

· 研究简报 ·

永磁磁场对胎鼠皮质神经元细胞超氧化物歧化酶及丙二醛含量的影响

张皓楠 王益民 孟庆楠 孟燕妮 王蕴华

【摘要】目的 观察在正常培养条件及缺氧培养条件下不同强度永磁磁场对胎鼠皮质神经元超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)含量的影响。**方法** 采集胎鼠皮质神经元分别在正常条件及缺氧条件下培养,神经元细胞在上述培养条件下又分为对照组及加磁组,加磁组根据给予的磁场强度高低(磁源极面中心磁感强度分别为 44.8 mT、90.6 mT、182.1 mT)细分为 A 组、B 组及 C 组,对照组细胞未给予磁场干预。于细胞培养 72 h 后分别检测细胞培养上清液中 SOD 及 MDA 含量。**结果** 在正常培养条件下,A 组、B 组神经元培养上清液中 SOD 值[分别为(13.132 ± 0.538) U/ml、(12.452 ± 1.236) U/ml]与对照组[(12.882 ± 0.713) U/ml]间差异均无统计学意义($P > 0.05$),C 组 SOD 值[(10.844 ± 2.385) U/ml]则明显低于对照组($P < 0.05$);A 组、B 组及 C 组培养上清液中 MDA 值[分别为(1.520 ± 0.162) nmol/ml、(1.190 ± 0.113) nmol/ml、(1.264 ± 0.120) nmol/ml]均显著高于对照组[(0.952 ± 0.133) nmol/ml] ($P < 0.05$);在缺氧培养条件下 A 组、B 组、C 组 SOD 值[分别为(35.089 ± 0.412) U/ml、(35.412 ± 0.420) U/ml、(34.999 ± 0.452) U/ml]及 MDA 值[分别为(9.865 ± 0.719) nmol/ml、(10.102 ± 0.719) nmol/ml、(10.380 ± 0.666) nmol/ml]与对照组[SOD 值为(34.964 ± 1.818) U/ml,MDA 值为(8.686 ± 3.751) nmol/ml]间差异均无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 在正常培养条件下本研究所用各强度永磁磁场均可诱发胎鼠皮质神经元氧化损伤;在缺氧培养条件下本研究所用各强度永磁磁场对胎鼠皮质神经元氧化损伤均无明显影响作用。

【关键词】 永磁磁场; 胎鼠皮质神经元; 超氧化物歧化酶; 丙二醛

神经元细胞作为神经系统结构和功能的基本单位,在生物体的存活及生长过程中具有重要作用。已有实验表明低频脉冲磁场会对神经元细胞产生损伤效应^[1],但磁疗所用的永磁磁源是否会对神经元细胞产生影响目前鲜见报道。本实验以永磁磁源产生的静磁场作为研究对象,分别在正常培养条件及缺氧培养条件下观察永磁磁场对神经元细胞培养上清液中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)及丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量的影响,并探讨不同强度永磁磁场对神经元细胞氧化损伤的作用机制,为磁疗的基础研究及临床应用提供参考依据。现报道如下。

材料与方法

一、主要实验试剂及仪器

本研究主要实验试剂包括胰酶(美国 Gma 公司)、达氏修正伊氏培养液/F12(Dulbecco's modified Eagle's medium/F12D, MEM-F12)(美国 Gibco 公司)、神经生长添加剂 B27(美国 Gibco 公司)、优级胎牛血清(美国 Gibco 公司)、SOD 试剂盒(南京建成生物工程有限公司)、MDA 试剂盒(南京建成生物工程有限公司)。主要实验仪器包括:CO₂ 培养箱(日本 SANYO 公司)、三气培养箱(日本 ASTEC 公司)、超净化工作台(东联哈尔公司)、IX-70 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司)、微量多功能读板机(瑞士 Tecan 公司)。

二、神经元细胞制备

本研究所用无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级大

鼠由中国医学科学院放射医学研究所提供[批号:SCSK(津)2005-0001],取孕 15 d 胎鼠双侧大脑半球组织,在放大镜下用眼科镊分离脑皮质,去除软脑膜;采用手术刀切碎大脑皮质,加入 20 ml 0.3% 胰酶并移入 50 ml 离心管中,37 ℃ 消化 10 min,消化完毕后用吸管吹打、分离细胞,将细胞悬液经 200 目滤网过滤后加入胎牛血清(fetal bovine serum, FBS),在 15 ℃ 环境下离心(1000 r/min)5 min,弃上清液后制备皮质神经元细胞悬液待用。

