

· 基础研究 ·

低功率微波辐射对抗氧化物酶活性及细胞膜流动性的影响

张清俊 丛建波 王长振 先宏 吴可

【摘要】目的 观察微波辐射对人脐静脉内皮细胞株 ECV₃₀₄、红细胞及纯化的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活性的影响及对 ECV₃₀₄ 细胞膜流动性的影响。**方法** (1) ECV₃₀₄ 细胞(18 个 200 ml 的玻璃培养瓶), 随机分为 3 组($n=6$): 微波假辐射组(A 组)、微波辐射 1 次组(B 组)及微波辐射 3 次组(C 组)。分别测定细胞 SOD、CAT 活性和还原性谷胱甘肽(GSH)含量。(2) 离体昆明种雄性小白鼠红细胞, 随机分为 3 组($n=9$), 组别同前。分别测定细胞 SOD、CAT 活性。取纯化的 CAT、SOD 酶, 随机分为 3 组($n=9$), 组别同前。微波辐射后, 测定酶活性。(3) ECV₃₀₄ 细胞(48 个 200 ml 的玻璃培养瓶), 随机分为 3 组($n=8$), 组别同前。微波辐射后, 在样品液中分别加入膜蛋白标记物 MAL-1 和脂肪酸标记物 5-Doxyl, 电子自旋共振(ESR)法检测波谱并计算膜流动性参数。**结果** 与 A 组比较, C 组 ECV₃₀₄ 细胞 CAT 活性明显降低($P<0.05$), ECV₃₀₄ 细胞的 SOD 活性和 GSH 含量也呈降低趋势, 而 B 组红细胞 SOD、CAT 及纯化的 CAT 活性明显增加($P<0.01$)。C 组 ECV₃₀₄ 细胞膜脂的运动参数与 A 组比明显降低($P<0.01$), 膜蛋白运动性变化不明显。**结论** 微波辐射可使红细胞内 SOD、CAT 和纯化 CAT 活性增强, 使 ECV₃₀₄ 细胞内 CAT 活性代偿性降低。微波辐射可导致 ECV₃₀₄ 细胞膜膜脂流动性降低。

【关键词】 微波辐射; 过氧化氢酶; 超氧化物歧化酶; 细胞膜流动性

Effects of microwave irradiation on the activity of cell antioxidant enzyme and the mobility of cell membrane lipids ZHANG Qing-jun*, CONG Jian-bo, WANG Chang-zhen, XIAN Hong, WU Ke. * Air Force Institute of Aviation Medicine, Beijing 100036, China

Corresponding author: WU Ke, Email: wuk@nu.bmi.ac.cn

【Abstract】Objective To investigate the effects of microwave irradiation (MI) on the activity of superoxide dismutase (SOD), ECV₃₀₄ catalase (CAT) of erythrocyte, and the mobility of ECV₃₀₄ membrane lipids. **Methods** (1) Eighteen culture flasks of ECV₃₀₄ cells were randomly divided into three groups of 6: a sham MI group (A), a once irradiated group (B), and a thrice irradiated group (C). After MI, the cells were scraped and lysed, and the activity of SOD and CAT and the content of glutathione (GSH) were determined. (2) The erythrocytes of Kunming mice and purified SOD and CAT enzymes were also collected and randomly divided into A, B and C groups ($n=9$). After MI, the activities of SOD and CAT were determined. (3) Forty-eight culture flasks of ECV₃₀₄ cells were randomly separated into A, B and C groups, including MAL 1 labeled and 5 Doxy labeled aliquots ($n=8$). After microwave exposure, MAL 1 and 5 Doxyl were added, and their ESR spectra were recorded. **Results** Compared with group A, the CAT activity of the ECV₃₀₄ cells in group C was significantly lower and the SOD activity and GSH content also were slightly lower. However, the SOD and CAT activities of the erythrocytes in group B were markedly increased. Compared with group A, the activity of purified CAT in group B was significantly higher. Compared with group A, lipid mobility in the membranes of the ECV₃₀₄ cells in group C was significantly lower, but there was no significant change in the mobility of ECV₃₀₄ membrane protein. **Conclusion** MI can enhance the CAT activity of erythrocytes and purified enzymes, while that of ECV₃₀₄ cells is decreased. MI can inhibit lipid mobility in ECV₃₀₄ cell membranes.

