



低频电磁场对酿酒酵母蛋白质表达及酶活性的影响

任浩锋¹ 蔡杏华² 林日辉^{*1} 蒋满州³ 杨慧¹ 唐乾玉¹

1 广西民族大学化学化工学院 广西 南宁 530006

2 广西民族大学海洋与生物技术学院 广西 南宁 530006

3 广西壮都生物科技有限公司 广西 南宁 530007

摘要:【背景】低频电磁场(Low frequency electromagnetic field, LF-EMF)可导致一系列健康效应的事实已被普遍接受。【目的】进一步探究 LF-EMF 辐射对细胞蛋白质表达及相关酶活性的影响。【方法】以酿酒酵母为研究对象,采用 50 Hz LF-EMF 对其进行持续暴露辐射,随后对其胞内蛋白质表达、相关酶活性进行分析。【结果】LF-EMF 辐射对酿酒酵母超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)和苹果酸脱氢酶(Malate dehydrogenase, MDH)活性的影响存在先促进后抑制的趋势。辐射处理使 SOD 活性在 72 h 提高了 43.18%, CAT 活性在 16 h 提高了 12.22%, MDH 活性在 20 h 提高了 12.90% ($P<0.05$); 而 LF-EMF 辐射作用对乙醇脱氢酶(Alcohol dehydrogenase, ADH)和乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase, LDH)的活性并未观察到显著的影响 ($P>0.05$)。此外,蛋白质电泳和蛋白质组学分析的结果表明,LF-EMF 可改变酿酒酵母部分胞内蛋白质的表达水平,其中 3 种蛋白质的表达发生显著上调,9 种蛋白质的表达发生显著下调($P<0.05$)。【结论】LF-EMF 辐射可影响酿酒酵母的部分酶活性,改变其胞内部分蛋白质的表达水平。

关键词: 低频电磁场, 酿酒酵母, 蛋白质表达, 酶活性

Effects of low frequency electromagnetic field on protein synthesis and enzyme activity of *Saccharomyces cerevisiae*

REN Hao-Feng¹ CAI Xing-Hua² LIN Ri-Hui^{*1} JIANG Man-Zhou³
YANG Hui¹ TANG Qian-Yu¹

1 School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi University for Nationalities, Nanning, Guangxi 530006, China

2 School of Marine Sciences and Biotechnology, Guangxi University for Nationalities, Nanning, Guangxi 530006, China

3 Guangxi Zhuangdu Biological Technology Co. Ltd., Nanning, Guangxi 530007, China

Abstract: [Background] It is now well accepted that low frequency electromagnetic field (LF-EMF) would produce a variety of health effects. [Objective] The objective of this work is to further investigate the effects of LF-EMF radiation on cells' protein expression and enzymes activities. [Methods] *Saccharomyces cerevisiae* was used as the research object and was continuously exposed to 50 Hz low

Foundation items: Guangxi University Talent Small Highland Construction Innovation Team Project (GJ[2011]47); National College Students' Innovation and Entrepreneurship Training Project (201710608015)

*Corresponding author: E-mail: rihuilin@aliyun.com

Received: 09-07-2018; Accepted: 06-12-2018; Published online: 24-12-2018

基金项目: 广西高校人才小高地建设创新团队项目(桂教[2011]47); 国家级大学生创新创业训练计划(201710608015)

*通信作者: E-mail: rihuilin@aliyun.com

收稿日期: 2018-07-09; 接受日期: 2018-12-06; 网络首发日期: 2018-12-24

frequency electromagnetic field in this work, then the expression of its intracellular proteins and relevant enzyme activities were analyzed. **[Results]** The effect of LF-EMF treatment on the activities of SOD (superoxide dismutase), CAT (catalase) and MDH (malate dehydrogenase) in *S. cerevisiae* appeared a trend of firstly promoted and then inhibited. LF-EMF treatment can increase 43.18% of the activity of SOD at 72 h, 12.22% of the CAT at 16 h, and 12.90% of the MDH at 20 h ($P<0.05$); however, no significant effects of LF-EMF treatment on the activity of ADH (alcohol dehydrogenase) and LDH (lactate dehydrogenase) were observed ($P>0.05$). In addition, the results of protein electrophoresis and proteomics analysis indicated that LF-EMF could change the expression level of intracellular proteins in *S. cerevisiae*, including significant up-regulation of 3 proteins and significant down-regulation of 9 proteins ($P<0.05$). **[Conclusion]** LF-EMF radiation can affect the activity of relevant enzymes in *S. cerevisiae*, and change the expression level of some intracellular proteins.

Keywords: Low frequency electromagnetic field, *Saccharomyces cerevisiae*, Protein expression, Enzyme activity

低频电磁场(Low frequency electromagnetic field, LF-EMF)是指频率较低,一般处于 0–300 Hz 的电磁场,主要由输电线路、变压器、家用电器产生^[1]。随着现代电子信息科技的不断发展,用电设备越来越多,所以 LF-EMF 在现代化社会中分布十分广泛,Wertheimer 研究发现 LF-EMF 辐射可导致白血病、淋巴瘤、神经系统肿瘤的发病率明显提高^[2],此后,LF-EMF 所导致的健康效应开始受到人们的广泛关注,并于 2002 年被国际癌症研究所列为可疑致癌物之一^[3]。

