

· 基础研究 ·

不同磁感强度磁场对人脑微血管内皮细胞生物学效应的影响

孟庆楠 王益民 阎冰 马轶文 岳冬梅

【摘要】 目的 观察不同磁感强度磁场对人脑微血管内皮细胞(HBMEC)生物学效应的影响。**方法** 提取传代后处于对数生长期的 HBMEC 并将其分为对照组、不同强度(其极面中心磁感强度分别为 26 mT、62.5 mT、110.7 mT、215.6 mT)磁场组。经体外培养 72 h 后,分别采用乳酸脱氢酶(LDH)法检测各组细胞细胞膜改变,采用超氧化物歧化酶(SOD)法、丙二醛(MDA)法检测磁场对细胞氧化损伤的影响;采用倒置显微镜观察细胞形态学变化;采用流式细胞仪观察细胞凋亡情况。**结果** 与对照组比较,磁感强度为 215.6 mT 的磁场组细胞 LDH 值明显升高,组间差异具有统计学意义($P < 0.05$),其细胞氧化损伤、凋亡情况与对照组间差异无统计学意义($P > 0.05$),细胞形态也无明显改变;与对照组比较,磁感强度 26 mT、62.5 mT、110.7 mT 的磁场组细胞 LDH 值、细胞氧化损伤及凋亡均无明显差异($P > 0.05$),细胞形态无明显改变。**结论** 不同磁感强度磁场对 HBMEC 生物学效应的影响不同,其中磁感强度 215.6 mT 的磁场对 HBMEC 细胞膜具有一定影响作用,但对细胞氧化损伤、凋亡及形态尚无影响,其作用效果及相关机制还有待进一步探讨。

【关键词】 磁感强度; 人脑微血管内皮细胞; 乳酸脱氢酶; 氧化损伤; 细胞凋亡; 细胞形态

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30873467)

The biological effects of magnetic fields on microvascular endothelial cells in the human brain Meng Qing-nan*, Wang Yimin, Yan Bing, Ma Yiwen, Yue Dongmei. * Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Corresponding author: Wang Yimin, Email: wym@tjutcm.edu.cn

【Abstract】 Objective To observe the biological effects of magnetic fields of different intensities on microvascular endothelial cells in the human brain (HBMECs). **Methods** HBMECs were cultured in vitro under normal conditions and randomly divided into a control group and several magnetic induction groups—26 mT, 62.5 mT, 110.7 mT and 215.6 mT at the center pole. Any changes to the cytomembranes were observed 72 h after planking using the lactate dehydrogenase (LDH) method. Superoxide dismutase and malondialdehyde methods were used to detect cellular oxidation due to the magnetic field. An inverted microscope was used to observe any changes in cell morphology, and flow cytometry was employed to detect cell apoptosis. **Results** Compared with the control group, the LDH value of the 215.6 mT group was significantly higher, but there were no significant differences in oxidative damage, apoptosis or morphology observed. Moreover, there were no significant differences between the controls and the 26 mT, 62.5 mT and 110.7 mT groups in any of the above measurements. **Conclusion** Magnetic fields of different intensity have different biological effects on HBMECs. A 215.6 mT magnetic field influences their cell membranes but causes no oxidative damage, cell apoptosis or morphological changes. These observations and the mechanism need further exploration.

【Key words】 Magnetic induction; Human brain microvascular endothelial cells; Oxidative damage; Cell apoptosis; Cell morphology

Fund program: The National Natural Science Foundation of China (grant 30873467)

磁生物学(magnetobiology)是一门新兴的边缘学科,它是以磁场对生物体的作用效果作为研究内容,探

讨磁场与生物体之间的作用关系^[1]。近年来随着非药物治疗法(non-medicine therapy)兴起,磁场生物效应(biological effects)亦受到越来越多关注^[2]。现代医学表明,高科技磁性材料作用于人体患病部位、穴位或经络,磁场能透入人体组织并发挥治疗作用^[3]。近年来国内、外开展了大量关于磁场生物学效应的应用及基

