文章编号:1000-5404(2008)09-0831-03

论著

低功率毫米波辐照对HL60细胞增殖的影响

赖晃文[1],赖声礼[1],杨传红[2],冼 江[2],武 婕[2],江悦华[1,2] ([1]华南理工大学电子信息工程学院,广州 510640;[2]广州军区广州总医院医学实验中心,广州 510010)

摘 要:**目的** 为探讨低功率毫米波对HL60细胞活力影响的机制。**方法** 应用细胞培养、活细胞计数、光镜、电镜及增殖细胞核抗原(Proliferating cell nuclear antigen,PCNA)免疫组化染色及图像分析等方法,检测低功率(功率密度约2 mW/cm^2)及频率41.32 GHz的毫米波辐照HL60白血病细胞增殖的影响;分为辐照时间15、30、45、60 min组和对照组(0 min组)共5组。**结果** 与对照组比较,毫米波辐照45 min和60 min组,HL60细胞活性增加和PCNA阳性细胞增多,光镜观察各组未见明显差别,超微结构显示HL60细胞形态呈增殖改变。**结论** 低功率毫米波辐照对HL60细胞有促进增殖的作用。

关键词:毫米波;HL60细胞;增殖细胞核抗原;超微结构
中图法分类号:R454;R73-36;R733.7 **文献标识码**:A

Low power millimeter waves irradiation improves proliferation of leukemia cells HL60

LAI Huang-wen[1], LAI Sheng-li[1], YANG Chuang-hong[2], XIAN Jiang[2], WU Jie[2], JIANG Yue-hua[1,2] ([1]College of Electronics and Information Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, [2]Center of Medical Research, General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, China)

Abstract: Objective To investigate the mechanism on the irradiation effect of low power millimeter waves (MMW) to HL60 leukemia cells. Methods HL60 cells, irradiated by millimeter wave at frequency of 41.32 GHz (mean power density <2 mW/cm^2), were divided into 5 groups according to the irradiation time (0, 15, 30, 45, 60 min groups). The irradiation effect to cell proliferation was detected by cell counting, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunohistochemical staining and quantitative analysis. Light microscopy and electron microscopy were used to observe the morphological changes of irradiated cells. Results The proliferation activity and number of PCNA-positive cells were increased in HL60 cell after 45 and 60 min MMW irradiation. There was no difference in the morphology between HL-60 cells exposed to MMW and sham-exposed group. Ultrastructure changes were consistent with cell proliferation. Conclusion Low power MMW irradiation may promote HL60 cell proliferation.

Key words: millimeter waves; leukemia cell line HL60; proliferating cell nuclear antigen; ultrastructure

近年来,毫米波对细胞生物学影响受到广泛的关注。有研究表明,毫米波可诱导肿瘤细胞凋亡并抑制其生长[1]。也有研究表明,毫米波能增强正常人骨髓细胞的克隆能力[2]。这些研究均表明毫米波辐照细胞可产生多种生物学效应。本研究应用细胞培养、活细胞计数、光镜、电镜及免疫组织化学等方法,检测低功率毫米波辐照对HL60细胞增殖的影响,探讨毫米波对其细胞增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与装置

人白血病HL60细胞株(由广州军区医学实验中心提供,在含10%小牛血清RPMI1640培养液中进行传代培养),RPMI1640培养基和小牛血清(HyClone公司),活细胞计数试剂盒CCK-8(日本同仁化学研究所),96孔细胞培养板(Corning公司),HD-413.2HPSG100毫米波辐照装置(西安恒达微波技术开发公司),Biocell 2010分光光度计(奥地利博赛公司)。Nikon E-600显微镜(日本Nikon公司),H-600透射电镜(日本日立公司),鼠抗人增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)单克隆抗体和EliVision广谱试剂盒(福州迈新

基金项目:广东省科技发展基金(2002C31101);广东省自然科学基金(990587)
Supported by Program of the Guangdong Scientific Technologic Society Development (2002C31101) and the Natural Science Foundation of Guangdong (990587)
作者简介:赖晃文,男,广东省兴宁市人,博士研究生,主任医师,主要从事电磁场生物效应、建模及超微病理方面的研究,发表论文10篇。电话:(020)36653433, E-mail chardlai@sina.com
收稿日期:2007-06-29 修回日期:2008-01-24

