DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.24.031
第26卷第24期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 24
2004年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)24-2252-03

硒对微波辐照致PC12细胞损伤的保护作用

龚茜芬[1],杨学森[2],张广斌[2],韦富珍[1],余争平[2] (第三军医大学:[1]西南医院营养科,[2]预防医学院劳动卫生学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨硒对微波致神经细胞损伤的保护作用。方法 以离体培养的PC12细胞为研究对象,采用65 mW/cm^{2}的微波照射20 min进行致伤,以细胞存活率、MDA含量、SOD和GSH-Px活性为实验指标反映Na_2SeO_3预处理对微波辐照致PC12细胞损伤的影响。结果 微波辐照后PC12细胞存活率明显降低,MDA含量增加,SOD、GSH-Px活性降低,而经过Na_2SeO_3预处理后再接受微波辐照,以上指标的变化明显减轻,并且高剂量Na_2SeO_3预处理作用更明显。结论 硒可以提高PC12细胞的抗氧化能力,保护神经细胞对抗微波辐射导致的细胞损伤。

关键词:硒;微波;PC12细胞
中图法分类号:R329.2;R454.1;R977.5 文献标识码:A

Protective effect of selenium on damaged PC12 cells induced by microwave irradiation

GONG Qian-fen[1], YANG Xue-sen[2], ZHANG Guang-bin[2], WEI Fu-zhen[1], YU Zheng-ping[2] ([1]Department of Nutrition, Southwest Hospital, [2]Department of Labor Hygiene, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To observe the damaging effect of microwave on neurons and the protective effect of selenium on damaged neurons after exposure to microwave. **Methods** *In vitro* cultured PC12 cells were exposed to 65 mW/cm^2 microwave. The survival rate, SOD activity, GSH-Px activity, and MDA concentration of PC12 cells were detected. The effects of selenium on PC12 cells after exposure to microwave were reflected by these markers. **Results** Survival rate, activity of superoxide dismutase (SOD), and glutathione peroxidase (GSH-Px) activity of PC12 cells decreased, but malondialdehyde (MDA) concentration of PC12 cells increased after microwave radiation. These changes weakened when PC12 cells were exposed to microwave after pretreatment with selenium. This effect was more significant after pretreatment with selenium at the high dose. **Conclusion** PC12 cells can be damaged by microwave through peroxidation. Selenium pretreatment can promote the antioxidation and protect PC12 cells from damages induced by microwave.

Key word: selenium; microwave; PC12 cell

随着信息社会的到来,微波技术得到广泛的应用,由此产生的电磁辐射污染对人体健康的影响也日益受到人们关注,尤其是微波的神经生物效应更是关注的焦点。已有研究表明一定剂量的微波辐射具有明显的中枢神经损伤效应[1,2],并且这种损伤可能与微波辐照时的氧化应激有关[3],因此通过抗氧化可能对微波的神经损伤效应具有一定的防护作用。硒是人体内一种必需的微量元素,近年来研究表明它是机体内一种重要的抗氧化酶——谷胱甘肽过氧化物酶的重要组成部分,具有明确的抗氧化、增强机体免疫能力、延缓衰老等多种功能,并且最近的研究表明一定剂量的硒能够促进神经细胞生长、分化[4],因而本研究利用离体培养的PC12细胞模型,观察硒对微波辐照后PC12细胞的存活率、脂质过氧化作用的影响,并探讨硒对微波导致的神经细胞损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

PC12细胞株由中科院上海细胞所提供,1640培养基为GIBCO公司产品,MTT试剂(四甲基偶氮唑蓝)为Sigma公司产品,超氧化物歧化酶(SOD)、GSH-Px、丙二醛(MDA)试剂盒均为南京建成生物工程研究所产品,其余试剂为国产分析纯试剂。

CO_2培养箱(Harris,美国),倒置显微镜(Olympus,日本),HT-7000plus酶联仪(Perkin Elmer,美国),微波源(西安黄河厂)。

作者简介:龚茜芬(1965-),女,四川省南充市人,高级实验师,主要从事微量元素与人群健康等方面的研究。电话:(023)68754340
收稿日期:2004-02-25;修回日期:2004-09-06

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2 细胞培养

细胞5×10^5 个/ml 接种于96 孔培养板及6 孔培养板中，内含10%小牛血清的RPMI 1640 培养液，置于37 ℃，5% CO_2 培养箱中培养至 3 d，加入神经生长因子，使其终浓度为5×10^{-3} mmol/L，继续培养 2 d，选取生长状态良好细胞进行实验。

