

发光二极管光源照射日本大耳白兔 皮肤的安全性评价

李彦红¹, 张继刚², 徐艳峰¹, 韩云林¹, 黄 澜¹, 江彬彬², 朱 华¹,
徐玉环¹, 杨维玲^{2*}, 秦 川^{1*}

(1. 中国医学科学院, 北京协和医学院, 医学实验动物研究所, 卫生部人类疾病比较医学重点实验室, 国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室, 新发再发传染病动物模型研究北京市重点实验室, 北京 100021; 2. 中国人民解放军火箭军总医院, 北京 100088)

【摘要】 目的 通过 LED 白色光源照射日本大耳白兔皮肤组织, 对 LED 光源照射的安全性进行初步的评价。**方法** 动物随机分成照射组 and 对照组。照射组动物剔除背部毛发, LED 光源照射, 强度为 50 mw/cm², 对照组动物以普通日光灯光源照射, 两组均每天照射 5 h, 连续 3 个月。观察动物皮肤有无红肿, 测量动物进食、体重、体温等改变情况; 照射完毕采集外周血测量常规、生化指标; Elisa 分析免疫细胞及细胞因子改变情况; 脏器组织病理检测, 及分析皮肤弹力纤维变化情况; 皮肤免疫组织化学分析 C-myc、P53、细胞周期蛋白 D1 (CCND1) 等癌基因及抑癌基因的表达变化。**结果** 照射组兔皮肤未见红肿表现, 体重在 6 周后稍高于对照组, 体温 3 周、6 周有差别, 进食未见异常; 血常规有白细胞增多, 生化检测尿素、肌酐水平有增高, 但在正常范围内; ELISA 分析血免疫细胞 CD3T 细胞、细胞因子 IL-6、TNF- α 、IFN- γ 水平在两组无明显差别, 照射组动物 CD19B 细胞, IL-4 水平升高; 照射组动物脏器组织病理未见明显异常结构改变, 皮肤弹性纤维分布无异常; 皮肤组织内细胞周期蛋白 (CCND1), C-Myc 蛋白, P53 蛋白表达与对照组相比没有差异。**结论** LED 光源照射日本大耳白兔 3 个月后, 未引起体内明显的组织病理学改变, 也未引起皮肤肿瘤相关因子的改变。

【关键词】 发光二极管; 日本大耳白兔; 皮肤; 安全评价

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)07-0024-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.07.004

The safety assessment on the light emitting diode (LED) resource through irradiating the skin of Japanese big-ear white rabbits

LI Yan-hong¹, ZHANG Ji-gang², XU Yan-feng¹, HAN Yun-lin¹, HUANG Lan¹,
JIANG Bin-bin², ZHU Hua¹, XU Yu-huan¹, YANG Wei-ling^{2*}, QIN Chuan^{1*}

(1. Key Laboratory of Human Diseases Comparative Medicine, Ministry of Health; Institute of Medical Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences; Key Laboratory of Human Diseases Animal Models, State Administration of Traditional Chinese Medicine; Beijing key Laboratory for Animal Models of Emerging and Reemerging infectious Disease; Peking Union Medicine College, Beijing 100021, China; 2. The General Hospital of the PLA Rocket Force, Beijing 100088, China)

【基金项目】 十二五重大科技专项(2012ZX10004-501); 国家高技术研究发展计划(863 计划) 课题子任务(2003AA123310)。

【作者简介】 李彦红(1983 -), 女, 硕士, 研究方向: 病理学与病理生理学。E-mail: liyanhong8408@163.com; 张继刚, 男, 副主任医师。Email: jigang_zhang@sina.com。

【通讯作者】 秦川, 女, 教授。Email: qinchuan@pumc.edu.cn; 杨维玲, 女, 主任医师。Email: ywlderma@sina.com。

[Abstract] Objective To evaluate the safety of Light emitting diode (LED) source through irradiating the skin of Japanese big-ear white rabbits. **Methods** Animals were randomly divided into irradiated group and control group. Animals in the two groups were irradiated with LED light source after eliminating back hair ($50\text{mw}/\text{cm}^2$) and the ordinary fluorescent lamp, respectively. The animals were irradiated for 5 hours every day for 3 months. The changes of animal skin symptoms, feeding, body weight, and temperature were observed and detected; the blood routine and biochemical indexes were tested; the changes of haematological immune cells and cytokines were analyzed by ELISA; histopathology and elastic fibers of skin were detected; the levels of C-myc, P53, and cyclin D1 in skin were tested by immunohistochemistry. **Results** The skin of rabbits in irradiated group showed no abnormal change; the weight was higher than the control group animals at the 6th week, and the temperature had difference at the 3rd and 6th week, the diet showed no abnormal. Blood routine showed white blood cells increased; biochemical detection manifested urea and creatinine levels increased, but the indexes are in normal range; the hematological CD3T cells, cytokines IL-6, TNF- α and IFN- γ in the two group animals had no significant difference. The levels of CD19B cell and IL-4 level increased in irradiated group; The viscera histopathology structure and skin elastic fibers distribution in irradiated group animals showed normal; the expression of cell cycle protein 1 (CCND1), c-myc protein and P53 protein in skin of irradiated group had no difference with control. **Conclusions** After irradiating 3 months, the LED light source had not caused the obvious pathology damage of tissues and change of skin tumor related factors to the rabbits.

