

· 论 著 ·

电磁辐射诱导乳鼠大脑皮层神经元凋亡的研究

赵梅兰 曹晓哲 王德文 刘杰

【摘 要】 目的 以体外原代培养的皮层神经元为对象,研究电磁脉冲(场强为 6×10^4 V/m)辐射后早期神经细胞死亡和凋亡的变化情况,并探讨电磁脉冲的可能致伤机制。方法 于照射后 1 h、6 h、12 h、24 h 和 48 h 分别采用 MTT 比色法和流式细胞术测定细胞活力和凋亡细胞的比例,用 HE 染色及 TUNEL 检测细胞凋亡并分别用普通光学显微镜和荧光显微镜进行凋亡观察。结果 电磁脉冲辐射后,神经细胞不仅发生快速的坏死,而且还发生细胞凋亡,于辐射作用后 12 h 达到高峰。结论 电磁脉冲辐射后早期可导致神经细胞凋亡和坏死,此改变可能与电磁脉冲致细胞 DNA 损伤有关。

【关键词】 电磁辐射; 神经细胞; 凋亡; 大脑皮层

The cortical neuron apoptosis induced by electromagnetic pulse in newborn Wistar rats ZHAO Meilan, CAO Xiaozhe, WANG Dewen, LIU Jie. Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

【Abstract】 Objective To observe the apoptosis and morphological changes of primary cultural cortical neurons exposed to electromagnetic pulses (EMP) and elucidate the possible mechanisms. Methods The cortical neurons of the newborn Wistar rats were prepared, cultivated in vitro, and then subjected to either of the two types of treatment: EMP for various periods of time or non-EMP. The MTT, flow cytometry and TUNEL methods were used to examine the activity and apoptosis of the neurons underwent EMP or non-EMP. Results It was shown that significant apoptosis and death of the neurons occurred immediately after EMP, as compared with that with non-EMP, and peaked at 12 hours of EMP. Conclusion EMP can promote necrosis and apoptosis of cortical neurons at the early stage, which may result from DNA injury induced by EMP.

【Key words】 Electromagnetic pulse; Cortex; Neurons; Apoptosis

随着电子技术的发展,电磁辐射(electromagnetic pulse, EMP)已成为人们十分关注的一种特殊污染,受其影响的人数逐年增加^[1,2]。研究表明,电磁脉冲可致全身性损害,而中枢神经系统最为敏感,可影响大鼠的学习记忆能力,还可引起神经元的坏死和凋亡^[3]。流行病学调查发现,EMP 对人体的健康影响比较广泛,可引起头昏、乏力、抑郁、失眠及记忆力减退等症状,长期调查还发现早年受 EMP 的人群中 Alzheimer 病(老年性痴呆)的患病率明显高于一般人群^[4,5]。但其病理机制尚未阐明。为此,本研究应用体外原代培养大鼠皮层神经细胞,通过电磁脉冲辐射,探讨电磁脉冲致神经细胞死亡的方式,为认识 EMP 对神经细胞损伤的机制以及防治提供理论依据。

材料和方法

一、材料

MTT、碘化丙啶(propidium iodide, PI)和 RNA 酶均为 Sigma 公司产品;DMEM、马血清及胎牛血清为

Gibco 公司产品;细胞凋亡检测试剂盒购自罗氏公司;6 孔及 96 孔板为 Costar 公司产品。用于生物学研究的 EMP 模拟源(有界波模拟源)是一个能产生类似于空中传播的电磁脉冲的装置,由高压脉冲发生源、引线极板、产生高压电场的平行终端设备组成,它可以产生一个横行传播的电磁脉冲。BIO-RAD Model 550 酶联免疫检测仪为日本 BIO-RAD 公司的产品, FACSCalibur 流式细胞仪是美国 B-D 公司的产品,CMIAS-II 真彩色图像分析仪是北京航空航天大学的产品。

