

电磁脉冲对 C57BL/6J 胸腺的作用*

张华伟 刘军叶 周咏春 郭娟 张琰君 郭国祯[△]

(第四军医大学放射医学教研室 陕西 西安 710032)

摘要 目的 观察电磁脉冲 Electromagnetic Pulse (EMP) 对 C57BL/6J 小鼠胸腺的影响。方法 50 只 C57BL/6J 小鼠按体重区组随机化分为对照组和辐照组, 每组 25 只。EMP 每天照射 400 次, 连续照射 7 天, 照后 1d (天)、3d、7d、14d、28d 共 5 个时间点杀取胸腺。2 只辐照组和 2 只对照组杀取的胸腺做 HE 染色, 观察其病理改变; 3 只辐照与 3 只对照组的小鼠, 杀后称取小鼠的体重和胸腺的重量, 计算胸腺指数, 然后提取 T 淋巴细胞进行计数, 同时取小鼠外周血检测其中的 IL-4 的水平。结果 照后 1d 胸腺的切片没有明显改变。7 天后, 胸腺开始有出血, 结构不清, 胸腺指数呈现递减的趋势, 但辐照组与对照组没有的差异没有统计学意义; T 淋巴细胞数的变化也呈现先减后增的趋势, 在第 1d、14d、28d 辐照组与对照组的差异没有统计学意义, 在第 3d 和 7d 辐照组的细胞数小于对照组的细胞数 ($P < 0.05$), 辐照组与对照组的外周血 IL-4 水平的差异也没有统计学意义。结论 电磁脉冲对雄性 Balb/c 小鼠胸腺结构造成一定的损伤, 但胸腺指数改变不显著, T 淋巴细胞数量增加。表明 EMP 对胸腺有一定的作用, 但是胸腺不是 EMP 作用的敏感器官。

关键词 电磁脉冲 胸腺 淋巴细胞

中图分类号: Q64 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273 (2012) 05-810-05

Effects of Electromagnetic Pulse on the T Lymphocyte in the Thymus of Mice*

ZHANG Hua-wei, LIU Jun-ye, ZHOU Yong-chun, GUO Juan, ZHANG Yan-jun, GUO Guo-zhen[△]

(Department of Radiation Medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of electromagnetic pulse on T lymphocyte of thymus in the C57BL/6J mouse. **Methods:** 50 male Balb/c mice, weighing (18~22)g, were sham or whole-body exposed to EMP at 200kV/m for 400 pulses per day, which lasted for one week. The thymus from the mice on the 1st d (day), 3rd d, 7th d, 14th d and 28th d after exposure was used. The thymus from two mice of the exposure group and two mice of the sham group were cut and stained with hematoxylin-eosin, then the pathological changes were detected by optical microscope; The weight of the body and thymus of 3 mice of the exposure group and 3 mice of the sham group were weighed for the thymus index; The lymphocyte was extracted from the thymus; Then the blood serum was collected to check out the content of the IL-4 in the peripheral blood. **Results:** There was no pathological changes on the first and third days after exposure, however, there was hemorrhage, the structure of thymus changes from the 7th day; The thymus index showed the trend of decline, but there was no difference between the sham group and the exposure group; The number of T lymphocyte between the sham group and the exposure group on the 1st, 14th and 28th day had no significant deviation, but the difference on the 3rd and 7th day had statistical meaning ($P < 0.05$); The difference of the content of IL-4 in the peripheral blood between the sham group and the exposure group had no statistical meaning. **Conclusions:** The structure of the thymus was destroyed, the thymus index was in the declining trend, the number of T lymphocyte in the thymus declined, and the content of IL-4 had no difference. EMP had some effects on T lymphocyte in the thymus, but it is not the sensitive target of EMP on the C57BL/6J mouse.

