



论文

HIF-1 α /ERK 通路活化调控微波长期辐射致大鼠海马神经元线粒体损伤

赵黎, 彭瑞云*, 高亚兵, 王水明, 王丽峰, 董霁, 徐新萍, 苏镇涛

军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 100850

* 联系人, E-mail: pengry@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2011-05-06; 接受日期: 2011-7-12

国家自然科学基金项目(批准号: 30901169)资助

doi: 10.1360/052011-547

摘要 本文旨在探讨微波辐射致大鼠海马神经元线粒体损伤中 HIF-1 α 和 ERK 通路分子表达的改变及意义, 为深入研究微波辐射损伤机制和防治提供新靶标. 2.5, 5 和 10 mW/cm² 的微波辐射 100 只雄性 Wistar 大鼠, 辐射时间为 6 min/次, 5 次/周, 连续辐射 1 月, 于辐射后 6 h, 7 d, 14 d, 1 周和 2 月, 采用 Real-time PCR, Western blot 和免疫组织化学检测海马中 hif-1 α mRNA, HIF-1 α , ERK1/2 和 p-ERK1/2 表达. 结果发现, 大鼠海马 hif-1 α mRNA 和 HIF-1 α 蛋白分别在 2.5 和 5 mW/cm² 组于辐射后 14 d 和 1 月明显增加, 10 mW/cm² 组辐射后 14 d~2 月降低. 但海马 ERK1/2 未见明显改变. 假辐射组 p-ERK1/2 于海马神经元胞浆中呈弱阳性, 2.5 mW/cm² 组 p-ERK1/2 表达无明显变化, 5 和 10 mW/cm² 辐射后 7 d~1 月, p-ERK1/2 于海马神经元胞浆和胞核中呈阳性或强阳性. 2.5, 5 和 10 mW/cm² 微波长期辐射后大鼠海马 HIF-1 α 和 p-ERK1/2 表达的改变, 表明 HIF-1 α 和 ERK 通路活化参与微波辐射致海马线粒体损伤的过程, 并可能发挥修复线粒体损伤的作用.

关键词
微波
海马
线粒体
HIF-1 α
ERK1/2

长期低剂量微波辐射的研究对于微波职业接触者和长期生活在电磁辐射环境中的人们来说, 具有现实性和必要性, 但其损伤机制研究较少. 低氧诱导因子(hypoxia-induced factor, HIF-1 α)是细胞内缺氧应答关键调控因子, 可通过激活下游靶基因维持机体自稳平衡. 研究发现, 多种脑损伤模型中存在线粒体损伤引起的 HIF-1 α 激活, 且在疾病进程中发挥作用. 同时, 胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)信号通路是线粒体活化 HIF-1 α 的重要通路之一. 但 HIF-1 α 和 ERK 通路在微波长期辐射中的表达及意义未见报道.

因此, 本研究在前期建立的微波长期辐射致海马神经元线粒体损伤模型基础上, 检测了海马 HIF-1 α 和 ERK 信号通路的主要分子 ERK 及磷酸化水平的表达, 将有助于阐明微波辐射致海马神经元线粒体损伤的调控机制.

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

二级雄性 Wistar 大鼠 100 只, 体重(180 $\pm$ 20) g(军事医学科学院实验动物中心). 随机分为 4 组, 即假辐

射组(25只)、2.5 mW/cm²组(25只)、5 mW/cm²组(25只)和10 mW/cm²组(25只)。

1.2 微波辐射方法

采用脉冲微波辐射源进行全身均匀辐射。辐射平均功率密度分别为2.5、5和10 mW/cm²。辐射时间为6 min/次,辐射次数为5次/周,持续辐射1月。假辐射组大鼠条件相同但不予辐射。

1.3 Real-time PCR 法检测大鼠海马组织 hif-1 α mRNA 表达

采用 Trizol(Invitrogen, 美国)提取辐射后6 h, 7 d, 14 d, 1月和2月各组大鼠海马组织总RNA, 采用禽类成髓细胞瘤病毒逆转录酶合成cDNA(上海生工, 中国), 以磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH)为内参, 合成以下引物: GAPDH(上游: 5'-GTGCTGAGTATGTCGTGGAG-3', 下游: 5'-CGGAGATGATGACCCTTTT-3'); hif-1 α (上游: 5'-GCATCTCCACCTTCTACCC-3', 下游: 5'-CTCTTTCCTGCTCTGTCTG-3')。采用 Real Master Mix (SYBR Green)(天根生化科技有限公司, 中国)进行扩增, 反应条件为: 95℃预变性10 min; 95℃变性15 s, 60℃退火/延伸1 min, 读板, 共40循环。

