

· 基础研究 ·

正常和缺氧条件下永磁磁场对人脑微血管内皮细胞超氧化物歧化酶和丙二醛的影响

孟庆楠 王益民 王蕴华 刘彦强 孙秀岩

【摘要】目的 观察不同强度永磁磁场对正常和缺氧条件下人脑微血管内皮细胞(HBMEC)氧化损伤的影响。**方法** 实验分为对照组和 8 个不同强度(8.1 mT、16.5 mT、20.3 mT、26.0 mT、27.3 mT、62.5 mT、110.7 mT、215.6 mT)的永磁磁场组(加磁 1 组~加磁 8 组),在正常和缺氧两种条件体外培养人脑微血管内皮细胞,于 72 h 后采用超氧化物歧化酶(SOD)法和丙二醛(MDA)法检测各组人脑微血管内皮细胞氧化损伤的变化情况。**结果** 正常环境下,加磁 1 组到加磁 6 组的 SOD 值均略低于对照组,且加磁 7 组和加磁 8 组的 SOD 值又略高于对照组,但差异均无统计学意义($P>0.05$);加磁各组的 MDA 值均高于对照组,其中仅加磁 8 组的 MDA 值与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。在缺氧环境下,加磁 1 组、加磁 2 组、加磁 4 组、加磁 7 组、加磁 8 组的 SOD 值均低于对照组,而加磁 3 组、加磁 5 组、加磁 6 组的 SOD 值则高于对照组,但差异均无统计学意义($P>0.05$);加磁 1 组、加磁 2 组、加磁 4 组的 MDA 值均高于对照组,加磁 3 组、加磁 5 组、加磁 6 组、加磁 7 组、加磁 8 组的 MDA 值则低于对照组,其中仅加磁 7 组的 MDA 值与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 正常条件下,磁感强度 215.6 mT 的永磁磁场对人脑微血管内皮细胞 MDA 有影响;缺氧条件下,磁感强度 110.7 mT 的永磁磁场对人脑微血管内皮细胞 MDA 有影响。

【关键词】 永磁磁场; 人脑微血管内皮细胞; 超氧化物歧化酶; 丙二醛

Effects of permanent magnetic fields on superoxide dismutase and malondialdehyde in human microvascular endothelial brain cells under normal and hypoxic conditions MENG Qing-nan*, WANG Yi-min, WANG Yun-hua, LIU Yan-qiang, SUN Xiu-yan. *Institute of TCM Engineering, Experimental Teaching Department of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Corresponding author: WANG Yi-min, Email: wym@tjutcm.edu.cn

【Abstract】Objective To observe the effects of permanent magnetic fields with different magnetic inductions on oxidative damage to human brain microvascular endothelial cells (HBMECs) under normal and hypoxic conditions. **Methods** HBMECs were cultured in vitro under normal and hypoxic conditions, then divided into a control group and groups receiving magnetic induction at 8.1, 16.5, 20.3, 26.0, 27.3, 62.5, 110.7 and 215.6 mT. Changes in superoxide dismutase (SOD) activity and malondialdehyde (MDA) content in each group were measured 72 h after exposure to the magnetic fields. **Results** Under normal conditions the SOD activities of the magnetic groups were not significantly different from that of the control group. Only the MDA content of the 215.6 mT group was statistically different (slightly higher) than that of the control group ($P<0.05$). Under hypoxic conditions, there was again no statistically significant difference in SOD activity, but the MDA content of the 110.7 mT group was significantly lower. **Conclusions** Under normal conditions, a 215.6 mT permanent magnetic field has an effect on MDA in HBMECs; under hypoxic conditions a 110.7 mT permanent magnetic field has such an effect.

