ter[J]. Curr Opin Support Palliat Care, 2013, 7(1): 54 – 59.
[9] Wood LJ, Gilster A, Winters KA, et al. Cancer chemotherapy-related symptoms: evidence to suggest a role for proinflammatory cytokines[J]. Oncol Nurs Forum, 2006, 33(3): 535 – 542.
[10] Mant TG, Borozdenkova S, Bradford DB, et al. Changes in HLA-DR expression, cytokine production, and coagulation following endotoxin infusion in healthy human volunteers[J]. Int Immunopharmacol, 2008, 8(5): 701 – 707.
[11] Wood LJ, Nail LM, Perrin NA, et al. The cancer chemotherapy drug etoposide(VP-16) induces proinflammatory cytokine production and sickness behavior-like symptoms in a mouse model of cancer chemotherapy-related symptoms[J]. Biol Res Nurs, 2006, 8(2): 157 – 169.
[12] Wong J, Smith LB, Magun EA, et al. Small molecule kinase inhibitors block the ZAK-dependent inflammatory effects[J]. Cancer Biol Ther, 2013, 14(1): 56 – 63.
[13] 何晓玲,徐锦江,顾立学. 化疗后不同时间有氧运动对乳腺癌癌因性疲乏的影响[J]. 医学与哲学, 2013, 34(8B): 69 – 71.
[14] 赵燕. 运动对慢性疲劳综合征大鼠神经免疫功能影响[J]. 中国公共卫生, 2010, 26(3): 374 – 375.
[15] Steensberg A, van Hall G, Osada T, et al. Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6[J]. J Physiol, 2000, 529(Pt. 1): 237 – 242.
[16] 许以诚,高炳宏,刘文海,等. 振动与非振动力量练习时肌电图变化的比较研究[J]. 西安体育学院学报, 2004, 21(4): 54 – 61.
[17] Hiscock N, Chan MH, Bisucci T, et al. Skeletal myocytes are a source of interleukin-6 mRNA expression and protein release during contraction: evidence of fiber type specificity[J]. FASEB J, 2004, 18(9): 992 – 994.
[18] Wood LJ, Nail LM, Winters KA. Does muscle-derived interleukin-6 mediate some of the beneficial effects of exercise on cancer treatment-related fatigue? [J]. Oncol Nurs Forum, 2009, 36(5): 519 – 524.
[19] Steensberg A, Fischer CP, Keller C, et al. IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003, 285(2): E433 – E437.
[20] Keller C, Keller P, Giralt M, et al. Exercise normalizes overexpression of TNF-alpha in knockout mice[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 321(1): 179 – 182.

收稿日期: 2015-05-06 (解学魁编辑 郑新校对)

· 实验研究 ·

磷酸化突触素在神经元囊泡循环与递质释放中作用*

乔思默,王丽峰,胡向军,彭瑞云,高亚兵,赵黎,王水明,王长振,邹勇,董霁

摘 要: 目的 探讨磷酸化突触素 I 在微波辐射所致囊泡循环和氨基酸递质释放改变中的作用。**方法** 采用 30 mW/cm^2 微波辐射原代海马神经元,免疫荧光染色观察辐射后 1、6、12 h,1、2、3 d 神经元 Ser – 62/67 及 Ser – 553 位点突触素 I 磷酸化表达改变;高效液相色谱检测辐射后 6 h 海马神经元氨基酸递质释放量变化; time – lapse 观察辐射后 6 h 神经元突触囊泡循环改变;给予 U0126 和 roscovitine 进行干预,观察上述指标改变。**结果** 30 mW/cm^2 微波辐射后海马磷酸化突触素 I Ser – 62/67、Ser – 553 及磷酸化细胞外调节激酶(p – ERK)、细胞周期素依赖性激酶(Cdk5)表达明显减少,γ – 氨基丁酸(GABA)释放明显减少,海马神经元囊泡循环速度减慢;辐射并给予 U0126 后,神经元 p – ERK 和 Ser – 62/67 位点突触素 I 磷酸化表达明显减弱,囊泡循环速度减慢;辐射并给予 roscovitine 后,神经元 Cdk5 表达减少,Ser – 553 位点突触素 I 磷酸化表达上调,GABA 释放明显增加,囊泡循环速度明显减慢。**结论** 30 mW/cm^2 微波辐射通过下调海马神经元 ERK 活性抑制突触素 I Ser – 62/67 位点磷酸化而使囊泡循环受抑制,囊泡锚定障碍;通过下调 Cdk5 促进突触素 I Ser – 553 位点磷酸化而利于含 GABA 的囊泡锚定于突触前膜,但抑制囊泡循环。

