

• 论 著 • DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2018. 05. 005

模拟手机电磁辐射系统对 SD 大鼠耳蜗边缘细胞影响的研究^{*}

张应龙, 左汶奇[△]

(重庆医科大学附属永川医院耳鼻喉科, 重庆 402160)

摘 要:目的 探讨 1 800 MHz 模拟手机电磁辐射系统对 SD 大鼠耳蜗边缘细胞 DNA 损伤、细胞凋亡的影响以及产生生物学效应的可能机制。方法 采用 1 800 MHz 模拟手机辐射系统, 强度选择 2、4 w/kg, 模式选择开 5 min、关 10 min 的通话模式, 辐射时间为短期 24 h 暴露, 辐射后采用彗星实验检测细胞 DNA 损伤; 流式细胞技术检测电磁辐射对细胞凋亡的影响; 采用荧光探针检测辐射后活性氧簇(ROS)的生成情况。结果 手机电磁辐射未引起边缘细胞 DNA 的损伤, 且未导致细胞凋亡率增加($P>0.05$)。4 w/kg 暴露组 ROS 生成量较对照组显著增加, 差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 通过离体研究发现, 短期暴露于手机辐射下, 其能量不足以引起细胞 DNA 的损伤和细胞凋亡, 但手机辐射的累积效应仍需要进一步证实; ROS 激活是手机电磁辐射产生生物学效应的主要机制。

关键词: DNA 损伤; 细胞凋亡; 活性氧; 手机电磁辐射; 耳蜗边缘细胞

中图法分类号: R764.4

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2018)05-0589-04

The effects of mobile phone electromagnetic radiation system on cochlea marginal cells of the SD rats^{*}

ZHANG Yinglong, ZUO Wenqi[△]

(Department of Ear-Nose-Throat, Yongchuan Hospital Affiliated of Chongqing

Medical University, Chongqing 402160, China)

Abstract: **Objective** To investigate the influence of 1 800 MHz mobile phone electromagnetic radiation system on the DNA damage, cell apoptosis and the possible mechanism of the biological effects in the SD rat cochlea marginal cells. **Methods** Mobile phone radiation intensity set 2 w/kg and 4 w/kg and the exposure mode was on 5 minutes off 10 minutes. Radiation time was 24 h short-term exposure type. After exposure, comet assay test, flow cytometry technology and fluorescent probe were used to detect cell DNA damage, cell apoptosis and reactive oxygen species (ROS) generation. **Results** The cell phone electromagnetic radiation did not cause marginal cell DNA damage, and the rate of cell apoptosis did not increase($P>0.05$). The production of ROS in 4 w/kg exposure group was significantly higher than the control group ($P<0.05$). **Conclusion** Energy of mobile phone does not cause cell DNA damage and cell apoptosis in the short-term exposure type in our study, but the cumulative effect of mobile phone radiation still needs to be further confirmed. Activating the ROS system is the main mechanism of electromagnetic radiation biological effects.

Key words: DAN damage; cell apoptosis; reactive oxygen species; mobile telephone; electromagnetic radiation; cochlea marginal cells

电磁辐射是继空气、水、食品污染后的第 4 大污染物。随着社会的进步, 电子产品的使用大量增加, 如微波炉、电脑、电磁炉等, 人们暴露于电磁场的概率也随之增高。手机是现代社会交流传递信息必不可少的工具, 人们常常随身携带。900、1 800 MHz 是常用的两种手机频率, 手机的辐射强度在每个国家有不同的规定, 比如欧洲和美国标准是小于 1.6 w/kg, 但 4 w/kg 常被用来了解手机辐射的热效应^[1]。关于手机对人体的影响, 目前有学者发现手机电磁辐射可以导致精子活力的下降、神经元细胞的数量及活力的降