【Key words】 Microwave irradiation; Antioxidant enzymes; Mobility of membrane lipids

微波辐射的生物效应主要分为热效应和非热效

应, 平均表面功率密度低于 10 mW/cm^2 的微波辐射主要以非热效应为主。调查研究表明^[1], 长期微瓦级 ($\mu\text{W/cm}^2$) 的微波暴露可使微波职业者出现神经衰弱并伴有植物神经功能紊乱, 脑血流图波幅弹性指数下降、两侧波幅不对称, 外周血细胞染色体畸变和微核细胞检出率升高, 说明微波辐射的非热生物效应不容

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30370363)

作者单位: 100036 北京, 空军航空医学研究所(张清俊); 军事医学科学院放射与辐射医学研究所(丛建波、王长振、先宏、吴可)

通讯作者: 吴可, Email: wuk@nu.bmi.ac.cn

忽视。

抗氧化酶如超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 在维持生物体内氧化还原平衡中起着非常重要的作用, 抗氧化酶活性的改变会导致机体内氧化应激状态的改变, 进而产生其他生物效应。微波辐射虽不能直接导致生物体系产生自由基, 但会不会通过影响自由基代谢平衡的酶活性而间接导致细胞内产生氧化应激呢? 此外, 细胞膜是由双层磷脂分子构成的“液态镶嵌”结构, 膜蛋白镶嵌其中, 磷脂分子和膜蛋白的运动状态影响细胞膜的功能。一定频率的微波辐射可以和细胞膜中磷脂分子及蛋白分子的震荡产生相互作用, 影响膜功能的状态, 进而产生更广泛的生物效应。因此, 微波辐射产生的氧化应激效应和细胞膜效应可能是微波辐射非热生物效应的机理^[2]。

本研究观察微波辐射对 ECV₃₀₄ 细胞、小鼠离体红细胞 SOD、CAT 及纯化的 SOD、CAT 活性的不同影响, 并采用电子自旋共振 (electron spin resonance, ESR) 技术, 对微波辐射作用后 ECV₃₀₄ 细胞膜流动性进行观察, 旨在从氧化应激及细胞膜效应的角度理解微波辐射的非热生物效应, 以便进一步采取相应的防护措施。

材料与方法

一、主要试剂

DMEM 细胞培养基, 购自 Invitrogen 公司, 含 10% 胎牛血清。蛋白质标记物——马来酰亚胺 (3-maleimide proxyl) 和脂肪酸标记物——5-恶唑烷氮氧自由基硬脂酸 (5-doxyl-stearic acid), 均购自 Sigma 公司。CAT, 购自 Sigma 公司。SOD 为本所提取。其它试剂均为国产分析纯。

二、微波辐射方法

将实验样品放置于特制的微波辐照平台, 微波频率为 2 856 MHz, 平均功率密度为 10 mW/cm², 每次辐射 10 min, 间隔 10 min。

三、样品处理

培养 ECV₃₀₄ 细胞, 长满 18 个 200 ml 的玻璃培养瓶时, 随机分为 3 组 ($n=6$): 微波假辐射组 (A 组)、微波辐射 1 次组 (B 组) 及微波辐射 3 次组 (C 组)。微波辐射后, 弃去细胞培养液, 加入 4 ml PBS, 用细胞刮子刮下细胞, 离心 10 min。在沉淀的细胞中加入 1 ml 细胞裂解液, 吹打细胞, 装入小离心管, 置 -20℃ 冰箱保存, 1 周内完成各指标的测定。红细胞的制备: 取昆明种雄性小白鼠 3 只, 挖眼球取肝素抗凝血约 3 ml, PBS 清洗 2 次, 分装于 27 个小离心管中, 每管 0.5 ml。酶的配制: CAT 浓度为 0.5 mg/ml, SOD 浓度为 1 mg/ml,

