

## ·基础研究·

# 次声对 HL-60 白血病细胞株生长的影响

李 克<sup>1</sup> 范建中<sup>1,2</sup> 鲍 勇<sup>1</sup>

**摘要** 目的:探讨次声治疗仪对 HL-60 人白血病细胞株生长的影响。方法:采用次声治疗仪产生的相同强度(档位 3)不同作用时间的次声直接作用于离体培养的 HL-60 细胞(作用组),对照组细胞暴露在空气中,分别在实验处理的 15min、30min、60min、90min 和 120min 取样检测,以台盼蓝活细胞计数,MTT 比色法及流式细胞仪技术,观察比较 HL-60 细胞的生长情况。结果:不同次声作用时间对 HL-60 细胞生长影响的差异不具显著性意义( $P>0.05$ )。结论:治疗剂量的次声处理对 HL-60 细胞的生长无明显影响。

**关键词** 次声;HL-60;增殖

中图分类号:R454, R49 文献标码:A 文章编号:1001-1242(2007)-03-0212-03

The effect of infrasound on the proliferation of HL-60 cells/LI Ke, FAN Jianzhong, BAO Yong//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007, 22(3): 212—214

**Abstract Objective:** To study HL-60 cells' proliferation that were exposed to infrasound field generated by a therapeutic infrasound generator. **Method:** The vitro cultured HL-60 cells of treatment groups were exposed to infrasound-field generated by a therapeutic infrasound generator (with selection button 3), the cells of control groups were exposed to air. The proliferation of the cells would be measured respectively at 15min., 30min., 60min., 90min and 120min. after the treatment. The cell viability would be showed by trypan blue staining, the cell multiplication measured by MTT assay, and the apoptosis of the cells detected with flow-cytometry. The results from each experimental condition were compared to those from appropriate control conditions. **Result:** The differences of the cell proliferations in all experimental conditions were not significant ( $P>0.05$ ). **Conclusion:** HL-60 cells' proliferation were not significantly alerted by a therapeutic infrasound field.

**Author's address** Dept. of Rehabilitation Medicine, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, 510515

**Key words** infrasound; HL-60 cells; proliferation

次声为频率  $1\times10^{-4}$ —20Hz 的弹性波,是由物体的机械振动产生的,次声作用的声压较强时,可引起非线性效应,导致力学、热学、光学、电学等物理效应的出现<sup>[1-2]</sup>。以往研究表明,一定声压级水平的次声能造成生物体损害,损害与声压级有关<sup>[3]</sup>。

近年有学者发现,在较弱的次声作用下,可伴有机体抗氧化系统酶活性增强,代偿反应增高<sup>[4-5]</sup>。次声在疾病诊疗方面有很大的开发潜力,研究低声压级、小剂量的次声对机体的作用将为进一步探讨和利用次声的有益作用维护身体健康,治疗某些疾病开辟新的途径。本实验拟观察国外已用于临床的某型次声治疗仪产生的次声对 HL-60 细胞株生长的影响,为次声治疗的临床应用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 HL-60 细胞及培养

HL-60 细胞由南方医院血液科实验室提供,来源于人急性髓性细胞白血病外周血中的原始粒细胞,培养于含 10% 新生牛血清,200μg/ml 谷氨酰胺

的 RPMI1640 培养液中,置于温度为 37℃,体积分数 5%CO<sub>2</sub>饱和湿度的培养箱内培养。约 2d 传代一次。

### 1.2 次声信号发生源

美国 Chi 公司的 Infrasound8TM 次声治疗仪作为次声信号源发生装置,该仪器主要由次声声头和主机两部分组成,主机面板上的输出档位分为“①、②、③”3 种次声频率及强度组合档,本实验用 3 档进行细胞处理。

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”<sup>[6]</sup>对实验中的次声信号测试结果显示,该仪器在③档时,输出次声频谱主要集中 4—20Hz,次声主频信号的频谱是随机变化的,声强 79.75—86.11dB。

