

文章编号:1000-5404(2012)24-2459-06

论著

电磁辐射急性暴露对小鼠 IL-12 表达的影响及其机制

王 源,杨 举,张广斌,余争平 (400038 重庆,第三军医大学军事预防医学院劳动卫生学教研室,电磁辐射医学防护教育部重点实验室)

[摘要] 目的 观察电磁辐射对昆明种小鼠白细胞介素-12(IL-12)表达的影响并探讨其机制。方法 使用平均功率密度为 90 mW/cm² 900 MHz 电磁辐射对昆明种小鼠及原代培养的小鼠腹腔巨噬细胞(M ϕ)进行急性辐照。辐照后,ELISA 检测 IL-12 表达量、RT-PCR 检测 IL-12p40 亚基 mRNA 表达水平、Western blot 检测 M ϕ 细胞质 I κ B 水平以及 EMSA 检测 M ϕ NF- κ B 转录活性的变化,观察吡咯烷二硫代氨基甲酸盐(pyrrolidinedithiocarbamate, PDTC)对电磁辐射影响 IL-12 表达的干预作用。结果 急性辐照后第 5 天,小鼠脾脏组织 IL-12p40 mRNA 表达水平以及小鼠血清中 IL-12p70 含量达到峰值,增幅分别为 9.32%、259.76%,与正常组相比差异有显著性($P < 0.05$),辐照后第 11 天恢复至正常水平。辐照后 8 h,小鼠腹腔巨噬细胞(M ϕ)细胞质中 I κ B- α 含量降到最低,降幅为 27.97%;辐照后 12 h,小鼠腹腔巨噬细胞 IL-12p40 mRNA 表达水平及培养上清中 IL-12p70 含量达到峰值,与正常对照组相比有显著性差异($P < 0.01$)。急性辐照后,各时相点均出现明显的 NF- κ B-探针结合带,辐照后 8 h 最为显著,正常对照组则检测不出明显的结合带。PDTC 能够抑制电磁辐射急性暴露导致的 IL-12 高表达,抑制率为(83.43 \pm 7.58)%。结论 900 MHz 电磁辐射急性暴露通过增加 NF- κ B 活性,导致 IL-12 表达量增高。

[关键词] 电磁辐射;IL-12;NF- κ B; I κ B- α

[中图分类号] R146;R329.11;R392.3

[文献标志码] A

Electromagnetic radiation enhances IL-12 expression *in vivo* and *in vitro*

Wang Yuan, Yang Ju, Zhang Guangbin, Yu Zhengping (Department of Occupational Hygiene, Key Laboratory of Electromagnetic Radiation Protection of Ministry of Education, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To determine the expression of interleukin-12 (IL-12) in the cultured peritoneal macrophages (M ϕ) and in mice after electromagnetic radiation. **Methods** Kunming mice and primarily cultured M ϕ were radiated in 900 MHz electromagnetic field with an average power density of 90 mW/cm² for 20 and 10 min respectively. RT-PCR was used to detect the expression of IL-12p40 in the spleen and cultured M ϕ at mRNA level. ELISA was employed to measure the levels of IL-12p70 in the serum and the M ϕ supernatant. Western blotting and EMSA was used to test I κ B- α expression and transcriptional activity of NF- κ B respectively in the cultured M ϕ . The intervention effect of pyrrolidinedithiocarbamate (PDTC), a NF- κ B specific inhibitor, on the change of IL-12 expression after electromagnetic radiation was also observed. **Results** In 5 d after radiation, the expression level of IL-12p40 mRNA and the content of IL-12p70 in the serum reached a peak with a increase of 9.32% and 259.76% respectively, significantly higher than those in normal control ($P < 0.05$). The content of IL-12p70 and the expression of IL-12p40 mRNA in mice returned to normal level in 11 d after irradiation. The content of I κ B- α in cultured M ϕ was reduced to a minimum in 8 h after radiation with a drop of 27.97%, significant lower than that of normal group ($P < 0.01$). In 12 h after acute radiation, the expression of IL-12p40 mRNA in cultured M ϕ and the content of IL-12p70 in culture medium was increased reached a peak, significantly higher than those in the normal control group ($P < 0.01$). After acute radiation,

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30972432)

[通信作者] 余争平,电话:(023)68752290,E-mail: yuzhengping@yahoo.com.cn

the NF- κ B-probe binding activity was increased, and reached to the strongest in 8 h after radiation. PDTC resulted in a decrease in enhanced IL-12 expression induced by electromagnetic radiation, with an inhibitory rate of $(83.43 \pm 7.58)\%$. **Conclusion** Acute exposure to 900 MHz electromagnetic radiation increases the expression of IL-12 by up-regulating NF- κ B activity.

