

· 生物磁学 ·

电磁脉冲(EMP)辐照对雄性子代大鼠下丘脑 GABA_A 受体表达的影响 *杨明娟 刘海强 郭娟 张琰君 曾丽华 郭国祯[△]

(第四军医大学放射医学教研室 陕西 西安 710032)

摘要 目的 观察电磁脉冲(EMP)辐照亲代大鼠后其雄性子代下丘脑 GABA_A 受体表达的变化。方法 应用免疫组织化学及图像分析观察亲代大鼠接受 EMP 辐照后其雄性子代下丘脑 GABA_A 受体表达的变化。结果 与对照组相比,100 次脉冲组其雄性子代下丘脑室旁核 GABA_A 受体阳性神经元增加,400 次脉冲组光密度值显著增强;100 次和 400 次脉冲组弓状核 GABA_A 受体阳性神经元增加,光密度值增强。结论 电磁脉冲可以影响雄性子代下丘脑 GABA_A 受体的表达,这可能与电磁脉冲辐射产生的远期遗传毒性有关。

关键词 电磁脉冲;雄性大鼠;子代;GABA_A 受体

中图分类号:Q64,Q95-3,R146 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)07-1257-04

Effects of Electromagnetic Pulse on the Expression of GABA_A Receptor in Hypothalamus of Male Offsprings of Rats*YANG Ming-juan, LIU Hai-qiang, GUO Juan, ZHANG Yan-jun, ZENG Li-hua, GUO Guo-zhen[△]

(Department of Radiation medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the relationship between the expression of GABA_A receptor in hypothalamus of the offspring of male rats and electromagnetic pulse (EMP). **Methods:** Immunocytochemistry combined with computer imaging analysis was carried out to examine the expression of the GABA_A receptor in hypothalamus of male offspring. **Results:** Compared with the rats of control group, the expression of GABA_A receptor increased in male offspring of 100 pulses group, the value of IOD increased in 400 pulses group; The expression of GABA_A receptor in the arcuate nucleus increased. **Conclusions:** Electromagnetic pulse could induce the expression of GABA_A receptor in hypothalamus of male offspring, which may be related to the long-term genetic toxicity of EMP.

Key words: Electromagnetic pulse; Male rat; Offspring; GABA_A receptor

Chinese Library Classification(CLC): Q64, Q95-3, R146 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)07-1257-04

前言

随着现代科学技术的发展,电磁辐射已经成为一种新的环境污染而受到关注。电磁脉冲(electromagnetic pulse, EMP)是一种高能的电磁波,因在工业、农业、国防等领域应用日益广泛,EMP 的生物学效应已成为学术界研究的热点。世界范围的大量流行病学调查和动物试验表明:亲代电磁暴露可引起不孕不育、妊娠结局不良(流产早产、先天畸形、围产期死亡等)、胎儿宫内或子代婴幼儿期生长发育受限、儿童肿瘤、子代学习记忆能力下降以及行为障碍等不良后果^[1-5]。已有研究发现,电磁辐射遗传毒性将危及雄性子代远期生殖健康,但相关机制尚不明确^[6]。男性生殖功能的调节是通过循环反馈系统下丘脑-垂体-睾丸轴来实现的^[7]。γ-氨基丁酸(GABA)是神经系统中广泛存在的抑制性神经递质,可激活三种类型 GABA 受体,分别是 GABA_A、GABA_B 和 GABA_C 受体,其抑制作用主要通过 A 型受体介导^[8]。下丘脑是神经内分泌的调节中枢,GABA 是其发挥作

用的一种很重要的神经递质。研究表明,GABA 主要通过下丘脑 GABA_A 受体,在下丘脑水平、垂体水平参与 GnRH 的合成与释放,影响睾丸、卵巢等性腺机能,进而调节性腺类固醇激素的分泌和配子发生,最终实现动物生殖功能的维持和调控^[9]。本研究旨在观察 EMP 对受照亲代的雄性子代下丘脑中 GABA_A 受体表达的影响,以探讨其远位生物学效应机理。

1 材料与方法

1.1 材料

EMP 发生器:西北核技术研究所研制;TS-12G 型生物组织自动脱水机:湖北省医用电子仪器厂;ZMN-7803 型全自动组织包埋机:常州华利电子公司;RM-2135 型石蜡切片机:德国 Leica 公司;Olympus CH 型显微镜:BH-2 日本工业株式会社;GABA_A 抗体:abcam 公司;免疫组化染色试剂盒:中杉金桥公司。