【Key words】 Permanent magnetic fields; Microvascular endothelial brain cells; Superoxide dismutase; Malondialdehyde

动脉粥样硬化是引起冠心病、脑梗死、肢端血供丧失等一系列重大疾病的原因。动脉粥样硬化实际上是

动脉壁对各种损伤的一种反应,内皮细胞损伤是动脉粥样硬化的始动及关键因素^[1-2]。本研究以人脑微血管内皮细胞(human brain microvascular endothelial cell, HBMEC)为研究对象,在正常和缺氧两种条件下观察永磁磁场对人脑微血管内皮细胞作用的效果,从而为利用磁场对动脉粥样硬化进行预防和治疗提供基础实验依据。

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2012.08.003

基金项目:国家自然科学基金资助(30873467)

作者单位:300193 天津,天津中医药大学中医工程研究所(孟庆楠、王益民、刘彦强);天津中医药大学实验教学部(王蕴华、孙秀岩)

通信作者:王益民,Email:wym@tjutcm.edu.cn

材料与方法

一、磁场条件

磁场极面中心的磁感强度分别为 8.1 mT、16.5 mT、20.3 mT、26.0 mT、27.3 mT、62.5 mT、110.7 mT、215.6 mT 的 8 组圆片永磁磁源(轴向充磁),对应的磁片尺寸分别为 8 mm × 2 mm、8 mm × 2 mm、8 mm × 2 mm、8 mm × 2 mm、8 mm × 2 mm、8 mm × 1.5 mm、8 mm × 2 mm,前 6 组磁感强度所采用的磁源材料为铁氧体,后 2 组采用的磁源材料为钕铁硼。

二、实验试剂与仪器

人脑微血管内皮细胞株(美国 ATCC 公司);胰酶、DMEM 低糖培养粉、优级胎牛血清(美国 Gibco 公司);超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒(南京建成生物工程有限公司);丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒(南京建成生物工程有限公司);全自动生化分析仪(日本日立公司);CO₂ 培养箱(日本三洋公司);三气培养箱(日本 ASTEC 公司);超净化工作台(日本日立公司);IX-70 型倒置显微镜(日本奥林巴斯公司)。

三、细胞培养环境和方法

细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,在 5% CO₂, 37 °C 的培养箱内培养,每 2~3 d 更换培养液 1 次,细胞融合度达 70%~80% 时,用弯头吸管适力吹打至细胞大部分脱落,800 r/min,离心半径 19 cm,离心 5 min,弃上清,完全培养基重悬,1:3 传代,实验均取对数生长期细胞。

将细胞以 5×10^4 /ml 密度种植于 24 孔板,分为对照组(含 10% 胎牛血清的培养基及细胞,不加磁)、加磁 1 组(磁感应强度为 8.1 mT)、加磁 2 组(磁感应强度为 16.5 mT)、加磁 3 组(磁感应强度为 20.3 mT)、加磁 4 组(磁感应强度为 26.0 mT)、加磁 5 组(磁感应强度为 27.3 mT)、加磁 6 组(磁感应强度为 62.5 mT)、加磁 7 组(磁感应强度为 110.7 mT)、加磁 8 组(磁感应强度为 215.6 mT),每组 12 个复孔,对细胞培养板加相对应的磁感强度磁场,分别放入细胞培养箱(正常培养条件,5% CO₂, 37 °C)和三气培养箱(缺氧培养条件,5% CO₂ + 5% O₂ + 90% N₂, 37 °C)培养,于 72 h 后(细胞密度达到 70%~80%)取细胞上清液,使用 SOD 试剂盒在半自动生化仪检测细胞外的 SOD 值,使用 MDA 试剂盒在半自动生化仪检测细胞外的 MDA 值。

四、SOD 法和 MDA 法检测

SOD 法检测:通过黄嘌呤及黄嘌呤氧化酶反应系统产生超氧阴离子自由基(O₂⁻),后者氧化羟胺形成亚硝酸盐,在显色剂的作用下呈现紫红色,用可见分光

光度计测其光密度值。当被测样品中含 SOD 时,则对超氧阴离子自由基有专一性的抑制作用,使形成的亚硝酸盐减少,比色时测定管的吸光度值低于对照管的吸光度值,通过公式计算可求出被测样品中的 SOD 活力。

MDA 法检测:机体通过酶系统与非酶系统产生氧自由基,后者能攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸,引发脂质过氧化作用,并因此形成脂质过氧化物 MDA,测定 MDA 的量常常可反映机体内脂质过氧化的程度,间接反映出细胞损伤的程度。MDA 在高温及酸性环境下可与 2-硫代巴比妥酸反应产生红棕色的产物,该物质在 532 nm 处有一吸收高峰,根据其在 532 nm 的光密度值可计算出溶液中 MDA 的含量。