Key words: EMP; Thymus; T lymphocyte

Chinese Library Classification (CLC): Q64 Document code: A

Article ID: 1673-6273 (2012) 05-810-05

前言

随着科技的高速发展, 各类电子产品为工作和生活提供便利的同时, 电磁辐射污染也正日益增加, 对电磁辐射的生物学效应、发生机制及其防治的研究已经成为全社会广泛关注的焦点。电磁脉冲 (electromagnetic pulse, EMP) 是一种宽频、高能

的非电离辐射, 在工业、农业、国防等各领域的使用日益广泛, 对于其生物学效应的研究正在不断增加。

近些年来, EMP 对于免疫系统生物效应的影响日益得到关注。有关电磁辐射对生物体免疫系统影响的研究文章非常多, 但是相互矛盾的不少^[1]。电磁场参数、照射时间、实验对象、研究方法等条件不同, 对免疫细胞的影响作用也不同, 表现为

* 基金项目 国家自然科学基金 (Nos.30972430, 81072272)

作者简介 张华伟 (1983), 男, 研究生, 主要研究方向 电磁辐射的生物学效应。E-mail: zhanghw1212@yahoo.cn

[△]通讯作者 郭国祯, Email: guozhen@fmmu.edu.cn

(收稿日期: 2011-10-07 接受日期: 2011-10-31)

淋巴细胞数量受到促进或者抑制,增殖功能下降、增强或不变^[2]。本文重点探讨 EMP 对于胸腺 T 淋巴细胞的作用特点,进一步阐明 EMP 对于免疫系统的作用规律。

1 材料和方法

1.1 动物及分组

雄性 Balb/c 小鼠 50 只,8~10 周,体重 18~22 g,由第四军医大学实验动物中心提供。将小鼠按体重区组随机化分为辐照组和对照组。

1.2 动物布放及电磁脉冲辐照

将辐照组放入位于电磁脉冲场的 30cm×30cm×30cm 有机玻璃盒中进行全身照射,取自由体位。照射参数:场强 200kV/m,脉冲前沿 3.5ns,脉宽 14ns,重复频率 1Hz。每天照射 400 次,连续 7 天。对照组置于相同条件下,不予以 EMP 照射。

1.3 仪器与试剂

EMP 发生器:西北核技术研究所研制;TS-12G 型生物组织自动脱水机(湖北省医用电子仪器厂);ZMN-7803 型全自动组织包埋机(常州华利电子公司);RM-2135 型石蜡切片机(德国 Leica 公司);Olympus CH 型显微镜(BH-2 日本工业株式会社);淋巴细胞分离液(天津市灏洋生物制品科技有限责任公司);L500 低速自动平衡离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司);HyClone 改良型 RPMI-1640 培养基(赛默飞世尔生物化学制品北京有限公司);小鼠白介素-4 定量酶联检测试剂盒(上海森雄科技实业有限公司)。

1.4 HE 染色

1) 小鼠经水合氯醛腹腔注射麻醉后,4%多聚甲醛进行心脏灌注固定,取出胸腺用上述固定液固定。2) 胸腺用梯度酒精

脱水、透明、石蜡包埋。3) 按冠状面切片(片厚 2μm)。4) HE 常规染色。

1.5 胸腺指数的测定

将小鼠称重后断头处死,取胸腺称重,按下述公式计算胸腺指数:胸腺指数 = 胸腺重量(mg) / 小鼠体重(g) × 100%

1.6 胸腺淋巴细胞数的测定

1) 断头处死小鼠,取出胸腺,用 PBS 清洗,放在含有 1640 培养液的平皿中。2) 将胸腺放在 200 目的筛网上,用眼科剪剪碎脾脏,再用粗玻璃棒研磨胸腺碎片。3) 用 1640 培养液冲洗研磨出的细胞至玻璃皿中。4) 用吸管将皿中的胸腺细胞吸入离心管中,以 800 转/分钟的速度离心 4 分钟,将废液吸去,再吸入 3ml 新鲜的 1640 培养液重悬胸腺细胞。5) 将 5ml 的淋巴细胞分离液加到细胞悬液的下层,以 1700 转/分钟的速度,离心 13 分钟,离心后,将离心管中的第二层的云雾状的细胞层吸出至另一离心管中。6) 用 1640 培养液将分离出的淋巴细胞洗两遍,800 转/分钟,离心 10 分钟。7) 将淋巴细胞重悬以备计数。8) 计数:细胞浓度 = (计数板四角大方格内的细胞总数 / 4) × 10000 × 稀释倍数(个)/ml。