1.2 亲代实验动物分组与辐照

SD 雄性大鼠 6 只和雌性 12 只(第四军医大学实验动物中

* 基金项目:国家自然科学基金(No:60971055; No: 60871068)和国际合作项目(No: 2010DFA31900)

作者简介:杨明娟(1985-),女,硕士研究生,主要研究方向:电磁辐射的生物学效应,E-mail:yufangmingjuan@126.com

[△]通讯作者:郭国祯,E-mail:guozhen@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2010-12-07 接受日期:2010-12-30)

心提供),体重分别为(250± 20)g 和(380± 20)g ,随机分为正常对照组、100 次脉冲和 400 次脉冲组,即分别接受 0 次、100 次和 400 次的电磁脉冲辐照。大鼠放置在有机玻璃盒内进行全身照射,取自身体位,场强 200 kv/m,连续照射 7 天,正常对照组于相同条件下放置,不予 EMP 辐照。辐照后将相同组别的雌雄亲代按 2:1 合笼,连续合笼 2 周生育子代。

1.3 子代实验动物及分组

子代根据其亲代分组方式相应分为正常对照子代组、100 次脉冲组和 400 次脉冲组。于子代大鼠 8w 龄时,从每组子代大鼠中随机选出雄性 5 只进行实验。

1.4 标本处理

动物经水合氯醛腹腔注射麻醉后,4%多聚甲醛进行心脏灌注固定,取出全脑用上述固定液后固定。脑组织用梯度酒精脱水、透明、石蜡包埋。制含室旁核(PVN)和弓状核(ARC)的间脑连续冠状切片(片厚 2 μ m)。

1.5 GABA_A 受体免疫组织化学反应

石蜡切片常规脱蜡至水后①3% H₂O₂ 孵育 10min, PBS 洗 3 次,每次 3 min;②正常山羊血清室温封闭 20 min,倾去,勿洗;③滴加 1:400 稀释的兔多克隆一抗,4℃过夜;④第二天早上取

出切片复温 30 min, PBS 洗 3 次;⑤滴加生物素化二抗工作液 37℃孵育 15 min, PBS 洗 3 次;⑥滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液 37℃孵育 15 min, PBS 洗 3 次;⑦显色剂显色,自来水充分冲洗;⑧切片经酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。对照试验:步骤③时用 PBS 缓冲液代替一抗,其余步骤相同

1.6 计算机图像处理

每只大鼠在含室旁核和弓状核前、中、后平面上各选取 3 张切片,对每组 GABA_A 受体反应阳性的细胞进行细胞计数和光密度分析,取每组 5 只的平均值。结果以均数± 标准差表示,用 SPSS 进行统计分析, P<0.05 表示差异有统计意义。

2 结果

2.1 下丘脑室旁核 GABA_A 受体免疫组化结果

在对照组和辐照组下丘脑室旁核均可以观察到 GABA_A 受体阳性神经元,阳性产物见于细胞膜和胞浆内。但与对照组相比,100 次脉冲组 GABA_A 受体阳性神经元数目显著增多,400 次脉冲组光密度值显著增高,其差异具有统计学意义(P<0.05,图 1 表 1)。

