磁场对大鼠肾上腺一氧化氮和神经肽 Y 含量的影响

罗振国 韩庆国 张小云

(深圳大学生物工程系, 深圳 518060. Email: sms@szu.edu.cn)

摘要 应用硝酸还原酶反应-分光光度法和组织化学技术对磁场处理后大鼠肾上腺一氧化氮含量的变化及神经肽 Y(NPY)免疫细胞化学染色强度进行了研究, 发现肾上腺皮质球状带、网状带、束状带细胞均呈 NADPH-d 阳性, 部分肾上腺髓质嗜铬细胞 NPY 阳性, 少量髓内神经节细胞呈 NADPH-d 和 NPY 双染阳性, 磁场可促使肾上腺一氧化氮量显著升高, 并维持一定时间, 神经肽 Y 免疫细胞化学染色强度增强. 对其相关机理和意义进行了讨论.

关键词 磁场 肾上腺 一氧化氮 神经肽 Y NO 硝酸还原酶反应-分光光度法 组织化学 大鼠

磁场对机体的影响是当前学术界关注的热点之一. 我们曾研制出 HMF-6000 旋磁治疗仪, 研究发现该装置磁场能显著升高血浆 β 内啡肽、5-羟色胺, 故在临床上有显著镇痛止吐效应[1], 表明磁场对机体的内分泌、神经内分泌具有调节作用. 一氧化氮是一种易于弥散的气体, 是在生物体内充当信使分子与效应分子的小分子物质, 其产生是在一氧化氮合酶催化下由精氨酸生成瓜氨酸和一氧化氮. 尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸黄递酶是一氧化氮合酶的辅酶, 可从电子供体 NADPH 接受电子, 再传递给血红素以激活分子氧[2]. 神经肽 Y(neuropeptide Y, NPY)在神经系统充当神经递质、调制物和激素. 在神经系统之外, NPY 有调节血流、调节胃肠分泌和运动、调节肾功能的作用[3]. 有关磁场对肾上腺作用的研究报道较少, 且为离体实验, 而磁场对肾上腺内 NO, NPY 影响的研究尚属空白. 本研究使用临床既定磁场参数, 对此进行了活体动物实验研究, 是磁场临床效应研究的补充与延伸, 以期为认识磁效应的内在机理提供基础理论的资料.

1 材料与方法

(ⅰ) 动物饲养及处理. 健康成年雄性 SD 大鼠 84 只(购自广州实验动物中心), 随机分为 14 组, 每组 6 只. 正常对照组编为 7 组, 实验组编为 7 组, 第 1 ~ 6 组用于 NO 测定, 第 7 组用于细胞化学染色, 所有动物在光照条件 L∶D = 12 h∶12 h 的情况下分笼饲养. 实验组在 HMF-6000 旋磁治疗仪(张小云教授专利)处理 60 min, 转速 240 r/min, 磁场强度 0.6 T; 正常对照组不做处理. 第 1 ~ 6 实验组动物于磁场处理后分别按 0(即刻), 0.5, 1, 2, 3, 4 h, 断头处死, 剖腹取材, 称重, 加 0.25 mol/L 蔗糖液(10%浓度), GF-1 型高速分散器(江苏海门市麒麟医疗仪器厂)破碎、高速冷冻离心机(4℃, 10 000 r/min)离心 10 min, 取其上清. 第 1 ~ 6 正常对照组除不做磁处理外余同上述. 将所得对照组样品上清液分别与实验组相匹配; 第 7 实验组, 磁处理 1 h 后, 与第 7 正常对照组均腹腔注射 2%戊巴比妥钠深麻醉(30 ~ 40 mg/kg), 先用 0.9% NaCl 通过心主动脉快速灌注 0.9% NaCl 200 mL, 再灌注含 4%多聚甲醛的 0.01 mol/L 磷酸缓冲液(pH = 7.2)500 mL, 剖腹取材, 4℃后固定 6 h, 含 30%蔗糖 0.01 mol/L 磷酸缓冲液(pH = 7.4)脱水至下沉. 标本经 OCT(美国)包埋, 液氮冷冻, 经 Leica-1100 恒冷切片机冷冻连续切片(-20 ℃), 片厚 10 μm.