近年来,关于 LF-EMF 的健康效应研究已逐步深入到细胞和分子水平^[4]。刘赞等^[5]的研究发现,LF-EMF 可促进大豆萌发过程中超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)和过氧化物酶(Peroxidase, POD)的表达,还有研究报道^[6-7]指出,LF-EMF 可改变小鼠大脑中谷胱甘肽水平,并影响 SOD 和 CAT 的活性。然而,LF-EMF 对酶活性的影响可能表现为空间结构或酶的表达量两个方面,尽管目前的研究^[8-9]表明 LF-EMF 可在一定程度上促进或抑制酶的活性且影响其表达水平,但并没有具体的数据证明 LF-EMF 对酶活性的影响是源于结构的改变或是表达量的变化。

为了进一步研究 LF-EMF 辐射对完整生物体在蛋白质水平的影响,并探索其相关作用机理,本文以酿酒酵母作为实验对象,采用频率为 50 Hz、

强度为 3 kV/m、2.5 mT 的 LF-EMF 对其进行持续暴露辐射,通过紫外分光光度计和 SDS-PAGE 电泳等技术手段,探究辐射前后酿酒酵母在蛋白质表达、部分相关酶活性等方面的变化,以期进一步解释 LF-EMF 导致健康效应的作用机理,为 LF-EMF 辐射的风险评估与合理开发应用提供数据支撑。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、主要试剂和培养基

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) CY3079 购自河北马利食品有限公司。

SOD、CAT、ADH (乙醇脱氢酶, Alcohol dehydrogenase)、MDH (苹果酸脱氢酶, Malate dehydrogenase)、LDH (乳酸脱氢酶, Lactate dehydrogenase)试剂盒均购自北京索莱宝公司;TPCK-胰蛋白酶、M5 酵母蛋白提取试剂盒均购自北京康维世纪公司;BCA (Bicinchoninic acid)蛋白浓度测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所;其他所有常规试剂均为国产分析纯。

葡萄糖蛋白胨培养基(Yeast extract peptone dextrose medium, YEDP) (g/L): 酵母粉 10.0, 葡萄糖 20.0, 蛋白胨 20.0, 氯化钠 10.0。

1.1.2 主要仪器

电场发生装置,日本株式会社;紫外分光光度计,北京普析公司;凝胶电泳成像分析系统,

Bio-Rad 公司; Triple-TOF5600 质谱仪, AB SCIEX 公司。

1.2 方法

1.2.1 比浊法测定酿酒酵母生长曲线

使用 YEPD 培养基对酿酒酵母进行发酵培养, 接种量为 2%。培养基随机分为两组(每组 3 个平行), 分别置于 LF-EMF 辐射环境下生长和自然生长。在培养过程中, 每间隔 4 h 吸取菌液 1 mL, 经过无菌水稀释 10 倍, 在 OD_{600} 下测定样品的吸光值, 空白对照为稀释 10 倍后的新鲜培养基。以横坐标为培养时间, 纵坐标为培养基的吸光度值绘制酿酒酵母的生长曲线, 并计算酿酒酵母在两种生长条件下的比生长速率 μ 。计算公式为^[10]:

$$\mu = \frac{n}{t} = \frac{\log N_t - \log N_0}{\log 2 \times (T_t - T_0)}$$

式中, μ 代表酿酒酵母的比生长速率; n 则表示经过 t 时间后细胞增加的世代数; N_0 为培养初始时的 OD_{600} ; N_t 表示经过 t 时间的 OD_{600} 值; T_t 与 T_0 表示时间 t 和起始时间。

1.2.2 酿酒酵母总胞内可溶性蛋白质的提取与浓度测定

设置 LF-EMF 辐射培养及自然培养两种培养条件(每组 3 个平行), 培养时间分别为 12、16、20、24、48、72 h, 取培养物 100 mL 于 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min 收集菌体, 用 Tris-HCl 缓冲液洗涤菌体 3 次, 将菌体 15 000 r/min 离心 20 min 收集于 5 mL 离心管中, 4 °C 条件下采用 M5 酵母蛋白抽提试剂盒对酿酒酵母胞内的总可溶性蛋白质进行抽提, 实验按照说明书进行。蛋白质浓度的测定采用 BCA 试剂盒参考 Bradford 法^[11]完成, 并通过酶标仪进行快速检测。

1.2.3 酿酒酵母胞内蛋白质的聚丙烯酰胺电泳分析(SDS-PAGE)

分别取辐射培养及自然培养 16 h 酿酒酵母的胞内可溶蛋白质提取物(每组 2 个平行样品), 稀释至浓度约为 3 mg/mL 进行 SDS-PAGE 电泳分析。分离胶的浓度为 12% (分子量分离范围处于

12–150 kD), 上样量 10 μ L, 电泳起始电压设置为 100 V, 20 min 后增加电压至 200 V 加速电泳。经过染色、脱色处理, 脱色至条带清晰后, 采用凝胶电泳成像分析系统(GelDOC XR)进行拍照分析。

1.2.4 酿酒酵母胞内 5 种关键酶的活性测定

以上述抽提所得的蛋白质溶液为粗酶液, 分别测定其中 ADH、SOD、CAT、LDH 和 MDH 的酶活性(酶活性测定实验均重复 3 次)。ADH 的活性测定参考文献[12]方法, 反应体系为 1 mL。在 0.7 mL 浓度为 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(pH 8.8)中加入 0.1 mL 浓度为 1 mol/L 的乙醇溶液, 0.1 mL 浓度为 0.2 mol/L 的 β -NAD 溶液, 最后加入 0.1 mL 的待测酶液开始反应, 在 340 nm 下进行时间扫描, 记录吸光值的变化量, 并根据标准曲线 $y=0.099 9x+0.004 5$ ($R^2=0.999 9$)计算 ADH 的活力。ADH 的酶活力单位定义为: 在最佳条件下, 每分钟催化乙醇脱氢生成 1 μ mol NADH 所需的酶量。

