

2450MHz 微波与 γ 射线联合辐射对 大鼠神经胶质细胞的影响

陆敏霞¹ 聂继华² 朱建全¹ 钱程¹ 汪国海¹ 童建²

¹ (常州市疾病预防控制中心 常州 213022)

² (苏州大学放射医学与公共卫生学院卫生毒理教研室 苏州 215123)

摘要 探讨微波及微波联合 γ 射线照射对大鼠神经胶质细胞凋亡率、线粒体膜电位 (MMP)、胞内游离 Ca^{2+} 和 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶活性的影响。将原代神经胶质细胞分为对照组(C)、微波组 (M)、电离组 (I) 和联合组 (IM)。M 和 IM 组接受 4 mW/cm^2 的微波辐射 3 d, 2 h/d; 第 4 天, I 和 IM 组接受 5 Gy (1 Gy/min) 的 γ 射线照射。采用 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶测试盒检测胞内 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶; 流式细胞术检测细胞凋亡和 MMP; 流式细胞术和共聚焦激光扫描显微镜检测胞内游离 Ca^{2+} 变化。结果发现, 与 C 组相比, I 和 IM 组细胞的凋亡率显著升高, 各组细胞 MMP 未见明显变化; M、I 和 IM 组胞内游离 Ca^{2+} 明显升高, Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶活性显著降低, 差异均有统计学意义 ($p < 0.05$)。结果提示, 在本试验条件下, 2450 MHz 微波可使胞内 Ca^{2+} 显著上升, Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶活性显著降低; 未观察到微波与 γ 射线照射大鼠神经胶质细胞的联合作用。

关键词 微波, γ 射线, 神经胶质细胞, 凋亡, MMP, Ca^{2+} , Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶

中图分类号 R122.4, R994.2, Q255

随着现代技术的发展, 微波被广泛应用于工业、农业、通讯、医疗、军事及日常生活中, 与此同时微波对人类健康的潜在威胁也成为了人们关注的热点。电离辐射主要见于战时核爆炸, 也见于辐射事故、临床肿瘤放射性治疗等。无论在临床肿瘤的联合治疗中, 或是在一些特殊作业环境或未来的战争中均存在着 γ 射线和微波复合照射的可能。研究报道^[1,2], 单独微波和电离辐射照射对神经细胞均能造成损伤, 抑制细胞增殖, 诱导细胞凋亡等, 但其作用机理尚不明了。神经胶质细胞是神经系统的间质细胞, 分布在神经元之间, 是神经系统内数量众多的一大类细胞群体, 约占中枢神经系统(CNS)细胞总数的 90%。神经系统许多疾病与胶质细胞密切相关, 如帕金森病时脑损伤区出现反应性星形胶质细胞增生。星形胶质细胞功能发生紊乱时, 细胞外 K^+ 异常升高, 可引起局部神经元兴奋性增高而导致癫痫发作。神经胶质细胞又称胶质细胞, 是神经组织中除神经元以外的另一大类细胞, 其数量为神经元的 10—50 倍, 本实验拟采用乳鼠大脑皮质神经胶质细胞观察微波与 γ 射线复合照射后对神

经胶质细胞的影响, 初步探讨其可能的联合效应及机理。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

DMEM/F12 培养基 (Gibco 公司), 胎牛血清 (杭州四季青公司), 多聚赖氨酸 (PLL, Sigma 公司), Fluo-3-AM、JC-1 (美国 Molecular Probes 公司), Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶测试盒、(南京建成生物工程研究所), Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒 (Bi-pec), 756 紫外可见分光光度计 (上海光谱仪器有限公司), 酶联免疫检测仪 (BIO-TEK 公司), ^{60}Co γ 射线放射源 (由苏州大学辐照中心提供), 微波功率场强仪 (Narda 公司 EP301), 流式细胞仪 (Becton Dickinson 公司), 激光共聚焦显微镜 (Leica TCS SPZ CLSM)。

