

中等强度旋转恒磁场亚慢性连续照射对大鼠大脑氧化还原和组织病理的影响*

严鑫平¹ 杨刘柱² 吴波¹ 周潇齐¹ 许遵营¹ 陈仲^{1,3}

摘要

目的:探讨中等强度旋转恒磁场亚慢性连续照射对大鼠大脑组织氧化还原指标和组织病理的影响。

方法:将22只健康成年雄性Wistar大鼠(购于南方医科大学实验动物中心),体重(220—250)g,随机分成4组:空白对照组(n=5):正常饲养,不给予任何干预;不旋转组(n=5):分别将每只大鼠放置在一个长宽高分别为10cm、10cm、12cm的均匀分布着孔洞的塑料筐里,可以保证在实验时大鼠一直在磁场上方,塑料筐上盖有玻璃板,防止大鼠跳出,然后将大鼠放于磁场上方(0.49T),磁场不旋转,实验期间整只大鼠都暴露于磁场当中;低频旋转组(n=6):将大鼠放于旋转恒磁场上方(0.49T),旋转频率为3000rpm;高频旋转组(n=6):将大鼠放于旋转恒磁场上方(0.49T),旋转频率为6000rpm,每天3h,连续30d。实验结束后取大脑组织进行生化指标丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)、一氧化氮(NO)、髓过氧化物酶(MPO)检测和大脑组织HE染色。

结果:各组大鼠大脑组织的MDA、GSH、NO、MPO指标差异无显著性意义($P>0.05$),组织病理切片未见明显病变。

结论:中等强度旋转恒磁场亚慢性连续照射对大鼠大脑组织无明显影响。

关键词 中等强度;旋转恒磁场;亚慢性连续照射;大脑

中图分类号:R454.1,R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2017)-06-0631-05

Effects of moderate intensity rotating permanent magnetic field on oxidative parameters and histopathology in subchronic continuous exposed rat brain/YAN Xinping, YANG Liuzhu, WU Bo, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2017, 32(6): 631—635

Abstract

Objective: To investigate the effects of subchronic continuous exposed to moderate intensity rotating magnetic field on oxidative parameters and histopathology in rat brain.

Method: Twenty-two male adult Wistar rats (purchased from the experimental animal center of Southern Medical University, weight 220—250g) were randomly divide into four groups: Control group (n=5): Raised in normal environment without treatment; No rotation group (n=5): each rat was placed in a 10cm×10cm×12cm plastic basket with uniformly distributed holes and covered with glass plate to prevent the jumping out of rats. Then the rats were placed above the magnetic field (0.49T) without rotation. Low frequency rotation group (n=6): Rats were placed above magnetic field (0.49T), rotation frequency was 3000rpm; High frequency rotation group (n=6): Rats were placed above magnetic field (0.49T), rotation frequency was 6000rpm. The experiment time was 3 hours per day for 30 consecutive days. At the end of experiment, took the brain tissue for MDA, GSH, NO, MPO detection and HE stain.

Result: The content of MDA, GSH, NO and MPO showed no significant difference ($P>0.05$) and histopathology showed no pathological changes between the 4 groups.

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2017.06.005

*基金项目:广东省科技计划项目(20130501c)

1 南方医科大学珠江医院骨科中心,广州,510280; 2 贺州市人民医院脊柱骨科; 3 通讯作者

作者简介:严鑫平,男,硕士,住院医师; 收稿日期:2016-03-06

Conclusion: Our study showed that subchronic continuous exposure to moderate intensity magnetic field had no effect on brain.

Author's address Department of Orthopedics, Southern Medical University Zhujiang Hospital, Guangzhou, 510280

Key word moderate intensity; rotating magnetic field; subchronic continuous exposure; brain

生物体和磁场间存在着密切的联系,磁疗已广泛运用于临床各种疾病的治疗。研究表明脉冲电磁场和极低频电磁场可以促进骨折和伤口的愈合,可以缓解疼痛及改善骨质疏松患者的运动功能等^[1-3],但由于其潜在的毒性作用,广泛的使用受到一定程度的限制。