其余 4 种酶的活性分别采用 SOD、CAT、LDH 和 MDH 试剂盒进行测定, 操作按照试剂盒说明书进行。SOD 的酶活力单位定义为: 在酶的最佳反应条件下, 每分钟对氧自由基抑制率达到 50% 的酶量。CAT 的酶活力单位定义为: 在酶的最适条件下, 每分钟转化 1 μ mol H_2O_2 的酶量。LDH 的酶活力单位定义为: 在酶的最佳反应条件下, 每分钟催化产生 1 nmol 丙酮酸的酶量。MDH 的酶活力单位定义为: 在酶的最佳反应条件下, 每分钟消耗 1 nmol NADH 所需的酶量^[13]。

1.2.5 蛋白质组学分析

将上述 1.2.2 所提取到的培养 16 h 的菌体胞内可溶性蛋白质, 用 Tris-HCl 缓冲液稀释至浓度为 5 mg/mL, 加入 TPCK 胰蛋白酶(终浓度为 0.1 mg/mL)于 37 °C 下恒温水浴振荡(转速 100 r/min) 24 h 进行酶解消化, 沸水浴加热 15 min 终止反应, 随后用 0.45 μ m 微孔滤膜过滤除去不溶物, 经真空冷冻干燥得到蛋白质组学分析样品。

样品的蛋白质组学分析实验均使用与 Triple-TOF5600 质谱仪串联的 Eksigent NanoLC-Ultra 系统

进行^[14]。在分析柱(75 $\mu\text{m}\times 15\text{ cm}$)上以 0.3 mL/min 的流速将肽段分离(缓冲液 A: 2%乙腈, 0.1%甲酸混合液; 缓冲液 B: 98%乙腈, 0.1%甲酸混合液)。操作质谱仪的 MS 扫描参数为 350–1 250 m/z , 积累时间 250 ms, TOF 分析的分辨率为 30 000 dpi, 然后进行 20 次数据相关性采集, MS/MS 扫描参数为 100–1 800 m/z , 累积时间 50 ms, 以 20 000 的分辨率进行 TOF 分析。

数据信息使用 Protein Pilot 软件 V.4.5b (AB SCIEX)进行 SWATH 采集, 数据的错误发现率(False discovery rate, FDR)设置为 1%, 蛋白质数据采集的参数范围设置为: 蛋白质得分 >0.05 , 10%的置信阈值。通过 Peak View V.2.0 (AB SCIEX)软件和 MDM 光谱数据库处理 SWATH 采集的样品数据, 只有在 FDR $<1\%$ 处鉴定的肽段才被纳入分析范围^[15]。酿酒酵母的肽段鉴定采用 UniProt Swiss-Prot 数据库进行匹配^[16], 差异的统计学检验通过 Fisher 精确测试算法^[17]完成。

2 结果与分析

2.1 LF-EMF 对酿酒酵母生长的影响

LF-EMF 对酿酒酵母生长的影响结果如图 1 所

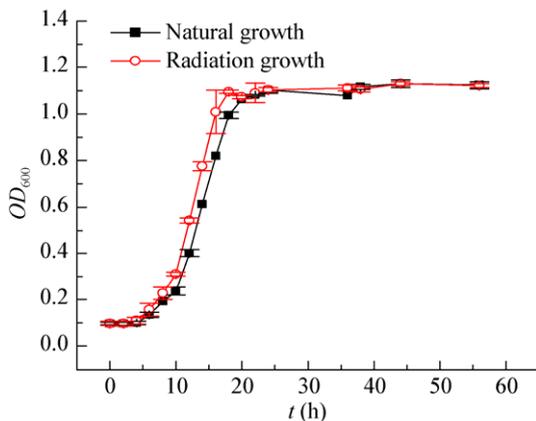


图 1 酿酒酵母的生长曲线

Figure 1 Growth curve of *S. cerevisiae*

注: 图中的数据取值为 3 个平行样品的平均值, 偏差线来源于平均值的上下差异($P<0.05$)。

Note: The taken data in the figure were the average of the three parallel samples, the deviation line was derived from the upper and lower differences of the average ($P<0.05$).

示。辐射生长的酿酒酵母在 4 h 后开始进入对数生长期, 与自然生长的酿酒酵母相比提前了 2 h。此外, 酿酒酵母的对数生长期(4–20 h)在 LF-EMF 辐射条件下的生长速率显著加快, 比生长速率为 0.276 h^{-1} , 比自然生长下的比生长速率(0.241 h^{-1})提高了 14.52%。当培养时间达到 20 h 后, 辐射生长的酿酒酵母已到达稳定期, 而自然生长的酿酒酵母在 24 h 后才达到生长稳定期。这说明 LF-EMF 可显著加速酿酒酵母的生长过程($P<0.05$), 缩短其生长迟滞期, 使其更快到达稳定期。

