

1950 MHz 射频辐射对 小鼠睾丸间质细胞系细胞增殖的影响

林艳云¹ 李康樗¹ 杜乐¹ 郎海洋¹ 苗霞¹
赵涛¹ 曾丽华¹ 张海荣² 郭国祯¹

¹ (第四军医大学放射医学教研室 西安 710032)

² (第四军医大学训练部教育技术中心 西安 710032)

摘要 采用 sXc(System for sXposure of cells)辐照系统、GSM talk 信号、频率 1950 MHz、SAR 值为 3 W/kg 的射频辐射,辐照小鼠睾丸间质细胞系 TM3 细胞,连续照射 24 h,同时设假辐照组。辐照后,将部分辐照组和假辐照组细胞接种于 9 块 96 孔板内,采用 CCK8 试剂盒测定照射后 1~9 d 细胞增殖能力,绘制生长曲线。另一部分辐照组与假辐照组细胞接种于不同的 10 cm 培养皿中,分别于照射后 1、2、3、4 和 5 d 用流式细胞仪检测细胞周期和细胞凋亡的变化。结果显示,照射后 2~9 d 辐照组细胞增殖能力低于假辐照组细胞($p<0.05$);照射后 1~5 d,辐照组细胞周期 S 期比假辐照组延长($p<0.05$),且于照射后 3~5 d 辐照组细胞周期 G₁ 期比假辐照组缩短($p<0.05$);而照射后 1~5 d 辐照组细胞凋亡与假辐照组无差异。频率 1950 MHz 的 GSM talk 信号射频辐射照射小鼠睾丸间质细胞 24 h 后,可以通过改变细胞周期,进而抑制细胞增殖,影响 TM3 细胞生物学作用的发挥,具体的作用机制尚有待于进一步研究。

关键词 射频辐射, 睾丸间质细胞, 细胞增殖, 细胞周期, 细胞凋亡

中图分类号 TL71

DOI: 10.11889/j.1000-3436.2015.rj.33.010203

近年来,随着手机在人们日常生活中的广泛应用,其产生的射频电磁辐射波(Radio-frequency electromagnetic waves, RF-EMW)是否会对人类健康造成危害,引起了人们的广泛关注。男性生殖系统具有产生生殖细胞,分泌性激素和维持男性第二性征等功能,同时也是手机辐射的主要靶点,有的研究认为手机射频辐射可导致睾丸结构和功能损伤、精液参数变化、附睾精子密度降低和生育能力下降等^[1-7]。其中针对睾丸间质细胞的研究较少,且结论各不相同,如 Eskander 等^[8]对 82 位不同年龄段的志愿者进行研究,发现志愿者血清睾酮含量随着手机使用时间延长而显著下降;Chen 等^[9]对雄性小鼠进行全身持续电磁暴露,频率 1 800 MHz,暴露时间 32 d (2 h/d),结果显示辐照组小鼠血清睾酮下降;而 Ribeiro 等^[10]选取成年雄性 Wistar 大鼠暴露于频率 1 835~1 850 MHz 的射频辐射中,持续 11 周(1 h/d)后,发现暴露组与对照组相比,血清总睾酮体积没

有差异。其中雄性睾丸间质组织中最重要细胞是睾丸间质细胞,机体内 95%睾酮由睾丸间质细胞合成和分泌,睾丸间质细胞对雄性生殖系统起着不可估量的作用。

目前最常见的手机是全球通系统(Globe system for mobile communication, GSM)的数字式手机,即第二代手机。这些手机在不同国家具有不同的工作频率,如美国使用的手机频率在 900~1 900 MHz 之间;欧洲国家使用的手机频率在 850~1 800 MHz 之间;中国采用的 3G 手机频率范围主要在 1 900~2 200 MHz 内^[11]。人体组织和器官可以通过天线效应、耦合 RF 信号和共振吸收等方式吸收辐射能量^[12]。比吸收率(SAR)为一定组织所吸收的射频辐射能量的多少,是一种测量方法,用以评价身体附近传感器的发射能量,手机的 SAR 值约在 0.12~1.6 W/kg 之间波动^[13]。