二、方法

1. 大鼠皮层神经元离体培养:在无菌条件下,将新生(第 1 天)的 Wistar 乳鼠断头,小心分离取出大脑皮层组织,在冰浴 PBS 液中,将脑组织剪碎,加入 0.125% 的胰蛋白酶,保持 37℃ 消化 15 min;用种植液(DMEM 含 10% 马血清和 10% 胎牛血清)洗涤、离心,将消化后的细胞稀释成 1×10^6 /ml 浓度的细胞悬液;然后,以 6 ml/瓶和 100 μ l/孔的量,将细胞悬液分别种植到培养瓶和 96 孔培养板中(预先均用多聚赖氨酸包被处理),放入 CO₂ 培养箱中培养。24 h 后,将种植液全部吸出,加入等量的饲养液(DMEM 含 10% 马血清),最后,再将细胞放回 CO₂ 培养箱中,继续培养。等待 48 h,在培养液中分别

基金项目:军队总后勤部“九五”课题基金资助(No. 39770697)

作者单位:100850 北京,军事医学科学院放射医学研究所

加入细胞分裂抑制剂阿糖胞苷 120 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以抑制胶质细胞的过度增殖,作用 48 h 后更换新鲜培养液,以后每周换液 2 次,每次更换半量,共 2 周。

2. 细胞爬片的制备及电磁辐射:在接种培养瓶和 96 孔板的同时将 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 浓度的细胞悬液再分别接种至 6 孔板中(在每个孔中放置四片盖玻片并预先用多聚赖氨酸包被处理),在 37°C 、5% CO_2 下培养爬片,剩余培养过程同上,约 12 d 左右时将 6 孔板分为辐射组和对照组。辐射组放在辐射装置的上、下两平行极板之间,当高压脉冲启动时,即可对爬片进行实验。其实验参数为:场强 $6 \times 10^4 \text{ V}/\text{m}$,脉冲上升时间 20 ns,脉宽 30 μs ,频率包含 0 ~ 100 MHz^[6]。对爬片辐射 2 min,共计 5 个脉冲。在辐射后即刻、1 h、6 h、12 h、24 h、48 h 捞片,100% 丙酮固定,4 $^\circ\text{C}$ 保存待用。对照组不做任何处理。最后对爬片进行常规 HE 染色和 TUNEL 检测。每组各选 3 张爬片,用 CMIAS-II 图像分析仪在光镜 400 倍视野下,随机对每张爬片上 100 个细胞进行图像学参数 - 积分光密度(integrated optical density, IOD)测定。

3. 神经细胞活性的测定:采用 MTT 比色法,用双层铝箔纸上、下覆盖 1 ~ 6 列孔做对照组,其余 6 ~ 12 列孔为辐照组。辐照条件同上。辐照后即刻、1 h、6 h、12 h、24 h、48 h 分别取 1 个 96 孔板 MTT 染色,即向 96 孔培养板的每孔中加入 MTT 磷酸缓冲液(最终浓度为 0.5 mg/ml),继续培养 5 h 之后,培养液全部吸出,每孔中再加入 100 μl DMSO,振荡,使结晶充分溶解后,用 BIO-RAD Model 550 酶联免疫检测仪在 570 nm 波长下测量读取光密度。

4. 神经细胞凋亡的测定:采用流式细胞术。培养约 10 d 的培养瓶内细胞经电磁脉冲辐照后,继续培养并分别于 1 h、6 h、12 h、24 h 及 48 h 用 0.25% 胰酶消化细胞、离心洗涤,5% 小牛血清悬浮,调细胞浓度为 $10^5/\text{ml}$,70% 乙醇固定,RNA 酶 37°C 孵育 20 min;用 PI 作 DNA 染色,用 FACSCalibur 流式细胞仪进行测定,cellfit 软件收取细胞(每份样品收取 10 000 个细胞),并测定 DNA 含量并得出该细胞群体的 DNA 直方图,计算在 G1/G0 峰左侧出现的被称为亚二倍体(亚 G1 期)的百分数。

5. 脱氧核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(TdT d-utp nick end labeling, TUNEL)检测细胞凋亡:用 PBS(0.01 mol/L, pH 7.4)洗涤细胞爬片 3 min $\times$ 3 次,双蒸水洗涤 3 min $\times$ 3 次,0.3% 的过氧化氢甲醇封闭 30 min, PBS 洗涤 3 min $\times$ 3 次,0.1% Triton X100(用 0.1% 柠檬酸钠稀释)2 min(4 $^\circ\text{C}$),20 mg/L 蛋白酶 K 缓冲液消化 10 min,双蒸水洗涤 3 min $\times$ 3 次, PBS 洗涤 3 min $\times$ 2 次,滴加 TUNEL 反应液 50 nl,湿盒内 37°C 孵育 1 h, PBS 洗涤 3 min $\times$ 3 次,荧光显微镜观察。实验对