[**Key words**] electromagnetic radiation; IL-12; NF- κ B; I κ B- α

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (30972432). Corresponding author: Yu Zhengping, Tel: 86-23-68752290, E-mail: yuzping@yahoo.com.cn

随着移动通讯技术的迅猛发展,手机通讯已在人们日常生活中非常普及,手机频段(900 ~ 1 800 MHz)电磁辐射是否会对人体造成不良影响,已成为目前全社会关注的热点问题。在前期的研究中我们发现900 MHz电磁辐射急性暴露能够导致小鼠体内INF- γ 表达增加,并使Th1/Th2平衡向Th1方向偏移^[1],但其机制尚不明确。IL-12是调节Th1/Th2平衡的重要细胞因子之一,对Th1型免疫反应具有重要的促进作用^[2]。IL-12主要来源于巨噬细胞、树突状细胞等抗原提呈细胞,Th1细胞分泌的INF- γ 能够刺激巨噬细胞活化,使其分泌大量的IL-12,IL-12反过来又刺激Th1细胞增殖激活,分泌更多的INF- γ ,形成正反馈循环^[3-4]。为此我们选用昆明种小鼠及其腹腔巨噬细胞作为辐照模型,探讨900 MHz电磁辐射急性暴露对IL-12表达的影响,研究其机制,为进一步研究电磁辐射影响免疫平衡的机制,以及防治电磁辐射可能对机体造成的负面影响提供实验基础。

1 材料与方 法

1.1 试剂

IL-12p70 ELISA 检测试剂盒(博士德公司),IL-12 RT-PCR引物:5'-GTGAACCTCACCTGTGACACGC-3'(正义链),5'-TGA-ATACTTCTCATAGTCCCTTTGG-3'(反义链); β -actin RT-PCR引物:5'-GTGGGCCCTCTAGGCACCAA-3'(正义链),5'-CTCTTTGATGTCACGCACGATTTC-3'(反义链)(上海生工)。RNA提取试剂 Tripure(Roche公司),逆转录试剂盒(宝生物公司),Hot-start Taq酶(TaKaRa公司),兔抗小鼠I κ B- α 多克隆抗体、抗小鼠 β -actin单克隆抗体、荧光标记的山羊抗兔IgG抗体、荧光标记的山羊抗鼠IgG抗体(Santa Cruz公司)。3'端标记生物素的NF- κ B探针5'-TCAACTCCCTGAAAGGGTCCG-3'+生物素、未标记的NF- κ B探针(冷竞争):5'-TCAACTCCCCTGAAA-GGGTCCG-3'、未标记的突变探针(突变竞争):5'-TCAACTC-CGCTGAAAGGGTCCG-3'(上海生工)。EMSA试剂盒(Roche公司),PDTC(Sigma公司)

1.2 仪器

PCR仪(MJ PTC-100, USA),酶标仪(TECAN SUNRISE,

Austria), Du-640紫外分光光度计(Beckman USA),电泳仪(Bio-Rad, USA),超低温冰柜(SANYO, Japan),荧光扫描分析系统(Odyessy, USA),台式低温高速离心机(Heraeus, German),电子天平(Sartorius, USA),垂直电泳槽、蛋白转印槽(Bio-Rad, USA)。

1.3 实验动物及细胞

1.3.1 实验动物 4~6周龄雌性昆明种小鼠40只,购自第三军医大学实验动物中心,其中5只作为正常对照,其余按电磁辐射急性暴露后1、2、3、5、7、9、11 d,每个时相点5只小鼠。

