



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101782576 A

(43) 申请公布日 2010.07.21

(21) 申请号 201010123365.5

(22) 申请日 2010.03.12

(71) 申请人 北京工业大学

地址 100124 北京市朝阳区平乐园 100 号

(72) 发明人 曾毅 赵丽娇 崔亚松 钟儒刚

(74) 专利代理机构 北京思海天达知识产权代理有限公司 11203

代理人 张燕慧

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 4 页

(54) 发明名称

电磁辐射诱发 Raji 细胞癌变的检测方法

(57) 摘要

本发明涉及一种电磁辐射诱发 Raji 细胞癌变的检测方法。该方法首先培养 Raji 细胞并传代,然后加入促癌剂丁酸钠、巴豆油、12-0-十四烷酰巴豆醇-13-乙酸酯或丁酸钠+巴豆油,暴露于 $30 \sim 90\text{W}/\text{m}^2$ 的电磁辐射下,培养 $3 \sim 15$ 天,最后用免疫酶法检测 EBV-EA 细胞阳性率。本发明方法中的促癌剂可以提高检测的灵敏性。该方法无需特殊仪器,检测过程简单。本发明方法可以应用于工业、科学、医疗以及日常生活中电磁辐射的致癌性风险预评价,对预防电磁辐射对人体健康的远期危害具有重要价值。

1. 一种电磁辐射诱发 Raji 细胞癌变的检测方法,包括以下步骤:

(1)Raji 细胞的培养与传代

将 Raji 细胞在 37℃、5% CO₂ 培养箱内用 RPMI-1640 培养液培养并进行传代,RPMI-1640 培养液含有 10% 小牛血清、1% 青霉素、1% 链霉素、1% 谷胺酰胺;

(2) 暴露实验

将 Raji 细胞中加入促癌剂丁酸钠、巴豆油、12-0- 十四烷酰巴豆醇 -13- 乙酸酯或丁酸钠 + 巴豆油,用 RPMI-1640 培养液培养,将装有 Raji 细胞的培养板置于横电磁波传输小室中,再将该小室置于 5% CO₂ 培养箱中,同时,将 Raji 细胞暴露于功率密度为 30 ~ 90W/m² 的电磁辐射下,设定培养箱温度为 36.5℃,每天辐射 2 小时,培养 3 ~ 15 天;

(3) 免疫酶检测

将经过电磁辐射的 Raji 细胞离心、涂片、晾干、固定处理后,滴加鼻咽癌患者阳性血清,并在 37℃ 培养箱中培养 40 分钟,取出后用磷酸盐缓冲溶液冲洗干净,晾干,加辣根过氧化物酶标记的羊抗人免疫球蛋白 A 进行酶标,并在 37℃ 培养箱中培养 40 分钟,然后放入酶底物溶液中 5 ~ 10 分钟,最后用磷酸盐缓冲溶液冲洗干净后镜检。

2. 根据权利要求 1 的方法,其特征在于促癌剂为 12-0- 十四烷酰巴豆醇 -13- 乙酸酯。

电磁辐射诱发 Raji 细胞癌变的检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种电磁辐射致癌性的检测方法,尤其是电磁辐射诱发 Raji 细胞癌变的检测方法。

背景技术

[0002] 随着科学技术的飞速发展,电磁技术已经成为工业、医疗、通讯等领域中不可或缺的重要工具之一。电磁技术在方便人们日常生活的同时,对人体的影响也受到越来越多的关注。电磁波可以透入生物体,并与生物组织发生相互作用,导致不同生物层次上的形态、结构及功能发生改变,甚至诱发癌症。如何预防或减少电磁辐射对人体的伤害,已日益成为生命科学、环境科学和医疗卫生领域的研究热点。通过对电磁辐射的生物效应进行深入研究,目前已经提出了多种作用机理的模型、假说和理论。1982 年美国制订了一套基于热效应的射频辐射标准,用比吸收率 (Specific Absorption Rate, SAR, 单位为 W/kg) 值来衡量电磁辐射的热效应,该标准逐渐被全世界所接收并沿用至今。但是,越来越多的现象表明仅仅用 SAR 值来衡量电磁辐射对人体的影响是不够的,因为长期的电磁辐射给人体造成一系列的健康问题无法用热效应解释和评价。于是,大量研究尝试分析其它一些参数指标来确定电磁辐射的危害。