1.4 Western blot 法检测大鼠海马组织 HIF-1 α 和 ERK1/2 蛋白表达

60 μ g 海马组织蛋白与变性缓冲液(0.1 mol/L Tris 碱缓冲液(pH 6.8), 4%十二烷基硫酸钠, 10% B-巯基乙醇, 20%甘油, 0.01%溴酚蓝, 双蒸水)混合, 95℃加热10 min, 冰上冷却后行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(浓缩胶5%, 分离胶6%)。电泳结束后, 切下样品所在的凝胶转膜, 5%脱脂奶粉常温封闭, 鼠抗 HIF-1 α 或兔抗 ERK1/2 或兔抗 β -actin(1:1000)4℃过夜, 依次与辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 或羊抗兔 IgG(1:5000)作用, 曝光显影定影。

1.5 免疫组织化学方法检测大鼠海马组织 p-ERK1/2 表达

各组动物分别于辐射后6 h, 7 d, 14 d, 1月和2月活杀取脑, 10%缓冲福尔马林固定1周后, 常规脱水透明制片。切片二甲苯脱蜡至水, 3% H₂O₂室温孵育10 min, 0.1%胰蛋白酶抗原修复10 min, p-ERK1/2 一

抗(1:200), 置湿盒37℃孵育1 h后, 4℃过夜, 加生物素标记的羊抗鼠 IgG(1:200), 37℃孵育40 min, 加 HRP-SA(1:200), 37℃孵育30 min, DAB 显色, 镜下控制显色效果, 充分水洗, 苏木素浅染细胞核, 脱水、透明、封片和照相。对照实验用 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.6 图像分析及定量方法

应用 7500 system SDS 软件对 hif-1 α mRNA 和相应内参 GAPDH mRNA 进行分析。应用 CMIAS-II 图像分析仪(Leica, 德国)计算 HIF-1 α 与其相应内参 β -actin 的条带积分光密度(integral optical density, IOD)比值, 同时在光镜10 $\times$ 40倍视野下, 每组免疫组化切片随机选取5个视野, 进行平均光密度(mean optical density, MOD)测定及分析。

1.7 统计学分析

实验数据均以均数和标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 SAS 软件进行单因素多水平方差分析。与假辐射组相比, *示 $P < 0.05$, **示 $P < 0.01$ 。

2 结果

2.1 大鼠海马组织 hif-1 α mRNA 变化

辐射后不同时间点大鼠海马组织 hif-1 α mRNA 的 Real-time PCR 检测结果见图1。与假辐射组相比, 2.5 mW/cm²组 hif-1 α mRNA 于辐射后6 h~14 d 均呈增加趋势, 但无显著差异; 5 mW/cm²组于辐射后7 d~1月增加, 以辐射后14 d 增加显著($P < 0.01$); 10 mW/cm²组于辐射后6 h~2月减少, 并以辐射后6 h, 1月和2月减少显著($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

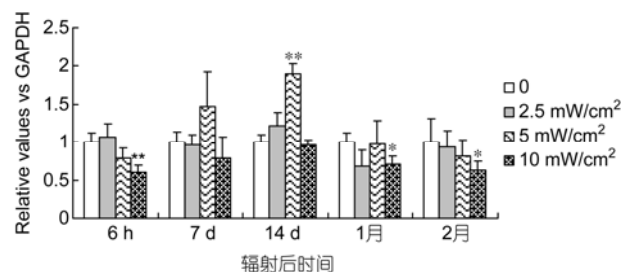


图1 微波长期辐射后大鼠海马组织中 hif-1 α mRNA 的 Real-time PCR 检测结果

2.2 大鼠海马组织 HIF-1 α 蛋白变化

辐射后大鼠海马组织 HIF-1 α 蛋白表达结果见图 2 和图 3. 与假辐射组相比, 2.5 mW/cm² 组 HIF-1 α 蛋白于辐射后 6 h~2 月均呈增加趋势, 以辐射后 7 d, 14 d 和 1 月改变显著($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 5 mW/cm² 组于辐射后 14 d 和 1 月显著增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 10 mW/cm² 组于辐射后 14 d, 1 月和 2 月均显著减少($P<0.01$).