关键词: 微波; 海马神经元; 突触素 I; 氨基酸递质; 囊泡循环
中图分类号: R 146 **文献标志码**: A **文章编号**: 1001-0580(2015)10-1279-04 DOI: 10.11847/zgggws2015-31-10-13

Effects of microwave-induced phosphorylation of synapsin I on synaptic vesicles cycles and amino acid neurotransmitter release in hippacampal neurons of rats

QIAO Si-mo, WANG Li-feng, HU Xiang-jun, et al (*Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing* 100850, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of microwave-induced synapsin I phosphoryltion on the change of synaptic vesicles cycles and amino acids neurotransmitter release. **Methods** Primary hippocampal neurons of Wistar rats were exposed to microwave radiation at the average power density of 30 mW/cm^2. Immunofluoresence was used to study the expression of phosphrylated synapsin I at Ser-62/67 and Ser-553 sites at 1, 6, and 12 hours and 1, 2, and 3 days after

* **基金项目**: 国家自然基金(30900382)
作者单位: 军事医学科学院放射与辐射医学研究所 毒物药物研究所,北京 100850
作者简介: 乔思默(1985 –),女,河南人,博士在读,研究方向:辐射病理学。
通讯作者: 胡向军,E-mail: xjhu2003@vip.sina.com;王丽峰,E-mail: fangchang_14@163.com
数字出版日期: 2015 – 3 – 4 17:54
数字出版网址: http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20150304.1754.024.html

the microwave radiation. High performance liquid chromatography was used to detect the release of amino acid neurotransmitters and time-lapse method to observe the synaptic vesicles cycles at 6 hours after the radiation. The indexes were then detected after U0126 and roscovitine intervetion. **Results** After 30 mW/cm^2 microwave radiation, the expression of phosphorylated synapsin I at Ser-62/67 was decreased during the period of 6 hours to 2 days; Ser-553 was decreased at 12 hours; the expression of phosphorylated extracellular signal-regulated kinase (P-ERK) and cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) reduced; the release of γ aminobutyric acid (GABA) and glycine decresed; and the speed of synaptic vesicles cycles slowered. After roscovitine intervention and radiation, the expression of phosphorylated synapsin I at Ser-553 was increased and Cdk5 was decreased; GABA release increased and the speed of synaptic vesicles cycles slowered compared to those of the group without the intervention. **Conclusion** Microwave radiation at the intensity of 30 mW/cm^2 could induce the inhibition of synaptic vesicles cycles and docking by down-regulating ERK activity to restrain the phosphorylated synapsin I at Ser-62/67, but help to the docking of synaptic vesicles containing GABA by up-regulating Cdk5 expression to facilitate the phosphorylated synapsin I at Ser-553.

Key words: microwave; hippocampal neuron; synapsin I; amino acids neurotransmitter; synaptic vesicles cycle

