

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.01.017

· 生物磁学 ·

1950 MHz 射频电磁场对 SRA01/04 细胞周期和凋亡的影响 *

安广洲¹ 周 艳¹ 苗 霞¹ 蒋大鹏¹王亚峰¹ 郭国祯¹ 王晓武¹ 张 晨^{2△} 丁桂荣^{1△}

(1 第四军医大学军事预防医学院放射医学教研室 西安 陕西 710032; 2 工业和信息化部电信研究院 北京 100191)

摘要 目的: 研究显示射频电磁场与白内障的发生关系密切, 为了评价晶状体上皮细胞在射频电磁场诱导的白内障发生中的作用, 本实验探讨了 1950 MHz 射频电磁场暴露对人眼晶状体上皮细胞株(SRA01/04)细胞周期与凋亡的影响。**方法:** 将处于对数生长期的 SRA01/04 细胞暴露或假暴露于频率为 1950 MHz, 比吸收率(SAR)为 2.79 W/kg 的射频电磁场中, 每天暴露 1 h, 每周暴露 5 天, 连续暴露 4 周。暴露结束后立即收集细胞, 显微镜下观察细胞形态变化, 噻唑蓝(MTT)法检测细胞存活力, 流式细胞仪(FCM)检测细胞周期与凋亡。**结果:** 与假辐照组相比, 暴露组细胞形态未见明显变化; 细胞存活力、细胞周期分布及细胞凋亡率亦无显著改变($P>0.05$)。**结论:** 1950 MHz 射频电磁场暴露 4 周对 SRA01/04 细胞的形态、活力、周期以及凋亡均无明显影响, 提示在本实验条件下 1950 MHz 射频电磁场不会诱发白内障的发生。

关键词: SRA01/04 细胞; 存活力; 细胞周期; 细胞凋亡

中图分类号: Q64, R146 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)01-82-04

Effects of 1950 MHz Radiofrequency Electromagnetic Fields
on Cell Cycle and Apoptosis in SRA01/04 Cells*AN Guang-zhou¹, ZHOU Yan¹, MIAO Xia¹, JIANG Da-peng¹,WANG Ya-feng¹, GUO Guo-zhen¹, WANG Xiao-wu¹, ZHANG Chen^{2△}, DING Gui-rong^{1△}

(1 Department of Radiation Medicine, College of Preventive Medicine, Fourth Military Medical University,

Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 China Academy of Telecommunication Research of Ministry of Industry and Information Technology, Beijing, 100191, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of 1950 MHz radiofrequency electromagnetic fields on cell cycle and apoptosis in human lens epithelial (SRA01/04) cells and clarify the role 1950 MHz radiofrequency electromagnetic fields plays in the cataractogenesis. **Methods:** SRA01/04 cells in exponential growth phase were exposed or sham-exposed to 1950 MHz radiofrequency electromagnetic fields at a specific absorption rate (SAR) of 2.79 W/kg for 1 hour one day, 5 days every week. After 4 weeks exposure, cells were collected instantly. The cell morphology was observed under invert microscope, and the cell viability was detected by MTT assay. Cell cycle and apoptosis of SRA01/04 cells were examined by flow cytometry. **Results:** Compared with sham-exposed cells, the shape of exposed cells showed no obvious change. Moreover, the cellular viability, cell cycle distribution and apoptosis between exposure group and sham group also showed no significant difference ($P>0.05$). **Conclusion:** The results suggested that 4-weeks 1950 MHz radiofrequency electromagnetic fields exposure could not affect cellular morphology, viability, cell cycle and apoptosis in SRA01/04 cells, these data suggested that 1950 MHz radiofrequency electromagnetic fields couldn't induce cataract under this experimental condition.