低, 同时手机电磁辐射与神经胶质瘤和听神经瘤发病有相关性^[2-4]。但有研究发现电磁辐射并不会引起明显的生物学效应, 原因为电磁辐射不同于电离辐射, 其能量低于电离辐射, 电磁辐射对各器官的影响仍是目前研究的热点^[5]。双耳是手机辐射的直接效应器官, 有研究发现幼鼠暴露于 900 MHz 手机电磁辐射装置下, 尽管听力没有改变, 但耳蜗超微结构有改变^[6]; 有离体研究发现耳蜗螺旋神经节细胞在经过脂多糖处理后暴露于 1 800 MHz、4 w/kg 强度下, 细胞有自噬小体生成, 自噬蛋白 LC3-II 和 beclin1 有阳性

^{*} 基金项目: 重庆市教委科学技术研究项目(KJ1400226)。

作者简介: 张应龙, 男, 主治医师, 主要从事耳鼻喉咽喉科临床与基础方面的研究。 [△] 通信作者, E-mail: zuowenqi@163.com。

表达,证实细胞超微结构有改变^[7];还有报道小鼠耳蜗毛细胞 HEI-OC1 暴露于 1 760 MHz 电磁辐射系统下,细胞周期、蛋白表达及 DNA 等均未见明显异常^[8]。活性氧簇(ROS)系统的激活被认为是电磁辐射产生生物学效应的主要机制^[9],而耳蜗边缘细胞对维持内耳生理具有重要作用。因此,本课题组选择耳蜗边缘细胞作为模拟电磁辐射研究的效应细胞,探讨 1 800 MHz 辐射频率、辐射强度比吸收率(SAR)在 2、4 w/kg 模式下,边缘细胞 DAN 的损伤、细胞凋亡情况及其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 材料来源 0~3 d SD 大鼠的乳鼠(由重庆医科大学动物中心提供),体质量约为 5 g,雌雄不限。所有动物均按照标准化流程饲养,并得到重庆医科大学伦理委员会的批准。

1.2 边缘细胞原代培养及鉴定 SD 大鼠乳鼠通过乙醚麻醉后,75%乙醇的容器浸泡 10 min,充分消毒断头;在解剖显微镜下用显微镊去除颞骨听泡骨壳后,用显微镊分离出耳蜗外侧壁的基底回,将血管纹组织完全剥离,0.1%Ⅱ型胶原酶溶解,置于 37℃孵箱中 30 min;取出后离心,弃上清液,用 1 mL MEM 基础培养液与之轻轻吹打混匀后,将细胞悬液置入无菌 6 孔培养板,细胞在 37℃、95%O₂、5%CO₂ 孵箱中培养 24 h 后可贴壁,倒置显微镜下可以观察到边缘细胞的典型形态。由于成纤维细胞贴壁较慢,隔天可用无菌磷酸盐缓冲液(PBS)轻轻冲洗培养板底部能纯化边缘细胞。将纯化后细胞悬液接种于盛有用多聚赖氨酸包被后的盖玻片无菌 6 孔板,当细胞单层生长至盖玻片的 80%时,用免疫荧光染色方法检测细胞角蛋白 18(CK18)在该细胞中的表达。弃培养基,PBS 清洗,4%多聚甲醛固定,0.3% Triton X-100 穿透,5%牛血清清蛋白(BSA)封闭,100 μL 一抗(1:50 稀释)4℃孵育过夜;加入 100 μL 二抗(1:100),避光,孵箱中孵育 30 min;DAPI 工作液染色,抗荧光淬灭剂封片。

1.3 1 800 MHz 辐射系统 该系统由 4 部分组成:高频电磁发生器和频带放大器(购自北京博伦锐科技公司)、计算机、放置于培养箱内的两个矩形电磁波导台(放置 35 mm 细胞培养皿)。暴露程序所有数据均由计算机控制。可以随机设置一个波导台为暴露组,另一个波导台自动成为屏蔽组;也可以手动设置暴露组。

1.4 细胞暴露程序及分组 细胞暴露于 1 800 MHz 辐射系统下,SAR 值选择 2、4 w/kg,时间是 24 h,模式是开 5 min,关 10 min 的手机通话模式。细胞分组:(1)对照组;(2)2 w/kg 暴露组和屏蔽组;(3)4 w/kg 暴露组和屏蔽组;(4)双氧水阳性对照组。