1.3.2 小鼠腹腔巨噬细胞分离纯化及分组 脱臼法处死小鼠,75%酒精中浸泡消毒5 min,腹腔注射5 ml无血清1640培养基(注意不要伤及内脏)轻轻揉捏腹壁2~3 min,缓慢抽出腹腔中的灌洗液。无血清1640培养基1 000 r/min离心洗涤2次,重悬细胞,调整细胞浓度为 0.5×10^6 /ml。将上述细胞悬液按3 ml/瓶或1 ml/孔,加入细胞培养瓶或6孔板中培养2 h后,用37℃预温的无血清1640培养基吹洗瓶底细胞,吸除未贴壁的细胞,换上等量新鲜的含10%小牛血清的1640培养基,继续培养。贴壁细胞即小鼠腹腔巨噬细胞,继续培养24 h后可用于辐照实验。细胞分组:①电磁辐射急性暴露对腹腔巨噬细胞IL-12分泌的影响:细胞培养于6孔板中,急性辐照后1、8、12、24、48 h,收集相应时相点及对照组细胞培养上清,每个时相点4个样本;②电磁辐射急性暴露对腹腔巨噬细胞IL-12p40 mRNA表达的影响:细胞培养于细胞培养瓶中,急性辐照后1、8、12、24、48 h,收集相应时相点及对照组细胞提取RNA,每个时相点4个样本;③电磁辐射急性暴露对腹腔巨噬细胞胞浆I κ B含量的影响:细胞培养于细胞培养瓶中,急性辐照后8、12、48 h,收集相应时相点及对照组细胞,提取细胞总蛋白,每个时相点4个样本;④电磁辐射急性暴露对腹腔巨噬细胞NF- κ B含量的影响:细胞培养于细胞培养瓶中,分别设正常对照和LPS刺激(500 ng/ml)阳性对照以及辐照组。急性辐照后4、8、24 h,收集相应时相点及对照组细胞,提取细胞核蛋白,每个时相点4个样本;⑤PDTC对电磁辐射急性暴露影响腹腔巨噬细胞IL-12p40 mRNA表达的干预:细胞培养于细胞培养瓶中,分别设正常对照组(C)、正常对照加PDTC刺激组(C+P)、电磁辐照组(R)、PDTC刺激后进行电磁辐照组(R+P)、LPS刺激组(L)、PDTC加LPS刺激组(L+P)。每组4个样本,PDTC刺激组细胞,在辐照前及LPS刺激前进行100 μ mol/L PDTC预处理30 min。

1.4 辐照模型

将小鼠及培养细胞置于反射系数近似零的微波暗室,进行900 MHz 电磁辐射急性暴露,辐照环境温度及湿度由空调器及吸湿机等调节,温度(25 ± 1)℃,湿度(80 ± 3)%,辐照时将小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,细胞培养瓶(板)置于37℃恒温水浴盒内,辐照时间20 min(细胞为10 min)。正常对照组小鼠及细胞,在不开波源的情况下,放置于同样的辐照环境中相应的时间。

1.5 RT-PCR 检测 IL-12p40 mRNA 表达

按 Tripure 试剂盒方法,提取急性暴露后不同时相小鼠脾脏及培养细胞总 RNA,按照逆转录试剂盒方法,逆转录生成 cDNA。按照如下扩增条件:94℃变性2 min 后进入循环,94℃30 s,61℃30 s,72℃1 min,共35个循环,最后72℃5 min,4℃保持(IL-12p40);94℃变性2 min 后进入循环,94℃30 s,57℃30 s,72℃1 min,共30个循环,最后72℃5 min,4℃保持(β-actin)。1.5%琼脂糖凝胶电泳检测 IL-12p40 mRNA 表达量的变化。以 IL-12p40 PCR 产物扫描值与各自的 β-actin PCR 产物扫描值比值表示 IL-12p40 mRNA 表达水平。

1.6 ELISA 检测小鼠血清及细胞培养上清中 IL-12p70 含量

按照 ELISA 试剂盒说明书操作。

1.7 Western blot 检测 IκB-α 蛋白表达

参照余飞等^[5]的方法进行。转膜后硝酸纤维素膜(NC)先后孵育一抗和荧光二抗,用 Odyessy 荧光扫描分析系统扫描,IκB-α、β-actin 的相对分子质量分别为 37 × 10³、42 × 10³。记录蛋白条带对应颜色的荧光光密度值。结果以目的蛋白条带的光密度值与对应 β-actin 蛋白条带的光密度值的比值表示。

1.8 EMSA 检测 NF-κB DNA 结合活性

核蛋白样品在电泳前在 EP 管中按照 EMSA 试剂盒说明书进行加样混合,5%的聚丙烯酰胺凝胶电泳,380 mA 转膜,把膜正面向下,置于 Gel Dc2000 凝胶扫描系统的紫外灯上方进行紫外交联 15 min,37℃封闭液中封闭 20 min,“生物素-亲和素-辣根过氧化物酶结合液”中结合 15 min,37℃预温的 1 × 洗脱液洗膜 4 次,每次 5 min,37℃预温的底物平衡液浸泡膜 5 min,吸干膜上的液体,用化学发光底物反应液充分浸泡尼龙膜 5 min,吸干膜上的液体,保鲜膜包裹(防止气泡产生),暗室用胶片曝光显影。