2.2 LF-EMF 对酿酒酵母胞内蛋白质合成的影响

每克菌体(湿重)的胞内可溶性蛋白质含量随时间变化曲线如图 2 所示。由图 2 可知, 随着培养时间的延长(12–72 h), 辐射生长与自然生长的酿酒酵母其胞内可溶性蛋白质均呈先增加后减小的趋势, 当培养时间为 16 h 时, 两者的可溶性蛋白质含量差距最大, 辐射条件下为 $9.95\pm 0.06\text{ mg/g}$, 自然生长条件下为 $9.07\pm 0.09\text{ mg/g}$, 差距达到

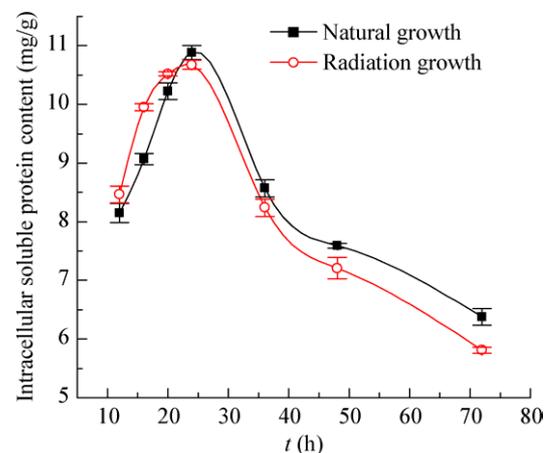


图 2 低频电磁场对酿酒酵母胞内可溶性蛋白质含量的影响

Figure 2 Effects of LF-EMF on the intracellular soluble protein content of *S. cerevisiae*

注: 图中的数据取值为 3 个平行样品的平均值, 偏差线来源于平均值的上下差异($P<0.05$)。

Note: The taken data in the figure were the average of the three parallel samples, the deviation line was derived from the upper and lower differences of the average ($P<0.05$).

9.70%。然而当培养时间达到 24 h 时,两者可溶性蛋白质的含量均达到最大值,其中辐射条件为 10.68 ± 0.08 mg/g,自然生长为 10.89 ± 0.12 mg/g,前者比后者降低了 1.93%。由此可知,在酿酒酵母达到稳定期前(12–24 h),LF-EMF 的辐射作用可促进酿酒酵母胞内可溶性蛋白质的合成,使其出现显著的上调现象($P < 0.05$)。当酿酒酵母的培养时间超过 24 h 后,其胞内可溶性蛋白质的含量开始逐渐下降,且辐射条件下酿酒酵母胞内可溶性蛋白质的含量均低于对照,这可能是由于酿酒酵母达到稳定期后,LF-EMF 加速了细胞的衰亡过程,从而加快了可溶性蛋白质不断下降的趋势^[18]。

鉴于两种培养条件下酿酒酵母胞内可溶性蛋白质含量最大差距的时间点为 16 h,对此时的胞内可溶性蛋白质进一步进行了 SDS-PAGE 电泳分析,结果如图 3 所示。由图 3 可知,LF-EMF 辐射处理

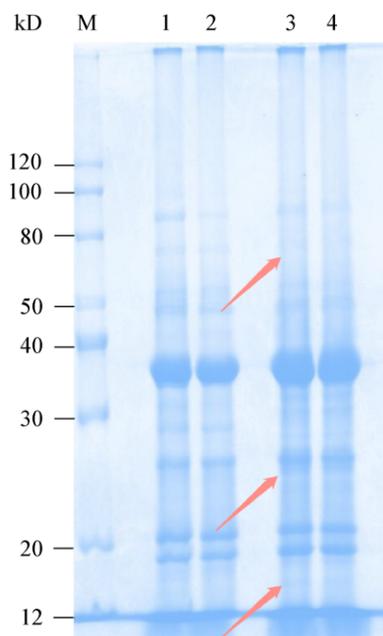


图 3 酿酒酵母胞内可溶性蛋白质的 SDS-PAGE 电泳分析(16 h)

Figure 3 SDS-PAGE analysis of the intracellular soluble protein (16 h)

注: M: 标准品; 1、2: 自然生长; 3、4: 辐射生长。

Note: M: Standard; 1, 2: Natural growth; 3, 4: Radiation growth.

的酿酒酵母胞内蛋白质在 12–20 kD 范围出现了新的蛋白质条带,在 20–30 kD 范围内存在蛋白质浓度差异或条带弥散,在 50–80 kD 范围内部分条带消失。这表明 LF-EMF 在一定程度上影响了酿酒酵母胞内可溶性蛋白质的表达水平,既促进了某些蛋白质的表达,同时又抑制了另一些蛋白质的合成,导致酿酒酵母蛋白质种类或含量发生变化。这与 Chen 等^[19]报道 LF-EMF 对细胞蛋白质表达的影响结果相似。

2.3 LF-EMF 对酿酒酵母胞内酶活性的影响

酿酒酵母胞内 5 种关键酶的活性测定结果如图 4–6 所示。由图 4 可知,两种生长条件下的 ADH 活性均呈先增大后减小的趋势。当培养时间达到 24 h 后,酿酒酵母达到生长稳定期,ADH 的活性接近最高值;此后,ADH 的活性逐渐下降,但整体趋势却未观察到其活性的显著差异($P > 0.05$)。因此,LF-EMF 辐射可能并不会直接影响酿酒酵母胞内 ADH 的活力,表现为不显著效应。