基础研究,已成为生物医学工程学研究热点^[4-7]。本研究以人脑微血管内皮细胞(human brain microvascular endothelial cell, HBMEC)作为观察对象,探讨不同磁感强度(26 mT、62.5 mT、110.7 mT、215.6 mT)永磁磁场对 HBMEC 细胞膜、氧化损伤、细胞凋亡及细胞形态的影响,从而为临床应用磁场预防及治疗脑血管疾病提供基础依据。

材料与方法

一、实验用磁源

使用极面中心(polar surface center)磁感强度分别为 26 mT、62.5 mT、110.7 mT、215.6 mT 的 4 组圆片磁源,简称磁源 A 组、B 组、C 组及 D 组,磁片尺寸分别为

Φ12 mm×2 mm、Φ12 mm×2 mm、Φ12 mm×1.5 mm、Φ12 mm×2 mm,前两组材料为铁氧体(Ferrite),后两组材料为钕铁硼(NdFeB)。各组磁源磁感强度等值线详见图 1-4 及表 1。

本研究选用的细胞培养板导磁率(permeability)接近于 1,与空气导磁率接近,对磁场分布无干扰。通过实验检测可知:当细胞培养板厚度为 1 mm,26 mT、62.5 mT、110.7 mT、215.6 mT 各组磁源具体作用于细胞区域的磁感强度值范围依次为 19.11~21.84 mT、43.75~50.01 mT、77.49~88.56 mT、150.92~172.48 mT。由磁感强度等值线图可知,具体作用于细胞部位的磁感强度与磁源极面中心磁感强度并不相同,作用部位离磁源中心越远则磁感强度越低。

