·实验研究·

电磁辐射暴露对小鼠细胞免疫功能影响*

王源,余争平

摘 要:目的 观察平均功率密度 90 mW/cm² 电磁辐射暴露对细胞免疫功能影响。**方法** 采用体内、体外淋巴细胞转化试验及迟发型超敏反应耳肿胀试验观察电磁辐射暴露对小鼠细胞免疫功能影响。**结果** 平均功率密度 90 mW/cm² 电磁辐射暴露后第 3、5、7 天,脾脏淋巴细胞植物血凝素(PHA)刺激指数分别为(1.15 ± 0.05)、(1.16 ± 0.08)、(1.13 ± 0.07),与对照组 PHA 刺激指数[分别为(1.09 ± 0.03)、(1.12 ± 0.11)、(1.21 ± 0.13)]比较无明显变化;辐照后第 3、5、7 天,小鼠体内淋巴细胞转化率分别为(43 ± 2.1)%、(53 ± 3.0)%、(51 ± 1.9)%,均明显高于对照组(32 ± 3.6)%、(44 ± 2.5)%、(41 ± 2.4)%;辐照后第 3、5 天的小鼠耳肿胀指数分别为(2.67 ± 0.37)、(2.93 ± 0.52) mg,明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 平均功率密度 90 mW/cm² 电磁辐射暴露后短期会导致小鼠细胞免疫功能亢进。

关键词:电磁辐射暴露;细胞免疫;淋巴细胞转化率;迟发型超敏反应

中图分类号:R 181.2⁺4 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-0580(2014)10-1271-03 DOI:10.11847/zgggws2014-30-10-11

Effect of electromagnetic field on cell immumity function in mice

WANG Yuan, YU Zheng-ping (*Department of Occupational Health, the Third Military Medical University, Chongqing* 400038, China)

Abstract: Objective To observe the effect of electromagnetic field (EMF) on cell immunity function. **Methods** After EMF exposure at the intensity of 90 mW/cm² for 20 minutes, the lymphocyte transformation rate *in vivo* and *in vitro* and the ear blubber index of delayed type hypersensitivity test were determined on the day of 3rd, 5th, and 7th. **Results** The phytohaemagglutinin stimulation indexes of the spleen lymphocyte *in vitro* were 1.15 ± 0.05, 1.16 ± 0.08, and 1.13 ± 0.07, respectively, on 3rd, 5th, and 7th day after the MEF exposure, without significant differences compared with those of the control (1.09 ± 0.03, 1.12 ± 0.11, and 1.21 ± 0.13), but the lymphocyte transformation rates *in vivo* were 43 ± 2.1 %, 53 ± 3.0 %, and 51 ± 1.9 %, respectively, and were significantly higher than those of the control ($P < 0.05$ for all). On 3rd and 5th day after the EMF exposure, the ear blubber indexes were 2.67 ± 0.37 mg and 2.93 ± 0.52 mg and significantly higher than those of the control ($P < 0.05$ for all). **Conclusion** Exposed to 90 mW/cm² EMF could induce cellular immune hyperfunction in mice.

Key words: electromagnetic field; cell immunity; lymphocyte transformation rate; delayed type hypersensitivity

研究发现,电磁辐射暴露会导致 Th1/Th2 细胞因子平衡向 Th1 方向偏移[1-2]。按照免疫平衡理论观点,这种偏移可能会导致机体细胞免疫功能异常[3-4]。本研究采用平均功率密度 90 mW/cm² 电磁辐射建立小鼠辐照模型,观察电磁辐射暴露后不同时间段,小鼠体内、体外淋巴细胞转化以及小鼠迟发型超敏反应耳朵肿胀度等细胞免疫功能指标变化,进一步探讨电磁辐射暴露对 Th1/Th2 细胞因子平衡影响,结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 微波源(第三军医大学劳动卫生学教研室),CO_2 培养箱(美国 Naurie 公司);IMT-2 倒置显微镜、光学显微镜(日本 Olympus 公司);酶标仪(奥地利 TECAN 公司);电子天平(美国 Sartorious 公司)。1640 培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司);噻唑蓝(methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT)、植物血凝素(phytohaemagglutinin, PHA)(美国 Sigma 公司);2,4 - 二硝基氯苯(DNCB)(上海第二试剂厂);Opti-MEM(美国 Invitrogen 公司)。

