

· 论 著 ·

不同宽频带强脉冲电磁场开放血脑屏障程度的量效关系和对脑部组织的损伤效应研究³

庞小峰, 李 滚, 陈 冀, 曾红娟, 邓 波

【摘要】 用不同宽频带强脉冲电磁场开放血脑屏障, 研究开放程度与外加电磁脉冲的场强、频率和暴露时间的量效关系和得出它们之间的变化规律曲线, 由血脑屏障开放所引起的脑组织和血脑屏障组织损伤、破坏等负面效应的程度。从这个量效关系得出, 新仪器开放血脑屏障的效果好于旧仪器, 对于新仪器来说, 场强为 100kV/m 或 75kV/m, 脉冲频率为 100 次/s 的脉冲场照射 20min 时最好。用红外光谱与荧光光谱仪测量血脑屏障组织额叶分子结构的改变情况时发现大鼠脑组织红外光谱与荧光光的峰值位置没有改变, 但峰值的强度发生了变化, 这表明制造的开放血脑屏障的脉冲电磁仪照射大脑组织的时, 并没有使分子的结构和构象发生变化。因此, 脉冲电磁场对大鼠脑部组织产生的损伤是非常小的。

【关键词】 脉冲电磁场; 血脑屏障; 大鼠; 脑部组; 损伤效应; 量效关系

【中图分类号】 R - 33

【文献标识码】 A

【文章编号】 1680 - 6115(2008)05 - 0385 - 06

A Relations of opening blood brain barrier with pulse electromagnetic field and its damaging effect on brain tissues

PANG Xiao - feng, LI Gun, CHEN Ji, et al. School of Life Science and Technology, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 610054, China

【Abstract】 The relationship of opening effects of blood brain barrier in rats with features of electromagnetic field was studied under action of a wide - band pulse electromagnetic field. The results showed that the opening effort for the pulse electromagnetic field with strength of 100KV/m or 75KV/m, pulse frequency of 100s - 1 and exposing time of 20 minutes was good. In the meanwhile, the damaging effect of brain tissues was measured and checked after the opening by using the Nexus 670FT - Irinfrared spectrometer and F700 fluorescence spectrometer. It was found that the infrared spectra of absorption and fluorescence spectra of these brain tissues had only increases of strengths of absorptions, but not the changes of frequencies and frequency shifts of absorbed peaks. Thus we can determine that the damaging effect of brain tissues is quite small after radiation.

【Key words】 Pulse electromagnetic field; blood brain barrier; rat; brain tissue; damaging effect; dose - effect relationship

如所知, 人和哺乳类动物等都有血脑屏障 (BBB) 组织, 所谓血脑屏障就是存在于血液和脑组织之间的一种结构, 它由一些脑毛细血管的内皮细胞与紧密连接组成的细胞层, 与包裹他们的外面连续基膜和附着于基膜上的星状形交织细胞形成的一层坚韧胶质薄膜突起组成的一种致密性结构。它能阻止生命系统中的一些水溶性物质如小分子的电解质进入脑组织, 仅允许脂溶性的物质通过血脑屏障

进入脑组织中。在其上存在的物质运输系统能使极性物质, 各种氨基酸分子和葡萄糖转运到大脑组织和其他中枢神经系统中, 供大脑组织和中枢神经系统的生命活动^[1~3]。同时它能阻止异物(微生物、毒素等)入侵而达到保护作用。但是, 一旦大脑组织出现一些疾病如脑肿瘤时, 由于血脑屏障的存在, 许多水溶性或分子量 > 500Da 的药物不能穿越 BBB 到达病灶, 或治疗部位的药物浓度远低于有效治疗浓度而不能充分发挥药效, 极大地阻碍了包括脑肿瘤在内的多种中枢神经系统 (CNS) 疾病, 如老年痴呆症、Huntington 舞蹈病、脑血管意外等的治疗。其

³ 基金项目: 国家“863”计划资助项目(编号: 2006AA02Z4C3)