随着微波技术的广泛应用,接触微波辐射的暴露人群越来越多,其辐射生物效应也日益受到关注。研究发现,微波辐射可引起学习记忆等脑结构和功能损伤[1-2],但其机制尚不明确。研究表明,突触素 I 一方面通过磷酸化作用调节神经递质释放,另一方面通过对突触结构影响,从而在突触可塑性中起到一定作用[3]。突触素 I 有多个磷酸化位点,分别受环磷酸腺苷依赖蛋白激酶、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)、Ⅰ型和Ⅱ型依赖蛋白激酶(Ca^{2+}/CaM)和细胞周期素依赖性激酶 5(cyclin-dependent kinase 5, Cdk5)催化[4]。本研究拟观察微波辐射对突触素 I 磷酸化及其相关激酶影响,探讨其在微波辐射所致囊泡循环和氨基酸递质释放中作用,为阐明微波辐射致学习记忆障碍的机制提供依据。结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 *原代海马神经元培养* 取出生 12 h 以内 Wistar 大鼠(军事医学科学院),许可证号:SCXK -(军)2012—2004,剥离海马,切成 1 ~ 2 mm^3 组织块,用 0.125% 胰蛋白酶 37 ℃下消化 25 min,吹打分散,离心制成细胞悬液。按 5×10^5 个/mL 密度接种细胞,置于 37 ℃、5% 的 CO_2 培养箱,24 h 更换培养基,将种植液换为饲养液,每周半量换液 2 次,为抑制非神经元过度增殖,在培养的第 4 天向培养基中加入适量阿糖胞苷(每皿中加阿糖胞苷储备液 30 ~ 50 μL,终浓度为 3 ~ 5 μg/mL),培养 10 d 后使用。

1.2 *辐射方法* 采用军事医学科学院自建微波模拟源进行辐射,原代神经元接种于 35 mm 培养皿中,放在辐射台上接受辐射。平均功率密度分别为 30 mW/cm^2,辐射时间为 5 min。对照组仅放置于辐射台上 5 min,不给予辐射。

1.3 *指标与方法*

1.3.1 海马神经元 Ser - 62/67 及 Ser - 553 位点突触素 I 磷酸化表达检测 采用免疫荧光法,原代海马神经元培养 10 d 后,于辐射前加入 Ser - 62/67 及 Ser - 553 位点调控激酶抑制剂 U0126 和 roscovitine(终浓度 10 μmol/L),作用 30 min;于辐射后 1、6、12 h,1、2、3 d,分别取细胞爬片,甲醇丙酮(1∶1)固定 15 min,于 4 ℃保存,以新鲜爬片进行血清封闭,0.01% TritonX - 100 细胞膜打孔,一抗分别以磷酸化细胞外调节激酶(phosphorylated extracellular signal-regulated kinase, p-ERK)、Cdk5、Ser - 62/67 及 Ser - 553 磷酸化突触素 I 进行标记,37 ℃孵育 1 h,4 ℃过夜,二抗以异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)及四甲基异硫氰酸罗丹明(tetramethylrhodamine isothiocyanate, TRITC)进行标记,常温孵育 1 h,PI/Hochest 染核,封片,激光共聚焦显微镜观察。

1.3.2 海马神经元氨基酸递质检测 采用高效液相色谱法,原代海马神经元培养 10 d 后,于辐射前加入 U0126 和 roscovitine(终浓度 10 μmol/L),作用 30 min;于辐射后 6 h,采用 30 mmol/L KCl 刺激 2 min 后,取上清;1000 r/min 离心 5 min,取上清;加入 10% 磺基水杨酸($V/V = 3:2$),5 000 r/min 离心 15 min;取上清,4 ℃保存;用高效液相色谱检测氨基酸神经递质,5 L 衍生试剂内加入 1 L 样品,振荡 2 min,进样针加样 6 L;测得数据为被测氨基酸所占峰面积(A 样),根据标准品峰面积(A 标)和浓度(C 标)比,计算被测氨基酸浓度:C 样(mg/mL) = C 标 × A 样/A 标。

1.3.3 海马神经元突触囊泡循环观察 采用 time-lapse 法,原代海马神经元培养 10 d,于辐射前加入 U0126 和 roscovitine(终浓度 10 μmol/L),作用 30 min;于辐射后 6 h,采用冰浴的缓冲液洗 3 次,加入 5 μg/mL FM1 - 43 染液,37 ℃孵育 2 min,time-lapse 实时观察囊泡循环情况。