本研究采用我国最常用的通讯频段 1950 MHz、

基金资助: 973 计划(2011CB503704)和军队指令性项目(13BYJZ29)资助

第一作者: 林艳云,女,1986 年 10 月出生,2009 年毕业于江苏大学,现为第四军医大学军事预防医学院硕士研究生

通讯作者: 曾丽华,硕士研究生导师, E-mail: zengzhou@fmmu.edu.cn; 张海荣, E-mail: 347910111@qq.com

收稿日期: 初稿 2014-09-17; 修回 2014-12-02

SAR 值为 3 W/kg 的射频辐射辐照小鼠睾丸间质细胞系, 观察射频辐射对睾丸间质细胞系细胞增殖的影响, 为进一步研究射频辐射对睾丸间质细胞分泌功能及对雄性生殖功能的影响提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠睾丸间质细胞系 TM3 细胞由第四军医大学基础部病理生理学教研室提供; 射频电磁辐照系统: sXc(System for sXposure of cells); Becton Dickinson 公司流式细胞仪 (美国 BD FACS Aria); CCK-8 试剂盒 (碧云天); 无水乙醇 (沪试); DMEM/F-12 1:1 培养基 (美国 Hyclone 公司); 胎牛血清 (四季青)。

1.2 TM3 细胞的培养及传代

选用含有 10% 胎牛血清的 DMEM/F-12 1:1 培养基, 在温度为 37 °C, CO₂ 含量为 5% 的孵箱内培养 TM3 细胞。每天更换细胞培养液。使用倒置显微镜观察培养皿中细胞生长密度, 当细胞密度达到 80%–90% 时, 用含有 0.02% EDTA 的胰蛋白酶消化传代处于对数生长期的细胞, 用于实验研究。

1.3 分组和照射条件

选取处于对数生长期的 TM3 细胞, 首先制成单细胞悬液, 然后以 1×10^4 cell/mL 的细胞浓度接种于 12 个直径为 35 mm 的培养皿中, 将 12 个培养皿随机分为两组, 每组 6 个, 组 1 设为辐照组, 组 2 设为假辐照组。待细胞贴壁后, 将细胞移入 sXc(System for sXposure of cells) 细胞电磁辐照系统内, 辐照组用 GSM talk 信号, 频率为 1950 MHz, SAR 值 3 W/kg 的射频辐射辐照 24 h, 期间温度变化范围为 37 °C $\pm$ 0.091 °C。

1.4 CCK-8 法检测 1950 MHz 射频辐射对 TM3 细胞增殖的影响

照射 24 h 后, 将辐照组与假辐照组 TM3 细胞, 分别用胰酶消化成细胞浓度为 1×10^3 cell/mL 单细胞悬液。取 9 块 96 孔培养板, 每块 96 孔板设各含 5 个复孔的辐照组、假辐照组和空白对照组, 辐照组和假辐照组每孔加入 100 μ L 细胞悬液, 空白对照组每孔加入 100 μ L 培养基。从接种 24 h 后开始, 每天相同时间点取一块 96 孔板, 同时向每个复孔内

加入 10 μ L CCK-8 溶液, 接着在孵箱内孵育 2 h 后, 使用酶联免疫检测仪测量在波长为 450 nm 处每孔的光密度值 (OD 值), 共测定 9 d, 绘制生长曲线, 观察细胞增殖的变化情况。实验重复 3 次。

1.5 流式细胞术检测 1950 MHz 射频辐射对 TM3 细胞周期的影响

照射 24 h 后, 将辐照组与假辐照组 TM3 细胞分别用胰酶消化为单细胞悬液, 然后将两组细胞悬液按 1×10^5 、 0.5×10^5 、 1×10^4 、 0.5×10^4 、 1×10^3 cell/mL 的细胞浓度分别接种于 10 个 10 cm 细胞培养皿中, 每个培养皿接种 10 mL 细胞悬液, 继续培养于温度为 37 °C, CO₂ 含量为 5% 的孵箱中。再分别于照射后的 1、2、3、4 和 5 d, 对应收取细胞浓度为 1×10^5 、 0.5×10^5 、 1×10^4 、 0.5×10^4 和 1×10^3 cell/mL 培养皿中的细胞。将收取的细胞放在离心管内, 用 1000 r/min 的转速离心 5 min, 弃去上清液, 再用 4 °C PBS 吹打洗涤 2 次, 最后向离心管内加入 1 mL PBS 和 2 mL 无水乙醇对细胞进行固定。检测前将所有固定的细胞离心弃上清, 用 4 °C PBS 洗涤 2 次, RNA 酶消化后, 再加入 PI 染液, 在常温下避光染色 30 min 后使用流式细胞仪检测, 确定各组细胞周期分布。

