

· 基础研究 ·

恒定磁场对大鼠脑缺血再灌注损伤保护作用的研究

关微华 高佩琦 许艳

【摘要】 目的 研究恒定磁场对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用。**方法** 40 只动物被随机分成 3 组,假手术组、模型组及磁疗组,其中后 2 组参考 Longa 法制成大鼠大脑中动脉缺血再灌注模型,磁疗组在脑缺血模型完成后立即将其头颈部置于 40 mT 的恒磁场中,持续 30 min,每天 1 次,7 d 后眼球取血、断头取脑,测量血液流变学、红细胞膜流动性、抗氧化酶活性以及 NO、NOS 等各项指标的变化,假手术组及模型组均未给予相应治疗措施,并与磁疗组对照。**结果** 模型组大鼠血液流变学、红细胞膜流动性等各项指标以及一氧化氮、一氧化氮合成酶含量均显著高于假手术组,抗氧化酶活性显著低于假手术组;经过磁场治疗后,大鼠血液流变学、红细胞膜流动性、一氧化氮及一氧化氮合成酶等含量均有所下降,抗氧化酶活性有所升高,差异均有显著性。**结论** 恒定磁场能显著改善大鼠的血液流变学特性,提高红细胞膜流动性及机体的抗氧化酶活性、降低 MDA、NO 及 NOS 含量,提高机体的抗氧化能力,从而有效阻止自由基、一氧化氮等对神经组织的损伤,从而阻断了脑缺血的病理生理过程,对脑缺血再灌注损伤起到一定的保护作用。

【关键词】 恒定磁场; 自由基; 脑缺血; 超氧化物歧化酶

The protective effect of constant magnetic field on ischemia-reperfusion injury of the brain in rats GUAN Wei-hua, GAO Pei-qi, XU Yan. Department of Biophysics, Harbin Medical University, Harbin 150086, China

【Abstract】 Objective To study the beneficial effect of constant magnetic field (CMF) on brain tissue injury of rats caused by cerebral ischemia and reperfusion. **Methods** Forty rats were divided into three groups: control group ($n = 10$), reperfusion group ($n = 15$) and CMF group ($n = 15$). In the reperfusion and CMF groups, cerebral ischemia-reperfusion was caused by using the Longa's surgical procedure, while the sham operation was performed on the rats in the control group. The rats in the CMF group were immediately exposed to 40mT constant magnetic field on bilateral carotid areas for 30 minutes once daily after the operation, and seven days later, the hemorrheologic parameters, erythrocyte membrane fluidity, anti-oxidase activity and the level of NO and NOS in these rats were determined. The animals in the control and CMF groups underwent the same procedure except exposure to CMF. **Results** The parameters including hemorrheologic ones, erythrocyte membrane fluidity and the levels of NO and NOS of the reperfusion group were higher than those of the control group ($P < 0.05$, or $P < 0.01$), but the levels of anti-oxidase activity were significantly lower ($P < 0.05$, or $P < 0.01$). After the CMF treatment, all the parameters except anti-oxidase activity were significantly increased ($P < 0.05$, or $P < 0.01$). **Conclusion** The constant magnetic field could effectively improve cerebral microcirculation, and inhibit the injurious effects of free radicals, NO and NOS, indicating that CMF might protect the cerebral tissue from injury caused by ischemia-reperfusion.