[Key words] Light emitting diode; Japanese big-ear white rabbit; Skin; Safety assessment

发光二极管(light emitting diode, LED)为半导体固体发光器件,两端加压后,注入半导体中的载流子发生复合,引起光子发射而产生光^[1]。随着半导体工艺的快速发展,新型 LED 光源不断推出,而且技术日益成熟,功率、发光效率不断提高,光谱从紫外到红外均已实现。LED 光源具有冷光源、工作电压低、功耗低、波长可调、绿色环保、寿命长等特点,已广泛应用于信号指示、装饰照明、液晶背光灯领域,而且在医学方面也开始应用,如医用照明、医学诊断和医学治疗等方面^[1]。但是关于 LED 光源的安全性问题研究的并不是很多,而且长时间照射是否会对机体造成潜在性的危害,均未见有明确报道。本文拟用 LED 光源照射日本大耳白兔 3 个月,观察其生理生化及病理指标,对 LED 光源照射的安全性进行初步的评价。

1 材料和方法

1.1 实验动物

普通级日本大耳白兔,6~8 周龄,体重 2.4~2.6 kg,雌雄各 6 只,购自北京富龙腾飞养殖中心[SCXK(京)2013-0004],动物在中国医学科学院医学实验动物研究所新药安全评价中心普通级动物房[SYXK(京)2010-0030]饲养及管理,每天光照明暗各 12 h,相对湿度 40%~60%,温度 18~25℃,每笼 1 只,自由摄食和饮水。实验操作已经过实验动物研究所实验动物使用管理委员会批准(ILAS-PL-2014-005)。

1.2 实验材料

LED 白色光源(GY225 型,由山西光宇半导体照明股份有限公司提供),功率 $50\text{mw}/\text{cm}^2$,光通量 4.51 m,距离 2~2.5 m,光源可悬吊屋顶相当于普通照明的方式连续照射。

1.3 实验方法

1.3.1 光源照射

动物随机分成两组:实验组:接受 LED 光源照射;对照组:以普通日光灯光源照射作为对照。动物剔除背部毛发,LED 光源照射,距离 2~2.5 m,每天 5 h,连续 3 个月;对照组动物以普通日光灯光源照射。每天 5 h,连续 3 个月。

1.3.2 临床观察

照射过程中观察动物局部皮肤有无红肿情况;观察进食,每周记录动物体重、体温的改变,并比较。

1.3.3 动物血液免疫学检测

照射结束后,耳源静脉采集动物外周血,检测血常规(Rayto RT-7600S, USA)、生化(谷丙转氨酶-ALT,尿素,血肌酐,胆固醇,甘油三脂,葡萄糖)^[2];ELISA 分析兔外周血免疫细胞 CD3(cluster differentiation 3)(QT-T98065, Qiyibio) T、CD19(MI027955, Mlbio) B 细胞;细胞因子 IL(interleukin)-4(CSB-E08745Rb, Cusabio)、IL-6(CSB-E06903Rb, Cusabio)、IFN(interferon)- γ (ER5400, solarbio)、TNF(tumor necrosis factor)- α (CSB-E06998Rb, Cusabio)等水平以明确动物免疫状态的变化。

1.3.4 病理及免疫组织化学分析

照射结束后,动物用戊巴比妥钠(30 mg/kg)过量麻醉并放血致死,解剖取皮肤及其它组织,10%福尔马林溶液固定,石蜡包埋切片,进行病理检测;皮肤弹力纤维染色分析真皮内弹力纤维变化情况;免疫组织化学分析 C-myc、P53、细胞周期蛋白 D1(CCND1)等癌基因及抑癌基因的表达变化。

苏木素-伊红(HE)染色:切片脱蜡至水,经苏木素染色,盐酸酒精分化,氨水反蓝后伊红染色,脱水透明封片,观察组织病理改变。

皮肤弹性纤维染色(Gomori's 醛品红):切片脱蜡至水,经高锰酸钾溶液氧化,草酸漂白,水洗入染液(配制:碱性品红 1 g,70%酒精 98 mL,三聚乙醛 1 mL,浓盐酸 1 mL)15 min,70%酒精分化,0.5%橙黄 G 对比染色后脱水透明封片。