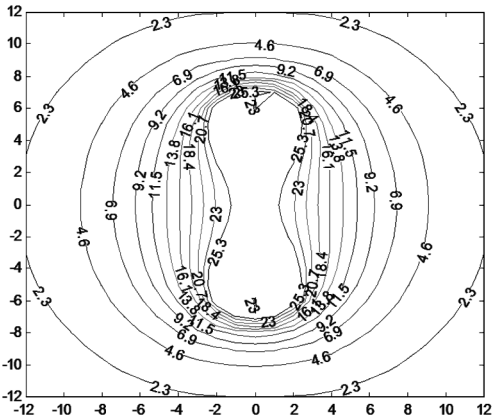


图 1 A 组磁源(26 mT)磁感强度等值线

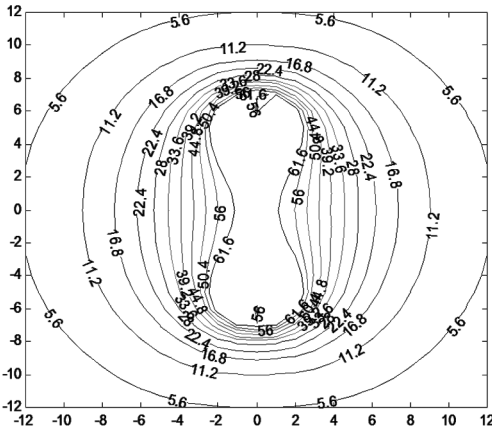


图 2 B 组磁源(62.5 mT)磁感强度等值线

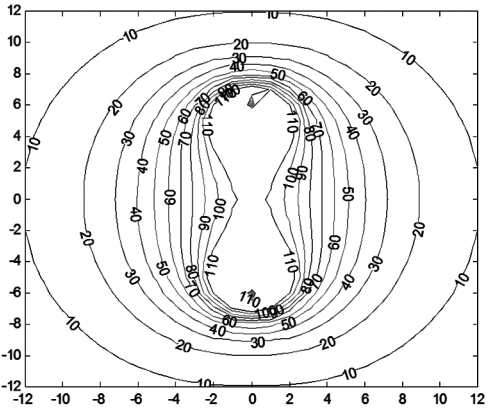


图 3 C 组磁源(110.7 mT)磁感强度等值线

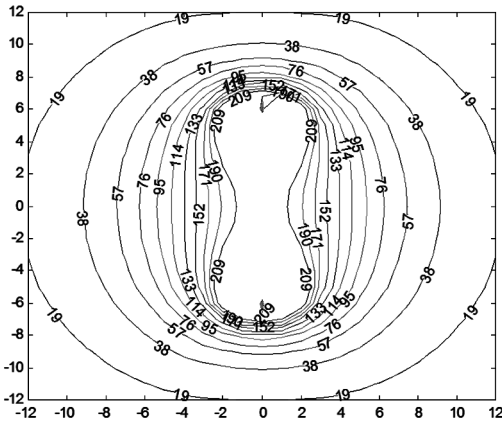


图 4 D 组磁源(215.6 mT)磁感强度等值线

表 1 4 组磁源磁感强度等值线量值(mT)

序号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
磁源 A	25.3	23.0	20.7	18.4	16.1	13.8	11.5	9.2	6.9	4.6	2.3
磁源 B	61.6	56.0	50.4	44.8	39.2	33.6	28.0	22.4	16.8	11.2	5.6
磁源 C	110.0	100.0	90.0	80.0	70.0	60.0	50.0	40.0	30.0	20.0	10.0
磁源 D	209.0	190.0	171.0	152.0	133.0	114.0	95.0	76.0	57.0	38.0	19.0

注:本表中序号对应于各图中由内至外的磁感强度等值线

二、实验试剂与仪器

本研究主要实验材料还包括人脑微血管内皮细胞株(美国 ATCC 公司)、胰酶(pancreatin)、胎牛血清(fetal bovine serum)、DMEM 低糖培养粉(美国 Gibco 公司)、乳酸脱氢酶(lactic dehydrogenase, LDH)试剂盒(中生北控生物有限公司);主要实验设备包括全自动生化分析仪(日本日立公司)、CO₂ 培养箱(日本 SANYO 公司)、超净化工作台(日本日立公司)、IX-70 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司)、倒置显微镜(德国 Leica 公司)、Annexin-V-FITC/PI 双染试剂盒(罗氏)及流式细胞仪(美国 Beckman 公司)等。

三、细胞培养及相关检测

将 HBMEC 培养在含 10%FBS 的 DMEM 培养基中,放置于 37℃、含 5%CO₂ 的培养箱内,每 2~3 天更换 1 次培养液。待细胞生长达 70%~80%时用吸管适力吹打细胞,使其大部分脱落并收集细胞,经 800 rpm 离心 5 min 弃上清,DMEM 培养基重悬,经 1:3 传代后取对数生长期(logarithmic phase)细胞。

将 HBMEC 以 5×10⁴ 个/ml 密度种植于 24 孔板中,并将其分为对照组(无磁场作用)、磁场 A 组(磁感强度为 26 mT)、磁场 B 组(磁感强度为 62.5 mT)、磁场 C 组(磁感强度为 110.7 mT)及磁场 D 组(磁感强度为 215.6 mT)。将磁场 A、B、C、D 组磁板置于细胞培养板下方,并一同放入细胞培养箱内,每组 12 个复孔。经 72 h 培养后取细胞上清液,在全自动生化分析仪上使用 LDH 试剂盒检测细胞外 LDH 值,使用 SOD 试剂盒检测细胞外 SOD 值,使用 MDA 试剂盒检测细胞外 MDA 值;另外采用倒置显微镜对各组细胞进行拍照,观察 HBMEC 形态学改变。

收集 HBMEC 并调整细胞浓度为 2~5×10⁶ 个/ml,根据 Annexin V-FITC/PI 双标记试剂盒说明书,用 1 ml 缓冲液加 20 μl Annexin V-FITC 和 20 μl PI 配成荧光反应液。取细胞悬液 500 μl,加入 100 μl 荧光反应液,在避光、室温环境下反应 10 min,用流式细胞仪进行分析,测得细胞凋亡指数(apoptotic index, AI)。