然而不同的是,LF-EMF 辐射显著影响了酿酒酵母胞内 SOD 和 CAT 的活性,由图 5 可知,

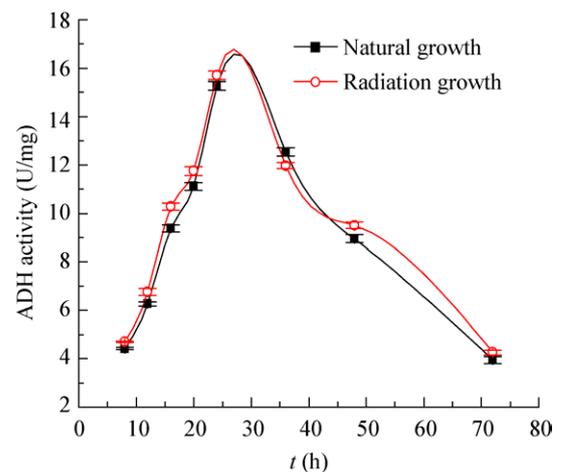


图 4 酿酒酵母 ADH 活性的变化趋势

Figure 4 The change trend of ADH activity in *S. cerevisiae*

注: 图中的数据取值为 3 个平行样品分别重复检测 3 次的平均值,偏差线来源于平均值的上下差异($P > 0.05$)。

Note: The taken data in the figure were the average of triple assaying of the three parallel samples, the deviation line was derived from the upper and lower differences of the average ($P > 0.05$).

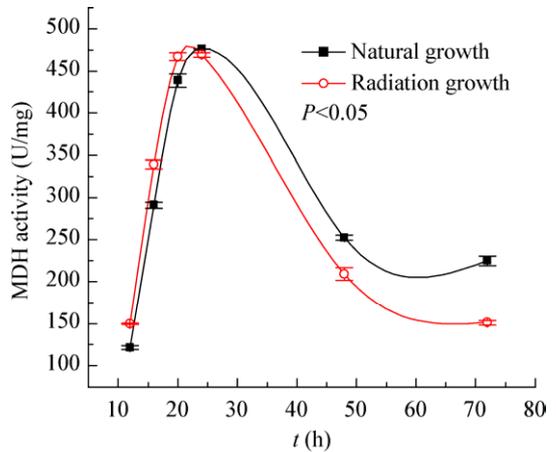
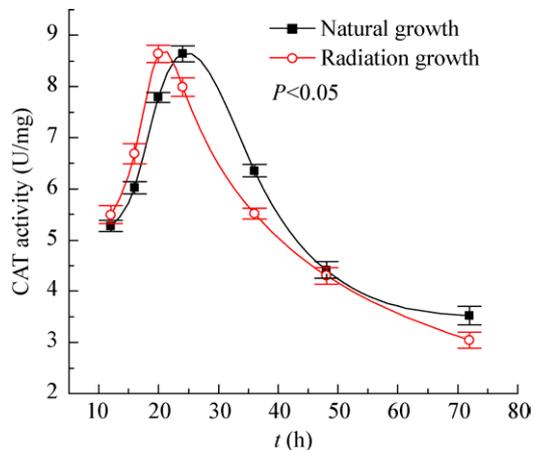
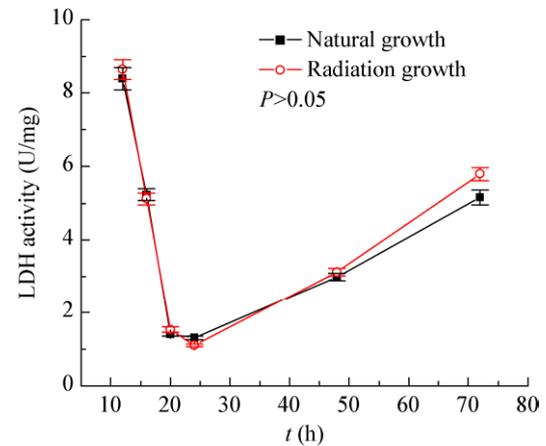
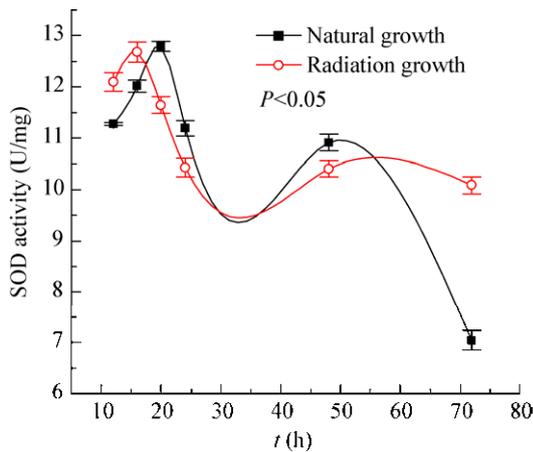


图5 酿酒酵母 SOD 和 CAT 的活性变化趋势

Figure 5 The change trend of SOD and CAT activity in *S. cerevisiae*

注: 图中的数据取值为 3 个平行样品分别重复检测 3 次的平均值, 偏差线来源于平均值的上下差异。

Note: The taken data in the figure were the average of triple assaying of the three parallel samples, the deviation line was derived from the upper and lower differences of the average.