1.3 微波辐照

按实验要求分别取培养在细胞培养瓶和 96 孔培养板上生长良好的 PC12 细胞进行辐照处理，辐照时将培养瓶或培养板置于可透射微波的 37 ℃水浴专用辐照盒内，在 H、E 场强均匀分布的可旋转平台上接受功率密度为 65 mW/cm² 的微波照射 20 min。

1.4 MTT 法检测细胞活性

将 PC12 细胞接种于 96 孔培养板，培养 4 d 后分组处理，实验处理组分为亚硒酸钠预处理组及二甲基亚砜预处理组，分别在微波辐照前 24 h 向每孔培养细胞加入亚硒酸钠（Na_2SeO_3 终浓度 5 μmol/L）及二甲基亚砜（DMSO），并设定辐照后 0、3、12、24、48 h 5 个时相点，阴性对照组则是正常培养的 PC12 细胞不接受微波辐照，各实验组的每个时相点作 6 个平行孔，采用 MTT 法检测细胞存活率，按公式计算细胞存活率：细胞存活率（%）= *A* 值/对照组 *A* 值× 100%。

1.5 SOD、MDA 和 GSH-Px 的测定

将密度为5×10^5/ml 的细胞接种于 6 孔培养板中，细胞分对照组、亚硒酸钠预处理Ⅰ组（Na_2SeO_3 终浓度 1 μmol/L）、亚硒酸钠预处理Ⅱ组（Na_2SeO_3 终浓度 10 μmol/L）、二甲基亚砜预处理组，并于辐照后 24 h 取出细胞，胰酶消化收集各实验组细胞，并于光镜下计数。细胞悬液反复冻融 3 次，10 000 r/min 离心取上清，Lowry 法测定蛋白浓度，用黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 活力，硫代巴比妥法测定 MDA 含量，DTNB 法测定 GSH-Px 活性。

1.6 统计学分析

实验结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 Microsoft Excel 软件进行方差齐性检验和 *t* 检验。

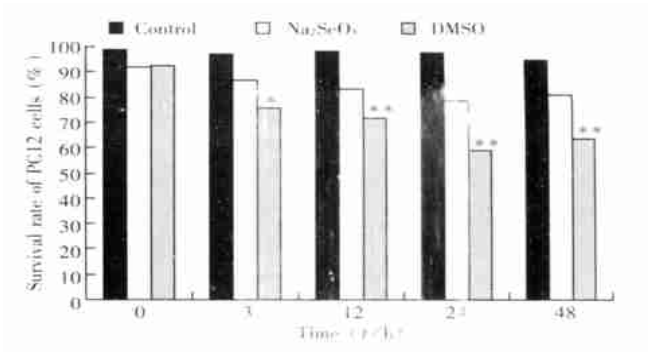
2 结果

2.1 微波辐照对细胞培养液温度的影响

微波辐照后即刻测定各组细胞培养液的温度，对照组培养液温度为（33.8±0.5）℃，Na_2SeO_3 预处理组培养液温度为（34.3±0.4）℃，DMSO 预处理组培养液温度为（34.7±0.3）℃，各组间无显著性差异（$P>0.05$）。

2.2 Na_2SeO_3 预处理后微波辐照对 PC12 细胞存活的影响

见图 1，对照组 PC12 细胞在各相应时相点的细胞存活率在 95%左右，表明细胞生长状态良好，并且在所观察时段内，细胞存活率未有明显变化。经 DMSO 预处理再接受微波辐照后即刻，细胞存活率有所降低但不明显，辐照后 3 h 细胞存活率明显降低，并且 48 h 内有随时间延长而进一步加剧的趋势。而经 Na_2SeO_3 预处理再接受微波辐照后细胞存活率也呈逐渐降低的趋势，但各时相点下降的幅度明显低于 DMSO 预处理组。



*：$P<0.05$　**：$P<0.01$，*vs* control

图 1　微波辐照后 PC12 细胞存活的变化

Fig 1　Changes of survival rate of PC12 cells after exposure to microwave

2.3 Na_2SeO_3 预处理后微波辐照对 PC12 细胞 SOD、GSH-Px 活性及 MDA 含量的影响

见表 1，与对照组正常生长细胞比较，经 DMSO 预处理的 PC12 细胞接受微波辐照后 SOD 及 GSH-Px 活性显著降低（$P<0.01$），分别下降 50.3%和 46.8%，而 MDA 明显增加（$P<0.01$），约为正常对照组 2 倍。经两种剂量 Na_2SeO_3 预处理后的 PC12 细胞接受微波辐照，SOD、GSH-Px 活性及 MDA 含量的变化与 DMSO 预处理组比较明显减轻（$P<0.05$），且 Na_2SeO_3 预处理Ⅱ组（终浓度 10 μmol/L）的作用更明显；与对照比较，而经 1 μmol/L Na_2SeO_3 预处理的细胞 SOD、GSH-Px 活性及 MDA 含量仍出现明显变化（$P<0.05$），经 10 μmol/L Na_2SeO_3 预处理的细胞 SOD、GSH-Px 活性变化没有统计学差异，MDA 含量明显升高（$P<0.05$）。

