文章编号:1000-5404(2011)09-0883-04

论著

电磁辐射急性暴露对 Th1/Th2 细胞因子平衡的影响

王 源,许商成,张广斌,储 芳,余争平 (400038 重庆,第三军医大学军事预防医学院劳动卫生学教研室,电磁辐射医学防护教育部重点实验室)

【摘要】 **目的** 观察电磁辐射对 Th1/Th2 细胞因子平衡的影响。**方法** 以平均功率密度为 90 mW/cm^2 的微波辐照昆明小鼠(4~6 周龄,体质量 20~25 g,40 只,均为雌性)20 min,采用 RT-PCR、ELISA 检测微波辐照后不同时相点干扰素(interferon-gamma,INF-γ)、白细胞介素-4(interleukin-4,IL-4)表达量的变化,分析微波辐照对 Th1/Th2 平衡的偏移。**结果** 90 mW/cm^2 的微波急性辐照会导致 INF-γ 表达量的增高,辐照后第 5 天达到峰值,增幅为 135.5%($P<0.01$);90 mW/cm^2 的微波急性辐照使 IL-4 的表达有降低的趋势,但与对照组相比没有显著差异($P>0.05$)。**结论** 平均功率密度为 90 mW/cm^2 的微波急性辐照会导致昆明种小鼠 Th1/Th2 平衡向 Th1 方向偏移。

【关键词】 电磁辐射;INF-γ;IL-4;Th1/Th2 平衡
【中图法分类号】 R818.023;R392.11 【文献标志码】 A

Electromagnetic acute irradiation leads to Th1/Th2 cytokine imbalance in mice

Wang Yuan, Xu Shangcheng, Zhang Guangbin, Chu Fang, Yu Zhengping (Department of Occupation Health, Key Laboratory of Electromagnetic Radiation Protection of Ministry of Education, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

【**Abstract**】 **Objective** To identify the effect of electromagnetic irradiation on Th1/Th2 cytokine balance. **Methods** A total of 40 Kunming mice were randomly divided into sham control ($n=5$), and irradiation groups (1, 2, 3, 5, 7, 9 and 11 d after 90 mW/cm^2 electromagnetic irradiation for 20 min, $n=5$ for each time point). The mice were sacrificed at the above correspondingly time points respectively after exposure, and their blood samples and spleen tissues were collected. The expression levels of interferon-gamma (INF-γ) and interleukin-4 (IL-4) were detected with RT-PCR for spleen tissues and ELISA for blood samples. The excursion of Th1/Th2 cytokine balance induced by electromagnetic irradiation was analyzed. **Results** INF-γ expression was obviously raised by 90 mW/cm^2 electromagnetic irradiation. Its serum level reached a a peak in 5 d after exposure, with an increase of 135.5% compared with sham control group ($P<0.01$). IL-4 expression had a drawdown tendency by 90 mW/cm^2 electromagnetic irradiation, but it had no significant difference when compared with sham control ($P>0.05$). **Conclusion** Electromagnetic irradiation at 90 mW/cm^2 leads to the Th1/Th2 cytokine balance deflect to Th1.

【**Key words**】 electromagnetic irradiation; INF-γ; IL-4; Th1/Th2 balance

Supported by the National Science Foundation of China (30972432). Corresponding author: Wang Yuan, 86-23-68752289, E-mail: 121463064@qq.com

世界卫生组织调查显示,电磁辐射对人体的影响是多方面的,其对免疫系统的影响是其重要效应之一。相关的流行病学调查发现,长期电磁辐射暴露导致多发性硬化(multiple sclerosis, MS)、糖尿病(diabetes mellitus, DM)、先兆流产及习惯性流产等疾病的发病率明显增高[1]。在上述疾病发生、发展过程中,免疫功能异常、免疫平衡紊乱是其重要的病因及病理学特征[2-5]。因此明确电磁辐射暴露下机体免疫平衡变化特征,对阐明电磁辐射生物效应机制具有重要的意义。本实验以平均功率密度为 90 mW/cm^2 的微波辐照昆明小鼠 20 min,采用 RT-PCR、ELISA 检测微波辐照后,干扰素(interferon-gamma, INF-γ)、白细胞介素-4(interleukin-4, IL-4)表达量的变化,分析电磁辐射对 Th1/Th2 平衡的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

