

中,移植时机的把握非常重要,一般采用延期移植。延期移植指不是在伤后即刻,而是在受伤后延至宿主产生神经营养因子和轴突生长促进因子最多时才进行移植,亦即在伤后 8~10 d 左右开始移植。神经干细胞修复损伤的机制可能包括:在宿主受体和干细胞分化而来的神经细胞间形成突触联系;为轴突的再生提供基质;分泌必需的神经营养因子;帮助无髓或新生轴突形成髓鞘。神经干细胞移植虽然还处于实验研究阶段,但其多向分化的特性及改善病灶微环境的作用使其具有广阔的临床应用前景。

三、伤后晚期和后期

在受伤后晚期和后期,中枢神经系统损伤患者的情况基本趋于稳定,但这并不意味着临床工作的结束,而是更加长期和艰巨康复工作的开始。坚持进行康复治疗及日常功能训练对患者功能恢复具有深远影响。因为即使是在损伤发生许多年后进行康复训练,也可以不同程度地改善患者的功能状态。在此阶段中,让患者处于变换的复杂环境中,去不断完成新的功能任务。复杂的环境可以给患者提供类似个体及群体生活的特有氛围,在一定程度上表现其交往的社会性;通过完成丰富的运动训练,使患者学习及实践的经验不断积累,从而促使其整体功能得到最大程度的康复;同时结合应用一些有利于神经再生的药物,如神经营养因子、神经节苷脂等,均有助于患者功能的康复;另外患者的心理状态、家庭和社会的理解及支持对患者的功能康复也具有重要影响作用。

参 考 书 目

- [1] 缪鸿石. 中枢神经系统(CNS)损伤后功能恢复的理论(二). 中国康复理论与实践,1996,1:1-5.
- [2] 缪鸿石. 中枢神经系统(CNS)损伤后功能恢复的理论(一). 中国康复理论与实践,1996,1:1-5.
- [3] Glees P, Cole J, Whitty CW, et al. The effects of lesions in the cingu-

- lar gyrus and adjacent areas in monkeys. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1950, 13: 178-190.
- [4] 王茂斌, 主编. 脑卒中的康复医疗. 北京: 中国科学技术出版社, 2006: 22-29.
- [5] Jones TA, Chu CJ, Grande LA, et al. Motor skills training enhances lesion induced structural plasticity in the motor cortex of adult rats. J Neurosci, 1999, 19: 10153-10163.
- [6] Fabisch W, Glees P, Macmillan AL. Hemispherectomy for the treatment of epilepsy in infantile hemiplegia, a review and a case report. Monat fur Psc Neur, 1955, 130: 385-405.
- [7] 贾子善, 李聪元, 闫桂芳, 等. 康复治疗对脑卒中患者脑的结构可塑性的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2004, 26: 634-636.
- [8] 廖维靖. 脑损伤及功能重组的研究. 中国康复医学杂志, 2006, 21: 195-196.
- [9] Meintzschel F, Ziemann U. Modification of practice-dependent plasticity in human motor cortex by neuromodulators. Cerebral Cortex, 2006, 16: 1106-1115.
- [10] Dong Y, Dobkin BH, Cen SY, et al. Motor cortex activation during treatment may predict therapeutic gains in paretic hand function after stroke. Stroke, 2006, 37: 1552-1555.
- [11] Deutsch A, Granger CV, Heinemann AW. Poststroke rehabilitation: outcomes of inpatient rehabilitation facilities and subacute rehabilitation programs. Stroke, 2006, 37: 1477-1482.
- [12] Bowden MG, Balasubramanian CK, Neptune RR, et al. Anterior-posterior ground reaction forces as a measure of paretic leg contribution in hemiparetic walking. Stroke, 2006, 37: 872-876.
- [13] Krakauer JW. Motor learning: its relevance to stroke recovery and neurorehabilitation. Curr Opin Neur, 2006, 19: 84-90.
- [14] Frontera WR, Fuhrer MJ, Jette AM, et al. Rehabilitation medicine summit: building research capacity. J Head Traum Rehab, 2006, 21: 1-7.