表 1　微波辐照后 PC12 细胞 SOD、GSH-Px 活性及 MDA 含量的变化（$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

Tab 1　Changes of SOD activity, GSH-Px activity, and MDA concentration of PC12 cells after microwave radiation（$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

Group	SOD (NU/mg)	GSH-Px (U/mg)	MDA (nmol/mg)
Control	86.82±9.93	134.63±13.85	6.97±1.91
DMSO Pretreatment	42.76±7.88[b]	71.45±14.16[b]	13.58±2.72[b]
Na_2SeO_3 PretreatmentⅠ	69.33±9.37[ad]	102.32±11.67[bc]	10.44±1.85[bc]
Na_2SeO_3 PretreatmentⅡ	74.41±10.52[d]	118.57±9.13[d]	8.38±2.18[ad]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，*vs* control；c：$P<0.05$，d：$P<0.01$，*vs* DMSO pretreatment

3 讨论

微波辐照可导致动物学习记忆等神经行为功能障碍，具有明显的中枢神经损伤效应[1,2]，通过本实验进一步证明微波辐照可直接致使神经细胞损伤，微波辐照后 3 h PC12 细胞开始出现明显死亡，随时间延长不断增加，并一直持续至 48 h。然而微波损伤神经细胞的具体机制目前并不是十分清楚。

已有研究表明，细胞内活性氧（reactive oxygen spe-

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

cies, ROS)与细胞的生理功能状态密切相关, 在外源性氧化剂刺激及细胞正常氧化代谢过程中都可产生 ROS, 但在活性氧清除系统, 如超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷光苷肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)等作用下, 保持动态平衡, 若 ROS 生成过多或未能及时清除, 致使细胞内 ROS 堆积, 这些活性基团可直接攻击核物质, 也可通过过氧化作用攻击膜性结构, 造成细胞损伤。丙二醛(malondialdehyde, MDA)是细胞内脂质过氧化反应的主要产物, 其含量反映了自由基水平及脂质过氧化水平, 因此也是细胞内氧化性损伤程度的标志。本实验结果显示, 微波辐照后 PC12 细胞 MDA 含量显著升高, SOD、GSH-Px 活性明显降低, 提示微波辐照后神经细胞脂质过氧化增强, 而 SOD 及 GSH-Px 清除氧自由基的作用减弱, 可能导致细胞内 ROS 堆积, 从而对 PC12 细胞产生损伤。

微量元素硒具有很多重要的生物学作用, 而近年来有关硒在中枢神经系统中的作用成为一个新的研究热点, 硒与学习记忆等中枢神经高级功能密切相关, 它不仅通过参与甲状腺素合成而影响神经系统发育, 还可直接影响神经细胞生长、分化[4,5], 并且, 由于硒能对抗自由基引发的脂质过氧化作用, 因此硒可能成为一种神经细胞保护剂[6]。文献[7~9]报道, 硒可对 H_2O_2 导致的体外培养的大鼠神经细胞的氧化损伤具有保护作用, 还可对抗大鼠胚胎神经细胞的老化反应等。本实验表明 PC12 细胞使用 Na_2SeO_3 预处理后再接受微波辐照, 细胞存活率明显高于未经 Na_2SeO_3 预处理的细胞, 说明硒对微波辐照导致的 PC12 细胞损伤具有一定保护作用; 进一步研究表明 Na_2SeO_3 预处理再接受微波辐照的 PC12 细胞, 它们的 SOD、GSH-Px 活性明显高于未经 Na_2SeO_3 预处理而接受微波辐照的细胞, 并且 MDA 含量也明显减少, 并且高剂量 Na_2SeO_3 的作用更明显, 结果提示硒可能提高 PC12 细胞的抗氧化能力, 保护细胞免受过量自由基的攻击和破坏, 从而对抗微波辐射导致的神经细胞损伤。因此硒在防护微波的中枢神经损伤效应上可能具有潜在的应用价值。

参考文献:

[1] Lai H, Horita A, Guy AW. Microwave irradiation affects radial-arm maze performance in rat[J]. Bioelectromagnetics, 1994, 15(2): 95-104.

