

工频磁场影响细胞间隙连接通讯功能及其机制的研究*

姜 槐 胡根林

浙江大学医学院微波研究室, 杭州 310031

摘要 电磁场的生物学效应, 尤其与肿瘤发生的关系, 是目前关注的一个热点. 细胞间隙连接通讯(GJIC)有调控细胞生长、分化等功能, GJIC抑制则是促癌剂促癌过程中的一个重要环节. 研究证明, 工频磁场(脉冲或正弦)不仅能增强 12-氧-14-酰佛波 13 酯(TPA)对 GJIC 的抑制作用, 而且一定强度的磁场本身也能抑制 GJIC. 通过系列的机制研究表明工频磁场对 GJIC 的抑制作用主要发生在连接蛋白(Cx)的翻译后水平, 即通过由蛋白激酶 C 介导的信息转导途径, 使 Cx43 蛋白发生过磷酸化, 并使其从质膜向胞质转移.

关键词 工频磁场 细胞间隙连接 通讯 机制

近 20 年来进行的流行病学调查表明, 肿瘤发生的危险性增高可能与环境中的电磁场有关, 并且电磁场还可能具有其他的潜在的危害. 因此电磁辐射与人类健康的关系尤其是与肿瘤发生发展的关系日益为人们所关注, 并开展了相关动物实验及细胞水平等多方面的研究, 以进一步探讨电磁场的危害及其机制. 如电磁场对鸟氨酸脱羧酶(ODC)和抗黑变激素(melatonin)等肿瘤相关物质的研究^[1,2], 对细胞增殖、DNA 合成的研究, 也有对 *c-fos*, *c-myc* 等原癌基因、蛋白磷酸化相关激酶(如蛋白激酶 C)等的研究^[3]. 但总体来说各方面的研究尚未形成一个较完整的系统, 而且结果也尚存在分歧.

基于现有研究的不足, 我们以细胞间隙连接通讯(GJIC)为指标, 来探讨极低频(ELF)磁场可能的促癌或协同促癌作用及其分子机制. GJIC 作为正常细胞间传递细胞信息的一个重要途径, 在胚胎发育、细胞分化和生长调控等方面起着重要的作用. 已有大量的研究发现, 在肿瘤细胞 GJIC 缺失或很弱时, 许多促癌剂有抑制 GJIC 的作用; 而当肿瘤细胞转导了连接蛋白(Cx)基因后, 细胞恢复正常生长, 因而认为 Cx 基因是一类潜在的肿瘤抑制基因, GJIC 抑制可能是促癌剂促癌过程中的一个重要环

节, 并被看作是检测可疑促癌物的一个重要指标^[4,5]. 我们研究室较系统地对工频磁场对细胞 GJIC 的影响及其机制进行了研究, 并首次报道了工频磁场对细胞 GJIC 功能的直接抑制作用及其可能的分子机制. 本文介绍了我们在这方面的近期研究进展.

1 工频磁场与细胞间隙连接通讯

研究所用辐照系统是自行设计并可在培养箱内使细胞受均匀辐照的 50 Hz 交变磁场装置, 它由一对方型 Helmholtz 正方形线圈及其中间一个补偿线圈串接构成, 在线圈中心区域可产生 0 ~ 1 mT 可调磁场, 含细胞的平皿与线圈的中心同轴垂直于磁场^[6]. 根据染料传输分析原理, 我们用两种方法进行了细胞 GJIC 功能的测定. 一是微注射法, 即用玻璃微电极将荧光黄溶液注入细胞内, 以注射负电流后 5 min 时的荧光偶合细胞数(DCC)作为 GJIC 功能的指标. 另一种是荧光漂白后的恢复(FRAP)技术, 用激光共聚焦显微镜来检测, 以漂白后一定时间内荧光恢复的百分率作为 GJIC 的指标. 所用细胞株为中国仓鼠肺成纤维细胞(CHL)和小鼠成纤维细胞 NIH3T3. 微注射法结果显示工频磁场所致

2001-04-10 收稿, 2001-05-24 收修改稿

* 国家自然科学基金重点项目资助(批准号: 39630100)

E-mail: jiangh@cmm.zju.edu.cn

GJIC的抑制作用与磁场强度及辐照时间有关^[6], 50 Hz, 24 h, 0.8 mT的正弦磁场单独辐照能明显抑制CHL细胞的GJIC功能, 0.2或0.4 mT磁场辐照不抑制GJIC功能, 但可增强促癌剂TPA对GJIC的抑制作用(见表1); CHL细胞受0.8 mT磁场辐照不同时间(从5 min到24 h)的测试, 得出5 min辐照不显示对GJIC的作用, 1 h辐照可见有统计学意义的抑制, 24 h辐照则抑制作用最为明显^[7].