作者单位: 610054 四川成都, 电子科技大学生命科学与技术学院

原因在于恶性的胶质细胞瘤由于分化不全且深入神经细胞深处,手术不可能全部切除,同时 95% 以上的治疗神经系统疾病药物难以通过血脑屏障到达残存瘤灶,故其复发率极高。在此情况下就需想办法开放血脑屏障,让药物能进入大脑,使疾病得到医治,便是现代医疗技术急需解决的一大难题。于是研究开放血脑屏障的方法和技术显得非常重要,一旦取得突破,无论从经济性、时效性、促进医疗事业发展等来说都是非常有意义的。

电磁辐射可引起 BBB 对药物的通透性增加。研究发现,体外血脑屏障模型经 1.8GHz GSM 微波辐照后,¹⁴C 标记的蔗糖通透性显著增加。动物实验也证实电磁辐射可引起 BBB 通透性的增加,如用 900MHz SAR = 7.5W/kg 的 GSM 微波辐照大鼠后 BBB 处血清蛋白外渗出现。1994 年 Salford 指出 915MHz 射频连续波和脉冲波均可引起动物 BBB 开放。Lin 等在微波辐照大鼠后立即给予抗肿瘤药物氨甲蝶呤(MTX),观察 MTX 进入脑组织的情况,发现在微波辐照后立即给药,可以明显增加脑组织对药物的摄入量,该作用在辐照后 45min 消失,表明微波致 BBB 的开放是可逆的。国内第四军医大学郭国帧等人采用一种前沿陡、脉冲短、频带宽、具有双指数波形特征的电磁脉冲开放了血脑屏障,但体温没有升高,并发现随着电磁脉冲场强和脉冲次数增加时,标志 BBB 通透性变化程度的伊文思蓝(EB)光斑面积显著增加并且呈现可逆性改变。从而使血脑屏障开放的技术得到了发展,将为脑肿瘤等脑部疾患的治疗提供一个崭新的方法。此后,邝芸^[4]等人建立了 EB 为示踪剂的方法。EB 是一种深蓝色粉末状浆料,其分子量为 961。在正常情况下,它不能穿过血脑屏障进入大脑组织。一旦血脑屏障开放,便可穿过它进入大脑组织中,迅速与血红蛋白结合。此反应的结果可成为检验血脑屏障开放的一种有效方法。李静^[5]等人研究了血脑屏障开放后对大脑功能的影响,发现可降低大鼠、小鼠的学习与记忆能力,影响大鼠脑外和脑内 5-HT,儿茶酚胺类神经递质的代谢。曲润江^[6]发现 50 次脉冲的 40kV/M 的电磁脉冲照射大鼠后,SCN 和 PG 中部分细胞的线粒体发生肿胀破裂,细胞膜与核膜结构模糊。丁桂荣^[7]发现 40kV/M 的脉冲可诱发大鼠海马的细

胞凋亡数增加。王琦等人^[8]发现电磁脉冲照射大鼠后,海马边缘区微结构的改变,溶酶体增多,线粒体肿胀。总之,研究工作做了不少。但是没有研究过血脑屏障开放与外加电磁脉冲的场强、频率和暴露时间的量效关系,这种开放所引起的脑组织和血脑屏障组织损伤、破坏等负面效应。这些问题直接关系到今后的临床运用,因此显得非常重要。本文就是利用已建立的类似的宽频电磁脉冲照射系统来系统全面研究这些问题,从而使开放血脑屏障达到实际和临床运用并奠定坚实的基础。

1 实验原理及方法

脉冲电磁场是由脉冲发生器产生的脉冲电流所产生的一种交变电磁场。利用脉冲发生器的可调性可产生特定频率、特定大小、特定长度的脉冲电流,从而产生特定的脉冲电磁场。在通常的实验都是将被试物置于两极板之间。我们这里采用新仪器和旧仪器天照射,以考察它们的效果,为今后的应用服务。新仪器是一个改进型,但它的效应没有被研究。