(ⅱ) NO 测定. 一氧化氮(酶法)试剂盒购自晶美生物工程(北京)有限公司, 主要原理是依据 NO 化学性质活泼, 在体内 NO 很快转变为 NO_3^-和 NO_2^-, NO_2^-进一步转化为 NO_3^-, 本法用硝酸还原酶特异性地将 NO_3^-还原为 NO_2^-, 通过显色深浅测定其浓度的高低. 方法如下: 向空白管、标准管、测定管分别加入试剂 1 和 2 各 0.1 mL; 向空白管加入双蒸水 0.1 mL; 向标准管加入 KNO_3 0.1 mL; 向测定管加入样品 0.1 mL; 轻轻混匀, 37℃水浴 1 h, 再向空白管、标准管、测定管分别加入试剂 3 和 4 各 0.5 mL, 混匀, 室温放置 10 min 后, UV-2000 核酸蛋白检测仪(Pharmacia) 测定, 530 nm 波长, 0.5 cm 比色杯, 空白管调零, 分别读取标准管、测定管 A 值, 按下列公式计算: 一氧化氮浓度(μmol/L)=$A_{测定管}/A_{标准管}\times 100$.

(ⅲ) 组织化学染色. 一氧化氮合酶染色: 切片放入含 1 mg/mL NADPH-d(Sigma), 0.5 mg/mL 四唑氮蓝(nitro-blue-tetrazolium, NBT, Sigma)和 0.3% Triton X-100 的 0.05 mol/L Tris-HCl (pH = 8.0)中, 37℃孵育 60 min. 免疫细胞化学染色: 切片经 0.01 mol/L 磷酸缓冲液(pH = 7.4)漂洗, 0.3% H_2O_2 处理 30 min, 3%正常猪血清封闭 30 min, 神经肽 Y 抗体(neuropeptide Y, NPY, Sigma)1∶3 000, 4℃孵育 12 h, 生物素化的猪抗兔血清(biotinylated swine anti-rabbit IgG, Dako)1∶400, 37℃孵育 30 min, 链霉亲和素抗生物素-辣根过氧化物酶复合体(streptavidin/HRP, Dako)1∶400, 37℃孵育 30 min, DAB 显色. 对照组和实验组同步操作. 对照实验: 以正常兔血清和 PBS 代替一抗分别作为替换对照和空白对照, 同步进行上述免疫组织化学染色, 结果为阴性.

(ⅳ) 图像分析. MIAS-200 型图像分析系统的帧显示器的分辨率为 512×512×8 像素点, 灰度为 256 个等级. 将待测切片置于光学显微镜, 经物镜将图像由摄像机输入, 显示在计算机监视屏幕上, 用鼠标划出被测区域. 所有切片在同一光强度下测定.

2 结果

肾上腺一氧化氮含量在磁处理后即刻较正常对照组升高($P < 0.05$), 0.5 ~ 1 h 达最大值($P < 0.01$), 2 h 后有所下降但仍高于对照组($P < 0.01$), 3 h 后继续下降($P < 0.05$), 4 h 时接近正常对照组水平(图 1).

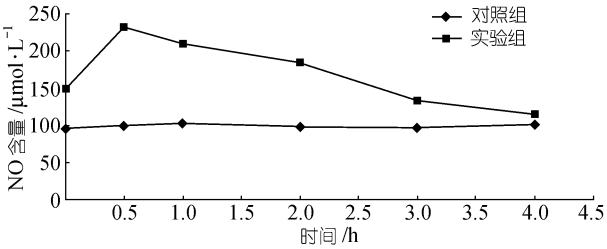


图 1 磁场处理前后大鼠肾上腺 NO 含量的变化

NADPH-d 阳性细胞主要分布在肾上腺皮质球状带、束状带、网状带, 呈强阳性; 肾上腺髓质嗜铬细胞仅少量细胞呈阳性, 少量髓内神经节细胞呈阳性(图版Ⅰ中的 1, 2 和图版Ⅱ中的 1 ~ 4, 附本刊后, 下同).

肾上腺髓质大量实质细胞与皮质内少量神经细胞呈 NPY 阳性, 被膜内、被膜下、皮质内有丰富 NPY 阳性神经纤维(图版Ⅱ中的 1, 3, 5).

磁处理组肾上腺髓质 NPY 阳性细胞面积较对照组有显著性升高, 灰度显著性降低(表 1).