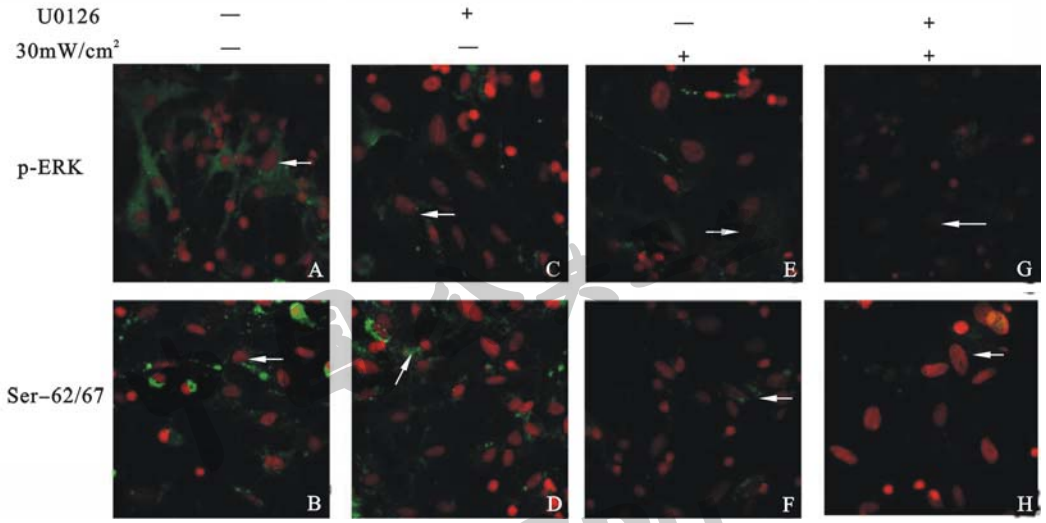
1.4 *统计分析* 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 软件进行统计分析,多组间比较采用方差分析,辐射

组与假辐射组比较，采用 t 检验，$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　微波辐射对海马神经元 Ser－62/67 及 Ser－553 位点突触素 I 磷酸化影响　海马神经元 Ser－62/67 位点突触素 I 磷酸化表达于辐射后 6 h～2 d 明显减少，Ser－553 位点突触素 I 磷酸化表达于辐射后 12 h 内明显减少，1 d 后基本恢复。

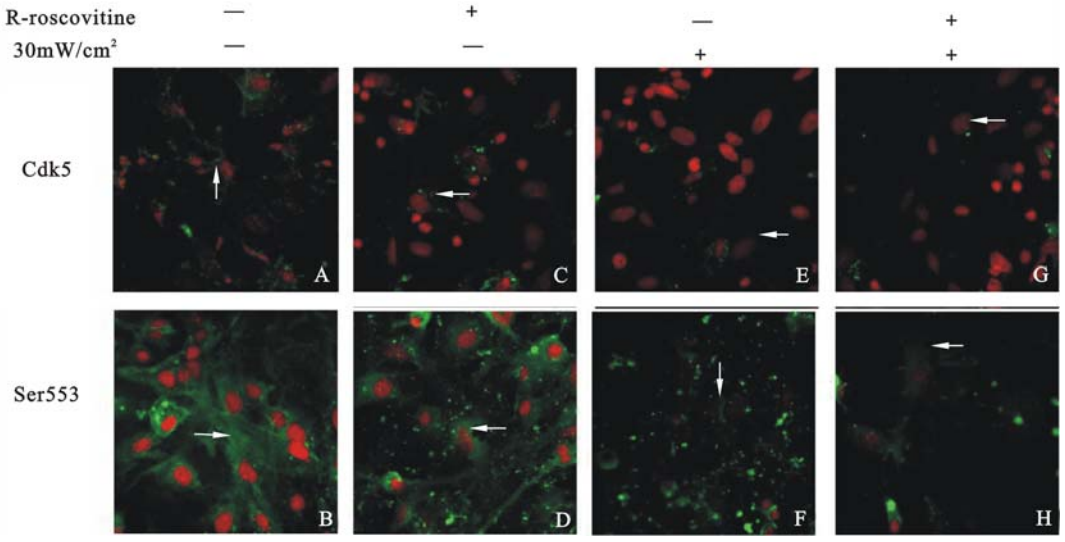
2.2　抑制剂对海马神经元 p-ERK 及 Ser－62/67、Ser－553 位点突触素 I 磷酸化影响（图 1）　与对照组比较（图 1A、B），U0126 组神经元内 p-ERK 与 Ser－62/67 位点（图 1C、D）突触素 I 磷酸化表达减弱；单纯辐射组与辐射 + U0126 组神经元 p-ERK（图 1E、G）与 Ser－62/67 位点（图 1F、H）突触素 I 磷酸化表达明显减弱。



