

· 基础研究 ·

次声对人外周血淋巴细胞的影响

范建中 张积仁 鲍勇 李克 杨俊峰

【摘要】 目的 探讨次声对人外周血淋巴细胞的影响。方法 健康志愿者 18 人 ($n=18$) 空腹抽血并分离其淋巴细胞,按照实验处理方法分为次声组(次声处理, $n=18$)、对照组(处理同次声组但次声治疗仪处于关闭状态, $n=18$)、空白组(淋巴细胞分离后一直置于 5% CO_2 饱和湿度的培养箱内培养, $n=18$);实验处理 15, 30, 60, 90, 120 min, 每时间段依次取样后放入 5% CO_2 饱和湿度的培养箱内进行培养。培养 24, 48 h, 检测相关指标, 包括台盼蓝染色法、噻唑蓝染色法(MTT 法)、流式细胞术以及扫描电镜的检测。结果 分离后的淋巴细胞存活率达到 95% 以上, 采用 MTT 法检测的结果显示, 实验处理后培养 24, 48 h, 次声组的 OD 值与对照组之间的差异均无统计学意义($P>0.05$);但次声组 OD 值随处理时间呈依次增大趋势, 而对照组这种趋势不明显。流式细胞仪检测结果显示, 各次声处理组与相应的对照组比较, 凋亡细胞以及其他各类细胞的比率, 差异均无统计学意义($P>0.05$)。扫描电镜下结果显示:次声处理作用 120 min 且培养 48 h 的细胞大小、形状、表面微绒毛疏密程度与空白组差异不大;而对照组细胞却有细胞表面微绒毛减少、异形细胞增加等变化。结论 本研究采用的次声治疗剂量对健康人外周血淋巴细胞的细胞活性可能有一定促进作用, 但其凋亡率影响不大;次声处理可能会引起细胞膜的超微结构变化。

【关键词】 次声; 人外周血淋巴细胞; 细胞膜

Effect of infrasound on human peripheral blood lymphocytes FAN Jian-zhong*, ZHANG Ji-ren, BAO Yong, LI Ke, YANG Jun-feng. * Nan Fang Hospital, the Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

【Abstract】 Objective To investigate the influence of infrasound therapy on human peripheral blood lymphocytes. Methods The blood samples from 18 health volunteers were divided into 3 groups ($n=18$ for each group): an infrasound group (treated by infrasound generator, $n=18$), a control group (treated same as infrasound group but the generator was in power off, $n=18$), and a blank group (extracted lymphocytes from human blood were cultivated in incubated tank with 5% CO_2 and saturated humidity all through, $n=18$). All the samples were treated accordingly for 15, 30, 90, and 120 min, and then cultivated. Trypan blue assay, MTT assay, flow cytometry analysis (Annexin V-EGFP/PI), and scanning electron microscope were used to examine various parameter after 24 h and 48 h of cultivation, respectively. Results The trypan blue assay showed that the survival rates of lymphocytes in all groups were above 95%. MTT assay showed that OD values of lymphocytes in the infrasound group were not different from those of the control groups ($P>0.05$), but that of the infrasound group showed a time-dependent increasing with infrasound treatment. OD values of lymphocytes in control groups did not show such a tendency. Flow cytometry analysis showed that the percentages of apoptosis of lymphocytes and other cells did not differ significantly among all the groups ($P>0.05$). SEM showed that the size, shape and membrane surface prominent or micro-floss of the lymphocytes exposed to infrasound for 120 minutes and then cultivated for 48 hours were almost the same as those of the lymphocytes of the blank group. But the lymphocytes of control group showed that the prominence or micro-floss of the membrane become shortened or decreased, the abnormal shape of the lymphocytes increased. Conclusion Infrasound treatment might increase the activity of human peripheral blood lymphocytes, but the influence on apoptosis of lymphocytes was not significant. Infrasound had shown some effects on the ultrastructure of the membrane of lymphocyte.