Key words: Radiofrequency electromagnetic fields; Viability; Cell cycle; Apoptosis

Chinese Library Classification(CLC): Q64, R146 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)01-82-04

前言

射频电磁场是指频率在 100 kHz~300 GHz 的电磁场, 主要由手机、基站、广播电视发射塔、微波炉、雷达等产生, 在现实生活中广泛存在^[1,2]。随着使用者和产生设备的增多, 射频电磁场

在环境中的辐射范围和强度也在不断增加, 其对人体健康的危害日益受到关注。第三代移动通信技术(3G)采用的通用移动通信系统(UMTS)将成为未来通讯的主要模式, 但有关这种信号模式射频电磁场的生物学效应研究尚处于起步阶段。

晶状体无血管、神经分布且含水量很高, 是对射频电磁场

* 基金项目: 国家“973”项目(2011CB503705); 国家自然科学基金项目(31170798, 81102091)

作者简介: 安广洲(1987-), 男, 硕士研究生, 主要研究方向: 电磁辐射生物学

△ 通讯作者: 丁桂荣, E-mail: dingzhao@fmmu.edu.cn;

张晨, E-mail: zhangchen@emcrite.com

(收稿日期: 2013-05-24 接受日期: 2013-06-19)

较为敏感的组织之一。研究显示,射频电磁场可作用于晶状体诱发白内障^[1,3,4]。由于晶状体上皮细胞在维持晶状体代谢动态平衡和透明度方面发挥重要作用,它的功能失调被认为是白内障病变的早期事件^[5,6],截至目前,关于 3G 手机辐射对人眼晶状体上皮细胞的影响,尚未见报道。本实验以人眼晶状体上皮细胞(SRA01/04)为研究对象,探讨 1950 MHz UMTS 射频电磁场对其周期和凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

细胞培养箱(HERAcell 240i,美国 Thermo 公司),荧光显微镜(德国 Leica 公司),酶标仪(美国 Bio-Rad 公司),流式细胞仪(美国 BD 公司);MTT、PI 和 DMSO 均购自美国 Sigma 公司,DMEM、胎牛血清(美国 Gibco 公司),凋亡试剂盒(美国 BD 公司)。

1.2 射频电磁场辐照系统

辐照系统(sXc-1950 MHz)购自瑞士 IT'IS 公司,该系统由培养箱中 2 个波导腔及外部控制装置组成。每个波导腔可放置 6 个细胞培养皿(直径 35 mm),其中一个波导腔用于细胞辐照,另一个波导腔不产生射频电磁场用于细胞假辐照。由计算机对整个细胞暴露系统进行比吸收率($0\sim 4.0\text{ W/Kg}$)定量和全反馈控制。整个辐照过程中,细胞处于($37\pm 0.1\text{ }^{\circ}\text{C}$),5% CO_2 的孵箱中,假辐照和辐照培养的温差不超过 $0.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。使用美国 Narda 7620 型微波辐射测试仪和惠普 8592C 型频谱分析仪定期测试暴露参数。

1.3 细胞培养

人眼晶状体上皮细胞株(SRA01/04)购自中国医学科学院细胞库。细胞在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温,5% CO_2 饱和湿度培养箱中培养,取对数生长期细胞用于实验。

1.4 分组及处理

将细胞接种于直径 35 mm 培养皿中,接种密度为 4000 个

/皿,暴露组与假暴露组各接种 6 皿细胞。暴露参数如下:频率为 1950 MHz, SAR 值为 2.79 W/kg , UMTS 信号为通话模式,连续暴露。细胞每天接受 1 h 连续暴露,每周暴露 5 天(周一至周五)。假暴露组细胞置于同一孵箱的另一波导腔中,不接受射频电磁场辐射。两组细胞在每周一暴露或假暴露前和周三当天暴露后换液,周五进行传代,传代接种时每皿细胞密度仍是 4000 个/皿,周末生长两天,然后重复上述步骤进行下一周射频电磁场暴露。共计暴露 4 周。