生物技术开发有限公司),HAIAS-2000 高清晰度彩色医学图文分析系统(武汉千屏影像技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 辐照处理 将 2 ml 细胞数为 4×10^6 ml^{-1} 的 HL60 细胞悬液接种于 T25 培养瓶中,将其平放于面积为 20 cm^2 毫米波辐照装置的方形喇叭口上,用输出功率为 40 mW,频率为 41.32 GHz 的毫米波辐照细胞,培养瓶和喇叭口均置于 37 ℃ 的培养箱中,辐照平均功率密度约 2 mW/cm^2。辐照组以辐照时间 15、30、45、60 min 共分为 4 组,辐照后继续将细胞置于 CO_2 恒温培养箱继续培养 24 h,同时设置未经辐照处理的对照组细胞即 0 min 组。各组实验均重复 3 次。

1.2.2 细胞活性的检测 收集辐照后的细胞与对照组细胞,取 100 μl 细胞悬液于 96 孔细胞培养板内,在每孔内加入 10 μl 的 CCK-8 试剂混合,置于培养箱内培养 3 h 后,用 Biocell 2010 分光光度计测定,波长为 450 nm,参比波长为 620 nm 的细胞吸光度值。

1.2.3 光镜观察 收集 3 次相同辐照后细胞悬液混匀,分别用离心机离心 5 min(5 000 r/min),弃上清液,加入 10% 中性福尔马林(0.01 mol/L PBS,pH7.0 配制)固定 2 h,按常规梯度酒精脱水,石蜡包埋,切片 3 μm 厚,HE 染色,Nikon E-600 显微镜观察。

1.2.4 电镜观察 将收集 3 次相同辐照后细胞悬液混匀,分别用离心机离心 5 min(5 000 r/min),弃上清液,加入 2.5% 戊二醛固定,4 ℃,2 h,经 1% OsO_4 后固定,1 h。按常规梯度酒精脱水,Epon812 树脂包埋,半薄切片,HE 染色,定位,超薄切片,H-600 透射电镜观察拍照。

1.2.5 免疫组织化学染色及图像分析 取上述各组石蜡包埋块,切片 3 μm 厚。用 EliVision 法作 PCNA 免疫组织化学染色,Nikon E-600 显微镜采集图像,应用 HAIAS-2000 高清晰度彩色医学图文分析系统,随机测量每张切片的 3 个不同部位同等面积中棕黄色阳性细胞核个数,并作统计学分析。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 10.0 统计软件对吸光度值行单因素方差分析,对 PCNA 染色阳性率行 χ^2 检验。

2 结果

2.1 辐照对细胞活力的影响

结果显示,照射时间为 45 min 和 60 min 的细胞与对照组细胞的吸光度值均有显著性差异[分别为(0.272 ± 0.009)、(0.270 ± 0.005)、(0.254 ± 0.003),$P<0.05$,$P<0.01$],提示有明显的促细胞增殖作用,而照射 15 min(0.259 ± 0.002)和 30 min(0.252 ± 0.005)与对照组比较,无显著性差异($P>0.05$)。

2.2 光镜观察结果

瘤细胞呈圆形或卵圆形,细胞质少 轻度嗜碱性 细胞核明显肥大,大小不等,核膜增厚,核质深染,易见核仁,核仁较大,1~2 个,可见病理性核分裂相。各组镜下形态未见明显差异。

2.3 电镜观察结果

瘤细胞呈圆形或卵圆形,见少量短小突起,细胞核大,有的细胞核畸形,核缘不规则,异染色质增多,边聚。可见核仁,细胞质内少量的线粒体,线粒体轻度肿胀,出现粗面内质网和糖原颗粒(图1)可见少量的凋亡细胞。各组光镜下形态除辐照 60 min 组较其他组的细胞核畸形数增多以外,其余未见明显差异。

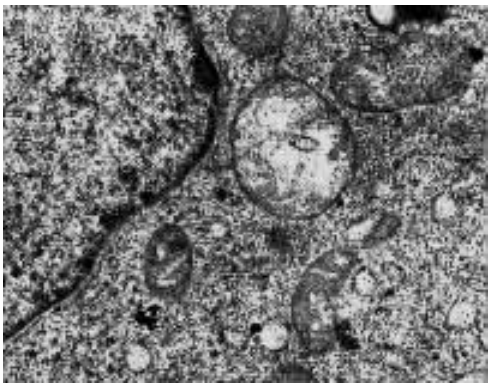


图1 辐照 60 min HL60 细胞电镜观察 (TEM ×20 000)