【Key words】 Infrasound; Human peripheral blood lymphocytes; Cell membrane

尽管有研究表明,次声可以通过生物共振效应作用到各种组织和细胞的各级生物结构,从而影响

细胞的生物学性状^[1];但次声对机体免疫系统的影响、以及对离体免疫细胞的影响等方面的研究,相关的文献报道不多^[2-4]。本研究拟观察次声对离体健康人外周血淋巴细胞作用后的生物学变化,为探索次声对人体免疫系统的影响提供实验依据。

作者单位:510515 广州,南方医科大学南方医院康复医学科(范建中、鲍勇、李克、杨俊峰);南方医科大学珠江医院肿瘤科(张积仁)

材料与方法

一、实验仪器

美国 Chi 公司的 INFRASOUND 8™ 次声治疗仪作为次声信号源发生装置^[5];超净台(苏州净化设备厂);HemaTEL-16H 台式高速离心机(美国);Olympus 倒置荧光显微镜(日本);Heraeus B5060ek/CO₂ 型 CO₂ 细胞培养箱(德国);流式细胞仪(Beckman Coulter 公司,美国);Thermo Labsystems Multi2skan MK3 全自动酶标仪;日立 H-600 电镜(日本日立公司)。

二、淋巴细胞的分离及培养

健康志愿者 18 例,每例为 1 个样本。将用肝素(20 U/ml)抗凝的外周血用尖吸管沿管壁缓慢加入淋巴细胞分离液中(一般 10 ml 全血用淋巴细胞分离液 3~5 ml),1 500 r/min 离心 15 min。以尖吸管小心吸取中间层,置于另一试管中,加培养液 4~5 ml 混匀。1 000 r/min 离心 15 min,重复以上操作 2 次。镜下观察细胞形态,对于形态异常的,取手指血推血液涂片鉴别排除。有核细胞混悬液(5×10^5 /ml)置 10% 胎牛血清培养液中,静置培养 30 min 后,将非贴壁细胞移入另一试管中。培养皿中 90% 以上贴壁细胞为单核细胞,非贴壁的细胞主要为淋巴细胞。在预试验中用流式细胞术检测分离物 CD3 及 CD19 等,测分离的 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞的纯度。分离的 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液中,200 μ g/ml 谷氨酰胺,温度为 37℃,于 CO₂ 体积分数为 5%、饱和湿度的培养箱内培养。

三、实验分组

将 18 例健康志愿者的淋巴细胞悬液按照实验处理方法分为次声组(次声处理, $n=18$)、对照组(处理同次声组但次声治疗仪处于关闭状态, $n=18$)、空白组(淋巴细胞分离后一直置于 5% CO₂ 饱和湿度的培养箱内培养, $n=18$)。

次声信号参数:采用第四军医大学等单位研制的“便携式野外低频信号实时测试智能分析系统”对该次声信号源进行测试,在该机处于次声治疗档位 3 时,次声信号与非次声信号的频谱能量的比例分别为 69.33% 与 30.67%,具体次声信号参数^[5]见表 1。

表 1 各频段次声声压级及其频谱成份

项 目	4 Hz	8 Hz	12 Hz	16 Hz	20 Hz
次声声压级(dB)	79.75	83.07	85.69	84.12	86.11
频谱成份(%)	13.85	20.00	20.77	22.31	23.08

次声处理方法:分离的淋巴细胞悬液置于直径为 60 mm 的培养皿中,培养皿置于次声治疗仪下,发射头

距液面均为 1.5~2.0 cm,使用次声治疗档位 3。于次声作用 15,30,60,90,120 min 这五个时间段依次取样,然后放入 5% CO₂ 饱和湿度的培养箱内进行培养。分别于培养 24 h 和 48 h 后检测相关指标。

四、观察指标

分别采用台盼蓝染色法观测淋巴细胞存活情况,噻唑蓝染色法(methyl thiazolyl tetrazolium,MTT)检测人外周血淋巴细胞 OD 值,流式细胞术检测细胞凋亡情况,扫描电镜观察次声对淋巴细胞膜超微结构的影响。

五、统计学分析

实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示,数据分析采用 SPSS 13.0 版统计软件进行。采用重复测量的方差分析。

结 果

一、台盼蓝染色法观察淋巴细胞存活情况

已知淋巴细胞在以上环境中不增殖,台盼蓝染色(重复 3 次)结果显示,分离后的细胞存活率达到 95% 以上,可进行下一步实验。

二、MTT 法检测的结果

各组细胞分别培养 24,48 h 后,次声组与对照组比较,OD 值之间的差异无统计学意义($P>0.05$),但次声组 OD 值随处理时间呈依次增大趋势,而对照组这种趋势不明显(表 2)。