照:①TdT 对照—标记缓冲液中不加 TdT,其余同上;②Bio-dUTD 对照—标记缓冲液中不加 Bio-dUTD,其余同上;③检测系统对照—用 PBS 代替辣根过氧化物酶标记的抗荧光素抗体,其余不变。结果判定:在荧光显微镜下带有荧光的胞核,即表示细胞死亡。

三、统计学分析

采用 SPSS 8.0 统计软件进行统计学分析。

结 果

一、电磁脉冲对皮层神经细胞存活率的影响

大鼠大脑皮层神经细胞经电磁脉冲辐射后即刻、1 h、6 h 的 MTT 值明显低于对照组($P < 0.01$),其它时间组与对照组比较未见显著性差异($P > 0.05$)(图 1)。

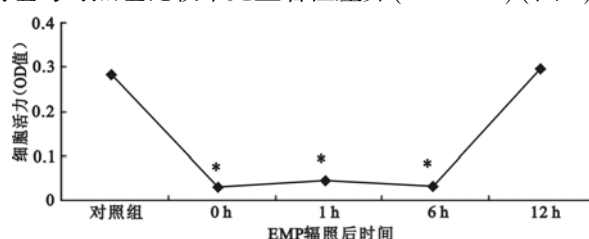


图1 EMP对神经细胞活性的影响
注: *与对照组比较, $P < 0.01$

二、EMP 辐射与原代培养神经元的形态学改变

培养达 8 d 时,细胞出现大量细丝状神经突起,突起神经交织成网。EMP 辐射后 6 h 的神经细胞损伤明显,部分细胞肿胀呈球状,视野中出现较多的细胞碎片,突起回缩、模糊并呈串珠状。HE 染色光镜下判断凋亡细胞的标准:散在单个细胞,整个胞体缩小并有核固缩或核碎裂,或形成凋亡小体。EMP 辐射后 6 h 即出现上述的改变。

三、电磁脉冲致皮层神经细胞凋亡

在所检测的各个时间点,EMP 诱导大脑皮层神经细胞发生凋亡不明显,辐射后 6 h 虽有凋亡增加,但统计学上无意义,图 2 为流式细胞仪检测的反映 EMP 作用后大脑皮层神经细胞凋亡的图形。

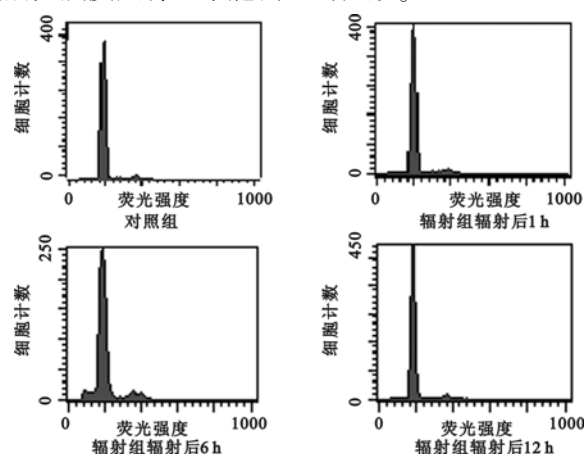


图2 电磁脉冲作用后皮层神经细胞凋亡直方图

四、TUNEL 检测结果

正常培养的大脑皮层神经细胞均有一定数量(约 14~15%)的凋亡细胞,EMP 辐射后 1 h 细胞凋亡率均已显著增加,其凋亡率高峰时间发生在大脑皮层神经

元被辐射后 24 h,辐射后 48 h 仍显著高于对照组。利用 DAB 显色,用随机记数四张片子各 100 个细胞中的具有凋亡细胞征象(胞核为棕黄色)的细胞数(%)来表示,结果见表 1、图 3。

表 1 EMP 辐射后不同时间神经细胞凋亡率的变化(%, $\bar{x} \pm s$)