2.3 大鼠海马组织 ERK1/2 和 p-ERK1/2 蛋白变化

大鼠海马组织 ERK1/2 表达变化结果见图 4 和图 5. 与假辐射组相比, 各辐射组于辐射后 6 h~2 月 ERK1/2 无明显差异.

p-ERK1/2 表达变化结果见图 6~8. p-ERK1/2 在假辐射组大鼠海马神经元胞浆中呈淡棕黄色颗粒, 为弱阳性表达(图 6A); 而在 2.5, 5 和 10 mW/cm² 组的神经元胞浆和胞核中呈棕黄色或深棕黄色, 为阳性或强阳性表达(图 6B-6D). 以 10 mW/cm² 组为例, 辐射后 14 d, p-ERK1/2 表达最强(图 7). 统计结果显示,

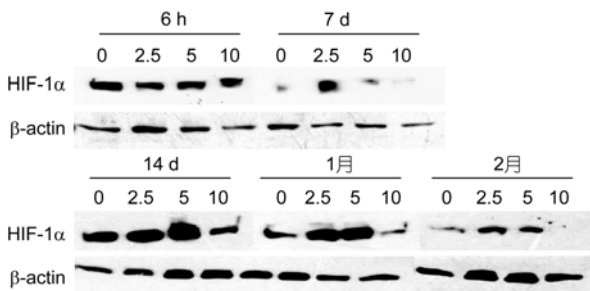


图 2 微波长期辐射后大鼠海马组织中 HIF-1 α 表达的 Western blot 检测结果

6 h~2 月示辐射后时间, 0~10 示辐射剂量(mW/cm²)

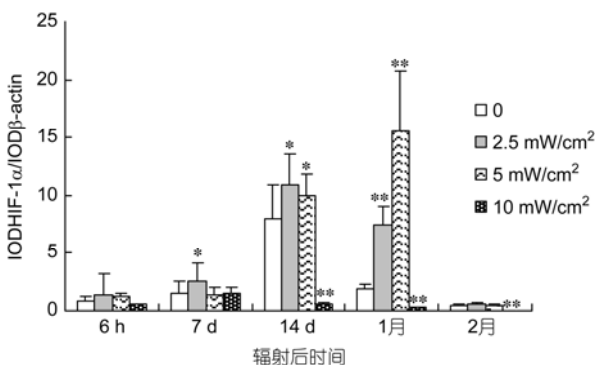


图 3 微波长期辐射后大鼠海马组织中 HIF-1 α 表达的定量分析结果

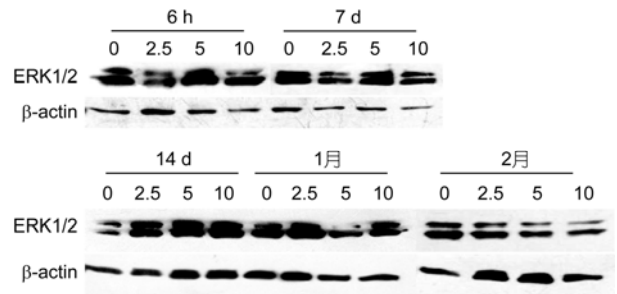


图 4 微波长期辐射后大鼠海马组织中 ERK1/2 蛋白表达的 Western blot 检测结果

6 h~2 月示辐射后时间, 0~10 示辐射剂量(mW/cm²)

