

微波暴露对大鼠 GLP-1 及其受体表达的影响及 与学习记忆功能损伤的关系

张蕾 周舟 张广斌 余争平
(第三军医大学劳动卫生学教研室 重庆 400038)

摘要 探讨了微波暴露对胰高血糖素样肽-1 (Glucagon-like peptide-1, GLP-1) 及其受体的影响, 揭示了 GLP-1 及其受体变化与大鼠学习记忆功能损伤的关系。分别用 Morris 水迷宫评价大鼠学习记忆能力, 酶联免疫吸附实验 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测血浆中 GLP-1 浓度, 逆转录多聚酶链反应 (Reverse transfer polymerase chain reaction, RT-PCR) 检测海马组织中 GLP-1R mRNA 表达, 原位末端标记法 (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated Biotin-dUTP nick-end labeling, TUNEL) 法检测细胞凋亡。研究发现微波暴露可导致大鼠学习记忆能力下降, 血浆中 GLP-1 浓度降低, 海马组织 GLP-1R mRNA 表达下降, 海马脑区神经细胞凋亡。暴露前给予 GLP-1 可改善微波暴露所致学习记忆功能损伤, 保护神经细胞, 降低海马神经细胞凋亡率。GLP-1 及其受体参与了微波暴露所致学习记忆功能损伤, 证实 GLP-1 具有神经保护作用, 并拮抗微波暴露所致学习记忆功能损伤。

关键词 微波暴露, GLP-1, GLP-1 受体, 海马, 学习记忆

中图分类号 Q64, R112.4, R594.8

随着人类社会现代化进程加快, 各类微波源在工业、农业、通讯、军事等领域的应用日益广泛, 人类暴露于电磁辐射的强度和时间与日俱增。电磁辐射的生物效应与危害防治正成为生命科学领域倍受关注的新课题^[1]。

以往研究表明微波暴露损伤的主要靶器官是中枢神经系统, 最为敏感的靶区为学习记忆的功能脑区海马^[2]。胰高血糖素样肽-1 (Glucagon-like peptide-1, GLP-1) 是源于小肠 L 细胞的一种激素, GLP-1 (7-36)、GLP-1 (7-37) 为血液中有活性的 GLP-1 形式^[3]。Alvarez 等^[4]发现, 在大鼠海马脑区也有 GLP-1 受体基因的合成和表达。During 等^[5]发现, GLP-1 受体在中枢神经系统参与了学习记忆的形成, 并具有神经保护作用。但微波暴露是否可以影响 GLP-1 的产生及受体的表达, 文献中至今仍未见有报道。本研究旨在以雄性大鼠为主要研究对象, 研究微波暴露对海马脑区 GLP-1 受体表达及血浆中 GLP-1 浓度的影响, 并观察外源性 GLP-1 对微波暴露致学习记忆损伤的干预作用, 从新的角度探讨微波暴露致学习记忆损伤的机理, 并为微波暴露致中

枢神经系统损伤的防护提供新的依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物与分组

二级清洁级雄性 8wk, Wistar 大鼠, 体重为 180—200g, 由第三军医大学实验动物中心提供。随机分为对照组 (Ctr.)、微波暴露组 (Microwave exposure, ME)、GLP-1 预处理组 (GLP-1+ ME)。

1.2 微波暴露

将大鼠置于反射系数近似零的微波暗室辐照, 辐照环境温度及湿度由空调器、吸湿机等调节, 温度为 (25±1)℃, 湿度为 80%±3%, 辐照时将大鼠放置于不影响其活动、散热、换气的多孔有机玻璃辐照盒内。辐照源为 9.37 GHz 微波源, 暴露峰值功率密度为 90W/cm², 峰值功率用 Hp8991A 脉冲功率计测定。每组暴露时间为 20min。

1.3 GLP-1 给药方法及剂量

GLP-1 (购于北京中杉生物公司) 贮存液用生

第一作者: 张蕾, 女, 1980 年 7 月出生, 2005 年毕业于第三军医大学劳动卫生与环境卫生学专业, 硕士, 助教, 主要从事电磁辐射分子生物学研究

通讯联系人: 余争平

收稿日期: 初稿 2007-03-05, 修回 2007-04-13

理盐水稀释,终浓度为 20ng/mL,并加入二肽基肽酶 IV(Dipeptidyl peptidase IV, DPP-IV)抑制剂(Linco research),参照 Gulpinar 等^[6]的方法,动物于辐照前的 5min 腹腔注射给予 GLP-1,给药剂量为 1 μ g/kg。

