tromagnetic radiation:are mobile phones really so(heat) shocking? [J]. Arch Biochem Biophys,2005,435(1):227 - 240.
〔4〕 Caubet R,Pedarros - Caubet F,Chu M,et al. A radio frequency electric current enhances antibiotic efficacy against bacterial biofilms[J]. Antimicrob Agents Chemother,2004,48(12):4662 - 4664.
〔5〕 谢燕,江海洪,龚茜芬,等. 微波辐照对大鼠脑海马和皮层神经细胞线粒体超微结构及 mt TFA mRNA 表达的影响[J]. 中华劳动卫生职业病杂志,2004,22(2):104 - 108.
〔6〕 姜槐,姚耿东,周水云. 不同强度和波形的微波辐射对小鼠脑线粒体标志酶的影响[J]. 中华劳动卫生职业病杂志,1984,2:347 - 350.
〔7〕 Sanders AP,Schaefer DJ,Joines WT. Microwave effects on energy metabolism of rat brain[J]. Bioelectromagnetics,1980,1(2):171 - 181.
〔8〕 Vorobyov V,Pesic V,Janac B,et al. Repeated exposure to low - level extremely low frequency - modulated microwaves affects baseline and scopolamine - modified electroencephalograms in freely moving rats[J]. Int J Radiat Biol,2004,80(9):691 - 698.
〔9〕 王丽峰,彭瑞云,胡向军,等. HPM 对大鼠大脑结构及其神经递质的影响[J]. 中国公共卫生,2005,21(9):1059 - 1060.
〔10〕 曹兆进,张洪桥,陶勇,等. 微波辐射对小白鼠脂质过氧化作用及神经递质含量的影响[J]. 卫生研究,2000,29(1):28 - 29.
〔11〕 王强,曹兆进,白雪涛. 900 MHz 微波电磁辐射对大鼠大脑皮质神经元神经递质受体 γ - 氨基丁酸蛋白表达得影响[J]. 卫生研究,2005,34(5):546 - 548.
〔12〕 隋建峰,吴宗耀,熊鹰,等. 脉冲微波孕期辐射致仔鼠海马神经元 N - 甲基 - D 天冬氨酸受体通道的变化[J]. 中华理疗杂志,2000,23(3):150 - 152.

收稿日期: 2007-01-19 (郑新编辑 孔繁学校对)

文章编号: 1001-0580(2007)10-1155-03 **中图分类号**: R 142+.4 **文献标志码**: A

【专题报道之一】

微波对大鼠大脑皮层及海马突触囊泡蛋白影响*

王丽峰,彭瑞云,胡向军,高亚兵,王水明,李杨,赵黎,王旭,马俊杰,高荣莲,苏镇涛

摘 要: **目的** 探讨微波辐射对大鼠大脑皮层和海马突触囊泡相关蛋白如突触素 I(synapsinI),囊泡相关膜蛋白 - 2(vesicle-associated membrane protein-2,VAMP-2)和突触融合蛋白(syntaxin)以及突触囊泡蛋白(synaptophysin)表达的影响。**方法** 采用 30 mW/cm^2 微波辐射 Wistar 雄性大鼠,于辐射后 6 h,1,3 和 7 d 取材,通过免疫蛋白印迹检测大脑皮层和海马突触体突触素 I,VAMP-2,突触融合蛋白和突触囊泡蛋白表达的改变;采用免疫共沉淀检测 VAMP-2 和突触融合蛋白相互作用的改变。**结果** 30 mW/cm^2 微波辐射后皮层突触素 I 于辐射后 3 d 表达减少($P < 0.01$);海马突触素 I 表达 1 d 增加,3 d 减少,7 d 又增加的波动($P < 0.01$)。皮层和海马突触囊泡蛋白于辐射后 7 d 表达增加($P < 0.01$),VAMP-2 和突触融合蛋白于辐射后 7 d 内表达均降低。VAMP-2 和突触融合蛋白相互作用在皮层于辐射后 3 d 减弱,而海马于辐射后 7 d 内明显减弱($P < 0.01$)。**结论** 微波辐射可引起大脑皮层和海马突触囊泡蛋白表达异常,进而影响突触传递功能。