1.6 流式细胞术检测 1950 MHz 射频辐射对 TM3 细胞凋亡的影响

细胞培养同 1.5 节。于照射后的 1、2、3、4 和 5 d 分别将细胞浓度为 1×10^5 、 0.5×10^5 、 1×10^4 、 0.5×10^4 、 1×10^3 cell/mL 培养皿中的上清液和细胞, 收集在离心管内, 然后离心洗涤 2 次, 再向每个离心管内加入 Binding Buffer 使细胞悬浮后加入 Annexin V-FITC 和 PI 染液, 常温下避光染色 15 min, 使用流式细胞仪检测各组细胞的凋亡情况。

1.7 数据处理

应用 SPSS13.0 统计分析软件处理数据, 两组数据之间采用完全随机设计两独立样本 *t* 检验, 多组之间比较应用方差分析, *p* < 0.05 时认为差异具有统计学意义。

2 实验结果

2.1 CCK-8 法检测 1950 MHz 射频辐射对 TM3 细胞增殖的影响

CCK-8 法检测结果显示, 辐照组细胞于照射后

第 2-9 d 细胞增殖能力低于假辐照组细胞, 差别有统计学意义($p<0.05$), 见图 1。

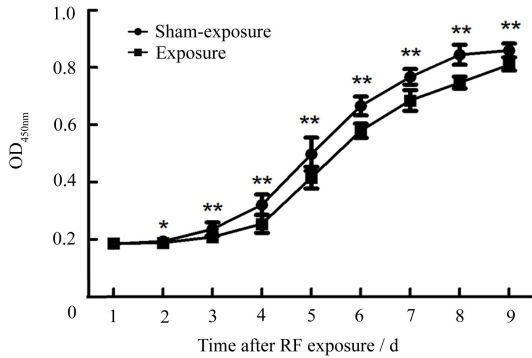


图 1 1950 MHz 射频辐射对 TM3 细胞增殖的影响
Fig.1 Effects of 1950 MHz RF on the proliferation in TM3 cells (* $p<0.05$, ** $p<0.01$ sham-exposure vs. exposure group)

2.2 流式细胞仪分析 1950 MHz 射频辐射对 TM3 细胞周期的影响

如图 2 所示, 1950 MHz 射频辐射照射 TM3 细胞 24 h 后, 可使辐照组细胞于照后 1-5 d 细胞周期 S 期比假辐照组延长, 具有统计学差异($p<0.05$)。而且在照射后第 3 d 和第 5 d 辐照组细胞周期 G₁ 期比假辐照组缩短, 差异也具有统计学意义($p<0.05$), 见图 3。图 4 为流式细胞仪分析 1950 MHz 射频辐射对 TM3 细胞周期影响的代表图片。

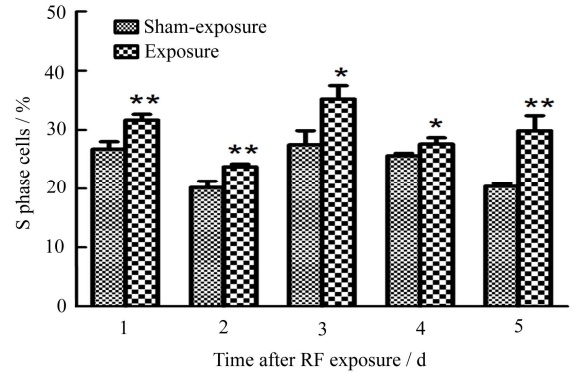


图 2 1950 MHz 射频辐射对 TM3 细胞周期 S 期的影响
Fig.2 Effects of 1950 MHz RF on the S phase cells of TM3 cells(* $p<0.05$, ** $p<0.01$ sham-exposure vs. exposure group)