微波源由本教研室提供,INF-γ、IL-4 ELISA 检测试剂盒(博士德公司);IFN-γ RT-PCR 引物、IL-4 RT-PCR 引物、β-actin RT-PCR 引物(上海生工)。Tripure(Roche 公司);逆转录试剂盒(宝生物公司);Hot-start *Taq* 酶(TaKaRa 公司)。PCR 仪(MJ PTC-100, USA);酶标仪(TECAN SUNRISE, Austria);Du-640 紫外分光光度计(Beckman USA);电泳仪(Bio-Rad, USA);超低温冰柜(SANYO, Japan);凝胶成像系统(DOC Gel 2000, Bio-Rad, USA);台式低温高速离心机(Heraeus, German);电子天平(Sar-

【基金项目】 国家自然科学基金(30972432)
【通信作者】 王 源,电话:(023)68752289,E-mail:121463064@qq.com

torious,USA)。

1.2 实验动物及分组

4~6周龄雌性昆明种小鼠40只,体质量20~25 g,购自第三军医大学实验动物中心。5只动物作为正常对照,并设以下观测时相点:电磁辐射急性辐照后1、2、3、5、7、9、11 d,每个时相点5只实验动物。

1.3 辐照模型

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/cm^2,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%。正常对照组小鼠,在不开波源的情况下,放置于同样的辐照环境中相应的时间。小鼠分别于累积辐照后相应的时相点,摘眼球取血后,断颈处死,剥取脾脏组织,液氮中保存备用,分离各小鼠血清标本,-70 ℃冰柜中保存备用。

1.4 RT-PCR检测

按Tripure试剂盒方法提取脾脏组织标本总RNA,紫外分光光度计检测RNA的质量和含量,RNA电泳检测其完整性。将逆转录生成cDNA;设计INF-γ、IL-4、β-actin PCR引物:IFN-γ上游5′-CATGAAAATCCTGCAGAGCC-3′;下游5′-GGACAATCTCTTCCCCACCC-3′;IL-4上游5′-TCTTTCTCGAATGTACCAGG-3′;下游5′-CATGGTGGCTCAGTACTACG-3′;β-actin上游5′-GTGGGCCGCTCTAGGCACCAA-3′;下游5′- CTCTTTGATGTCACGCACGATTTC-3′。PCR扩增条件:INF-γ,94 ℃,2 min,进入循环,94 ℃ 30 s,57 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,共35个循环,72 ℃ 5 min,4 ℃保存;IL-4,94 ℃,2 min,进入循环,94 ℃ 30 s,54 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,共35个循环,72 ℃ 5 min,4 ℃保存;β-actin,94 ℃,2 min,进入循环,94 ℃ 30 s,57 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min。共30个循环,72 ℃ 5 min,4 ℃保存。INF-γ、IL-4、β-actin PCR扩增产物片段长度分别为:307、401、540 bp。PCR产物采用1.5%琼脂糖凝胶电泳,Gel Doc2000凝胶图像分析系统扫描分析,现将上述目的基因PCR产物扫描值与各自的β-actin PCR产物扫描值相比,然后以比值表示基因表达水平。

1.5 ELISA检测

血清标本按1∶3.5稀释后,按100 μl/孔加入包被好抗体的酶标板中,分别加入一组已用标本稀释液倍比稀释的标准品:IL-4(0、7.8、15.6、31.3、62.5、125、250、500 pg/ml),INF-γ(0、31.3、62.5、125、250、500、1 000、2 000 pg/ml),每块酶标板分别设置4个孔作为TMB空白对照。加样完毕,酶标板加盖在37 ℃孵育90 min;甩尽酶标板中液体,分别加入按1∶100稀释的生物素标记抗INF-γ、IL-4抗体100 μl/孔(TMB空白孔不加),37 ℃孵育60 min;0.01 mol/L TBS洗板2次,每次浸泡1 min;加入1∶100稀释的亲和素-过氧化物酶复合物(ABC)100 μl/孔,37 ℃孵育30 min;0.01 mol/L TBS洗板5次,每次浸泡2 min;甩尽酶标板中液体,在吸水纸上拍干,加入ABC底物TMB 90 μl/孔,37 ℃避光反应15 min;加入终止液100 μl/孔;使用TECAN SUNRISE酶标仪450 nm波长测各孔的光密度值[D(450)];以标准品D(450)-TMB D(450)对应标准品浓度绘制标准曲线,以样品D(450)与TMB D(450)的差值在标准曲线上查出血清样品INF-γ、IL-4的含量。