注：A、B：对照组；C、D：U0126 组；E、F：单纯辐射组；G、H：辐射 + U0126 组。

图 1　U0126 对微波辐射后海马神经元 p-ERK 及 Ser－62/67 突触素 I 磷酸化影响（×400）

2.3　抑制剂对海马神经元 Cdk5 及 Ser－553 位点突触素 I 磷酸化影响（图 2）　与对照组比较（图 2A），roscovitine 组（图 2C）、单纯辐射组（图 2E）及辐射 + roscovitine 组（图 2G）Cdk5 表达均明显减少；与对照组比较（图 2B），单纯辐射组（图 2F）与辐射 + roscovitine 组（图 2H）Ser－553 位点磷酸化突触素 I 表达减少。



注：A、B：对照组；C、D：roscovitine 组；E、F：单纯辐射组；G、H：辐射 + roscovitine 组。

图 2　给予 roscovitine 微波辐射后海马神经元 Ser－553 突触素 I 磷酸化表达改变（×400）

2.4　抑制剂对海马神经元氨基酸递质释放影响（表 1）　辐射后 γ－氨基丁酸（γ－aminobutyric acid，GABA）和甘氨酸释放明显减少。与单纯辐射组比较，给予 roscovitine 并辐射后 GABA 释放明显增加，给予 U0126 对辐射后氨基酸释放未见明显影响。

表 1　抑制剂对微波辐射后海马神经元氨基酸递质释放影响(mg/mL, $\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

组别	谷氨酸	γ－氨基丁酸	天门冬氨酸	甘氨酸
对照组	2. 80 ± 0. 23	60. 10 ± 2. 26	5. 91 ± 0. 54	52. 76 ± 7. 24
辐射组	2. 40 ± 0. 12	34. 29 ± 1. 03[a]	4. 83 ± 0. 47	42. 10 ± 1. 40[a]
roscovitine 组	2. 37 ± 0. 18	37. 11 ± 2. 11[a]	4. 25 ± 0. 71	43. 00 ± 1. 07[a]
辐射 + roscovitine	2. 39 ± 0. 18	60. 18 ± 1. 10[b]	4. 32 ± 0. 74	40. 53 ± 2. 11[a]
U0126 组	2. 53 ± 0. 18	60. 92 ± 2. 59	4. 48 ± 1. 15	38. 51 ± 0. 87[a]
辐射 + U0126	2. 49 ± 0. 17	63. 13 ± 2. 09	3. 68 ± 0. 65	40. 95 ± 0. 98[a]

注：与对照组比较，a $P < 0.01$；与辐射组比较，b $P < 0.01$。

2.5　抑制剂与辐射对突触囊泡循环影响　与对照组比较，30 mW/cm^2 辐射后 6 h，海马神经元囊泡循环速度减慢；单纯给予丝裂原活化蛋白激酶的抑制剂 U0126 后囊泡循环速度也减慢，但单纯给予 Cdk5 抑制剂 roscovitine 后，囊泡循环速度未见明显改变；辐射 + U0126 或 roscovitine 囊泡循环速度均减慢；辐射 + roscovitine 组海马神经元囊泡循环速度明显慢于单纯辐射组。