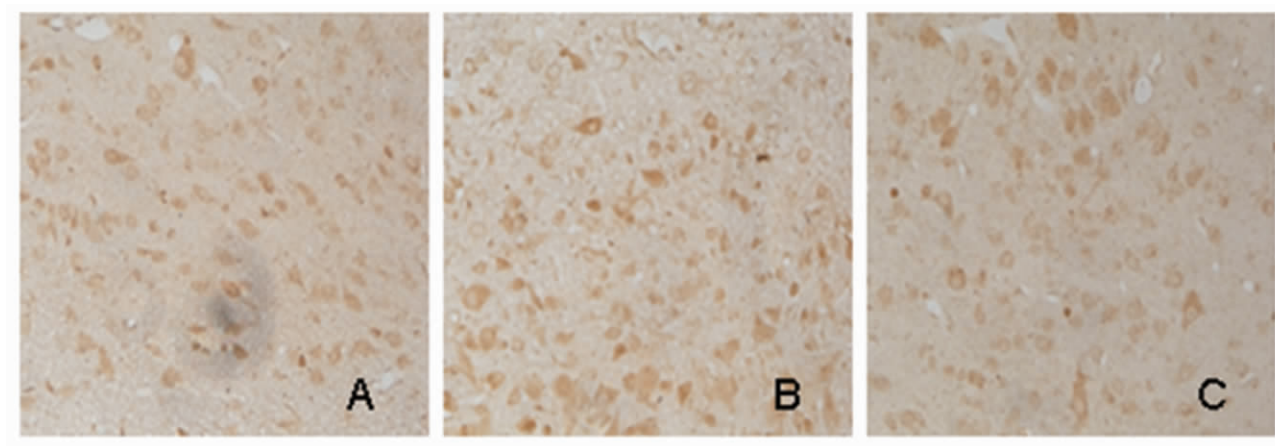


图 1 下丘脑室旁核 GABA_A 受体免疫组化染色(× 200)A 对照组; B 100 次脉冲组; C 400 次脉冲组

Fig.1 GABA_A receptor immunohistochemical staining of PVN × 200 A control; B 100 pulses; C 400 pulses

表 1 电磁脉冲(EMP)辐照对雄性子代大鼠下丘脑 GABA_A 受体表达的影响

Table 1 Effects of electromagnetic pulse on the expression of GABA_A receptor in hypothalamus of male offsprings of rats

Group	PVN		ARC	
	Number	IOD	Number	IOD
control	149.67± 1.53	18.43± 0.64	93.33± 10.69	13.12± 0.02
100 pulses	186± 15*	20.22± 1.62	177.67± 9.61*	29.48± 4.05*
400 pulses	191.67± 26.63	31.89± 4.98*	202.33± 28.36*	22.10± 2.48*

*P<0.05

2.2 下丘脑弓状核 GABA_A 受体免疫组化结果

与对照组相比,100 次脉冲组和 400 次脉冲组下丘脑弓状

核 GABA_A 受体阳性神经元数均增多(图 2),光密度值显著高于对照组(P<0.05,表 1)。

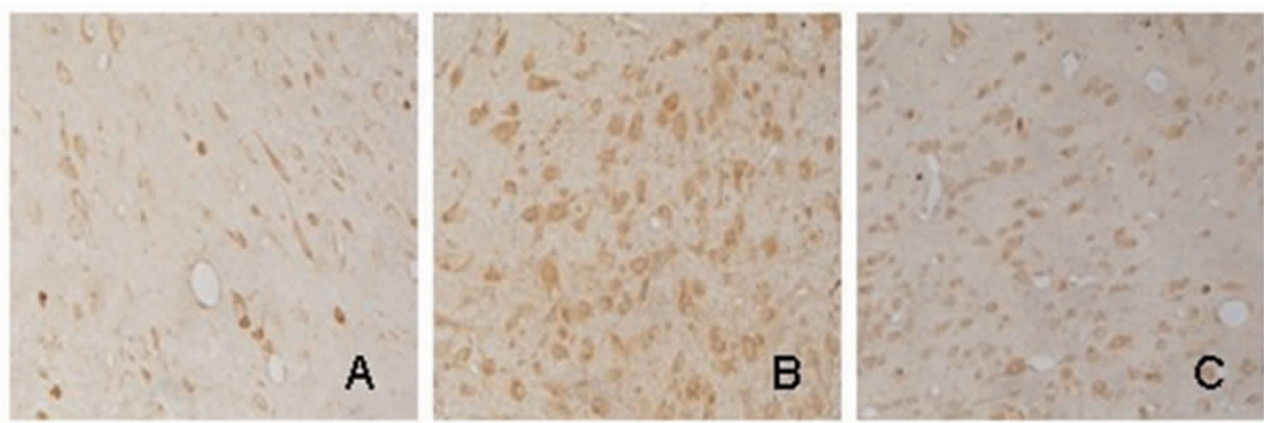


图2 下丘脑弓状核 GABA_A 受体免疫组化染色($\times 200$): A 对照组; B 100 次脉冲组; C 400 次脉冲组
Fig.2 GABA_A receptor immunohistochemical staining of ARC($\times 200$); A control; B 100 pulses; C 400 pulses

3 讨论

下丘脑 - 垂体 - 性腺(hypothalamic-pituitary gonadal, HPG)轴是动物生殖系统发育和功能维持的调控核心,经典生殖内分泌学理论认为:雄性生殖功能的调节是由下丘脑脉冲式分泌 GnRH 引起垂体分泌促性腺激素,在适当的时候启动青春期发育,并维持正常男性特征和生育活动^[10]。已证实上述过程中, GnRH/GnRH-R 是调节 HPG 轴的关键环节,而 GABA 及其受体则是调节这个关键环节的重要物质^[11-12]。