实验是首先调节所制作的脉冲电磁仪的频率和强度,将旧仪器强度调节到 50kV/m, 100kV/m, 200kV/m, 400kV/m, 脉冲次数都是 100 次/s, 新仪器强度调节到 50kV/m, 75kV/m, 100kV/m, 脉冲次数分别控制在 75 次/s 和 100 次/s。将 Wistar 大鼠分为实验组和对照组。实验组又分为 24 个组,对照组 1 组,共 25 组,每组 12 只大鼠。在旧仪器的条件下,将场强设为 50kV/m, 100kV/m, 200kV/m, 400kV/m, 对 144 只大鼠分别照射 10min、20min 和 30min。对新仪器,将场强 50kV/m, 75kV/m, 100kV/m, 脉冲次数分别控制在 75 次/s 和 100 次/s, 对 144 只大鼠分别照射 10min、20min 和 30min。其中实验组放在上述产生电磁脉冲的发生器中照射,而对照组则放在无电磁脉冲的环境中饲养。

在实验中,先用乙醚诱导大鼠昏睡,然后在 10% 水合氯醛麻醉(0.4ml/100g)下,由一侧股静脉注入 20% EB 大约 1ml,等大鼠完全清醒后将上述各实验组动物置入产生电磁脉冲的发生器中照射,照射的时间分别是 10min、20min 和 30min,照射后再麻醉大鼠,由左心室快速注入 400ml 的生理盐水,然后每只大鼠又灌注 4% 的多聚甲醛磷酸缓冲液

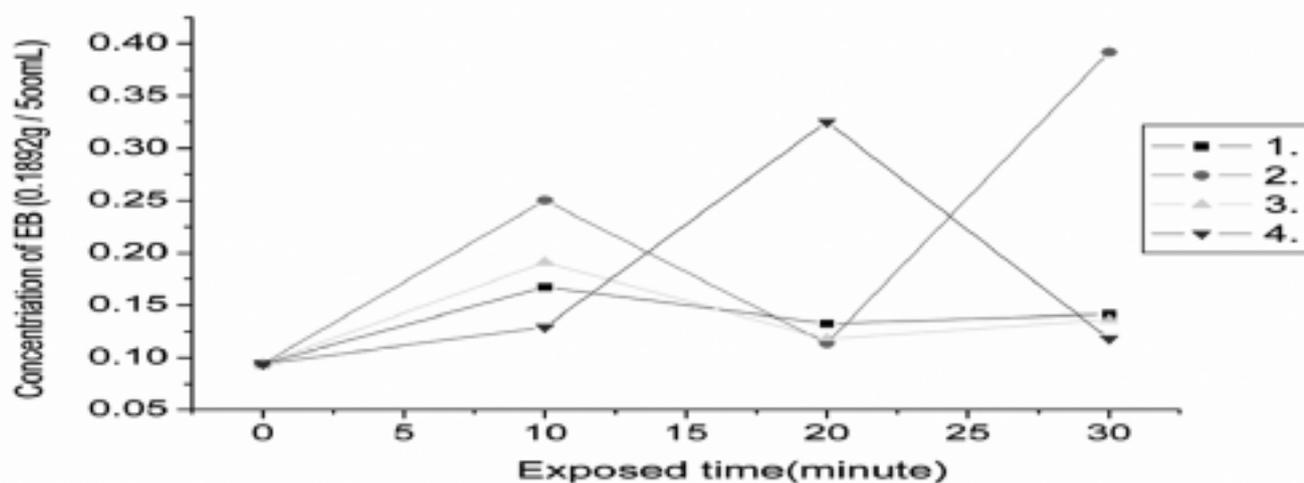
(先快速灌注 100 ~150ml,再缓慢灌注 200 ~250ml)直至流出液无色为止。然后取出全脑,立即置于 -25 以下培养箱中冷冻。在恒冷切片机上连续冠状切片,片厚控制在 20 ~30 μm 以内,隔 5 取 1 并直接贴在载玻片上,用 50% 甘油封片并在 -5 无光条件下保存。然后解冻后,对额叶脑组织进行称重,再根据重量的大小按比例加入 N,N - 二甲基甲酰胺,其比例为每毫克加入 30ml N,N - 二甲基甲酰胺,然后对额叶脑组织匀浆,匀浆后,将所得的混合溶液置于 45 的水浴中,保存 48h。48h 后,用 3000r/min 的离心机将其中的水分离去,然后用分光光度计测其光密度,从而确定 EB 在脑组织中的含量。对照组额叶中没有检测到 EB。于是我们可以得到在不同强度,不同脉冲次数和不同时间下脑组织中 EB 的浓度,以此来决定在不同强度,不同脉冲次数的脉冲电磁场作用下在不同作用时间下血脑屏障开放的程度。