### 1.3 细胞分组和作用方法

1 南方医科大学南方医院康复医学科,广州,510515

2 通讯作者:范建中(南方医科大学南方医院康复医学科,广州,510515)

作者简介:李克,女,硕士研究生

收稿日期:2006-11-16

在无菌超净台中作业,取同密度的对数增长期细胞,分为作用组和对照组两大组,分别置于Φ60mm培养皿中。作用组的细胞培养皿暴露在次声治疗仪声头下,次声声头距液面1.5—2cm,使用次声治疗最高档位③,次声在处理的15min、30min、60min、90min和120min分别取样置于培养箱培养。对照组的细胞培养皿暴露在关闭状态下的次声治疗仪声头下,于相同时间取样后放入培养箱培养。分别为24h、48h进行检测。

#### 1.4 测定方法

**1.4.1 台盼蓝染色法:**将2g台盼蓝,加少量蒸馏水研磨,加双蒸水至50ml,用0.04mm滤纸过滤,PBS稀释至0.04%。将各组培养后的细胞吹打成单细胞悬液,取10μl细胞悬液移入0.5ml EP管中,加入10μl 0.04%台盼蓝溶液,混匀后取10μl,计数板内计数,每个样本反复取样计数3次。分别记录存活细胞及拒染细胞,实验共重复3次。

**1.4.2 噻唑蓝染色法(MTT法):**取50mgMTT,加入10ml PBS(0.01mol/L,pH7.4),在磁力搅拌机上搅拌30min,用0.22μm滤膜除菌,终浓度为5mg/ml,分装后4℃避光保存。将对数增长期细胞处理后收集,每组细胞以每孔200μl接种于96孔板,每孔细胞数为 $1\times10^4$ 个,每组设4个复孔,将96孔板置37℃、5%CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中分别培养24h、48h进行检测。在培养结束前4h加入MTT每孔20μl,继续培养4h后,将96孔板置于平板离心机离心,2000r/min,5min,弃上清,每孔加入DMSO150μl,水平摇床震荡10min,结晶物充分溶解后,至酶标仪(Bio-TEK,美国)检测OD值,设定吸收波长为570nm。实验共重复3次。

**1.4.3 流式细胞术:**将处理后细胞每样本取为 $5\times10^5$ — $1\times10^6$ 个,收集于24孔板内培养,每样本总液量为2ml。培养结束后,2000r/min,5min,弃上清,1×PBS清洗2遍,按凯基生物公司Annexin V-EGFP联合PI双染凋亡试剂盒说明书操作。将Annexin V-EGFP/PI荧光标记染色成功的细胞样品,用流式细胞仪(Beckman Coulter,美国)检测,经488nm的激发光激发,被激发的细胞发射525nm绿色荧光和610nm红色荧光。分别用不同的荧光通道接收,然后用LMD软件对所测数据进行分析,可获得任意一群细胞的细胞凋亡率。

#### 1.5 统计学分析

所有数据应用SPSS13.0统计软件分析,采用均数±标准差表示,用t检验,多组间比较用方差分析,组间比较采用Student Newman Keuls检验。

## 2 结果

### 2.1 台盼蓝染色结果

结果显示(见表1),作用组和对照组细胞在实验处理后的即刻和第24h、第48h检测均显持续增长状态。作用组随次声作用时间延长,细胞生长较对照组未见明显改变。实验过程中拒染细胞较少,细胞存活率达到95%以上。统计分析,对照组与作用组各时间点差异无显著性意义( $P>0.05$ )。

### 2.2 MTT法结果

结果显示(见表2),随着次声作用及空气暴露时间的增加,实验处理后培养48h的两组细胞均呈现逐渐下降趋势。作用组下降幅度较对照组明显,但经统计学检验,相同实验处理时间的作用组和对照组进行配对t检验,结果显示两组之间的差异均无显著性( $P>0.05$ )。