3　讨　论

突触前突触囊泡可摄取神经递质，携递质至突触前膜，与前膜锚定、融合，并释放到突触间隙。突触素 I 以磷酸化形式参与囊泡转运递质过程，并促进递质释放和再循环，突触素 I 存在多个磷酸化位点，受不同蛋白激酶催化。研究发现，30 mW/cm^2 微波辐射可引起海马突触素 I 表达增加，但其磷酸化改变尚不明确[5]。本研究结果显示，微波辐射后 p-ERK 活性降低，突触素 I Ser－62/67 位点的磷酸化受到抑制，进而使囊泡锚定于突触前膜障碍；而 Cdk5 活性降低，可促进突触素 I Ser－553 位点的磷酸化，进而促使囊泡锚定于突触前膜，但微波辐射早期对 Cdk5 的影响较弱，未能使其发挥保护性作用。本研究结果还显示，微波辐射后抑制性氨基酸释放障碍，且 Cdk5 活性降低可能通过促进突触素 I Ser－553 位点磷酸化而使包含有 GABA 的囊泡锚定障碍。

苯乙烯类荧光染料可用于标记追踪囊泡的胞吞胞吐及循环过程[6－7]。磷酸化突触素 I 参与递质释放及囊泡循环过程[8－9]。本研究结果表明，微波辐射后 ERK 抑制可通过下调突触素 I Ser－62/67 位点磷酸化而使囊泡循环受抑制；辐射后 Cdk5 激酶活性受抑制，突触素 I Ser－553 位点磷酸化受抑制，加重了辐射所致囊泡循环障碍。Cdk5 在中枢神经系统发育、突触前膜的囊泡循环、轴突运输等多方面发挥重要作用[10－11]，这可能与 Cdk5 参与突触传递其他环节有关。

综上，30 mW/cm^2 微波辐射后可通过下调海马神经元 ERK 活性，抑制突触素 I Ser－62/67 位点磷酸化而使囊泡循环受抑制，囊泡锚定障碍；辐射可通过下调 Cdk5 表达，促进突触素 I Ser－553 位点磷酸化，而利于含 GABA 的囊泡锚定于突触前膜，但抑制囊泡循环。

参考文献

[1] Kesari KK, Kumar S, Behari J. Pathophysiology of microwave radiation: effect on rat brain[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2012, 166(2): 379－388.

[2] Zhao L, Peng RY, Wang SM, et al. Relationship between cognition function and hippocampus structure afer long-term microwave exposure[J]. Biomed Environ Sci, 2012, 25(2): 182－188.

[3] Bogen IL, Jensen V, Hvalby O, et al. Synapsin-dependent development of glutamatergic synaptic vesicles and presynaptic plasticity in postnatal mouse brain[J]. Neuroscience, 2009, 158(1): 231－241.

[4] Yamagata Y, Jovanovic JN, Czernik AJ, et al. Bidirectional changes in synapsin I phosphorylation at MAP kinase-dependent sites by acute neuronal excitation *in vivo*[J]. J Neurochem, 2002, 80(5): 835－842.

[5] 王丽峰，彭瑞云，胡向军，等. 微波辐射对大鼠大脑皮层和海马突触囊泡相关蛋白的影响[J]. 中国公共卫生，2007，23(10)：1155－1157.

[6] Gu F, Fu L, Ma YJ. Functional analysis of calcium channel-mediated exocytosis in synaptic terminals by FM imaging technique[J]. Neurosci Bull, 2009, 25(4): 216－220.

[7] Clayton EL, Cousin MA. Quantitative monitoring of activity-dependent bulk endocytosis of synaptic vesicle membrane by fluorescent dextran imaging[J]. J Neurosci Methods, 2009, 185(1): 76－81.

[8] Cui Y, Costa RM, Murphy GG, et al. Neurofibromin regulation of ERK signaling modulates GABA release and learning[J]. Cell, 2008, 135(3): 549－560.

[9] Orenbuch A, Shalev L, Marra V, et al. Synapsin selectively controls the mobility of resting pool vesicles at hippocampal terminals[J]. J Neurosci, 2012, 32(12): 3969－3980.

[10] Barnett DG, Bibb JA. The role of Cdk5 in cognition and neuropsychiatric and neurological pathology[J]. Brain Res Bull, 2011, 85(1－2): 9－13.

[11] Hisanaga S, Endo R. Regulation and role of cyclin-dependent kinase activity in neuronal survival and death[J]. J Neurochem, 2010, 115(6): 1309－1321.

收稿日期：2014－02－11　　（解学魁编辑　郑新校对）