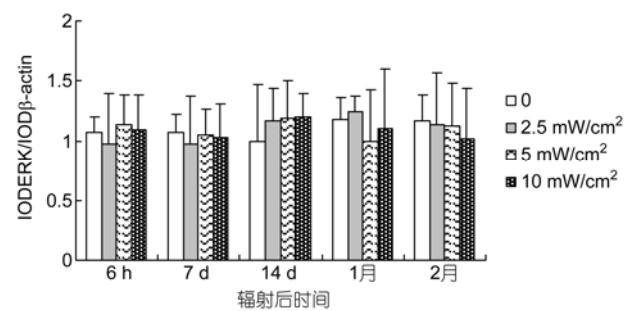


图 5 微波长期辐射后大鼠海马组织中 ERK1/2 蛋白表达的定量分析结果

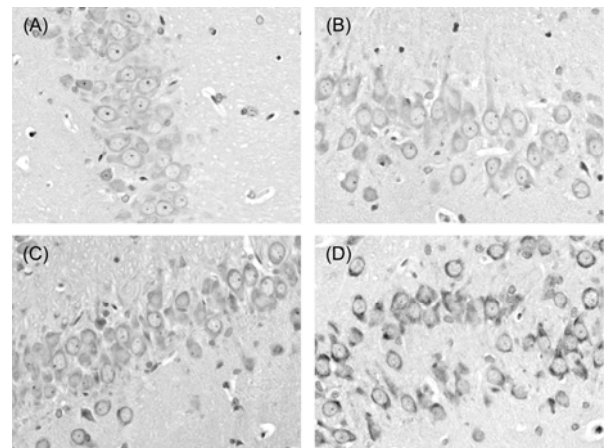


图 6 微波长期辐射后 14 d 大鼠海马组织神经元 p-ERK1/2 表达(SP $\times 200$)

(A) 假辐射组, 示 p-ERK1/2 于胞浆中呈浅棕黄色弱阳性; (B) 2.5 mW/cm² 组, 示 p-ERK1/2 于胞浆中呈棕黄色阳性; (C) 5 mW/cm² 组, 示 p-ERK1/2 于胞浆和胞核中呈棕黄色阳性; (D) 10 mW/cm² 组, 示 p-ERK1/2 于胞浆和胞核中呈深棕黄色强阳性

与假辐射组相比, 2.5 mW/cm² 组 p-ERK1/2 表达于辐射后 1 月呈增加趋势; 5 mW/cm² 组 p-ERK1/2 表达于

辐射后 6 h~2 月均呈增加趋势, 以辐射后 7 d~2 月改变显著($P<0.05$); 10 mW/cm² 组 p-ERK1/2 表达于辐射后 6 h~2 月均呈增加趋势, 以辐射后 7 d~2 月改变显著($P<0.05$ 或 $P<0.01$)(图 8).

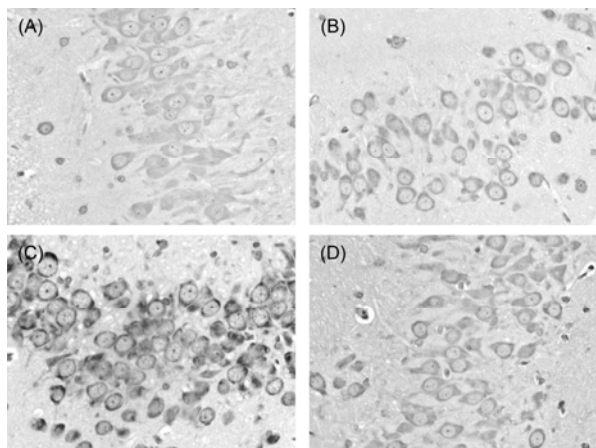


图7 10 mW/cm²微波长期辐射后大鼠海马神经元p-ERK1/2 表达(SP $\times 200$)

(A) 辐射后 6 h, 示 p-ERK1/2 于胞浆中呈浅棕黄色弱阳性; (B) 辐射后 7 d, 示 p-ERK1/2 于胞浆和胞核中呈棕黄色阳性; (C) 辐射后 14 d, 示 p-ERK1/2 于胞浆和胞核中呈深棕黄色强阳性; (D) 辐射后 1 月, 示 p-ERK1/2 于胞浆和胞核中呈棕黄色阳性

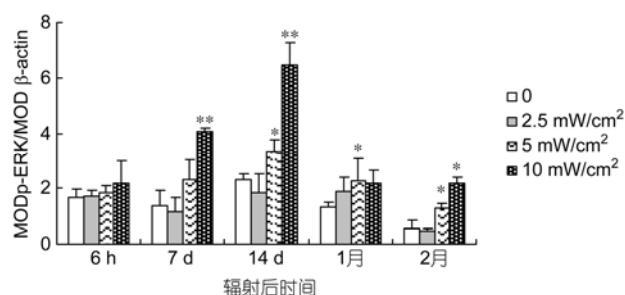


图8 微波长期辐射后大鼠海马组织中 p-ERK1/2 表达的定量分析结果

3 讨论

HIF-1 由构成性表达的 β 亚基和受氧调节的 α 亚基组成^[1], 其活性主要取决于 HIF-1 α 的活性和表达。由于 HIF-1 的靶基因与糖酵解、细胞生存与增殖、血管新生、肿瘤生长和转移等许多生命活动密切相关^[2], 因而对 HIF-1 α 的研究备受注目。