### 2.3 流式细胞技术分析

两组细胞在实验处理120min后分别培养24h、48h进行检测。结果显示每组细胞样本中活细胞均约90%。培养第24h时,作用组凋亡率为11.45%,对照组凋亡率为8.88%(图1,见后置彩色插页1)。培

表1 次声对HL-60细胞存活率的影响 ( $\bar{x}\pm s$ , %, n=12)

组别	对照组	作用组	P
<b>15min</b>			
0h	13.25±2.81	12.42±1.59	0.678
24h	25.17±5.81	25.67±5.62	0.92
48h	52.33±11.55	48.25±12.14	0.695
<b>30min</b>			
0h	11.67±3.39	12.58±2.53	0.727
24h	25.67±5.88	23.67±3.64	0.643
48h	46.92±1.46	42.42±3.61	0.81
<b>60min</b>			
0h	12.5±2.61	13.58±2.79	0.649
24h	22±3.5	21.83±4.22	0.96
48h	49.33±5.14	44.92±0.29	0.211
<b>90min</b>			
0h	13.33±1.04	12.67±1.84	0.614
24h	21±1.39	18.75±4.21	0.429
48h	47.67±5.1	44.42±1.91	0.36
<b>120min</b>			
0h	14.58±1.89	14.42±1.46	0.91
24h	21.25±5.75	18.08±8.81	0.63
48h	37.33±3.97	32.83±2.47	0.171

表2 次声对HL-60细胞增殖的影响 ( $\bar{x}\pm s$ , %, n=12)

组别	对照组	作用组	P
<b>15min</b>			
24h	1.26±0.54	1.3±0.53	0.858
48h	1.69±0.74	1.7±0.79	0.973
<b>30min</b>			
24h	1.23±0.45	1.28±0.48	0.763
48h	1.66±0.65	1.46±0.67	0.427
<b>60min</b>			
24h	1.17±0.56	1.21±0.59	0.864
48h	1.58±0.69	1.47±0.59	0.647
<b>90min</b>			
24h	1.51±0.6	1.42±0.56	0.781
48h	1.66±0.71	1.56±0.62	0.764
<b>120min</b>			
24h	1.06±0.59	0.96±0.46	0.651
48h	1.33±0.57	0.99±0.44	0.09

养第 48h 时作用组凋亡率为 9.05%, 对照组凋亡率为 7.49% (图 2, 见后置彩色插页 1)。

### 3 讨论

次声是频率低于可听声频率范围的机械振动波。广泛存在于我们生活当中,生物体处于次声环境时,若声压级水平达到一定程度,其作用频率与生物体组织器官的固有频率相同时,就会发生共振反应,此时产生的次声刺激最大<sup>[7]</sup>。当前次声研究主要集中在它对机体的负面影响和有害效应上,这种效应与其参数(频率、声压、强度、作用时间等)有关<sup>[8]</sup>。

国内关于次声对离体细胞生物学效应的研究报道较少。有作者发现 16Hz 不同声压级的次声可导致人脐静脉内皮细胞内钙离子浓度不同程度增加,从而引起血管内皮细胞损伤性改变,且其增高与声压级水平相关,认为细胞内钙的增高与次声作用后的细胞损伤相关<sup>[9-10]</sup>。但以上研究未对细胞增殖情况做观察。

国外有关次声作用于离体肿瘤细胞的研究,采用美国 Chi 公司的 Infrasound 8TM 次声治疗仪,其次发出次声主要于的 8—14Hz, 72—79dB, 作用于神经胶质瘤细胞。治疗发现单独应用次声或次声与 X 射线联合应用对细胞增殖无明显影响,但次声与 5-氟尿嘧啶联合应用可抑制细胞的增殖,认为次声可增加离体细胞对化疗药物的敏感性<sup>[11]</sup>。