【Key words】 Constant magnetic field; Cerebral ischemia-reperfusion

磁疗在我国已有悠久历史,人们利用各种形式的磁场对多种疾病进行了尝试性治疗,许多已得到认可,但是目前利用恒定磁场观察其对脑保护作用的研究仍然鲜见报道。本文通过制作大鼠局灶性脑缺血再灌注模型,探讨恒定磁场对宏观水平的血液流变学、亚细胞水平的红细胞膜流动性、分子水平的抗氧化酶活性以及当今研究热点一氧化氮和一氧化氮合成酶水平的影

响,试图更进一步了解磁疗的作用机理,为磁疗在临床的广泛应用提供更多的实验依据。

材料和方法

一、材料

1. 动物:健康雄性 Wistar 大鼠 40 只,体重(250 ± 30)g,平均 10~12 周龄,由中国农业科学院兽医研究所提供。

2. 试剂:DPH(1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene)美国 Sigma 公司生产;超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛

基金项目:黑龙江省自然科学基金资助项目(D9901)

作者单位:150086 哈尔滨,黑龙江省哈尔滨医科大学生物物理教研室

(MDA)、铜蓝蛋白(CP)、总抗氧化能力(T-AO)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、一氧化氮(NO)、一氧化氮合成酶(NOS)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所,其它试剂均为国产分析纯。

3. 仪器:722 型分光光度计(上海第三分析仪器厂)、电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司)、Avanti 高速冷冻离心机(美国 Beckman 公司生产)、RF-540 型荧光分光光度计(日本岛津公司生产)、NTX-2B 体视显微镜(宁波光学仪器厂生产)、人体显微手术器械(上海医疗器械有限公司手术器械厂生产)、计算机控制的毛细管式粘度计(自制)、CT-3 型特斯拉计(上海第四电表厂)。

二、方法

1. 分组:40 只大鼠被随机分为 3 组,假手术组 10 只,模型组和磁疗组各 15 只,除去手术失败、术中或术后死亡外,后两组各存活 10 只。

2. 动物模型建立:参考改进的 Longa^[1] 法制作大鼠大脑中动脉缺血再灌注模型。大鼠术前 12 h 禁食,术前 4 h 禁水,采用戊巴比妥钠(40 mg/kg 体重,ip)麻醉。大鼠仰卧于手术台上,颈部正中切口,在体视显微镜下暴露左侧颈总动脉(CCA)、颈内动脉(ICA)、颈外动脉(ECA)分叉处,小心分离迷走神经,先结扎 ECA,再结扎 CCA 近心端。在 CCA 壁上剪一直径约 0.3 mm 的小口,插入直径为 0.165 mm 的尼龙鱼线,线插入端前部预先在靠近火焰处加热成直径约为 0.25 mm 的球形,在 4 倍显微镜下观察呈光滑曲面,临用前将尼龙鱼线在肝素中浸泡 10 min。插入的尼龙鱼线沿颈总动脉、颈内动脉缓慢顺行插入大脑中动脉处,插入深度约为 17~21 mm。从阻断血流开始计时,于手术后 1.5 h 将插线拔出,恢复血流再通。假手术组线栓插入深度为 9~11 mm,1.5 h 后拔退至 CCA。术中用白炽灯加热,维持大鼠肛温(37 ± 0.5)℃。

3. 治疗方法:若手术大鼠于 1.5 h 后苏醒,提尾悬空时左前肢内收屈曲,爬行时向右侧划圈即表示模型制作成功可入选本实验。磁疗组于缺血再灌注时立即将其置于磁疗机(4 片直径为 10 cm,厚度为 1 cm 的半圆形钕铁硼磁片异名极放置于近椭圆形的铁片两侧)中,大鼠头颈部中心距两侧磁极各 2 cm,磁力线垂直通过大鼠的长轴方向,磁感应强度为 40 mT,持续作用 30 min,每天 1 次,共 7 d。对照组和模型组不作暴磁处理。

4. 血液流变学指标检测:3 组大鼠均于手术 7 d 后在乙醚浅麻醉下眼眶取血 3~5 ml,肝素抗凝,测全血高切粘度、全血低切粘度、血浆粘度,其中红细胞压积、纤维蛋白原含量用温氏(Wintrobe)血沉管测定。