四、统计学分析

本研所得计量数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 19.0 版统计学软件包进行数据分析,计量数据比较采用单因素方差分析(one-way analysis of variance, one-way ANOVA), $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、各组细胞 LDH 值比较

由表 2 可见,与对照组比较,磁场 A 组、磁场 B 组及磁场 C 组 LDH 值均无显著变化,组间差异均无统计学意义($P > 0.05$),表明磁感强度 26 mT、62.5 mT、

110.7 mT 的磁场对 HBMEC 细胞膜无明显影响;与对照组比较,磁场 D 组(215.6 mT)细胞 LDH 值明显升高,组间差异具有统计学意义($P < 0.05$),表明磁感强度 215.6 mT 的磁场对 HBMEC 细胞膜具有一定影响。

表 2 不同强度磁场对 HBMEC 细胞 LDH 值的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	LDH 值
对照组(不加磁)	12	52.92±2.81
磁场 A 组(26 mT)	12	52.08±4.06
磁场 B 组(62.5 mT)	12	53.50±3.94
磁场 C 组(110.7 mT)	12	52.58±3.48
磁场 D 组(215.6 mT)	12	60.67±2.64 ^a

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$

二、各组细胞 SOD 及 MDA 值比较

由表 3 可见,与对照组比较,磁场 A 组、磁场 B 组、磁场 C 组及磁场 D 组其 SOD、MDA 值均无显著变化,组间差异均无统计学意义($P > 0.05$),提示磁感强度 26 mT、62.5 mT、110.7 mT、215.6 mT 的磁场对体外培养的 HBMEC 氧化损伤均无明显影响。

表 3 不同强度磁场对 HBMEC 细胞 SOD、MDA 值的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	SOD 值(U/ml)	MDA 值(nmol/ml)
对照组(不加磁)	12	24.17±2.92	0.898±0.014
磁场 A 组(26.0 mT)	12	22.50±2.56	1.034±0.017
磁场 B 组(62.5 mT)	12	23.37±2.90	0.962±0.011
磁场 C 组(110.7 mT)	12	22.43±3.43	0.994±0.015
磁场 D 组(215.6 mT)	12	23.68±2.19	1.138±0.018

三、各组细胞凋亡情况比较

由表 4 可见,与对照组比较,磁场 A 组、磁场 B 组、磁场 C 组及磁场 D 组细胞凋亡指数均无显著变化,组间差异均无统计学意义($P > 0.05$),表明磁感强度为 26 mT、62.5 mT、110.7 mT、215.6 mT 的磁场对体外培养的 HBMEC 细胞凋亡无明显影响。

表 4 不同强度磁场对 HBMEC 细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	凋亡指数(%)
对照组(不加磁)	12	0.34±0.03
磁场 A 组(26 mT)	12	0.40±0.03
磁场 B 组(62.5 mT)	12	0.43±0.02
磁场 C 组(110.7 mT)	12	0.41±0.01
磁场 D 组(215.6 mT)	12	0.44±0.02

四、各组细胞形态学比较

与对照组比较,通过倒置显微镜观察发现磁场 A 组、磁场 B 组、磁场 C 组及磁场 D 组 HBMEC 均呈贴壁生长,细胞大小较正常,细胞形态较对照组均无明显改变,细胞生长状态良好,具体情况见图 5-9。