1.2 电磁辐射系统

电磁辐照系统由信号发生器(北京森馥科技有

江苏省自然科学基金重大项目 (05KJA33013)、江苏省放射医学与防护省级重点实验室开放课题 (KJS05027) 资助

第一作者: 陆敏霞, 女, 1979年8月出生, 2009年于苏州大学获硕士学位, 常州市疾病预防控制中心职业病防治所, 医师

通讯作者: 童建, E-mail: tongjian@suda.edu.cn

收稿日期: 初稿 2009-12-23, 修回 2010-04-20

限公司)、功率放大器和 GTEM 电磁辐照室(东南大学)组成。信号发生器发出的信号由功率放大器放大输入 GTEM 电磁辐照室内,经过发射端产生电

磁场。内部的电磁场功率密度由探头接收后经电脑读出(图1)。

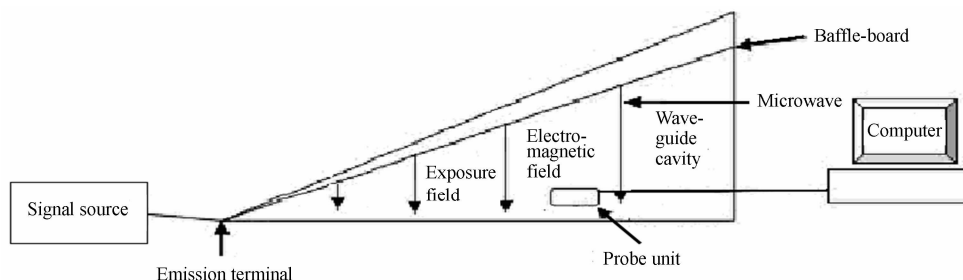


Fig.1 The device of electromagnetic radiation

1.3 原代神经胶质细胞的培养和传代

取新生1-3 d的SD乳鼠(由苏州大学实验动物中心提供),用75%乙醇浸泡5—10 min消毒皮肤,断头,无菌条件下用眼科剪小心剪开头骨后,用眼科镊取出双侧大脑皮质置于含有D-Hanks液的培养皿内,小心剥离脑膜和血管组织,将大脑皮质移至另一个盛有适量DMEM-F12 培养液的培养皿内,切碎大脑皮质成糜状,加无血清培养基吹打成悬液,用400目的细胞筛过滤,离心1000 r/min, 5 min,弃上清,用含血清培养基(DMEM-F12+15%胎牛血清)重悬后,置37℃、5%CO₂ 培养箱中差速粘附处理60 min,以去除成纤维细胞成分,然后翻转培养瓶,吸取细胞悬液接种至预先包被过PLL(浓度为12.5 μ g/mL)的玻璃培养瓶内,置入37℃、5%CO₂ 培养箱中培养。随后3 d内静置培养瓶,3 d后换液,2—3 d换液1次,培养至第9—10 d,细胞融合后0.25%胰蛋白酶消化传代。传代前先用力振荡培养瓶,吸出培养基,用D-Hanks液清洗3次,用0.25%胰蛋白酶1 mL于37℃培养箱中消化1—2 min,待细胞变圆后加入新的含血清培养基终止消化,充分吹打,接种于新的培养瓶中,传3代后进行后续实验。

1.4 照射分组

细胞按 5×10^5 /瓶接种于50mL培养瓶。将细胞随机分为对照组(C),微波组(M),电离组(I),联合组(IM),每组设3个平行样。第2d细胞贴壁后将M和IM放入辐照系统内进行辐照,频率2450 MHz,强度4 mW/cm², 2 h/d,连续照射3 d。第4天 IM组再接受5 Gy的⁶⁰Co照射,剂量率为1 Gy/min。细胞分组如表1。

1.5 细胞凋亡的检测

辐照结束后24 h 消化收集细胞,加入4℃预冷的PBS,充分洗涤细胞,1000 r/min, 5 min 离心收

集细胞,两次;加入400 μ L 结合缓冲液,轻柔吹打细胞制成单细胞悬液,加入5 μ L Annexin V-FITC 和10 μ LPI 溶液,充分混匀后,于4℃避光反应15 min。同时以分别加 Annexin V-FITC 溶液和PI 溶液染色作为对照校正。将测试样品和对照组于流式细胞仪检测分析。

Table 1 Groups of cultured astrocytes

⁶⁰ Co γ -rays / Gy	Microwave/mW·cm ⁻²	
	0	4
0	Control (C)	Microwave group (M)
5	Irradiation group (I)	Microwave+Irradiation (IM)

1.6 线粒体膜电位(MMP)的检测

处理方法同1.5,测定方法按照试剂盒说明,加入10 μ g/mL JC-1应用液200 μ L,37℃避光30 min后,采用流式细胞仪进行检测。

1.7 胞浆内 Ca²⁺的检测

处理同1.5,加入5 μ mol/mL Fluo-3-AM应用液200 μ L,常温避光反应45 min后,取20 μ L滴于载玻片上,以激光扫描共聚焦显微镜检测,激发波长488nm、发射波长526 nm,以3—6 s的速度间隔连续扫描,总时间1—4 min,每组随机选取50个细胞,所得图像由计算机收集分析。其余细胞悬液采用流式细胞仪进行检测。