表1 ELF和/或TPA对细胞GJIC功能的作用

处理	DCC($\bar{x} \pm s$)	FRAP($\bar{x} \pm s$)
对照	9.84 ± 2.01(61)	41.04 ± 13.10(45)
0.2 mT	9.56 ± 2.20(25)	38.31 ± 7.23(93)
0.4 mT	9.24 ± 1.39(24)	25.50 ± 9.26(47) ^{c)}
0.8 mT	6.08 ± 1.59(24) ^{a)}	18.58 ± 7.73(60) ^{a), d)}
TPA	6.26 ± 1.39(53)	24.21 ± 8.74(59)
0.1 mT + TPA	—	23.79 ± 8.78(45)
0.2 mT + TPA	5.52 ± 1.53(25) ^{b)}	12.69 ± 6.34(68) ^{e)}

a) 与对照相比, $P < 0.05$; b) 与TPA处理组相比, $P < 0.05$; c) 与对照组相比, $P < 0.01$; d) 与0.4 mT组相比, $P < 0.01$; e) 与TPA组相比, $P < 0.01$; 括号内为测定的细胞数

表1的结果进一步证实了FRAP技术. 用激光共聚焦显微镜检测GJIC功能较微注射法更灵敏, 结果也更精确, 并便于分析统计, 且还能观察到荧光恢复的整个动态过程. 在辐照时间为24 h条件下, 进一步揭示了0.4 mT及以上强度的磁场对细胞GJIC功能的单独抑制作用和0.2 mT及以上强度与TPA的协同抑制GJIC作用.

我们也研究了脉冲磁场(PMF)对GJIC功能的抑制作用. CHL细胞受脉冲磁场(重复频率50 Hz, 脉宽2 ms)辐照24 h, 用微注射法测定GJIC的条件下, 在0.4 mT或0.8 mT都导致GJIC的抑制, 与正弦磁场作用相比, 在同样的磁通密度下, PMF对GJIC的抑制作用比正弦磁场的作用更强^[8], 其原因可能与PMF的瞬时能量较高有关.

由于细胞在受磁场辐照时, 所处位置不同, 其感应电场也不同, 因此就有必要分析GJIC功能的下降是磁场的直接作用还是由培养皿内的感应电场所致. 我们对位于平皿中心部位和边缘部位即距中心约3 cm处的细胞分别进行磁场在0.8 mT, 24 h辐照后的GJIC测试. 近中心部位感应电场接近于零; 距3 cm处约3.76 mV/m. 结果显示在相同磁通密度不同感应电场强度条件下GJIC的抑制程度没有统计学差异^[7], 即提示工频磁场对GJIC的抑制作用主要是磁场本身的直接作用, 而非非感应电

场所致.

从以上实验我们得出结论: 工频磁场(正弦或脉冲)不仅能增强TPA对GJIC的抑制作用, 而且磁场本身也能抑制GJIC, 并与其辐照的强度和时间的有关. 该研究结果有助于工频磁场卫生标准的制定. 目前我国尚无工频磁场的卫生标准. 在国际非电离辐射防护委员会(ICNIRP)制定的参考标准中, 职业暴露的限值为0.5 mT, 一般居民的限值为0.1 mT^[9]. 由于磁场本身不被人体或动物所干扰, 培养细胞和动物、人体组织有相同的吸收磁辐射能力, 而我们研究的这些作用阈值低于ICNIRP所制定的职业暴露参考标准, 因此本研究所得到的数据可以作为电磁辐射卫生标准修订时的依据.

