

· 基础研究 ·

不同强度永磁磁场对大鼠胰岛细胞超氧化物歧化酶及丙二醛的影响

杨琳 王益民 孟庆楠 孟燕妮 张皓楠 王蕴华

【摘要】目的 研究在正常培养条件下和缺氧培养条件下,不同强度永磁磁场对大鼠胰岛细胞超氧化物歧化酶(SOD)活性及丙二醛(MDA)含量的影响。**方法** 根据大鼠胰岛细胞生长情况,选取培养后第3天的细胞进行实验。在正常培养条件下和缺氧培养条件下分别采用44.8 mT、90.6 mT和182.1 mT 3种强度磁场对加磁A组、加磁B组及加磁C组细胞进行干预,对照组细胞不给予任何磁场干预。于磁场干预72 h后检测各组细胞培养液中SOD活性及MDA含量。**结果** 通过观察大鼠胰岛细胞生长情况发现,其细胞光密度(OD)值从培养第2天到第5天呈直线增长趋势,故选择培养第3天的细胞进行磁场干预实验。在正常培养条件下,各加磁组SOD活性均低于对照组,其中加磁A组SOD活性与对照组间差异具有统计学意义($P < 0.05$);在缺氧培养条件下,发现各加磁组SOD活性随磁场强度增加呈现先增强、后降低趋势,其中加磁B组、加磁C组SOD活性明显低于对照组水平($P < 0.01$)。在正常培养条件下,各加磁组MDA含量均随磁场强度增加而增加,其中加磁C组MDA含量明显高于对照组($P < 0.01$);在缺氧培养条件下,发现各加磁组MDA含量均随磁场强度增加呈现先增加、后降低趋势,其中加磁B组、加磁C组MDA含量均明显低于对照组水平($P < 0.01$)。**结论** 在正常培养条件下,磁场干预能降低大鼠胰岛细胞SOD活性,增加MDA含量,呈现氧化损伤效应,并随着磁场强度增加,其氧化损伤程度进行性加重;在缺氧培养条件下,磁场干预在降低大鼠胰岛细胞SOD活性同时,还能降低MDA含量,呈现抗氧化损伤效应,并随着磁场强度增加,其抗氧化损伤效应逐渐增强。

【关键词】 永磁磁场; 胰岛细胞; 氧化损伤

An experimental study of the impacts of magnetic fields on superoxide dismutase and malondialdehyde in rat pancreatic islet cells YANG Lin, WANG Yi-min, MENG Qing-nan, MENG Yan-ni, ZHANG Hao-nan, WANG Yun-hua. Department of Experimental Teaching, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

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

【Abstract】 Objective To explore the impacts of magnetic fields of different intensities on the superoxide dismutase (SOD) activity and malondialdehyde (MDA) levels in rat pancreatic islet cells under normal and hypoxic conditions. **Methods** Rat pancreatic islet cells were cultured, and after 3 days were subjected to a magnetic field of either 44.8 mT, 90.6 mT or 182.1 mT under either normal or hypoxic conditions. Control cells received no magnetic field exposure. SOD activity and MDA level were measured after 72 hr. **Results** The cultured cells grew linearly with optical density (OD) of 0.067 ± 0.021 after 2 days and 0.449 ± 0.113 after 5 days. SOD activity was significantly lower in the three magnetic field intervention groups than in the control group. Under hypoxic culture conditions, in all the magnetic field intervention groups SOD activity increased at first and then decreased. Under normal culture conditions, MDA content was significantly higher in the 182.1 mT group than in the control group. In the other two groups it was significantly lower. **Conclusion** Magnetic field exposure can cause oxidative damage to pancreatic islet cells, at least rat cells in culture. Under hypoxic culture conditions a magnetic field can inhibit such damage.

【Key words】 Magnetic fields; Islet cells; Oxidative damage

磁场对生物体内细胞具有多种生物学效应^[1-2],近年来在该领域内研究较多的细胞主要包括神经细胞、

成纤维细胞、成骨细胞、内皮细胞等^[3-13]。胰岛细胞是具有分泌功能的内分泌细胞,对生物机体的糖脂代谢具有重要作用。基于上述背景,本研究通过观察在正常培养条件下及缺氧培养条件下,不同强度永磁磁场对大鼠胰岛细胞超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性及丙二醛(malondialdehyde, MDA)含