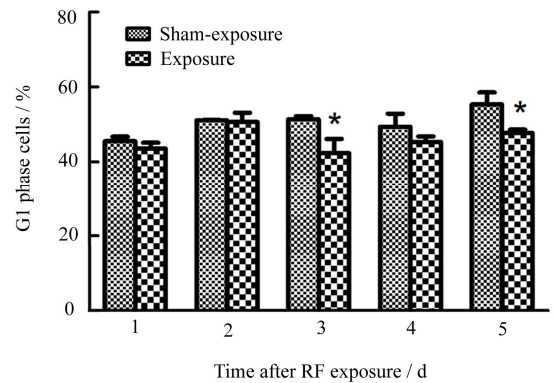


图 3 1950 MHz 射频辐射对 TM3 细胞周期 G₁ 期的影响
Fig.3 Effects of 1950 MHz RF on the G₁ phase cells of TM3 cells(* $p<0.05$, ** $p<0.01$ sham-exposure vs. exposure group)

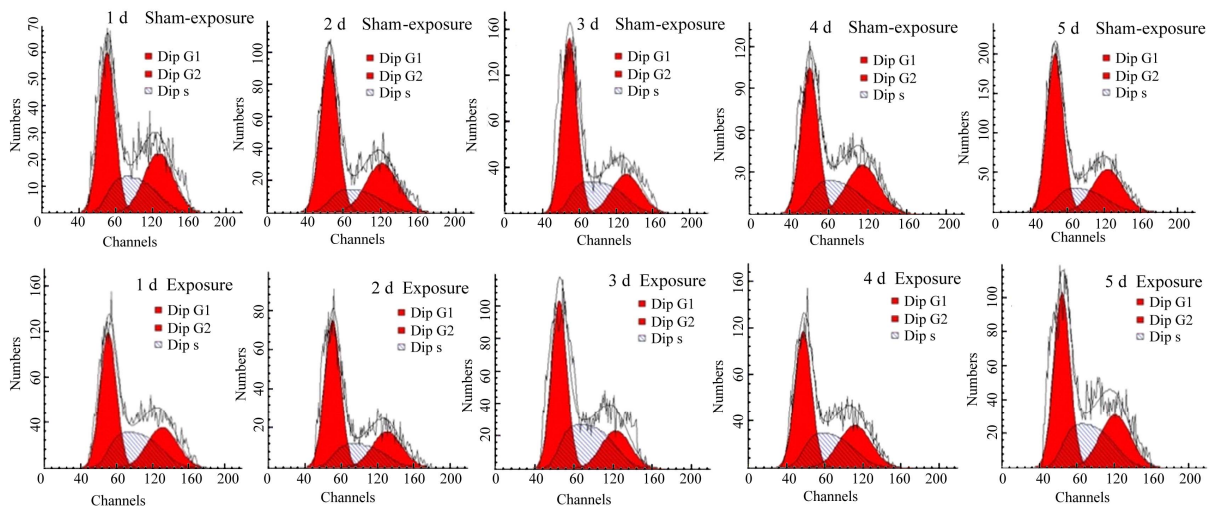


图 4 流式细胞仪分析 1950 MHz 射频辐射对 TM3 细胞周期的影响
Fig.4 Effects of 1950 MHz RF on the cell-cycle in TM3 cells analyzed by flow cytometry technology

2.3 流式细胞仪分析 1950 MHz 射频辐射对 TM3 细胞凋亡的影响

用流式细胞仪分析射频辐射对 TM3 细胞凋亡的影响,实验结果显示 1950 MHz 射频辐射连续照射 24 h 后,辐照组 TM3 细胞和假辐照组相比,辐照后 1-5 d 细胞凋亡无统计学差异,见图 5。