1.5 MTT 法检测细胞存活力

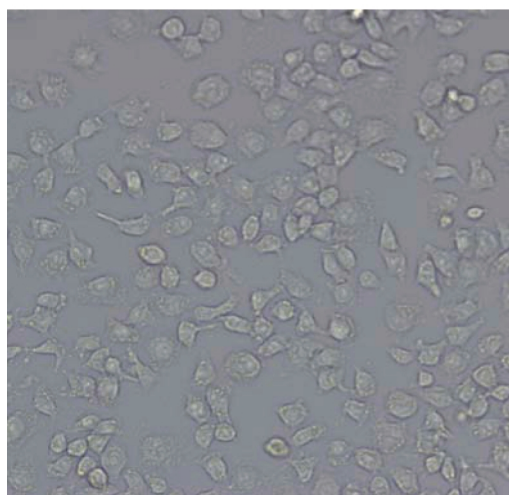
细胞暴露结束后,0.25% 胰酶消化为单细胞悬液,离心收集细胞沉淀,用含 10% 血清的 DMEM 培养基重悬,制成单细胞悬液,调整细胞密度至 1×10^4 个/mL。用移液器吸取 200 μL 稀释后的细胞悬液接种到 96 孔板上,每组 6 个复孔。培养 48 h 后每孔加入 5 mg/mL MTT 溶液 20 μL 孵育 4 h 后小心吸弃孔内培养液,每孔加入 DMSO 150 μL ,低速震荡 10 min,使结晶充分溶解。选择 490 nm 波长,在酶标仪上测定各孔吸光度值,计算每组 OD 值的算术平均数绘制柱形图。

1.6 流式细胞仪检测细胞周期

细胞暴露结束后,0.25% 胰酶消化为单细胞悬液,置于 10 mL 离心管,收集细胞沉淀,预冷的 PBS 洗 3 次(2000 rpm, 5 min/次),弃上清。将 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷的 70% 乙醇(由 0.01 mol/L PBS 稀释)3 mL 加入离心管,吹打均匀,封口膜封口, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜。检测前,离心(2000 rpm, 5 min)、PBS 洗涤,重复 2 次。加入 200 μL PBS 并将细胞吹悬,用含 0.01% RNase 和 0.5% 碘化丙啶(PI)4 $^{\circ}\text{C}$ 处理细胞 20 min,过 300 目尼龙网,最后用流式细胞仪在 488 nm 激发波长下测定细胞各周期 DNA 含量,并计算增殖指数 PI(PI=S 期和 G2 期细胞比例之和/G1 期、S 期和 G2 期细胞比例之和)。

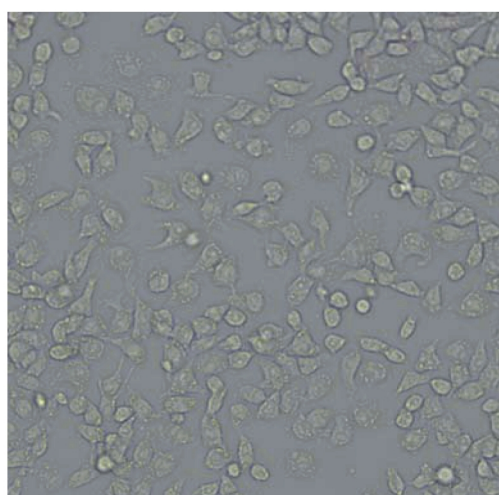
1.7 流式细胞仪检测细胞凋亡

按照凋亡试剂盒说明书操作。细胞暴露结束后,0.25% 胰酶消化为单细胞悬液,收集到 10 mL 离心管中,1000 rpm 离心 5 min,弃去培养液,用预冷的 PBS 洗涤 2 次(1000 rpm, 5 min/



假暴露组细胞形态 $\times 200$

Cell morphology in sham group $\times 200$



暴露 4 周后细胞形态 $\times 200$

Cell morphology after 4 weeks exposure $\times 200$

图 1 射频电磁场暴露 4 周后 SRA01/04 细胞形态变化

Fig.1 Cell morphology of SRA01/04 cells after 4 weeks RF exposure

次),用 $1\times$ 孵育缓冲液调节细胞浓度为 1×10^6 个/mL,取100 μ L的细胞悬浮液(1×10^5 个细胞)到5 ml的流式管中,加5 μ L的 FITC AnnexinV 和5 μ L PI,轻微震荡细胞,常温(25 $^{\circ}$ C)避光孵育15 min,然后在每个样品管中加入400 μ L $1\times$ 孵育缓冲液,最后在流式细胞仪上进行检测。