5. 红细胞膜流动性检测:用一步低渗溶血法提取红细胞膜,DPH 荧光标记,于 $E_x = 362$ nm, $E_m = 432$ nm 时测量荧光偏振度 P ,求得微粘度 η ,各向异性指数 r , $\eta = 2p/(0.46 - p)$, $r = 2p/(3 - p)$, P 值越大,膜流动性越小。

6. 脑组织匀浆制备:3 组大鼠于眼眶取血后,迅速将其断头处死,在冰浴中取脑,切取颞区皮层及皮层下组织共 0.2 g,平均分成 2 份,每份加 9 倍预冷的生理盐水,在 4℃ 条件下制成 10% 的脑匀浆液。一份以 1 000 rpm 离心 5 min,另一份以 3 500 rpm 离心 10 min。

三、统计学分析

实验数据用($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验进行统计学分析。

结 果

一、各组大鼠血液流变学指标变化的比较

模型组与假手术组比较,全血高切粘度、全血低切粘度、纤维蛋白原含量、红细胞压积均有显著升高($P < 0.01$),血浆粘度虽有升高但差异无显著性意义。磁疗组经过恒磁场治疗后,上述各项指标均有所下降,差异均有极显著性($P < 0.01$)。具体数据见表 1。

二、各组大鼠红细胞膜流动性指标变化的比较

模型组与假手术组比较,荧光偏振度、平均微粘度、各向异性指数均有显著升高($P < 0.01$),磁疗组经过恒磁场治疗后,各项指标均有显著下降($P < 0.05$)。微粘度越高,红细胞膜流动性越差。具体数据见表 2。

三、各组大鼠血清 GSH-PX 及 CP 含量变化的比较

模型组大鼠血清 GSH-PX 及 CP 含量均显著低于假手术组,差异有显著性意义(P 均 < 0.05),磁疗组经过磁场治疗后,上述指标均有所升高,与模型组比较,差异有极显著性意义($P < 0.01$),并略高于假手术组。具体数据见表 3。

四、各组大鼠脑组织 SOD、MDA、及 T-AO 含量变化的比较

模型组大鼠 CuZn-SOD、MDA 含量高于假手术组, T-AO 含量低于假手术组,差异均有显著性,磁疗组经过磁场治疗后,MDA 含量显著下降, T-SOD、CuZn-SOD、T-AO 水平显著升高,差异均有显著性。具体数据见表 4。

五、各组大鼠脑组织 NO、NOS 含量变化的比较

模型组大鼠脑组织中 NO、NOS 含量显著高于假手术组(P 均 < 0.01),磁疗组经过磁场治疗后,NO、NOS 水平显著下降(P 均 < 0.01)。具体数据见表 5。

表 1 各组大鼠血液流变学指标的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	全血高切粘度(cp)	全血低切粘度(cp)	血浆粘度(cp)	红细胞压积(%)	纤维蛋白原含量(g·L ⁻¹)
假手术组(n=10)	6.1996 ± 0.9933	7.9632 ± 1.4885	1.7625 ± 0.0993	45.2800 ± 2.6415	4.3200 ± 0.9682
模型组(n=10)	8.4331 ± 1.3152 *	10.4911 ± 1.5594 *	1.8210 ± 0.0926	52.5900 ± 3.6202 *	7.7333 ± 0.9925 *
磁疗组(n=10)	5.7993 ± 0.9002 [#]	8.1175 ± 1.6622 [#]	1.6832 ± 0.0763 [#]	45.0000 ± 2.7921 [#]	5.0500 ± 1.3898 [#]

注:模型组与假手术组比较,* $P < 0.01$;磁疗组与模型组比较,[#] $P < 0.01$

表 2 各组大鼠红细胞膜流动性指标的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	荧光偏振度(p)	平均微粘度(η)	各向异性(r)
假手术组(n=10)	0.2080 ± 0.0072	1.6541 ± 0.1060	0.1494 ± 0.0058
模型组(n=10)	0.2213 ± 0.0057 *	1.8560 ± 0.0922 *	0.1593 ± 0.0044 *
磁疗组(n=10)	0.2103 ± 0.1020 [#]	1.6912 ± 0.1696 [#]	0.1508 ± 0.0092 [#]