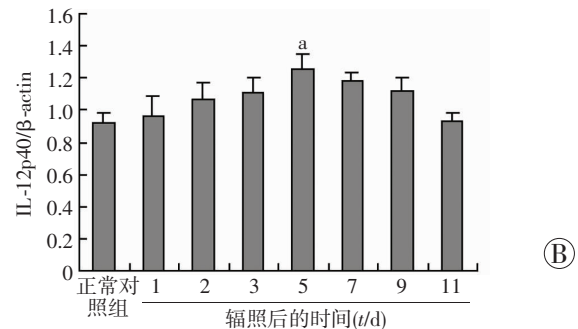
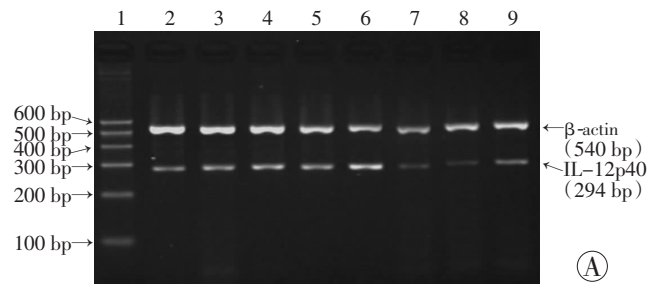
1.9 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行 *t* 检验。

2 结果

2.1 电磁辐射急性暴露对小鼠脾脏组织 IL-12p40 mRNA 表达水平的影响

IL-12p40 mRNA 的 RT-PCR 扩增产物电泳结果见图 1,辐照后 5 d 的增幅为 9.32%,与正常对照组相比有显著差异($P < 0.05$),辐照后第 11 天 IL-12p40 mRNA 表达水平恢复正常。



A: RT-PCR 检测 1: DNA 标准;2: 正常对照组;3~9: 分别为辐照后第 1、2、3、5、7、9、11 天;B: 半定量分析 a: $P < 0.05$, 与正常对照组比较

图 1 90 mW/cm² 电磁辐射急性辐照对小鼠脾脏组织 IL-12 mRNA 表达水平的影响

2.2 电磁辐射急性暴露对小鼠血清 IL-12 水平的影响

辐照后小鼠血清中 IL-12p70 含量从照后第 3 天开始显著增高,第 5 天达到峰值,辐照后第 3、5、7、9 天,小鼠血清中 IL-12p70 的含量与正常对照组相比有显著性差异($P < 0.05$, $P < 0.01$)。辐照后第 11 天小鼠血清中 IL-12p70 的含量回落到接近正常水平。见表 1。

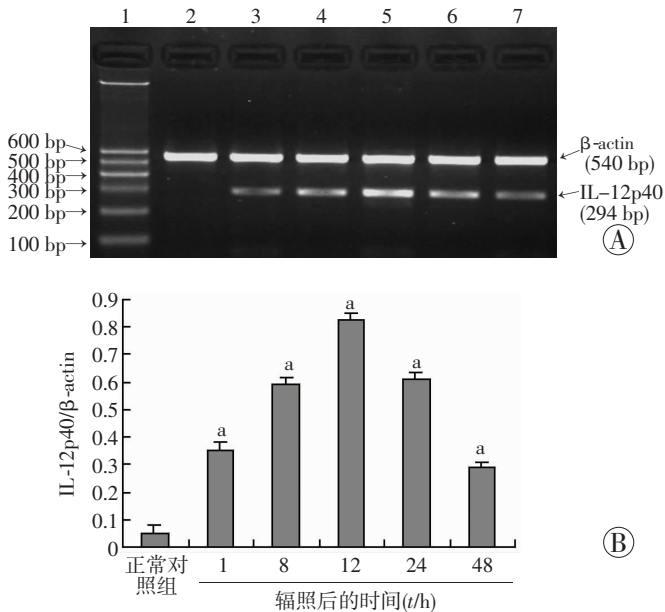
表 1 90 mW/cm² 电磁辐射急性辐照对小鼠血清 IL-12 水平的影响 (n=5, $\bar{x} \pm s$)

组别	IL-12p70 含量 (pg/ml)
正常对照组	78.29 ± 23.73
辐照后 1 d	102.46 ± 17.42
辐照后 2 d	112.53 ± 16.05
辐照后 3 d	200.12 ± 26.63 ^b
辐照后 5 d	281.68 ± 22.50 ^b
辐照后 7 d	206.17 ± 19.96 ^b
辐照后 9 d	133.67 ± 22.74 ^a
辐照后 11 d	76.78 ± 19.31

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与正常对照组比较

2.3 电磁辐射急性暴露对小鼠腹腔巨噬细胞 IL-12p40 mRNA 表达水平的影响

电磁辐射急性暴露后,小鼠腹腔巨噬细胞 IL-12p40 mRNA 表达水平的变化见图 2。辐照后各时相点小鼠腹腔巨噬细胞 IL-12p40 mRNA 表达水平升高,照后 12 h 达到峰值,与正常对照组相比有显著性差异($P < 0.01$)。