近年来,恒磁场由于其设备容易操作、价格便宜、维修费用较低以及没有电磁辐射等优点越来越受到人们的重视,市场上已充斥着各式各样恒磁场理疗仪。已有研究表明旋转恒磁场可以增加骨质疏松大鼠的骨密度、增加骨强度和促进骨代谢^[4]。恒磁场还可以用于疼痛治疗^[5-6]。在物理学上,已知导线切割磁感线的时候,会产生感生电动势,电动势的方向遵守楞次定律。那么神经纤维既然也是导体,应该也遵守楞次定律,于是我们大胆地假设:当神经纤维切割磁感线时,如果产生的感生电动势的方向与神经冲动传导的方向相反,当感生电动势足够大时,可能阻断神经冲动的传导。本课题组前期研究表明旋转恒磁场切割大鼠脊髓可以即时提高大鼠的痛阈^[7]。这些研究为旋转恒磁场运用于临床治疗提供了有力的证据,但是对于其安全性的研究,目前尚未见有关文献报道。为此,我们设计了本实验。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组:将22只健康成年雄性Wistar大鼠,清洁级,购于南方医科大学实验动物中心,体重(220—250)g,随机分成4组:空白对照组(n=5):不给予任何干预;不旋转组(n=5):大鼠放于恒磁场上方(0.49T),不旋转;低频旋转组(n=6):将大鼠放于恒磁场上方(0.49T),3000r/min;高频旋转组(n=6):将大鼠放于恒磁场上方(0.49T),6000r/min。

1.1.2 旋转恒磁场设备:因钕铁硼磁铁日常使用广泛,容易获得,价钱便宜,而且其磁场强度较强,持久

稳定,于是我们选用钕铁硼磁铁,其磁场强度为0.49T。旋转恒磁场(自行设计,委托广州德奥模具机械厂加工)主要组成部分:①环形磁铁,为内外径分别为4.2cm和10cm,厚1cm的钕铁硼磁铁,内外面用纯铝板包被;②高速电动机:220V日立交流电机,功率90W;③变频器(康沃牌,变频范围:0—200Hz,购于广州南调机电设备有限公司),用于调节磁铁的旋转频率;④激光测速仪(DT-234B),用于测量磁铁的旋转频率;⑤钢铁底座:用于固定电动机。

1.1.3 有机玻璃罩:用厚度为1cm的透明有机玻璃制成长宽高分别为50cm、40cm、67cm的有机玻璃箱,上面有一中间均匀分布有7个直径为1cm的孔洞的盖子,实验时用于通气。在距离下面42cm处安装有一均匀分布着直径为1cm孔洞的有机玻璃板,用于放置实验动物,实验时用有机玻璃箱罩住旋转恒磁场,有机玻璃板距离磁场上方1cm。

1.2 实验方法

空白对照组:不进行任何处理;不旋转组:分别将每只大鼠放置在一个长宽高分别为10cm、10cm、12cm的均匀分布着孔洞的塑料筐里,可以保证在实验时大鼠一直在磁场上方,塑料筐上盖有玻璃板,防止大鼠跳出,然后将大鼠放于磁场上方,磁场不旋转,实验期间整只大鼠都暴露于磁场当中,每天3h,连续30天;低频旋转组和高频旋转组:在不旋转的基础上,磁场的旋转频率分别为3000r/min和6000r/min,每天3h,连续30d。所有动物均采用单笼饲养,室温维持在20—25℃,自然照明,自由饮水和摄食。实验期间大鼠暴露的环境温度控制在(23±2)℃范围内,环境湿度控制在(55±10)%,为避免日周期节律对实验结果的影响,实验时间均于上午8时—11时完成。

1.3 检测指标

因本课题组早期研究发现旋转恒磁场切割大鼠脊髓可以即时提高大鼠痛阈,而大脑和脊髓同属于中枢神经系统。众所周知,磁场暴露产生的过量的

氧自由基会引起脂质过氧化,尤其在大脑组织,因其含有大量的易被过氧化的脂肪酸,而容易受到氧自由基的攻击,于是我们选择大脑组织进行氧化还原指标检测和组织病理分析。实验结束后,过量戊巴比妥钠腹腔注射麻醉处死大鼠,立即取出大脑组织放入-80℃液氮中冷冻,取一半大脑组织进行丙二醛(malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)、一氧化氮(NO)、髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)检测,另一半大脑组织用于HE染色。

1.3.1 大脑组织MDA含量检测:取适量大脑组织,加入冰三氯乙酸,1g组织加入10ml 10%三氯乙酸,然后放置于组织匀浆器中进行匀浆处理。随后将组织匀浆放置于离心机中,3000r/min,离心10min,取上清液,按照MDA测试盒(南京建成生物工程研究所)说明书操作检测大脑组织中MDA含量。依次加入各种试剂后,旋涡混匀器混匀,试管口用保鲜薄膜扎紧,用针头刺一小孔,95℃沸水浴40min,取出后流水冷却,然后3500—4000r/min,离心10min。取上清液,用可见分光光度计(721上海菁华科技仪器有限公司),在532nm处,1cm光径,蒸馏水调零,测定各管吸光度值,计算出组织中MDA的含量。