2 工频磁场抑制GJIC功能的机制研究

对于工频磁场抑制细胞GJIC功能的机理, 我们直接从组成细胞间隙连接的结构、功能蛋白——Cx43入手, 分析了其在转录、翻译及翻译后水平(包括Cx43蛋白磷酸化水平及其在细胞的分布)等方面的变化. 机制研究的辐照条件固定于0.8 mT, 24 h. 对细胞Cx43基因转录用Northern blot方法以³²P标记的Cx43探针进行测定, 以样本Cx43基因条带的特异吸光度值与相对应的磷酸甘油醛脱氢酶基因条带(内参照)的吸光度值之比来表示Cx43基因的转录水平, 统计结果显示工频磁场不影响Cx43基因的转录, 与TPA也无协同影响作用^[10].

Cx43蛋白水平及其磷酸化由Western blot方法测定. NIH3T3细胞受工频磁场和/或TPA(3 ng/mL, 2 h)处理后, Cx43蛋白总水平未见有明显的变化; 但可导致非磷酸化的连接蛋白Cx43(P₀)的减少, 同时出现Cx43的过磷酸化(P₃). Cx43蛋白在正常情况下以非磷酸化的P₀和部分磷酸化的P₁, P₂状态存在, P₃的出现可能是由于P₀, P₁或P₂发生过磷酸化的结果. 过磷酸化可导致Cx43蛋白在膜上的构象发生改变, 使细胞间隙连接通道关闭, 或影响细胞间连接子的偶合, 从而导致细胞GJIC功能下降. 因此Cx43的过磷酸化是工频磁场抑制GJIC功能的一个重要机制.

细胞间隙连接的结构和功能蛋白Cx主要位于细胞质膜上, 相邻细胞质膜上间隙连接结构的数目、偶合状况与细胞GJIC的功能密切相关. 对CHL的细胞免疫分析后进行激光共聚焦显微镜观察, 发现磁场和/或TPA处理后, 质膜上Cx43免

疫标记斑点减少,同时更多的斑点出现在核周围的胞浆中;同时用 Western blot 的方法发现细胞处理后 Cx43 蛋白在细胞浆中的含量增加,进一步证实了以上现象.两种实验方法协同证实了 Cx43 蛋白内移的存在,内移(主要至胞浆)是工频磁场抑制 GJIC 功能的另一个主要机制.

在实验中,我们以 TPA 为阳性对照.TPA 为一典型促癌剂,也是蛋白激酶 C(PKC)的激活剂.比较工频磁场和 TPA 对 GJIC 的作用,发现它们有许多类似之处:(1)一定强度的工频磁场和 TPA 均能明显抑制细胞 GJIC 功能,工频磁场辐照强度、TPA 处理浓度与 GJIC 抑制呈正相关.对 NIH3T3 或 CHL 细胞,50 Hz,0.8 mT,24 h 的磁场辐照对 GJIC 的抑制作用相当于 3~5 ng/mL TPA 的作用;(2)PKC 抑制剂能拮抗工频磁场或 TPA 所诱导的 GJIC 抑制;(3)工频磁场或 TPA 处理对 Cx43 基因转录均没有显著的影响;(4)工频磁场或 TPA 均能诱导 Cx43 过磷酸化的发生;(5)工频磁场或 TPA 均能促进 Cx43 蛋白的内移;(6)工频磁场辐照与 TPA 有明显的协同抑制 GJIC 的作用.因此我们认为工频磁场与 TPA 可能有类似的致 GJIC 抑制机制.但经比较发现两者之间尚存在差异之处,即在处理时间与细胞 GJIC 功能上表现出各自的特点,工频磁场辐照时间与 GJIC 抑制呈正相关,不存在抑制恢复现象;而 TPA 则不同,一般在 TPA 处理 1~2 h 时细胞 GJIC 抑制达到高峰,随后细胞的 GJIC 功能会逐步地恢复直至大部分恢复.在磷酸化状态上,则表现为工频磁场辐照后 Cx43 过磷酸化的持续和 TPA 处理后正常磷酸化状态的逐步恢复.这两者所致 GJIC 抑制的差异,可能与存在的不同的 PKC 致 Cx43 磷酸化途径有关.