A: RT-PCR 检测 1: DNA 标准; 2: 正常对照组; 3~7: 分别为辐照后 1、8、12、24、48 h; B: 半定量分析 a: $P < 0.01$, 与正常对照组比较

图2 90 mW/cm² 电磁辐射急性辐照对小鼠腹腔巨噬细胞 IL-12 mRNA 表达水平的影响

2.4 电磁辐射急性暴露对小鼠腹腔巨噬细胞 IL-12p70 表达水平的影响

小鼠腹腔巨噬细胞培养上清中 IL-12p70 含量, 从电磁辐射急性辐照后 1 h 开始显著增高, 辐照 12 h 达到峰值, 辐照后, 各观测时相点细胞培养上清中 IL-12p70 含量与正常对照组相比均有显著性差异 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 90 mW/cm² 电磁辐射急性辐照对小鼠腹腔巨噬细胞培养上清 IL-12p70 含量的影响 ($n = 4, \bar{x} \pm s$)

组别	IL-12p70 含量 (pg/ml)
正常对照组	13.83 ± 3.62
辐照后 1 h	41.21 ± 3.85 ^a
辐照后 8 h	57.06 ± 4.70 ^a
辐照后 12 h	62.70 ± 3.25 ^a
辐照后 24 h	53.21 ± 3.25 ^a
辐照后 48 h	49.65 ± 2.61 ^a

a: $P < 0.01$, 与正常对照组比较

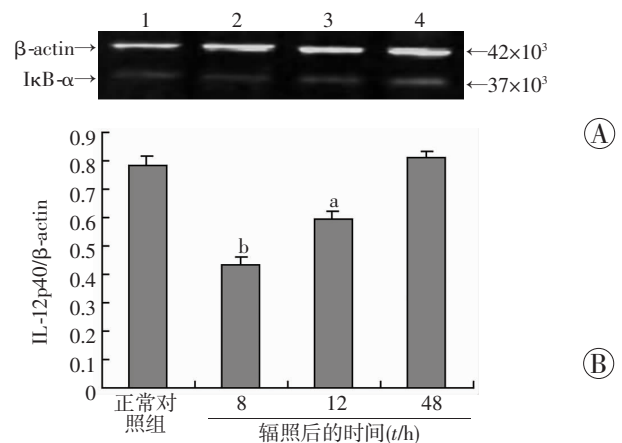
2.5 电磁辐射急性暴露对小鼠腹腔巨噬细胞胞浆 I κ B- α 含量的影响

急性辐照后, 小鼠腹腔巨噬细胞胞浆 I κ B- α 含量, 在辐照后 8 h 降至最低, 与正常对照组相比差异显著 ($P < 0.01$)。辐照后 48 h, 胞浆 I κ B- α 含量与正常对照组没有显著差异。见图 3。

2.6 电磁辐射急性暴露对小鼠腹腔巨噬细胞 NF- κ B 转录活性的影响

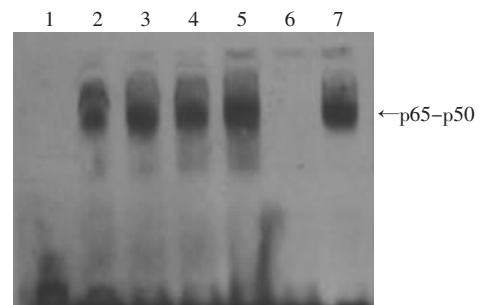
电磁辐射急性暴露后, EMSA 检测巨噬细胞 NF- κ B 转录活

性变化的结果见图 4。由于冷竞争组加入的 200 倍浓度的未标记探针, 完全竞争了生物素标记探针与核蛋白的结合, 因而未见显影条带。突变的冷竞争组, 由于加入的是未标记突变探针, 不能与生物素标记探针竞争结合核蛋白, 因而呈现明显的显影条带, 从而说明该核蛋白与标记探针的结合是特异性的。LPS 刺激阳性对照, 指示出 NF- κ B p65-p50 与标记探针结合显影条带的正确位置。辐照后各时相点均出现明显的核蛋白与标记探针结合的显影带, 在辐照后 8 h, 显影带光密度最为明显。4 批实验的变化趋势基本一致, 表明辐照后, 核内 NF- κ B DNA 结合活性与正常对照组比较, 有明显的增加, 并且在辐照后 8 h 达最高水平。提示电磁辐射急性暴露能够激活小鼠腹腔巨噬细胞中 NF- κ B, 促使其转位入核, 与目的基因结合。



A: Western blot 检测 1: 正常对照组; 2: 辐照后 8 h; 3: 辐照后 12 h; 4: 辐照后 48 h; B: 半定量分析 a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与正常对照组比较