[0003] Leszczynski 等人 (D. Leszczynski, et al. Differentiation. 2002, 70 :120 ~ 129) 研究了电磁辐射对人内皮细胞的影响,发现能引起热休克蛋白 27 (HSP27) 的短暂磷酸化,并能激活多种细胞信号转换路径,并提出电磁辐射诱导的 HSP27 活化能阻止细胞色素 C 的凋亡路径,从而导致脑瘤的发生。Di carlo 等人 (A. DiCarlo, et al. J. Cell. Biochem. 2002, 84 :447 ~ 454) 用功率为 3.5mW 的电磁辐射对鸡胚胎进行每日 30 ~ 60 分钟的辐射,连续辐射 4 天,结果发现与对照组相比热休克蛋白 70 (HSP70) 水平下降了 27%,从而胚胎防御缺氧应激的能力降低,提示长期暴露于电磁辐射会由于 HSP70 水平降低而导致细胞自我保护能力降低,从而增加发生肿瘤的可能性。Kramarenko 等人 (A. V. Kramarenko, et al. Int. J. Neurosci. 2003, 113 :1007 ~ 1019) 研究了高频电磁辐射对人脑电图的影响,发现用手机照射人脑后,在颞骨部位出现 2.5 ~ 6.0Hz 的慢波,每 15 ~ 20 秒出现一次,持续约 1 秒;在儿童中有类似的发现,但慢波出现较早、振幅较大、持续时间长且间隔短,表明手机辐射会影响人的大脑,而且可能更容易对儿童大脑造成损伤。然而,并非所有实验都证明电磁辐射会对人体的正常生理指标产生影响。比如在 Tahvanainen 等人 (K. Tahvanainen, et al. Bioelectromagnetics. 2004, 25 :73 ~ 83) 的研究中,他们用 900MHz 和 1800MHz 的手机辐射作用于志愿者 35 分钟,结果发现动脉血压和心率与对照组没有显著差异。

[0004] 以上这些研究由于受到实验条件的限制,不能确定长期的电磁辐射所造成的危害及程度,特别是不能对电磁辐射的致癌作用进行评价。由于在实验研究中利用不同的生物学体系,如不同的细胞或动物亚型及生物体处于不同的生理状态等个体差异,或使用不同的辐射装置、实验程序等分析电磁辐射的生物学后果,有的甚至得出相反的结论,从而对确定电磁辐射的致癌作用带来了困难。因此,目前亟需一种可靠的方法来定量地检测电磁辐

射的致癌性。

[0005] Raji 细胞是一种淋巴瘤细胞系,常用于致癌剂和促癌剂的检测。Raji 细胞携带 Epstein-Barr (EB) 病毒基因,EB 病毒与许多恶性淋巴瘤和上皮性恶性肿瘤有关,其中尤以与 Burkitt 淋巴瘤和鼻咽癌的关系最为密切。正常情况下,EB 病毒在 Raji 细胞中处于潜伏状态,不能自发地产生 EB 病毒增殖后期的抗原和病毒粒子。但当 Raji 细胞被激活时,EB 病毒的早期抗原被激发,其表达会增加。到目前为止,利用 Raji 细胞的这一特性检测电磁辐射诱发细胞癌变的方法尚未见国内外文献报道。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种操作简单、重复性好的电磁辐射诱发 Raji 细胞癌变的检测方法。