用 PBS 分别配制 15 ml 酶液, 分装于 27 个小离心管中, 每管 0.5 ml。离体酶及红细胞分组: 随机分为 3 组 ($n=9$), 组别同前。

ECV₃₀₄ 细胞长满 48 个 200 ml 培养瓶时, 随机分为 3 组 (再分为膜脂标记组和膜蛋白标记组, $n=8$), 组别同前。MAL-1 标记的样品温育 4 h, 5-Doxyl 标记的样品孵育 30 min。标记完后分别用 PBS 洗至上清液在 ESR 仪上检测没有信号为止 (1 500 r, 10 min/次)。最后将离心的样品装入毛细管, ESR 仪检测。ESR 条件: X 波段, 微波功率 5 mW, 调制 0.15 mT, 室温。检测结果以图谱的形式打印, 根据公式测量并计算结果。

四、指标测定

采用邻苯三酚自氧化法测定 SOD 活性^[3], 钼酸铵比色法测定 CAT 活性^[4], 用 Beutler 改良法测定还原性谷胱甘肽 (γ -glutamylcysteinylglycine, GSH) 含量^[5], 考马斯亮蓝法测定细胞蛋白定量^[6], 细胞膜流动性按照本室前期建立的方法检测^[7]。

五、统计学分析

用 SAS 6.12 版软件进行单因素方差分析, 并采用 SNK 法进行两两比较。

结 果

一、微波辐射对 ECV₃₀₄ 细胞 SOD、CAT 活性及 GSH 含量的影响

微波辐射作用后, C 组与 A 组比较, ECV₃₀₄ 细胞的 CAT 明显降低 ($F=4.33, P<0.05$), GSH 含量也呈降低趋势, 细胞 SOD 酶活性变化不明显, 见表 1。

表 1 微波辐射对 ECV₃₀₄ 细胞 SOD、CAT 活性及 GSH 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	SOD (U/mg 蛋白)	CAT (KU/mg 蛋白)	GSH (μ g/mg 蛋白)
A 组	6	11.20 $\pm$ 1.77	36.28 $\pm$ 9.86	131.55 $\pm$ 13.39
B 组	6	10.52 $\pm$ 1.39	32.85 $\pm$ 7.38	136.54 $\pm$ 22.13
C 组	6	10.33 $\pm$ 2.00	24.35 $\pm$ 8.53 ^a	112.33 $\pm$ 11.52

注: 与 A 组比较, ^a $P<0.05$

二、微波辐射对小鼠红细胞 SOD、CAT 酶活性及纯化的 SOD、CAT 酶活性的影响

表 2 所示, 微波辐射 1 次后, B 组与 A 组比较, 红细胞 SOD、CAT 酶活性明显增加 (F 值分别为 5.04, 6.02, $P<0.01$), 而 GSH 含量变化不明显。B 组与 A 组比, 离体 CAT 酶活性明显增加 ($F=4.06, P<0.01$), 而 SOD 酶活性也有增加趋势, 但差异无统计学意义。

三、微波辐射对 ECV₃₀₄ 细胞膜流动性的影响

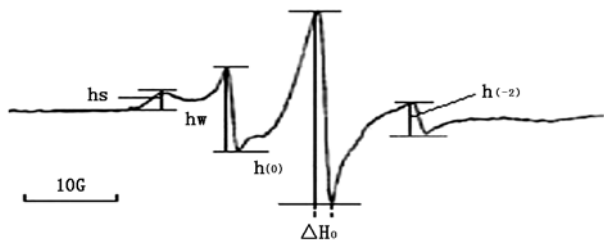
图 1 为 MAL-1 标记膜蛋白的 ESR 波谱, 分别计算

波谱的旋转相关时间(τ_c)和强弱固定化之比(S/W)。 τ_c 值反映标记物分子由一种构象旋转到另一种构象所需时间。弱固定化波谱(W)反映了蛋白质表面标记物的运动情况,强固定化波谱(S)反映了蛋白质深层位点上标记物的运动情况。标记物结合位点周围蛋白质构象的变化引起强弱固定化波谱值的改变用S/W表示,S/W降低说明膜蛋白构象松散,蛋白-SH运动自由,S/W升高说明蛋白-SH运动受限。图2为5-Doxyl标记膜脂所得的ESR波谱,可分别计算序参数(S)和 τ_c 。S值反映5-Doxyl附近膜脂的有序性,S值低,有序性差,流动性高。