表 2 2 组人外周血淋巴细胞不同时段 OD 值的变化($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	培养时间	
		24 h	48 h
对照组	18		
次声作用 15 min		0.47 $\pm$ 0.15	0.53 $\pm$ 0.17
次声作用 30 min		0.45 $\pm$ 0.13	0.50 $\pm$ 0.14
次声作用 60 min		0.44 $\pm$ 0.11	0.45 $\pm$ 0.09
次声作用 90 min		0.46 $\pm$ 0.12	0.54 $\pm$ 0.16
次声作用 120 min		0.45 $\pm$ 0.09	0.53 $\pm$ 0.19
次声组	18		
次声作用 15 min		0.46 $\pm$ 0.16 ^a	0.55 $\pm$ 0.17 ^a
次声作用 30 min		0.48 $\pm$ 0.15 ^a	0.54 $\pm$ 0.15 ^a
次声作用 60 min		0.50 $\pm$ 0.17 ^a	0.57 $\pm$ 0.21 ^a
次声作用 90 min		0.51 $\pm$ 0.15 ^a	0.48 $\pm$ 0.10 ^a
次声作用 120 min		0.51 $\pm$ 0.10 ^a	0.72 $\pm$ 0.29 ^a

注:与次声组同时段比较,^a $P>0.05$

三、流式细胞仪检测结果

2 组细胞在实验处理后分别培养 24 h 和 48 h 后进行流式细胞仪检测,结果见表 3,4 和图 1。

四、次声对淋巴细胞膜超微结构的影响

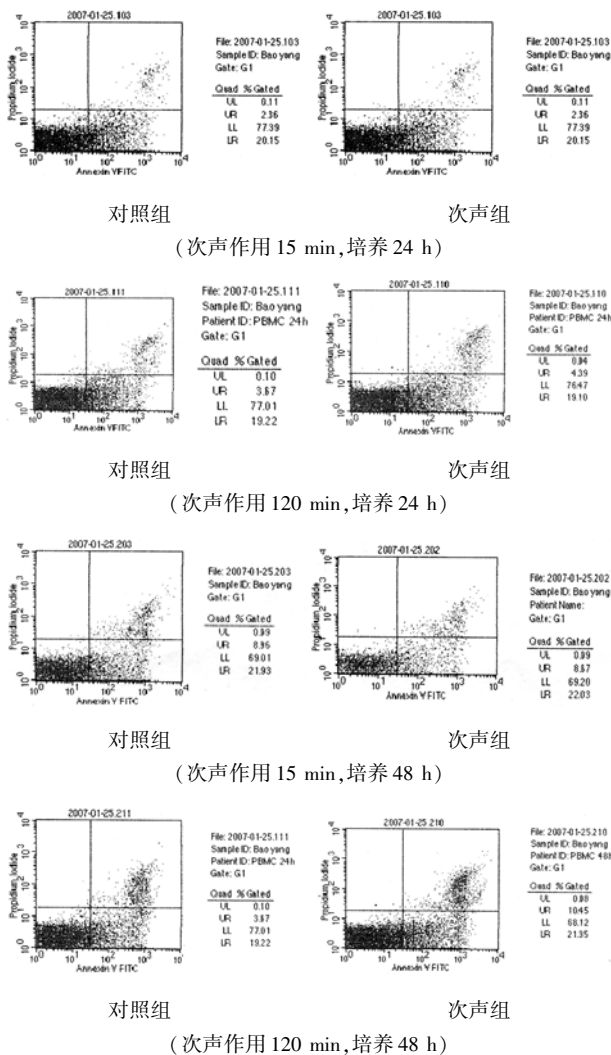
扫描电镜观察结果显示:对照组与空白组比较,对照组细胞表面微绒毛明显减少,外形略有变形的细胞比例增加;次声组的细胞大小、微绒毛疏密变化程度与空白组比较差异不大(图 2)。

表 3 2 组培养 24 h 后淋巴细胞流式细胞仪检测结果(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	正常细胞	坏死细胞	早期凋亡	晚期凋亡	凋亡比率
对照组	18					
作用时间 15 min		68.01 ± 10.89 ^a	0.09 ± 0.03 ^a	28.33 ± 10.00 ^a	3.57 ± 1.07 ^a	31.90 ± 10.89 ^a
作用时间 120 min		68.02 ± 9.72 ^a	0.06 ± 0.04 ^a	27.91 ± 9.08 ^a	4.00 ± 0.83 ^a	31.91 ± 9.76 ^a
次声组	18					
作用时间 15 min		69.95 ± 11.11	0.11 ± 0.06	26.84 ± 9.78	3.11 ± 1.31	29.95 ± 11.07
作用时间 120 min		70.57 ± 7.87	0.08 ± 0.07	25.02 ± 6.74	4.33 ± 1.55	29.36 ± 7.80