免疫组织化学染色:切片脱蜡至水,抗原修复,封闭后加一抗 C-myc (MD645-B, MDL),P53

(ab194404, abcam), CCND1 (ARP33370 _ P050, AVIVA SYSTEM BIOLOGY),4℃过夜,加相应二抗(PV9001,PV9002,购自中杉金桥),DAB 显色,苏木素复染,流水冲洗后,脱水透明封片。观察这些因子在两组动物皮肤的表达水平。

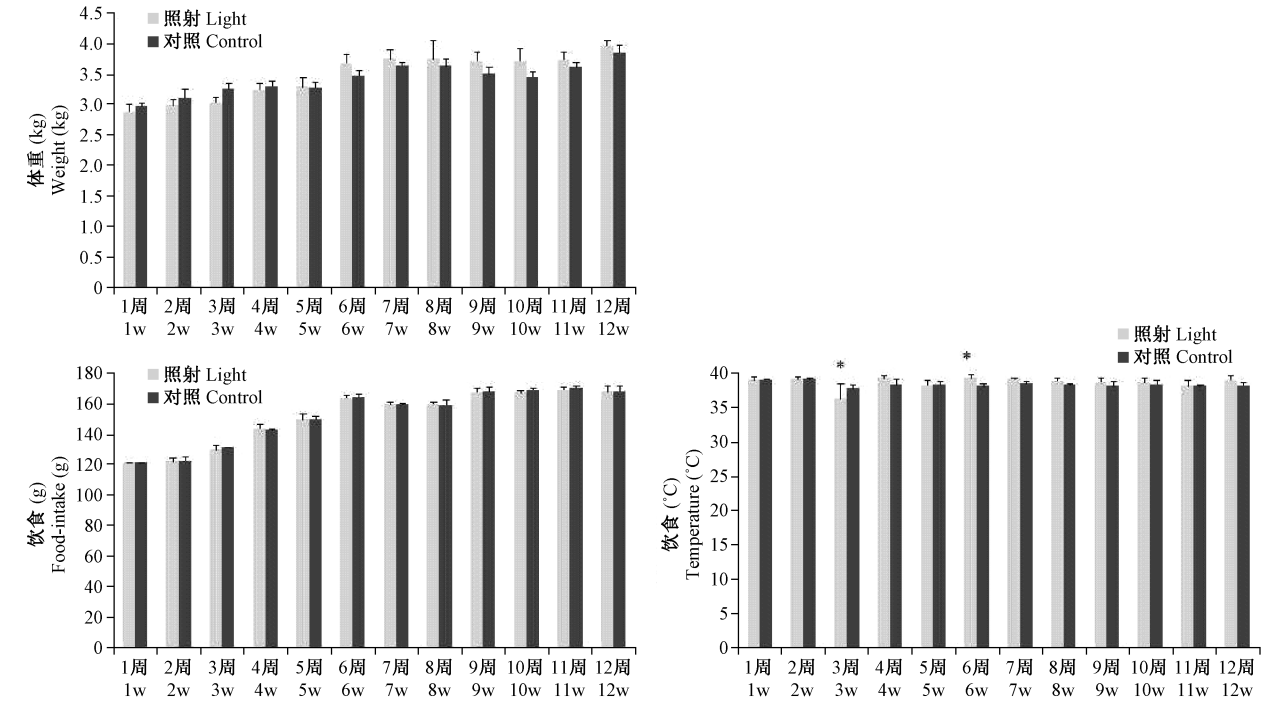
1.4 数据分析

染色切片应用 Image-pro-plus 软件进行图像结果分析,数据经 Microsoft Excel 处理,实验数据以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组数据比较用 *t* 检验方法,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 临床观察

动物在照射过程中,皮肤未见红肿异常表现。两组动物的进食、体重测量结果未见明显异常;动物的体温除第 3 周、6 周改变有差异(*P* < 0.05)外,其余时间段比较无差异。(图 1)



注: * :*P* < 0.05, 与对照组相比。

图 1 动物体重、饮食和体温随时间改变

Note. * :*P* < 0.05, compared with control group.