量的影响,从而探讨不同强度磁场对胰岛细胞的氧化损伤作用。

材料与方法

一、主要实验材料

实验用大鼠胰岛细胞株(RINm5f)由北京协和细胞资源中心提供;主要实验试剂与耗材包括:RPMI1640培养基(美国 Gibco 公司)、胰酶(美国 Sigma公司)、胎牛血清(美国 Gibco 公司)、双抗(含 100 kU/L青霉素,100 mg/L链霉素)由美国 Boster 公司出品、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(南京建成生物工程有限公司)、丙二醛(MDA)试剂盒(南京建成生物工程有限公司)、噻唑蓝(MTT,美国 Gibco 公司)、二甲基亚砜(DMSO,美国 Gibco 公司)、96 孔及 6 孔细胞培养板及 75 cm² 细胞培养瓶等。主要实验仪器包括:超纯水系统、恒温培养振荡器(SPH-200B)、CO₂ 培养箱(日本 Sanyo 公司)、微量可调移液器、IX-70 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司)、超净化工作台、低温高速离心机、多功能读板机(奥地利 Sunrise 公司)、722 分光光度计(上海第三分析仪器厂)、恒温水浴锅等。

二、实验用磁源与加磁方法

取圆片极面中心磁感强度分别为 44.8 mT、90.6 mT、182.1 mT,尺寸分别为 Φ25 mm × 7 mm、Φ25 mm × 2 mm、Φ24 mm × 4 mm 共 3 组磁源,按磁感强度由低到高第 1 组磁源材料为铁氧体,后 2 组磁源材料为钕铁硼,均轴向充磁,简称为 A、B、C 组。将有机塑料板参照 6 孔培养板大小进行加工,根据各组磁源的厚度及直径在有机塑料板上打孔,依次嵌入各组磁源片,每种强度磁源含 6 个复孔,一块磁板为一组。加磁时将磁板置于细胞培养板下,使细胞培养板的各孔和磁板各孔一一对应,对照组细胞未给予任何干预。根据磁源空间磁场计算方法^[14],得出 A、B、C 组磁源对培养细胞的磁感强度范围依次为 37.0 ~ 40.0 mT、73.8 ~ 82.0 mT、148.5 ~ 165.0 mT。

三、大鼠胰岛细胞的复苏与传代

取出细胞冻存管立即置于 37 ℃ 水浴中摇晃、快速复温 1 min,待样品融化后以 800 rpm 离心 5 min,弃上清液,加入完全培养基重悬,接种于 75 cm² 培养瓶中(预先置有 12 ml 含 10% 胎牛血清的 1640 完全培养基),继续置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱内培养,于培养次日换液,之后每 2 ~ 3 天换液 1 次。当细胞融合度达 70% ~ 80% 时弃培养液,并用 12 ml D-Hanks 液清洗 2 次,再加入 4 ml 0.5% 胰酶清洗 1 次,然后加入 4 ml 0.5% 胰酶(37 ℃)消化,待细胞呈部分悬浮状态时,加入 12 ml 含 10% 胎牛血清的 1640 常规培养基终止消

化,并用弯头吸管适力吹打至细胞大部分脱落,按 1:3 比例进行传代培养。

四、大鼠胰岛细胞生长曲线测定

利用复苏后传出的第 1 代胰岛细胞进行生长曲线测定,以确定胰岛细胞最佳磁场干预时间。将细胞按照上述消化流程消化后进行细胞计数,按 $(2 \sim 5) \times 10^4$ 个/ml 密度接种于 96 孔板中(每孔 150 μl),每块板的边缘孔加入 150 μl D-Hank's 溶液,共接种 7 块板,每块板接种 20 孔,随后将其培养于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱内,于次日相同时间加入 MTT 溶液,每孔弃掉细胞悬液后,用 D-Hank's 液冲洗 2 遍,再加入 20 μl MTT,置于 37 ℃ 培养箱内培养 4 h,然后弃掉 MTT,每孔加入 200 μl DMSO,于 37 ℃ 环境下振荡 10 min 后,使用多功能读板机测定样品光密度值(optical density, OD)。每天检测 1 块 96 孔板细胞样品,共持续 7 d,然后根据所得 OD 值绘制胰岛细胞生长曲线。

五、正常及缺氧培养条件下 SOD 及 MDA 检测

将上述处于对数生长期的胰岛细胞以 $(2 \sim 5) \times 10^4$ 个/ml 密度接种于 6 孔板中(每孔 2000 μl)。在正常培养条件下及缺氧培养条件下均设有对照组(未给予磁场干扰)和加磁组(包括加磁 A 组、加磁 B 组及加磁 C 组),每组设 6 个复孔。在细胞培养板下放置预先制作好的磁板。正常培养是将细胞样品置入 37 ℃、5% CO₂ 培养箱内培养,缺氧培养则是将细胞样品置入三气培养箱内培养,待培养 72 h 且细胞密度达 70% ~ 80% 时提取细胞上清液,采用 722 型分光光度计进行 SOD 与 MDA 吸光度值测定,然后根据试剂盒说明书分别换算出 SOD 及 MDA 相关数据。

