

高频电磁场暴露对胃粘膜急性损伤的 治疗效应及作用机制研究

丁立新 刘 莉 明旭昌 刘瑶娟

(西安第四军医大学唐都医院 陕西 西安 710038)

摘要 目的: 探讨高频电磁场暴露对大鼠胃粘膜急性损伤的治疗效应, 以及血管内皮素 1(endothelin-1, ET-1)、一氧化氮(nitric oxide, NO)及超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)在高频电磁场这一效应中的作用。方法: SD 大鼠胃粘膜急性损伤模型采用 indomethacin 灌胃法复制, 高频电磁场暴露的条件为频率 40.68MHz, 电流输出 30-50mA, 暴露 15min, 1/d, 对照组电磁场暴露条件相同, 但无电流输出, 观察电磁场暴露 1 或 6 次后大鼠胃粘膜损伤程度以及血浆 ET-1、NO 和 SOD 水平的变化。结果: 电磁场暴露 1 次后, 急性胃损伤大鼠胃粘膜损伤程度较对照组并无显著性差异($p > 0.05$), 血 ET-1 和 NO 水平均明显增高($p < 0.05$); 暴露 6 次后, 胃粘膜损伤程度较对照组明显改善($p < 0.05$), 但血 ET-1 和 NO 水平则与对照组无显著性差异($p > 0.05$), 血 SOD 水平在电磁场暴露 1 或 6 次后均无显著意义的变化($p > 0.05$)。结论: 40.68MHz 高频电磁场 30-50mA 暴露对大鼠胃粘膜急性损伤, 呈现出有效的治疗效应, 高频电磁场这一作用机制与 ET-1、NO 及 SOD 无关。

关键词: 高频电磁场; 大鼠; 胃粘膜损伤; 内皮素; 一氧化氮; 超氧化物歧化酶

中图分类号: Q64 文献标识码: A

Study on Therapeutic Effect and Mechanism of High-frequency Electromagnetic Fields on Acute Gastric Mucosal Injuries in Rats

DING Li-xin, LIU Li, MING Xu-chang, LIU Yao-juan

(Department of Physical Medicine, Tangdu Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi, China)

ABSTRACT Objective: To study the therapeutic effect of the exposure of high-frequency electromagnetic fields(HEMF) on acute gastric mucosal injuries in rats and to elucidate whether endothelin-1(ET-1), nitric oxide(NO) and superoxide dismutase(SOD) are involved in the therapeutic mechanism of HEMF. **Methods:** Immediately after the models of acute gastric mucosal injury in rats were made by gastric gavage of indomethacin, rats in experiment groups were exposed to 40.68MHz 7.3m HEMF (30-50mA) for 15 minutes 1/d while rats in control group were sham-exposed to HEMF with no electric current output. After exposure to HEMF once or six times, the degree of gastric injury (injury index and integral of pathological diagnosis), and the levels of ET-1, NO and SOD in plasma were measured. **Results:** Compared to control group after exposure to HEMF once, there was no significant change in the degree of gastric injury for the rats in experiment group (p both > 0.05), while the levels of plasma ET-1 and NO increased markedly (p both < 0.05); following exposure to HEMF for six times, the degree of gastric injury was improved in experiment group (p both < 0.05), with no marked difference in the levels of ET-1 and NO between experiment and control groups (p both > 0.05); there was no significant change in the level of plasma SOD after exposure either once or for six times (p both > 0.05). **Conclusion:** Exposure to 30-50mA, 40.68MHz HEMF 15 min for six times is an effective prescription for acute gastric mucosal injury in rats, and ET-1, NO and SOD are not involved in the therapeutic mechanism of HEMF.