三、皮质神经元培养及加磁干预

将处于对数生长期的皮质神经元细胞进行计数,按照每孔 10⁶ 个/ml 密度接种于已包被多聚赖氨酸的 6 孔细胞培养板中。待培养 4 h 后用含 2% B27 的 DMEM-F12 培养基进行全量换液^[2]。随后分别在正常条件(培养于体积分数 5% CO₂、37 ℃ 的培养箱内)及缺氧条件(培养于 O₂ 体积分数 < 5%、37 ℃ 三气培养箱内)下培养上述神经细胞,并且在不同培养条件下均设有对照组及加磁组,每组设有 12 个复孔。

对照组细胞不给予任何特殊干预,加磁组根据磁源材料(均轴向充磁)不同又分为 3 个亚组,A 组磁源材料为铁氧体(磁源尺寸为 Φ25 mm × 7 mm),B 组及 C 组磁源材料均为钕铁硼(B 组磁源材料尺寸为 Φ25 mm × 2 mm, C 组磁源材料尺寸为 Φ24 mm × 4 mm),A 组、B 组、C 组磁源极面中心磁感强度均值经实测分别为 44.8 mT、90.6 mT 和 182.1 mT^[3]。将有机塑料板按照 6 孔培养板大小进行修剪,参照各组磁源厚度挖孔,分别镶入相应的永磁磁源;然后将有机塑料磁板置于细胞培养板下,使细胞培养板的各孔与磁源一一对应。经测量细胞培养板底壁厚度为 1 mm,根据有限元法^[4]计算得出 A 组、B 组、C 组培养细胞分别受到磁场强度为 37.0 ~ 40.0 mT、73.8 ~ 82.0 mT、148.5 ~ 165.0 mT 的磁场干预。

四、SOD 及 MDA 检测

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2013.06.020

基金项目:国家自然科学基金支持项目(30873467)

作者单位:300193 天津,天津中医药大学中医工程学院

通信作者:王益民,Email:wym@tjutcm.edu.cn

各组神经元细胞分别培养 72 h 后,取细胞培养上清液,选用 SOD 试剂盒及 MDA 试剂盒,分别通过微量多功能读板机检测各组细胞培养上清液中 SOD 及 MDA 光密度值(optical density, OD),然后根据试剂盒说明书分别换算出 SOD 及 MDA 含量。

五、统计学分析

本研究所得计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 13.0 版统计学软件包进行数据处理,组间比较采用单因素方差分析及 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、正常条件下各组细胞培养上清液中 SOD 及 MDA 含量比较

在正常培养条件下,各组细胞培养上清液中 SOD 及 MDA 含量结果详见表 1,表中数据显示,A 组、B 组细胞培养上清液中 SOD 含量与对照组间差异均无统计学意义($P > 0.05$),C 组细胞培养上清液中 SOD 含量显著低于对照组,组间差异具有统计学意义($P < 0.05$);A 组、B 组及 C 组细胞培养上清液中 MDA 含量均显著高于对照组,组间差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 正常培养条件下各组细胞培养上清液中 SOD 及 MDA 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	SOD 含量 (U/ml)	MDA 含量 (nmol/ml)
对照组	12.882 $\pm$ 0.713	0.952 $\pm$ 0.133
A 组	13.132 $\pm$ 0.538	1.520 $\pm$ 0.162 ^a
B 组	12.452 $\pm$ 1.236	1.190 $\pm$ 0.113 ^a
C 组	10.844 $\pm$ 2.385 ^a	1.264 $\pm$ 0.120 ^a

注:与对照组比较,^a $P < 0.01$

二、缺氧条件下各组细胞培养上清液中 SOD 及 MDA 含量比较

在缺氧培养条件下,各组细胞培养上清液中 SOD 及 MDA 含量结果详见表 2,表中数据显示,A 组、B 组、C 组细胞培养上清液中 SOD 及 MDA 含量与对照组间差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 缺氧培养条件下各组细胞培养上清液中 SOD 及 MDA 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	SOD (U/ml)	MDA (nmol/ml)
对照组	34.964 $\pm$ 1.818	8.686 $\pm$ 3.751
A 组	35.089 $\pm$ 0.412	9.865 $\pm$ 0.719
B 组	35.412 $\pm$ 0.420	10.102 $\pm$ 0.719
C 组	34.999 $\pm$ 0.452	10.380 $\pm$ 0.666

讨 论

目前已有大量研究表明,神经元氧化损伤与失眠、过敏以及帕金森综合征等神经性疾病具有密切联系^[5-6],所以针对神经系统氧化损伤方面的研究日益受到临床关注。有学者指出,特定生物制剂会对神经元细胞氧化损伤产生一定影响^[7-9]。本实验主要观察不同强度永磁磁场对正常培养及缺氧培养条件下神经元 SOD 及 MDA 含量的影响,从而探讨磁场干预与细胞