2.4 免疫组织化学染色及图像分析

PCNA 染色后,阳性细胞核呈棕黄色。PCNA 染色经图像分析处理结果 辐照 0、15、30、45 min 和 60 min 组的 PCNA 染色总阳性率依次为 34.40%、36.27%、40.41%、42.86% 和 43.94%。总体上 0、15、30、45 min 和 60 min 组比较有显著性差异($P<0.05$),其中辐照以 60 min 组阳性率最高,为 43.94%,0 min组最低,为 34.40%。

3 讨论

毫米波作为肿瘤的辅助治疗手段得到广泛的应用,取得了一定的疗效[3]。近年来不少研究表明,毫米波对白血病细胞有抑制及诱导细胞凋亡的作用[1,2,4]。丁光生等[1]发现毫米波对肿瘤细胞有功率窗、时间窗效应。但是,毫米波生物学效应的机制至今尚不清楚,仍存许多争议。由于毫米波生物学效应的不稳定性和非线性特点,其生物学效应呈现复杂而多变,对细胞的作用产生多种生物学效应。Pavicic 等[5]应用 935 MHz 微波辐照 V79 细胞(中国仓鼠肺细胞),V79 细胞呈明显生长趋势。有研究表明,毫米波可使肿瘤转移性增强和在治疗中可带来相反的作用[6]。本研究从细胞活力检测表明低功率毫米波辐照也可诱导 HL60 细胞增生,证实相同的作用。这可能与毫米波生物效应的频率窗、功率窗有密切关系。

PCNA 是真核细胞 DNA 合成所必需的一种相对分子质量为 36×10^3 的核蛋白,是 DNA 聚合酶的辅助蛋白,于 G_1 晚期和 S 期合成,对 DNA 复制的调节起重要作用[7]。研究表明 PCNA 在增殖细胞中的表达,可间接反映细胞的增殖状况[8]。有研究表明,把 PCNA 表达和指数作为肿瘤细胞的定量标记指标和肿瘤的临床预后指标[9,10]。王斌等[11]检测 PCNA 表达在辛基酚(OP)和三羟异黄酮(GEN)对乳腺癌发生及细胞增殖的影响,结果与对照组比较,GEN 组的乳腺癌细胞增殖及 PCNA 表达均显著降低($P<0.01$),OP 组细胞增殖能力显著增强($P<0.01$),PCNA 表达显著上升($P<0.05$)。因此,PCNA 这一特性被广泛用于评估细胞增生情况并被作为试图判断实体肿瘤的预后。本研

究通过用细胞活力、PCNA 免疫组化染色、图像分析，光镜及电镜观察等方法，检测毫米波辐照 HL60 细胞，发现低功率毫米波辐照 HL60 细胞后，促进细胞的增生。本实验结果显示，低功率毫米波在某一特定条件下辐照肿瘤细胞，可致肿瘤细胞增生，提示毫米波对肿瘤细胞的生物学效应不仅是抑制生长，也可促进肿瘤细胞的增生。因此，这些为深入研究毫米波对肿瘤细胞的生物学效应及临床应用的安全性提出一个值得注意的问题。

参考文献：

[1] 丁光生，赖声礼，孙桂玲，等. 毫米波对白血病细胞结构、活力及细胞凋亡率的影响[J]. 华南理工大学学报：自然科学版，2001，29(9)：61－64.
[2] 史泓浏，伍新尧，崔芙蓉. 毫米波对人骨髓细胞和白血病细胞克隆能力的作用[J]. 中山医科大学学报，2000，21(4S)：102－104，115.
[3] 唐友军，王中和. 恶性肿瘤的毫米波辅助治疗国内研究进展[J]. 中华理疗杂志，1999，22(4)：249－251.
[4] 袁淑兰，王艳萍，陈晓禾，等. 毫米波辐射对急性早幼粒白血病细胞增殖及分化的影响[J]. 中国肿瘤临床，2001，28(7)：485－488.
[5] Pavicic I, Trosic I, Sarolic A. Comparison of 864 MHz and 935 MHz microwave radiation effects on cell culture[J]. Arh Hig Rada Toksikol, 2006, 57(2): 149－154.
[6] 吴　瑛，赖声礼. 毫米波的生物效应及毫米波疗法研究进展[J]. 第一军医大学学报，2001，21(1)：62－64.
[7] Hartwell L H, Kastan M B. Cell cycle control and cancer[J]. Science, 1994, 266(5192): 1821－1828.
[8] Wang L D, Zhou Q, Yang C S. Esophageal and gastric cardia epithelial cell proliferation in northern Chinese subjects living in a high-incidence area[J]. J Cell Biochem Suppl, 1997, 28－29: 159－165.
[9] Barboza C A, Pereira-Pinto L, Freitas-Rde A, *et al*. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and p53 protein expression in ameloblastoma and adenomatoid odontogenic tumor[J]. Braz Dent J, 2005, 16(1): 56－61.
[10] Zhu S C, Li R, Wang Y X, *et al*. Impact of simultaneous assay, the PCNA, cyclinD1, and DNA content with specimens before and after preoperative radiotherapy on prognosis of esophageal cancer-possible incorporation into clinical TNM staging system[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(25): 3823－3829.
[11] 王　斌，糜漫天，彭俊华，等. 辛基酚和三羟异黄酮对大鼠乳腺癌发生及细胞增殖影响的研究[J]. 第三军医大学学报，2005，27(2)：119－122.