1.5 彗星实验检测细胞 DNA 损伤 彗星实验是公认的检测单个细胞核损伤的技术,具有较高的特异度

和灵敏度^[10],具体方法是弃去培养基,PBS 清洗,胰酶消化,离心弃上清液。PBS 重悬,细胞计数 10⁵/mL。彗星试剂盒(购自美国 Trebigen 公司),低熔点琼脂糖 100℃融化后 60℃水浴箱中备用。吸取 10 μL 细胞悬液加入 60 μL 琼脂糖中反复吹打混匀,吸取含细胞悬液的琼脂糖 10 μL 铺板后在暗盒内 4℃冷却 30 min 待胶凝固。将载玻片放置于 4℃裂解液中裂解 2 h,避光。将载玻片放置于电泳槽中,设置电压 25 V/300 mA,时间 30 min。载玻片取出后蒸馏水清洗,75%、95%无水乙醇中分别脱水。载玻片 4℃中干燥 30 min。SYBR® Green 染色 15 min。荧光显微镜拍照。CASP 软件分析。正常细胞无拖尾现象,而受损细胞的 DNA 表现为像彗星一样的拖尾,细胞的头部基本维持在原来的位置,尾部是损伤后从细胞核迁移的 DNA 片段,观察 DNA 损伤的 3 个参数:尾部 DNA 水平、尾力距和尾长。

1.6 流式细胞技术检测电磁辐射对边缘细胞凋亡水平的影响 将各组细胞分别重悬于 200 μL 1×结合缓冲液中,控制细胞浓度在 10⁶~10⁷ 个/毫升,并分别移入流式管中;每管加入 5 μL 的 annexin V-FITC 和 10 μL 的 PI;避光,冰上孵育 15 min;流式细胞仪上读取每组 10 000 个细胞的凋亡率,计算出平均值。

1.7 荧光酶标仪检测 ROS 的生成 以双氧水为阳性对照。按照 1:1 000 用无血清的 DMEM/F12 培养基稀释 DCFH-DA 终浓度 10 μmol/L。收集细胞后装载探针。去除细胞培养液加入 50 μL 稀释好 DCFH-DA,37℃培养箱内培养 20 min,以无血清培养基洗涤 3 次,每次 5 min;收集细胞,在荧光酶标仪中观察细胞荧光值。激发波长使用 488 nm,发射波长使用 525 nm。

1.8 统计学处理 采用 SPSS18.0 进行分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 边缘细胞原代培养及鉴定 倒置相差显微镜下观察原代培养的大鼠边缘细胞。未纯化前的边缘细胞与长梭形的成纤维细胞一起贴壁生长,边缘细胞大小不一,呈多角形,细胞间境界清楚,颜色较暗。数个细胞生长融合成单层时即呈典型的“铺路石”特征。当细胞堆积成多层时可形成“dome”结构。应用免疫荧光技术检测边缘细胞内 CK-18 的表达,可见 CK-18 在边缘细胞的细胞质内高表达,呈绿色荧光。

2.2 彗星实验 随机选择 200 个细胞作为结果分析,细胞拍摄时一般选择 200 倍。分析软件采用 CASP Lab。双氧水作为阳性对照,细胞有明显的拖尾现象,结果显示手机电磁辐射能量不足以引起边缘细胞 DNA 的损伤。DNA 损伤的 3 个参数与阳性对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

2.3 流式细胞技术检测电磁辐射对边缘细胞凋亡的影响 流式细胞检测结果显示双氧水阳性对照组边缘细胞凋亡率与对照组相比显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$);其余各组同对照组边缘细胞相比,凋亡细胞无明显变化($P>0.05$),说明电磁辐射不会引起边缘细胞凋亡率增加。见表 2。

2.4 电磁辐射对细胞 ROS 生成的影响 本实验采用 DCFH-DA 试剂盒检测暴露于电磁辐射后细胞内 ROS 变化情况,以双氧水作为阳性对照。发现在 4 w/kg 辐射后 ROS 生成量和对照组相比差异有统计