HIF-1 α 在脑缺氧等多种模型中的作用已有广泛

研究, 而非缺氧途径(如高温、辐射和细胞因子等)也可介导 HIF-1 α 表达^[3-6]。王旭等人^[7]采用 30 和 100 mW/cm²微波急性辐射大鼠 5 min, 发现辐射后皮层和海马神经元胞核 HIF-1 α 基因和蛋白均于辐射后 6 h~1 d 呈阳性。但是, 微波长期辐射对 HIF-1 α 表达的研究未见报道。

近来研究发现, 在一些脑损伤模型中存在线粒体引起的 HIF-1 α 的稳定、移位和活化的调节机制^[8]。因此, 本研究在前期建立的微波长期辐射致海马神经元线粒体损伤的模型基础上, 检测了辐射后 6 h~2 m 的海马 hif-1 α mRNA 和 HIF-1 α 蛋白表达。结果发现不同的辐射剂量, HIF-1 α 表达呈差异改变, 即 2.5 和 5 mW/cm² 组 HIF-1 α 表达均呈增加的活化改变, 而 10 mW/cm² 组 HIF-1 α 则持续抑制。其原因可能是不同辐射剂量对海马损伤以及作用机制不同。2.5 和 5 mW/cm² 组的 HIF-1 α 表达增强, 可能由于: 脑内自由基增加^[9,10], 源于线粒体呼吸链受损即 HIF-1 α 活化的始动因素; 局部脑微循环紊乱, 供氧能力下降导致缺氧敏感的 HIF-1 α 蓄积^[7,11]; 海马及其周围组织释放活性物质, 启动自我保护性反应。HIF-1 α 活化后能介导多个基因表达调控, 可通过促进糖酵解、生成 ATP 和促细胞存活等方面发挥脑保护作用^[12]。10 mW/cm² 组 HIF-1 α 持续受抑, 可能与辐射剂量与海马损伤相关, 以致无法激活 HIF-1 α , 或启动其他的脑自我修复机制。

线粒体引起的 HIF-1 α 激活的途径尚不明确, 可能通过影响 HIF-1 α 激活之前的信号途径如丝裂原活化的蛋白激酶等, 影响 HIF-1 二聚体的形成^[13]。因此, 本研究进而检测了辐射后 ERK 通路分子的表达情况。结果显示, 微波对 ERK1/2 蛋白影响不显著, 但是 p-ERK1/2 高度活化, 且随着剂量的增加其活化程度更明显, 表明微波长期辐射可通过活化 p-ERK1/2 来激活 ERK 信号通路, 从而调控相关基因表达。对于 ERK 信号通路的上游激活因素, 可能是微波辐射的直接作用, 也包括如线粒体损伤诱发的 Ca²⁺内流和 ROS 堆积, 以及各种生长因子及其受体的激活^[14,15]。由于 ERK 通路是连接线粒体损伤与 HIF-1 α 激活的中间环节^[16,17], 那么, 本研究证实微波辐射后 ERK 通路和 HIF-1 α 活化, 但它们之间的相互关系如何, 是否是辐射的应答效应之一, 是需要进一步探讨的重要内容。

综上, 本研究发现 HIF-1 α 和 ERK 通路活化参与

微波辐射致海马线粒体损伤的过程, 并可能发挥修复线粒体损伤的作用. 该研究为深入探讨 HIF-1 α /ERK 通路在微波辐射后线粒体损伤中的机制研究奠定基础.

随着对微波辐射后 HIF-1 α 调节通路和活化机制更加深入的研究, 将 HIF-1 作为靶点, 寻找开发治疗相关途径具有潜在前景.