3 GJIC 抑制与信息转导

工频磁场作为一种较弱的信息或能量,细胞膜可能是其作用的主要靶体,通过影响膜上某些蛋白分子的结构或功能,从而启动细胞内某些信息转导途径,最终影响到细胞 GJIC 功能.PKC 是信息转导中最常见的一个调节蛋白磷酸化的激酶.Phillips 等^[3]曾报道工频磁场能激活 PKC 及诱导 PKC 基因转录活性的增强.工频磁场抑制 GJIC 是否与 PKC 有关?我们研究发现两种 PKC 抑制剂(10 mmol/L 斯特罗斯孢啉或 10 μ mol/L 十六酰基肉毒碱)均能有效拮抗 ELF 磁场对 GJIC 的抑制作用^[11];这一结果

表明 PKC 参与了 GJIC 的抑制过程,有可能是 PKC 介导了 Cx43 蛋白的过磷酸化而导致 GJIC 的抑制.此外,我们用 mRNA 差异显示技术对受工频磁场辐照与假辐照的 Daudi 细胞内的 mRNA 进行了检测,结果发现有多个与工频磁场相关的特异反应基因,其中的两个片段(MF-CA 和 MF-CB)均为参与信息转导途径的重要因子^[12,13].

作为信息转导因子的癌基因产物在细胞 GJIC 的抑制中同样起着重要作用,细胞转导癌基因后可导致 GJIC 功能的抑制.已在 MCF-7 细胞发现 Cx43 启动子区域存在 Fos 和 Jun 的结合位点,发现 60 Hz,1 G 磁场辐照能改变 *c-fos* 或 *c-jun* 的转录活性.我们实验室同样发现 0.8 mT 及 0.4 mT 的磁场对 TPA 所诱导的 *c-fos* 基因转录活性具有协同促进效应^[14].

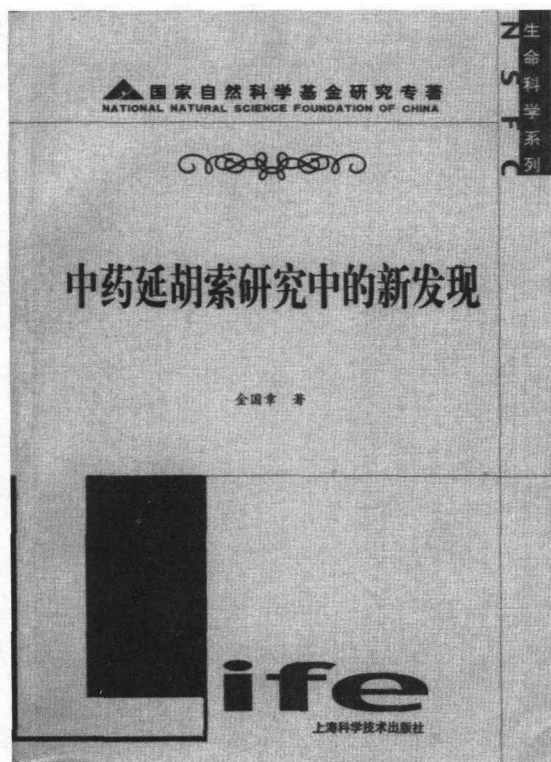
4 展望

电磁场作为新的“人类可疑促癌物”^[15],其生物学效应的研究受到了应有的重视.电磁场通过信息转导途径而影响细胞的生物学功能,从而在促癌过程中起到某些作用,相信这是一个“事实”.信息转导是一个复杂的网状系统,电磁场对该系统作用的研究,尤其是癌基因产物介导的转导途径,是不充分的,许多中间环节有待阐明,其他未知的途径也可能存在作用,这方面应该是今后研究的一个方向.但物理因素(如工频磁场)与化学因素(如 TPA)是否真的存在类似的信息转导途径?要回答这个问题尚需要做很大的努力.化学因素本身作为一个已知的分子,在与细胞膜上的分子作用时存在一定的分子基础,因而“受体”概念目前基本上限于对化学因子而言;物理因子的“受体”知之甚少.在 DNA 中,各类基因同样存在化学因子的调控区域,是否也存在物理因子的调控区域?Lin 等^[16]发现在人 HSP70 启动子区域存在由 *c-myc* 蛋白介导的磁场作用位点.虽然这样的单一结果不能概括什么,但仍可以给我们一些启示,物理因子作为一种信息或能量,在细胞的一些部位存在其作用位点,从而影响到细胞的某些正常生理功能.相信随着这方面工作的逐步开展,生物系统与物理因子相互作用的概念必将得以阐明,并在生命科学领域产生重要影响.