Fig.1 The weight, diet and body temperature of animals changed with time

2.2 常规生化检测

血常规检测照射组白细胞较对照组增多(*P* < 0.05),中间细胞(白细胞中的嗜酸、嗜碱、单核细胞)、淋巴细胞、中性粒细胞也增多,但差别无统计学意义。平均红细胞血红蛋白量(MCH)和平均红

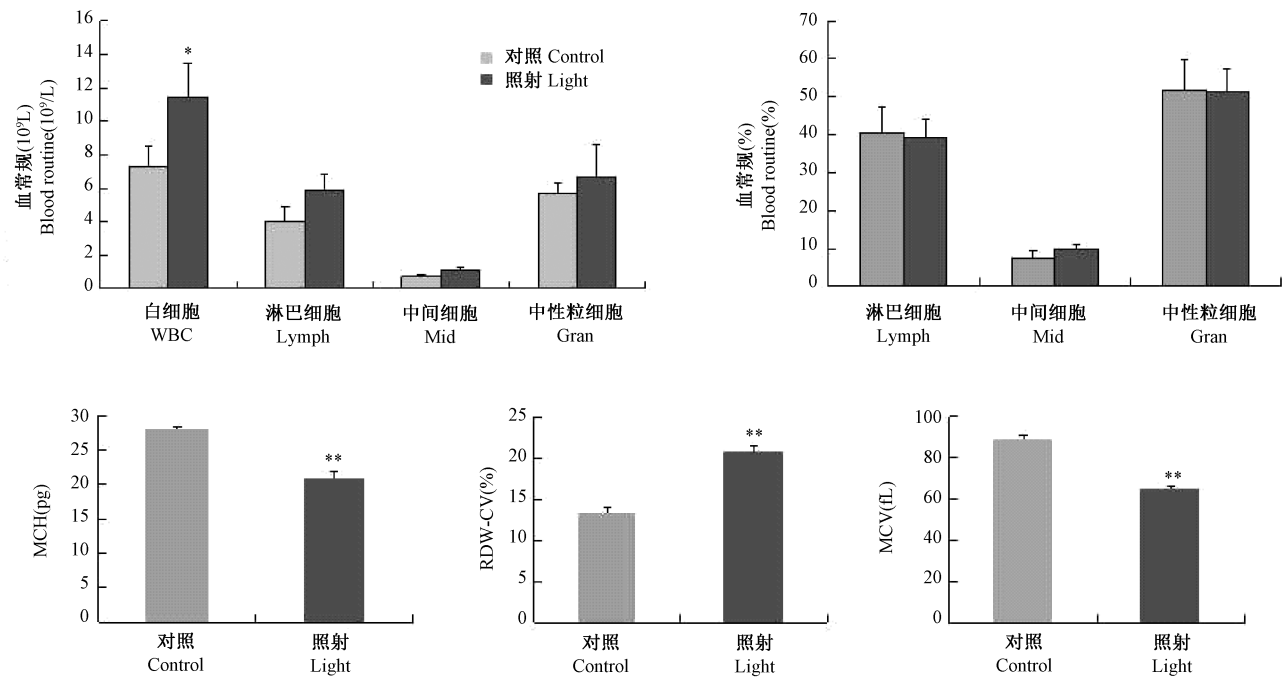
细胞容积(MCV)有所下降(*P* < 0.01),但平均红细胞血红蛋白浓度并没有异常改变,红细胞分布变异系数(RDW-CV)升高(*P* < 0.01)。其余均未见异常改变。(图 2)

血生化检测两组动物血清谷丙转氨酶(ALT),

血糖 (GLU)、甘油三酯 (TG)、胆固醇 (TC) 没有明显差异; 血清尿素 (UREA) 和肌酐 (CR) 水平在照射组有所升高 ($P < 0.01$)。(图 3)

2.3 血液免疫学检测

动物血液学检测免疫细胞 CD3T 细胞含量两组无差异, CD19B 细胞在照射组升高 ($P < 0.05$); 细胞因子检测 IL-4 水平在照射组升高 ($P < 0.01$), IL-6, TNF- α , IFN- γ 水平在两组无明显差别。(图 4)