1.4 神经行为学测定

水迷宫训练依照 Morris 等^[7]的方法进行。定位航行试验(Place navigation),用于测量大鼠对水迷宫学习和记忆的能力,观察并记录大鼠寻找并爬上平台的路线图及所需时间(潜伏期)。空间搜索试验(Spatial probe test),用于测量大鼠学会寻找平台后,对平台空间位置记忆的能力。即在第 4 天的训练后撤除平台,让动物自由游泳 60s,测其在 60s 内在原平台所在位置的区域百分比,并记录大鼠在 60s 内搜索平台的路线图。

1.5 血浆 GLP-1 水平检测

从对照组及暴露组大鼠股静脉取血,分离血浆进行 ELISA 检测血浆 GLP-1 浓度,即采用固定于微孔板上的单克隆抗体捕获样本中的活性 GLP-1,捕获的 GLP-1 与抗 GLP-1-碱性磷酸盐共轭物结合后,加入磷酸甲基伞酮(Methyl-umbelliferyl phosphate, MUP),其在碱性磷酸盐的存在下形成荧光物质 7-羟基香豆素,荧光以激发/吸收波长 355 nm/460nm 读取光密度值,对应于样本中的 GLP-1 的浓度。GLP-1(Active)酶联免疫吸附实验(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒购自晶美生物工程有限公司,按说明书操作。

1.6 海马 GLP-1R mRNA 表达

大鼠麻醉后快速分离双侧海马,提取总核糖核酸(Ribonucleic Acid, RNA)逆转录为 cDNA, GLP-1R(NM-012728)上游引物:5'-GTGATAGC-CAAGCTGAAGGC3',下游引物:5'-GTCCCTC-TGGATGTTCAAGC3',扩增产物为 300bp。 β -actin(NM-031144)上游引物:5'-CATTGTCACC-AACTGGGACG3',下游引物:5'-CATTGTCACC-AACTGGGACG3',扩增产物为 500bp。反应条件为(94 $^{\circ}$ C 30s—57 $^{\circ}$ C 30s—72 $^{\circ}$ C 60 s) $\times$ 38 cycles $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C 10 min $\rightarrow$ 4 $^{\circ}$ C 5 min。使用 1.5%琼脂凝胶电泳,以 Gel

DoC 2000 凝胶图像分析系统采集分析结果, GLP-1R 表达强度以单位面积光密度比值(GLP-1R/ β -actin)表示。

1.7 细胞凋亡检测

原位末端标记法(Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated Biotin-dUTP nick-end labeling, TUNEL)检测细胞凋亡^[8]。取对照组及暴露后 24h 组石蜡海马组织切片,脱蜡水化后以蛋白酶 K(20 μ g/mL 溶于 Tris/HCl 中, pH 7.4—8.0)室温孵育 30min,滴加 50 μ L 的 TUNEL 反应混合液,在湿盒中 37 $^{\circ}$ C 孵育 60min,加入 50 μ L 转化剂,在湿盒中 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min,加入 50 μ L 二胺基联苯胺(Diaminobenzidine, DAB)底物溶液,镜下观察出现阳性染色即终止 DAB 孵育。然后水洗 4 次,封片,镜下观察并照相。在显微镜下(40 $\times$ 10)随机计数海马脑区 10 个视野内阳性细胞数,求出每个视野的阳性细胞百分率作为该标本的细胞凋亡百分率,然后计算出每个标本的均数,进行统计分析。

1.8 统计学分析

实验数据采用 Microsoft excel 软件进行方差齐性检验和 t 检验,取 $p < 0.05$ 为相差显著,实验结果用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果

2.1 微波暴露对学习记忆功能的损害及 GLP-1 的防护作用

2.1.1 寻找平台潜伏期的差异 定位航行试验中,各组大鼠历时 3d 训练,每天训练 2 次,寻找水下平台所需潜伏期见表 1。从各组潜伏期变化可以看出对照组和 GLP-1 预处理组的潜伏期变化趋势大致一致,在第二次训练开始,潜伏期即明显缩短,后几次训练潜伏期均维持在显著低于第一次训练的水平, GLP-1 预处理组后几次训练潜伏期与对照组相比较没有显著差异;微波暴露组在训练第二次、第三次潜伏期也显著缩短,与对照组比较没有显著差异,但在第四次训练中,潜伏期较对照组有非常显著延长($p < 0.01$),在第五次、第六次训练中微波暴露组的潜伏期仍然显著高于对照组($p < 0.05$)。

Table 1 Effects of microwave exposure and GLP-1 pretreatment on the latency of place navigation in rats ($n=6, \bar{x} \pm s$)