表 1 磁场处理后大鼠肾上腺 NPY 阳性细胞面积和灰度比较

组别	n	NPY 阳性细胞面积($X\pm S$)/μm	NPY 阳性细胞灰度($X\pm S$)
对照组	6	4 503 ± 23.65	173 ± 5.81
实验组	6	7 968** ± 47.91	119** ± 2.65

**示 $P<0.001$

3 讨论

3.1 磁场对肾上腺的作用机理

肾上腺是重要的内分泌器官，丘脑下部-垂体-肾上腺轴在调节机体生理活动、维持内外环境平衡过程中起着重要作用. 磁场对肾上腺的作用离不开丘脑下部-垂体-肾上腺系统. Mann 等人[4]研究了高频脉冲电磁场对人丘脑下部-垂体-肾上腺轴的作用，观察到血浆可地松升高并持续 1 h. 目前，国内外文献未见报告磁场作用活体后肾上腺内发生的具体变化，尤其是关于其 NPY, NO 的变化，故尚难将本文所观察到的现象与丘脑下部调节肽、垂体促激素的作用联系起来. 不过，已有研究者用低频电磁场处理离体培养的大鼠肾上腺嗜铬细胞，发现磁场诱导嗜铬细胞产生高浓度的儿茶酚胺[5]，似提示磁场对肾上腺实质细胞具有直接的作用. 另一有实验资料支持的途径是磁场直接作用于松果腺，而后间接影响到肾上腺. 松果腺是一个磁敏感器官，在正常情况下可感受地磁场信号，通过节律性分泌褪黑激素来调节各内分泌腺的活动. 肾上腺细胞存在有褪黑激素受体. 给大鼠皮下注射褪黑激素，其肾上腺重量减轻，皮质细胞分裂被抑制，呈现萎缩，肾上腺多巴胺b-羟化酶活性降低，髓质儿茶酚胺含量减少. 与注射褪黑激素所产生的效应相反，切除松果腺可使大鼠肾上腺体积增大，皮质细胞增生，髓质嗜铬细胞增生肥大，分泌颗粒积聚，多巴胺b-羟化酶活性增高[6~10]. 总之，松果腺通过分泌褪黑激素抑制肾上腺的功能活动. 已有实验室报告外加磁场直接抑制松果腺褪黑激素的生成和分泌[11, 12]. 故可推测，磁场作用下肾上腺功能活动增强的原因之一是来自松果腺的抑制减弱.

3.2 磁场促使肾上腺 NO 和 NPY 变化的意义

磁场作用后大鼠肾上腺实质细胞 NO 浓度升高有重要意义. 免疫活性测定发现大鼠肾上腺内血管紧张素浓度是血浆浓度的 100 多倍[13]，其肾上腺皮质球状带细胞膜上分布有血管紧张素 AT1 型受体，该受体激活导致醛固酮分泌；其肾上腺髓质嗜铬细胞膜上分布有血管紧张素 AT2 型受体，该受体激活导致儿茶酚胺分泌[14]，NO 能够下调血管紧张素受体，抑制醛固酮和儿茶酚胺的分泌，肾上腺皮质束状带细胞生成类固醇亦可被 NO 所抑制. 舒血管物质 NO 和缩血管物质血管紧张素似具有拮抗效应[15~17]. 实验资料表明肾上腺 NO 系统是一个应激限制系统，磁场可作用于产生 NO 的肾上腺实质细胞本身，或通过作用于肾上腺 NO 能神经细胞，启动、加强该系统的运作.

NPY 受体可分为 Y1, Y2, Y3 型[18]，在肾上腺皮质球状带分泌细胞胞膜上分布有 Y1 受体，NPY 神经纤维所释放的 NPY 作用于 Y1 受体，抑制醛固酮分泌[19~21]，亦或 NPY 通过 Y1 受体调节肾上腺皮质球状带分泌细胞对 ACTH 的敏感性[22]；肾上腺髓质许多嗜铬细胞胞膜上亦存在 Y1 受体，NPY 以自分泌、旁分泌方式作用于 Y1 受体上调酪氨酸羟化酶的表达，增加儿茶酚胺的合成[23]，在肾上腺髓质毛细血管内皮细胞膜上也存在 Y1 受体，NPY 作用于 Y1 受体可使肾上腺血流量减少[23]. 髓质 NPY 与儿茶酚胺共存，受到刺激时平行释放，共同增高，又作用于不同部位的受体产生不同效应，NPY 在应激反应初期对儿茶酚胺的作用有加强效应，在应激反应后期又通过限制肾上腺血流量，阻止更多儿茶酚胺作用于肾上腺外儿茶酚胺受体，产生适中的应激反应，以维护机体内环境的稳定. 磁场对此过程具有正向调节作用.