1.2 辐照模型制备 动物辐照在反射系数近似为零的微波辐照暗室内进行,实验动物置于可透射微波的有机玻璃盒内,在匀速旋转的实验平台上接受辐照,辐照平均功率密度为 90 mW/cm²,辐照时间为 20 min,辐照环境温、湿度保持恒定,温度(20 ± 2) ℃,湿度 50% ~70%。对照组小鼠,在不开波源的情况下,置于同样的辐照环境中相同时间。

1.3 指标与方法

1.3.1 脾脏淋巴细胞转化率测定 采用 MTT 法,取健康成年昆明小鼠 24 只,雌性,随机分为对照组和辐照组,每组 12 只,辐照后第 3、5、7 天每组分别

* **基金项目:** 国家自然科学基金(30972432)
作者单位: 第三军医大学劳动卫生学教研室,重庆 400038
作者简介: 王源(1973 -),男,四川南溪人,高级实验师,博士,主要从事电磁辐射生物效应及防护研究。
数字出版日期:2014 - 4 - 8 14:11
数字出版网址:http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20140408.1411.041.html

随机取 4 只小鼠，脱臼处死后，无菌取脾，制备细胞悬液，经低渗处理除去红细胞，用 Hanks 液洗涤 2 次，用台盼蓝染色计数活细胞比率在 95% 以上，制成脾细胞悬液，调整细胞浓度为 2×10^5 个/mL。细胞悬液加入 96 孔培养板中，100 μL/孔，辐照组和对照组细胞悬液各加 6 孔，前 3 孔分别加入 100 μL PHA 液（浓度为 10 μg/mL）作为刺激孔，后 3 孔各加脾细胞培养基 100 μL 作为参照孔，混匀后培养 48 h。培养结束前 4 h，各孔轻轻吸出上清液100 μL，然后分别加入 MTT 液 10 μL/孔（5 mg/mL），混匀后继续培养 4 h 后，每孔加入 100 二甲基亚砜，吹打均匀，置于微量振荡器上振荡 1 ~ 2 min，使紫色结晶完全溶解，静置 10 min 后，用酶标仪以 570 nm 波长测定吸光度（*A*）值，以刺激指数（SI）反映脾淋巴细胞转化率，SI = PHA 刺激孔 *A* 值/参照孔 *A* 值。

1.3.2　小鼠淋巴细胞转化率测定　取健康成年昆明小鼠 6 只，随机分为对照组和辐照组，每组 3 只，辐照后，辐照组与对照组小鼠每日进行 PHA 肌肉注射 0.2 mL（含 PHA 100 μg），连续注射 3 d，分别在辐照后第 3、5、7 天，从小鼠尾尖取血涂片。血涂片采用 Wright-Giemsa 染色油镜下观察并计数 100 个淋巴细胞中转化的淋巴细胞个数，计算转化率。

1.3.3　小鼠迟发型超敏反应强度检测（耳肿胀实验）　取健康成年昆明小鼠 18 只，雌性，用 10% 硫化钠在小鼠腹部 3 cm × 1 cm 固定部位脱毛，温水洗净。连续 2 d 在小鼠腹部脱毛部位涂 1 % DNCB 进行致敏，每天 1 次，每次 20 μL，致敏结束后小鼠随机分为对照组和辐照组，每组 9 只，辐照组小鼠进行 90 mW/cm^2 微波辐照 20 min，在辐照后第 3、5、7 天，于对照组与辐照组分别选取 3 只小鼠，在其右耳背涂布 20 μL 0.5 % DNCB 诱发皮炎，左耳背涂布丙酮 20 μL 作对照，于诱发后 24 h，脱臼处死小鼠，剪下小鼠双耳，用直径 0.6 cm 打孔器在左右耳中部相同位置打下组织块，电子天平称重，计算肿胀指数 = 右耳重量 − 左耳重量），作为炎症反应强度指标。

1.4　统计分析　实验结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较采用 Microsoft Excel 2003 软件进行方差齐性检验和 *t* 检验，$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　转化淋巴细胞显微镜观察（图 1、2）　体外培养的脾脏淋巴细胞，经 PHA 刺激后，镜下可观察到转化的淋巴细胞（图 1，箭头所指为转化淋巴细胞）。在辐照各相应时点，小鼠尾静脉取血涂片，经瑞 − 姬染色，可见转化的淋巴细胞体积增大、细胞核疏松呈网状，胞浆增多呈嗜碱性（图 2，箭头所指为转化淋巴细胞）。