SOD 的活性呈现两次先增后减的现象, 最大活性差距达到 43.18% ($P < 0.05$), CAT 的活性则呈现先升高后下降的趋势, 最大活性差距达到 12.22% ($P < 0.05$)。当培养时间约为 16 h 时, 辐射生长的 SOD 活性达到最大值 12.68 ± 0.19 U/mg, 自然生长的 SOD 活性在 20 h 时达到最大值 12.79 ± 0.12 U/mg。尽管辐射与自然生长组的 SOD 最大活性差距较小, 但当培养时间小于 16 h 时, 酿酒酵母处于生长繁殖阶段, 此时可观察到辐射条件的 SOD 和

图6 酿酒酵母 LDH 和 MDH 的活性变化趋势

Figure 6 The change trend of LDH and MDH activity in *S. cerevisiae*

注: 图中的数据取值为 3 个平行样品分别重复检测 3 次的平均值, 偏差线来源于平均值的上下差异。

Note: The taken data in the figure were the average of triple assaying of the three parallel samples, the deviation line was derived from the upper and lower differences of the average.

CAT 的活性均高于自然生长条件的活性。SOD 和 CAT 均与细胞的生长、代谢和氧化应激过程密切相关^[20], 其活性的提高预示着细胞内的氧自由基代谢活动旺盛。

酿酒酵母胞内 LDH 和 MDH 的活性变化趋势如图 6 所示。由图 6 可知, 无论是辐射或自然生长的酿酒酵母, 其 LDH 活性均呈先迅速下降后回升的趋势, 且当培养时间为 24 h 时, LDH 的活性最低, 但两者却未观察到显著的差异 ($P > 0.05$)。然

而,LF-EMF对酿酒酵母的MDH活性却存在显著的影响($P<0.05$)。当培养时间低于24 h时,辐射生长的酿酒酵母MDH活性均高于自然生长条件,其活性在20 h提高了12.90% ($P<0.05$);然而,当培养时间大于24 h时,辐射条件的MDH活性下降更为显著。当培养时间达到72 h,辐射组的MDH活性仅为150.87 U/mg,与自然生长的酿酒酵母MDH活性(224.73 U/mg)相比,下降了32.87% ($P<0.05$)。MDH是细胞内苹果酸循环、TCA循环的关键酶之一,MDH酶活力的先促进后抑制变化趋势与LF-EMF对酿酒酵母生长曲线的影响趋势高度吻合,说明LF-EMF对酿酒酵母生长的影响与其胞内相关酶的活性及代谢水平变化密切相关^[21]。

2.4 酿酒酵母的蛋白质组学分析

蛋白质组学分析表明,LF-EMF辐射可改变酿酒酵母胞内部分蛋白质的表达水平。如表1所示,经过LF-EMF辐射处理16 h后的酿酒酵母,其胞内可溶性蛋白质中有3种蛋白质发生了显著

的上调表达现象;9种胞内可溶性蛋白质出现了显著的下调表达现象。其中上调表达的SOD与细胞中自由基代谢和氧化应激过程密切相关,泛素-60S核糖体蛋白L40主要参与酿酒酵母对不良环境的抗逆性过程,并且与核糖体亚基的生物合成和调控有关^[20-22]。二羟基丙酮激酶催化二羟丙酮进行磷酸化反应,与葡萄糖代谢密切相关^[23]。在下调表达的可溶性蛋白质中,肌醇-3-磷酸合成酶的下降比例最大,达到40.59%,主要催化葡萄糖-6-磷酸转化为肌醇-3-磷酸的反应,参与了细胞的抗应激反应、生长、代谢等多种调节功能^[24]。Zhong等^[25]的研究发现,酿酒酵母肌醇-3-磷酸合酶影响了细胞内肌动蛋白的合成,对维持细胞骨架和细胞结构的完整性具有重要作用。本课题组蔡杏华在研究低频静电场辐射对酿酒酵母生长代谢的影响中发现,细胞经过LF-EMF持续暴露辐射后产生不同程度的凹陷甚至被击穿的现象,推测可能与肌醇-3-磷酸合酶的显著下调表达有关^[26]。

表1 差异蛋白质汇总表

Table 1 Summary of the differential proteins

差异肽段 Differential peptide	数据库比对结果 Database comparison result	上调或下调 Up or down	比例 Proportion (%)	P值 P-value
sp P0CH09 RL402	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	Up	34.21	0.021 6
sp P54838 DAK1	Dihydroxyacetone kinase 1	Up	19.28	0.028 5
sp P00445 SODC	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	Up	15.78	0.005 4
sp P11986 INO1	Inositol-3-phosphate synthase	Down	40.59	0.008 9
sp P49723 RIR4	Ribonucleoside-diphosphate reductase small chain 2	Down	38.31	0.018 5
sp Q12118 SGT2	Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein 2	Down	32.79	0.020 1
sp Q04344 HNT1	Hit family protein 1	Down	25.97	0.029 1
sp P07262 DHE4	NADP-specific glutamate dehydrogenase 1	Down	21.37	0.022 5
sp Q01532 BLH1	Cysteine proteinase 1, mitochondrial	Down	20.08	0.041 2
sp P54839 HMCS	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase	Down	19.04	0.021 1
sp Q05905 HRI1	Protein HRI1	Down	18.51	0.026 2
sp P07267 CARP	Saccharopepsin	Down	14.43	0.027 2