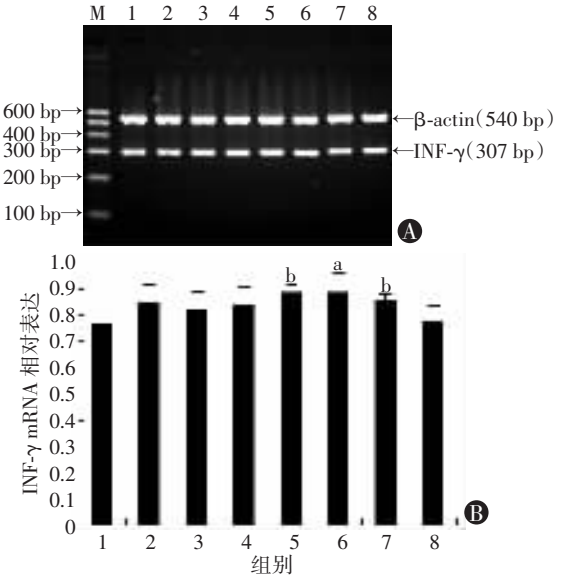
1.6 统计学分析

实验数据用$\bar{x}\pm s$表示,采用Microsoft Excel软件进行方差齐性检验和t检验。

2 结果

2.1 90 mW/cm^{2}微波急性辐照对小鼠脾脏组织INF-γ mRNA表达水平的影响

INF-γ的PCR产物扫描值与各自的β-actin PCR产物扫描值相比,然后以比值表示INF-γ mRNA表达水平的变化。平均功率密度为90 mW/cm^{2}的微波辐照后,各时相点INF-γ mRNA表达水平相对于正常对照组出现增高趋势,其中照后5、7、9 d的增幅分别为13.12%、13.06%、11.32%($P<0.05$),且在照后11 d INF-γ mRNA表达水平恢复正常(图1)。



M:标准;1:对照组;2~8:分别为辐照后1、2、3、5、7、9、11 d

A:RT-PCR电泳结果;B:半定量分析结果 a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较

图1 电磁辐射(90 mW/cm^2)急性辐照对小鼠脾脏组织INF-γ mRNA表达水平的影响

2.2 90 mW/cm^{2}微波辐照对小鼠脾脏组织IL-4 mRNA表达水平的影响

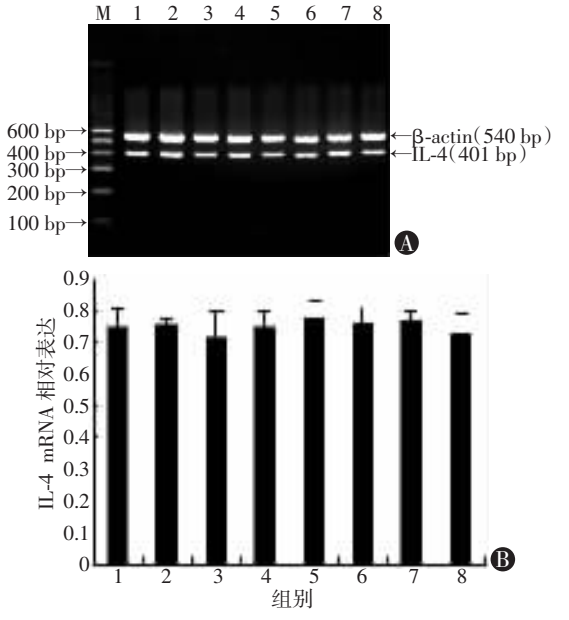
IL-4的PCR产物扫描值与各自的β-actin PCR产物扫描值相比,然后以比值表示IL-4 mRNA表达水平的变化,平均功率密度为90 mW/cm^{2}的微波辐照后,各时相点IL-4 mRNA表达水平相对于正常对照组无显著差异($P>0.05$)(图2)。

2.3 90 mW/cm^{2}微波辐照对小鼠血清INF-γ、IL-4水平的影响

由表1可知平均功率密度为90 mW/cm^{2}的微波辐照后,小鼠血清中INF-γ水平显著增高,辐照后第5天的增幅最高,达到135.5%($P<0.01$)。辐照后第11天小鼠血清中INF-γ回落到接近正常水平,但仍显著高于正常组($P<0.05$)。

平均功率密度为90 mW/cm^{2}的微波辐照后,小鼠血清中IL-4水平与正常对照组相比,略有下降的趋势,但没有显著差异($P>0.05$)(表1)。以细胞因子INF-γ、IL-4血清含量比值