1.8 统计学分析

两组样本间均数比较采用t检验,用SPSS 17.0软件包统计软件处理。 $P<0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 射频电磁场暴露对细胞形态的影响

倒置显微镜下观察发现,与假暴露组相比,暴露组细胞形态没有发生明显改变,见图1。

2.2 射频电磁场暴露对细胞存活力的影响

与假暴露组相比,SRA01/04细胞射频电磁场暴露4周后,细胞存活力未见明显改变($P>0.05$),见图2。

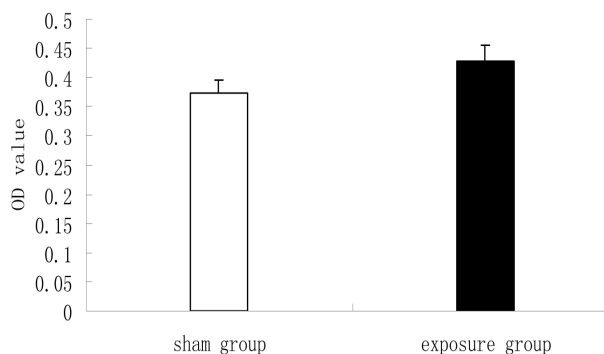


图2 射频电磁场暴露4周后SRA01/04细胞存活力的变化

Fig.2 Cell viability of SRA01/04 cells after 4 weeks RF exposure

注:与假暴露组相比, $P>0.05$ 。

Note: compared with sham group, $P>0.05$.

2.3 射频电磁场暴露对细胞周期的影响

与假暴露组相比,SRA01/04细胞射频电磁场暴露4周后,细胞周期各期分布未见明显改变($P>0.05$),见图3。假暴露组PI均值=0.1665,暴露组PI均值=0.2441,但两组间PI差异没有统计学意义($P>0.05$)。

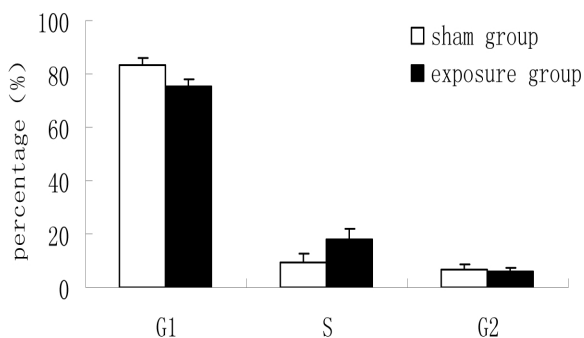


图3 射频电磁场暴露4周后SRA01/04细胞周期的变化

Fig.3 Cell cycle of SRA01/04 cells after 4 weeks RF exposure

注:细胞各期与假暴露组相比, $P>0.05$ 。

Note: each phase of cell cycle compared with sham group, $P>0.05$.