部位	对照组	辐 照 组					
		即刻	1 h	6 h	12 h	24 h	48 h
皮层	13.75 $\pm$ 0.96	12.25 $\pm$ 0.96	16.50 $\pm$ 1.29 *	21.25 $\pm$ 1.50 **	19.50 $\pm$ 2.38 *	30.50 $\pm$ 1.29 **	28.25 $\pm$ 1.26 **

注:与对照组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

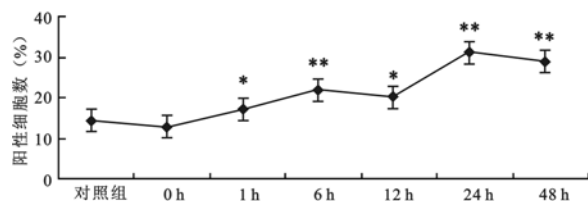


图 3 TUNEL 对 EMP 辐射后皮层神经元凋亡率
注:与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

讨 论

电磁脉冲是一种高功率非电离辐射,它包含的频谱非常宽,几乎覆盖了整个无线电频谱,可以严重干扰和破坏电子通讯等设备,现已成为人们关注的一种特殊污染。

王保义^[7]等研究指出,生物体在瞬态电磁脉冲作用下,可在细胞膜原有静息电位基础上产生一个跨膜电位,从而影响细胞的各种生物学特性。王长清^[8]等人用时域有限差分法和非均匀块状人体电磁模型研究了电磁脉冲对人体作用的规律,认为脉冲电磁波峰值很高,对人体的影响是不容忽视的。细胞凋亡是医学生物领域的研究热点之一。凋亡(Apoptosis)是一种受基因调节的细胞自主控制过程,细胞凋亡对多细胞生物个体发育、存活和各组织保持正常结构与功能有着积极而重要的意义^[9]。以往认为神经细胞是不易发生凋亡的细胞,许多病理过程发生的脑损伤也被认为只是细胞坏死。越来越多的证据表明,神经元凋亡在帕金森氏病和早老性痴呆等神经退行性疾病的发病机制中起关键作用,与脑缺血和脑损伤等中枢神经损害的病理过程也有关。Simko^[10]等人将人鳞状上皮癌细胞系(squamous cell carcinoma cell line, SCL II)和羊水细胞系(amniotic fluid cell line, AFC)暴露于极低频电磁场(ELF-EMF)中 24 h、48 h 和 72 h,发现 SCL II 细胞的微核形成率及细胞凋亡率在 48 h 组和 72 h 组明显增高,而 AFC 细胞变化不明显。这一结果说明,人类的不同细胞系对 EMF 的反应是不同的。本实验以体外原代培养的大鼠大脑皮层神经细胞为研究对象,对电磁脉冲致皮层神经细胞的存活率及细胞凋亡进行了观察。结果显示电磁脉冲可致皮层细胞坏死。从实验结果可知,神经元被 EMP 辐射后即刻的细胞活力就明显

下降并持续到辐射后 6 h,而在辐射后 12 h 时又明显恢复。这可能是残余的神经胶质细胞增殖所致。与此同时,电磁脉冲可引起神经元凋亡。从流式细胞检测结果可知,凋亡峰不明显,可能与检测的时间点过短有关,应检测到 24 h 或 48 h。而利用 TUNEL 则发现有明显的细胞凋亡,且持续到辐射后 48 h。对这样的实验结果还需进一步的深入研究。我们前期在对海马神经元的研究中则利用两种方法得到了比较一致的结果。凋亡是由细胞内源性基因控制的、有基因表达和蛋白质合成参与的死亡方式,凋亡的主要特征和诱因之一,是 DNA 链的断裂。TUNEL 凋亡检测试剂盒正是利用了凋亡的这一特征,标记断裂的 DNA 3'-OH 端,使凋亡细胞着色,这与 Nordenson^[11]等报道电磁辐射可引起 DNA 的损伤和染色体畸变,且在形态学上表现为微核的形成或细胞凋亡基本一致。此结果提示,如果控制凋亡相关基因,或者控制其相关大分子的合成,便可能达到控制凋亡的目的,这对实际中防治电磁脉冲引起的脑组织损伤无疑是一种新的尝试。至于控制凋亡的基因是否皆参与了电磁脉冲致脑损伤中凋亡的调节以及脑损伤中细胞凋亡发生的机制,尚需做进一步探讨。