表2 微波辐射对红细胞及纯化的SOD、CAT酶活性的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	SOD(U/mg 蛋白)		CAT(KU/mg 蛋白)	
	红细胞	纯化酶	红细胞	纯化酶
A组	4.18 ± 0.70	1 488.97 ± 107.11	102.62 ± 16.42	1 076.60 ± 126.09
B组	6.06 ± 1.47 ^a	1 484.56 ± 93.59	147.99 ± 37.03 ^a	218.45 ± 128.80 ^a
C组	5.18 ± 1.44	1 506.62 ± 73.03	144.98 ± 34.08	1 208.73 ± 91.80

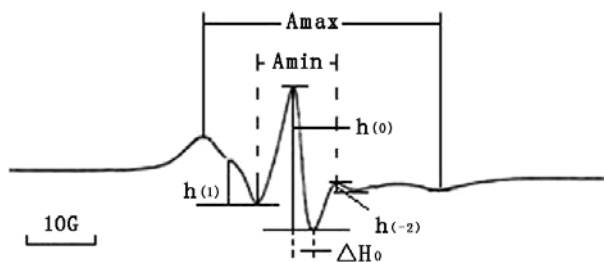
注:与A组比较,^a $P < 0.01$



$$\frac{S}{W} = \frac{h_s}{h_w}$$

$$\tau_c = 2.756 \times 10^{-10} \times \Delta H_0 \times \sqrt{\frac{h_0}{h_{(-1)}}} - \sqrt{\frac{h_0}{h_{(1)}}}$$

图1 MAL-1标记膜蛋白的ESR图谱



$$S = \frac{1.952 \times (A_{\max} - A_{\min} - 3.416)}{A_{\max} + 2.353 A_{\min} + 8.038}$$

$$\tau_c = 2.756 \times 10^{-10} \times \Delta H_0 \times \sqrt{\frac{h_0}{h_{(-1)}}} - \sqrt{\frac{h_0}{h_{(1)}}}$$

图2 5-Doxyl标记膜脂的ESR图谱

微波辐射3次后,C组与A组比较,ECV₃₀₄细胞膜的脂肪酸标记物S值明显增加($P < 0.01$, $F = 6.63$),说明膜脂的流动性变慢,而膜蛋白的流动参数无明显变化,见表3。

表3 微波辐射对ECV₃₀₄细胞膜流动性的影响($\times 10^{-10}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	膜脂		膜蛋白	
	S	τ_c	S/W	τ_c
A组	0.572 ± 0.015	14.955 ± 2.771	0.063 ± 0.008	0.978 ± 0.087
B组	0.584 ± 0.011	15.819 ± 5.491	0.058 ± 0.009	0.886 ± 0.086
C组	0.595 ± 0.014 ^a	16.503 ± 4.135	0.059 ± 0.006	0.919 ± 0.067

注:与A组比较,^a $P < 0.01$

讨 论

Moustafa等^[8]发现,移动电话频率及强度的微波辐射1~4 h后,可以导致志愿者血浆脂质过氧化水平显著增加,红细胞SOD、GSH-Px活性降低。刘秀红等^[9]研究发现,平均功率密度为10,20,30 mW/cm²的2 450 MHz微波辐射1 h,可使体外培养的人视网膜色素上皮细胞系——hTERT-RPE1细胞内抗氧化酶SOD、GSH-Px活性显著降低,过氧化产物MDA含量升高,这种变化的程度与微波的剂量相关。进一步研究发现,GSH可显著降低hTERT-RPE1细胞急性期反应蛋白转录,使细胞蛋白质合成、翻译和细胞生长增殖等基因转录下调,并同时使调节信号通道和周期蛋白丰度的相关基因转录下调^[10]。刘朝晖等^[11]观察到,平均功率密度为10 mW/cm²的毫米波辐射可引起大鼠血中SOD、NOS活性下降,但未造成血细胞的明显损害。叶娟等^[12]观察到,平均功率密度为5 mW/cm²和10 mW/cm²的微波辐射均可导致兔晶状体上皮细胞中早期凋亡细胞及继发性坏死细胞的数量明显增加,说明低强度的微波辐射也可导致兔晶状体上皮细胞发生不可逆性损伤。