参考文献

- 1 Semenza G L. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr Opin Cell Biol*, 2001, 13: 167–171
- 2 Semenza G L. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr Opin Genet Dev*, 2010, 20: 51–56
- 3 Horowitz M. Genomics and proteomics of heat acclimation. *Front Biosci (Schol Ed)*, 2010, 2: 1068–1080
- 4 Sun F Y, Guo X. Molecular and cellular mechanisms of neuroprotection by vascular endothelial growth factor. *J Neurosci Res*, 2005, 79: 180–184
- 5 Chen W Y, Chang M S. IL-20 is regulated by hypoxia-inducible factor and up-regulated after experimental ischemic stroke. *J Immunol*, 2009, 182: 5003–5012
- 6 Choi Y K, Kim C K, Lee H, et al. Carbon monoxide promotes VEGF expression by increasing HIF-1 α protein level via two distinct mechanisms, translational activation and stabilization of HIF-1 α protein. *J Biol Chem*, 2010, 285: 32116–32125
- 7 王旭, 胡向军, 彭瑞云, 等. 高功率微波辐射对大鼠脑 HIF-1 α 表达影响. *中国公共卫生*, 2007, 23: 1161–1163
- 8 Solaini G, Baracca A, Lenaz G, et al. Hypoxia and mitochondrial oxidative metabolism. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1797: 1171–1177
- 9 Moeller B J, Cao Y, Li C Y, et al. Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radical, and stress granules. *Cancer Cell*, 2004, 5: 429–441
- 10 Gorski D H, Beckett M A, Jaskowiak N T, et al. Blockage of the vascular endothelial growth factor stress response increases the antitumor effects of ionizing radiation. *Cancer Res*, 1999, 59: 3374–3378
- 11 陈瑞, 侯燕芝, 陈安宇, 等. 微波辐射对鼠脑 MND、NOS 含量和 LDH 活性的影响. *首都医科大学学报*, 2003, 24: 231–233
- 12 Fan X, Heijnen C J, van der Kooij M A, et al. The role and regulation of hypoxia-inducible factor-1 α expression in brain development and neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Brain Res Rev*, 2009, 62: 99–108
- 13 Moon E J, Sonveaux P, Porporato P E, et al. NADPH oxidase-mediated reactive oxygen species production activates hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) via the ERK pathway after hyperthermia treatment. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 20477–20482
- 14 Pages G, Milanini J, Richard D E, et al. Signaling angiogenesis via p42/p44 MAP kinase cascade. *Ann N Y Acad Sci*, 2000, 902: 187–200
- 15 Narasimhan P, Liu J, Song Y S, et al. VEGF Stimulates the ERK 1/2 signaling pathway and apoptosis in cerebral endothelial cells after ischemic conditions. *Stroke*, 2009, 40: 1467–1473
- 16 Minet E, Michel G, Mottet D, et al. Transduction pathways involved in hypoxia-inducible factor-1 phosphorylation and activation. *Free Radic Biol Med*, 2001, 31: 847–855
- 17 Hur E, Chang K Y, Lee E, et al. Mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor PD98059 blocks the transactivation but not the stabilization or DNA binding ability of hypoxia-inducible factor-1 α . *Mol Pharmacol*, 2001, 59: 1216–1224

Activation of HIF-1 α /ERK Pathway Regulates the Injury of Neuron Mitochondria in Hippocampus Induced by Long-term Microwave Exposure

ZHAO Li, PENG RuinYun, GAO YaBing, WANG ShuiMing, WANG LiFeng,
DONG Ji, XU XinPing & SU ZhenTao

Institute of Radiation and Irradiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

Change of HIF-1 α /ERK signaling pathway and its significance in the damage of the hippocampus induced by microwave exposure provides new targets for in-depth study of microwave injury mechanisms and prevention and control measures and approaches. 100 male Wistar rats were exposed to microwave at 2.5, 5 and 10 mW/cm². The exposure time was 6 min/times, 5 times/week, and the exposure was continuous for one month. Rats were sacrificed at 6 h, 7 d, 14 d, one and two months after exposure. The expression of hif-1 α mRNA in hippocampus was detected by real-time PCR. HIF-1 α , ERK1/2, p-ERK1/2 expression were detected by Western blot, IHC and image analysis. The mRNA and protein levels of HIF-1 α in hippocampus were increased significantly at 14 d and one month in 2.5 and 5 mW/cm² groups, while decreased from 14 d to two months in 10 mW/cm² group. There was no significant change of ERK1/2 within two months in exposure groups. In sham group, p-ERK1/2 was expressed weakly positive in neuron cytoplasm of hippocampus, while there was no changes in 2.5 mW/cm² group, and p-ERK1/2 was expressed positive or strong positive from 7 d to one month in 5 and 10 mW/cm² group. Therefore, HIF-1 α and p-ERK1/2 expression in hippocampus were changed after 2.5, 5 and 10 mW/cm² microwave exposure, which indicated the activation of HIF-1 α and ERK pathway participated in the processes of hippocampus mitochondria injury induced by microwave, and might repair the mitochondria injury.

microwave, hippocampus, mitochondria, HIF-1 α , ERK1/2

doi: 10.1360/052011-547