1.7 外周血白介素-4 的测定

按照试剂盒的说明步骤,先建标准曲线,然后检测样品的吸光度值,根据 OD 值反推外周血中白介素-4 的含量。

2 结果

2.1 EMP 辐照对胸腺形态学的影响

照后第 1 天和第三天脾脏的切片没有明显改变。从第 7 天开始,胸腺开始充血,淋巴细胞数增加。第 28 天形态学改变开始逐渐恢复。

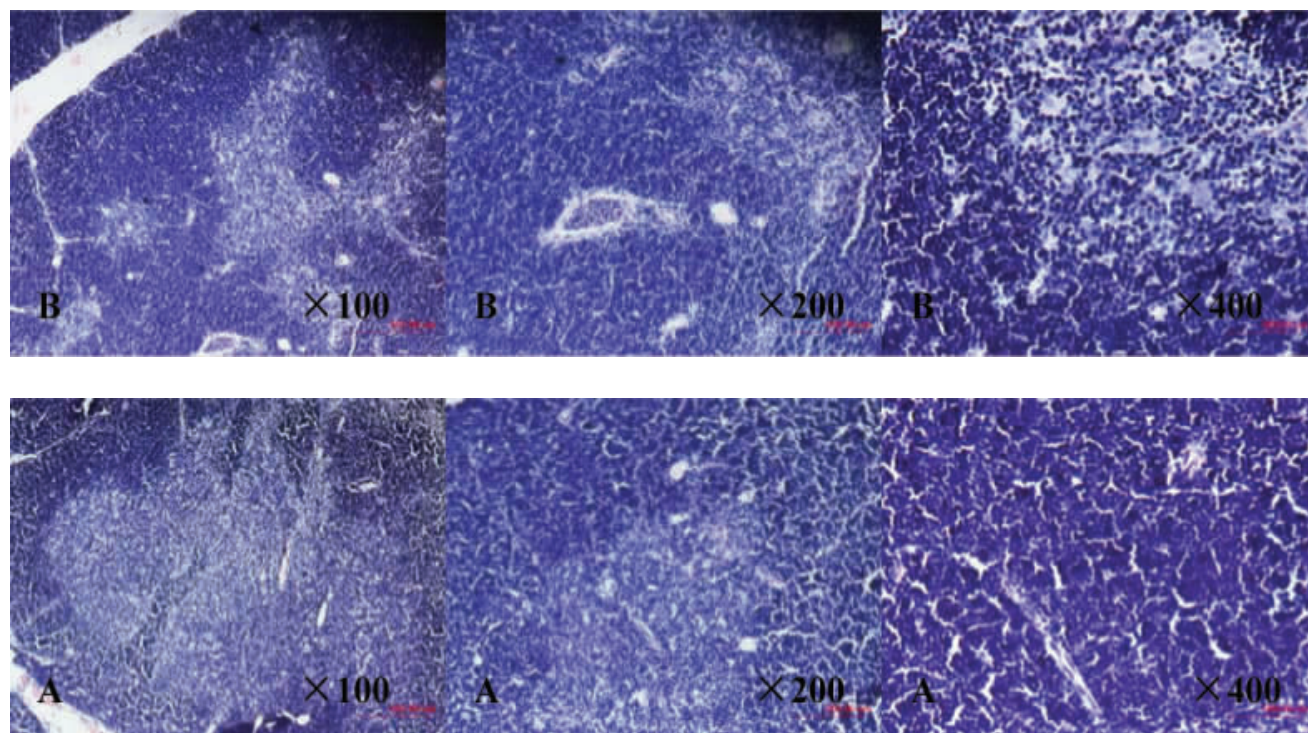


图 1 EMP 照后第 7 天胸腺 HE 染色结果。A 辐照组,B 对照组

Fig.1 The results of HE staining of the thymus on the 7th day after EMP

A exposure group,B sham group.