关键词: 微波;皮层;海马;突触体;突触囊泡相关蛋白

Influence of microwave radiation on synaptic associated proteins in cerebral cortex and hippocampus in rats *WANG Li-feng, PENG Rui-yun, HU Xiang-jun, et al. Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences (Beijing 100850, China)*

Abstract: **Objective** To investigate the effect of microwave radiation on expressions of synaptic associated proteins: synapsin I,VAMP-2,syntaxin and synaptophysin. **Methods** 25 Wistar rats were exposed to microwave which average power density was 30 mW/cm^2. Western blot was used to study the change of the expressions of synapsin I,VAMP-2,syntaxin and synaptophysin of synaptosome in cerebral cortex and hippocampus,and immune co - precipitation was used to study the interaction of VAMP-2 and syntaxin. **Results** It resulted in the decrease of synapsin I at after 3-day radiation in cerebral cortex ($P < 0.01$),but increase at 1 d,decrease at 3 d and increase at 7 d in hippocampus ($P < 0.01$);the increase of synaptophysin at 1～7 d and decrease of VAMP-2 and syntaxin at 6 h～7 d after radiation in cerebral cortex and hippocampus ($P < 0.01$); the decrease of the interaction of VAMP-2 and syntaxin at 3 d in cerebral cortex and at 6 h～7 d in hippocampus after exposure ($P < 0.01$). **Conclusion** Microwave radiation can induce the abnormity of expressions of synaptic associated proteins in cerebral cortex,and hipoccampus then induce the disorder of synaptic transmission.

Key words: microwave;cerebral cortex;hippocampus;synaptosome;synaptic associated proteins.

微波是频率在 300 MHz～300 GHz 之间的一种非电离辐射,它作为一种新技术,已经被广泛应用,其辐射损伤效应也越来越受到关注。研究表明,神经系统是微波辐射最为敏感的靶部位。突触是神经元间信息传递的特化结构,在突触前结构中,大多神经递质和神经活性物质储存在突触囊泡中,通过胞吐作用释放出来,其中几种突触囊泡相关蛋白改变其活性以助于神经递质释放,如突触素(synapsin)通过磷酸化影响递质释放,突触囊泡膜上的囊泡相关膜蛋白(vesicle-associated membrane protein,VAMP)、突触体相关蛋白(synaptosome-associated protein of 25000,SNAP-25)和突触前膜上的突触融合蛋白(symaxin)形成 SNARE(soluble N-ethylmaleimide attachment protein receptor)复合体,参与囊泡与前膜的融合以及递质释放[1];突触囊泡上的突触囊泡蛋白(synaptophysin)参与形成融合微孔,使递质释放于突触间隙[2]。研究表明,微波辐

*基金项目: 全军十一五医药卫生专项项目(06Z065);全军十五杰出人才基金项目(04J016)
作者单位: 军事医学科学院放射与辐射医学研究所,北京 100850
作者简介: 王丽峰(1980 -),女,山西方山人,博士,主要从事电磁辐射生物效应研究。
通讯作者: 彭瑞云,胡向军

射可引起突触结构、神经递质的改变[3,4],而微波辐射对突触囊泡相关蛋白的影响报道较少。为此,本研究主要探讨微波辐射后突触囊泡相关蛋白突触素 I,SNARE 复合体中 VAMP-2 和突触融合蛋白以及突触囊泡蛋白表达的改变,为揭示微波辐射致突触传递改变的机制提供基础依据。