2 实验结果

2.1 血脑屏障开放程度与电磁场的强度和频率的量效关系及其变化规律

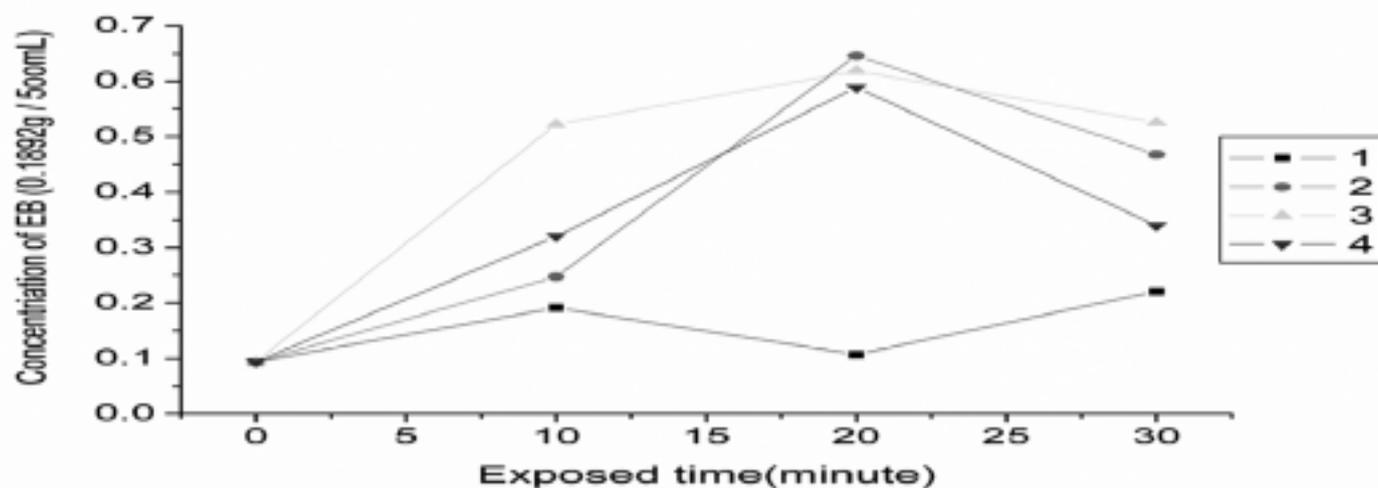
按照传统的方法,我们通过向血液注射伊文斯蓝(EB),然后用电磁场照射脑组织,看测量 EB 穿过血脑屏障,进入脑组织的多少来表征血脑屏障的开放程度。所以我们的实验基本思想就是测量脑组织中 EB 浓度的大小来研究开放程度与外加电磁场的变化关系和变化规律。按照上述实验方法,用分光光度计测其光密度,从而确定 EB 在脑组织中的含量。对照组额叶中没有检测到