2.2 EMP 辐照对胸腺指数的影响

胸腺指数的结果如图 2 所示。胸腺指数呈递减的趋势,但是辐照组和对照组的差异没有统计学意义,表明随着小鼠的

衰老,胸腺是在不断地萎缩,这可能一个生理过程,EMP 对胸腺的重量没有显著的影响。

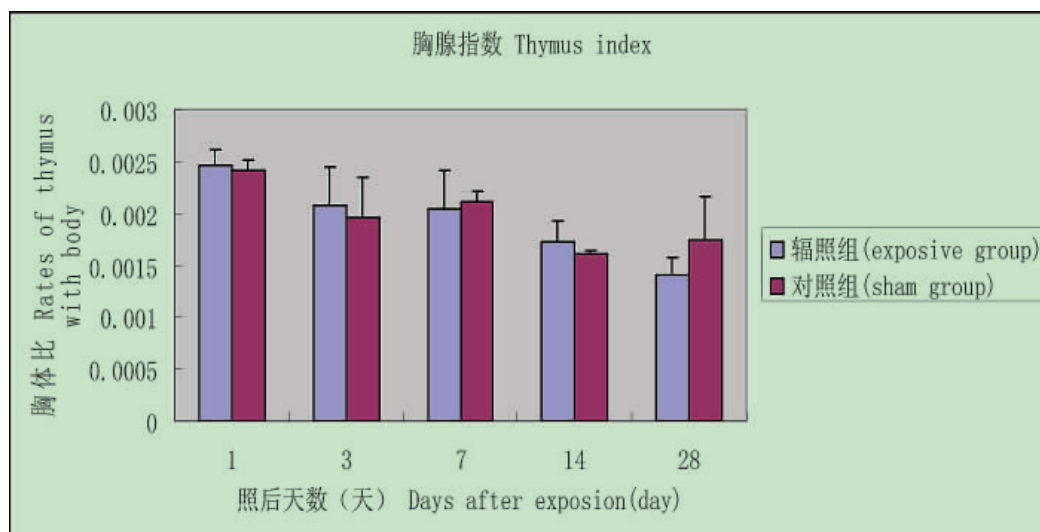


图 2 EMP 照后胸腺指数的变化

Fig.2 Changes of the thymus index after EMP

2.3 EMP 辐照对胸腺 T 淋巴细胞数量的影响

胸腺 T 淋巴细胞数量的改变的结果如图 3 所示。照后第 1 天辐照组的胸腺淋巴细胞数较对照组差异不显著,照后第 3、7 天较对照组减少,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。照后 14、28 天

较对照组无差异。胸腺 T 淋巴细胞的数量呈现先减后增的趋势,表明 EMP 对胸腺淋巴细胞可能有抑制作用,但是胸腺的 T 淋巴细胞数很快恢复。

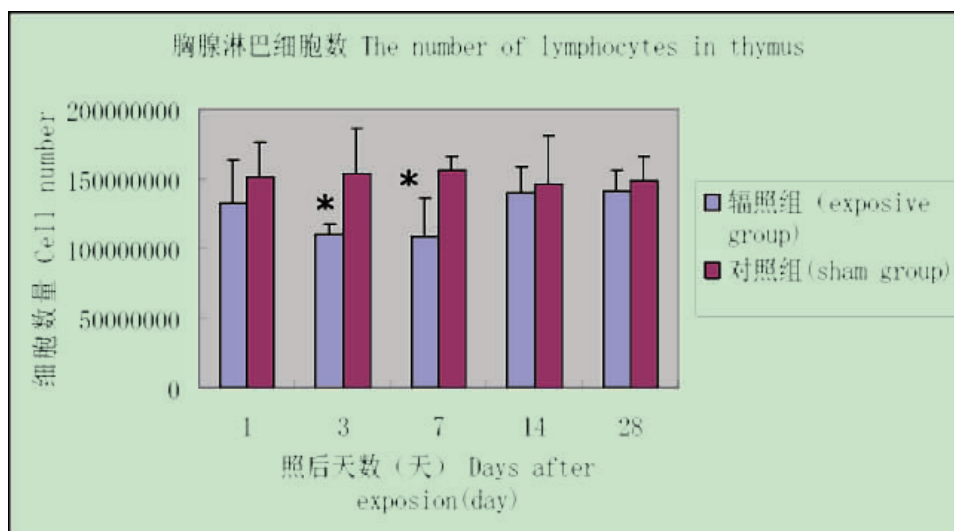


图 3 EMP 照后胸腺淋巴细胞数的变化

Fig.3 Changes of the number of lymphocytes in thymus after EMP

2.4 EMP 辐照对小鼠外周血白介素-4 含量的影响

通过 ELISA 试剂盒检测小鼠外周血中的 IL-4 的含量,结果如图所示,辐照组和对照组的差异没有统计学意义,在表明 EMP 可能对外周血中 IL-4 的含量没有影响。