五、统计学分析

采用 SPSS 13.00 版统计学软件包进行分析,所有数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素成对样本 *t* 检验分析, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

结 果

正常环境下,加磁 1 组到加磁 6 组的 SOD 值均略低于对照组,且加磁 7 组和加磁 8 组的 SOD 值又略高于对照组,但差异均无统计学意义($P > 0.05$);加磁各组的 MDA 值均高于对照组,其中仅加磁 8 组的 MDA 值与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。详见表 1。

表 1 正常条件下 HBMEC 在不同强度磁场作用下的 SOD 值和 MDA 值($\bar{x} \pm s$)

分组	孔数	SOD (U/ml)	MDA (nmol/ml)
对照组	12	24.17 ± 4.01	0.449 ± 0.005
加磁 1 组	12	23.16 ± 3.40	0.469 ± 0.005
加磁 2 组	12	23.85 ± 3.77	0.457 ± 0.008
加磁 3 组	12	23.38 ± 3.99	0.465 ± 0.004
加磁 4 组	12	23.49 ± 2.82	0.517 ± 0.009
加磁 5 组	12	23.49 ± 2.74	0.521 ± 0.008
加磁 6 组	12	23.38 ± 2.90	0.481 ± 0.004
加磁 7 组	12	24.30 ± 3.43	0.497 ± 0.004
加磁 8 组	12	26.64 ± 3.58	0.553 ± 0.002 ^a

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$

缺氧环境下,加磁 1 组、加磁 2 组、加磁 4 组、加磁 7 组、加磁 8 组的 SOD 值均低于对照组,而加磁 3 组、加磁 5 组、加磁 6 组得 SOD 值则高于对照组,但差异均无统计学意义($P > 0.05$);加磁 1 组、加磁 2 组、加磁 4 组的 MDA 值均高于对照组,加磁 3 组、加磁 5 组、加磁 6 组、加磁 7 组、加磁 8 组的 MDA 值则低于对照组,其中仅加磁 7 组的 MDA 值与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。详见表 2。

表 2 缺氧条件下 HBMEC 在不同强度磁场作用下的 SOD 值和 MDA 值($\bar{x} \pm s$)

分组	孔数	SOD (U/ml)	MDA (nmol/ml)
对照组	12	24.27 $\pm$ 2.68	1.667 $\pm$ 0.019
加磁 1 组	12	23.97 $\pm$ 3.09	1.776 $\pm$ 0.058
加磁 2 组	12	23.07 $\pm$ 4.39	1.788 $\pm$ 0.071
加磁 3 组	12	25.34 $\pm$ 1.73	1.653 $\pm$ 0.090
加磁 4 组	12	23.34 $\pm$ 2.35	1.818 $\pm$ 0.266
加磁 5 组	12	25.70 $\pm$ 2.55	1.489 $\pm$ 0.129
加磁 6 组	12	25.27 $\pm$ 1.65	1.503 $\pm$ 0.058
加磁 7 组	12	23.54 $\pm$ 3.74	1.475 $\pm$ 0.054 ^a
加磁 8 组	12	23.50 $\pm$ 2.70	1.565 $\pm$ 0.080

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$

讨 论

磁场的细胞生物学效应既涉及到磁场的磁感强度大小、均匀性、方向、作用时间等因素,还会受到细胞的种类、敏感性等因素影响,是多种因素共同作用的结果。本研究表明,正常条件下与对照组比较,磁感强度 215.6 mT 的磁场组 HBMEC 的 MDA 值高,差异有统计学意义($P < 0.05$),其他各磁场组(8.1 mT ~ 62.5 mT)SOD 值和 MDA 值差异均无统计学意义($P > 0.05$),显示磁感强度 215.6 mT 的磁场对 HBMEC 可能有一定的氧化损伤作用;缺氧条件下与对照组比较,磁感强度 110.7 mT 的磁场组 HBMEC 的 MDA 值低,差异有统计学意义($P < 0.05$),其他各磁场组 SOD 值和 MDA 值差异均无统计学意义($P > 0.05$),显示磁感强度 110.7 mT 的磁场组对 HBMEC 可能有一定的保护作用。