[0007] 本发明所提供的一种电磁辐射诱发 Raji 细胞癌变的检测方法,包括以下步骤:

[0008] (1)Raji 细胞的培养与传代

[0009] 将 Raji 细胞在 37℃、5% CO₂ 培养箱内用 RPMI-1640 培养液培养并进行传代,RPMI-1640 培养液含有 10% 小牛血清、1% 青霉素、1% 链霉素、1% 谷胺酰胺;

[0010] (2) 暴露实验

[0011] 将 Raji 细胞中加入促癌剂丁酸钠、巴豆油、12-0- 十四烷酰巴豆醇-13- 乙酸酯 (12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate, TPA) 或丁酸钠 + 巴豆油,用 RPMI-1640 培养液培养,将装有 Raji 细胞的培养板置于横电磁波传输小室 (Transverse Electromagnetic Transmission Cell, 简称 TEM 小室) 中,再将 TEM 小室置于 5% CO₂ 培养箱中,同时,将 Raji 细胞暴露于功率密度为 30 ~ 90W/m² 的电磁辐射下,设定培养箱温度为 36.5℃,每天辐射 2 小时,培养 3 ~ 15 天;

[0012] (3) 免疫酶检测

[0013] 将上述细胞离心、涂片、晾干、固定处理后,滴加鼻咽癌患者阳性血清,并在 37℃ 培养箱中培养 40 分钟,取出后用磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 冲洗干净,晾干,加辣根过氧化物酶标记的羊抗人免疫球蛋白 A 进行酶标,并在 37℃ 培养箱中培养 40 分钟,然后放入酶底物溶液中 5 ~ 10 分钟,最后用 PBS 冲洗干净后镜检。

[0014] 上述步骤 (1) 中的促癌剂优选 12-0- 十四烷酰巴豆醇-13- 乙酸酯。

[0015] 上述步骤 (3) 中的磷酸盐缓冲溶液含有 NaCl 8.0g/L, KCl 0.2g/L, Na₂HPO₄ 1.44g/L, KH₂PO₄ 0.24g/L, pH 7.4。

[0016] 上述步骤 (3) 中的酶底物溶液含有 3,3'- 二氨基联苯胺 0.5g/L, 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐 (Tris-HCl) 0.05mol/L, 0.003% H₂O₂, pH 7.6。

[0017] 本发明方法以 Raji 细胞作为抗原靶细胞,经过电磁波照射后,再用免疫酶法检测 Raji 细胞中 EB 病毒早期抗原 (Epstein-Barr virus early antigen, EBV-EA) 的表达。

[0018] 本发明方法中的促癌剂丁酸钠、巴豆油和 TPA 可以激活类淋巴细胞内潜伏状态的 EB 病毒,诱发 Raji 细胞中 EBV-EA 的表达。

[0019] 本发明将 Raji 细胞作为体应用于检测电磁辐射的致癌作用,使用免疫酶法对阳性细胞进行检测,了一种通过检测 Raji 细胞中的 EBV-EA 来检测电磁辐射致癌性的方法,无需特,检测过程简单。

[0020] 本发明方法可以应用于工业、科学、医疗以及日常生活中电磁辐射的致癌性预评价,这将对预防电磁辐射对人体健康的期危害具有重要价值。

[0021] 具体实方

[0022] 实 1

[0023] (1)Raji 细胞的培养与传代

[0024] 将 Raji 细胞在 37℃、5% CO₂ 培养箱内用 RPMI-1640 培养液培养,当细胞生长增殖形成单层细胞后,小心吸出培养液,再加入的培养液,用吸将细胞成单细胞液,然后将细胞液吸出分装至 3 个培养中,放入 CO₂ 培养箱中续培养;