3 讨论

电磁辐射对免疫系统的造成各种影响^[3]。EMP 对淋巴细胞的作用比起其它波段的电磁辐射作用更加显著^[4]。但是低强度

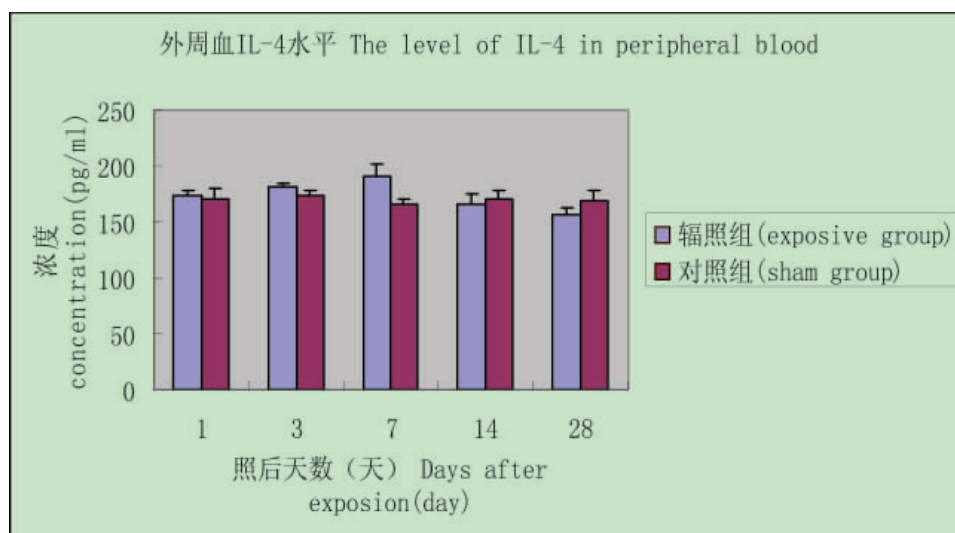


图4 EMP照后外周血IL-4水平的变化

Fig.4 Changes of IL-4 content in peripheral blood after EMP

的电磁脉冲场对免疫系统产生的影响表现出一定的“时间窗效应”,在出现影响后,开始具有自我适应性^[5]。有报道称,不同强度微波辐射后,对T淋巴细胞的数量,功能等方面具有不同程度的影响,且表现为一定的双效性,即一定强度内的微波辐射对T细胞功能起到促进作用,超过一定强度,则表现出抑制作用,而且,由于各实验室所用的微波频率、辐射功率密度、吸收率及时间等实验因素不同,得到的结果也不尽相同^[6]。胸腺是重要的中枢免疫器官,电磁脉冲对胸腺的作用将会影响机体的免疫功能,尤其是T淋巴细胞的免疫作用。

有关电磁辐射对胸腺组织的病理改变的报道不多。金华等对电磁脉冲对胸腺组织的病理改变做了长期的观察,发现早期皮质细胞变性坏死,髓质内可见灶状出血;后期可见皮髓质比例倒置,髓质内纤维组织增生。晚期胸腺出现萎缩,淋巴细胞数有所恢复^[7]。孙侠等研究发现,微波的高强度辐照组小鼠胸腺体积略减少,镜下淋巴细胞数量减少,胸腺小体略增多^[8]。Thrall等用150 W/cm²的微波照射狗80分钟,发现狗淋巴组织出现急性坏死表现,胸腺髓质和脾出血,微波强度越大,出现病理变化的可能性越大^[9]。从本实验的短期结果显示,EMP对胸腺的结构也造成一定的损伤,充血明显,结构不清。病理改变可能与照射的强度和时间,以及观察的时间有关系。