六、统计学分析

本研究所得数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,选用 SPSS 13.0 版统计学软件包进行数据比较,统计学方法采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、大鼠胰岛细胞生长情况分析

大鼠胰岛细胞在正常培养条件下第 1 ~ 7 天的 OD 值分别为 (0.058 ± 0.013) 、 (0.067 ± 0.021) 、 (0.179 ± 0.045) 、 (0.287 ± 0.074) 、 (0.449 ± 0.113) 、 (0.406 ± 0.110) 和 (0.275 ± 0.099) ,其生长曲线详见图 1,可见胰岛细胞在培养第 2 天至第 5 天期间呈线性生长趋势,此时细胞生长状态最佳,适合进行药物等外界因素干预实验,故本研究磁场干预时间点选定为胰岛细胞培养后第 3 天时。

二、磁场对正常培养条件下胰岛细胞 SOD 活性及 MDA 含量的影响

通过检测各组胰岛细胞在正常培养条件下 SOD

活性及 MDA 含量时发现,各加磁组(包括加磁 A 组、加磁 B 组及加磁 C 组)SOD 活性均高于对照组,其中以加磁 A 组 SOD 活性的提高幅度较显著,与对照组间差异具有统计学意义($P < 0.05$);各加磁组 MDA 含量随磁场强度增加而增加,其中以加磁 C 组 MDA 含量增高幅度尤为显著,与对照组间差异具有统计学意义($P < 0.01$),具体数据见表 1。

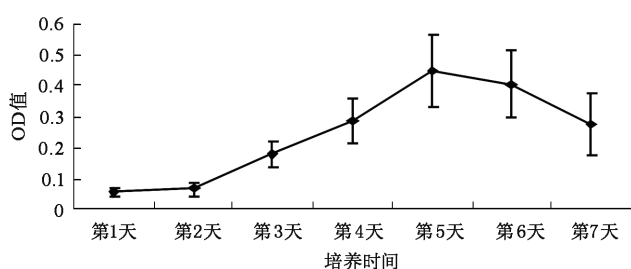


图 1 正常培养条件下胰岛细胞生长曲线分析

表 1 不同强度磁场干预对正常培养条件下大鼠胰岛细胞 SOD 活性及 MDA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	SOD 活性 (U/ml)	MDA 含量 (nmol/L)
对照组	13.627 ± 0.925	1.028 ± 0.083
加磁 A 组 (44.8 mT)	15.015 ± 0.808 ^a	0.985 ± 0.066
加磁 B 组 (90.6 mT)	14.473 ± 1.221	0.993 ± 0.060
加磁 C 组 (182.1 mT)	14.053 ± 0.963	1.740 ± 0.069 ^b

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$

三、磁场对缺氧培养条件下胰岛细胞 SOD 活性及 MDA 含量的影响

通过检测各组胰岛细胞在缺氧培养条件下 SOD 活性及 MDA 含量时发现,各加磁组(包括加磁 A 组、加磁 B 组及加磁 C 组)SOD 活性随磁场强度增加呈现先增强、后降低趋势,其中加磁 B 组、加磁 C 组 SOD 活性均较对照组显著降低($P < 0.01$);各加磁组 MDA 含量随磁场强度增加亦呈现先增加、后降低趋势,其中加磁 B 组、加磁 C 组 MDA 含量均较对照组显著降低($P < 0.01$),具体数据见表 2。

表 2 不同强度磁场干预对缺氧培养条件下大鼠胰岛细胞 SOD 活性及 MDA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	SOD 活性 (U/ml)	MDA 含量 (nmol/L)
对照组	27.519 ± 0.320	1.373 ± 0.074
加磁 A 组 (44.8 mT)	27.541 ± 1.973	1.196 ± 0.312
加磁 B 组 (90.6 mT)	24.629 ± 0.520 ^a	1.057 ± 0.180 ^a
加磁 C 组 (182.1 mT)	24.407 ± 0.798 ^a	0.917 ± 0.047 ^a