本研究发现,平均功率密度为10 mW/cm²的微波辐射可使ECV₃₀₄细胞中的CAT活性明显降低,细胞内GSH含量也成降低趋势。GSH是细胞内重要的小分子抗氧化剂,GSH含量的改变会导致更广泛的细胞生物效应^[13]。本研究中GSH含量的降低趋势及CAT活性的下降均说明了细胞内氧化还原平衡状态产生了改变,细胞内产生了氧化应激。成熟的红细胞富含抗氧化酶,由于细胞内缺乏再合成抗氧化酶的完整体系,在观察红细胞酶活性时可以不考虑酶含量变化造成的影响。本研究中,微波辐射后离体红细胞中CAT、SOD活性和纯化的CAT活性却明显增加,可能和微波辐射使酶活性中心集团空间构象更为活泼,更容易与底物结合、催化底物有关。同时,也验证了微波辐射可以通过影响抗氧化酶活性进一步影响机体内自由基的代谢平衡,间接产生氧化应激的假说。此外,ECV₃₀₄细胞内酶活性与红细胞和纯酶活性在微波辐射作用后产生了截然不同的改变,可能是生物样品对微波的比吸收率不同有关,也可能是活的生物体可通过调节酶活性、酶

含量及抗氧化小分子含量的变化适应外界环境的刺激面引起的氧化应激,最终表现为微波辐射生物效应随生物体系不同而有所差异。

本研究中细胞膜流动性检测结果发现,膜脂在微波辐射作用后有序性增加,其运动减慢。膜脂流动性的改变,一方面导致膜脂功能的改变,另一方面也必然会影响到膜上“镶嵌”的蛋白,从而间接使细胞膜蛋白运动发生变化,最终影响细胞的膜功能。赵东红等^[14]也发现 2 450 MHz、平均功率密度为 10 mW/cm² 的微波辐射可引起红细胞膜的脆性增加,流动性下降。而本室前期研究发现^[7],电磁脉冲可影响大鼠肝线粒体膜流动性,膜蛋白运动变慢,膜脂运动加快。Bordiushkov 等^[15]发现,低频电磁场暴露 40 min,可使离体的淋巴细胞膜流动性增加。这说明不同形式的电磁辐射会产生不同的生物效应。