氧化损伤间的相互作用。

细胞氧化损伤与细胞内自由基具有密切联系。自由基是原子最外层偶数电子失去一个电子后形成的具有强氧化活性的基团,在生物体系中主要是氧自由基,过多氧自由基会导致细胞及组织过氧化损伤。SOD 及 MDA 是反映机体过氧化损伤的重要指标,通过检测 SOD 及 MDA 水平可间接了解细胞氧化损伤程度^[10-12]。SOD 是一种存在于细胞浆及线粒体内的金属蛋白酶,可通过化学反应清除生物体内自由基,抑制氧自由基对细胞的损伤,其活性高低亦可间接反映组织细胞中自由基含量和脂质过氧化损伤程度。MDA 则是自由基作用于脂质发生过氧化反应后的氧化终产物,其含量水平可反映机体脂质过氧化程度^[13]。

本研究结果表明,在正常培养条件下,A 组、B 组细胞培养上清液中 SOD 值与对照组间差异均无统计学意义($P > 0.05$),但 MDA 值均显著高于对照组($P < 0.05$);C 组细胞培养上清液中 SOD 值低于对照组($P < 0.05$),MDA 含量则高于对照组($P < 0.05$)。上述结果提示本研究所用低强度及中强度磁场干预能诱发神经细胞损伤,导致氧化反应终产物 MDA 含量增加;但此时细胞内 SOD 酶活性与对照组间无明显差异,提示低强度、中强度磁场干预能影响电子对排列,使得细胞内 MDA 含量增高,并未影响到 SOD 酶活性;高强度磁场干预则能对神经细胞产生严重损伤,导致大量氧自由基释放,SOD 活性降低,并伴有大量 MDA 生成,其影响作用更为显著。在缺氧培养条件下,实验中各加磁组细胞培养上清液中 SOD 值、MDA 值与对照组间差异均无统计学意义($P > 0.05$),提示神经元细胞在缺氧条件下受到的损伤可能远大于磁场对神经元细胞的过氧化损伤,此时磁场干预已不是影响细胞 SOD、MDA 含量的主要因素^[14]。需要指出的是,本研究只是观察了不同培养条件下磁场干预对神经元 SOD、MDA 含量的影响,至于磁场干预影响神经元自由基系统的具体机制还需进一步探讨。

综上所述,本研究结果表明,在正常培养条件下本实验所用低、中、高强度永磁磁场干预均可诱发胎鼠皮质神经元细胞氧化损伤;在缺氧培养条件下本实验所用各强度永磁磁场对胎鼠皮质神经元氧化损伤均无明显影响作用。

参 考 文 献

- [1] 董娟,李伯勤,王旭平,等. 低频脉冲磁场对大鼠皮质神经元损伤效应. 中国公共卫生,2008,28:503-504.
- [2] 王廷华,冯忠堂. 神经细胞培养理论与技术. 北京:科学出版社,2009:142-143.
- [3] 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.
- [4] 王益民,张皓楠,孟庆楠,等. 磁疗用圆片永磁磁源空间磁场有限元分析. 中国医学物理学杂志,2010,27:2294-2298.
- [5] Gulec M, Ozkol H, Selvi Y, et al. Oxidative stress in patients with primary insomnia. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2012, 37: 247-251.
- [6] Kapun AP, Salobir J, Levart A, et al. Oxidative stress markers in canine atopic dermatitis. Res Vet Sci, 2012, 92:469-470.
- [7] 陈瑶玥,暨荀鹤,郭礼和. 木犀草素对大鼠皮层神经元氧化损伤的保护作用. 中国药理学通报,2008,24:382-386.
- [8] 刘强. 氯胺酮对颅脑损伤神经细胞凋亡 SOD、MDA 的影响. 中国医

- 药指南,2011,9:221.
- [9] 李祥,汤艳,吴雨岭,等. 十溴联苯醚致大鼠学习记忆及海马神经元氧化损伤和凋亡研究. 中国职业医学,2011,38:463-466.
- [10] Dai RL,Zhu SY,Xia YP,et al. Sonic hedgehog protects cortical neurons against oxidative stress. Neurochem Res,2011,36:67-75.
- [11] Domoki F,Kis B,Gáspár T,et al. Rosuvastatin induces delayed preconditioning against L-glutamate excitotoxicity in cultured cortical neurons. Neurochem Int,2010,56:404-409.
- [12] Ali SS,Hardt JJ,Dugan LL. SOD activity of carboxyfullerenes predicts their neuroprotective efficacy:a structure-activity study. Nanomedicine, 2008,4:283-294.
- [13] 吴书昱,王淑君,刘俏,等. 杨梅叶总黄酮对培养大鼠皮质神经元缺糖缺氧损伤的影响. 沈阳药科大学学报,2010,27:829-833.
- [14] 孙树清,吴中学,张友平,等. 脑损伤后脑组织自由基变化的实验研究. 首都医科大学学报,2002,23:236-833.
- (修回日期:2013-03-26)
(本文编辑:易 浩)