(收稿日期: 2007-03-19)

(本文编辑: 易 浩)

· 研究简报 ·

模拟移动电话微波辐射对大鼠离体皮质神经细胞的过氧化损伤

高峰 宋水江

【摘 要】 目的 探讨模拟移动电话微波辐射对大鼠离体皮质神经细胞的脂质过氧化损伤作用。**方法** 在对新生大鼠(出生 0~1 d)大脑皮质神经细胞进行原代培养的基础上,采用频率 900 MHz、功率密度 0.05 mW/cm² 的模拟移动电话微波对其辐射 4, 8, 12, 16, 20 及 24 h, 然后继续培养 24 h, 在微波辐射结束后即刻和再培养 24 h 时分别测定细胞超氧化物歧化酶(SOD)活性及丙二醛(MDA)含量, 选用四唑盐(MTT)比色法测定细胞增殖活性。**结果** 皮质神经细胞经模拟移动电话微波辐射 12 h 后, 其 MDA 含量[(2.32 ± 0.29) μmol/g] 明显增高, 与对照组[(1.84 ± 0.28) μmol/g] 比较, 差异具有统计学意义($P < 0.05$); 且随着微波辐射时间的延长, 皮质神经细胞 MDA 含量也逐渐升高, SOD 活性降低较缓慢, 在微波辐射 20 h 后为[(1.60 ± 0.24) × 10³ U/g], 较对照组[(1.91 ± 0.40) × 10³ U/g] 明显下降, 差异具有统计学意义($P < 0.01$)。皮质神经细胞增殖活性在微波辐射 12 h 后为(0.45 ± 0.02), 较相应对照组(0.51 ± 0.03) 明显降低, 差异具有统计学意义($P < 0.01$), 并且随着微波辐射时间的延长而呈现一定的剂量依赖关系。微波辐射后细胞经再培养 24 h 后, 发现微波辐射 8 h 组 SOD 活性明显增高, 同相应对照组比较, 差异具有统计学意义($P < 0.05$); 微波辐射 20 h 组 SOD 活

作者单位: 310009 杭州, 浙江大学医学院附属第二医院神经内科

通讯作者: 宋水江, Email: shuijiangs@yahoo.com.cn

性最强,MDA 含量有所下降,仅微波辐射 24 h 组 MDA 含量较对照组有所增高,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。皮质神经细胞增殖活性于微波辐射 12 h 后有所恢复,与相应对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);而微波辐射 16 h、20 h 及 24 h 时,细胞增殖活性仍然偏低,同相应对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 急性短期模拟移动电话微波辐射可抑制大鼠离体皮质神经细胞的增殖活性,这种损伤可能与神经细胞脂质过氧化反应有关,并且在一定时间范围内具有可逆性。

【关键词】 移动电话; 微波; 细胞培养; 脂质过氧化

近年来,移动电话微波辐射对机体健康的影响越来越多地受到人们重视,我们在前期实验中发现模拟移动电话微波辐射可导致培养大鼠皮质神经细胞死亡率显著增高^[1],本研究进一步测定其对细胞超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)、丙二醛(malondialdehyde,MDA)含量的影响以及与细胞增殖活性间的关系,从而探讨氧自由基变化与模拟移动电话微波辐射对大鼠离体皮质神经细胞早期损伤的相关机制。现报道如下。

材料与方法

一、皮质神经细胞培养与实验仪器

本研究共选取出生 24 h 内的 SD 大鼠 2 只(由浙江大学医学院动物实验中心提供),经断头取脑皮质,参照 Choi 等^[2]介绍的方法略加改动,在 37℃、质量分数为 0.25% 胰酶消化液中剪碎,并持续摇动消化 30 min,以 800 r/min 离心后弃上清液,加入培养液中反复吹打,培养液为 DMEM 加灭活小牛血清(体积分数为 15%),调整细胞密度为 10^6 个/ml 接种在经多聚赖氨酸前处理的培养板上,于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,3 d 后加入阿糖胞苷达 $10 \mu\text{mol/L}$,作用 48 h 以抑制非神经元细胞增殖,以后每周换液 2 次,培养至第 12 天。