(INF-γ/IL-4)代表 Th1/Th2 平衡的变化,平均功率密度为 90 mW/cm² 的微波辐照后,Th1/Th2 平衡明显向 Th1 方向偏移,与 RT-PCR 结果比较一致,到辐照后 11 d Th1/Th2 平衡的偏移基本恢复到正常水平(表 1)。



M:标准;1:对照组;2~8:分别为辐照后 1、2、3、5、7、9、11 d
A:RT-PCR 电泳结果;B:半定量分析结果

图 2　电磁辐射(90 mW/cm²)急性辐照对小鼠脾脏组织 IL-4 mRNA 表达水平的影响

表 1　90 mW/cm² 的微波辐照对小鼠血清 INF-γ 与 IL-4 的影响($n=5$, $\bar{x}\pm s$)

组别	INF-γ(pg/ml)	IL-4(pg/ml)	INF-γ/IL-4
对照组	351.44±20.26	17.28±1.64	20.34±1.35
辐照后 1 d	388.01±28.51[a]	16.69±2.46	23.25±1.26[b]
2 d	473.71±58.21[a]	16.11±0.67	29.40±2.13[a]
3 d	584.54±48.28[b]	16.37±1.60	35.71±2.47[a]
5 d	827.90±34.68[b]	15.92±1.32	52.00±3.65[a]
7 d	785.65±47.49[b]	16.53±2.86	47.53±3.15[a]
9 d	638.25±48.13[b]	16.34±0.86	39.06±3.45[b]
11 d	398.29±24.01[a]	16.92±1.52	23.54±1.76[b]

a:$P<0.05$, b:$P<0.01$,与对照组比较

3　讨论

辅助性 T 细胞(helper T cell,Th)处于调节细胞免疫和体液免疫以及特异免疫和非特异免疫的关键位置,是机体免疫平衡主要调节细胞[6]。根据细胞因子分泌模式的不同,Th 细胞主要分为 Th1 和 Th2 两大亚类,Th1 细胞主要分泌 IFN-γ、IL-2 等促炎性细胞因子,介导细胞免疫,其功能亢进容易引发自身免疫性疾病;Th2 细胞主要分泌 IL-4、IL-10 等抑炎性细胞因子,介导体液免疫,其功能亢进与过敏症密切相关[7-11]。在正常情况下 Th1、Th2 的细胞比例及分泌细胞因子的量处于一动态平衡中,维持机体正常的免疫应答。Th1/Th2 平衡紊乱参与多种疾病过程,与自身免疫性疾病、过敏症、妊娠异常、HIV 感染、癌症等疾病的发生、发展、转归具有密切的关系。监测血清中 Th1 细胞特征性细胞因子(如 IFN-γ、IL-2)和 Th2 细胞特征性细胞因子(如 IL-4、IL-10)的含量变化,分析 Th1/Th2 细胞因子平衡的变化规律,能够间接反映出免疫平衡的变化趋势及程度。本研究模拟手机通讯基站微波暴露(平均功率 90 mW/cm²),对昆明种小鼠进行全身暴露。观察辐照后细胞因子 INF-γ 和 IL-4 的 mRNA 表达水平及血清中的含量的变化,进而分析微波辐照对 Th1/Th2 平衡的影响。

结果显示 90 mW/cm² 微波急性辐照后,脾脏组织 INF-γ mRNA 表达水平相对于正常对照组均出现增高趋势,照后 5、7、9 d 的增幅分别为 13.12%、13.04% 和 11.32%,与正常组相比有显著差异($P<0.05$),且在照后 11 d INF-γ mRNA 表达恢复至正常水平。经 ELISA 检测,小鼠血清中 INF-γ 含量与 INF-γ mRNA 表达水平有类似的变化趋势,但增长幅度更为明显,照后 3、5、7、9 d 的增幅分别为 66.33%、135.58%、123.55%、81.61%,与正常组相比有显著差异($P<0.01$)。

IL-4 是特征性的 Th2 型细胞因子,曾被称为 B 细胞生长因子,主要功能是促进 B 细胞增殖,是介导体液免疫的重要细胞因子;IL-4 是 Th2 细胞分化、发育必需的细胞因子,对 Th1 型细胞因子及 Th1 型免疫反应具有抑制作用。RT-PCR 和 ELISA 实验结果均显示 90 mW/cm² 微波急性辐照没有造成机体内 IL-4 表达水平的明显改变。