3 讨论

目前关于 LF-EMF 健康效应的研究结论尚不统一, 争议主要有以下几点: (1) 研究对象不同。LF-EMF 对不同生物体的影响可能大相径庭, 且不同生物体 LF-EMF 的影响程度千差万别, 这可能是导致 LF-EMF 的生物学效应争议较大的主要原因。(2) 以离体实验研究为主。离体实验的研究本身会产生多种环境影响因素, 与体内研究可能存在较大差异, 且不可控因素较多, 因此离体实验的研究结论较难反映 LF-EMF 在一个完整生物体内的影响机制。(3) LF-EMF 对不同生物体的影响都是一个错综复杂的过程, 其是否具有靶向性或是随机性都难以确定, 因此仍然需要在分子水平进行更系统和深入的研究。

本文为了减少不可控因素和环境因素对实验结论的影响, 选择了真核细胞生物中的酿酒酵母作为研究对象, 首先研究了 LF-EMF 对酿酒酵母生长趋势、蛋白质表达及酶活性等方面的影响, 并进一步研究其蛋白质组学的变化, 探索 LF-EMF 引起生物学效应的作用机制。研究发现, LF-EMF 可加速酿酒酵母的生长过程, 同时在酿酒酵母的生长阶段(生长稳定期前), 其部分与生长和代谢相关的酶活性(SOD、CAT 和 MDH)同样受到了 LF-EMF 的促进作用, 当酿酒酵母进入生长稳定期后部分酶活性又受到了 LF-EMF 的抑制作用。此外, LF-EMF 辐射还显著改变了酿酒酵母胞内部分蛋白质的表达水平, 这意味着调控这些蛋白质表达的基因也可能发生了相应的变化, 且可能直接影响酿酒酵母的部分生物学功能。综合前期的研究结果^[26], LF-EMF 辐射对于酿酒酵母的影响作用是一个先促进后抑制的过程。即短时间的 LF-EMF 辐射, 有利于酿酒酵母的生长和新陈代谢, 然而长时间的辐射则逐渐表现为对酿酒酵母的危害作用, 使细胞产生形变和部分酶活性受到显著抑制, 并加速细胞的凋亡过程。这可能就是 LF-EMF 辐射的持续时间越长, 导致细胞病变率越高的重要原因之一。

本文关于 LF-EMF 辐射对酿酒酵母部分酶的活性及胞内蛋白质表达的影响, 可为进一步研究 LF-EMF 辐射的作用机理提供基础。然而, 关于 LF-EMF 辐射是如何影响酿酒酵母的蛋白质表达, LF-EMF 辐射导致这一系列效应的先后顺序如何, 其作用是广谱性或者靶向性等问题都有待进一步深入研究。因此, 继续研究 LF-EMF 辐射引起细胞生物学效应的分子机制, 仍然是今后该领域研究的重要课题。

4 结论

本文通过对 LF-EMF 辐射影响酿酒酵母胞内蛋白质表达及相关酶活性的研究表明, LF-EMF 辐射可以加速酿酒酵母的生长过程, 这种加速作用可能是源于 LF-EMF 促进了酿酒酵母胞内 SOD、CAT 和 MDH 酶活性的提高。当酿酒酵母进入生长稳定期后, LF-EMF 辐射对其 SOD、CAT 和 MDH 的酶活性又表现为抑制作用, 整体过程表现为先促进后抑制的过程。此外, LF-EMF 辐射改变了酿酒酵母胞内部分蛋白质的表达水平, 其中 3 种蛋白质的表达发生显著上调, 9 种蛋白质的表达发生显著下调 ($P < 0.05$)。因此, LF-EMF 辐射对酿酒酵母胞内蛋白质表达及相关酶活性的影响是导致多种生物学效应的重要原因之一。

REFERENCES

- [1] Bao JL. Health effects of extremely low frequency electromagnetic fields[J]. High Voltage Engineering, 2015, 41(8): 2550-2561 (in Chinese)
包家立. 极低频电磁场的健康效应[J]. 高电压技术, 2015, 41(8): 2550-2561
- [2] Wertheimer N, Leeper E. Electrical wiring configurations and childhood cancer[J]. American Journal of Epidemiology, 1979, 109(3): 273-284
- [3] IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Non-Ionizing Radiation, Part 1: Static and Extremely Low-Frequency (ELF) Electric and Magnetic Fields[M]. Lyon, France: IARC, 2002: 285
- [4] Zhang PP, Yin RC, Wu LF, et al. Non-thermal bioeffects of static and extremely low frequency electromagnetic fields[J]. Journal of Biomedical Engineering, 2007, 24(6): 1411-1415 (in Chinese)
张萍萍, 尹若春, 吴丽芳, 等. 静态和极低频电磁场非热生物效应的研究动态[J]. 生物医学工程杂志, 2007, 24(6):