本研究实验仪器包括:8647A 型微波发生器(Hewlett Packard 产品)、ESA-1500A 型微波检测仪(Hewlett Packard 公司产品)、MODEL727LC-CE 型功率放大器(KALMUS 公司产品)。微波辐射参数如下:频率 900 MHz,连续波,功率密度为 0.05 mW/cm^2 (模拟普通移动电话的工作频率及功率密度)。

二、微波辐射方法

在 5% CO₂ 培养箱内,首先用微波检测仪测定并调整微波辐射工作面的辐射强度,使工作面的微波平均强度达到 0.05 mW/cm^2 。实验时将细胞培养板置于辐射台上依次进行辐射,辐射时间分别为 4、8、12、16、20 及 24 h,辐射距离为 10 cm。在微波暴露期间,将培养箱温度设定在 37.0℃,培养液温度波动范围为 0~0.4℃;同时设立假辐射组(即对照组),除不接受微波辐射外,其它处理均与辐射组相同。微波辐射结束后收集部分细胞进行相关检测(微波辐射后立即组),另一部分细胞于微波辐射结束后放置在相同环境条件下的细胞培养箱内继续培养 24 h 后再次进行检测(即微波辐射后再培养组)。

三、SOD 和 MDA 测定

上述皮质神经细胞经微波辐射作用后,去除原培养液,用 PBS 液清洗 2 遍,每孔加入 0.1 mol/L PBS、 0.05 mmol/L EDTA (pH=8.0) 各 1 ml,再加入 $50 \mu\text{l}$ 1% Triton-X100,将培养板置振荡器上振荡 1 min 使细胞溶解,再加入 $100 \mu\text{l}$ 25% HPO₃ 以沉淀蛋白,按 Mizuno^[3]介绍的方法测定 SOD 活性,选用硫代巴比妥酸法测定 MDA 含量,蛋白质定量测定选用 Folin 酚法。

四、MTT 比色法测定细胞增殖活性

皮质神经细胞经微波辐射作用后,将细胞以 1×10^6 个/ml 浓度接种在 96 孔培养板中,每孔加入 $20 \mu\text{l}$ MTT 溶液(5 mg/ml)和体积分数为 15% 的血清培养液 $200 \mu\text{l}$,孵育 4 h 后弃培养上清液,每孔加入 $150 \mu\text{l}$ 二甲亚砜(DMSO)充分溶解结晶物,用酶标仪测吸光度(A)值,设定波长为 490 nm。

五、统计学分析

实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示,各组间数据比较采用 SPSS 13.0 版统计软件包进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、微波辐射对 SOD 活性及 MDA 含量的影响

各组神经细胞在辐射结束后即刻进行 SOD 活性及 MDA 含量测定,结果发现经模拟移动电话微波辐射 12 h 后,神经细胞 MDA 含量较对照组明显升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$),且随着微波辐射时间的延长,MDA 含量亦逐渐升高;相对而言,细胞 SOD 活性降低的速度较为缓慢,直到微波辐射 20 h 后,同相应对照组比较,差异才具有统计学意义($P < 0.01$)。部分神经细胞在微波辐射结束后继续置于培养箱内培养 24 h,再次测定 SOD 活性及 MDA 含量,发现其 MDA 含量明显下降,除微波辐射 24 h 组仍明显高于对照组外,其余各组同相应对照组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$);而各组神经细胞 SOD 活性则呈现上升趋势,如微波辐射 8 h 组 SOD 活性同对照组比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$),微波辐射 20 h 组 SOD 活性最强,但微波辐射 24 h 组 SOD 活性同对照组比较仍然偏低($P < 0.01$)。各组神经细胞经微波辐射后 SOD 活性及 MDA 含量变化详见表 1。

二、微波辐射对细胞增殖活性的影响

各组神经细胞经微波辐射结束后立刻测定部分神经细胞增殖活性(以 MTT 法 A 值表示),结果表明,经模拟移动电话微波辐射 12 h 后神经细胞增殖活性为(0.45 ± 0.02),明显低于相应对照组(0.51 ± 0.03),差异具有统计学意义($P < 0.01$),且随着微波辐射时间的延长而呈现一定的剂量依赖关系($r = -0.964, P < 0.01$),而微波辐射 4 h 和 8 h 时与相应对照组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。微波辐射后神经细胞经再培养后发现,微波辐射 12 h 组细胞增殖活性有所恢复,同相应对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),而微波辐射 16 h、20 h 及 24 h 组细胞增殖活性仍然偏低,同相应对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。各组神经细胞经微波辐射后细胞增殖活性变化详见表 1。