Key words: High-frequency electromagnetic field; Rat; Acute gastric mucosal injury; Endothelin; Nitric oxide; Superoxide dismutase

胃炎症性疾病是常见病、多发病。有报道, 高频电磁场(high-frequency electromagnetic fields, HEMF)暴露能有效地治疗胃炎症性疾病^[1-3], 然而这一结论仅来自于临床观察结果, 仍缺乏相关动物实验研究。据文献^[6-8], 血管内皮素(endothelin, ET)、一氧化氮(nitric oxide, NO)及自由基成份等因素均参与了胃粘膜炎症损伤的发病机制。本文在复制大鼠胃粘膜急性损伤模型的基础上, 观察 HEMF 暴露后大鼠胃粘膜损伤程度, 以及 ET、NO 及自由基清除剂超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)的水平变化, 旨在探讨 HEMF 暴露对胃粘膜急性损伤的治疗效应及其作用机制。

1 材料与方法

实验选用健康 SD 大鼠, 共 60 只, 12-13 月龄, 体重 200-270g, 雌雄不限, 均由第四军医大学实验动物中心提供。完全随机化等分成 6 组: 空白组 I、对照组 I、实验组 I 和空白组 II、对照组 II、实验组 II。除两空白组以外, 两对照组和两实验组大鼠均施以 Indomethacin (安徽合肥制药厂生产), 25mg/kg 剂量一次灌胃, 以复制急性胃损伤模型^[9]。

Indomethacin 灌胃后, 实验组 I 大鼠即暴露于高频电磁场(high-frequency electromagnetic fields, HEMF)。HEMF 源于国产 CDL-I 型超短波治疗机, 频率为 40.68MHz, 波长 7.3m, 板状电极 15cm×20cm×2。HEMF 暴露时, 单只大鼠置于特制的 20cm×20cm×20cm 木盒中, 两电极板均垂直地面并作对置状分别固定在木盒两对立面壁上, 220V, 面板毫安表显示输出电流为 30~50mA (氛灯接触电极表面显示微热量), 治疗时间

作者简介: 丁立新, (1966-), 男, 副主任医师, 副教授
从事临床诊疗工作

(收稿日期: 2006-02-09 接受日期: 2006-04-26)

15min, 仅治疗 1 次。空白组 I 和对照组 I 两组大鼠也给予相同条件的 HEMF 暴露 1 次, 但均无电流输出。

实验组 II 大鼠在灌胃后也进行相同条件的 HEMF 暴露, 每日 1 次, 共暴露 6 次。空白组 II 和对照组 II 大鼠也接受同样条件暴露 6 次, 但均无电流输出。所有大鼠均统一饲养。在取血前 24h 开始禁食, 但饮水不禁。

HEMF 暴露结束后, 立即从受试大鼠颈动脉取血 5—6ml, 先注血 2ml 入含 30 ul EDTA—2Na(10%) 和 40ul 抑肽酶的试管中, 以测试内皮素 1(ET—1) 含量用, 另注血 3—4ml 入内含肝素抗凝剂的试管中, 用于测试 NO 和 SOD 含量用。所有血样本均 4℃、3000r/min 离心 10min, 血浆分离后—20℃置放待测。ET—1、NO 和 SOD 含量测定严格按试剂盒说明书操作。其中 ET—1 测试盒由北京东亚免疫技术研究所提供, NO 试剂盒由南方聚力生物有限公司供给, SOD 测试药盒由武汉大学提供。GC—1200r 放射免疫计数器由中国科学技术大学科技实业总公司中佳光电仪器公司生产。

表 1 HEMF 暴露 1 次后大鼠胃损伤程度及血浆 ET—1、NO 及 SOD 水平(x±s)

Table 1 The levels of plasma ET—1, NO and SOD and the degree of gastric injury in rats after exposure to HEMF once

组别	胃损伤指数	病理损伤积分	ET—1(pg/ml)	NO(μmol/L)	SOD(μmol/L)
空白组 I	/	/	80.5±18.75	190.9±26.68	11.3±2.67
对照组 I	39.35±8.78	15.74±4.07	136.0±23.77	112.7±18.02	4.5±0.85
实验组 I	38.11±10.67	15.97±3.07	164.2±20.94 [△]	143.2±15.30 [△]	4.7±1.89