1 材料与方法

1.1 动物分组与辐射方法 二级 Wistar 雄性大鼠 25 只,体重(180 ±20) g(军事医学科学院实验动物中心)。动物随机分为假辐射组和 30 mW/cm² 组。其中假辐射组放于辐射盒内后置于辐射台上 5 min,不给予辐射。采用微波模拟源进行全身均匀辐射,平均功率密度为 30 mW/cm²,辐射时间为 5 min。各组大鼠于辐射后 6 h,1 ,3 和 7 d,麻醉,断头处死,每个时间点 5 只。

1.2 突触体蛋白制备方法 采用蔗糖梯度离心法制备大脑皮层和海马突触体[5]:取假辐射组和 30 mW/cm² 组大鼠脑组织,分离大脑皮层和海马,混合后按 1∶100(W∶V)加入 0.32 mol/L 蔗糖后匀浆,初离心得到去核上清液。去核上清液覆加于 1.5 ml 1.2 mol/L 蔗糖表面,离心后收集中间带。中间带用 0.32 mol/L 蔗糖稀释 3～3.5 倍后,覆加于 1.5 ml 0.8 mol/L 蔗糖表面,离心,得到离心管底部的突触体。测定突触体的蛋白浓度,悬浮于 Na-Pss,4 ℃保存。之后收集突触体,提取突触体蛋白,-70 ℃保存。

1.3 免疫蛋白印迹法检测突触囊泡相关蛋白表达 制备突触体蛋白后,电泳,转膜,封闭;加兔抗突触素 I 多抗(美国 Chemicon 公司)或鼠抗突触囊泡蛋白单抗(武汉博士德生物技术有限公司)或兔抗 VAMP-2 单抗(日本 Wako 公司)或鼠抗突触融合蛋白单抗(美国 Sigma 公司),再加入二抗;最后采用发光底物试剂盒显影。将目的条带扫描后应用 CMIAS-II 图像分析仪,检测目的条带的积分吸光度(integral absorbency,IA)值,将扫描值与β-肌动蛋白(B-actin)扫描值相比,然后以样本/内参照的比值表示突触素 I/突触囊泡蛋白/VAMP-2/突触融合蛋白蛋白表达水平。

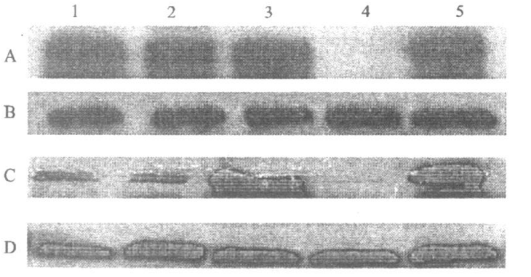
1.4 免疫共沉淀法检测 VAMP-2 和突触融合蛋白相互作用 取 300 μg 突触体蛋白加裂解液补足至 250 μl;加 5 μl 兔抗 VAMP-2 单抗,摇床 4 ℃震摇 1 h;加 20 μl 蛋白-A 琼脂微球(protein-A agarose,美国 Santa crutz 公司),4 ℃摇过夜。2 500 r/min 离心 5 min,弃上清,收取琼脂微球沉淀;加入冰浴裂解液洗 4 次,离心取沉淀;加入 20 μl 裂解液及 20 μl 上样缓冲液;100 ℃水浴 3 min,4 000r/min 离心 10 min,使琼脂微球沉淀,取上清;进行免疫蛋白印迹,一抗加鼠抗突触融合蛋白单抗(1∶1 000)。显影后,将目的条带扫描后应用 CMIAS-II 图像分析仪,测目的条带的 IA 值。

1.5 统计分析 采用 SAS 软件进行具有一个重复测量的两因素方差分析。

2 结 果

2.1 微波辐射后大鼠大脑皮层和海马突触素 I 表达的改变 皮层突触体突触素 I 表达于辐射后 3 d,明显减少($P < 0.000\ 1$);而海马于辐射后 1 d 显著增加($P < 0.000\ 1$),3 d 减少($P < 0.000\ 1$),7 d 又显著增加($P < 0.001\ 4$),见图 1 和表 1。