讨 论

目前国外相关研究表明,移动电话微波辐射对生物体具有

表 1 模拟移动电话微波辐射后离体皮质神经细胞的过氧化损伤观察($\bar{x} \pm s$)

组 别	微波辐射后即刻			微波辐射后再培养 24 h		
	SOD($\times 10^3$ U/g)	MDA($\mu\text{mol/g}$)	细胞增殖活性(A)	SOD($\times 10^3$ U/g)	MDA($\mu\text{mol/g}$)	细胞增殖活性(A)
对照组	1.91 $\pm$ 0.40	1.84 $\pm$ 0.28	0.51 $\pm$ 0.03	2.27 $\pm$ 0.44	2.23 $\pm$ 0.43	0.49 $\pm$ 0.02
微波辐射 4 h 组	1.95 $\pm$ 0.49	1.93 $\pm$ 0.30	0.50 $\pm$ 0.05	2.07 $\pm$ 0.26	2.17 $\pm$ 0.33	0.47 $\pm$ 0.05
微波辐射 8 h 组	2.10 $\pm$ 0.47	2.06 $\pm$ 0.24	0.48 $\pm$ 0.02	3.35 $\pm$ 0.79 ^a	2.12 $\pm$ 0.31	0.48 $\pm$ 0.04
微波辐射 12 h 组	2.02 $\pm$ 0.45	2.32 $\pm$ 0.29 ^a	0.45 $\pm$ 0.02 ^b	3.84 $\pm$ 0.59 ^b	2.26 $\pm$ 0.53	0.46 $\pm$ 0.03
微波辐射 16 h 组	1.89 $\pm$ 0.40	2.42 $\pm$ 0.39 ^a	0.38 $\pm$ 0.04 ^b	4.61 $\pm$ 0.82 ^b	2.23 $\pm$ 0.25	0.44 $\pm$ 0.03 ^a
微波辐射 20 h 组	1.60 $\pm$ 0.24 ^b	2.95 $\pm$ 0.38 ^b	0.30 $\pm$ 0.01 ^b	5.04 $\pm$ 0.83 ^b	2.38 $\pm$ 0.32	0.30 $\pm$ 0.04 ^b
微波辐射 24 h 组	1.47 $\pm$ 0.30 ^b	3.46 $\pm$ 0.31 ^b	0.27 $\pm$ 0.02 ^b	1.84 $\pm$ 0.22 ^b	3.11 $\pm$ 0.49 ^b	0.20 $\pm$ 0.041 ^b

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$

广谱的生物学效应,尤其是其非致热效应^[4,5]。尽管有研究发现,非热生物效应对人体细胞形态、增殖、DNA 基因表达等方面均存在一定影响作用,但对其作用机制的探讨还不够深入^[6]。根据流行病学调查资料发现,900 MHz 微波电磁辐射能影响人的神经行为,如移动电话使用者患电磁辐射超敏综合征及神经衰弱的机率显著增加,志愿受试者脑血流图及脑电图也发生明显改变,接受通讯微波辐射后导致简单反应时、数字译码试验及情绪反应等认知功能受到影响等^[7-9]。这些现象均提示移动电话发射的微波辐射可能影响大脑神经细胞的功能。在本次实验中,我们选用频率为 900 MHz、功率密度为 0.05 mW/cm² 的微波辐射,无论在频率还是在功率密度方面均很好地模拟了现实中移动电话产生的微波辐射。