图 6 为流式细胞仪分析 1950 MHz 射频辐射对 TM3 细胞凋亡影响的代表图片。

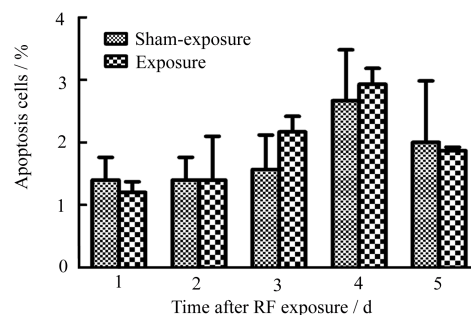


图 5 1950 MHz 射频辐射对 TM3 细胞凋亡的影响
Fig.5 Effects of 1950 MHz RF on the Apoptosis in TM3 cells

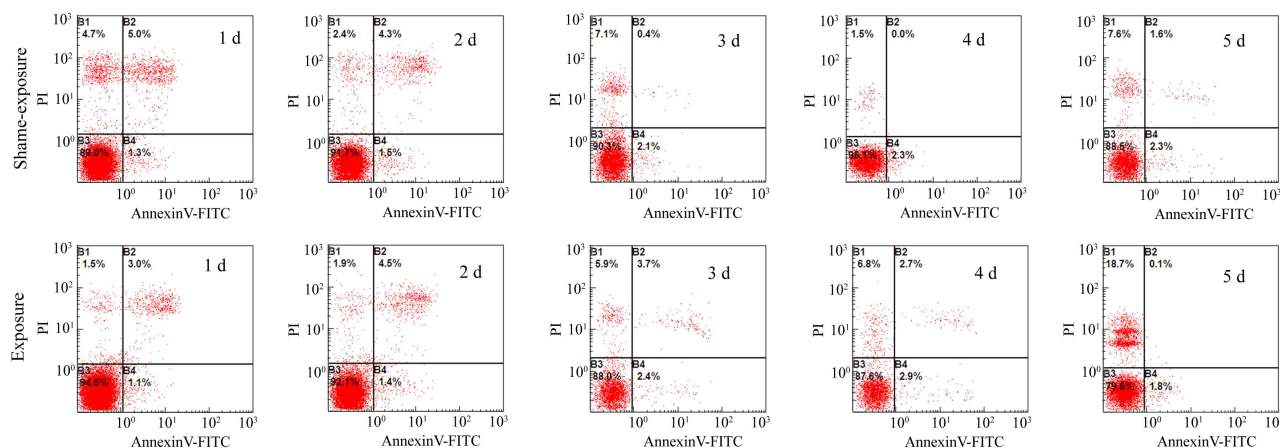


图 6 流式细胞仪分析 1950 MHz 射频辐射对 TM3 细胞凋亡的影响
Fig.6 Effects of 1950 MHz RF on the cell-apoptosis in TM3 cells analyzed by flow cytometry technology

3 讨论

细胞的生长曲线为 S 形,分为 4 个部分,首先细胞传代后经过短暂的悬浮,然后贴壁,进入生长缓慢的潜伏期,再进入大量分裂的指数生长期,最后细胞达到饱和密度后,停止生长,进入平台期,最后是退化衰亡期。实验发现,正常小鼠睾丸间质细胞的生长曲线为 S 形,细胞在刚接种后第 1 天表现为增殖停滞;第 2-7 d,正常的 TM3 细胞进入指数生长期,此时细胞生长迅速;到了第 8-9 d,则进入了平台期,细胞生长缓慢,部分细胞生长停滞。而接受 1950 MHz 射频辐射照射 24 h 后,受照射细胞增殖明显减慢,主要表现为:潜伏期相对延长,指数生长期延后,而平台期也比假辐照组推后。所以通过实验发现,1950 MHz 射频辐射连续照射 24 h 后,抑制了 TM3 细胞增殖。

细胞周期分为分裂间期和分裂期,分裂间期包括: G₁ 期、S 期和 G₂ 期, G₁ 期主要合成 RNA 和核糖体, S 期为 DNA 合成期, G₂ 期是 DNA 合成后期,为分裂期做准备,整个细胞周期几乎均在分裂间期