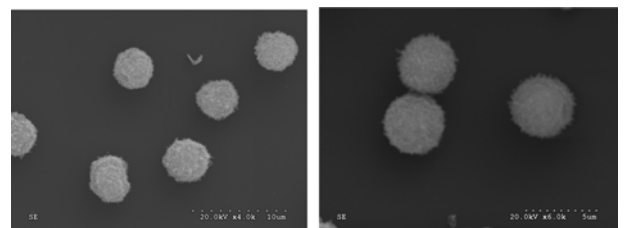
注:与次声组同时段比较,^aP>0.05表 4 2 组培养 48 h 后淋巴细胞流式细胞仪检测结果($\bar{x} \pm s$)

组别	n	正常细胞	坏死细胞	早期凋亡	晚期凋亡	凋亡比率
对照组	18					
作用时间 15 min		69.01 ± 4.44 ^a	0.06 ± 0.05 ^a	24.44 ± 5.75 ^a	6.49 ± 2.33 ^a	30.93 ± 4.40 ^a
作用时间 120 min		70.12 ± 1.19 ^a	0.06 ± 0.04 ^a	22.23 ± 4.20 ^a	7.59 ± 3.66 ^a	29.81 ± 1.23 ^a
次声组	18					
作用时间 15 min		70.78 ± 5.19	0.06 ± 0.04	22.56 ± 5.28	6.77 ± 1.73	29.33 ± 4.87
作用时间 120 min		66.71 ± 10.88	0.06 ± 0.02	22.41 ± 2.24	5.27 ± 4.51	27.68 ± 4.36

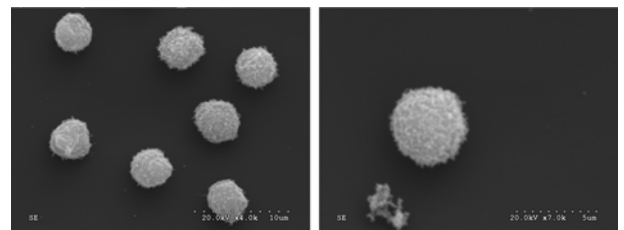
注:与次声组同时段比较,^aP>0.05

注:左下象限显示活细胞;左上象限显示坏死细胞;右上象限显示早期凋亡细胞;右下象限显示中、晚期凋亡细胞

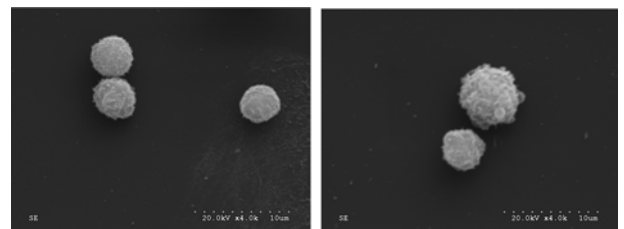
图 1 实验处理后淋巴细胞流式细胞仪检测结果图



对照组(次声假作用 120 min, 培养 48 h)



次声组(次声作用 120 min, 培养 48 h)



空白组(空气暴露 120 min, 培养 48 h)

图 2 淋巴细胞扫描电镜照片

讨 论

以往的研究结果显示,次声以生物共振的方式普遍作用于生物体的各器官和组织,使其吸收能量,其机械能可转化为热能、生物化学能和生物电能,最终影响细胞分子结构、生物氧化和能量代谢过程,因而可产

生广泛的生物学效应^[1]。因此在次声环境或次声治疗仪的作用下,离体细胞的生物学性状会受到不同程度的影响。

本研究采用已在国外临床上使用的次声治疗仪,采用多种检测指标,观察次声对离体淋巴细胞的影响。

台盼蓝染色法结果显示,分离后的细胞存活率达到 95% 以上,可以说明我们分离淋巴细胞的方法对其损伤不大,最大可能地避免了其他处理因素的干扰,可以进行下一步实验。

采用 MTT 法检测的结果显示,实验处理后培养 24 h 和 48 h,次声组的 OD 值与对照组之间的差异均无统计学意义($P > 0.05$);次声组 OD 值随处理时间呈依次增大趋势,而对照组这种趋势不明显。结果提示,较长时间的低声压级次声处理有可能促进 MTT 进入细胞内,或增加淋巴细胞的细胞活性。

研究结果显示,各次声处理组与相应的对照组比较,凋亡细胞以及其他各类细胞的比率,其差异均无统计学意义($P > 0.05$),提示本实验采用的次声作用方式可能对淋巴细胞的凋亡影响不明显。