2.2 微波辐射后突触囊泡蛋白表达的改变 皮层突触体在辐射后 6h 即可见突触囊泡蛋白表达明显增加($P = 0.000\ 4$),1 d 最为显著($P < 0.000\ 1$),之后逐渐恢复,7 d 仍未恢复正常($P < 0.000\ 1$)。海马突触体在辐射后 1 d 可见突触囊泡蛋白表达明显增加($P < 0.000\ 1$),3 d 最为显著($P < 0.000\ 1$),7 d 仍未恢复正常($P < 0.000\ 1$),见图 2。



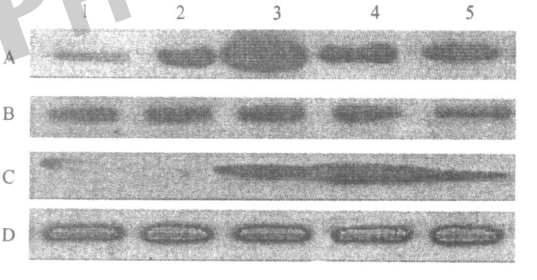
注:A,C:分别为大脑皮层和海马突触素 I 表达;
B,D:分别为大脑皮层和海马β-肌动蛋白表达;1:假辐射组;
2,3,4,5:分别为 30 mW/cm² 辐射后 6 h,1 ,3 和 7 d。

图 1 大鼠大脑皮层和海马突触体突触素 I 表达的免疫印迹结果

表 1 微波辐射后突触素 I 表达的定量分析结果($\bar{x} \pm S$)

组 别 (mW/cm²)	辐射时间(d)	$IA_{synapsin}/IA_{actin}$ 皮层	海马
假辐射组		1.149 5 ±0.001 2	0.272 2 ±0.010 5
30	6	1.093 9 ±0.034 0	0.264 4 ±0.037 4
30	1	1.147 7 ±0.051 8	0.481 4 ±0.083 3 *
30	3	0.015 4 ±0.002 8 *	0.004 8 ±0.000 5 *
30	7	1.090 6 ±0.057 2	0.404 1 ±0.026 4 *

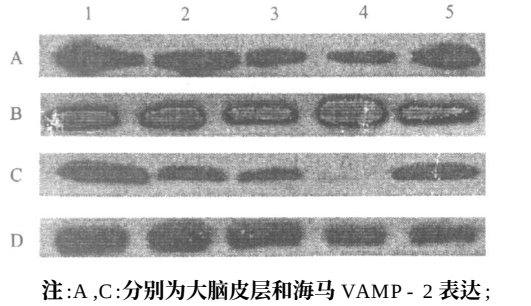
注:与假辐射组比较,* $P < 0.01$。



注:A,C:分别为大脑皮层和海马突触囊泡蛋白表达;
B,D:分别为大脑皮层和海马β肌动蛋白表达,1:假辐射组;
2,3,4,5:分别为 30 mW/cm²,辐射后 6h,1 ,3 和 7 d。

图 2 大鼠大脑皮层和海马突触体突触囊泡蛋白表达的免疫印迹结果

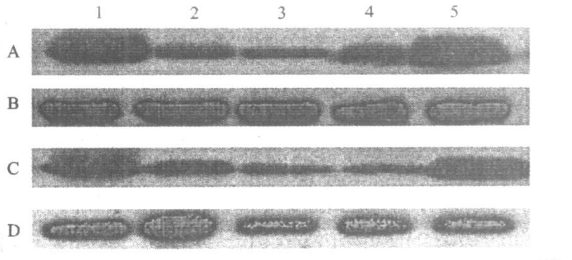
2.3 微波辐射后 VAMP-2 表达的改变 皮层突触体在辐射后 1d 可见 VAMP-2 表达明显减少($P < 0.000\ 1$),7 d 基本恢复正常($P = 0.545\ 1$)。海马突触体在辐射 6 h 可见 VAMP-2 表达明显减少($P < 0.000\ 1$),3 d 最为显著($P < 0.000\ 1$),7 d 基本恢复正常($P < 0.216\ 6$),见图 3。