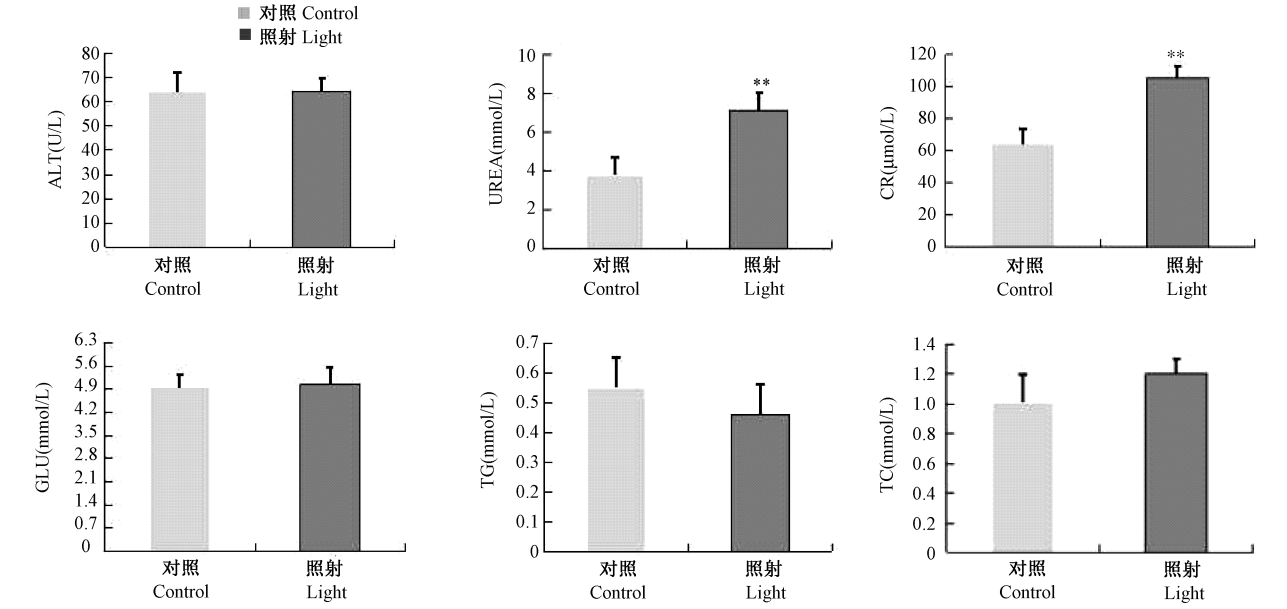


注: * : $P < 0.05$; ** : $P < 0.01$, 与对照组相比。

图 2 血常规检测

Note. * : $P < 0.05$; ** : $P < 0.01$, Compared with control group.

Fig. 2 Blood routine test

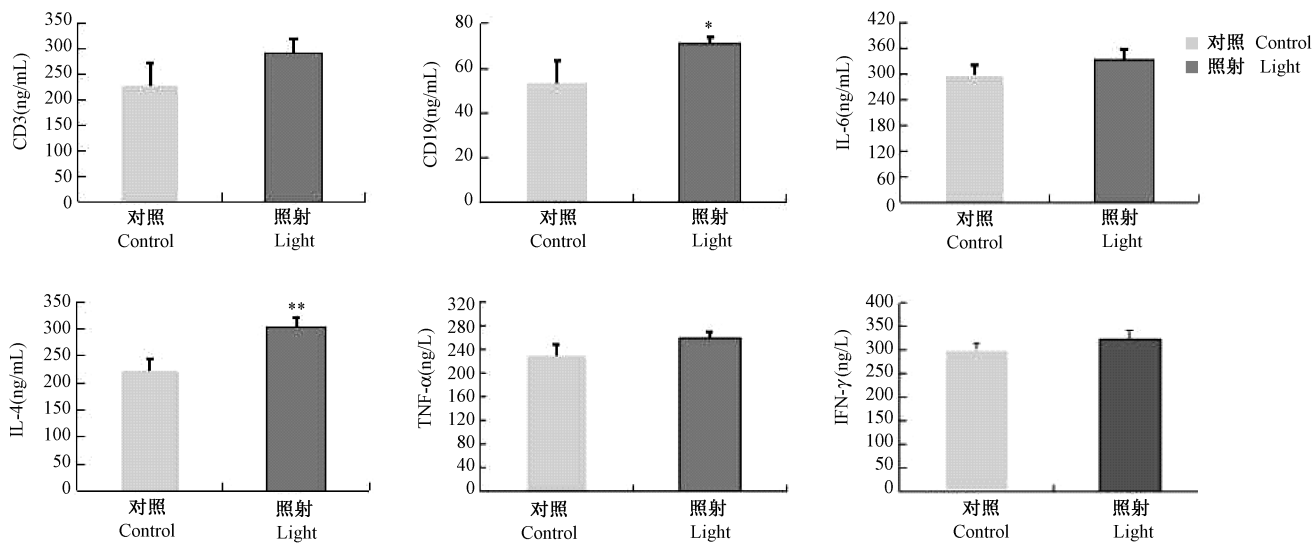


注: * : $P < 0.05$; ** : $P < 0.01$, 与对照组相比。

图 3 血生化检测

Note. * : $P < 0.05$; ** : $P < 0.01$, Compared with control group.

Fig. 3 Hemorheological biochemical detection



注：*： $P < 0.05$ ；**： $P < 0.01$ ，与对照组相比。

图 4 血液免疫学改变

Note. *： $P < 0.05$ ；**： $P < 0.01$ ，Compared with control group.