扫描电镜观察结果显示,培养 48 h 后次声作用 120 min 的细胞大小、形状、表面微绒毛疏密程度与空白组差异不大;而对照组细胞却有细胞表面微绒毛减少、异形细胞增加等变化。考虑到健康人外周血淋巴细胞存在自然老化或凋亡的过程以及空气暴露对细胞膜的影响,因此推测次声处理过程可能对淋巴细胞的自然老化或凋亡过程和外界损害因素的影响有延缓作用。

次声对离体培养的细胞作用研究报道显示,小鼠成骨样细胞(MC3T3-E1)在不同参数的次声作用下,4 Hz/100 dB 和 12 Hz/100 dB 的次声波可明显促进细胞增殖,20 Hz/100 dB 次声波作用具有显著分泌骨钙

素的作用,100 dB 次声波不同频率下可以促进成骨样细胞的体外增殖和分泌功能^[5]。

复习次声对机体免疫细胞影响的研究报道^[2-4]可以发现,次声对机体免疫是有影响的,但这种影响与次声的参数有关,且不能排除次声对机体全身其它系统作用所致的间接影响,具体影响机制尚无定论。

有关次声对离体免疫细胞的作用尚未见相关报道。

综合上述实验结果以及相关的文献复习,本研究采用的次声治疗剂量对健康人外周血淋巴细胞的细胞活性可能有一定促进作用,但对其凋亡率影响不大;次声处理可能会影响细胞膜的超微结构变化。

本实验采用的次声处理对健康人外周血淋巴细胞的活性可能有一定促进作用,但对其凋亡影响不明显,次声处理过程可能对淋巴细胞的自然老化过程和外界损害因素的影响有延缓作用,次声所致的淋巴细胞膜超微结构的改变或生物膜通透性的变化可能是其对淋巴细胞产生生物学效应的机制之一。

参 考 文 献

- [1] 杨俊峰,范建中,陈景藻. 次声对人体损伤之防护的研究进展. 中华物理医学与康复杂志,2004,26:191-193.
- [2] Batanov GV. Characteristics of etiology of immediate hypersensitivity in conditions of exposure to infrasound. Radiats Biol Radioecol,1995,350:78-82.
- [3] 刘秀敏,甄荣,陈惠芳,等. 次声对小鼠生育能力与免疫功能的影响. 中华物理医学与康复杂志,2000,22:100-102.
- [4] 杨琨,张建平,金伯泉,等. 次声对 PHA 和同种异体抗原诱导小鼠脾细胞增殖的影响. 细胞与分子免疫学杂志,2000,16:289-291.
- [5] 范建中,鲍勇,易南,等. 治疗用次声发生装置声场特征研究. 中华物理医学与康复杂志,2007,29:213-214.

(修回日期:2007-10-11)

(本文编辑:阮仕衡)

· 消息 ·

首届亚洲和大洋洲物理医学与康复医学学术会议将在中国举办

由亚太地区物理医学与康复医学学会主办、中国康复医学会和中华医学会物理医学与康复学分会承办的第一届亚洲和大洋洲物理医学与康复医学学术会议(1st Conference of the Asian Oceania Society of Physical and Rehabilitation Medicine)将于2008年5月16至19日在南京召开。这将是在中国举办的第一个国际性物理医学与康复医学学术组织的大型国际学术会议。

本次学术大会的主题是“传统与现代结合,为残疾者塑造更好的明天”。大会将邀请众多国际知名专家和学者做精彩的学术报告。会议将以大会报告、分会报告、专题研讨、继续教育讲座、壁报交流、卫星会议、产品展示会等多种形式交叉进行。届时,大会还将进行优秀青年论文奖评选活动。大会征文活动已经正式展开,凡是有关物理医学与康复医学领域的基础理论和临床应用研究的新成果和新进展的文章,均在欢迎之列。请登陆大会网站了解有关投稿事项和投稿。凡被大会录取的论文摘要,均将刊登在 Journal of Rehabilitation Medicine 2008 年 4 月份增刊上,该刊是 SCI 收录的学术刊物。

会议日期:2008 年 5 月 16 至 19 日;会议地点:南京钟山宾馆;会议语言:英语(部分分会场采用中文交流形式);会议咨询热线:010-62174061,62103104,62180141;会议网址:www.aocprm2008.com;秘书处:北京市海淀区学院南路 86 号东楼 717,100081,中国国际科技会议中心;传真:10-62180141/2,Email: info@aocprm2008.com;投稿及注册:请登录 www.aocprm2008.com 进行网上投稿注册。