注:A,C:分别为大脑皮层和海马 VAMP-2 表达;
B,D:分别为大脑皮层和海马β-肌动蛋白表达;1:假辐射组;
2,3,4,5:分别为 30 mW/cm² 辐射后 6 h,1 ,3 和 7 d。

图 3 大鼠大脑皮层和海马突触体 VAMP-2 表达的免疫印迹结果

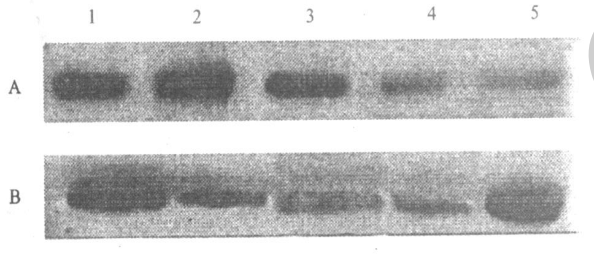
2.4　微波辐射后突触合蛋白表达的改变　皮层突触体在辐射后 6 h～3 d 可见突触融合蛋白表达明显减少（$P < 0.000\ 1$），7 d 基本恢复正常（$P = 0.237\ 0$）；海马突触体在辐射后 6 h～3 d 可见突触融合蛋白表达明减少（$P < 0.001$），7 d 时又明显增加（$P < 0.000\ 1$），见图 4。



注：A，C：分别为大脑皮层和海马突触融合蛋白表达；B，D：分别为大脑皮层海马β-肌动蛋白表达；1：假辐射组；2，3，4，5：分别为 30 mW/cm² 辐射后 6 h，1，3 和 7 d。

图 4　大鼠大脑皮层和海马突触体突触融合蛋白表达的免疫的印迹结果

2.5　微波辐射后 VAMP-2 和突触融合蛋相互作用的改变　皮层在辐射后 3 d 二者相互作用量减弱（$P < 0.000\ 1$），7 d 仍未恢复正常（$P < 0.000\ 1$）；海马在辐射后 6h 即可见二者相互作用量减弱（$P < 0.000\ 1$），3 d 尤为显著（$P < 0.000\ 1$），7 d 仍未恢复正常（$P < 0.000\ 1$），这种改变一方面可能是分子相互作用减弱，另一方面可能与 2 种蛋白表达量减少有关，见图 5。



注：A，B：分别为在脑皮层和海马 VAMP-2 与突触融合蛋白相互作用结果；1：假辐射组；2，3，4，5：分别为 30 mW/cm² 辐射后 6 h，1，3 和 7 d。

图 5　大鼠大脑皮层和海马突触体 VAMP-2 和突触融合蛋白相作用的免疫印迹结果

3　讨　论

近年来，很多学者就微波辐射效应进行了实验研究[6,7]。学习记忆的神经生物学基础是突触可塑性，突触传递的改变在突触可塑性中至关重要，神经递质主要通过突触胞吐来发挥功能，其中几种突触囊泡相关蛋白改变其活性以助于神经递质释放，研究表明，微波辐射可引起神经递质含量和释放的改变[8]。

突触素通过其磷酸化参与突触囊泡内容物的释放，突触素家族包括突触素 I、II 和 III，其中突触素 I 研究较透彻，且在胞吐过程中发挥主要作用[9,10]。本研究发现，30 mW/cm² 微波辐射后皮层突触素 I 表达减少可能导致递质释放障碍；而海马突触素 I 表达呈波动趋势，总的来看升高，这与皮层的改变相矛盾，但突触素I表达增加是否引起递质释放增加并不确切，尚需检测突触素 I 磷酸化的改变。