EB。于是可以得到在不同强度,不同脉冲次数和不同时间下脑组织中 EB 的浓度,以此来决定在不同强度,不同脉冲次数的脉冲电磁场作用下在不同作用时间下血脑屏障开放的程度。对旧仪器和新仪器的实验结果分别示于图 1 和图 2 中。它们示出了血脑屏障开放的程度与外加场强、脉冲次数和不同作用时间的变化关。可看出,血脑屏障开放的程度与外加的脉冲场强度、频率和照射时间有一定关系,但没有固定的变化规律,在不同脉冲电磁场中都存在有开放的极大和开放的极小。具体讲,对旧仪器,当照射时间为 10min 时,强度 100kV/m 的电磁场照射效果最好;当照射时间为 20min 时,400 kV/m 电磁场照射效果最好;而照射 30min 时,100 kV/m 电磁场照射效果最好,对 50kV/m 和 200kV/m 的场强,照射时间为 10min 时,其开放程度还是比较好的。对新仪器,当照射时间为 10min 时,强度 100kV/m,脉冲频率为 100 次/s 的电磁场效果最好;当照射时间为 20min 时,75kV/m,脉冲次数为 100 次/s 的脉冲电磁场,效果最好;而照射 30min 时,100kV/m 电磁场,脉冲频率为 100 次/s 时,效果最好;对 100kV/m,脉冲频率为 100 次/s 的脉冲电磁场,当照射 20min 时,效果最佳;对 100kV/m,脉冲频率为 75 次/s 的脉冲电磁场时,照射时间为 20min 时,其开放程度还是比较好的。对 50kV/m,脉冲频率为 100 次/s 的脉冲电磁场时,照射时间为 30min 时,其开放程度还是比较好的。



注:‘1’表示场强为 50kV/m 的结果;‘2’表示场强为 100kV/m 的结果;‘3’表示场强为 200kV/m 的结果;‘4’表示场强为 400kV/m 的结果

图 1 大脑组织中 EB 的浓度与照射时间在旧仪器的不同场强作用下的变化



注:‘1’表示场强为 50kV/m, 脉冲频率为 100 次/s 的结果;‘2’表示场强为 75kV/m, 脉冲频率为 100 次/s 的结果;‘3’表示场强为 100kV/m, 脉冲频率为 100 次/s 的结果;‘4’表示场强为 100kV/m, 脉冲频率为 75 次/s 的结果

图 2 大脑组织中 EB 的浓度与照射时间在新仪器的不同场强作用下的变化特性

现在我们采取单因素的方差分析方法, 从我们所得的结果中计算出其平均均方值来研究量效关系。通过分析后得知, 在 100kV/m 的电场强度下, 改变辐照时间和辐照时的脉冲次数(100 次/s 和 50 次/s), 发现只在辐照时间为 10min 时, 不同脉冲次数的电磁场才能产生显著差异。其具体结果是, 在 100kV/m 的电场强度下, 脉冲次数为 50 次/s 时, 其均方平均值为 1.32454 与对照组(均方平均值为 1.74259) 的差异较大; 当辐照时间为 20min 和 30min 时, 不同脉冲次数的电磁场不能导致显著差异。对于不同的场强之间存在显著差异, 其中在 75kV/m 的脉冲电磁场照射下, 它的均方平均值为 1.3564, 与对照组的差异最大。对于不同的照射时间之间也存在显著差异, 其中在照射时间为 20min 时, 其均方平均值为 1.41708 与对照组的差异最大。从此, 我们得出采用新仪器, 选择场强为 75kV/m, 照射时间为 20min 的效果最好, 也可以选择 100kV/m 的电场强度, 脉冲次数为 50 次/s, 其效果也好。这些结果与上面的结果基本一致。

2.2 脉冲电磁场血脑屏障开放以后对脑组织结构的损伤影响 我们将 84 只大鼠分成实验组和对照组, 其中, 60 只大鼠分成 5 个实验组, 每组 12 只, 用新仪器进行照射, 其照射的场强分别为 50kV/m, 75kV/m, 100kV/m, 照射时间分别为 10min、20min 和 30min, 脉冲次数都为 100 次/s。对旧仪器仅用了