学意义($P<0.05$)。见表 2。说明 4 w/kg 辐射强度下 ROS 生成量显著增加。

表 1 各组彗星实验参数数值($\bar{x}\pm s$)			
组别	尾部 DNA	尾力距(μm)	尾长(μm)
双氧水阳性对照组	18.21 $\pm$ 1.72	16.43 $\pm$ 2.42	24.28 $\pm$ 2.93
对照组	2.45 $\pm$ 1.28	2.38 $\pm$ 1.56	2.66 $\pm$ 1.32
2 w/kg 屏蔽组	2.09 $\pm$ 1.73	2.28 $\pm$ 1.63	1.98 $\pm$ 1.45
2 w/kg 暴露组	2.38 $\pm$ 1.65	2.46 $\pm$ 1.82	2.18 $\pm$ 1.73
4 w/kg 屏蔽组	2.42 $\pm$ 1.63	2.28 $\pm$ 1.38	2.02 $\pm$ 1.46
4 w/kg 暴露组	2.53 $\pm$ 1.43	2.63 $\pm$ 1.57	2.23 $\pm$ 1.89
P	>0.05	>0.05	>0.05

表 2 细胞凋亡率和 ROS 生成量在各组中的表达情况($\bar{x}\pm s$)						
参数	双氧水阳性对照组	对照组	2 w/kg 屏蔽组	2 w/kg 暴露组	4 w/kg 屏蔽组	4 w/kg 暴露组
细胞凋亡(%)	8.66 $\pm$ 2.54	2.05 $\pm$ 1.78	2.23 $\pm$ 1.38	2.48 $\pm$ 1.27	2.35 $\pm$ 1.42	2.26 $\pm$ 1.35
ROS 生成(pg/mL)	4.46 $\pm$ 1.58	1.02 $\pm$ 0.36	1.18 $\pm$ 0.43	1.09 $\pm$ 0.32	1.28 $\pm$ 0.38	2.53 $\pm$ 1.39*

注:与对照组比较,* $P<0.05$

3 讨 论

离体和活体研究中已经证实 ROS 的激活是手机电磁辐射产生生物学效应的主要机制,过量产生的活性氧可以引起细胞不同程度的氧化应激损伤^[11]。耳蜗是保持着较高有氧代谢的器官,在产生 ATP 供应能量的同时也能产生出大量 ROS,因此极易遭到 ROS 的氧化攻击。维持稳定的耳蜗微电位对正常的听力至关重要,而耳蜗微电位的维持则主要取决于耳蜗外侧壁组织的泵机制。血管纹是位于耳蜗外侧壁的重要组织结构,它是由 3 类细胞构成的特殊的含毛血管的复层上皮,最外层是边缘细胞,中间层是中间细胞,最内层是基底细胞。而其中的边缘细胞邻近内淋巴腔,其细胞膜上具有 Na⁺-K⁺-ATP 酶以及 Na⁺/K⁺通道,对维持内淋巴液离子环境以及耳蜗微电位具有重要意义^[12]。一旦边缘细胞受到 ROS 的损害,会影响到内耳的能量供应。

本研究初期仅仅采用离体的短期暴露的方式研究手机电磁辐射对耳蜗边缘细胞的影响,但手机电磁辐射对听力系统的长期影响仍需要在活体研究中进一步证实。本研究中采用的手机通话模式,即开 5 min 关 10 min 暴露模式能更好地探讨手机电磁辐射的生物学效应,更能模拟手机电磁辐射对人体的影响。手机对 SAR 有明确的限制规定,各个国家规定和标准有所不同,但手机在接通瞬间或者信号不足的情况下辐射强度会较平常显著增大,4 w/kg 常常被用来作为电磁辐射热效应的研究,因此本课题组采用的 2、4 w/kg 辐射强度是合理的。本研究发现 1 800 MHz 手机电磁辐射不足以引起耳蜗边缘细胞 DNA 的直接损伤,因为电磁辐射的能量远较电离辐射弱,但通过荧光探针发现了 4 w/kg 辐射强度下有 ROS 的激活,证实了 ROS 的激活是手机电磁辐射产生生物学效应的主要机制,但生成的过量的 ROS 不足以