突触囊泡与突触前膜融合内化从而释放内容物的过程中，需要几种突触囊泡蛋白和突触前膜蛋白的相互作用[11]。其中突触囊泡膜上的 VAMP 与突触前膜上的 SNAP-25 和突触融合蛋白形成 SNARE 复合体，起始融合过程。本研究发现，皮层和海马 VAMP-2 和突触融合蛋白表达在 30 mW/cm² 微波辐射后 7 d 内均明显降低，二者相互作用量也明显减弱。后者一方面可能是分子相互作用减弱，另一方面可能与 2 种蛋白表达量减少有关。但只要二者相互作用量减少即表明神经递质释放存在障碍。这与前面突触素 I 表达改变比较，皮层改变基本一致，但海马却相反，表明皮层突触囊泡在锚定前以及融合均存在障碍；而海马突触囊泡锚定前的过程代谢活跃，但融合过程存在障碍。

本研究发现，30 mW/cm² 微波辐射后皮层和海马突触囊泡蛋白表达均显著增加，但是否更多的突触囊泡蛋白与 VAMP 分离，参与了融合孔的开启而导致递质释放的增加并不确切。根据微波辐射后 SNARE 复合体的改变，可以初步判定突触囊泡蛋白表达的增加是一种代偿性的反应。综上所述，30 mW/cm² 微波辐射大鼠可引起突触功能异常，进而可能导致突触传递障碍。

参考文献

〔1〕 Cesare M, Giampietro S, Sergio P. SNARE complexes and neuroexocytosis: how many, how close? [J]. Trends in Biochemical Sciences, 2005, 30(7): 367 - 372.

〔2〕 Flavia V, Maria P, Dario B, et al. Synaptophysin: leading actor or walkon role in synaptic vesicle exocytosis? [J]. Bio Essays, 2004, 26(4): 445 - 453.

〔3〕 刘朝晖，王小娟，陈景藻，等. 毫米波辐射对大鼠下丘脑及海马化合物含量的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志，2002，24(6): 363 - 364.

〔4〕 Testylier G, Tonduli L, Malabiau R, et al. Effect of exposure to low level radiofrequency fields on acetylcholine release in hippocampus of freely moving mouse[J]. Bioelectromagnetics, 2002, (230): 249 - 255.

〔5〕 Brito MA, Brites D, Butterfield DA. A link between hyperbilirubinemia, oxidative stress and injury to neocortical synaptosomes [J]. Brain Research, 2004; 1026(1): 33 - 43.

〔6〕 王丽峰，胡向车，彭瑞云，等. 高功率微波辐射后小鼠行为学变化研究[J]. 中国行为医学科学，2005，214(1): 32 - 34.

〔7〕 Yamaguchi H, Tsurlta G, Ueno S, et al. 1439 MHz pulsed TDMA fields affect performance of rats in a T-maze task only when body temperature is elevated [J]. Bioelectromagnetics, 2003, 24(4): 223 - 230.

〔8〕 王丽峰，彭瑞云，胡向军，等. HPM 对大鼠大脑结构及其神经质的影响[J]. 中国公共卫生，2005，21(9): 1059 - 1060.

〔9〕 Bloom, O, Evergren E, Tomilin N, et al. Coloaclization of synapsin and actin duing synaptic vesicle recycling[J]. J Cell Biol, 2003, 161(4): 737 - 747.

〔10〕 Girler D, Xu, Y, kao HT, et al. Molecular determinants of synapsin targeting to presynaptic terminals[J]. J Neurosci, 2004, 24(14): 3711 - 3720.

〔11〕 蔡倩，陆佩华，盛祖杭. 神经末梢突触囊泡释放神经递质过程的调控蛋白[J]. 生理科学进展，2003，34(1): 6 - 10.

收稿日期：2007-01-11　（宋艳萍编辑　孔繁学校对）