2.2　电磁辐射暴露对小鼠体外淋巴细胞转化影响（表 1）　与对照组比较，平均功率密度 90 mW/cm^2 电磁辐射暴露后，各时点脾脏淋巴细胞 PHA 刺激指数均无明显变化。

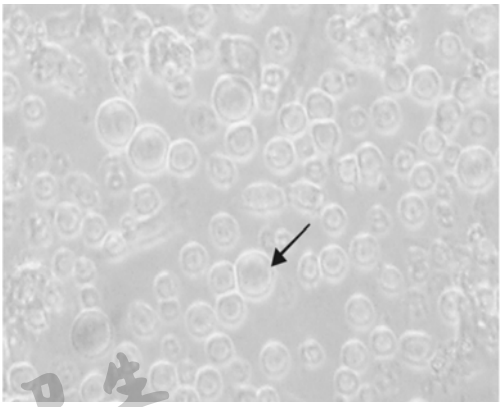

图 1　PHA 刺激淋巴细胞转化（400 ×）

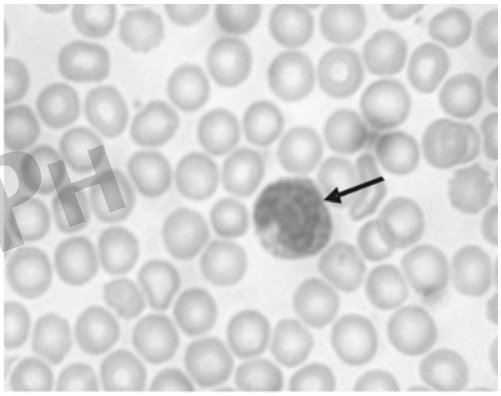

图 2　转化淋巴细胞（瑞 − 姬染色，1000 ×）

表 1　电磁辐射暴露对小鼠体外淋巴细胞转化影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 4$）

组别	辐照后时间		
	3 d	5 d	7 d
对照组	1.09 ± 0.03	1.12 ± 0.11	1.21 ± 0.13
辐照组	1.15 ± 0.05	1.16 ± 0.08	1.13 ± 0.07

2.3　电磁辐射暴露对小鼠淋巴细胞转化率影响（表 2）　与对照组比较，平均功率密度 90 mW/cm^2 电磁辐射暴露后第 3、5、7 天，辐射组小鼠淋巴细胞转化率均明显升高，差异有统计学意义（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$）。

表 2　电磁辐射对小鼠体内淋巴细胞转化影响，（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

组别	辐照后时间		
	3 d	5 d	7 d
对照组	32 ± 3.6	44 ± 2.5	41 ± 2.4
辐照组	43 ± 2.1[a]	53 ± 3.0[b]	51 ± 1.9[b]

注：与对照组比较，a $P < 0.05$，b $P < 0.01$。

中国公共卫生 CPH

2.4　DNBC 诱发迟发型超敏反应(表 3)　与对照组比较,平均功率密度 90mW/cm^{2}电磁辐射暴露后第 3、5 天,辐照组小鼠耳朵肿胀指数均升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 3　电磁辐射对 DNBC 诱发的小鼠耳肿胀指数影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	辐照后时间		
	3 d	5 d	7 d
对照组	1.53 ± 0.17	1.47 ± 0.21	1.66 ± 0.09
辐照组	2.67 ± 0.37[a]	2.93 ± 0.51[a]	1.97 ± 0.12

注:与对照组比较,a $P<0.05$。

3　讨　论

研究表明,平均功率密度 900 mW/cm^2 电磁辐射会导致 Th 细胞因子平衡向 Th1 方向偏移[1-2],γ 干扰素作为 1 型细胞因子代表,在电磁辐射暴露后的高表达,预示着电磁辐射暴露可能会导致机体细胞免疫功能亢进[5-6]。本研究结果显示,90 mW/cm^2 电磁辐射暴露后各时点,小鼠体内淋巴细胞转化率均明显高于对照组,体外淋巴细胞转化率相对于对照组呈现增高趋势,但与对照组比较,差异均没有统计学意义。提示,电磁辐射暴露对脾脏淋巴细胞的活化没有明显的促进作用,但对机体的整个免疫系统内环境,包括各种免疫细胞和细胞因子,具有一定促进淋巴细胞转化作用[7]。