图3 90mW/cm² 电磁辐射急性辐照对小鼠腹腔巨噬细胞胞浆蛋白 I κ B- α 含量的影响

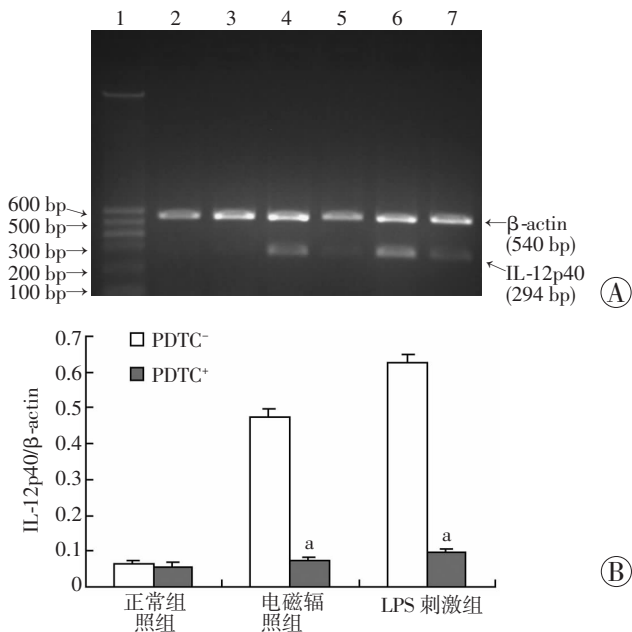


1: 正常对照组; 2~4: 辐照后 4、8、24 h; 5: LPS 刺激组; 6: 冷竞争; 7: 突变竞争

图4 90 mW/cm² 电磁辐射急性辐照对小鼠腹腔巨噬细胞 NF- κ B DNA 结合活性的影响

2.7 PDTC 对电磁辐射急性暴露影响巨噬细胞 IL-12 表达的干预

PDTC 可明显抑制电磁辐射急性暴露导致的 IL-12 表达增高 ($P < 0.01$)。见图 5。



A: RT-PCR 检测 1:标准;2:正常对照组;3:正常对照 + PDTC 刺激组;4:电磁辐照组;5:PDTC 刺激后进行电磁辐照组;6:LPS 刺激组;7:PDTC加 LPS 刺激组;B:半定量分析 a: $P < 0.01$, 与不加 PDTC 刺激组比较

图5 PDTC对90 mW/cm²电磁辐射急性辐照影响小鼠腹腔巨噬细胞 IL-12 mRNA 的干预

3 讨论

本研究模拟移动通讯频段(900 MHz)电磁辐射职业暴露(平均功率密度 90 mW/cm²),观察电磁辐射急性暴露对小鼠 IL-12 mRNA 表达水平及血清中的含量的变化以及对原代培养小鼠腹腔巨噬细胞 IL-12 表达水平的影响,并对其机制进行了初步探讨。

IL-12 在细胞因子网络调节中起着重要作用,它具有诱导 T 细胞向 Th1 类细胞分化、促进 T 细胞和 NK 细胞增殖、诱导 INF- γ 产生及增强 CTL 的分化等功能,能选择性抑制自身免疫性抗体分泌细胞 B1 细胞的增殖。在本实验研究中我们发现电磁辐射急性辐照后,IL-12 的表达在基因水平及蛋白水平均出现不同程度的增加,其中小鼠血清中 IL-12 的含量在照后第 5 天达到峰值,增幅为 259.76%,这种含量的增加一直持续到照后 11 d 才恢复至正常水平,以上结果显示 900 MHz 辐照造成 IL-12 表达量的增加与 900 MHz 辐照导致的 Th1/Th2 免疫平衡向 Th1 方向偏移具有一定的相关性。

IL-12 是由 p40、p35 两种亚基构成的异二聚体,常以 IL-12p70 表示。实验发现,由于 p35 亚基可由体内多种细胞产生,p35 基因敲除鼠与正常鼠相比,体内 IL-12 的量及功能无显著降低,Th1 反应未见明显减

弱;而 p40 亚基因敲除鼠,体内 IL-12 的量及功能显著降低,Th1 反应明显减弱^[6]。由此可见 IL-12p40 亚基是 IL-12 表达的调节亚基,因此本实验在基因水平的研究主要观察电磁辐射对 IL-12p40 亚基 mRNA 表达水平的影响,同时采用 ELISA 检测 IL-12p70 含量的变化。我们观察到小鼠脾脏组织 IL-12p40 mRNA 的表达在辐照后第 5 天有显著增高,而血清 IL-12 检查却在辐照后第 3 天开始显著增高,这种基因和蛋白水平变化不一致的原因可能是:除脾脏组织外,机体还有其他免疫器官或免疫细胞能够分泌 IL-12,可能是其他免疫器官或免疫细胞对电磁辐射暴露更为敏感,这有待我们在今后的研究中进一步关注。