本研究结果表明,低功率的微波辐射可从细胞及蛋白分子水平影响抗氧化酶的活性,并引起了细胞膜功能的改变。这为解释微波辐射的非热生物效应提供了一定的理论基础,也为采取微波防护措施提供了参考,低功率微波辐射的生物氧化应激效应值得进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 夏玉静. 小功率微波对人体健康影响的国内研究进展. 中国职业医学, 2001, 28: 49-50.
- [2] 张清俊, 吴可. 电磁辐射诱导的生物氧化应激效应. 航天医学与医学工程, 2004, 17: 152-156.
- [3] Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autooxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur J Biochem, 1974, 47: 469-474.
- [4] 庞战军, 周玫, 陈媛, 主编. 自由基医学研究方法. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 163-166.
- [5] 张文焕, 杨梅, 由仲杰, 等. Beutler 改良法测定小鼠全血中还原型谷胱甘肽的研究. 中老年医学杂志, 1996, 16: 83-85.
- [6] 李建武, 萧能赓, 于瑞元, 等. 生物化学实验原理和方法. 北京: 北京大学出版社, 1994: 174-176.
- [7] 王长振, 丛建波, 先宏, 等. 电磁脉冲对大鼠肝线粒体膜流动性及脂质过氧化的影响. 中华劳动卫生职业病杂志, 2002, 20: 266-268.
- [8] Moustafa YM, Moustafa RM, Belacy A, et al. Effects of acute exposure to the radiofrequency fields of cellular phones on plasma lipid peroxide and antioxidant activities in human erythrocytes. J Pharm Biomed Anal, 2001, 26: 605-608.
- [9] 刘秀红, 申洪, 季爱玲, 等. 微波辐射对培养的 hTERT-RPE1 细胞的应激损伤. 西北国防医学杂志, 2003, 24: 4-6.
- [10] 刘秀红, 申洪, 史永亮, 等. 谷胱甘肽在微波辐射致 hTERT-RPE1 细胞基因转录中的作用. 第四军医大学学报, 2003, 24: 1345-1348.
- [11] 刘朝晖, 王小娟, 陈景藻, 等. 毫米波对大鼠血清中活性氧、一氧化氮及其相关酶的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2000, 22: 215-216.
- [12] 叶娟, 姚克, 鲁德强, 等. 两种低强度微波辐射致兔晶状体上皮细胞改变的定量研究. 中华眼科杂志, 2003, 39: 361-364.
- [13] 张清俊, 吴可, 丛建波. 谷胱甘肽及其代谢产物对细胞信号转导的影响. 国外医学生理病理科学与临床分册, 2004, 24: 14-17.
- [14] 赵东红, 秦德安, 何学民. 微波(2 450 Hz)对整体小白鼠红细胞膜的损伤效应及药物防护. 华东师范大学学报自然科学版, 1995: 108-112.
- [15] Bordiushkov IuN, Goroshinskaia IA, Frantsiiants EM, et al. Structural-functional in lymphocytes erythrocyte membranes after exposure to alternating magnetic field. Vopr Med Khim, 2000, 46: 72-80.

(修回日期: 2006-08-29)

(本文编辑: 松 明)

· 消息 ·

药刀靶向治疗新技术推广与针刀、注射粘连点定位及疗效提高学习班招生通知

为了促进疼痛治疗靶向化、微创化进程,进一步提高临床疗效,由药刀疗法发明人陕俊平教授亲自举办的药刀靶向微创治疗临床经验推广学习班现正在招生。该学习班采取理论结合临床实践的方式,现场进行病例操作,白天上课,晚上学员练习实践(由陕俊平教授亲自辅导学员,以确保教学质量)。授课内容包括:①病变粘连点、痛点检查及准确定位,一次性针、刀、药(磁、药栓)、电、气靶向微创同施,以加快疼痛疾病根治;②痛点探查定位系统在疼痛诊疗中的应用;③药刀靶向微创松解术及调衡术;④药刀靶向特效注射、药液配制及常用注射术;⑤磁疗药栓具体制作方法及靶向应用;⑥如何开展针刀、注射、磁疗药栓植入三序列治疗及进一步提高疗效,预防针刀治疗后的创伤再粘连和注射治疗的复发;⑦针刀、注射治疗十大误区剖析。

本学习班重点讲解颈椎病、腰椎间盘突出症、骨质增生症、肩周炎、腱鞘炎、跟骨痛、股骨头坏死、骨性关节炎、神经卡压综合征、软组织疼痛、脊柱相关性疾病、内科疾病等多种疾病的治疗。学员通过学习后可掌握针刀、注射、磁疗药栓植入三序列靶向治疗,为治疗疑难病症增添治疗手段。

本学习班学费、课本及药刀刀具大全 1 套共计 1 680 元,限招 40 人,报名时间为 2007 年 3 月 24 日至 4 月 2 日;5 月 12 至 21 日。另外,由中国中医科学院董福慧博士、中华疼痛学会第三临床中心黄延寿主任做序,由北京大学王者风教授审阅、修改,经中国医药科技出版社出版的《中国药刀学》已经出版发行,每本订价 22 元,邮购价 28 元。学习班及购书联系方式:100029 北京中医药大学药学院 425 房间,岳老师;联系电话:010-84064077, 84064076, 64202604。药刀疗法发明人电话:13892316858,联系时间限于每天 15:00 至 22:00 点,仅限疑难问题解答,详情请查询中国药刀网(网址:www.zgyaodao.com)。