度过。以往研究发现,电磁辐射能通过影响细胞周期,进而抑制细胞增殖,对细胞周期的影响主要是通过使细胞滞留在 G₁、S、G₂ 期不能进入有丝分裂过程^[14-15]。且研究还发现电磁辐射可能通过抑制细胞内 DNA 的合成^[16],以及降低 DNA 损伤修复酶类的活性^[17],进而影响细胞周期。而且因受照射细胞种类不同以及辐射参数不相同等,导致细胞周期阻滞时相、阻滞程度和阻滞过程等方面呈现显著差异,可表现为 G₁ 期阻滞、S 期蓄积、G₂/M 期阻滞等^[18-19]。其中 DNA 合成和修复主要在细胞周期 S 期完成,如果进入 S 期后细胞 DNA 还不能得到有效的修复,那么细胞就很有可能发生严重损伤^[20-21]。实验结果显示使用 GSM talk 信号,频率 1950 MHz, SAR 值 3 W/kg 的射频辐射连续照射 TM3 细胞 24 h 后,于照射后 1-5 d 辐照组细胞周期 S 期比假辐照组延长,所以认为 1950 MHz 射频辐射可以通过阻滞辐照组细胞 DNA 合成和抑制其修复,进而影响细胞周期 S 期,对 TM3 细胞周期造成影响。用流式细胞术检测细胞凋亡结果显示,接受 1950 MHz 射频辐射照射后的小鼠睾丸间质细胞系细胞凋亡与假辐

对照组相比无差异, 所以认为 1950 MHz 射频辐射连续照射 24 h, 对 TM3 细胞凋亡无影响。

结合细胞周期和细胞凋亡结果, 本文认为 1950 MHz 射频辐射主要通过改变小鼠睾丸间质细胞的细胞周期, 造成细胞周期 S 期阻滞, 进而影响细胞增殖。其中 1950 MHz 射频辐射对 TM3 细胞损伤机制, 以及是否影响小鼠睾丸间质细胞的分泌功能, 还需要进一步研究。