已有研究证实电磁辐射遗传毒性将危及雄性子代远期生殖健康。McGivern RF 等^[13]将孕 15 d 的大鼠暴露于 15 Hz 极低频电磁场中(15 min/次,2 次/d,连续 5 d),发现出生后 120 d 的子代成熟期雄性大鼠具有明显的去势倾向,表现为对雌性发情期释放的性信息素嗅迹行为减少,并伴有附睾、精囊、前列腺等多个副性器官的重量较正常同龄大鼠显著增加等改变,Cobb BL^[14]等用 55 kV/m、上升前沿 300 ps、脉宽 1.8 ns 的超宽带电磁波连续辐照孕 3~18 d 的大鼠,发现其子代雄性大鼠的交配频率显著减少,但交配后受精率及产仔数未见明显异常。但是有关电磁辐射对子代雄性生殖内分泌的远期遗传毒性机制研究尚未见报道。

正常生理状态下,GABA 能神经元通过 GABA_A 受体,调节下丘脑释放 GnRH 的脉冲频率发生改变,可首先在基因转录及转录后多个水平引起垂体促性腺激素分泌细胞的 GnRH-R 表达量及蛋白构型发生波动,继而 GnRH-R 活化并激活胞内 ERK、JNK、p38 MAPK 等多条信号转导通路^[9,15],调节 GnRH 及下游激素的分泌,促使垂体分泌相关激素,最终实现动物生殖内分泌功能的维持和调控。因此下丘脑 GABA_A 受体的正常表达对生殖内分泌功能的调控起着重要的作用。

GABA 的释放量受到机体生理状态、物理因素及化学药物等因素的影响,各种因素干扰 GABA 与 GABA 受体的结合量从而会影响其生理功能。Anne-Laure Mausset 等研究发现,高能量的射频辐射暴露可能会导致小鼠脑细胞内 GABA 含量的减少^[16]。王强等将原代培养大鼠大脑皮质神经元暴露于 900 MHz 的连续性微波电磁辐射(SAR=1.15~3.22 W/kg),进行每天 2 h、连续 6 d 暴露后暴露组神经元 GABA 受体蛋白的表达与假暴露组

相比具有明显差异,重复实验结果显示当微波暴露强度为 6 mW/cm²、SAR = 2.23 W/kg 时,神经元的 GABA 受体蛋白的表达与其他暴露组相比出现明显上调($P < 0.05$),显示微波对 GABA 抑制系统的激活作用具有能量蓄积效应^[17]。

GABA_A 受体属于配体门控离子通道受体,由 GABA 识别位点、安定识别位点和氯离子通道三部分组成。GABA 由神经细胞末端突触前膜释放,与突触后部存在的 GABA 受体结合,使位于细胞膜上的 CL⁻ 通道开放,CL⁻ 进入细胞内,导致细胞内电位增加而产生超极化,抑制神经兴奋性,调节神经系统的机能^[18]。弓状核(AN)和室旁核(PVN)是中枢神经系统内与生殖密切相关的核团^[19-20]。本研究结果表明,与对照组相比,亲代大鼠电磁脉冲暴露后,100 次脉冲组雄性子代下丘脑室旁核 GABA_A 受体阳性神经元增加,400 次脉冲组光密度值显著增强,而 100 次和 400 次脉冲组弓状核 GABA_A 受体阳性神经元增加,光密度值增强。上述结果提示电磁脉冲辐射可能影响雄性子代 GABA_A 受体在下丘脑的表达,从而对雄性子代产生远期遗传毒性。

参考文献(References)

- [1] Parivar K, Kouchesfehni MH, Boojar MM, et al. Organ culture studies on the development of mouse embryo limb buds under EMF influence [J]. Int J Radiat Biol, 2006, 82(7): 455-464
- [2] Ferreira AR, Knakiewicz T, Pasquali MA, et al. Ultra high frequency-electromagnetic field irradiation during pregnancy leads to an increase in erythrocytes micronuclei incidence in rat offspring [J]. Life Sci, 2006, 80(1): 43-50
- [3] Khaki AA, Tubbs RS, Shoja MM, et al. The effects of an electromagnetic field on the boundary tissue of the seminiferous tubules of the rat: A light and transmission electron microscope study [J]. Folia Morphol (Warsz), 2006, 65(3): 188-194
- [4] Cao YN, Zhang Y, Liu Y. Effects of exposure to extremely low frequency electromagnetic fields on reproduction of female mice and development of offsprings [J]. Chinese Journal of Industrial Hygiene and Occupational Diseases, 2006, 24(8): 468-470
- [5] Pearce MS, Hammal DM, Dorak MT, et al. Paternal occupational exposure to electro-magnetic fields as a risk factor for cancer in children and young adults: A case-control study from the North of England [J]. Pediatr Blood Cancer, 2007, 49(3): 280-286