参 考 文 献

- Freude G, Ullsperger P, Eggert S, et al. Microwaves emitted by cellular telephones affect human slow brain potentials. Eur J Appl Physiol, 2000, 81: 18-27.
- Repacholi MH. Low-level exposure to radiofrequency electromagnetic fields: health effects and research needs. Bioelectromagnetics, 1998, 19: 1-19.
- 赵梅兰, 马强, 曹晓哲, 等. 电磁脉冲对大鼠学习记忆能力和 LTP 的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2001, 23: 69-71.
- Malyapa RS, Ahern EW, Bi C, et al. DNA damage in rat brain cells after in vivo exposure to 2 450 MHz electromagnetic radiation and various methods of euthanasia. Radiat Res, 1998, 149: 637-645.
- Savitz DA, Loomis DP, Tse CK. Electrical occupations and neurodegenerative disease: analysis of U. S. mortality data. Arch Environ Health, 1998, 53: 71-74.
- 赵梅兰, 曹晓哲, 王德文, 等. 高场强电磁脉冲模拟器及其生物学研究. 国防科技大学学报, 2000, 22: 17-22.
- 王保义, 杨杰斌, 郭庆功, 等. 毫微秒电磁脉冲的生物效应实验研究和机理分析. 中国科学(C 辑), 1997, 27: 35-39.
- 王长清, 祝西里. 脉冲电磁波对人体作用的研究. 电子学报, 1994, 22: 83-87.

- 9 Bains JS, Shaw CA. Neurodegenerative disorders in humans; the role of glutathione in oxidative stress - mediated neuronal death. *Brain Res Rev*, 1997, 25:335-358.
- 10 Simko M, Kriehuber R, Weiss DG, et al. Effects of 50 Hz EMF exposure on micronucleus formation and apoptosis in transformed and non-transformed human cell lines. *Bioelectromagnetics*, 1998, 19:85-91.
- 11 Nordenson I, Mild KH, Andersson G, et al. Chromosomal aberrations in human amniotic cells after intermittent exposure to fifty hertz magnetic fields. *Bioelectromagnetics*, 1994, 15:293-301.

(收稿日期:2002-02-07)

(本文编辑:阮仕衡)

· 短篇报道 ·

腰椎间盘突出症术后早期康复训练

陈建国 张学会 张庆民

腰椎间盘突出症是常见病,手术治疗是其重要的治疗方法之一,但是术后愈合期会造成神经周围组织粘连,形成再压迫,同时术后需较长时间卧床,造成腰背肌废用性萎缩,远期出现下背痛、肢体麻木等症状并不少见。我们将术后早期体位康复训练作为一种治疗措施,取得显著效果,现总结如下。

观察对象为 1995 年 6 月~2001 年 6 月间有完整临床和随访资料的腰椎间盘突出症手术治疗患者 176 例,其中男性 103 例,女性 73 例,年龄 36~71 岁,平均 47.2 岁。随访时间为 6~18 个月。

术后康复训练开始时间为术后第 2 天拔除引流管之后,在医生或护士指导下进行被动和主动早期体位康复训练。训练之前针对体位康复训练后患者可能出现的伤口牵扯痛和腰腿酸胀等问题作充分的解释和心理辅导宣教,缓解患者的恐惧或紧张情绪。体位康复训练方法有:①双下肢(尤其术侧)直腿抬高训练;②术后第 3 天带腰围直腰行走,逐渐加量,以不劳累为度;③俯卧位多次数的腰背伸展运动。

评估标准参照 Fairbank 评分法:①腰部疼痛:剧烈疼痛,非吗啡类药物不能缓解为 6 分;重度疼痛,一般止痛药物可缓解为 4 分;中度疼痛,不须服用止痛药物可忍受为 2 分;正常为 0 分。②腰部压痛:重度压痛(轻度用力就出现疼痛,扣击痛阳性)为 6 分;中度压痛(轻度用力就出现疼痛,扣击痛阴性)为 4 分;轻度压痛(用力按压才出现疼痛,扣击痛阴性)为 2 分;正常为 0 分。疗效标准:痊愈—评分总和为 0 分;有效—评分总和≤4 分;无效—评分总和>4 分。