1.3.2 大脑组织GSH含量检测:取适量大脑组织,加入冰三氯乙酸,1g组织加入10ml 10%三氯乙酸,然后放置于组织匀浆器中进行匀浆处理。随后将组织匀浆放置于离心机中,3000r/min,离心10min,取上清液,按照GSH试剂盒(南京建成生物工程研究所)操作说明书检测样本中GSH含量。取待测样本0.5ml,加入试剂一应用液2ml混匀,3500—4000r/min离心10min,取上清液1ml进行显色反应。依次加入各种试剂后,混匀,静置5min,用可见分光光度计(721上海菁华科技仪器有限公司)在420nm处,1cm光径,蒸馏水调零比色测定各管OD值,计算出组织中GSH的含量。

1.3.3 大脑组织中NO含量检测:取大脑组织与生理盐水按1g:9ml比例制成10%脑组织匀浆,随后将组织匀浆放置于离心机中,3000r/min,离心10min,取上清液,按照NO测试盒(南京建成生物工程研究所)说明书操作步骤依次加入各种试剂,混匀,室温下静置10min,用蒸馏水调零,使用可见分光光度计,在550nm处,0.5cm光径,测各管吸光度值,计算

出组织中的NO含量。

1.3.4 大脑组织中MPO含量检测:取大脑组织与生理盐水按1g:9ml比例制成10%脑组织匀浆,随后将组织匀浆放置于离心机中,3000r/min,离心10min,取上清液,按照MPO测试盒(南京建成生物工程研究所)说明书操作步骤依次加入各种试剂,混匀,60℃水浴10min,取出后立即用可见分光光度计,在460nm处,1cm光径,蒸馏水调零,测各管吸光度值,计算出组织中的MPO含量。

1.3.5 大脑组织HE染色:①脱水、浸蜡、石蜡包埋(步骤共11步):组织标本清洗,流水冲洗8h;冲洗完后,把标本放入70%乙醇中过夜;80%乙醇浸泡1h;90%乙醇浸泡1h;100%(A)乙醇浸泡1h;100%(B)乙醇浸泡1h;透明:丙酮溶液浸泡0.5h;透明:二甲苯A溶液浸泡0.5h;透明:二甲苯B溶液浸泡0.5h,至组织块呈现棕黄色或暗红色透明状即可;浸蜡:放入水浴机石蜡缸A、B、C各1h(60℃);包埋:把包埋块放在包埋模具中用包埋仪进行包埋。②切片:连续切片,厚度4μm。从每只大鼠的大脑组织标本切片中,随机选择1张切片进行组织病理学观察。清洁载玻片捞片,进行常规烤片。③HE染色(步骤共14步):脱蜡:将石蜡切片放入染色盒中,用二甲苯A、B各脱蜡10min,可适当延长脱蜡时间以使组织上的蜡完全脱掉为止;100%乙醇浸泡5min;95%乙醇浸泡5min;90%乙醇浸泡5min;85%乙醇浸泡5min;70%乙醇浸泡5min;蒸馏水洗涤2次,每次5min;苏木素染色5min;流水冲洗1min;在静水中放置5min;0.5%伊红染色1min;流水冲洗干净,把载玻片放在通风橱里晾干;封片:用中性树胶对晾干的组织切片进行封片;拍照及观察:在光学显微镜下观察组织切片并进行拍照。

1.4 统计学分析

应用SPSS 19.0软件包进行统计处理,计量资料先行正态性检验,服从正态分布的数据采用均数±标准差表示,方差齐性检验后,多组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

实验期间各组大鼠均未出现死亡。

2.1 大脑组织生化指标

各组大鼠大脑组织的MDA、GSH、NO、MPO指标差异均无显著性意义($P > 0.05$),说明中等强度旋转恒磁场亚慢性连续照射对大鼠大脑组织的氧化还原代谢无明显的影响。见表1。