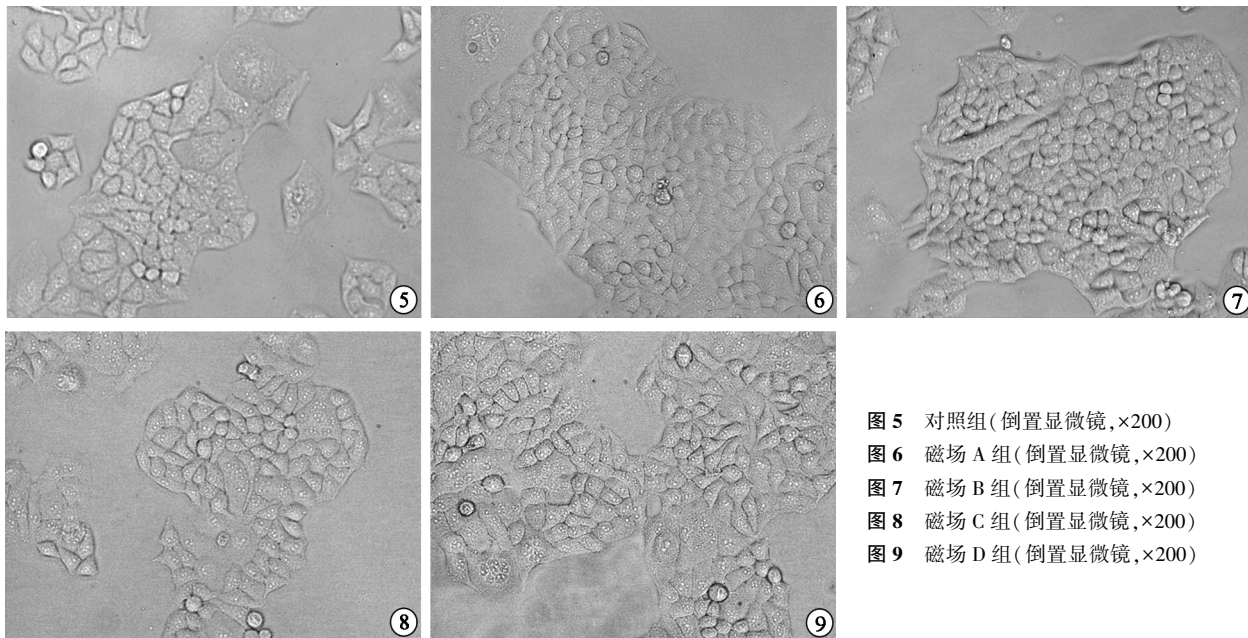


图 5 对照组(倒置显微镜,×200)

图 6 磁场 A 组(倒置显微镜,×200)

图 7 磁场 B 组(倒置显微镜,×200)

图 8 磁场 C 组(倒置显微镜,×200)

图 9 磁场 D 组(倒置显微镜,×200)

讨 论

相关磁场生物效应研究发现,部分文献标注的磁场条件大多数只是在某一位置的磁感强度,有时仅模糊给出一个强度值,这显然是不科学的。圆片磁源经实际测量,发现即使在极面其各处强度值也不一致,存在中心低、边缘高现象,若只给出一个磁感强度,则该研究结果是不可信的,因为很可能具体研究区域的磁感强度达不到相关要求^[8]。在进行磁生物效应研究时,只有系统、完整地进行磁源磁场分析,掌握磁源整个空间磁场情况,使磁源应用实现标准化和规范化,才能更进一步深入开展磁生物效应研究,从而使研究结果具有可比性及准确性^[9]。本研究选用极面中心磁感强度分别为 26 mT、62.5 mT、110.7 mT 和 215.6 mT 永磁磁源,通过图 1-4 等值线图,得出上述各组磁源具体作用区域的磁感强度值范围,实现了对具体作用部位磁感强度进行规范定量,这也是本研究特色之处。

有研究报道^[10]静磁场会影响三叉神经(trigeminal nerve)细胞膜电压门控钾离子通道(voltage-gated potassium channels)的失活特性,从而使细胞膜变形(membrane deformation),进一步影响与之相关的各种细胞活动。有学者采用 80~300 mT 静磁场干预成胶质瘤细胞(glioma cell)并观察细胞形态学变化,发现成胶质瘤细胞直径较对照组明显减小,细胞体积及形状均发生改变;进一步采用原子显微镜观察细胞膜表面形态结构,发现细胞膜表面纤毛数量减少,其对细胞的固着力也下降^[11-12]。还有研究报道神经元细胞经 200 mT 静磁场作用后,发现细胞形态显著改变,聚集形