（编辑　邓强庭）

文章编号：1000-5404(2008)09-0833-01

个案与短篇

实用新型仿生乳头按摩器的研制及临床应用

吴庆蓉[1]，罗东宁[2]，吴国华[1]　（重庆市涪陵中心医院：[1]妇产科，[2]麻醉科，重庆 408000）

静脉滴注缩宫素是目前临床常用的引产方式，但需要专人管理，定时调节滴速，且难以模拟垂体脉冲式的缩宫素释放模式。婴儿吸吮母亲乳头能诱发宫缩的现象提示按摩乳头能诱发或加强宫缩。据此，本院于 2004 年 1 月开始进行仿生乳头按摩器的研究和设计，经反复技术和材料改进，成功推出了试用产品并获得了国家实用新型专利（专利号：200520010184.6）。经 80 例孕妇临床应用证实，该按摩器能诱发符合生理状态的宫缩，且具有操作方便、安全等优点，现将其研制及临床应用报告如下。

1　实用新型仿生乳头按摩器的研制

1.1　原理

根据仿生学原理，模仿初生婴儿吸吮乳头时对乳头所产生的压力，同时刺激乳头及乳晕，通过神经-内分泌反射解除下丘脑抑制，促进缩宫素的释放，以诱发宫缩。

1.2　构造

按摩器采用硅橡胶制造，主要部件为乳房吸附托、半球状仿生奶嘴、仿生按摩内表层、负压橡皮球及连接管，含 A、B 两仿生嘴接口。其中 A 接口为圆筒型，与橡皮球连接，并加压使得仿生嘴内表层向内突出，连同内表层的细小凸起按摩乳头及乳晕；A 接口封堵，B 接口接负压时，可将乳头吸进仿生嘴内以矫正凹陷乳头（图 1）。

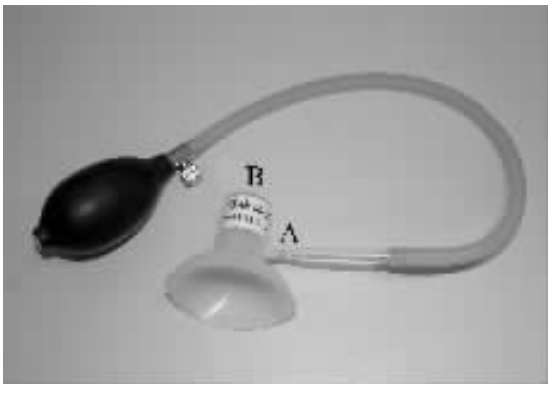


图 1　实用新型仿生乳头按摩器　（A、B 为接口）

1.3　特点及使用方法

按摩器主体全部采用白色半透明硅橡胶制造，质地柔软、舒适，能紧贴皮肤表面。在半球形仿生嘴的内表面设置有细小颗粒状按摩头，能对乳头产生更为有效的类似吸吮感觉的物理刺激，其使用方法为：①洗净并擦干乳头后用手将按摩器罩于

（下转 836 页）

作者简介：吴庆蓉，女，重庆市人，副主任医师，主要从事产科危急重症的处理及妇科微创手术方面的研究。E-mail：ttbbtt@sohu.com
收稿日期：2007-09-14　修回日期：2007-11-08