Fig. 4 Hemorheological immunologic changes

2.4 病理检测

组织病理苏木素-伊红染色显示,两组动物皮肤各层结构未见异常改变,层次清楚,少数皮肤真皮少量炎细胞浸润;皮肤弹性纤维染色显示分布无异常(图 5);其余各脏器病理改变未见异常。

皮肤免疫组化检测结果为细胞周期蛋白
照射 Light

(Cyclin D1, CCND1), C-Myc 癌基因蛋白, P53 抑癌基因表达蛋白两组均无明显差异。(图 6,7)

3 讨论

LED 光源目前已在某些领域被广泛应用,甚至未来会替代传统照明光源用于室内照明,但我们应
对照 Control

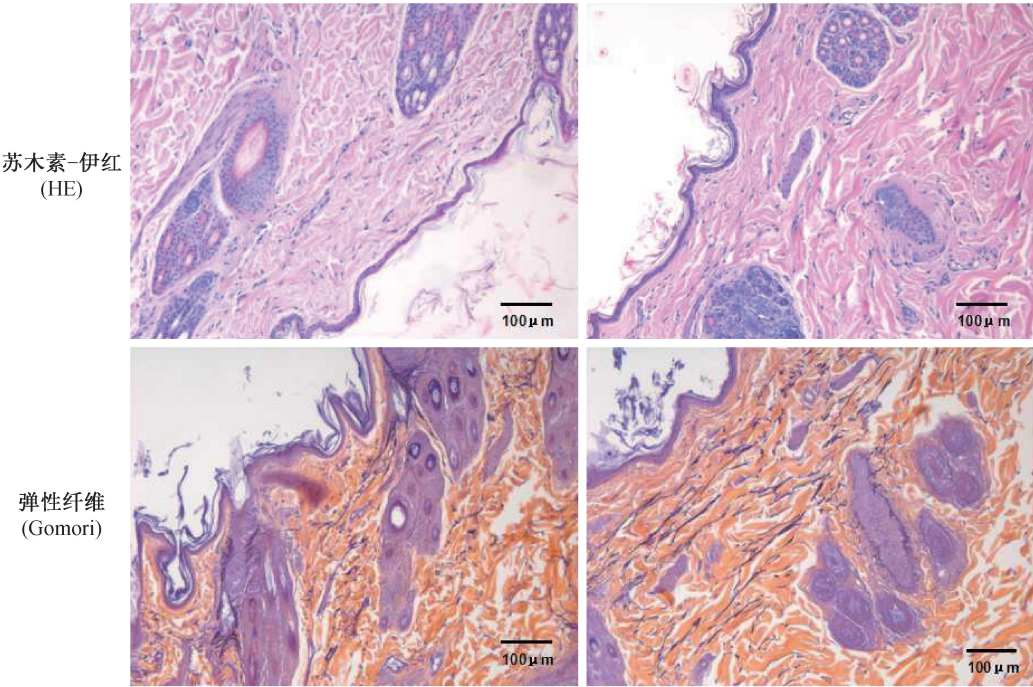


图 5 皮肤苏木素-伊红 (HE) 和弹性纤维染色 (Bar = 100 μm)