Group	Block 1	Block 2	Block 3	Block 4	Block 5	Block 6
Ctr.	25.5±5.6	15.7±10.4	17.4±8.6	6.8±3.7	11.1±5.0	9.3±4.1
ME	27.4±7.3	15.8±9.6	16.6±8.5	20.3±9.2 ⁽²⁾	23.0±11.9 ⁽¹⁾	23.9±11.2 ⁽¹⁾
GLP-1+ME	23.8±8.8	13.4±9.2	18.6±11.0	14.1±8.2	9.1±2.9	21.6±14.4

Note: ⁽¹⁾ $p<0.05$, ⁽²⁾ $p<0.01$ vs. The same block of control

2.1.2 空间搜索试验 在空间搜索试验中, 60s 自由游泳的数据记录显示, 暴露组在中心区域(原平台所在处)的游泳时间明显少于其它两组($p<0.05$), 见表 2 和图 1。游泳的轨迹记录显示, 暴露组大鼠大多沿四壁绕圈游动, 四个象限侧重性不太强, 而其它两组大多集中在目标附近, 反复来回寻找目标, 见图 1。

上述结果提示, 微波暴露显著降低了大鼠学习记忆能力, 而外源性 GLP-1 预处理表现出明显的防

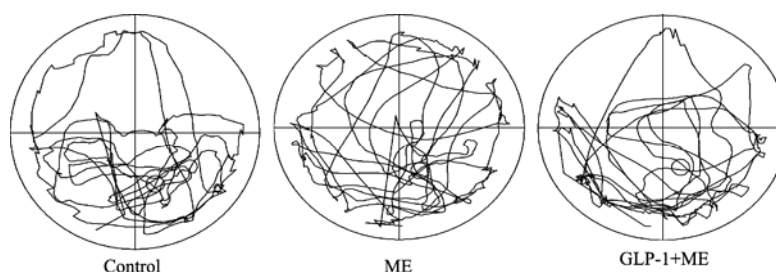
护作用。

Table 2 Effect of microwave exposure and GLP-1 pretreatment on percentage of central area in spatial probe test in rats

($n=6, \bar{x} \pm s$)

Group	Ctr.	ME	GLP-1+ME
Percentage of central area	41.0±6.6	27.7±7.9 ⁽¹⁾	33.5±3.4

Note: ⁽¹⁾ $p<0.05$ vs. Control

**Fig.1** Effects of microwave exposure and GLP-1 pretreatment on track in spatial probe test in rats

2.2 大鼠血浆 GLP-1 水平变化

与对照组比较, 血浆中 GLP-1 浓度在微波暴露后即刻开始下降, 于暴露后 0.5h 的下降值与对照组

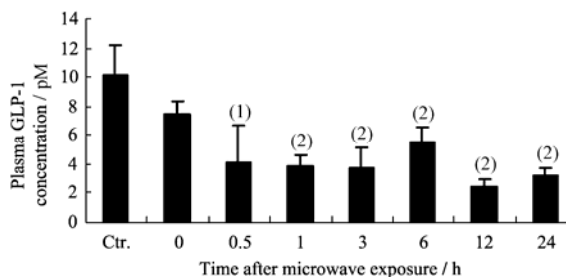
有显著差异, 在暴露后 12h 血浆中 GLP-1 降至最低水平, 24h 仍显著低于对照值 (见表 3 和图 2)。

Table 3 Effect of microwave exposure on plasma GLP-1 level

($n=6, \bar{x} \pm s$)

		Time after microwave exposure /h						
		0	0.5	1	3	6	12	24
GLP-1 concentration (pM)	10.17±2.02	7.50±0.87	4.17±2.47 ⁽¹⁾	3.83±0.76 ⁽²⁾	3.67±1.44 ⁽²⁾	5.50±1.00 ⁽²⁾	2.50±0.50 ⁽²⁾	3.17±0.58 ⁽²⁾

Note: ⁽¹⁾ $p<0.05$, ⁽²⁾ $p<0.01$, vs. Control

**Fig.2** Effect of microwave exposure on plasma GLP-1 level ($n=6$)

⁽¹⁾ $p<0.05$, ⁽²⁾ $p<0.01$ vs. control

2.3 微波暴露后大鼠海马脑区 GLP-1R 的 mRNA 表达变化

微波暴露后大鼠海马脑区 GLP-1R 的 mRNA 表

达在暴露后 0.5h 有明显下降,随后于 1h 回升至对照水平,但于暴露后 24h 再次下降,且显著低于对照水平(见表 4 和图 3)。

Table 4 Effects of microwave exposure on mRNA expression of GLP-1R

(Control/%, $n=3$, $\bar{x} \pm s$)