注:与对照组比较,^a $P < 0.01$

讨 论

在涉及永磁磁场生物学效应的研究中,对磁场的定量大多是使用磁源表面特定位置的磁感强度值进行

表述。但由于永磁磁源具有空间磁场分布不均匀、衰减快等特点,故无法得知实际作用于具体研究区域的磁感强度量值或量值范围,导致其研究结果具有一定局限性。本实验根据已有理论及前期实验基础^[14],对选取的 3 组磁源进行了空间磁感强度定量分析计算,明确得出上述 3 组磁源在具体作用区域的磁感强度量值范围,并以此为依据进行相关磁场干预研究。

本实验通过检测胰岛细胞培养液内 SOD 活性与 MDA 含量来研究不同强度永磁磁场对大鼠胰岛细胞氧化损伤的影响。SOD 是自由基清除剂,能将 O_2^- 歧化成 O_2 和 H_2O_2 ,后者在过氧化氢酶作用下变成 H_2O ,从而保护细胞免受氧自由基攻击,因此 SOD 活力高低可间接反映机体清除氧自由基的能力。机体通过酶系统及非酶系统产生氧自由基,自由基能攻击膜脂中不饱和脂肪酸,使其发生氧化,脂质过氧化产物 MDA 就会升高。由于脂质过氧化是造成生物体氧化损伤的主要原因,故通过测定 MDA 含量可间接反映体内自由基对机体的损伤程度^[15-16]。

本实验结果表明,于细胞培养第 3 天时进行磁场干预,发现在正常培养条件下各加磁组(包括加磁 A 组、加磁 B 组及加磁 C 组)SOD 含量均高于对照组,并且以加磁 A 组 SOD 活性提高幅度尤为显著,与对照组间差异具有统计学意义($P < 0.05$),提示低强度磁场干预可明显提高胰岛细胞 SOD 活性;各加磁组 MDA 含量随磁场强度增强而增加,其中以加磁 C 组 MDA 含量增加幅度较显著,与对照组间差异具有统计学意义($P < 0.01$),提示低强度磁场干预有助于胰岛细胞 SOD 活性增强,机体消除自由基的能力提高,故 MDA 含量生成减少;随着磁场强度增高,机体 SOD 活性逐渐降低,其消除自由基的能力也随之下降,导致 MDA 生成增加,机体受到自由基的损伤情况加重。

在缺氧培养条件下,本研究各加磁组(包括加磁 A 组、加磁 B 组及加磁 C 组)SOD 活性随磁场强度增加呈现先升高、后降低趋势,其中加磁 B 组、加磁 C 组与对照组比较,其 SOD 活性显著下降($P < 0.01$),提示低强度磁场干预对缺氧培养条件下胰岛细胞 SOD 活性有一定改善作用,而随着磁场强度增加,细胞 SOD 活性逐渐降低;各加磁组(包括加磁 A 组、加磁 B 组及加磁 C 组)MDA 含量随磁场强度增加呈现先增加、后降低趋势,其中加磁 B 组、加磁 C 组 MDA 含量较对照组显著降低($P < 0.01$)。上述结果表明,当大鼠胰岛细胞处于缺氧培养阶段时,经磁场干预后其 SOD、MDA 与正常培养条件下经磁场干预后的变化特点不同,而是随磁场强度增加,其 SOD 酶活性降低,MDA 含量也随之下降,考虑其原因可能包括:由于细胞此时正处于缺氧状态,细胞内各个活性成分均会受到影响,

酶作为细胞体的活性成分其功能也会受到抑制,而磁场作为外界干预手段,对细胞内的电子分布具有一定程度影响,能促使电子序列重新排序,导致细胞内自由基无法大量攻击细胞膜而发生氧化作用,对细胞整体功能具有保护作用,因而 MDA 生成量随磁场强度增高而减少,至于其确切作用机制还有待进一步研究确定。

综上所述,本研究结果表明,在正常培养条件下,磁场干预能降低大鼠胰岛细胞 SOD 活性,增加 MDA 含量,呈现氧化损伤反应,并随着磁场强度增加,损伤进行性加重;在缺氧培养条件下,磁场干预在降低大鼠胰岛细胞 SOD 活性同时,还能降低 MDA 含量,呈现一定程度的抗氧化损伤效应,并随着磁场强度增加,其抗氧化损伤作用逐渐增强。

参 考 文 献

- [1] 杨丽,乔晓燕,董有尔. 磁场生物效应的研究现状与展望. 中国医学物理学杂志,2009,26:1022-1024.
- [2] 智丽媛,杜莉. 静磁场的细胞生物学效应的研究. 广东牙病防治,2008,16: 651.
- [3] 程立君,李刚,林凌,等. 中等强度恒定磁场作用下的神经元钠通道特性. 纳米技术与精密工程,2010,8:559-564.
- [4] 刘哲伟,苏开新,贺全勇,等. 恒稳磁场对离体增生性瘢痕成纤维细胞 TGF- β 表达的影响. 南华大学学报医学版,2009,37:654-657.
- [5] 王蕴华,肖松山,王益民,等. 不同强度永磁磁场对成纤维细胞的