注:模型组与假手术组比较,* $P < 0.01$;磁疗组与模型组比较,[#] $P < 0.05$

表 3 各组大鼠血清 GSH-PX 及 CP 含量的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	GSH-PX(U)	CP(U·L ⁻¹)
假手术组(n=10)	311.83 ± 36.81	570.44 ± 59.77
模型组(n=10)	283.71 ± 25.28 *	492.52 ± 69.92 *
磁疗组(n=10)	334.61 ± 14.88 [#]	586.99 ± 67.69 [#]

注:模型组与假手术组比较,* $P < 0.05$;磁疗组与模型组比较,[#] $P < 0.01$

表 4 各组大鼠脑组织 SOD、MDA 及 T-AO 含量的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	T-SOD (U·mg ⁻¹ ·prot ⁻¹)	CuZn-SOD (U·mg ⁻¹ ·prot ⁻¹)	Mn-SOD (U·mg ⁻¹ ·prot ⁻¹)	MDA (nmol·mg ⁻¹ ·prot ⁻¹)	T-AO (U·mg ⁻¹ ·prot ⁻¹)
假手术组(n=10)	227.25 ± 20.97	152.07 ± 23.88	75.18 ± 23.97	5.2029 ± 1.0823	1.2075 ± 0.1214
模型组(n=10)	240.29 ± 15.31	188.66 ± 37.39 *	51.64 ± 34.99	12.1480 ± 1.9809 **	0.8428 ± 0.1831 **
磁疗组(n=10)	299.79 ± 38.11 [#]	225.80 ± 27.22 [#]	73.99 ± 30.05	9.8527 ± 1.0746 [#]	1.3727 ± 0.3302 [#]

注:模型组与假手术组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;磁疗组与模型组比较,[#] $P < 0.05$,[#] $P < 0.01$

表 5 各组大鼠脑组织 NO、NOS 含量的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	NO (μmol·g ⁻¹ ·prot ⁻¹)	NOS (U·mg ⁻¹ ·prot ⁻¹)
假手术组(n=10)	2.1712 ± 0.5239	0.7796 ± 0.1486
模型组(n=10)	3.2542 ± 0.6217 *	1.5936 ± 0.4146 *
磁疗组(n=10)	2.0722 ± 0.6200 [#]	0.8487 ± 0.2256 [#]

注:模型组与假手术组比较,* $P < 0.01$;磁疗组与模型组比较,[#] $P < 0.01$

讨 论

一、血液流变学方面

本实验结果显示,大鼠脑缺血再灌注后全血高切粘度、全血低切粘度、纤维蛋白原含量、红细胞压积、血浆粘度均有所升高,说明此时血液处于高凝高聚集状态,影响了受损脑组织的血液灌注;经过恒磁场治疗后,上述指标均显著下降,这充分说明了恒磁场能有效阻断血液流变异常的恶性循环,减轻脑部微循环障碍,对防止病情的进一步发展起到重要作用。其作用机制可能是:①磁场通过降低血浆纤维蛋白原含量,减弱其对红细胞的桥联作用;②磁场作用加快红细胞的电泳速度,增大表面电荷密度,使细胞之间的相互排斥性增加,促进红细胞聚集解体;③磁场通过降低红细胞压积,减少了 ADP 的释放,进而减少了血栓的形成;④磁场通过提高 SOD 活力,降低自由基含量,调节 TXA₂/PGI₂ 比值,降低血液粘度;⑤磁场通过核磁共振和电子自旋共振效应加速脂类分解,从而降低血液粘度^[2]。