400kV/m 场强, 100 次/s 的脉冲电磁场, 照射时间为 30min。按照上述方法, 取出实验组和对照组中大鼠的大脑额叶, 然后用 Nexus 670FT - IR 红外光谱仪测量血脑屏障组织额叶分子结构的改变情况, 进行红外光谱的测定。其测量的每组的平均红外吸收谱示于图 3 中。从图 3 看出, 在经过不同条件的电磁场照射后, 大鼠脑组织的红外光谱的峰值位置没有改变, 但峰值的强度发生了变化, 特别是新仪器的 50kV/m, 30min 和新仪器的 100kV/m, 10min 组在 $2800 \sim 2900\text{cm}^{-1}$ 峰值的变化较明显。由于红外光谱表征了生物组织中分子结构和构象及分子极化效应等特征。如果有新峰产生, 旧峰表明有新的结构模产生和分子结构和构象的变化。而吸收峰的幅度的变化表征了分子极化效应的增加和跃迁偶极矩的增大。上述的脑组织额叶的实验组和对照组的红外光谱的对照中, 我们仅发现了峰值强度的改变, 而未发现新峰的产生和频率的红移。因此, 我们可以得出, 用我们所制造的开放血脑屏障的脉冲电磁仪照射大脑组织的时候, 并没有使分子的结构和构象发生变化, 仅是它们内部分子的极化效应增加。这种极化增加是可以理解的。它是由于所加的电磁场的电场力使带电的分子如蛋白质分子发生了极化效应所产生的。由此可以得出, 我们所加的电磁场对大脑组织的损伤是非常之小的。