1.8 超微量 Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活性的检测

辐照结束后6 h,收集照射后的细胞常规离心弃上清后,留下层细胞,每管加0.5 mL生理盐水重悬,超声粉碎机粉碎细胞:400 W,持续5 s,间隔10 s,工作5次。测定方法参照试剂盒说明。

1.9 统计学处理

各组数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,运

用SAS 8.1分析软件进行方差分析。 $p < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 原代神经胶质细胞的传代培养结果

首次接种的神经胶质细胞一般在2—3 d贴壁,折旋光性较好,部分细胞开始铺展,长出细长的胞突。7—9 d后,主要以星形胶质细胞为主,还有少

量的少突胶质细胞、神经元细胞和极少量的成纤维细胞。随着传代培养时间的延长,培养物中的胶质细胞的比例逐渐增加,而神经元、成纤维细胞的比例逐渐减少^[3]。神经胶质细胞在底层互相连接成网状(图2)。传代后,神经胶质细胞比例增多,形态结构更加突出。倒置显微镜下形态学特征:胞体较大而扁,形状不规则,胞质较丰富,细胞核圆形或卵圆形,常偏于胞体的一侧,神经胶质细胞的胞突尤其是初级胞突较多较长,呈放射状。

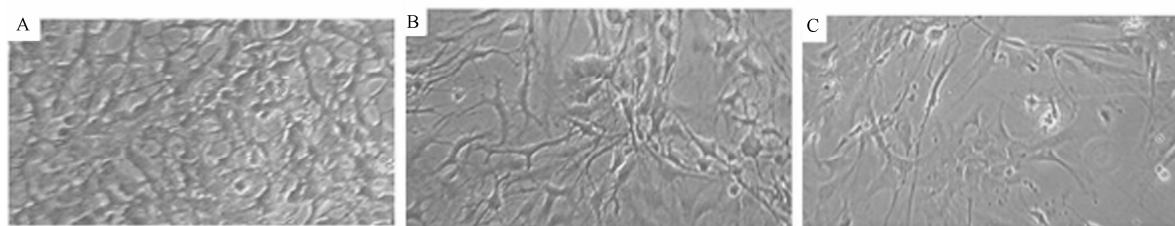


Fig.2 Serial subcultivation of cultured gliocyte(A, On 9th day, gliocytes connect into network($\times 100$); B, On 15th day, gliocytes processes clearly and radial connection($\times 100$); C, On 21th day, gliocytes size increased, processes significantly and irregular($\times 100$))

2.2 微波、 γ 射线单独及联合照射后细胞凋亡和 MMP 的改变

从表2可以看出,各处理组细胞的凋亡率均升高;与C组相比,I和IM组有统计学意义($p < 0.05$)。IM组与I组相比,凋亡率有下降趋势,但无统计学意义。各组细胞MMP无明显变化。

Table 2 The effects of microwave and combined with γ -rays on apoptosis and MMP ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Groups	Apoptosis / %	MMP fluorescence intensity
C	6.67 \pm 1.72	57.35 \pm 3.00
M	9.64 \pm 2.13	59.86 \pm 3.43
I	16.91 \pm 7.04*	60.36 \pm 2.77
IM	14.07 \pm 0.39*	62.48 \pm 0.78

Note: * Compared to the control, $p < 0.05$.

2.3 微波、 γ 射线及联合照射对细胞胞内游离 Ca^{2+} 和 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶活性的影响

与C组相比,各处理组细胞的胞浆内游离的 Ca^{2+} 显著升高, Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP酶活性显著降低($p < 0.05$)。IM组与I组相比无统计学意义(见表3)。

从图3可以看出,C组普遍为低荧光强度细胞,经微波或 γ 射线照射后,各处理组扫描视野内可见胞内荧光普遍增强,个别细胞呈极度增强,显示胞内游离 Ca^{2+} 升高。

Table 3 The effects of microwave and combined with γ -rays on Ca^{2+} and Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase activity ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Groups	Ca^{2+} fluorescence intensity	Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase (U/mg prot)
C	16.17 \pm 1.46	28.12 \pm 5.34
M	19.50 \pm 0.36*	13.48 \pm 2.85*
I	22.77 \pm 0.87*	17.80 \pm 3.18*
IM	22.10 \pm 1.87*	15.63 \pm 2.26*

Note: * Compared to the control, $p < 0.05$.