2.4 射频电磁场对细胞凋亡的影响

暴露组与假暴露组相比,其细胞坏死率、晚期细胞凋亡率、早期细胞凋亡率以及活细胞比例均无统计学差异($P>0.05$),见图4。

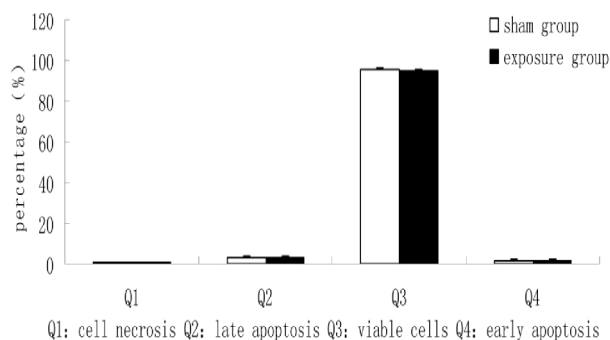


图4 射频电磁场暴露4周后SRA01/04细胞凋亡的变化

Fig.4 Apoptosis in SRA01/04 cells after 4 weeks RF exposure

3 讨论

细胞的形态与功能有着密切联系,细胞出现肿胀或空泡化等形态变化会严重影响细胞的功能。有关长期手机辐照(尤其是连续暴露超过4周)对细胞形态的影响报道较少。在本实验中,我们对每次暴露结束后的细胞都进行了形态学观察,直到最后一次暴露结束,结果未发现细胞形态有明显改变。

细胞周期是指能持续分裂的真核细胞从一次有丝分裂完成到下一次有丝分裂结束的循环过程。本实验研究结果显示,SRA01/04细胞经4周射频电磁场暴露后细胞周期与存活力未见明显改变,该结果这与Zeni和Lee等的报道一致,Zeni等将大鼠嗜铬瘤细胞暴露于1950 MHz,10 W/Kg的射频电磁场(3G,UMTS)中24小时,未发现细胞周期有统计学差异的改变^[7]。Lee等将人乳腺癌MCF-7细胞置于837 MHz射频电磁场中单独暴露或837 MHz与1950 MHz射频电磁场中联合暴露(SAR值均为4 W/kg)1 h,同样未发现细胞周期及其相关的调控蛋白发生改变^[8]。但是,也有学者报道,人眼晶状体上皮细胞经1.8 GHz,4 W/kg的射频电磁场暴露24 h后G1/G0期细胞比例增大,细胞增殖变慢^[9];兔眼晶状体上皮细胞经2450 MHz,0.50,1或2 mW/cm²的射频电磁场暴露8 h后出现G1/G0阻滞,G1/G0期细胞比例增大,细胞增殖变慢^[10,11]。需要指出的是,后者实验采用的细胞类型,暴露系统和暴露参数均与本实验不同。

细胞凋亡又称程序性细胞死亡,是细胞受高度精密调节的、有序地走向死亡的过程。有关射频电磁场对细胞凋亡的影响也存在争议。本实验研究结果显示,SRA01/04细胞经4周射频电磁场暴露后细胞凋亡未见明显改变,该结果与Yao等的报道一致,Yao等将人眼晶状体上皮细胞间断暴露于频率为1.8 GHz,SAR分别是1 W/Kg、2 W/Kg、3 W/Kg、4 W/Kg的射频电磁场中24 h,未发现各剂量组与假暴露组之间的凋亡率有明显差异^[9]。

细胞周期与凋亡是细胞所具有的两种不同的生理活动,两者对于维持组织器官的正常功能发挥重要作用。据报道,人眼

晶状体上皮细胞的周期与凋亡异常与白内障的发生密切相关^[5, 12, 13]。在本实验中,我们观察了4周手机辐射对人眼晶状体上皮细胞形态、存活力、周期及凋亡的影响,未发现阳性结果。需要指出的是本次实验采用的信号为3G手机信号,连续暴露模式,与以往学者采用的GSM信号、间断暴露不同,比如:有学者研究发现,1800 MHz射频电磁场间断暴露可以引起DNA链的断裂和蛋白表达的改变^[14, 15]。由于本次实验累积暴露时间与现实生活中手机使用时间相比仍是非常较短暂的,并且本实验只采用了一种手机信号进行了研究,故本实验结果仍不能排除射频电磁场对人眼晶状体的危害作用。