经上述训练后,痊愈 169 例(96.02%),其中男性 103 例(100%),女性 66 例(90.41%)例;有效 7 例(全部为女性)。

讨论 ①早期体位康复训练的必要性:腰椎手术在解除病痛的同时,可造成椎管内静脉丛和骨创面的渗血,压迫刺激神经组织,加之术后愈合期会在神经根周围形成无菌性粘连,限制神经根活动,临床上出现患肢活动受限、肢体麻木、酸痛不适,同时手术对脊柱后柱的破坏、椎旁肌的剥离溶导致医源性腰椎失稳的出现,为此一般要求术后较长时间卧床(3~4 周)。但是有研究表明,卧床两周静养肌蛋白合成会减少 50%^[1],并且安静卧床可造成骨质丢失,有报道称椎板切除后远期下腰痛发生率高达 30%^[2]。早期体位康复训练对防止神经根周围形成无菌性粘连和腰背肌废用性萎缩有一定作用。从而达到提高手术疗效,确实为患者解除病痛的作用。②理论

基础:下肢直腿抬高运动可以对坐骨神经造成反复牵拉,使坐骨神经在被拉长的同时在椎管内发生位置改变,因此,一方面扩大坐骨神经在椎管内的活动空间,减轻血肿机化后疤痕组织的压迫,另一方面可促进神经周围血液循环,减轻炎症反应,从而防止坐骨神经粘连。在腰背肌后伸康复训练中,要求俯卧位。俯卧位时腰椎间盘突出压力最低,并且椎管位于上位,可以防止康复训练中因椎间盘内压增高而造成腰椎间盘突出复发。③体位康复训练要点:术后拔除引流管后开始进行下肢直腿抬高康复训练,要求抬高角度达 70°以上。第 1 次完成有困难时,医生或护士一面固定骨盆,一面将下肢直腿抬高至 70°以上,以后由患者自行完成,每日作 150~300 次。术后第 3 天带腰围直腰徒步行走或扶车行走,逐渐加量,以不劳累为度。禁止弯腰、负重。术后 1 周开始俯卧位腰背伸运动,每日作 150~300 次。我们强调次数而不是幅度,因生物力学研究显示高频率短暂重复的等长肌肉收缩练习是提高肌肉耐力的最佳方式^[3]。俯卧位练习法:第一步:患者俯卧位于床上,双上肢向后伸,抬头挺胸,使头、胸及上肢离开床面。第二步:双腿伸直向上抬起,离开床面,可交替进行抬起,然后同时后伸抬高。第三步:患者头、颈、胸及双下肢同时抬起,双上肢后伸,仅使腹部着床,身体呈弓形。开展体位康复训练前的健康教育也是康复治疗的关键^[4]。早期体位康复训练普遍出现伤口疼痛、坐骨神经牵拉痛、小腿酸痛不适等,尤其以第 1 次为甚,约训练 3~4 次后可缓解。让患者了解此过程则易被其接受并主动进行康复训练。

总之,观察表明术后早期康复训练对防止坐骨神经粘连,促进神经功能恢复,预防腰背肌废用性萎缩,避免出现下背痛、肢体麻木等具有良好效果,应作为腰椎间盘突出症术后的常规康复手段。

参 考 文 献

- 1 孙燕. 运动对骨骼肌代谢的影响. *现代康复*, 2001, 5:8.
- 2 Fox MN, Onofrio BM, Hanssen AD, et al. Clinical outcome and radiological instability following decompressive lumbar laminectomy for degenerative spinal stenosis: A comparison of patients undergoing concomitant arthrodesis versus decompression alone. *Neurosurg*, 1996, 85:793-802.
- 3 乔志恒. 新编物理治疗学. 北京:华夏出版社, 1994. 48-59.
- 4 Bendix AF, Bendix T, Ostensfeld S, et al. Active treatment program for patients with low back pain. *Eur spine*, 1995, 4:148-152.

(收稿日期:2002-07-22)

(本文编辑:郭正成)

作者单位:063000 唐山,河北省唐山市中医医院(陈建国、张学会);华北石油总医院(张庆民)