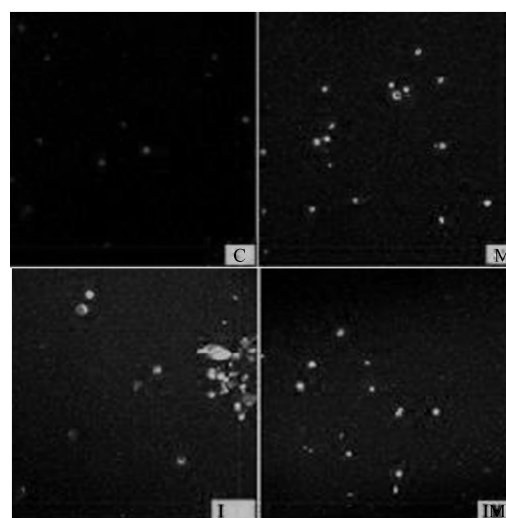


Fig.3 Fluorescence intensity of intracellular Ca^{2+} detected by Fluo-3-AM fluorescent dyes($\times 200$)

3 讨论

随着电磁炉、微波炉等电器的普及应用, 人类暴露于电磁辐射的机会不断增加, 且这些家电频率多集中在 2450 MHz。研究报道, 中枢神经系统对电磁辐射有很高的敏感性^[4], 低强度微波辐射 ($<10\text{mW}/\text{cm}^2$) 主要引起非热效应, 然而低剂量非致热效应的危害尚不明确。流行病学调查发现, 长期持续暴露于电磁辐射环境可引发自觉神经症状, 精神抑郁、失眠、头痛和记忆力下降等症状^[5], 且长期接触手机辐射后同样可引起以上症状^[6]。小鼠接受 2450 MHz、 $10\text{mW}/\text{cm}^2$ 的微波辐照, 1 h/d, 连续照射 7 d, 结果显示, 钙镁 ATP 酶活性显著下降, 细胞内游离 Ca^{2+} 增高, 导致 Ca^{2+} 调节的蛋白酶、腺苷酸环化酶等功能失调, 线粒体氧化磷酸化失偶联, 能量生成减少, 导致神经元代谢紊乱^[7]。

Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶作为细胞膜上的 Ca^{2+} 泵, 可以水解 ATP, 将胞内 Ca^{2+} 泵到胞外, 以维持细胞内相对较低的 Ca^{2+} 浓度, 是维持细胞稳态的重要机制之一, 也是细胞功能得以正常发挥的基础^[8]。当 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶活性降低时可导致胞内游离 Ca^{2+} 升高, 引起细胞的继发性损伤, 主要发生部位在胞浆、线粒体、内质网和细胞骨架等; 其中线粒体在凋亡的启动及整个凋亡过程中发挥着重要作用^[9]。目前认为, 线粒体内、外膜之间的通透性转换孔 (MPTP) 具有调节线粒体膜通透性的作用。正常情况下, 绝大多数转换孔处于关闭状态, 当线粒体跨膜电位降低时, 转换孔开放, 导致线粒体膜通透性增大, 允许相对分子量小的分子通过, 从而导致内膜两侧离子梯度消失, 呼吸链与氧化磷酸化失耦联, ATP 合成停止, 线粒体基质 Ca^{2+} 外流, 还原性谷胱甘肽和 NAD(P)H₂ 减少, cyt-C 和凋亡诱导因子 AIF 释放, 引起蛋白水解的级联反应, 使 Caspase 9 和 Caspase 3 激活, 从而引起细胞凋亡^[10,11]。同时, MPTP 开放后导致线粒体基质膨胀, 外膜皱裂和表面积减小, 易于破裂, 释放出膜间促凋亡蛋白, 也可引起细胞凋亡。

本实验采用乳鼠原代神经胶质细胞, 接受微波或 γ 射线照射后 6 h 即可检测到 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶的活性降低, 提示 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶调节胞内 Ca^{2+} 能力下降, 导致胞内 Ca^{2+} 的泵出受限, Ca^{2+} 升高。微波或 γ 射线照射后 24 h 时, 细胞的胞内游离 Ca^{2+} 升高, 共聚焦显微镜扫描观察到辐照后的细胞胞浆内荧光普遍增强, 个别细胞极度增强, 表明细胞在微波或 γ 射线暴露下发生了钙超载。而各组细胞的线粒体膜电位无明显差别, 其原因可能是细

胞受到微波或者 γ 射线照射后, 能迅速地刺激产生反应, 出现细胞凋亡, 此结果与王志成等^[12,13]报道相似。结果提示, 2450 MHz, $4\text{mW}/\text{cm}^2$ 的微波辐射可抑制原代神经胶质细胞 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶的活性, 升高胞内游离 Ca^{2+} ; 但未表现出对 γ 射线的协同或抑制效应, 其作用机理有待进一步探讨。