引起边缘细胞凋亡的增加和细胞 DNA 的损伤,认为 ROS 尽管增加明显,但尚在代偿范围之内;连续暴露于电磁辐射下,ROS 的生成量会逐渐增加,超过细胞和组织的代偿能力后即会出现损伤。有研究认为手机辐射产生的过量的 ROS 可以引起细胞 DNA 损伤, Ca²⁺通道激活,以及热休克蛋白表达增加,但在本研究中未发现明显的损伤,考虑不同组织和细胞对电磁辐射有不同的敏感性^[13-14]。本课题组拟进一步通过动物模型验证手机电磁辐射的长期累积效应。

参考文献

[1] VECCHIA P. Exposure of humans to electromagnetic fields. Standards and regulations[J]. Ann Ist Super Sani-ta,2007,43(3):260-267.

[2] AGARWAL A,DESAI N R,MAKKER K,et al. Effects of radiofrequency electromagnetic waves (RF-EMW) from cellular phones on human ejaculated semen: an in vitro pilot study[J]. Fertil Steril,2009,92(4):1318-1325.

[3] SALFORD L G,BRUN A E,EBERHARDT J L,et al. Nerve cell damage in mammalian brain after exposure to microwaves from GSM Mobile phones[J]. Environ Health Perspect,2003,111(7):881-883.

[4] HARDELL L,CARLBERG M,HANSSON MILD K. Use of Mobile phones and cordless phones is associated with increased risk for glioma and acoustic neuroma[J]. Patho-physiology,2013,20(2):85-110.

[5] GALLONI P,LOVISOLO G A,MANCINI S,et al. Effects of 900 MHz electromagnetic fields exposure on cochlear cells' functionality in rats;evaluation of distortion product otoacoustic emissions[J]. Bioelectromagnet-ics,2005,26(7):536-547.

[6] SECKIN E,SUREN BASAR F,ATMACA S,et al. The effect of radiofrequency radiation generated by a Global System for Mobile Communications source(下转第 595 页)

细胞分泌,可聚集中性粒细胞,促进释放弹性蛋白酶、氧自由基,会损害肺部毛细血管内皮细胞和肺泡上皮细胞,使其通透性增加,进而引发肺间质水肿。IL-8 主要由淋巴细胞、气道上皮细胞、肺泡巨噬细胞,属于趋化因子家族成员之一,可促进炎性细胞的趋化,促使炎性反应的发生。TNF- α 是一种促炎性因子,主要由活化的巨噬细胞、NK 细胞及 T 淋巴细胞产生,可促进 T 细胞产生各种炎性因子,进而引发炎性反应。以上炎性因子相互作用,诱导中性粒细胞不断发生趋化,对肺泡弹性纤维造成破坏,气道重塑狭窄,加剧炎性反应,使 COPD 病情恶化。本文研究中,经过治疗,观察组的炎性因子 IL-6、IL-8、TNF- α 水平显著低于对照组($P<0.05$)。提示患者的炎性水平得到有效改善,进而促进病情恢复。

综上所述,胸腺五肽联合连花清瘟胶囊治疗 AE-COPD 的疗效确切,可显著改善患者肺功能及免疫功能,有效降低机体炎性水平。

参考文献

[1] 夏敬文,董樑,龚益,等.连花清瘟(LHQW)胶囊对慢性阻塞性肺疾病急性加重期(AECOPD)患者诱导痰炎性因子的影响[J].复旦学报(医学版),2014,41(2):243-247.

[2] 庞先琼,赵学会,徐华.胸腺肽联合抗菌药物对老年慢性阻塞性肺疾病急性加重期的治疗效果[J].检验医学与临床,2015,12(13):1922-1923.

[3] 董樑,夏敬文,龚益,等.连花清瘟胶囊治疗慢性阻塞性肺疾病急性加重期的临床疗效和作用机制[J].中成药,2014,36(5):926-929.

[4] 符岛,符裕,林德厚.慢性阻塞性肺疾病急性加重期患者

认知状况的影响因素探讨[J].中南医学科学杂志,2016,44(2):162-165.