	Control	Time after microwave exposure /h						
		0	0.5	1	3	6	12	24
Percentage (Control/%)	100	120.2 $\pm$ 52.4	74.8 $\pm$ 15.0 ⁽¹⁾	91.2 $\pm$ 26.0	123.4 $\pm$ 58.1	150.9 $\pm$ 73.8	107.9 $\pm$ 37.5	86.6 $\pm$ 40.1 ⁽¹⁾

Note: ⁽¹⁾ $p<0.05$ vs. Control

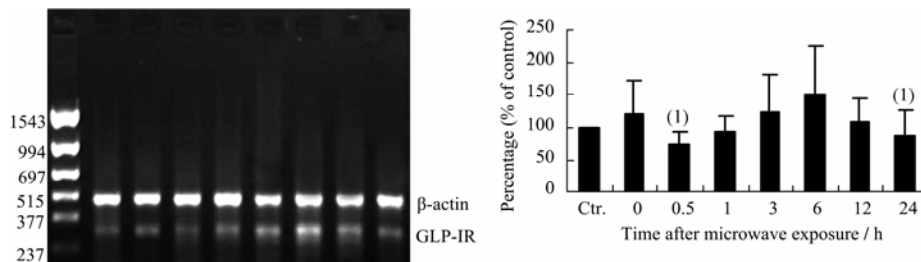


Fig.3 Effects of microwave exposure on GLP-1R mRNA expression of hippocampus in rats ($n=3$)
⁽¹⁾ $p<0.05$ vs. control

2.4 GLP-1 预处理对微波暴露致海马神经细胞凋亡的影响

原位细胞凋亡检测(TUNEL)结果(见图 4)显示,微波暴露后 24 h 海马细胞凋亡百分率较对照组明显升高, GLP-1 预处理组海马细胞凋亡百分率与对照组相比有上升,无统计学差异,但较之微波暴露组有显著下降。本实验结果显示微波暴露可诱导海马神经细胞发生凋亡,而 GLP-1 预处理可拮抗微波暴露引起的神经细胞凋亡。

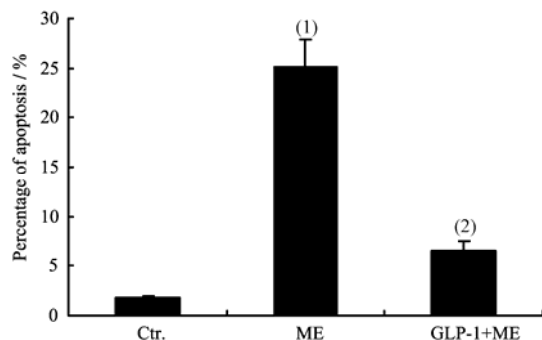


Fig.4 Effects of microwave exposure and GLP-1 pretreatment on apoptosis in hippocampus ($n=10$)
⁽¹⁾ $p<0.01$ vs. control, ⁽²⁾ $p<0.01$ vs. ME group

3 讨论

以往研究表明微波暴露对中枢神经系统和心、肝、肺、眼、睾丸等重要器官均有致伤效应,其中

尤以中枢神经系统最为显著,表现为微波暴露后学习记忆功能下降。GLP-1R 及其介导的信号通路在中枢特别是海马中参与学习记忆形成的过程,且 GLP-1 的神经保护效应研究日益受到关注^[9],而 GLP-1 及其受体变化是否参与了微波暴露所致学习记忆损伤尚未见研究报道。

During 等^[5]用被动回避实验观察到脑室内给予(i.c.v.)GLP-1 可缩短潜伏期,转染 GLP-1R 的大鼠表现出更强的学习记忆和认知能力,这是 GLP-1R 参与了大鼠空间学习记忆的形成和维持的直接实验依据。本研究中,首先在神经行为检测中发现微波暴露后大鼠寻找平台潜伏期显著延长,对平台位置形成记忆能力减弱;其次发现,血浆 GLP-1 水平在微波暴露后显著降低,相应地在海马组织中 GLP-1R mRNA 的表达下调;最后用外源性 GLP-1 进行预处理,大鼠空间学习记忆功能基本维持在对照水平,提示 GLP-1 参与了大鼠空间学习记忆的形成,而 GLP-1 及其受体的变化可能是微波暴露引起学习记忆功能损伤的重要机制之一。