[△]p<0.05 与对照组 I 比较, p<0.05 与空白组 I 比较
Compared with control group I, [△]p<0.05; Compared with vacancy group I, p<0.05

表 2 HEMF 暴露 6 次后大鼠胃损伤程度及血浆 ET—1、NO 及 SOD 水平(x±s)

Table 2 The levels of plasma ET—1, NO and SOD and the degree of gastric injury in rats after exposure to HEMF six times

组别	胃损伤指数	病理损伤积分	ET—1(pg/ml)	NO(μmol/L)	SOD(μmol/L)
空白组 II	/	/	86.4±8.96	193.3±24.57	10.2±2.15
对照组 II	28.98±6.49	11.80±3.58	100.4±13.62	135.7±23.82	9.0±1.15
实验组 II	15.58±5.49 [△]	6.70±1.80 [△]	97.6±22.82	132.9±17.85	9.1±1.73

[△]p<0.05 与对照组 II 比较, 与空白组 II 比较
Compared with control II, [△]p<0.05; Compared with vacancy group II.

HEMF 暴露 1 次后, 实验组 I 血浆 ET—1 水平较对照组 I 明显增高, 且两组水平均明显高于空白组 I (p<0.05); 实验组 I 血浆 NO 水平比对照组 I 显著增高, 但两组水平均明显低于空白组 I (p<0.05); 血浆 SOD 水平在实验组 I 与对照组 I 间无明显差异(p>0.05), 但两组水平均明显低于空白组 I (p<0.05)(表 1)。

HEMF 暴露 6 次后, 实验组 II 与对照组 II 血浆 ET—1 水平相差无统计意义, 两组水平虽略高于空白组 II, 但相差均无显著性(p<0.05); 血浆 NO 水平在实验组 II 与对照组 II 之间无显著差异(p>0.05), 但两组较空白组 II 均明显降低(p<0.05); 血浆 SOD 水平在实验组 II、对照组 II 和空白组 II 间不存在显著性差异(p>0.05)(表 2)。

3 讨论

在临床上胃炎症性疾病是一类常见病、多发病。虽有不少报道, HEMF 暴露能有效地治疗胃炎症性疾病^{1—3}, 然而这一结论仅来自于临床观察结果, 因而缺乏相关的动物实验研究证实, 此外, 对其作用机制的探讨也是十分必要。

胃炎症性疾病发病机制虽然比较复杂, 但研究认为, 在胃粘膜损伤的病理生理机制中, ET、NO 及组织内自由基等因素

取血后采用颈椎脱臼法处死大鼠, 解剖结扎胃幽门部位, 用 4% 福尔马林液 8ml 注入胃中, 再结扎胃贲门部, 取下整体胃。30min 后, 剪开胃大弯, 以 Guth 标准判定胃损伤指数; 同时取胃粘膜组织行常规石蜡切片, 以 Mascuda 标准进行胃损伤程度累计积分。

实验数据均采用 x±s 表示, 应用 X²、t 或 Oneway ANOVA 检验, p<0.05 定为差异有统计意义。

2 结果

6 组大鼠性别比及体重均无显著性差异(p 均>0.05)。空白组 I 和空白组 II 大鼠均未见胃粘膜出血性损伤; 对照组 I 和实验组 I 胃粘膜损伤严重, 损伤指数和病理损伤积分两组间均不存在显著性差异(p 均>0.05); 实验组 II 胃粘膜损伤指数及病理损伤积分均显著低于对照组 II (p 均<0.05)(表 1, 2)。

均不可忽视^{6—8}。ET 和 NO 均是由血管内皮细胞所产生的, 强效的血管活性介质。ET 主要通过其强效的缩血管效应, 降低胃粘膜的供血量, 减弱胃粘膜的保护作用; NO 却具有较强的扩张血管作用, 对胃粘膜则具有一定的保护效应; 氧自由基则直接造成胃粘膜细胞的损伤效应。SOD 是体内强有效的氧自由基酶类清除剂, 通过清除氧自由基而具有保护胃粘膜效应。