参考文献

- 1 高荣莲, 陈肖华. 国外医学: 放射医学核医学分册, 2004, **28**(1): 37-40
GAO Ronglian, CHEN Xiaohua. Foreign Medical Science. Section of Radiation Medicine and Nuclear Medicine, 2004, **28**(1): 37-40
- 2 李巍, 李成仁, 蔡文琴, 等. 第三军医大学学报, 2003, **25**(1): 7-10
LI Wei, LI Chenren, CAI Wenqin. Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae. 2003, **25**(1): 7-10
- 3 黄柏胜, 刘发益, 曹莉. 实用预防医学, 2007, **14**(4): 981-983
HUANG Baisheng, LIU Fayi, CAO Li. Practical Preventive Medicine, 2007, **14**(4): 981-983
- 4 Orbach-Arbouys S, Abgrall S, Bravo-Cuellar A. Pathol Biol, 1999, **47**: 1085
- 5 伏代刚, 龙云芳, 赵立强. 职业卫生与病伤, 2005, **20**: 85-89
FU Daigang, LONG Yunfang, ZHAO Liqiang. Journal of Occupational Health and Damage, 2005, **20**: 85-89
- 6 赵亚丽, 马洪波, 宋锦萍, 等. 航天医学与医学工程, 2003, **16**(1): 36-40
ZHAO Yali, MA Hongbo, SONG Jinping, et al. Space Medicine & Medical Engineering, 2003, **16**(1): 36-40
- 7 谭维溢. 国外医学: 物理医学与康复学分册, 1999, 01: 1-5
TAN Weiyi. Foreign Medical Sciences(Physical Medical and Rehabilitation) 1999, 01: 1-5
- 8 王尧, 杜子威. 神经生物化学与分子生物学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1997. 17
WANG Rao, DU Ziwei. Neural Biochemistry and Molecular Biology[M]. Beijing: People's Health Publishing House, 1997. 17
- 9 Zhang X, Xu Q, Saiki I. Clin Exp Metastasis, 2000, **18**(5): 415-21
- 10 Vaux D L. Cell, 1997, **90**(3): 389-390
- 11 Golstein P. Science, 1997, **275**(5303): 1081-1082
- 12 王志成, 赵红光, 龚守良, 等. 中华放射医学与防护杂志, 2006, **26**(2): 151-154

- WANG Zhicheng, ZHAO Hongguang, GONG Shouliang, *et al.* Chinese Journal of Radiation Mediation and Protection, 2006, **26**(2): 151-154
- 2007, **33**(5): 786-789
- WANG Zhicheng, LI Yanbo, GUO Wei, *et al.* Journal of Jilin university(Medicine edition), 2007, **33**(5): 786-789
- 13 王志成, 李艳博, 郭伟, 等. 吉林大学学报(医学版),

Biological effects of 2450 MHz microwave combined with γ -rays on rat cultured gliocytes

LU Minxia¹ NIE jihua² ZHU Jianquan¹ QIAN Cheng¹ WANG Guohai¹ TONG Jian²

¹(Changzhou Center for Disease and Control Prevention, Changzhou 213022, China)

²(School of Radiation Medicine and Public Health, Suzhou University, Suzhou 215123, China)

ABSTRACT To explore the biological effects of microwave combined with γ -rays on apoptosis, mitochondrion membrane potential(MMP), Ca^{2+} and Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase in rat cultured gliocytes, primarily cultured gliocytes were randomly divided into the control group(C), the microwave group(M), the γ -rays group(I) and the combined group(IM). The M and IM groups were exposed to 4 mW/cm² microwave 2h/d for 3 days. The I and IM groups were given 5 Gy ⁶⁰Co γ -rays on the fourth day. Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase was detected by kit. Apoptosis, MMP and Ca^{2+} were detected by flow cytometry(FCM). The results show that the ratio of apoptosis of the I and IM groups were significantly increased, and the contents of Ca^{2+} in the cytoplasm of M, I and IM group cells were all significantly higher meanwhile Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase activity was lower than that of the control group; but MMP had no obvious changes in the four groups. Under the experimental conditions, the microwave radiation did not induce evident changes in MMP. However, the content of Ca^{2+} in the cytoplasm increased significantly and Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase decreased obviously. No synergic effects were observed in the treatment with microwave before exposure to γ -rays.

KEYWORDS Microwave, γ -rays, Apoptosis, Cultured gliocytes, MMP, Ca^{2+} , Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase

CLC R122.4, R994.2, Q255