- 生物学活性影响研究. 生物医学工程与临床,2012,16:14-17.
- [6] 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,2006,14:140-142.
- [7] 孙向华,蔡永芹,袁爱芹. 恒定磁场中大鼠成骨细胞的增殖和功能活性. 中国组织工程研究与临床康复,2011,15:8587-8590.
- [8] 张杰,陆洪英,金成文,等. 恒磁场对人脐静脉内皮细胞增殖、凋亡及分泌功能的影响. 中华物理医学与康复杂志,2011,33:742-745.
- [9] 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. 哈尔滨医科大学学报,2011,45:301-303.
- [10] 吴全义,端礼荣,张永康. 稳恒磁场对新生小鼠肾上皮细胞影响. 中国公共卫生,2009,25:325-326.
- [11] Khodarahmi I, Mobasheri H, Firouzi M. The effect of 2.1 T static magnetic field on astrocyte viability and morphology. Magn Reson Imaging,2010,28:903-909.
- [12] Potenza L, Martinelli C, Polidori E, et al. Effects of a 300 mT static magnetic field on human umbilical vein endothelial cells. Bioelectromagnetics,2010,31:630-639.
- [13] 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. 中华物理医学与康复杂志,2007,29:522-524.
- [14] 王益民,孟庆楠,张皓楠,等. 磁疗用永磁圆片磁源实测结果与分析. 中华物理医学与康复杂志,2011,33:509-512.
- [15] 喻晶,刘宏. 低剂量辐射过程中的自由基损伤及药物防护. 中国医院药学杂志,2011,31:1121-1123.
- [16] 王文锋,张兆霞,朱红平. 生物分子的自由基损伤与保护研究. 生物物理学报,2009,25:405-406.

(修回日期:2012-09-26)

(本文编辑:易 浩)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊对来稿中统计学处理的有关要求

1. 统计研究设计:应交代统计研究设计的名称和主要做法。如调查设计(分为前瞻性、回顾性或横断面调查研究);实验设计(应交代具体的设计类型,如自身配对设计、成组设计、交叉设计、析因设计、正交设计等);临床试验设计(应交代属于第几期临床试验,采用了何种盲法措施等)。主要做法应围绕 4 个基本原则(随机、对照、重复、均衡)概要说明,尤其要交代如何控制重要非试验因素的干扰和影响。

2. 资料的表达与描述:用($\bar{x} \pm s$)表达近似服从正态分布的定量资料,用 $M(Q_R)$ 表达呈偏态分布的定量资料;用统计表时,要合理安排纵横标目,并将数据的含义表达清楚;用统计图时,所用统计图的类型应与资料性质相匹配,并使数轴上刻度值的标法符合数学原则;用相对数时,分母不宜小于 20,要注意区分百分率与百分比。

3. 统计分析方法的选择:对于定量资料,应根据所采用的设计类型、资料所具备的条件和分析目的,选用合适的统计分析方法,不应盲目套用 t 检验和单因素方差分析;对于定性资料,应根据所采用的设计类型、定性变量的性质和频数所具备的条件以及分析目的,选用合适的统计分析方法,不应盲目套用 χ^2 检验。对于回归分析,应结合专业知识和散点图,选用合适的回归类型,不应盲目套用简单直线回归分析,对具有重复实验数据的回归分析资料,不应简单化处理;对于多因素、多指标资料,要在一元分析的基础上,尽可能运用多元统计分析方法,以便对因素之间的交互作用和多指标之间的内在联系进行全面、合理的解释和评价。

4. 统计结果的解释和表达:当 $P < 0.05$ (或 $P < 0.01$) 时,应说明对比组之间的差异有统计学意义,而不应说对比组之间具有显著性(或非常显著性)的差别;应写明所用统计分析方法的具体名称(如:成组设计资料的 t 检验,两因素析因设计资料的方差分析、多个均数之间两两比较的 q 检验等),统计量的具体值(如 $t = 3.45$, $\chi^2 = 4.68$, $F = 6.79$ 等),应尽可能给出具体的 P 值(如 $P = 0.0238$);当涉及到总体参数(如总体均数、总体率等)时,在给出显著性检验结果的同时,再给出 95% 可信区间。