Fig. 5 The htoxylin-eosin (HE) and elastic fiber staining of skin

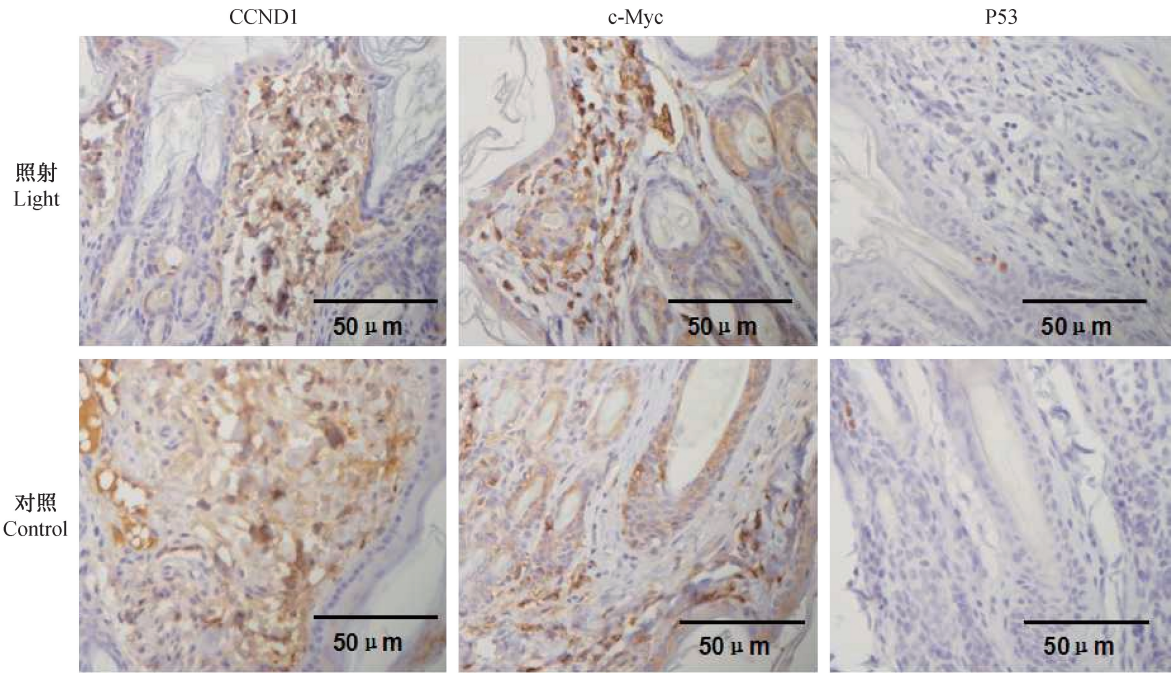


图 6 皮肤免疫组化染色(Bar = 50 μm)
Fig.6 The immunohistochemical staining of skin

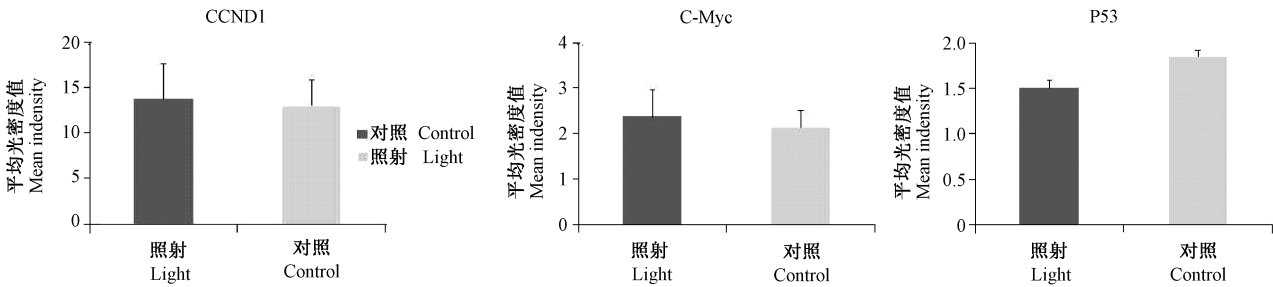


图 7 皮肤免疫组化染色统计结果
Fig.7 The statistical results of immunohistochemical staining in skin

该对 LED 光源的长时间使用的安全性进行初步的认识和评价。本研究用 LED 白光照射日本大耳白兔 3 个月,观察其生理、生化、免疫、病理指标及致癌作用等方面进行初步观察,或以后进行更长时间,更深入、系统的检测来确定其使用系数的绝对安全性。

实验组动物在照射过程中,LED 光源对其体重、进食未引起明显异常改变,体温虽在某个阶段与对照组存在差别,但体温的测量值均在兔的体温波动正常范围内^[3],因此改变无意义。

血常规检测照射组动物白细胞增多,但据文献报道兔的血白细胞正常值变化范围为(5.5~12.5)×10⁹/L^[4],所测结果包含在此范围内,属于正常。血常规中平均红细胞体积(MCV)、平均红细胞血红蛋白浓度(MCHC)、平均红细胞血红蛋白量(MCH)

是反映红细胞形态特征的指标,独立的指标改变不能作为疾病诊断的依据,需结合红细胞体积分布宽度(RDW)相互参照才能用来判断机体生理生化状况^[5],而本研究中 MCHC 并未发现异常,MCV, MCH, RDW 虽然两组比较后有差异,但根据文献^[3,5]报道的这些指标的参考值范围,本实验所测结果基本正常,所以改变的意义不大。照射 3 月后的实验组兔血生化检测肌酐、尿素氮水平较对照组增高,但文献^[5-7]报道的这些指标参考值范围均包含该实验所测结果,因此兔的这些常规生化指标的改变虽波动范围大但正常。血液免疫细胞及细胞因子检测结果 CD19B 淋巴细胞增多,IL-4 增多,其余检测指标结果与对照组无差别。B 淋巴细胞主要作用是产生抗体,参与体液免疫应答并清除抗原,而 IL-4 可以促进 B 淋巴细胞增殖^[8],这说明动物体

内可能存在 B 细胞免疫反应,该免疫反应是机体的一种适应和防御反应。结合组织病理学结果,对照及实验组动物均有皮肤、肺脏等少数组织出现轻度炎症反应,考虑原因可能为实验操作、动物的应激^[9]、加之动物的个体差异,而引起动物机体的不同程度的炎症反应及表现。例如动物接受毛发修剪的过程中,固定架对动物身体的固定,及剃毛器对皮肤的刺激等,虽手法和其它条件一致,但不可避免会引起动物不同程度的挣扎、损伤及生理反应改变,进而造成机体不同程度的免疫功能紊乱及炎症反应。