朱世忠发现在极低频电磁场的作用下,低、中剂量处理后,胸腺指数增加,但在高剂量组却表现为下降^[10]。孙侠等研究了微波对胸腺的影响,各组间胸腺重量差异均无显著性,辐照组胸腺指数与对照组相比,差异也无显著性^[8]。孟旭英等发现电磁辐射作用后动物胸腺重量指数下降^[11]。本实验所采用的是200 kV/m的高能电磁脉冲源,在辐照后,胸腺指数虽呈下降趋势,但是与对照组没有显著差异。据文献报道,一定强度的正弦磁场能促进人外周血淋巴细胞生长^[12]。用微波长期照射兔子的试验中发现,微波使T淋巴细胞的数量明显减少^[2]。不同的照射条件和对象,可能得到的结果都不一致。本实验通过分离胸腺中的淋巴细胞进行计数,结果发现在照后第3天和第7天的时候淋巴细胞数量减少,随后数量逐渐回升。表明200 kV/m EMP

对胸腺淋巴细胞有短暂的抑制作用,但胸腺淋巴细胞具有可恢复性。

EMP对小鼠外周血IL-4水平的影响 胸腺是T细胞分化、发育和成熟的场所,从骨髓迁入的淋巴样细胞,经过辐照的分化发育过程,最终成为功能性的CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞,输出胸腺,定位于外周淋巴器官和组织。CD4⁺T细胞又分为Th1和Th2细胞。Th1的主要效应功能是增强吞噬细胞介导的抗感染机制,特别是抗细胞内寄生菌的感染,Th2分泌各种细胞因子(IL-4, IL-5, IL-6, IL-10及IL-13),主要作用是增强B细胞介导的体液免疫应答。CD8⁺T细胞的主要功能是特异性直接杀伤靶细胞^[13]。本研究选取IL-4作为T淋巴细胞的功能分子,检测了小鼠外周血的IL-4表达水平。结果显示在照后收集的外周血血清的IL-4的表达没有显著的改变。Boscolo等研究显示辐射后IFN- γ 明显下降,IL-4并没有明显的改变^[14]。金华等报道称,辐射后IL-4也没有显著的变化^[15]。IL-4主要由Th2细胞产生,主要介导体液免疫反应,EMP对IL-4没有明显作用,这些结果提示EMP对体液免疫没有明显的影响。

综上所述,200 kV/m的EMP对胸腺的组织结构有一定的损伤作用,T淋巴细胞数减少,外周血IL-4的表达改变不显著。T淋巴细胞数量的改变的原因及其分子机制有待进一步的研究。

参考文献(References)

- [1] 郭鹏.电磁辐射对神经、内分泌和免疫系统的影响[J].疾病控制杂志, 2004,8(1):13-15
Guo Yao. The influence of electromagnetic radiation on nervous, endocrine and immune system [J]. Chinese Journal of Disease Control and Prevention, 2004,8(1):13-15
- [2] 吴春艳,张俐,郑世民.电磁场对动物免疫系统的影响及其机理[J].免疫学杂志,2004,20(3):118-120
Wu Chun-yan, Zhang Li, Zheng Shi-min. Effects and mechanisms of electromagnetic fields on animal immune system [J]. Immunological Journal, 2004,20(3):118-120
- [3] Olle J. Disturbance of the immune system by electromagnetic fields [J].