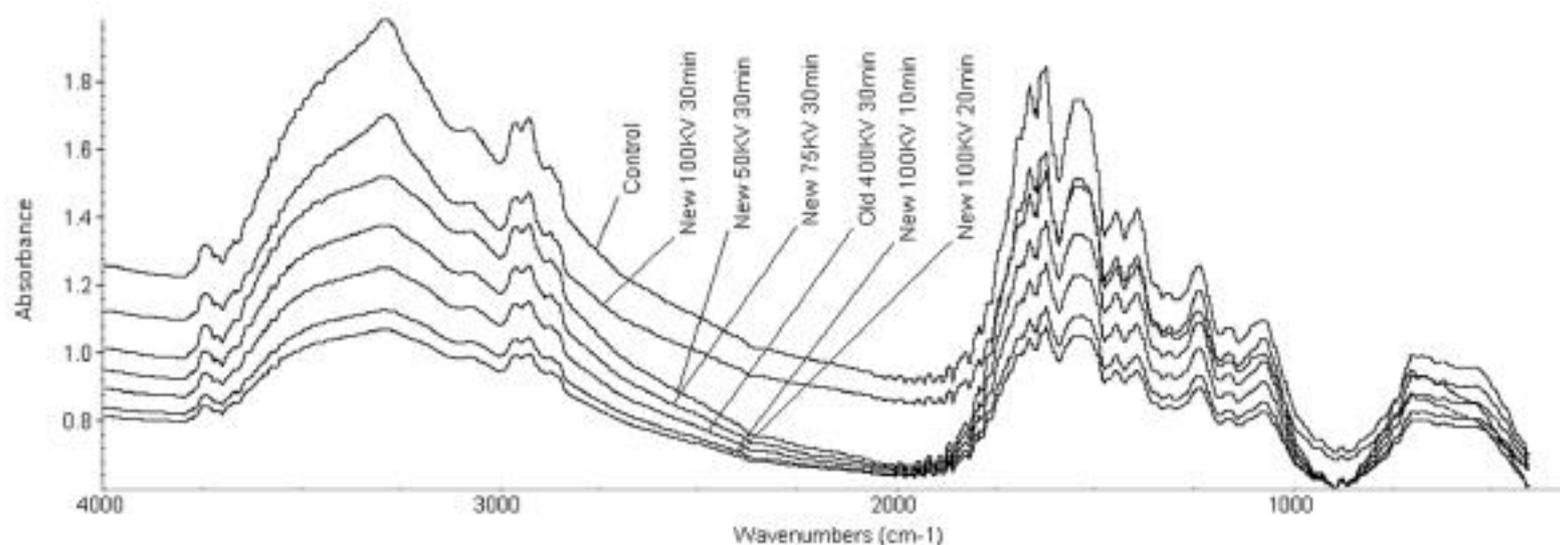


图 3 对照组和实验组中的大鼠大脑额叶的红外光谱

我们将 48 只大鼠分成实验组和对照组, 其中, 40 只大鼠分成 5 个实验组, 每组 8 只, 用新仪器进行照射, 其照射的场强为 100kV/m, 照射时间分别为 10min 和 30min, 脉冲次数都为 100 次/s。对旧仪器用场强分别为 400kV/m, 100kV/m, 100 次/s 的脉冲电磁场, 照射时间为 30min, 10min。按照上述方法, 取出实验组和对照组中大鼠的大脑额叶, 然后用 F700 荧光光谱仪测量它的荧光光谱。其测量的每组的平均荧光光谱示于图 4 中。从图 4 可知用脉冲电磁场照射大鼠大脑额叶组织后, 所有实验组的荧光光谱的强度相对于对照组都有不同程度的增加, 其中用场强为 100kV/m, 脉冲频率为 100 次/s 的旧仪器照射 10min 后的荧光光谱的强度增加非常大; 用场强为 100kV/m, 脉冲频率为 100 次/s 的旧仪器照射 30min 后的荧光光谱的强度增加减少了; 其用场强为 100kV/m, 脉冲频率为 100 次/s, 照射时间分别为 10min 和 30min 的新仪器引起的脑组织的荧光光谱的强度是基本一致的, 它们的强度都低于前两种的情况, 但都高于用场强为 400kV/m, 脉冲频率为 100 次/s 的旧仪器照射 10min 后的荧光光谱的强度。由于一种组织的荧光光谱表征了组织中的原子和分子当中的电子的跃迁强度和分子中活性中心能量转移和受杂质缺陷影响后的增强和淬灭大小。上述在照射后, 组织荧光光谱的表征只是增加了荧光的强度和峰值半宽度, 没有新峰的出现和频率的移动。这表明, 用脉冲电磁场照射后, 脑组织的分子结构没有发生改变, 只是增强了电子跃迁的强度。这与前面用红外光谱测量的结果一致。由此我们可以从这两种光谱技术得出的结果可以证明, 用

宽谱带脉冲电磁场开放血脑屏障后并没有使脑组织的分子结构发生改变。因此, 产生的损伤是非常小的。

3 结论

我们这里研究了用不同宽频带强脉冲电磁场开放血脑屏障, 研究开放程度与外加电磁脉冲的场强、频率和暴露时间的量效关系, 并得出了它们之间的变化规律曲线, 由血脑屏障开放所引起的脑组织和血脑屏障组织损伤、破坏等负面效应的程度。从这个量效关系得出, 新仪器和旧仪器比较起来, 新仪器的效果比较好, 它们对血脑屏障开放程度大大高于旧仪器, 并有明显的变化规律, 即随着照射时间和场强的增加, 血脑屏障的开放程度越来越大, 在照射 20min 时候, 效果最好。同时我们用 Nexus 670FT-IR 红外光谱与 F700 荧光光谱仪测量血脑屏障组织额叶分子结构的改变情况时发现大鼠脑组织的红外光谱与荧光光的峰值位置没有改变, 但峰值的强度发生了变化。这表明所制造的开放血脑屏障的脉冲电磁仪照射大脑组织的时, 并没有使分子的结构和构象发生变化。因此, 脉冲电磁场对大鼠脑部组织产生的损伤是非常小的, 这些成果为脉冲电磁场开放血脑屏障达到实际和临床运用奠定坚实的基础。因此具有重要意义。

(本文彩图见封三)

【参考文献】

- 1 H. K Kinderg. Current concepts of brain edema: Review of laboratory investigations. J Neurosurg, 1995, 83(60):105.
- 2 庞小峰. 生物电磁学. 北京: 国防工业出版社, 2008.
- 3 庞小峰. 生物物理学. 成都: 电子科技大学出版社, 2007.

4 邝芳, 王白忍, 王凌, 等. 利用伊文思兰的荧光显示肾上腺素诱发的血脑屏障开放. 神经解剖学杂志, 1997, 13: 417 - 420.

5 李静, 郭鹞, 郭国祯, 等. 电磁脉冲对大鼠、小鼠大脑功能及形态的影响. 西安: 第四军医大学出版社, 1999, 4 - 6.