[0025] (2) 暴露实验

[0026] 在 Raji 细胞培养板上加入度为 500ng/m 丁酸钠,用 RPMI-1640 培养液培养,将装有 Raji 细胞的培养板放入 TEM 中,再将 TEM 置于 5% CO₂ 培养箱中,同时,将 Raji 细胞暴露于功率密度为 30W/m² 的电磁辐射下,设定培养箱温度为 36.5℃,每天辐射 2 小时,培养 3 天,电磁辐射由 Agilent 8648C 信号产生,经 20W 功率放大放大,电磁辐射度由 Narda 制;

[0027] (3) 免疫酶检测

[0028] 将对照组和实验组细胞离心后,重细胞并细胞数,取 100uL 细胞涂片,晾干,然后用预的在 4℃ 箱中固定 15 分钟,晾干,滴加鼻咽癌患者阳性血清,将涂片放入,在 37℃ 培养箱中培养 40 分钟,取出后用 PBS 冲洗干净,晾干,加辣根过氧化物酶标记的羊抗人免疫球蛋白 A(,经科化学试剂)进行酶标后放入,在 37℃ 培养箱中培养 40 分钟,取出,再用 PBS 冲洗干净,将涂片放入 100mL 酶底物溶液中 5 ~ 10 分钟,最后用 PBS 冲洗干净后镜检,并数 500 个细胞中出现的阳性细胞数。

[0029] 免疫酶检测 EBV-EA 细胞阳性率为 4.2%。

[0030] 实 2

[0031] 步骤 (2) 中使用度为 500ng/mL 巴豆油,其它步骤同实 1。免疫酶检测 EBV-EA 细胞阳性率为 5.7%。

[0032] 实 3

[0033] 步骤 (2) 中使用度为 500ng/mL TPA,其它步骤同实 1。免疫酶检测 EBV-EA 细胞阳性率为 8.1%。

[0034] 实 4

[0035] 步骤 (2) 中使用度为 500ng/mL 丁酸钠 + 度为 500ng/mL 巴豆油,其它步骤同实 1。免疫酶检测 EBV-EA 细胞阳性率为 6.9%。

[0036] 实 5

[0037] 步骤 (2) 中培养时间为 15 天,其它步骤同实 1。免疫酶检测 EBV-EA 细胞阳性率为 7.6%。

[0038] 实 6

[0039] 步骤 (2) 中培养时间为 15 天,其它步骤同实 2。免疫酶检测 EBV-EA 细胞阳性率为 9.3%。

[0040] 实 7

[0041] 步骤 (2) 中培养时间为 15 天,其它步骤同实 3。免疫酶检测 EBV-EA 细胞阳性率为 14.2%。

[0042] 实 8

[0043] 步骤 (2) 中培养时间为 15 天, 其它步骤同实 4。免疫酶检测 EBV-EA 细胞阳性率为 12.7%。

专利名称(译)	电磁辐射诱发Raji细胞癌变的检测方法		
公开(公告)号	CN101782576A	公开(公告)日	2010-07-21
申请号	CN201010123365.5	申请日	2010-03-12
[标]申请(专利权)人(译)	北京工业大学		
申请(专利权)人(译)	北京工业大学		
当前申请(专利权)人(译)	北京工业大学		
[标]发明人	曾毅 赵丽娇 崔亚松 钟儒刚		
发明人	曾毅 赵丽娇 崔亚松 钟儒刚		
IPC分类号	G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种电磁辐射诱发Raji细胞癌变的检测方法。该方法首先培养Raji细胞并传代，然后加入促癌剂丁酸钠、巴豆油、12-O-十四烷酰巴豆醇-13-乙酸酯或丁酸钠+巴豆油，暴露于30~90W/m²的电磁辐射下，培养3~15天，最后用免疫酶法检测EBV-EA细胞阳性率。本发明方法中的促癌剂可以提高检测的灵敏性。该方法无需特殊仪器，检测过程简单。本发明方法可以应用于工业、科学、医疗以及日常生活中电磁辐射的致癌性风险预评价，对预防电磁辐射对人体健康的远期危害具有重要价值。