- [6] Aris FP. Reproductive and developmental effects of EMF in vertebrate animal models[J]. Pathophysiology, 2009,16:179-189
- [7] 王笑笑,李斌,肖经纬.男性生殖内分泌系统调节的研究进展[J].毒理学杂志,2007,21(6):501-504
Wang Xiao-xiao, Li Bin, Xiao Jing-wei.. Research progress of the regulation of male reproductive endocrine system[J]. Journal of Toxicology, 2007,21(6):501-504
- [8] 周纪东,喻晓蔚. GABAA 受体的神经药理学研究进展[J]. 生命的化学,2002,22 (2):160-162
Zhou Ji-dong, Yu Xiao-wei. Neuropharmacology research progress of GABAA receptor[J]. Chemistry of Life, 2002, 22(2):160-162
- [9] Masha DB, Michal N, Adam JP, et al. Activation of Mitogen-activated protein kinase (MAPK) by GnRH is cell-context dependent [J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2006,252:184-190
- [10] Rispoli LA, Nett TM. Pituitary gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor: Structure, distribution and regulation of expression [J]. Animal Reproduction Science, 2005, 88:57-74
- [11] Tsai PS. Gonadotropin-releasing hormone in invertebrates:structure, function, and evolution [J]. Gen Comp Endocrinol, 2006, 148: 48-53
- [12] Magdalena C, Magdalena ?, Tadeusz M, et al. Effects of GABAA receptor modulation on the expression of GnRH gene and GnRH receptor (GnRH-R) gene in the hypothalamus and GnRH-R gene in the anterior pituitary gland of follicular-phase ewes [J]. Animal Reproduction Science, 2009,111:235-248
- [13] McGivern RF, Sokol RZ, Adey WR. Prenatal exposure to a low-frequency electromagnetic field demasculinizes adult scent marking behavior and increases accessory sex organ weights in rats[J]. Teratology, 1990, 41:1-8
- [14] Cobb BL, Jauchem JR, Mason PA, et al. Neural and behavioral teratological evaluation of rats exposed to ultra-wideband electromagnetic fields[J]. Bioelectromagnetic, 2000,21(7):524-537
- [15] Zvi Naor. Signaling by G-protein-coupled receptor (GPCR): Studies on the GnRH receptor[J].Frontiers in Neuroendocrinology,2009(30) : 10-29
- [16] Mausset AL, Rene? de S, Francoise M, et al. Effects of radiofrequency exposure on the GABAergic system in the rat cerebellum: clues from semi-quantitative immunohistochemistry [J]. Brain Research, 2001 (912):33-46
- [17] 王强,曹兆进,白雪涛.900MHz 微波电磁辐射对大鼠大脑皮质神经元神经递质受体 γ -氨基丁酸蛋白表达的影响 [J]. 卫生研究, 2005,34(5):546-548
Wang Qiang, Cao Zhao-Jin, Bai Xue-Tao. Effect of 900MHz electromagnetic fields on the expression of GABA receptor of cerebral cortical neurons in postnatal rats[J]. Journal of Hygiene Research, 2005,34 (5):546-548
- [18] 张辉,徐满英. γ -氨基丁酸作用的研究进展[J].哈尔滨医科大学学报,2006, 40(3):267-269
Zhang Hui, Xu Man-ying. Research progress of γ -Amino butyric acid role [J]. Journal of Harbin Medical University, 2006, 40 (3): 267-269
- [19] 王兰,宋天保,周劲松.不同生殖状态雌性大鼠下丘脑视上核和室旁核内一氧化氮合酶神经元的变化[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2001,10: 33- 36
Wang Lan, Song Tian-bao, Zhou Jin-song.Reproductive state-related changes of NOS neurons in hypothalamic supraoptic and paraventricular nuclei of female rats [J]. Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 2001,10(1):33-36
- [20] 贾悦.下丘脑弓状核在生殖轴系的作用和地位[J].国外医学计划生育分册,2002,21(3): 147-149
Jia Yue. Role and status of Hypothalamic arcuate nucleus in the reproductive shaft[J]. Foreign medical sciences, family planning volume, 2002,21(3): 147-149