磁场促使肾上腺 NO 和 NPY 升高还可能具有一定的临床意义，在高旋磁治疗装置临床使用过程中，发现某些类型的高血压如肾性高血压、症状性高血压接受磁疗后，得以缓解，此现

象是否与磁场促使肾上腺 NO 和 NPY 含量增高有关，值得进一步深入研究.

致谢 本工作为国家自然科学基金资助项目(批准号: 59470089).

参 考 文 献

1 张小云，罗振国，马永健. 磁场对血浆β-内啡肽的影响. 中华物理医学杂志, 1998, 20(3): 129 ~ 132

2 钟慈声，孙安阳. 一氧化氮的生物医学. 上海: 上海医科大学出版社, 1997. 6 ~ 10

3 William F C, Wahlestedt C. The Biology of Neuropeptide Y and Related Peptides. Totowa: Human Press, 1993

4 Mann K, Wagner P, Brunn G, et al. Effects of pulsed high-frequency electromagnetic field on neuroendocrine system. Neuroendocrinology, 1998, 67(2): 139 ~ 144

5 Zhang L, Zhou L, Vega-Gonzalez A, et al. Extremely low frequency magnetic fields promote neurite varicosity formation and cell excitability in cultured rat chromaffin cells. Comp Biochem Physiol Pharmacol Toxicol Endocrinol, 1997, 118(3): 295 ~ 299

6 Persengiev S P. 2-(^{125}I) iodomelatonin binding sites in rat adrenals: pharmacological characterristics and subcellular distribution. Life Sci, 1992, 51(9): 647 ~ 651

7 Fraschini F, Mess B, Martini L. Pineal gland, melatonin and the control of luteinizing hormone secretion. Endocrinology, 1986, 82: 919 ~ 924

8 Banerji T K, Quay W B. Effects of melatonin on adrenalmedullary dopamine-β-hydroxylase activity in golden hamsters: evidence for pineal and dependencies. J Pineal Res, 1986, 3(4): 397 ~ 404

9 Esquifino A I, Moreno M L, Steger R W. Effects of chronic melatonin administration on adrenal medulla catecholamine metabolism in adult male golden hamsters. J Pineal Res, 1994, 16(3): 154 ~ 158

10 Kachi T. Effects of pinealectomy on the mitotic activity of adrenomedullary chromaffin cells in relation to time of day. J Pineal Res, 1990, 8: 21 ~ 34

11 Karasek I, Woldanska-Okonska I, Czernicki J, et al. Chronic exposure to 2.9 mT, 40 Hz magnetic field reduced melatonin concentrations in humans. J Pineal Res, 1998, 25(4): 240 ~ 244

12 Reiter R J, Dun X T, Burkhard P, et al. Inconsistent suppression of nocturnal pineal melatonin synthesis and serum melatonin levels in rats exposed to pulsed DC magnetic field. Bio Electro Magnetics, 1998, 19(5): 318 ~ 329

13 Husain A, DeSilva P, Speth R C, et al. Regulation of angiotensin Ⅱ in rat adrenal gland. Circ Res, 1987, 60(5): 640 ~ 648

14 Belloni A S, Andreis P G, Macchi V, et al. Distribution and functional significance of angiotensin-Ⅱ AT1- and AT2-receptor subtypes in the rat adrenal gland. Endocr Res, 1998, 24(1): 1 ~ 15

15 Millatt L J, Abdel-Rahman E M, Siragy H M. Angiotensin Ⅱ and nitric oxide: a question of balance. Regul Pept, 1999, 81(1-3): 1 ~ 10

16 Cymeryng C B, Dada L A, Colonna C, et al. Effects of L-arginine in adrenal cell: involvement of nitric oxide synthase. Endocrinology, 1999, 140(7): 2962 ~ 2967

17 Yang Y, Macdonald G J, Duggan K A. A study of angiotensin Ⅱ receptor after chronic inhibition of nitric oxide synthase in the spontaneously hypertensive rat. Clin Exp Pharmacol Physiol, 1996, 23(5): 441 ~ 443

18 Wharton J, Gordon L, Byrne J, et al. Expression of the human neuropeptide tyrosine Y1 receptor. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(2): 687 ~ 691