在磁场对生物体氧化损伤的研究中,既有对活体动物的研究也有对细胞的研究。赵锐等^[3]对大鼠急性心肌梗死模型施以外加磁场(将磁片钕-铁-硼永磁片,直径 10 mm,厚 2 mm,表面磁感强度 90 mT)埋于心前区皮下作用 6 d,结果大鼠在磁场作用下,血浆和心肌 MDA 含量明显降低,永磁场治疗组 SOD 活力明显高于心肌梗死组,与药物治疗组近似,说明 AMI 大鼠在永磁场作用下体内抗氧化系统对自由基的清除能力增加,体内氧自由基减少。张桂莲等^[4]研究表明,30 mT 磁场使大鼠肝组织 SOD 值增加,磁感强度 10 mT 和 20 mT 则对 SOD 值无明显影响。

动物实验研究表明,动物暴露在磁场下会有代偿反应^[5],如大鼠急性心肌梗死后心肌组织受到损伤,氧自由基的氧化与抗氧化失衡,形成过氧化脂质使细胞膜受到毒害,这种情况调动了血液及组织中 SOD 值

的增高。而细胞实验研究的是离体细胞,离体细胞的代偿反应能力较差^[6]。因此本研究中大部分加磁组 SOD 值和 MDA 值无明显变化,可能与细胞受损较轻微、氧化损伤不明显有关,也可能与磁场的作用时间较短(72 h)有关。但是 24 孔板的孔径偏小,种板 72 h 后细胞基本长满培养孔,如果时间延长会导致孔内细胞接触抑制而死亡,使得实验结果无法检测,这将在随后研究中进行深入探讨。此外,不同的细胞对磁场的反应也不同,文献报道^[7-9]中所检测的为心肌细胞、红细胞、肝组织细胞的 SOD 和 MDA 的含量,而本实验所研究的为 HBMEC 的 SOD 和 MDA 含量,故结果可能有所不同。

现有的各种实验对于静磁场作用的量-效关系和时-效关系尚无较好的解释和判断。同时由于不同种类细胞可能对不同强度静磁场的敏感性不同,静磁场所产生的细胞生物学效应会因实验条件的不同存在一定的差异,这在实验结论的推广及其应用上会产生一定的局限性。因此,对于静磁场细胞生物学效应的研究尚需要进行大量的工作。

参 考 文 献

- [1] 李飞,王海昌,郭文怡,等. 恒磁场对人脐静脉内皮细胞活性及超微结构的影响. 中国动脉硬化杂志, 2006, 14: 140.
- [2] Ropert S, Vignaux O, Mir O, et al. VEGF pathway inhibition by anti-cancer agent sunitinib and susceptibility to atherosclerosis plaque disruption. Invest New Drugs, 2011, 29: 1497-1499.
- [3] 赵锐,杨春玖,张宝山,等. 磁场对急性心肌梗死大鼠心肌丙二醛、三磷酸腺苷及红细胞超氧化物歧化酶含量的影响. 中国老年学杂志, 2007, 27: 303-304.
- [4] 张桂莲,郭梅凤,程向晖,等. 不同磁场对大鼠肝组织中自由基代谢的影响. 包头医学院学报, 2008, 24: 456-457.
- [5] Yamaguchi S, Ogiue-Ikeda M, Sekino M, et al. Effects of pulsed magnetic stimulation on tumor development and immune functions in mice. Bioelectromagnetics, 2006, 27: 64-72.
- [6] Ghibelli L, Cerella C, Cordisco S, et al. NMR exposure sensitizes tumor cells to apoptosis. Apoptosis, 2006, 11: 359-365.
- [7] 苟兴能,张克,杨兴江,等. 川麦冬多糖对恒磁场致小鼠免疫损伤的防护作用. 四川中医, 2009, 27: 18-19.
- [8] Gmitrov J, Ohkubo C, Okano H. Effect of 0.25 T static magnetic field on microcirculation in rabbits. Bioelectromagnetics, 2002, 23: 224-229.
- [9] 张克英,冯建军,苟兴能. 恒定磁场暴露雄性小鼠某些脏/体比值及血液成分的变化. 中国职业医学, 2009, 36: 25-29.

(修回日期:2012-06-17)

(本文编辑:阮仕衡)