Indomethacin 是一种非甾体类抗炎药, 一定的剂量可引起胃粘膜炎症性损伤。本研究参照文献通过其灌胃来复制大鼠急性胃损伤模型。研究表明, 急性胃损伤时大鼠血浆中 ET—1 水平较正常大鼠明显升高, NO 和 SOD 水平则明显降低(表 1), 这一结果与文献^{9—11}报道相符, 也有力地验证了 ET—1、NO 及氧自由成份在胃炎性损伤发病机制中的作用。

急性胃损伤大鼠暴露于 HEMF 1 次(15min) 后, 胃粘膜炎症性损伤并无明显改善; 然而连续暴露于 HEMF 6 次, 对大鼠急性胃损伤具有显著的治疗效应。这一结果与临床观察相一致^{12—13}。虽然 1 次暴露, 急性胃损伤大鼠血浆 ET—1 和 NO 水平均明显增高, 但连续 6 次暴露后, 二者血浆水平却并无显著意义的改变, 血 SOD 水平也始终未显现明显意义的变化。

(下转第 21 页)

证明如果二级结构过于稳定 mRNA 常常会形成各种各样的二级结构如发夹结构,在能量较低的情况下,这些二级结构有时会通过形成假结(pseudoknot)结构,从而形成更为复杂的三级结构,从而影响到核糖体 RNA 对 TIR 区的重要位点如 SD 区的识别。翻译起始阶段,当核糖体 16S 亚基开始识别 SD 序列并结合到 mRNA 时必须先打开发夹之类的二级结构,这个过程与反应进行的自由能有关,翻译起始区标准自由能变化(ΔG^0)过低则二级结构很难打开,翻译会因此中止,实验证明,当 TIR 区不形成二级结构时翻译的效率是最高的^[2],即二级结构对翻译顺利进行影响甚大,二级结构越不稳定,翻译起始的效率也就越高,因此二级结构的自由能对翻译起始的影响不可小觑。Maarten H 的实验证明,TIR 区 ΔG^0 降低 1.4kcal/mol 将造成翻译起始效率降低 10%。而碱基 G 和 C 因为含有三个成氢键基团,相对于 A 和 U 成键其 ΔG^0 值大于 1.4kcal/mol^[2],所以适量减少 G+C 的含量可能会升高碱基序列的自由能,使 mRNA 二级结构不稳定,翻译因而得以更顺利的进行。

B. 密码子的偏好性。大多数氨基酸的密码子并不唯一,其对应 tRNA 的丰度亦有差别:采用偏好密码子的 mRNA 翻译速度要快于稀有密码子比例较高的 mRNA^[3]。偏好性可由下面网址查出 [http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=Escherichia+coli+\[ghbc\]](http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=Escherichia+coli+[ghbc])。DNASIS v2.5 软件计算结果虽有一定的误差,但对提高实验效率,缩小选择范围确实具有相当明显的指导意义。这一点在我们的其它实验中亦有体现。

hbFGF 在 E. coli 中表达是目前最常用的生产手段,但是非融合形式表达量很低,现在很少看到国内有超过 10% 的报导,基因在细胞中的表达很大程度上为翻译起始区(Translation Initiation Region, TIR)所决定,TIR 区域较高的 G+C 含量会形成较稳定的二级结构,阻碍转录和翻译的有效进行。关于 TIR 的范围尚无定论,Ganoza 等人认为开放性阅读框起始密码子上下游 70 个核苷酸的范围为 TIR 区域。我们统计了 bFGF 前 10 个和 20 个氨基酸编码序列中的 GC 含量分别高达 75% 和 78%,这样的基因结构显然对表达不利,必须进行适当调整,本研究将序列调整的重点放在 bFGF 蛋白 N 端前 20 个氨基酸的编码序列,前提是不改变蛋白质的编码序列,通过使用计算机软件的计算和筛选得到改造后的 G+C 含量降低为 55% 左右,并取得了较好的效果。