2.2 大脑皮质组织病理结果比较

各组大鼠大脑皮质区细胞排列整齐,无明显病变。灰、白质细胞和间质未见水肿,未见明显血管周水肿、血管充血、出血等现象,脑膜或室管膜未见水

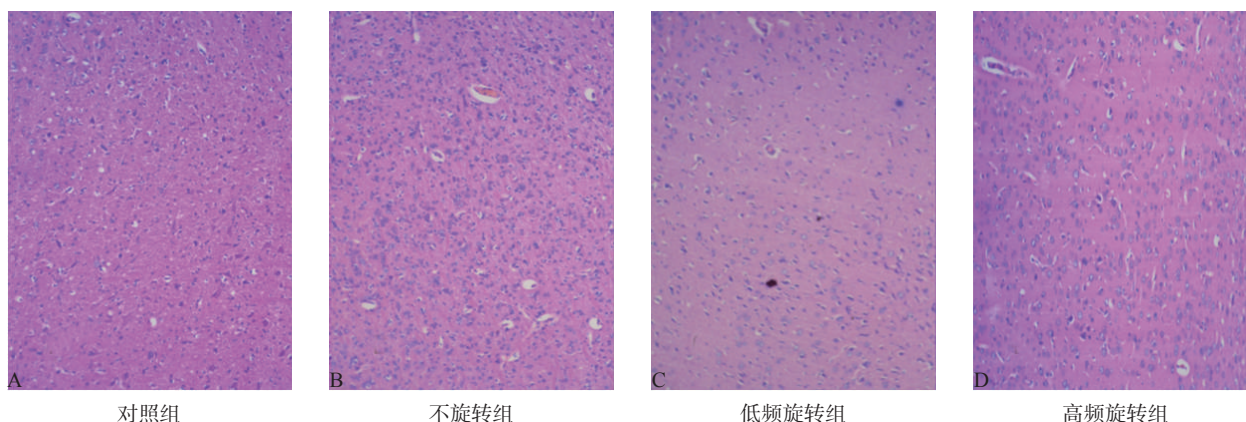
肿、充血、出血。说明中等强度旋转恒磁场亚慢性连续照射对大鼠皮质的组织病理无明显影响。见图1。

表1 各组大鼠大脑组织MDA、GSH、NO、MPO含量($\bar{x} \pm s$)

组别	MDA(nmol/ mgprot)	GSH(mgGSH/ gprot)	NO(μ mol/ gprot)	MPO(U/g组 织湿重)
空白对照组	13.64 $\pm$ 4.76	13.81 $\pm$ 2.11	27.09 $\pm$ 5.71	0.07 $\pm$ 0.03
不旋转组	19.63 $\pm$ 19.71	22.48 $\pm$ 15.09	56.18 $\pm$ 26.12	0.03 $\pm$ 0.02
低频旋转组	11.56 $\pm$ 5.28	20.13 $\pm$ 10.04	21.99 $\pm$ 18.13	0.06 $\pm$ 0.02
高频旋转组	13.96 $\pm$ 9.85	4.23 $\pm$ 4.58	35.51 $\pm$ 27.90	0.05 $\pm$ 0.02
F值	0.717	0.774	2.552	2.125

图1 大脑皮质的组织病理结构

(HE, $\times 100$)



3 讨论

大脑是机体的中枢神经系统,是机体最重要的调节系统。体内各系统和器官的功能活动都是在神经系统的直接或间接调控下完成的;通过神经调节,各系统和器官还能对内、外环境变化做出迅速而完善的适应性反应,调整其功能状态,满足当时生理活动的需要,以维持整个机体的正常生命活动。

细胞生化的改变起源于膜电位或者跨膜粒子转移的改变,这个改变会影响细胞的功能。磁场会影响邻近原子间的化学键,这样最终会导致细胞内自由基的产生^[8]。而最近的研究还发现,极低频磁场可以延长细胞内自由基的寿命^[9]。自由基包含活性氧和活性氮物质,这些物质会对细胞结构和分子造成损伤,比如会对细胞中的脂质、蛋白质和核酸等造成损害。尤其在生物膜,生物膜中富含不饱和脂肪酸,其容易遭受自由基的攻击^[10]。自由基与细胞膜上的不饱和脂肪酸反应会导致脂质氧化的过程,而MDA作为脂质氧化的最终产物,是一种高分子毒性物质,在组织中引起氧化损伤而导致组织出

现一系列的病理改变。当然,组织中也有对抗自由基的防御机制,这些物质包含维生素A、维生素C、维生素E、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、还原型GSH、谷胱氨肽过氧化物酶(GSH-Px)、MPO、过氧化氢酶(catalase, CAT)等其他抗氧化物质。而在大脑组织,因其含有大量的易被过氧化的脂肪酸,而容易受到氧自由基的攻击。