二、红细胞膜流动性

生物膜的流动性是生物膜的重要特征之一,它对于维持细胞膜的生理功能有重要意义。本实验结果显示脑缺血再灌注后红细胞膜微粘度升高,经过恒磁场治疗后微粘度降低。由此可见脑缺血再灌注后红细胞膜流动性显著下降,经恒磁场作用可增加红细胞膜流动性,改善微循环,对再灌注后损伤起到一定保护作用。其原因可能是脑缺血再灌注后产生大量自由基,使脂质过氧化与抗过氧化平衡机制失调,引起红细胞脂质过氧化作用增强,导致膜流动性下降。经过磁场治疗后,血液及脑组织中自由基含量显著减少,其对细胞膜中多种不饱和脂肪酸的攻击力减弱,在一定程度上抑制了脂质过氧化作用,使含有不饱和脂酰链的磷脂成分增加,磷脂分子各向运动增强,膜流动性增加。

三、抗氧化酶及抗氧化剂

大鼠脑缺血再灌注后,除了缺血本身对组织器官的直接损伤外,还可以引起更为严重的缺血再灌注损伤,其中尤以再灌注后组织细胞内黄嘌呤氧化酶过程,以及浸润于病灶局部被激活的多形核白细胞所介导的吞噬作用和呼吸爆发所产生的大量自由基为甚,它们在组织细胞的过氧化损伤中起重要作用。

正常机体存在抗氧化防御体系,它包括酶和非酶类,抗氧化酶包括 SOD、GSH-PX、过氧化氢酶(CAT)等;抗氧化剂主要包括维生素、氨基酸、金属蛋白质等。抗氧化作用主要通过清除自由基和活性氧,阻止脂质过氧化作用的发生,分解过氧化物,阻断过氧化链及去

除具有催化作用的金属离子。T-AO 是上述作用的综合体现。

脑组织由于自身特点容易受到自由基攻击,加之脑缺血再灌注后产生大量自由基,加重了对神经组织的损伤。本研究结果显示,经恒磁场作用能显著提高 SOD、CuZn-SOD、GSH-PX 及 CP 的活性,大大降低 MDA 的含量,总体表现为 T-AO 提高,这一切都能有效阻止自由基对脑组织损伤的病理生理过程,充分发挥恒磁场的脑保护作用,其具体机制可能与以下方面有关:①SOD 含有 Cu、Zn、Fe、Mn 等金属离子,GSH-PX 含有 Se,铜蓝蛋白中含有 Cu,它们都是过渡元素,在 3 d 和 4 s 亚层都有未配对电子^[3]。根据 Keilman^[4]理论,磁场能够影响电子自旋状态,造成不同电子自旋态的非热平衡分布,从而影响上述抗氧化酶和抗氧化剂的活性,进而间接影响自由基反应;②自由基本身也是顺磁性物质,具有自旋磁矩,会受到磁场的吸引^[5],因此磁场能直接作用于自由基,在磁场对运动电荷的洛仑兹力及磁场对运动电荷的转动转矩作用下,影响自由基参与生理病理活动;③MDA 含量减少的原因^[6]可能是磁疗后 SOD 活性增加,其清除超氧阴离子自由基的能力加强,大量减少了羟自由基的生成,进而导致 MDA 含量的减少;脂类过氧化的中间产物如烷自由基、烷氧基、烷过氧基等脂性自由基带有未抵消的电荷和磁矩,受磁场作用后它们的化学反应速度会改变,有可能参与了减少 MDA 的生成;铜蓝蛋白能抑制由无机铁引起的脂类自氧化,清除超氧阴离子自由基,磁疗后其活性增加也可能参与 MDA 含量的减少。

此外,本实验结果显示脑缺血再灌注后 T-SOD、CuZn-SOD 活性升高,受损脑组织 SOD 功能有所恢复,这可能是因为^[7]:①缺血首先导致胶质细胞产生细胞因子,然后诱导 Mn-SOD mRNA 的转录;②再灌注后,产生大量氧自由基,引起 MDA 蓄积,诱导局部组织 CuZn-SOD 合成,导致 T-SOD 增加,以实现机体的一种防御机制。