迟发型超敏反应结果显示,电磁辐射暴露后各时点,小鼠耳朵经 DNBC 刺激后红肿、硬结强度均高于对照组,其中暴露后第 3、5 天的耳肿胀指数与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。提示平均功率密度 90 mW/cm^{2}电磁辐射暴露会导致机体细胞免疫功能亢进[8]。这一结果还从另一个方面印证了 Logani 等[9]观察毫米波影响小鼠移植瘤转移率的结论,低能量毫米波(42.2 GHz, 36.5 mW/cm^2)能够刺激自然杀伤细胞活性,增强细胞免疫功能,抑制荷瘤小鼠瘤转移。

参考文献

[1] 王源,许商成,张光斌,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(9):883 - 886.

[2] 王源,张广斌,裴莉萍,等. 电磁辐射累积暴露对 Th1/Th2 细胞因子平衡的影响[J]. 中国公共卫生,2011,27(7):887 - 889.

[3] 姚根宏,侯亚义. 狼疮性肾炎与 Th1/Th2 细胞因子关系研究进展[J]. 中国公共卫生,2007,23(7):892 - 893.

[4] 刘剑利,曹向宇,李其久,等. 小米多肽对小鼠免疫调节作用[J]. 中国公共卫生,2012,28(1):44 - 45.

[5] Boskabady MH, Shahmohammadi S, Rezaee A, et al. The impact of *Zataria multiflora Boiss* extract on *in vitro* and *in vivo* Th1/Th2 cytokine (IFN-gamma/IL4) balance[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2013, 150(3): 1024 - 1031.

[6] Lochmatter P, Beeler A, Kawabata TT, et al. Drug-specific *in vitro* release of IL-2, IL-5, IL-13 and IFN-gamma in patients with delayed-type drug hypersensitivity[J]. Allergy, 2009, 64(9): 1269 - 1278.

[7] Marzec M, Halasa K, Liu X, et al. Malignant transformation of CD4$^+$ T lymphocytes mediated by oncogenic kinase NPM/ALK recapitulates IL-2-induced cell signaling and gene expression reprogramming[J]. Journal of Immunology, 2013, 191(12): 6200 - 6207.

[8] Yu WG, Lin P, Pan H, et al. Pathophysiological significance of a reaction in mouse gastrointestinal tract associated with delayed-type hypersensitivity[J]. World Journal of Gastroenterology, 2004, 10(15): 2254 - 2258.

[9] Logani MK, Szabo I, Makar V, et al. Effect of millimeter wave irradiation on tumor metastasis[J]. Bioelectromagnetics, 2006, 27(4): 258 - 264.

收稿日期: 2013-11-18　（解学魁编辑　校对）

· 实验研究 ·

不同药物对 HT29 细胞及其体外肿瘤移植模型作用

张晓峰

关键词:帕尼单抗;西妥昔单抗;结肠癌;HT29;体外肿瘤移植模型
中图分类号:R 739.9　**文献标志码**:A　**文章编号**:1001-0580(2014)10-1273-03　DOI:10.11847/zgggws2014-30-10-12

结直肠癌是常见的恶性肿瘤之一,其术后 5 年生存率小于 40%[1]。表皮生长因子受体(epithelial growth factor receptor, EGFR)是一种具有酪氨酸激酶活性的跨膜受体。研究显示,人类多种肿瘤细胞存在 EGFR 的异常激活,使其正常功能失控[2]。结肠癌细胞过表达 EGFR,抗 EGFR 抗体成为治疗结肠癌的重要生物治疗方法[3]。西妥昔单抗是抗 EGFR 人/鼠嵌合单克隆抗体,它选择性地与 EGFR 结

作者单位: 永城市人民医院药剂科,河南 476600
作者简介: 张晓峰(1967 -),男,河南永城人,主管药师,本科,研究方向:临床药学。
数字出版日期:2014 - 8 - 28 13:49
数字出版网址:http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20140903.1525.025.html