红外线照射对萎缩性胃炎大鼠胃酸分泌及 P16 表达的影响

王建国 邵雪辉 张晓丽 杨跃平

【摘要】 目的 观察红外线照射对慢性萎缩性胃炎(CAG)大鼠胃酸分泌及胃黏膜细胞 P16 表达的影响,并探讨红外线照射治疗 CAG 的可能机制。**方法** 采用随机数字表法将 40 只成年雄性 Wistar 大鼠分为正常组、模型对照组及红外线照射组。将模型对照组、红外线照射组大鼠制成 CAG 动物模型,红外线照射组大鼠于制模成功后给予红外线照射,每日照射 1 次。待红外线照射 20 d 后观察各组大鼠胃酸分泌及胃黏膜 P16 表达情况。**结果** 模型对照组大鼠胃酸酸度[pH 值(5.86 ± 1.45)]较正常组[pH 值(3.72 ± 1.02)]显著降低($P < 0.05$),红外线照射组胃酸酸度[pH 值(3.99 ± 0.93)]较模型对照组明显增高($P < 0.05$)。正常组胃黏膜细胞 P16 阳性率(75.0%)、红外线照射组 P16 阳性率(66.7%)均显著高于模型对照组水平(25.0%)($P < 0.05$)。**结论** 红外线照射能促进 CAG 模型大鼠胃酸分泌及胃黏膜 P16 表达,对促进胃黏膜功能恢复、预防胃癌发生等均具有重要意义。

【关键词】 红外线; 慢性萎缩性胃炎; 胃酸; P16

慢性萎缩性胃炎(chronic atrophic gastritis,CAG)是临床常见、多发病,其发病原因复杂,至今尚无统一治疗方案可循,临床疗效有待提高。近年来物理疗法(特别是红外线、激光针、磁疗等无痛、无创理疗手段)在临床中的应用日趋广泛,红外线治疗因具有操作简便、刺激性小、疗效明确、患者依从性好等优点而倍受临床关注。本课题组通过建立 CAG 大鼠模型并对其进行红外线照射,观察干预前、后大鼠胃酸分泌及胃黏膜 P16 表达变化,为 CAG 的物理治疗提供参考资料。现报道如下。

材料与方法

一、实验动物及分组

共选取清洁级 8 周龄 Wistar 雄性大鼠 40 只,体质量约(250 ± 50)g,每笼 5 只,经常规标准颗粒饲料饲养 1 周后,根据质量配对原则随机取 8 只大鼠归入正常组,余 32 只大鼠则进行 CAG 造模,参考文献[1]介绍的方法,采用 2% 水杨酸钠和 30% 酒精混合溶液对大鼠实施灌胃,并结合劳累、饥饿失常等多种干预手段建立 CAG 大鼠模型。在造模过程中有 3 只大鼠因灌

胃方式不当而死亡。在造模结束前,随机取 5 只造模大鼠进行胃黏膜病理组织学检查,待确认造模成功后,采用随机数字表法将 CAG 模型大鼠分成模型对照组及红外线照射组,每组 12 只大鼠。

二、红外线照射疗法

红外线照射组大鼠于制模后给予红外线照射,采用 L-I-6A 型红外线灯,发出的红外线波长为 2~25 μm ,功率为 200 W,将红外线灯头垂直照射大鼠胃部投影区,灯距 50 cm,每次照射持续 30 min,每日治疗 1 次,连续照射 20 d。模型对照组及正常组大鼠均未给予特殊处理。所有大鼠在实验期间均自由饮水、摄食,给予正常周期日光照射。

三、标本取材与处理

各组大鼠于制模结束 20 d 时禁食、不禁水持续 24 h,于次日经乙醚麻醉后立即剖腹,结扎贲门后摘出全胃,洗去表面血污并用滤纸吸干,沿胃大弯剪开胃腔,用 5 ml 蒸馏水冲洗胃腔并收集稀释胃液,采用 PHS-3C 型数字式酸度计测定其 pH 值;然后沿胃小弯侧全层切取一段长 1 cm、宽 5 mm 的胃窦及部分胃体组织,置于 10% 中性甲醛中固定 24 h,经石蜡包埋后行连续切片(片厚 5 μm)。第 1 张切片用于苏木精-伊红(hematoxylin-eosin,HE)染色,第 2 张切片采用 0.01% 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution,PBS)代替一抗作为阴性对照,第三张切片采用抗 P16 抗体标记样本中 P16 蛋白,免疫组化染色选用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶法(streptavidin-peroxidase

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2013.06.021

基金项目:河北省卫生厅医学科学重点研究课题(20100478),河北北方学院课题(Q2010005)

作者单位:075000 张家口,张家口学院(王建国);河北北方学院医学物理教研室(邵雪辉),电镜室(张晓丽),信息系(杨跃平)