- 1411-1415
- [5] Liu Y, Weng EQ, Dai YQ, et al. Biological effects of extremely low frequency electromagnetic fields on soybean seeds during germination[J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2002, 8(5): 482-484 (in Chinese)
刘赞, 翁恩琪, 戴雅奇, 等. 极低频电磁场对萌发期大豆的生物学效应[J]. 应用与环境生物学报, 2002, 8(5): 482-484
- [6] Amara S, Douki T, Garrel C, et al. Effects of static magnetic field and cadmium on oxidative stress and DNA damage in rat cortex brain and hippocampus[J]. Toxicology and Industrial Health, 2011, 27(2): 99-106
- [7] Panagopoulos DJ, Karabarbounis A, Lioliosis C. ELF alternating magnetic field decreases reproduction by DNA damage induction[J]. Cell Biochemistry and Biophysics, 2013, 67(2): 703-716
- [8] Cappelli S, Penco A, Mannini B, et al. Effect of molecular chaperones on aberrant protein oligomers *in vitro*: super- versus sub-stoichiometric chaperone concentrations[J]. Biological Chemistry, 2016, 397(5): 401-415
- [9] Patruno A, Tabrez S, Pesce M, et al. Effects of extremely low frequency electromagnetic field (ELF-EMF) on catalase, cytochrome P450 and nitric oxide synthase in erythro-leukemic cells[J]. Life Sciences, 2015, 121: 117-123
- [10] Song J, Lin JQ, Jin Y, et al. A new population growth model based on the time dependent changes of the specific growth rate[J]. Microbiology China, 2007, 34(5): 836-838 (in Chinese)
宋健, 林建群, 金燕, 等. 以比生长速率时间曲线为基础的生物群体生长数学模型[J]. 微生物学通报, 2007, 34(5): 836-838
- [11] Carlsson N, Borde A, Wölfel S, et al. Quantification of protein concentration by the Bradford method in the presence of pharmaceutical polymers[J]. Analytical Biochemistry, 2011, 411(1): 116-121
- [12] Fibla J, González-Duarte R. Colorimetric assay to determine alcohol dehydrogenase activity[J]. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 1993, 26(1): 87-93
- [13] Zhang HF. Discussion on definition of activity unit of enzyme[J]. Chinese Science and Technology Terms Journal, 2005, 7(1): 38 (in Chinese)
张华峰. 关于酶活力单位定义[J]. 科技术语研究, 2005, 7(1): 38
- [14] Petschnigg J, Groisman B, Kotlyar M, et al. The mammalian-membrane two-hybrid assay (MAMTH) for probing membrane-protein interactions in human cells[J]. Nature Methods, 2014, 11(5): 585-592
- [15] Xiong Y, Tang XF, Meng QS, et al. Differential expression analysis of the broiler tracheal proteins responsible for the immune response and muscle contraction induced by high concentration of ammonia using iTRAQ-coupled 2D LC-MS/MS[J]. Science China Life Sciences, 2016, 59(11): 1166-1176 (in Chinese)
熊嫣, 唐湘方, 孟庆石, 等. 高氨刺激下参与免疫应答和肌肉收缩过程的肉鸡气管蛋白差异表达——基于 iTRAQ 标记技术的差异蛋白质组学研究[J]. 中国科学: 生命科学, 2016, 46(11): 1267-1276
- [16] Boutet E, Lieberherr D, Tognolli M, et al. UniProtKB/Swiss-Prot, the manually annotated section of the UniProt knowledgebase: how to use the entry view[A]//Edwards D. Plant Bioinformatics: Methods and Protocols[M]. New York, NY: Humana Press, 2016: 23-54
- [17] Wang BH. Simulation comparison of two fisher exact test algorithms[J]. Chinese Journal of Health Statistics, 2005, 22(2): 114-115 (in Chinese)
王斌会. 两种 Fisher 精确检验算法的模拟比较[J]. 中国卫生统计, 2005, 22(2): 114-115
- [18] Sadeghipour R, Ahmadian S, Bolouri B, et al. Effects of extremely low-frequency pulsed electromagnetic fields on morphological and biochemical properties of human breast carcinoma cells (T47D)[J]. Electromagnetic Biology and Medicine, 2012, 31(4): 425-435
- [19] Chen GD, Xu ZP. Global protein expression in response to extremely low frequency magnetic fields[A]//Leszczynski D. Radiation Proteomics: the Effects of Ionizing and Non-Ionizing Radiation on Cells and Tissues[M]. Dordrecht: Springer, 2013: 107-110
- [20] Ciejka E, Kleniewska P, Skibska B, et al. Effects of extremely low frequency magnetic field on oxidative balance in brain of rats[J]. Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society, 2011, 62(6): 657-661
- [21] Morelli A, Ravera S, Panfoli I, et al. Effects of extremely low frequency electromagnetic fields on membrane-associated enzymes[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2005, 441(2): 191-198
- [22] Qiao GH, Li T, Wang KR. Molecular cloning and analysis of ubiquitin and ribosomal protein L40 fusion protein from *Cryphonectria parasitica*[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2009, 25(4): 758-762 (in Chinese)
乔广行, 李涛, 王克荣. 栗疫病菌泛素核糖体 L40 融合蛋白基因的克隆与分析[J]. 江苏农业学报, 2009, 25(4): 758-762
- [23] Erni B, Siebold C, Christen S, et al. Small substrate, big surprise: fold, function and phylogeny of dihydroxyacetone kinases[J]. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 2006, 63(7/8): 890-900
- [24] Ju SL, Shaltiel G, Shamir A, et al. Human 1-D-*myo*-inositol-3-phosphate synthase is functional in yeast[J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(21): 21759-21765
- [25] Zhong Q, Greenberg ML. Regulation of phosphatidylglycerophosphate synthase by inositol in *Saccharomyces cerevisiae* is not at the level of *PGS1* mRNA abundance[J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(36): 33978-33984
- [26] Cai XH, Ren HF, Meng YS, et al. Effects of low frequency electrostatic field radiation on growth and metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(2): 124-127,133 (in Chinese)
蔡杏华, 任浩锋, 蒙永双, 等. 低频静电场辐射对酿酒酵母生长代谢的影响[J]. 食品工业科技, 2018, 39(2): 124-127,133