众所周知,机体内一些正常的生理过程都涉及到自由基反应,过量的自由基能被体内抗氧化系统及时清除,以保证正常的生理功能。如由于某种因素作用而引起体内自由基异常增多,则会引发一系列化学反应,导致组织损伤。MDA 是脂质过氧化反应中的主要降解产物之一,其含量的高低能反映机体细胞受自由基攻击的严重程度;而 SOD 则是体内重要的抗氧化酶,能促使超氧化阴离子自由基转变为过氧化氢和氧离子,其活性高低与体内过氧化物含量密切相关,且该酶为一种诱导酶,在细胞受到过氧化损伤时能诱导产生,而使机体细胞及组织免受损伤^[10]。MTT 比色法可灵敏地反映细胞的能量代谢及细胞活性状态,是检测细胞早期损伤的敏感指标。在本实验过程中发现,经模拟移动电话微波辐射 12 h 后,细胞 MDA 含量较对照组明显升高,且随着微波辐射时间的延长,MDA 含量也逐渐升高,相对 MDA 含量变化而言,SOD 活性降低较为缓慢,在微波辐射 20 h 后同相应对照组比较才开始有明显下降。MTT 比色法检测结果显示,微波辐射 12 h 后神经细胞增殖活性明显降低,且随着辐射时间的延长,细胞增殖活性也逐渐下降,与微波辐射时间长短具有一定的量效关系,提示模拟移动电话微波辐射对大鼠离体皮质神经细胞存在损伤作用,且这种损伤涉及脂质过氧化反应。微波辐射后神经细胞经再培养 24 h 后,其 SOD 活性明显升高是细胞的一种保护性反应,MDA 含量降低可能与此有关,同时也表明 SOD 的诱导产生需要一定的时间才能实现,因此神经细胞经短时间微波辐射后,其 SOD 活性表现为降低,而经微波辐射 24 h 后,其 SOD 活性仍未见明显升高,则可能是由于细胞破坏较严重,其诱导产生酶的作用难以发挥效应所致。细胞增殖活性结果提示经微波辐射 12 h 后,细胞增殖活性有所恢复,表明微波对细胞造成的损伤在一定时间内是可逆的,这种恢复可能与 SOD 升高诱发的保护性反应有关;但我们同时

也观察到,尽管微波辐射 16 h 和 20 h 组大鼠血清 SOD 明显升高,但细胞增殖活性并没有完全恢复正常,提示微波辐射对大鼠离体皮质神经细胞的损伤作用不仅仅局限于脂质过氧化反应,可能还有其它未知因素参与其中。

综上所述,本研究结果表明,急性短期模拟移动电话微波辐射可抑制大鼠离体皮质神经细胞的增殖活性,这种损伤可能部分与神经细胞脂质过氧化反应有关,且在一定时间范围内具有可逆性,为研究移动电话微波辐射诱发神经衰弱综合征等疾病的发病机制提供了实验数据,也为制定合理使用移动电话时间提供了参考依据。

参 考 文 献

- [1] 刘伟国,杨小峰,高峰,等.移动电话微波辐射对体外培养大鼠皮质神经细胞损伤的研究.中华劳动卫生职业病杂志,2001,19:184-186.
- [2] Choi DW. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. J Neurosci, 1987,7:369-379.
- [3] Mizuno Y. Changes in superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione reductase activities and thiobarbituric acid reactive product levels in early stages of development in dystrophic chickens. Exp Neurol, 1984,84:58-73.
- [4] 王保义,黄卡玛,王喜忠,等.低强度微波辐射对人细胞非热生物效应的研究.中国医学物理学杂志,1995,12:9-13.
- [5] Hyland GJ. Physics and biology of mobile telephony. Lancet, 2000,356:1833-1836.
- [6] 王志刚,蒋欧,时德.低强度微波辐射的细胞生物学效应.中华物理医学与康复杂志,2005,27:436-438.
- [7] Krause CM, Sillanmaki L, Koivisto M, et al. Effects of electromagnetic field emitted by cellular phones on the EEG during a memory task. Neuroreport, 2000,11:761-764.
- [8] Hillert L, Berglind N, Ametz BB, et al. Prevalence of self-reported hypersensitivity to electric or magnetic fields in a population-based questionnaire survey. Scand J Work Environ Health, 2002,28:33-41.
- [9] Koivisto M, Krause CM, Revonsuo A, et al. The effects of electromagnetic field emitted by GSM phones on working memory. Neuroreport, 2000,11:1641-1643.
- [10] 海春旭. 自由基生物学与医学. 西安:第四军医大学出版社,2002. 135-170.

(修回日期:2006-12-20)

(本文编辑:易 浩)