6 曲润江, 郭鹞, 郭国祯, 等. 核电磁脉冲对大鼠昼夜节律的影响及其生理探讨. 西安: 第四军医大学出版社, 2000, 3 - 4.

7 丁桂荣, 吴彦卓, 等. 40kV/M 电磁脉冲辐照后大鼠海马区细胞凋亡的研究. 中华物理医学杂志, 1999, 21(3): 186.

8 王琦, 郭鹞, 任东青, 等. 不同场强电磁辐射对大鼠血脑屏障的影响. 疾病控制杂志, 2003, 7, 87.

(编辑: 张 犁)

· 临床医学 ·

闭式持续冲洗治疗骨髓炎 20 例体会

王宝柱

【中图分类号】 R681.2

【文献标识码】 B

【文章编号】 1680 - 6115(2008)05 - 0390 - 01

骨髓炎分外伤性和血源性骨髓炎, 是一种病程长, 根治困难, 易复发, 残废率较高的常见病。近几年, 我们采用手术加闭式持续冲洗治疗的方法治疗骨髓炎, 取得了良好的效果。现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本组 20 例, 男 12 例, 女 8 例; 年龄最大 60 岁, 最小 5 岁; 病程最长 30 年, 最短 14 天; 外伤所致 13 例, 血源性 7 例; 肱骨干 8 例, 尺骨 2 例, 股骨干 4 例, 跟骨 3 例, 胫腓骨 3 例。

1.2 方法

1.2.1 手术方法 清创术, 手术将不正常的皮肤, 软组织, 窦道, 死骨, 髓腔内坏死肉芽, 脓液彻底清除, 沟通髓腔, 用生理盐水反复冲洗。

1.2.2 置管方法 将病灶彻底清创后, 根据髓腔情况, 选择合适的两根引流管(潘式管或输血管) 第一根接盐水, 第二根引流, 接引流袋, 两端分别从便于引流的组织处穿出, 固定牢, 封闭伤口及引流口。

1.2.3 冲洗治疗及护理方法 术后患肢置于适当位置, 支被架保护, 防止扭曲, 肿胀及受压; 引流管两端分别接生理盐水和引流袋。先快速冲洗至引流液由血性变清然后调节滴数, 每分 20 ~30 滴, 间断使用抗生素。加抗生素之盐水控制滴数 10 ~15 滴维持。定时查看引流管稳定性, 勿松动拔出或局部碘伏消毒, 保持伤口清洁。

1.2.4 拔管时间与方法 体温正常, 皮肤愈合, 局部

无红肿, 引流液外观清晰, 细菌培养阴性, 一般 1 ~2 周, 方可拔管; 拔管时, 先拔进水管, 12h 后再拔引流管, 使病灶内水分得到充分引流。

2 结果

本组经闭式持续冲洗治疗痊愈。随访最长 7 年, 最短 2 年, 无一例复发。

3 体会

3.1 冲洗装置应保持无菌通畅 术后 3 天, 血凝块, 坏死脱落组织, 较多易阻塞管道。每日应数次快速冲洗 1 ~2min。如有管道堵塞还可用挤压的方法或用 20ml 注射器抽生理盐水高压冲洗, 同时查引流管有无脱落或抽出, 一旦发生脱落应立即停止冲洗。无菌下重新置管。

3.2 抗生素的使用 冲洗液中定时定量加抗生素, 根据术前细菌培养及药敏决定, 浓度不宜过高, 防止吸收过多。冲洗时间 1 ~2 周。

在局部手术清创, 持续冲洗治疗的同时, 应口服或静注抗生素, 以达到抗菌效果。

不论外伤性骨髓炎, 还是血源性骨髓炎, 不能根治的主要原因之一是病灶不能从微观上消除。由于髓腔内病灶清除后仍有大量的细菌残留, 成为复发隐患, 采用持续冲洗能有效的排除病灶的坏死。脱裂组织为骨髓血管的生长及血运重建, 骨质再造创造条件。同时药物直接作用病灶是局部抗生素有效浓度增加并得以维持, 配合全身用药, 有效控制了感染, 从而从微观上消除了病灶达到了根治的目的。

(编辑: 张 犁)