19 Maubert E, Dupouy J P, Bernet F. Effect of adrenal demedullation on neuropeptide Y content of the capsule/glomerulosa zone of the rat adrenal gland. Neurosci Lett, 1993, 156(1-2): 5 ~ 8

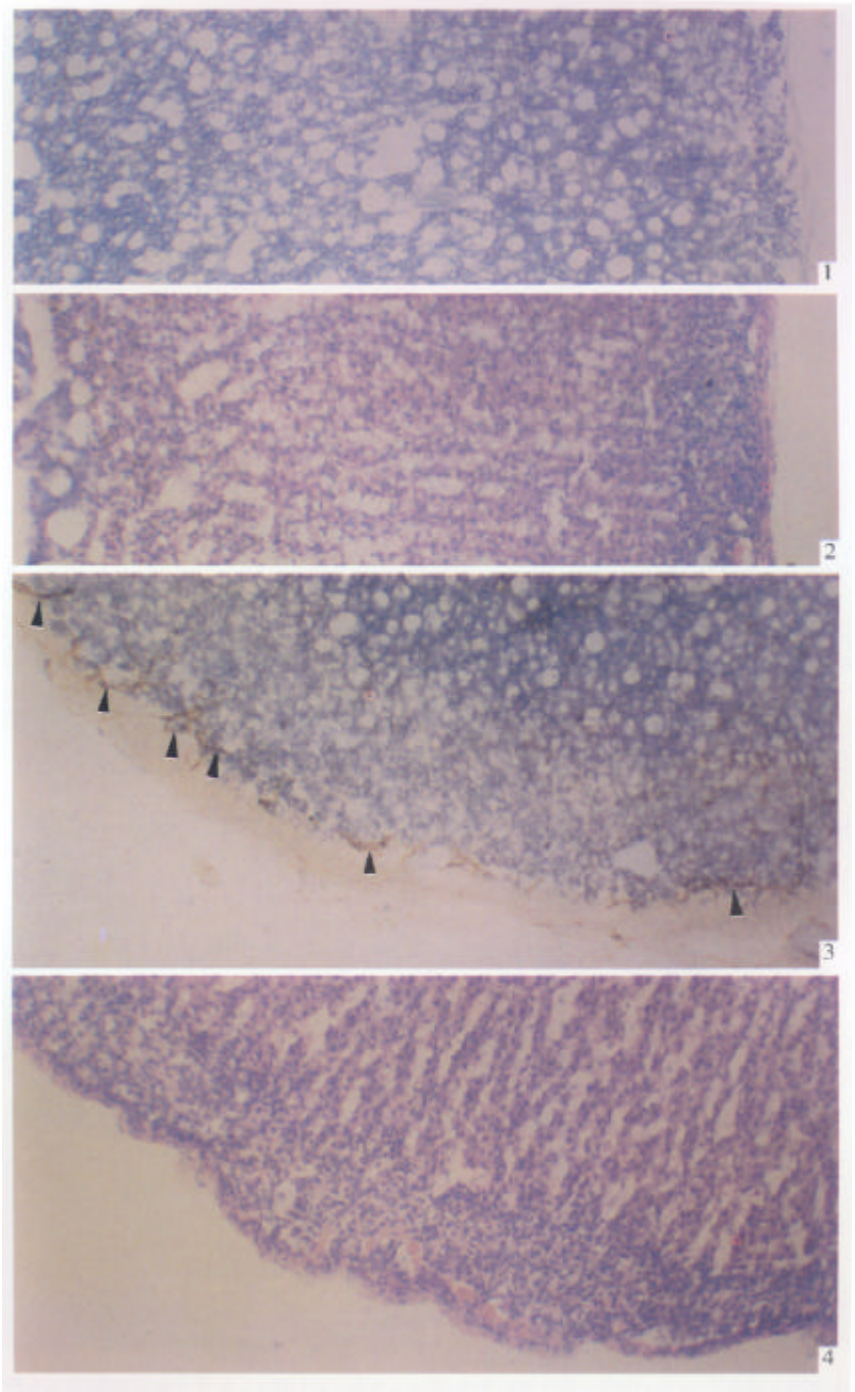
20 Nussdorfer G G, Gottardo G. Neuropeptide-Y family of peptides in the autocrine-paracrine regulation of adrenocortical function. Horm Metab Res, 1998, 30(6-7): 368 ~ 373