本实验的各组大鼠的大脑组织中GSH、NO、MDA、MPO的含量差异没有显著性意义($P > 0.05$),大脑皮质组织病理切片显示无明显病变,说明中等强度旋转恒磁场亚慢性连续照射对大鼠脑组织没有明显影响。Watanabe等^[11]的实验结果表明静磁场对大鼠的大脑组织的生化代谢没有明显影响,这与我们的实验数据具有一致性,他们是将大鼠分别暴露于4.7T的磁场3h、6h、24h、48h。Lee等^[12]的实验表明60Hz磁场暴露会导致大脑组织过氧化。而Coşkun等^[13]的实验是将几内亚猪持续暴露或者间断暴露于50Hz、1.5mT的磁场,4h/d或2h/次、2次/d,连续4d,结果表明各实验组的MDA含量都降低

了。国内有研究表明不均匀恒磁场可改善低压缺氧造成的大脑皮质神经元损伤,并具有一定的保护作用^[14]。而也有研究表明不同强度恒磁场对胎鼠大脑皮质神经元细胞代谢有一定抑制作用^[15]。研究结论不尽一致,猜测每个实验得出不同实验结果的原因是各个实验所用的磁场强度、频率和实验动物不同。

中等强度旋转恒磁场亚慢性连续照射对机体毒性方面的研究目前未见相关报道,本研究为首次报道。但是此次实验仅完成了旋转恒磁场长期连续照射对于大鼠大脑组织的毒性作用的研究,对于其他组织器官的毒性作用,尚需进一步研究。为了更全面地了解中等强度旋转恒磁场的生物学效应,以后还可以对旋转恒磁场的不同作用时间和不同旋转频率做进一步的研究,甚至还可以从遗传毒性方面做更深入的研究。旋转恒磁场对生物体的作用尚需大量的实验研究来进一步了解。

参考文献

- [1] Mert T, Ocal I, Cinar E, et al. Pain-relieving effects of pulsed magnetic fields in a rat model of carrageenan-induced hindpaw inflammation[J]. *Int J Radiat Biol*, 2014, 90(1):95—103.
- [2] 张维蛟,程杰平,郭永智,等.脉冲电磁场对家兔骨软骨骨折愈合的影响[J].*白求恩医科大学学报*,2001,(2):171—174.
- [3] 孙胜男.脉冲磁场治疗骨质疏松的效果研究[J].*中外健康文摘*, 2014,(7):142—143.
- [4] Zhang XY, Xue Y, Zhang Y. Effects of 0.4 T rotating magnetic field exposure on density, strength, calcium and metabolism of rat thigh bones[J]. *Bioelectromagnetics*, 2006, 27(1): 1—9.
- [5] 蔡华安,文体端,张大新,等.恒旋磁场治疗运动性损伤疼痛症的临床研究[J].*中国医师杂志*,2009,11(1):78—80.
- [6] 宋芳,李定忠.恒磁场治疗带状疱疹后遗神经痛疗效观察[J].*中华物理医学与康复杂志*,2010,32(2):160.
- [7] Chen Z, Ye H, Xu H, et al. Rotating magnets produce A prompt analgesia effect in rats[J]. *Progress In Electromagnetics Research*,2012,27:203—217.
- [8] Rollwitz J, Lupke M, Simkó M. Fifty-hertz magnetic fields induce free radical formation in mouse bone marrow-derived promonocytes and macrophages[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1674(3):231—238.
- [9] Lee BC, Johng HM, Lim JK, et al. Effects of extremely low frequency magnetic field on the antioxidant defense system in mouse brain: a chemiluminescence study[J]. *J Photochem Photobiol B*, 2004, 73(1—2):43—48.
- [10] Riley PA. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation[J]. *Int J Radiat Biol*, 1994, 65(1):27—33.
- [11] Watanabe Y, Nakagawa M, Miyakoshi Y. Enhancement of lipid peroxidation in the liver of mice exposed to magnetic fields[J]. *Ind Health*, 1997, 35(2):285—290.
- [12] Bc L, Ky B, Tj N, et al. 60 Hz magnetic field induces lipid peroxidative stress in cortex, midbrain and cerebellum of Mouse[Z]. Rhodes, Greece:2002820—825.
- [13] Coşkun S, Balabanlı B, Canseven A, et al. Effects of continuous and intermittent magnetic fields on oxidative parameters in vivo[J]. *Neurochem Res*, 2009, 34(2):238—243.
- [14] 黄晶波,郭宝军,沙建慧.不均匀恒磁场对小鼠急性低压缺氧大脑皮质神经元超微结构的影响[J].*第四军医大学吉林军医学院学报*,2002,24(4):190—191,196.
- [15] 张皓楠,王益民,孟庆楠,等.永磁磁场对胎鼠大脑皮质神经元细胞的影响[J].*生物医学工程与临床*,2011,15(2):107—110.