成漩涡状,并且出现特征性突触苞束群^[13-14],表明一定强度的磁场会影响神经细胞形态^[15]。

本研究结果显示,与对照组比较,磁感强度 27.3 mT、62.5 mT、110.7 mT 的磁场对体外培养 HBMEC 细胞膜、氧化损伤、细胞形态及细胞凋亡均无明显影响,磁感强度 215.6 mT 的磁场对 HBMEC 细胞膜具有一定影响,但对细胞氧化损伤、细胞形态、细胞凋亡无明显影响,表明磁场对细胞生物学效应的影响与磁感强度有关。另外本实验结果与其他相关报道有所不同^[16],分析原因可能与实验条件(如磁感强度、细胞种类及磁场敏感性等)不同有关。

磁场作为一种较弱的物理因子,在生物体内尚无特定作用靶点。目前关于磁场的生物学作用尚处于研究假设阶段,包括磁小体振动模型、回旋共振模型等假说^[17]。生物体内各种顺磁性、反磁性物质都会受到自身磁场及外加磁场影响,细胞膜上反磁性异性分子在外加磁场作用下进行重新排列,引起细胞膜一系列结构及功能改变^[18]。细胞内生物小分子、电子、原子、水分子及酶分子等物质在参与细胞间物质转运、信息传递过程中,大都伴随电荷运动,而电荷转移要受到磁场洛伦兹力作用,导致其正常运动轨迹遭到破坏,使细胞功能、活动发生改变,进而导致机体内环境(internal environment)失衡^[19]。另外磁场作为一种应激因素作用于细胞会产生相应的生物学效应^[20];如磁场可能会影响细胞内 DNA 中氢键(hydrogen bond)变化;还可能引起酶分子(enzyme molecules)构象变形、扭曲,活性中心暴露或内包,酶活性改变,机体代谢过程受到影响,进而产生一系列生化反应^[21]。

目前关于磁场的作用机制研究还不够完善,上述机理均只是推测。因为磁场作用效果不仅与磁场参数(包括磁场类型、方向性、均匀性、强度、作用时间等)有关;还与机体状态(organism status)、细胞种类、敏感性、磁性等因素密切联系。由于涉及非常复杂的系统,迄今为止尚未形成完善的作用理论^[22-23]。因此要将磁疗推向临床,还有待进行系统全面考察以及开展进一步实验研究及理论探讨。此外磁场究竟是通过什么途径发挥其生物学效应,它的作用与化学药物作用有何异同,这些都将成为后续研究热点。