以 INF-γ 和 IL-4 表达量的比值变化来反映 Th1/Th2 平衡的变化趋势[12-13],90 mW/cm² 微波急性辐照导致 Th1/Th2 平衡向 Th1 方向偏移,持续到照后第 11 天才恢复到正常水平。表明 90 mW/cm² 微波急性辐照对 Th1 型免疫反应具有促进作用,而 Th1 型免疫反应通常伴有炎症的发生[14-15],其功能亢进会加重炎症反应的进程。机体在接受外界抗原、病原体刺激时采用何种免疫应答,与体内的免疫平衡状态有关,当 Th1 型细胞因子占优势时,免疫应答通常以细胞免疫为主,当 Th2 型细胞因子占优势时免疫应答以体液免疫为主。某一特定的病原体刺激,需要机体采取正确的免疫应答方式才能有效地清除病原体,保护机体健康,如果机体因为免疫平衡异常,采用了错误的免疫应答方式,将会对机体造成更加严重的损伤。实验结果显示 90 mW/cm² 微波急性辐照导致 Th1/Th2 平衡偏移,相对于高剂量微波急性辐照对其他系统的生物效应有明显的滞后,在照后第 5 天平衡的偏移才达到峰值,究竟这种偏移是微波急性辐照直接作用于免疫系统的结果,还是对其他脏器生物效应的继发效应,有待进一步的实验观察。

参考文献：

[1] de-Vocht F. “Dirty electricity”: what, where, and should we care? [J]. J Expo Sci Environ Epidemiol, 2010, 20(5): 399 – 405.

[2] Emmanouil M, Taoufik E, Tseveleki V, *et al*. Neuronal I kappa B kinase beta protects mice from autoimmune encephalomyelitis by mediating neuroprotective and immunosuppressive effects in the central nervous system[J]. J Immunol, 2009, 183(12): 7877 – 2889.

[3] Paschalidis N, Iqbal A J, Maione F, *et al*. Modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by endogenous annexin A1[J]. J Neuroinflammation, 2009, 6: 33.

[4] Stosic-Grujicic S, Cvjeticanin T, Stojanovic I. Retinoids differentially regulate the progression of autoimmune diabetes in three preclinical models in mice[J]. Mol Immunol, 2009, 47(1): 79 – 86.

[5] 凡瞿明，张国元，刘剑平，等. 结核性及恶性肿瘤性胸腔积液淋巴细胞亚群比例以及 Th1/Th2 免疫平衡研究[J]. 第三军医大学学报，2008，30(18)：1749 – 1752.

[6] McHeyzer-Williams L J, Malherbe L P, McHeyzer-Williams M G. Helper T cell-regulated B cell immunity[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2006, 311: 59 – 83.

[7] Rose S, Guevara P, Farach S, *et al*. The key regulators of adult T helper cell responses, STAT6 and T-bet, are established in early life in mice[J]. Eur J Immunol, 2006, 36(5): 1241 – 1253.

[8] Buch T, Polic B, Clausen B E, *et al*. MHC class II expression through a hitherto unknown pathway supports T helper cell-dependent immune responses: implications for MHC class II deficiency[J]. Blood, 2006, 107(4): 1434 – 1444.

[9] 李明超，熊菀. 更昔洛韦对巨细胞病毒肝炎婴儿细胞因子水平的影响[J]. 第三军医大学学报，2009，31(19)：1897 – 1900.

[10] 吴奎，孙鲲，毕玉田，等. 屋尘螨过敏原 DNA 疫苗对哮喘模型小鼠 Foxp3 + 调节性 T 细胞功能的影响[J]. 第三军医大学学报，2008，30(5)：374 – 377.

[11] Bedoret D, Wallemacq H, Marichal T, *et al*. Lung interstitial macrophages alter dendritic cell functions to prevent airway allergy in mice [J]. J Clin Invest, 2009, 119(12): 3723 – 3738.

[12] Sharma A, Khan R, Joshi S, *et al*. Dysregulation in T helper 1/T helper 2 cytokine ratios in patients with multiple myeloma[J]. Leuk Lymphoma, 2010, 51(5): 920 – 927.

[13] Franke A, Lante W, Kollig E, *et al*. Exogenous IL-12 and its effect on TH1/TH2 cell activity after cardiac surgery[J]. Shock, 2009, 32 (4): 366 – 373.