近年来,低剂量长期射频电磁辐射的生物学效应研究已经成为本领域的热点。本实验首次探讨了1950 MHz射频电磁场暴露4周对SRA01/04细胞形态、存活力、周期以及凋亡的影响,没有发现阳性结果,据此推测,在此实验条件下1950 MHz射频电磁场不会诱发白内障的发生,由于白内障的发生是一个长期的过程,并且人们在环境射频电磁场中的暴露也是长期的,具有累计效应。由于实验条件的限制,本实验用的细胞只暴露了4周时间,将来我们拟延长细胞的暴露时间,再重复检测上述指标,同时还将利用彗星实验、 γ -H2AX等方法检测SRA01/04细胞DNA链的损伤水平,以明确1950 MHz射频电磁场辐射对人晶状体上皮细胞的影响,实验结果不仅可以丰富手机辐射的生物学效应理论,还为帮助人们正确认识手机辐射对人体健康的危害,消除心理恐慌具有重要意义。

参考文献(References)

- [1] Elder J A. Ocular effects of radiofrequency energy[J]. Bioelectromagnetics, 2003, Suppl 6: S148-S161
- [2] George D F, Bilek M M, Mckenzie D R. Non-thermal effects in the microwave induced unfolding of proteins observed by chaperone binding[J]. Bioelectromagnetics, 2008, 29(4): 324-330
- [3] Lipman R M, Tripathi B J, Tripathi R C. Cataracts induced by microwave and ionizing radiation[J]. Surv Ophthalmol, 1988, 33(3): 200-210
- [4] Foster M R, Ferri E S, Hagan G J. Dosimetric study of microwave cataractogenesis[J]. Bioelectromagnetics, 1986, 7(2): 129-140
- [5] Lee E H, Wan X H, Song J, et al. Lens epithelial cell death and reduction of anti-apoptotic protein Bcl-2 in human anterior polar cataracts[J]. Mol Vis, 2002, 8: 235-240
- [6] Bhat S P. The ocular lens epithelium[J]. Biosci Rep, 2001, 21(4): 537-563
- [7] Zeni O, Sannino A, Sarti M, et al. Radiofrequency radiation at 1950 MHz (UMTS) does not affect key cellular endpoints in neuron-like PC12 cells[J]. Bioelectromagnetics, 2012, 33(6): 497-507
- [8] Lee K Y, Kim B C, Han N K, et al. Effects of combined radiofrequency radiation exposure on the cell cycle and its regulatory proteins[J]. Bioelectromagnetics, 2011, 32(3): 169-178
- [9] Yao K, Wu W, Yu Y, et al. Effect of superposed electromagnetic noise on DNA damage of lens epithelial cells induced by microwave radiation[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008, 49(5): 2009-2015
- [10] Yao K, Wang K J, Tan J, et al. Low-intensity microwave blocks cell cycle and regulate cell cycle related gene expression in rabbit lens epithelial cells [J]. Chinese Journal of Ophthalmology, 2004, 40(12): 836-840
- [11] Wang K J, Yao K, Lu D Q, et al. Effect of low-intensity microwave radiation on proliferation of cultured epithelial cells of rabbit lens[J]. Chinese Journal of Industrial Hygiene and Occupational Diseases, 2003, 21(5): 346-349
- [12] Michael Wormstone I. Posterior Capsule Opacification: A Cell Biological Perspective [J]. Experimental Eye Research, 2002, 74(3): 337-347
- [13] Awasthi N, Guo S, Wagner B J. Posterior capsular opacification: a problem reduced but not yet eradicated [J]. Arch Ophthalmol, 2009, 127(4): 555-562
- [14] Diem E, Schwarz C, Adlkofer F, et al. Non-thermal DNA breakage by mobile-phone radiation (1800 MHz) in human fibroblasts and in transformed GFSH-R17 rat granulosa cells in vitro [J]. Mutat Res, 2005, 583(2): 178-183
- [15] 曾群力, 翁瑜, 陈光弟, 等. 1800MHz 射频电磁场对人乳腺癌细胞蛋白质表达的影响[J]. 中华预防医学杂志, 2006, 40(3): 153-158
- Zeng Qun-li, Weng Yu, Chen Guang-di, et al. Effects of 1800MHz radiofrequency electromagnetic on the expression of protein in breast cancer cells[J]. Chinese journal of preventive medicine, 2006, 40(3): 153-158