[5] 毕贞水,颜景红,王正凯,等.连花清瘟胶囊治疗慢性阻塞性肺疾病患者的效果及其对肺功能、血气指标及炎性因子的影响[J].疑难病杂志,2015,14(9):891-894.

[6] 周红卫,张农.胸腺五肽治疗稳定期重度慢性阻塞性肺疾病的疗效观察[J].四川医学,2014,35(7):871-873.

[7] 杨帆,霍建民.慢性阻塞性肺疾病急性加重期的抗生素应用进展[J/CD].中华临床医师杂志(电子版),2013,7(15):7145-7148.

[8] 冯原,陈斯宁.胸腺五肽肌注对 COPD 急性加重期患者免疫功能的影响[J].山东医药,2014,54(3):82-83.

[9] 江雁琼,贺端明,伍慧妍.慢性阻塞性肺疾病急性加重期 HBP 与 CD64 的表达及意义[J].检验医学与临床,2015,12(14):2034-2036.

[10] 甘丽杏,王健.免疫干预对慢性阻塞性肺疾病患者急性加重期免疫功能及生活质量的影响[J].实用临床医药杂志,2015,19(9):35-37.

[11] 马俊.胸腺肽 $\alpha 1$ 辅助治疗慢性阻塞性肺疾病急性加重期呼吸衰竭的临床研究[J].山西医药杂志,2015,44(22):2615-2617.

[12] 高静珍,陈宝元.盐酸氨溴索不同持续使用时间对慢性阻塞性肺疾病急性加重期的治疗效果[J].中华老年医学杂志,2014,33(3):294-296.

[13] 于彩红.胸腺肽对慢阻肺急性加重期的疗效及 T 淋巴细胞亚群的影响[J].临床肺科杂志,2016,21(4):670-673.

[14] 郁震,曹娟,王红梅,等.噻托溴铵联合沙美特罗替卡松对慢阻肺急性加重期患者免疫功能的影响[J].临床肺科杂志,2016,21(5):795-798.

(收稿日期:2017-08-21 修回日期:2017-10-29)

(上接第 591 页)

on cochlear development in a rat model[J].J Laryngol Otol,2014,128(5):400-405.

[7] ZUO W Q,HU Y J,YANG Y,et al. Sensitivity of spiral ganglion neurons to damage caused by Mobile phone electromagnetic radiation will increase in lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro model[J].J Neuroinflammation,2015,12(1):1-13.

[8] HUANG T Q,LEE M S,OH E H,et al. Characterization of biological effect of 1763 MHz radiofrequency exposure on auditory hair cells[J].Int J Radiat Biol,2008,84(11):909-915.

[9] KESARI K K,KUMAR S,NIRALA J,et al. Biophysical evaluation of radiofrequency electromagnetic field effects on male reproductive pattern[J].Cell Biochem Biophys,2013,65(2):85-96.

[10] NERI M,MILAZZO D,UGOLINI D,et al. Worldwide interest in the comet assay:a bibliometric study[J].Mutagenesis,2015,30(1):155-163.

[11] FRIEDMAN J,KRAUS S,HAUPTMAN Y,et al. Mechanism of short-term ERK activation by electromagnetic fields at Mobile phone frequencies[J].Biochem J,2007,405(3):559-568.

[12] GABAIZADEH R,STAECKER H,LIU W,et al. BDNF protection of auditory neurons from cisplatin involves changes in intracellular levels of both reactive Oxygen species and glutathione[J].Brain Res Mol Brain Res,1997,50(1/2):71-78.

[13] AVCI B,AKAR A,BILGICI B,et al. Oxidative stress induced by 1.8 GHz radio frequency electromagnetic radiation and effects of garlic extract in rats[J].Int J Radiat Biol,2012,88(11):799-805.

[14] DEMIREL S,DOGANAY S,TURKOZ Y,et al. Effects of third generation mobile phone-emitted electromagnetic radiation on oxidative stress parameters in eye tissue and blood of rats[J].Cutan Ocul Toxicol,2012,31(2):89-94.

(收稿日期:2017-09-06 修回日期:2017-11-15)