参 考 文 献

- 1 Byus C V, et al. Increased ornithine decarboxylase activity in cul-

- tured cells exposed to low energy modulated microwave fields and phorbol ester promoters. *Cancer Res*, 1998, 48: 4222
- 2 Harland J D, et al. Environmental magnetic fields inhibit the antiproliferative action of tamoxifen and melatonin in a human breast cancer cell line. *Bioelectromagnetics*, 1997, 18: 555
 - 3 Phillips J L, et al. Magnetic field-induced changes in specific gene transcription. *Biochem Biophys Acta*, 1992, 1132: 140
 - 4 Cesen-Cummings K, et al. Frequent reduction of gap junctional intercellular communication and Cx43 expression in human and mouse lung carcinoma cells. *Carcinogenesis*, 1998, 19: 61
 - 5 Yamasaki H, et al. Connexins in tumor suppression and cancer therapy. *Novartis Found Symp*, 1999, 219: 241
 - 6 Li C M, et al. Effects of 50 Hz magnetic fields on gap junctional intercellular communication. *Bioelectromagnetics*, 1999, 20: 290
 - 7 Li C M, et al. Exposure to 50-Hz electromagnetic fields: effects of time and field strength on gap junctional intercellular communications. *Electro-Magnetobiol*, 1999, 18: 249
 - 8 李昌敏, 等. 脉冲磁场对细胞缝隙连接通讯功能影响的研究. *中国生物医学工程学报*, 2001, 20: 148
 - 9 ICNIRP. Guidelines for limiting exposure to time-varying electric, magnetic, and electromagnetic fields (up to 300 GHz). *Health Physics*, 1998, 74(4): 494
 - 10 Hu G L, et al. Absence of ELF magnetic field effects on transcription of the connexin43 gene. *Electro-Magnetobiol*, 2000, 19(3): 345
 - 11 Chiang H, et al. The mechanism of suppression of gap junctional intercellular communication by 50-Hz magnetic fields. *Electro-Magnetobiol*, 1999, 18: 243
 - 12 Wu R Y, et al. The effect of 50 Hz magnetic field on GCS mRNA expression in lymphoma B cell by differential display. *J Cell Biochem*, 2000, 79(3): 460
 - 13 Wu R Y, et al. Cloning and identification of magnetic field-responsive genes in Daudi cells. *Chinese Science Bulletin*, 2000, 45 (11): 1006
 - 14 吴瑞英, 等. 50 Hz 磁场增强佛波酯对细胞 *c-fos* 基因转录的诱导作用. *中华劳动卫生职业病杂志*, 1999, 17: 327
 - 15 姜 槐. 工频磁场与癌症发生的关系以及对健康影响的研究. *中华劳动卫生职业病杂志*, 1999, 17: 322
 - 16 Lin H, et al. A magnetic field-responsive domain in the human HSP70 promoter. *J Cell Biochem*, 1999, 75: 170



国家自然科学基金研究成果专著

《中药延胡索研究中的新发现》金国章 著
上海科学技术出版社 定价：51.00 元

本书作者金国章院士浙江永康人，1952年毕业于浙江大学理学院药学系，现为中国科学院上海药物研究所研究员，长期从事神经药理学研究工作。运用现代科学方法系统整理中药延胡索的药理作用，确定 *l*-THP 为主要有效成分，具有镇痛和安定作用，使其成为正式药品，载入国家药典，列入药理学教材内容。

本书是一本系统阐述四氢原小檗碱同类物 (THPBs) 对脑内多巴胺 (DA) 受体作用关系的专著，涉及神经科学的多方面内容。首先阐述了中药延胡索的中医药学与药物化学研究，介绍了左旋四氢帕马丁的镇痛、镇静、安定等药理作用及其作用机制和临床应用。开拓了 THPBs 作用于 DA 神经系统的研究领域，发现左旋千金藤啶碱对 DA 受体有 D₁ 激动-D₂ 阻滞的双重作用。这是新型的药理作用，系统阐述其机制和治疗精神病的前景。本书对 THPBs 药理作用作了许多深广的探索。

本书适合大专院校、研究院所有关神经科学、药学的研究生、教师、研究人员，以及临床医生和制药企业研究人员阅读和参考。

(供稿：武长白)