四、一氧化氮和一氧化氮合成酶

一氧化氮(nitric oxide, NO)既是一种可逆行弥散的神经介质或信使物质,又是一种自由基和细胞毒性物质,越来越多的研究表明,它可能参与了缺血性脑损伤的病理生理机制。

本实验结果显示,脑缺血再灌注后 NO 和 NOS 水平均显著升高,经过恒磁场作用后,两者含量显著下降,大大降低了 NO 对神经组织的细胞毒性作用,充分发挥其脑保护作用。其可能机制是:①NO 含量降低导致其所合成的过氧化亚硝酸盐含量减少,减弱了对细胞的氧化性损害作用;②NO 衍生物合成减少,充分抑

制了其所诱导的能量耗竭、DNA 损害、DNA 合成受阻以及细胞程序性死亡的进程^[8];③NO 水平降低使其通过兴奋性氨基酸所介导的生物膜中多不饱和脂肪酸(PUFAS)的脂质过氧化反应减弱,使对细胞膜完整性的损害减轻,延缓了细胞的死亡^[9]。此外,恒磁场使大鼠脑组织 NO、NOS 水平降低的可能机制是:①磁场作用后,组织内自由基含量显著减少,使细胞内钙离子含量显著减少,抑制了钙离子与钙调蛋白结合,使 cNOS 激活减弱,合成 NO 减弱;②磁场可减少炎症区白细胞的数量,控制细胞因子的产生,降低了对 iNOS 的诱导激活,使 NO 产生减少;③NO 是一种具有顺磁性的自由基气体。

综上所述,磁场通过改善大鼠血液流变学特性,增加红细胞膜流动性,提高机体抗氧化防御能力,降低自由基、丙二醛、一氧化氮及一氧化氮合成酶含量,有效地改善了脑部微循环,阻止了自由基对细胞的脂质过氧化损伤及一氧化氮对神经组织的细胞毒性作用,充分发挥了恒定磁场对脑缺血再灌注损伤的保护作用。但本文仅从上述几个方面探讨了 40 mT 磁疗的脑保护作用,至于其具体的作用机理以及其它强度、种类磁疗的效果如何,还有待于今后更进一步的研究。

参 考 文 献

- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 1989, 20: 84.
- 张鸿,宋明艳,王金春,等.血液磁极化疗法对急性脑梗死患者的血液流变学和运动功能恢复的影响. *现代康复*, 2001, 15: 41-42.
- 付研,李晓林,吕遐龄,等.恒定磁场对小鼠肝组织超氧化物歧化酶活力及过氧化脂质水平的影响. *中国医学物理学杂志*, 1998, 15: 144-145.
- Keilman F. Triplet-selective chemistry: a possible cause of biological microwave sensitivity. *Naturforsch*, 1986, 12: 795.
- 赵大源,付研,李红丽,等.磁场的穴位刺激对家兔自由基代谢的影响. *中国医学物理学杂志*, 2000, 17: 59-60.
- 闫秀英,韩丽莎,许志华,等.旋磁场对血清 SOD 活力铜蓝蛋白活性及 MDA 含量的影响. *中华物理医学杂志*, 1997, 19: 115-116.
- Matsuyama T, Shimizu S, Nakamura H, et al. Effects of superoxide dismutase on manganese superoxide dismutase gene expression in gerbil hippocampus after ischemia. *stroke*, 1999, 4: 1417-1424.
- Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, et al. Apoptosis and necrosis, two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad USA*, 1995, 92: 7162-7166.
- Montague PR, Gancayco CD, Winn MJ, et al. Role of NO production in NMDA receptor-mediated neurotransmitter release in cerebral cortex. *Science*, 1994, 263: 973-977.

(收稿日期:2002-09-02)

(本文编辑:易浩)