巨噬细胞是体内重要的抗原提呈细胞之一,是 IL-12 的主要来源细胞之一,IL-12 的高表达是巨噬细胞活化的重要标志。为此我们采用原代培养的小鼠腹腔巨噬细胞作为辐照模型,探讨电磁辐射诱导 IL-12 高表达的机制。实验结果表明电磁辐射急性辐照会导致巨噬细胞 IL-12 的表达增多,辐照后 12 h 腹腔巨噬细胞培养上清中 IL-12p70 含量达到峰值,增幅为 453.33%,在照后 48 h 的增幅仍达到 384.70%,与正常对照组相比均有显著性差异($P < 0.01$);巨噬细胞一般在受到细菌、病毒或相关细胞因子的刺激时活化,本实验结果显示电磁辐射能够直接刺激巨噬细胞活化,分泌大量的 IL-12,这可能是电磁辐射导致 Th1/Th2 免疫平衡向 Th1 方向偏移的机制之一。

细胞实验显示在电磁辐射暴露后 12 h,IL-12 的表达达到峰值,与整体动物实验中 IL-12 出现峰值的时间(3 d)并不一致。笔者认为,这种体内、体外实验 IL-12 表达变化时间点不一致的原因可能是:①电磁辐射生物效应及其强度,取决于生物体吸收电磁辐射能量的多少,整体动物和体外培养细胞对电磁辐射能量吸收的不一致,导致了电磁辐射暴露后敏感靶因子变化时相点的不一致;②整体动物存在神经-内分泌-免疫网络调节系统,对于理化因素造成的不利影响,机体内部存在修复、拮抗的过程,这可能也是电磁辐射暴露后,整体动物和体外培养细胞的 IL-12 表达变化在时间点上不一致的原因。

IL-12 的表达受到转录因子 NF- κ B 的调控^[7-8],NF- κ B 是真核细胞转录因子 Rel 家族成员之一,是由多肽链 p50(NF- κ B1)和 p65(RelA)两亚基组成的二聚体,包括 p50 同源二聚体、p65 同源二聚体和 p65-p50 异源二聚体,其中发挥调控目的基因转录作用的主要是 p65-p50 异源二聚体。细胞未受到任何刺激时,细胞中的 NF- κ B 处于未活化状态,不具有调节基

因转录的能力。此时,细胞质中 NF- κ B 的 p65 亚基与 I κ B 蛋白结合,可覆盖 p50 亚基的核定位信号,使 NF- κ B 与 I κ B 形成三聚体复合物而被“囚禁”在细胞质中,不能发挥转录调节功能。当细胞受到细胞因子(如 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-2)、有丝分裂原、内毒素、病毒蛋白、过氧化物、蛋白激酶 C、钙离子载体、蛋白合成抑制剂、紫外线及 X 射线等细胞外信号刺激时,IKK 蛋白激酶被激活,致使 I κ B- α N 端调节区的 Ser32/36 磷酸化。随后该区内的 2 个赖氨酸残基与遍在蛋白结合,而发生遍在蛋白化。最后在蛋白酶小体的作用下 I κ B- α 发生裂解,获得“自由”的 NF- κ B 即迅速从细胞质移位到细胞核。入核的 NF- κ B 二聚体与目的基因上的 κ B 位点发生特异性结合,从而促进相关基因的转录^[9]。

Western blot 结果显示,急性辐照后 8 h,巨噬细胞 I κ B- α 含量降到最低,较正常对照组降低 27.97%,提示电磁辐射可能通过使 I κ B 降解,促使 NF- κ B 迅速从细胞质移位到细胞核,从而促进相关基因的转录。EMSA 实验结果显示电磁辐射急性暴露会导致 NF- κ B 核转位增加,辐照后 8 h 最为显著,这与 I κ B- α 含量变化的 Western blot 检测结果比较吻合。采用 NF- κ B 特异性抑制剂 PDTC 处理细胞,再进行 90 mW/cm² 电磁辐射急性辐照,实验结果显示 PDTC 能够抑制电磁辐射急性暴露导致的 IL-12 高表达,提示电磁辐射通过增强 NF- κ B 转录活性导致 IL-12 表达增高