本研究结果提示,在细胞增殖试验中,随着次声作用时间延长,对照组与作用组细胞增殖差异随之增加,以 120min 为明显,但此差异均无显著性意义。实验过程中坏死细胞较少,提示次声治疗可损伤细胞,但不致使细胞坏死。为了解次声对细胞的坏死及凋亡分期情况,进行流式细胞技术 Annexin V-EGFP/PI 双染,区分坏死细胞及处于各凋亡时期细胞。结果显示,坏死细胞约 0.04%—0.2%,作用组与对照组细胞存活率及凋亡率有约 2% 的差异,早期凋亡与中、晚期的凋亡率较接近。但细胞存活率均约 90%。24h 凋亡较 48h 明显。以上提示次声治疗对离体肿瘤细胞的凋亡影响不明显。

以往的次声作用于离体细胞的研究结果显示,次声作用于细胞,可观察到细胞骨架结构和量的变化,这种变化与细胞内钙离子的释放密切相关。而

现已明确大多数细胞胞内  $\text{Ca}^{2+}$  升高可以诱导细胞凋亡<sup>[12]</sup>。也有实验发现,在次声损伤作用机制中,细胞膜结构变化占有明显的位置<sup>[13]</sup>。因此,次声对细胞骨架与细胞内钙离子的释放的影响以及对细胞膜结构的作用,可能是次声对肿瘤细胞生物学效应的作用机制之一。

本研究结果提示,治疗用次声对离体肿瘤细胞生长的影响不明显,但是否有可逆性损伤的改变,尚需进一步的研究。

### 参考文献

- [1] 陈景藻. 次声的存在及其基本生物效应和研究意义 [J]. 中华物理医学与康复杂志, 1999, 21(3):131—133.
- [2] 庄志强, 裴兆辉, 陈景藻. 次声生物学效应的相关机制 [J]. 疾病控制杂志, 2005, 8(9):328—330.
- [3] 裴兆辉, 陈景藻, 朱妙章. 次声作用后大鼠血浆一氧化氮与内皮素-1 含量变化及意义 [J]. 中国临床康复, 2004, 8(12):2260—2261.
- [4] Sidorenko EI, Obrubov SA, Tumasian AR. Experience of clinical use infrasound pneumomassage in the treatment of progressive myopia in schoolchildren [J]. Vestn Oftalmol, 1997, 113(3):18—20.
- [5] 赵志刚, 陈景藻. 次声与应激 [J]. 国外医学·物理医学与康复杂志, 2000, 20(3):106—108.
- [6] 易南, 陈景藻, 李玲, 等. 次声信号数据采集系统的研制 [J]. 第四军医大学学报, 2001, 22(6):560.
- [7] Osann Okai. Effects of infrasound on respiratory function of man [J]. J Low Freq Noise and Vib, 1986, 5(3):94.
- [8] 陆晓军, 杨秋平, 邢吉红, 等. 次声对人体生理的影响 [J]. 吉林工业大学自然科学学报, 2000, 30(4):89.
- [9] 王冰水, 陈景藻, 李玲, 等. 次声暴露对人脐静脉血管内皮细胞内钙离子浓度的影响 [J]. 中国临床康复, 2005, 9(11):48.
- [10] 邱萍, 李洪, 温宁. 次声对视网膜微血管内皮细胞胞浆  $[\text{Ca}^{2+}]$  水平的影响 [J]. 中国微循环, 2004, 8(2):79.
- [11] Garret Yount, Ryan Taft. Possible Influence of Infrasound on Glioma Cell Response to Chemotherapy: A Pilot Study [J]. The Journal of Alternative and Complementary Medicine, 2004, 10(2):247—250.
- [12] Annunziato L, Amoroso S, Pannaccione A, et al. Apoptosis induced in neuronal cells by oxidative stress: role played by caspases and intracellular calcium ions [J]. Toxicol Lett, 2003, 139(2—3):125—133.
- [13] 朱妙章. 心血管生理学与临床 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2004. 611—614.