[14] Munuswamy-Ramanujam G, Dai E, Liu L, *et al*. Neuroserpin, a thrombolytic serine protease inhibitor (serpin), blocks transplant vasculopathy with associated modification of T-helper cell subsets[J]. Thromb Haemost, 2010, 103(3): 545 – 555.

[15] Gigley J P, Fox B A, Bzik D J. Cell-mediated immunity to Toxoplasma gondii develops primarily by local Th1 host immune responses in the absence of parasite replication[J]. J Immunol, 2009, 182(2): 1069 – 1078.

（收稿 2010-10-27 修回 2010-12-14）

（编辑 栾 嘉）

（上接 877 页）

2 讨论

横纹肌肉瘤是儿童常见的软组织肉瘤，占所有儿童恶性肿瘤的 5%，软组织恶性肿瘤的 20%。RMS 的常见原发部位是头颈部(40%)、泌尿生殖系统(20%)、四肢(20%)、躯干(10%)及其他部位(10%)。尽管鼻腔鼻窦 RMS 可发生于任何年龄，但多见于儿童，平均年龄约 8 岁，90% 患者年龄小于 16 岁，发生于成人者罕见[1-2]。

横纹肌肉瘤起源于原始间叶细胞，病理学上分为腺泡型、胚胎型、簇状型和多形型 4 种组织学类型。以往文献报道胚胎型是头颈部横纹肌肉瘤最常见类型，但是近年研究结果却以腺泡型占绝大多数[3]。目前普遍认为多形型 RMS 分化较好，具有较好的临床预后，而腺泡型预后最差。成人腺泡型 RMS 发病年龄多在 10 ~ 25 岁，肿瘤细胞分化差，更易发生远处转移。本例经病理学证实为胚胎型横纹肌肉瘤。

CT 和 MRI 对于鼻腔鼻窦肿瘤的诊断均具有重要价值，多层螺旋 CT 多平面重组、MRI 冠状位及横轴位扫描是该区域肿瘤的常规成像方式，可用于肿瘤的准确定位、范围测量，评价肿瘤与邻近重要结构之间的关系。CT 的优势在于对邻近骨骼的显示，肿瘤界限不清和邻近骨骼受侵提示恶性病变的可能性较大。MRI 对于肿瘤与黏膜增厚、黏液聚集的鉴别较 CT 更可靠，并能更为准确评价对邻近神经、血管、局部软组织间隙和颅内脑组织的侵犯[1,3]。鼻窦与眼眶之间存在明显的骨性界面标志，鼻窦肿瘤侵犯眼眶影像学上比较容易判断。因此，此例 CT 和 MRI 均清晰显示肿瘤对眼眶的侵犯，并能明确肿瘤与眼外肌、视神经及眼球之间的关系。由于 CT 和 MRI 对于鼻腔鼻窦肿瘤的评价各有优势，互为补充，两种影像学技术的联合应用能够对肿瘤的分期作出更加全面的评价，但鼻腔鼻窦肿块的定性诊断需要行活检取得病理学结果。本例是通过鼻内镜活检得到病理学确诊。

无论组织学类型，因其特殊的解剖学位置，且邻近颅底，容易发生颅内侵犯，鼻腔鼻窦 RMS 总体预后较差。由于术后毁容和通常不能完全切除肿瘤，外科手术一般不作为首选的治疗方式，大多数鼻腔鼻窦 RMS 选择放疗和化疗予以治疗[4]。本例患者亦是选择了放疗和化疗，取得了较好疗效，目前尚未发现远处转移。

参考文献：

[1] Moon H S, Kwon S W, Lee J H. A case of alveolar rhabdomyosarcoma of the ethmoid sinus invading the orbit in an adult[J]. Korean J Ophthalmol, 2006, 20(1): 70 – 75.

[2] Herrmann B W, Sotelo-Avila C, Eisenbeis J F. Pediatric sinonasal rhabdomyosarcoma: three cases and a review of the literature[J]. Am J Otolaryngol, 2003, 24(3): 174 – 180.

[3] Ahmed A A, Tsokos M. Sinonasal rhabdomyosarcoma in children and young adults[J]. Int J Surg Pathol, 2007, 15(2): 160 – 165.

[4] Wu T H, Huang J S, Wang H M, *et al*. Long-term survivors of adult rhabdomyosarcoma of maxillary sinus following multimodal therapy: case reports and literature reviews[J]. Chang Gung Med J, 2010, 33 (4): 466 – 471.

（收稿 2010-11-22 修回 2011-01-08）

（编辑 吴培红）