参考文献

- Fejes I, Zavaczki Z, Szollosi J, *et al.* Is there a relationship between cell phone use and semen quality? [J]. Archives of Andrology, 2005, **51**(5): 385-393.
- 王亚峰, 曾丽华, 郭国祯, 等. 电磁脉冲暴露对雄性 BALB/c 幼鼠生殖系统发育的影响 [J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2013, **31**(5): 201-206.
WANG Yafeng, ZENG Lihua, GUO Guozhen, *et al.* Effects of electromagnetic pulse exposure on the development of reproduction system of male BALB/c mice [J]. Journal of Radiation Research and Radiation Processing, 2013, **31**(5): 201-206.
- Imai N, Kawabe M, Hikage T, *et al.* Effects on rat testis of 1.95-GHz W-CDMA for IMT-2000 cellular phones [J]. Systems Biology in Reproductive Medicine, 2011, **57**(4): 204-209.
- Meo S A, Arif M, Rashied S, *et al.* Hypospermatogenesis and spermatozoa maturation arrest in rats induced by mobile phone radiation [J]. Journal of the College of Physicians and Surgeons-Pakistan, 2011, **21**(5): 262-265.
- Kesari K K, Kumar S, Behari J. Effects of radiofrequency electromagnetic wave exposure from cellular phones on the reproductive pattern in male Wistar rats [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2011, **164**(4): 546-559.
- Agarwal A, Deepinder F, Sharma R K, *et al.* Effect of cell phone usage on semen analysis in men attending infertility clinic: an observational study [J]. Fertility and Sterility, 2008, **89**(1): 124-128.
- Kesari K K, Kumar S, Behari J. Mobile phone usage and male infertility in Wistar rats [J]. Indian Journal of Experimental Biology, 2010, **48**(10): 987-992.
- Eskander E F, Estefan S F, Abd-Rabou A A. How does long term exposure to base stations and mobile phones affect human hormone profiles? [J]. Clinicle Biochemstry, 2012, **45**(1/2): 157-161.
- Chen L, Qin F, Chen Y, *et al.* Chronotoxicity of 1800 MHz microwave radiation on sex hormones and spermatogenesis in male mice[J]. Journal of Hygiene Research, 2014, **43**(1): 110-115.
- Ribeiro E P, Rhoden E L, Horn M M, *et al.* Effects of subchronic exposure to radio frequency from a conventional cellular telephone on testicular function in adult rats [J]. Journal of Urology, 2007, **177**(1): 395-399.
- Deepinder F, Makker K, Agarwal A. Cell phones and male in-fertility: dissecting the relationship [J]. Reproductive Biomedicine Online, 2007, **15**(3): 266-270.
- D'Andrea J A, Emmerson R Y, Bailey C M, *et al.* Microwave radiation absorption in the rat: frequency-dependent SAR distribution in body and tail [J]. Bioelectromagnetics, 1985, **6**(2): 199-206.
- La Viqnera S, Condorelli R A, Vicari E, *et al.* Effects of the exposure to mobile phones on male reproduction: a review of the literature [J]. Asian Journal of Andrology, 2012, **33**(3): 350-356.
- Wilson G D. Radiation and the cell cycle, revisited [J]. Cancer and Metastasis Reviews, 2004, **23**(3-4): 209-225.
- Iliakis G, Wang Y, Guan J, *et al.* DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation [J]. Oncogene, 2003, **22**(37): 5834-5847.
- Deepinder F, Makker K, Agarwal A. Cell phones and male in-fertility: Dissecting the relationship [J]. Reproductive Biomedicine Online, 2007, **15**(3): 266-270.
- 代金明, 林汝仙, 王升启. 细胞周期调控与细胞抗辐射能力 [J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2005, **23**(5): 262-265.
DAI Jinming, LIN Ruxian, WANG Shengqi. Cell cycle modulation and radiation resistance [J]. Journal of Radiation Research and Radiation Processing, 2005, **23**(5): 262-265.
- Lieberman I, Abrams R, Hunt N, OVE P. Levels of enzyme activity and Deoxyribonucleic acid synthesis in mammalian cells cultured from the animal [J]. Journal of Biological Chemistry, 1963, **238**: 3955-3962.
- Hwang A, Muschel RJ. Radiation and the G2 phase of the cell cycle [J]. Radiation Research, 1998, **150**(5 Suppl): S52-S59.
- Durocher D, Jackson S P. DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: variations on a theme? [J]. Current Opinion in Cell Biology, 2001, **13**(2): 225-231.
- Wilson G D. Radiation and the cell cycle, revisited [J]. Cancer and Metastasis Reviews, 2004, **23**(3-4): 209-225.

Effects of 1950 MHz electromagnetic radiation on leydig cells proliferation

LIN Yanyun¹ LI Kangchu¹ DU Le¹ LANG Haiyang¹ MIAO Xia¹
ZHAO Tao¹ ZENG Lihua¹ ZHANG Hairong² GUO Guozhen¹

¹(Department of Radiation Medicine, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

²(Educational Technology Center, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

ABSTRACT Mice Leydig cells were irradiated by 1950 MHz radio frequency electromagnetic field (sXc irradiation system, GSM talk signal, with the frequency of 1950 MHz, and SAR value of 3 W/kg). After continuous irradiation for 24 h, the irradiated or sham-irradiated cells were seeded in 96-well plates and 10 cm dishes, respectively. The cell proliferation, cell cycle and cell apoptosis were measured by using CCK8 assay and flow cytometry, respectively. The results showed that cell proliferation in the irradiated group was slower than that in the sham-irradiated group 2–9 d after irradiation ($p<0.05$); cells in S phase in the irradiated group increased significantly compared with the sham-irradiated group 1 d, 2 d, 3 d, 4 d and 5 d after irradiation ($p<0.05$); cells in G₁ phase in the irradiated group decreased significantly compare with the sham-irradiated group 3 d and 5 d after irradiation ($p<0.05$). There was no significant difference in cell apoptosis between the irradiated group and the sham-irradiated group. 1950 MHz RF EMR for 24 h may inhibit the cell proliferation of TM3 cells by changing the cell cycle, yet further study is needed to explore the specific mechanisms of this phenomenon.

KEYWORDS Radio frequency radiation (RF radiation), Leydig cell, Cell proliferation, Cell cycle, Cell apoptosis
CLC TL71