已有研究表明 GLP-1 具神经保护作用^[9], GLP-1R 的受体激动剂正作为一种新型的神经退行性疾病的治疗药物被研究和开发^[10]。Kastin 等^[11]发现 GLP-1 可通过血脑屏障, Perry 等^[12]发现 GLP-1 具有神经营养特性。GLP-1 可降低内源性 β 淀粉样肽(Amyloid- β peptide, A β)的水平,保护由 A β 和铁离子诱导的神经细胞死亡^[13]。本实验通过原位细

胞凋亡检测,观察到微波暴露后 24 h 的大鼠脑组织切片海马脑区神经细胞凋亡率显著上升,表明微波暴露可通过诱导海马脑区神经细胞凋亡而影响海马的功能,从而引起学习记忆能力的损害。同时本实验观察到辐照前给予 GLP-1 可以减轻由微波引起的海马脑区神经细胞凋亡,证实了 GLP-1 具有神经保护作用。

本研究发现微波暴露可以降低血浆 GLP-1 水平,下调海马脑区 GLP-1R 的 mRNA 表达, GLP-1 预处理可以改善微波损伤后空间学习记忆功能,减少海马神经细胞的凋亡。这些结果证实了 GLP-1 具有神经保护作用,并拮抗微波暴露所致学习记忆功能损伤。此结果为深化认识电磁辐射神经系统生物效应机制和寻找电磁辐射暴露神经系统损伤防护靶点提供了新的实验依据。

参考文献

- 1 Zmyslon M. *Med Pr*, 2006, **57**(1): 29-39
- 2 Sienkiewicz Z, Jones N, Bottomley A. *Bioelectromagnetics*, 2005, Suppl 7: S116-126
- 3 Rotella C M, Pala L, Mannucci E. *J Endocrinol Invest*, 2005, **28**(8): 746-758
- 4 Alvarez E, Roncero I. *Brain J Neurochem*, 1996, **66**(3): 920-927
- 5 During M J, Cao L, Zuzga D S. *Nat Med*, 2003, **9**(9): 1173-1179
- 6 Gulpinar M A, Bozkurt A, Coskun T, *et al.* *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2000, **278**(6): G924-929
- 7 Morris R G M, Garrud P, Rawlins J N P, *et al.* *Nature*, 1982, **297**(5868): 681-683
- 8 Rizk N N, Rafols J A, Dunbar J C. *Brain Res*, 2006, **1096**(1): 204-212
- 9 Martin B, Lopez de Maturana R, Brenneman R, *et al.* *Neuromolecular Med*, 2005, **7**(1-2): 3-36
- 10 Greig N H, Mattson M P, Perry T, *et al.* *Ann N Y Acad Sci*, 2004, **1035**(1): 290-315
- 11 Kastin A J, Ackerstrom V, Pan W. *J Mol Neurosci*, 2002, **18**(1-2): 7-14
- 12 Perry T, Haughey N J, Mattson M P, *et al.* *J Pharmacol Exp Ther*, 2002, **302**(3): 881-888
- 13 Perry T, Debomoy K, Kumar Sambamurti, *et al.* *J Neurosci Res*, 2003, **72**(5): 603-612

Effects of microwave exposure on glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and its receptor and the relationship with learning and memory injury

ZHANG Lei ZHOU Zhou ZHANG Guangbin YU Zhengping

(Department of Occupational Health, Third Military Medical University, Chongqing 400038)

ABSTRACT In order to explore the effects of microwave exposure on GLP-1 and its receptor, the relationship between the changes of GLP-1 and its receptor and learning and memory injury induced by microwave exposure has been studied in this paper. Morris water maze was used to evaluate learning and memory ability of rats. The changes of the plasma GLP-1 level were measured by ELISA assay. Alteration of the GLP-1R mRNA expression in rat hippocampus was determined by RT-PCR and Apoptosis was detected by TUNEL. Our study showed that microwave exposure injured the learning and memory abilities of rats meanwhile plasma GLP-1 level was decreased and GLP-1R expression in hippocampus was down-regulated, which can be protected by pretreatment with GLP-1. Alterations in GLP-1 and GLP-1R are, at least partially, responsible for the microwave exposure induced learning and memory dysfunction and neuronal injury. These data provide some new clues to investigate the mechanisms of microwave exposure induced neuronal injury and develop clinical approaches for treatment of microwave exposure induced injury. It can provide some new ideals for investigation of related mechanism and development of clinical treatment under exposed microwave irradiation.

KEYWORDS Microwave exposure, GLP-1, GLP-1R, Hippocampus, Learning and memory

CLC Q64, R112.4, R594.8