参 考 文 献

- [1] 金和俊,冯春燕,张春红.磁疗的研究现状[J].医学综述,2008,14(18):2832-2834.DOI:10.3969/j.issn.1006-2084.2008.18.039.
- [2] 王彩霞,李向钰,高贵生.中药离子导入加磁疗治疗脑卒中后肢体肿胀 37 例[J].现代中西医结合杂志,2010,19(1):7677. DOI:10.3969/j.issn.1008-8849.2010.01.049.
- [3] 李刚.磁与生活健康[J].中国市场,2008,3(9):129.DOI:10.3969/j.issn.1005-6432.2008.09.066.
- [4] 燕铁斌.经颅磁刺激的临床应用研究及前景展望[J].中华物理医学与康复杂志,2012,34(12):881-882. DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2012.012.001.
- [5] 李刚,程立君,林凌,等.30 mT 恒定磁场可延长神经细胞的存活时间[J].天津大学学报,2010,43(7):619-622. DOI:10.3969/j.issn.0493-2137.2010.07.008.
- [6] 周洋.静磁场促进成骨作用机制的研究进展[J].中华口腔医学研究杂志(电子版),2014,8(5):62-64. DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2014.05.017.
- [7] 杨博,万军,王显悦,等.不同强度弱恒磁场对体外大鼠内皮祖细胞功能的影响[J].实用医学杂志,2013,29(7):1053-1055. DOI:10.3969/j.issn.1006-5725.2013.07.008.
- [8] 王益民,王蕴华,孟庆楠,等.磁疗用圆片永磁磁源空间磁感强度理论值与实测值分析[J].中国医学物理学杂志,2012,29(6):3809-3812. DOI:10.3969/j.issn.1005-202X.2012.06.023.
- [9] 王益民,靳世久,陆一竹,等.永磁磁场对内皮细胞的影响及其量效关系研究[J].中华物理医学与康复杂志,2007,29(8):522-524. DOI:10.3760/j.issn.0254-1424.2007.08.005.
- [10] 董军涛,郑修元,林阳阳,等.不同形式的运动训练对血管性痴呆大鼠学习记忆及前额叶皮质区突触素及突触后致密物-95 表达的影响[J].中华物理医学与康复杂志,2015,37(9):641-645. DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2015.09.001.
- [11] 曹建平,蹇爱荣,张维,等.0.2-0.4 T 磁场对肿瘤细胞生长和黏附功能的影响[J].世界华人消化杂志,2010,18(13):1337-1343. DOI:10.3969/j.issn.1009-3079.2010.13.007.
- [12] 郭艳,靳令经,刘务朝,等.多克隆神经细胞粘附分子抗体对肉毒毒素生物学效应的影响[J].中华物理医学与康复杂志,2013,35(11):833-838. DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2013.11.001.
- [13] 李刚,程立君,林凌.30 mT 恒定磁场可延长神经细胞的存活时间[J].天津大学学报,2010,43(7):619-622. DOI:10.3969/j.issn.0493-2137.2010.07.008.
- [14] 刘慧华,燕铁斌.功能性电刺激对急性脑梗死大鼠运动功能及室管膜下区内源性神经干细胞的影响[J].中华物理医学与康复杂志,2015,37(9):646-652. DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2015.09.002.
- [15] 何晓阔,刘慧华,燕铁斌.高频重复经颅磁刺激对短暂全脑缺血大鼠学习记忆能力及海马长时程增强的影响[J].中华物理医学与康复杂志,2012,34(12):883-888. DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2012.012.002.
- [16] 马波,陈丽娜,何月涵,等.稳恒磁场对体外培养的大鼠脑神经细胞影响的研究[J].哈尔滨医科大学学报,2011,45(4):301-303.
- [17] 李磊,徐博,佟伟平,等.静磁场下浓度梯度控制的凝固过程中 α (Al) 枝晶定向生长行为[J].中国有色金属学报(英文版),2015,25(7):2438-2445. DOI:10.1016/S1003-6326(15)63860-2.
- [18] 赵黎,彭瑞云,高亚兵,等.静磁场辐射对大鼠外周血细胞、血清代谢酶和血浆递质的影响[J].军事医学,2011,35(5):382-385. DOI:10.3969/j.issn.1674-9960.2011.05.015.
- [19] 冉景榆.静磁场对猪胰脏脂肪酶催化活性和结构的影响研究[J].淮阴师范学院学报(自然科学版),2015,14(2):117-120. DOI:10.3969/j.issn.1671-6876.2015.02.006.
- [20] 刘宇,刘海源,陈颖,等.1.5T MRI 静磁场对小鼠烫伤创面修复作用初探[J].中国烧伤创疡杂志,2015,27(5):335-338. DOI:10.3969/j.issn.1001-0726.2015.05.003.
- [21] 智丽媛,杜莉.静磁场的细胞生物学效应的研究[J].广东牙病防治,2008,16(3):651. DOI:10.3969/j.issn.1006-5245.2008.z1.049.
- [22] 姚三丽.对核磁共振成像仪建设项目环境影响评价的研究[J].环境科学与管理,2015,40(3):174-175. DOI:10.3969/j.issn.1673-1212.2015.03.042.
- [23] 李喜.静磁场下热电磁效应及其对凝固组织的影响[J].中国材料进展,2014,33(6):349-354. DOI:10.7502/j.issn.1674-3962.2014.06.05.

(修回日期:2017-08-03)

(本文编辑:易 浩)