Pathophysiology,2009,16:157-177

- [4] 王伟,左红艳,王德文,等.不同波段电磁辐射对淋巴细胞的损伤效应[J].中华劳动卫生职业病杂志, 2009, 27(2):95-97
Wang Wei, Zuo Hong-yan, Wang De-wen, et al. Injury effects of electromagnetic wave in different band on lymphocytes [J]. Chin J Ind Hyg Occup Dis,2009,27(2):95-97
- [5] 郭庆功,马雪莲,张弘.瞬态电磁脉冲对淋巴细胞遗传及免疫功能的影响[J].重庆邮电学院学报, 2002, 14(4):65-68
Guo Qing-gong, Ma Xue-lian, Zhang Hong. The effects of weak transient electromagnetic pulses on heredity and immunity of the lymphocytes[J]. Journal of Chongqing University of Posts and Telecommunications, 2002, 14(4):65-68
- [6] 满其航,张超,杜丽,等.微波辐射对 T 细胞作用的研究进展[J].感染、炎症、修复, 2009,10(1):62-64
Man Qi-hang, Zhang Chao, Du Li, et al. Major recent developments of microwave radiation on T lymphocyte[J]. Infect Inflamm Rep,2009,10(1):62-64
- [7] 金华,王德文,彭瑞云,等.电磁脉冲辐射后小鼠免疫器官损伤的病理研究[J].军事医学科学院院刊, 2004, 28(6):337-340
Jin Hua, Wang De-wen, Peng Rui-yun, et al. Pathological study of immune organ of the mouse after electromagnetic pulse[J]. Bulletin of the Academy of military Medical Sciences, 2004,28(6):337-340
- [8] 孙侠,张文辉,牛玉杰,等.不同强度微波辐射对小鼠胸腺的影响[J].中华劳动卫生职业病杂志, 2004, 22(2):108-111
Sun Xia, Zhang Wen-hui, Niu Yu-jie, et al. Effects of microwave radiation on thymocytes in mice at different power densities [J]. Chin J Ind Hyg Occup Dis, 2004,22(2):108-111
- [9] Thrall DE, Prescott DM, Samulski TV, et al. Serious toxicity associated with annular microwave array induction of whole-body hyperthermia in normal dogs[J]. Int J Hyperthermia, 1992, 8:23-32
- [10] 朱世忠. 极低频电磁场对 BALB/c 小鼠免疫功能影响的实验研究[J].中国辐射卫生,2010,19(2):145-146
Zhu Shi-zhong. Experiment research of effects of extremely low frequency electromagnetic fields on immune function of BALB/c mice [J]. Chin J Radiol Health, 2010, 19(2):145-146
- [11] 孟旭英,高春记,张怡堃,等.电磁辐射对小鼠免疫功能的抑制作用[J].军医进修学院学报, 2009, 30(2):215-217
Meng Xu-ying, Gao Chun-ji, Zhang, et al. Inhibitory effect of electromagnetic radiation on immune function of mice [J]. Acad J Chinese PLA Postgrad Med Sch, 2009,30(2):215-217
- [12] Antonopoulos A, Yang B, Stamm A, et al. Cytological effects of 50Hz electromagnetic fields on human lymphocytes in vitro[J].Mutat Res,1995,346(3):151-157
- [13] 陈慰峰,金伯泉等.医学免疫学[M].第4版.人民卫生出版社, 2005
Chen Wei-feng, Jin Bo-quan. Medical Immunology [M]. People's Medical Publishing House,2005
- [14] Boscolo P[J].Sci Total Environ,2001,270:13-20
- [15] 金华,王德文,唐晓敏,等.高场强电磁脉冲对 Jurkat 细胞 IFN- γ , IL-4 蛋白表达的定量分析 [J]. 中国体视学与图像分析,2007,12(3): 172-175
Jin Hua, Wang De-wen, Tang Xiao-min, et al. The influence of IFN- γ and IL-4 expression in the Jurkat cell by high power electromagnetic pulse[J]. Chin J Stereology and Image Analysis, 2007,12(3):172-175

(上接第 817 页)

- [16] Pfander B, Moldovan GL, Sacher M, et al. SUMO modified PCNA recruits Srs2 to prevent recombination during S phase [J]. Nature, 2005, 436:428-433
- [17] Edmunds CE, Simpson LJ, Sale JE. PCNA ubiquitination and REV1 define temporally distinct mechanisms for controlling translesion synthesis in the avian cell line DT40[J]. Mol-Cell,2008,30(4):519-529
- [18] Hoeghe C, Pfander B, Moldovan GL, et al. RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO[J]. Nature, 2002, 419:135-141
- [19] Gohler T, Munoz IM, Rouse J, et al. PTIP/Swift is required for efficient PCNA ubiquitination in response to DNA damage[J]. DNA-Repair-(Amst), 2008, 7(5):775-787
- [20] Freudenthal BD, Gakhov L, Ramaswamy S, et al. Structure of mono-ubiquitinated PCNA and implications for translesion synthesis and DNA polymerase exchange[J]. Nat-Struct-Mol-Biol,2010,17(4): 479-484