[2] D'Andrea J A, Thomas A, Hatcher D J. Rhesus monkey behavior during exposure to highpeak-power 5.62-GHz microwave pluses[J]. Bioelectromagnetics, 1994, 15(2): 163-176.

[3] 谢　燕, 江海洪, 龚茜芬, 等. 微波辐照对大鼠脑海马和皮层神经细胞线粒体超微结构与 mtTFA mRNA 表达的影响[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2004, 22(2): 104-1073.

[4] 杨瑞华, 陈景元, 刘学东, 等. 微波对培养视网膜神经节细胞过氧化损伤的实验[J]. 第四军医大学学报, 2000, 20(9): S35-S36.

[5] 陈婉蓉, 鲁心安, 傅中滇, 等. 硒对大鼠胚胎神经细胞增殖和分化的影响[J]. 中国公共卫生, 2000, 16(11): 992-994.

[6] 刘德润, 高建国. 硒碘对鸡胚脑发育影响的研究-亚临床克汀病发病因素及防治方法研究之三[J]. 中国地方病学杂志, 1994, 13(3): 136-138.

[7] Kayanoki Y, Fujii J, Islam K N, *et al*. The protective role of glutathione peroxidase in apoptosis induced by reactive oxygen species[J]. J Biochem (Tokyo), 1996, 119(6): 817-822.

[8] 孔祥锋, 陈婉蓉, 倪　兵, 等. H_2O_2 对大鼠神经细胞的氧化损伤及硒的保护作用[J]. 卫生毒理学杂志, 2000, 14(2): 91-94.

[9] 高良才, 陈婉蓉, 邬雄飞, 等. 硒对大鼠胚胎神经细胞拟老化反应的影响[J]. 中国老年学杂志, 2002, 22(6): 503-504.

(编辑　张大春)

(上接 2247 页)

于抗生素很难到达脓腔内, 只能靠脓肿自行缓慢吸收, 故脓肿消散往往时间很长。②患者可出现不同程度的毒素吸收的症状, 如发热、消化道功能失调等。③脓肿压迫肠管, 可引起肠梗阻。④部分患者形成阑尾炎性包块最终仍需手术治疗。而一期手术可以有效的彻底消除病灶, 引流脓液, 缓解患者中毒症状, 同时去除脓肿壁形成的粘连, 减少肠梗阻的发生。只要操作得当, 加上术后联合应用抗生素, 并不增加手术并发症。故一期手术可缩短疗程, 降低治疗费用。总的来说利大于弊。

在施行一期手术治疗阑尾周围脓肿的过程中, 既要看到手术对阑尾周围脓肿治疗的安全性, 同时又要时刻警惕感染扩散、肠瘘、切口感染等并发症的发生。为此, 我们注意做到: ①采用右下腹经腹直肌切口, 切口大小适宜, 以保证良好的暴露。②切口采用全腹膜保护法覆盖保护, 减少切口污染。③开腹后不要急于分离脓肿壁, 先看清脓肿壁的解剖情况, 在形成脓肿壁的两种组织如网膜与肠管、网膜与腹膜等粘连间隙处用手指轻柔钝性分离, 进入脓腔, 充分吸净脓液, 再寻找阑尾。④松解被脓肿粘连的肠管, 切除失活及炎性浸润的大网膜组织。⑤阑尾残端尽量结扎包埋, 如果残端根部盲肠壁充血水肿明显, 不要强行缝荷包及"8"字缝合包埋, 可行阑尾根部结扎及周围腹膜、肠脂垂、肠系膜覆盖固定残端。如果阑尾根部坏疽、穿孔, 无法结扎, 可行全阑尾切除, 盲肠壁全层间断缝合及周围腹膜、肠脂垂、肠系膜覆盖固定。⑥1%双氧水冲洗脓腔及切口, 脓腔处放置橡胶引流管另戳孔引出。⑦必要时可在切口处另置橡皮片引流。手术人员缝合切口前要更换手套。⑧手术前后联合应用抗生素。

关键词: 阑尾; 脓肿; 一期手术
中图法分类号: R656.8　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 张铭琏. 阑尾脓肿的诊断与治疗[J]. 中国实用外科杂志, 1994, 14(5): 268-279.

[2] 吕德阳, 钱　礼. 阑尾周围脓肿的再手术时机[J]. 实用外科杂志, 1986, 6(11): 600-601.

[3] 刘金刚, 林立杰, 余　云, 等. 阑尾周围脓肿 508 例分析[J]. 实用外科杂志, 1994, 14(5): 292-293.

[4] 吴阶平, 裘法祖. 黄家驷外科学[M]. 第 6 版. 北京: 人民卫生出版社, 2000. 1147-1148.

(编辑　薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net