讨。

Tfam 是线粒体转录因子,能够调控 mtDNA 的

转录和复制,同时能够维持 mtDNA 的核样结构,并且对 mtDNA 损伤修复具有重要作用^[1]。最近研究表明,Tfam 还具有抗氧化应激的作用^[10]。Tfam 转运障碍必然会引起其在线粒体内功能的发挥,比如可能表现为 mtDNA 的降解,转录产物的减少,呼吸链严重受阻等,导致神经元能量代谢障碍和氧化应激的增加,而线粒体功能障碍和氧化应激的增加又会反过来恶化 Tfam 的转运,形成恶性循环(Vicious cycle),最终诱发皮层神经元的凋亡或坏死^[11]。因此,改善 Tfam 的转运可能成为防护微波损伤神经元的新策略。

参考文献

- 1 Dongchon Kang, Naotaka Hamasaki. *Ann N Y Acad Sci*, 2005, **1042**: 101-108
- 2 Mats I EKstrand, Mugen Terzioglu, Dagmar Galter. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, **104**(4): 1325-1330
- 3 Mats I EKstrand, Maria Falkenberg, Anja Rantanen, *et al.* *Human Molecular Genetics*, 2004, **13**(9): 935-944
- 4 谢燕,江海洪,龚茜芬,等. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2004, **22**(2): 104-107
XIE Yan, JIANG Haihong, GONG Qianfen, *et al.* *Chin J Ind Hyg Occup Dis*, 2004, **22**(2): 104-107
- 5 许商成,张蕾,余争平,等. *辐射研究与辐射工艺学报*, 2008, **26**(5): 305-308
XU Shangcheng, ZHANG Lei, YU Zhengping, *et al.* *J Radiat Res Radiat Process*, 2008, **26**(5): 305-308
- 6 Stojanovski D, Pfanner N, Wiedemann N. *Methods Cell Biol*, 2007, **80**: 783-806
- 7 James A, Mackenzie R, Mark Payne. *Biochimiciophysica Acta*, 2007, **1772**: 509-523
- 8 David A, Hood Anna Maria Joseph. *Proceedings of the Nutrition Society*, 2004, **63**: 293-300
- 9 Janice Y, Grey Michael K, Connor Joseph W. Gordon. *Am J physiol Cell Physiol*, 2000, **279**: 1393-1400
- 10 Dongchon Kang, Sang Ho Kim, Naotaka Hamasaki. *Mitochondrion*, 2007, **7**: 39-44
- 11 Wallace D C. *Science*, 1999, **283**: 1482-1488

Inhibitory effect of microwave exposure on the import of mitochondrial transcription factor A (Tfam)

XU Shangcheng YU Zhengping WU Juan PEI Liping LUO Xue CHEN Chunhai
HE Mindi WANG Yuan YAO Quan ZHONG Min

(Department of Occupational Health of Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

ABSTRACT In order to investigate the inhibitory effect of microwave exposure on the import of mitochondrial transcription factor A (Tfam), we successfully created a recombinant expression vector Tfam-pTNT, which was then placed into rabbit coupled reticulocyte lysate system to be translated into the precursor of Tfam (pre-Tfam) labeled with S³⁵ methionine. After exposing the primary cultured cortex neurons to microwave for 15min, we isolated the mitochondria from these treated neurons at 0 h, 6 h, 12 h, 24 h and 48 h after microwave irradiation. Through import assay, it was found that microwave exposure obviously decreased the import of the pre-Tfam from cytoplasm into mitochondria in a time-depend manner. The results indicate that microwave exposure can inhibit the import of Tfam, which reveals a novel mechanism that microwave irradiation disturbs the energy metabolisms in neurons.

KEYWORDS Microwave, Neurons, import assay, Tfam import

CLC Q64, R112.4, R594.8