病理学检测对照及实验组动物除皮肤、肺脏等少数组织出现轻度炎症反应外,其余脏器均未见明显异常器质性病变。皮肤肿瘤相关因子的免疫组化检测显示两组动物无明显差别。细胞周期蛋白 Cyclin D1 是细胞周期中短暂出现的原癌基因表达产物,具有严格的周期顺序性,主要功能是促进细胞增殖,其过度表达可致细胞增殖失控而恶性化^[10],实验证明在照射组和对照组表达无明显差别,照射并未引起其过度表达;C-Myc 癌基因是 myc 基因家族的重要成员之一,c-myc 基因既是一种可易位基因,又是一种多种物质调节的可调节基因,C-myc 基因的表达一般与细胞的生长状态有关,C-myc 与许多恶性肿瘤的发生、发展密切相关,其蛋白高表达在细胞恶性转化和增殖中起到重要作用^[11],实验表明两组动物 C-myc 癌基因的表达也无明显差异;P53 是最重要的抑癌基因,对肿瘤细胞的凋亡具有促进作用,还具有帮助细胞基因修复缺陷的功能^[12]。正常条件下,P53 蛋白在细胞内的含量维持在一个较低的水平,当细胞发生 DNA 损伤或原癌基因突变激活时,细胞内含量随即升高,引发一系列下游段应激反应^[13]。在各种肿瘤及细胞转化过程中会高表达,P53 突变和过度表达对肿瘤的发生发展起到一定的作用^[14]。本实验研究表明两组动物皮肤 P53 蛋白均低表达或不表达。

综上,LED 白色光源照射日本大耳白兔 3 个月,某些常规生化指标较对照组有差别,但不具有生理学意义;血液免疫指标部分也存在差别,但不

能排除动物因个体差异、操作及应激致炎性病变后引起的免疫反应,而且属于轻度炎性反应;组织学观察未见明显的病理性损伤;皮肤肿瘤学观察未见相关肿瘤分子相对的异常表达;这些实验表明 LED 光源照射 3 个月,未对动物身体造成明显的病理损伤。但是将 LED 灯取代照明灯后更长时间的照射安全性问题,仍需进行深入系统的实验研究。

参考文献:

- [1] 侯珏,刘陈. LED 在医学中的应用及展望[J]. 光学仪器, 2010, 32(1): 90-94.
- [2] 谢连志,曾秀雅,王前明,宋秀宇. 临床生化检验测量不确定度的探究[J]. 中国医学创新,2013,10(28): 90-91.
- [3] 病理生理教研组. 我国兔体温,白血球总数及分类的正常值[J]. 北京大学学报:医学版,1960(3):209.
- [4] 施新猷. 现代医学实验动物学[M]. 人民军医出版社. 2000, 第 1 版.
- [5] 丁雷. 新西兰兔血液学参数的研究[D]. 东北林业大学, 2010.
- [6] 岳乘飞,程水生,杨果杰,等. 不同周龄大耳白兔血液生理生化指标的测定[J]. 中国兽药杂志,2000,35(3):17-21.
- [7] 张秋桂,何科明,杨柞升,等. 实验兔常用血清生化指标参考值测定[J]. 陕西医学检验,1993,8(4):215-216.
- [8] 何维. 医学免疫学[M]. 人民卫生出版社. 2010,第 2 版.
- [9] 董齐. 危重病人代谢与营养支持[J]. 中国实用外科杂志, 2010,30(11):914-915.
- [10] Iosiya T, Matsushime H, Valentine M, *et al.* Genomic organization, chromosomal localization, and independent expression of human Cyclin D genes[J]. Genomics, 1992,13(3):565-574.
- [11] Studzinski GP, Brelvi ZS, Feldman SC, *et al.* Participation of C-myc protein in DNA synthesis of human cells [J]. Science, 1986, 234(4775): 467-470.
- [12] 李文娟,潘庆杰,李美玉. P53 基因及其功能研究进展[J]. 生物技术通讯, 2014,25(2):282-285.
- [13] 魏永永,侯静,唐文如,等. P53 与 Ras 协同及其在肿瘤发生中的作用[J]. 遗传, 2012, 34(12):1513-1521.
- [14] Klemi PJ, Pylkanen L, Kilhoma P, *et al.* P53 protein detected by immunohistochemistry as a prognostic factor in patients with epithelial ovarian carcinoma [J]. Cancer, 1999, 76(1):120-127.

[修回日期]2016-01-06