参考文献

- [1] 陈苏民, Court DL. 大肠杆菌中高表达重组 Em 可溶性蛋白的纯化及其生化特性[J]. 生物化学杂志, 1992, 8(1): 33—41
- [2] Zhang J, Cousens L S, Barr PJ, et al. Three-dimensional structure of human basic fibroblast growth factor, a structural homolog of interleukin 1 beta[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 3446—3450
- [3] Enkson A E, Cousens IS, Mathews BW. Refinement of the structure of human basic fibroblast growth factor at 1.6 Å resolution and analysis of presumed heparin binding sites by selenate analysis of presumed heparin binding sites by selenate substitution[J]. Protein Sci, 1993, 2: 1274—1284
- [4] 林剑, 许雁, 刘春宇. 碱性成纤维细胞生长因子[J]. 暨南大学学报(自然科学版), 1993, 14(1): 99—104

(上接第 23 页)

结果表明, 40.68MHz 的 HEMF30—50mA 暴露对大鼠胃粘膜急性损伤, 呈现出有效的治疗效应, HEMF 这一作用机制与 ET-1、NO 及 SOD 无关。如文献^[1, 2, 4, 5, 10], 其机制可能仍与 HEMF 作用下产生的电磁场振荡效应, 对植物神经的调节作用, 解除胃组织内血管痉挛, 从而增加局部供血量等有关。本研究中, 血 ET-1 及 NO 水平在 HEMF 暴露 1 和 6 次后不同变化这一现象, 仍有待于进一步探究。本研究结果可为临床 HEMF 治疗学提供一点有价值的参考资料。

参考文献

- [1] 郭万学. 理疗学. 北京: 人民卫生出版社, 1984: 217—234
- [2] 陈景藻. 现代物理治疗学. 北京: 人民军医出版社, 2001: 180—181
- [3] 张啸. 短波、超短波疗法对慢性胃炎的疗效观察. 中华理疗杂志, 1986, 8(4): 206—208
- [4] Macheret IeL, Korkushko OO, Chupryna HM. Using ultrahigh-frequency therapy in the treatment of chronic gastroduodenal ulcers. Lik-Sprava, 2001, 25(1): 74—6
- [5] Tsimneman IaS, Kochurova IA, Vladiminskii EV. Physiotherapeutic treatment of gastroduodenal ulcer. Klin Med Mosk, 2003, 81(7): 8—15

- [6] 丁立新. 磁场对血浆和胃粘膜内胃肠激素及胃动力效应的实验研究[J]. 生物磁学, 2006, 6(1): 34—36
- [7] 高健青. 胃病者血浆内皮素水平的临床意义. 江苏大学学报·医学版, 2003, 13(3): 217—218
- [8] 丁立新. 磁场对急性胃损伤的治疗效应及其机制的实验研究[J]. 生物磁学, 2006, 6(1): 50—52
- [9] 丁立新, 刘莉, 明旭昌, 等. 表皮生长因子和降钙素基因相关肽在电磁场治疗急性胃损伤中的作用研究[J]. 现代生物医学进展, 2006, 6(7): 22—23
- [10] 马高峰, 刘忠民, 何小飞, 等. 慢性胃炎患者血浆一氧化氮和内皮素水平的变化及意义. 中国冶金工业医学杂志, 1998, 15(1): 11—13
- [11] 李涛. 氧自由基与胃肠疾病研究进展. 国外医学·消化系疾病分册, 1997, 17(4): 204—207
- [12] Okada M, Niida H, Takeuchi K, et al. Role of prostaglandin deficiency in pathogenic mechanism of gastric lesions induced by indomethacin in rats. Dig Dis Sci, 1989, 34(2): 694—696
- [13] Mileva K, Georgieva B, Radicheva N. About the biological effects of high and extremely high frequency electromagnetic fields. Acta Physiol Pharmacol Bulg, 2003, 27(2—3): 89—100