目前有关电磁辐射影响 NF- κ B 转录活性的报道比较少。Natarajan 等^[10]发现超宽带电磁波[脉宽(0.79 \pm 0.01) ns,脉冲重复频率 250 pps]辐射人单核细胞(MM6)90 min,可导致细胞内 NF- κ B DNA 结合活性增高 3.5 倍,但认为这种 DNA 结合活性的增高是一种瞬时效应,对下游基因的表达影响较小。Natarajan 等^[11]还研究了射频辐射(8.2 GHz,2.2 ms 脉宽,脉冲重复频率 1 000 pps,平均功率密度 5 mW/cm²) 在 37 $^{\circ}$ C 恒温水浴对人 MM6 连续辐射 90 min(SAR = 22 ~ 29 W/kg),发现辐照后 4 h,细胞内 NF- κ B DNA 结合活性增高 3.6 倍。而 Logani 等^[12]发现毫米波(42.2 GHz)辐照能够抑制环磷酸胺导致的脾细胞 NF- κ B DNA 结合活性显著增高,使 NF- κ B DNA 结合活性增高幅度从 58.9 倍降为 0.51 倍。这种电磁辐射对 NF- κ B 转录活性影响结果的不一致性,可能与电磁波的频率、强度、辐照条件、细胞株的敏感性以及合并化学因素处理有关。

本实验研究初步阐明了电磁辐射通过增强巨噬细胞 NF- κ B 转录活性导致 IL-12 表达增高这一机制。但

是,参与免疫反应的早期和炎症反应各阶段的许多分子都受 NF- κ B 的调控,NF- κ B 并不适宜作为干预电磁辐射对机体免疫系统负面影响的靶分子,因此,进一步研究电磁辐射对 NF- κ B 上游信号分子的影响,寻找干预电磁辐射导致 Th 平衡偏移的特异性靶分子,将是我们今后研究工作的关注点。

参考文献:

- [1] 王源,许商成,张广斌,等. 电磁辐射急性暴露对 Th1/Th2 细胞因子平衡的影响[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(9): 883-886.
- [2] Nagai T, Yanagida T, Hirohata S. Anti-ribosomal P protein antibody induces Th1 responses by enhancing the production of IL-12 in activated monocytes[J]. *Mod Rheumatol*, 2011, 21(1): 57-62.
- [3] Jaime-Ramirez A C, Mundy-Bosse B L, Kondadasula S, et al. IL-12 enhances the antitumor actions of trastuzumab via NK cell IFN- γ production[J]. *J Immunol*, 2011, 186(6): 3401-3409.
- [4] Roberts-Thomson I C, Fon J, Uylaki W, et al. Cells, cytokines and inflammatory bowel disease: a clinical perspective[J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2011, 5(6): 703-716.
- [5] 余飞,张彦文,李丽,等. 电磁辐射对原代大鼠皮层神经元细胞周期素依赖性蛋白激酶 5 及其活化亚基的影响[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(22): 2374-2377.
- [6] Spensieri F, Fedele G, Fazio C, et al. Bordetella pertussis inhibition of interleukin-12 (IL-12) p70 in human monocyte-derived dendritic cells blocks IL-12 p35 through adenylate cyclase toxin-dependent cyclic AMP induction [J]. *Infect Immun*, 2006, 74(5): 2831-2838.
- [7] Alam K, Ghousunnissa S, Nair S, et al. Glutathione-redox balance regulates c-rel-driven IL-12 production in macrophages: possible implications in antituberculosis immunotherapy[J]. *J Immunol*, 2010, 184(6): 2918-2929.
- [8] Jana M, Dasgupta S, Pal U, et al. IL-12 p40 homodimer, the so-called biologically inactive molecule, induces nitric oxide synthase in microglia via IL-12R beta 1[J]. *Glia*, 2009, 57(14): 1553-1565.
- [9] Lepsch L B, Munhoz C D, Kawamoto E M, et al. Cocaine induces cell death and activates the transcription nuclear factor kappa-b in pc12 cells[J]. *Mol Brain*, 2009, 2(1): 3-8.
- [10] Natarajan M, Nayak B K, Galindo C, et al. Nuclear translocation and DNA-binding activity of NF- κ B (NF-kappaB) after exposure of human monocytes to pulsed ultra-wideband electromagnetic fields (1 kV/cm) fails to transactivate kappaB-dependent gene expression[J]. *Radiat Res*, 2006, 165(6): 645-654.
- [11] Natarajan M, Vijayalaxmi, Szilagyi M, et al. NF-kappaB DNA-binding activity after high peak power pulsed microwave (8.2 GHz) exposure of normal human monocytes[J]. *Bioelectromagnetics*, 2002, 23(4): 271-277.
- [12] Logani M K, Natarajan M, Makar V R, et al. Effect of millimeter waves on cyclophosphamide induced NF-kappaB[J]. *Electromagn Biol Med*, 2006, 25(1): 23-27.

(收稿:2012-07-06;修回:2012-08-18)

(编辑 吴培红)