21 Weng G, Yee F, Michl P, et al. Studies on neuropeptide Y receptors in a mouse adrenocortical cell line. Mol Pharmacol, 1995, 48(1): 9 ~ 14

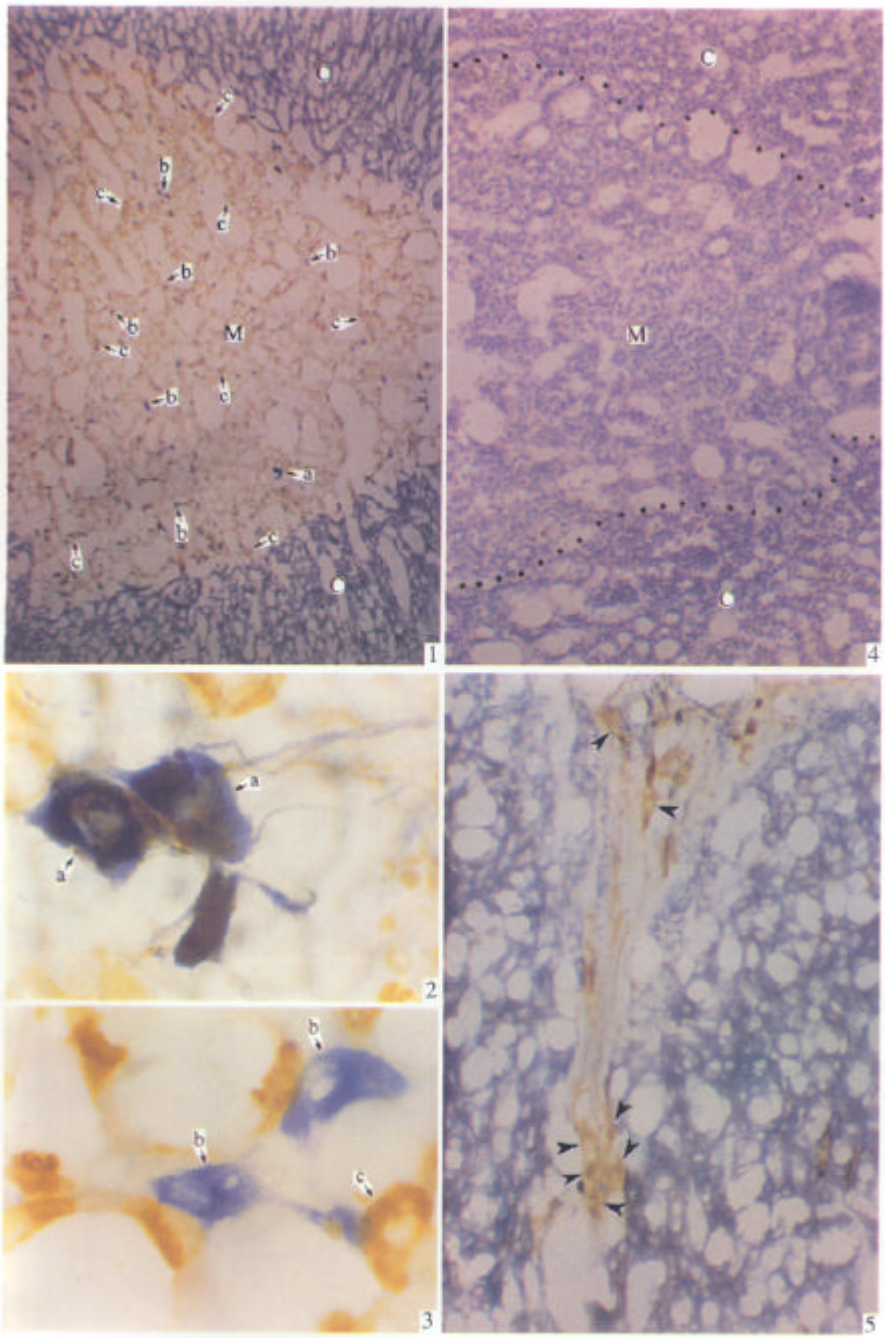
22 Hinson J P, Cameron L A, Kapas S. Neuropeptide Y modulates the sensitivity of the rat adrenal cortex to stimulation by ACTH. J Endocrinol, 1995, 145(2): 283 ~ 289

23 Hong M, Li S, Fournier A, et al. Role of neuropeptide Y in the regulation of tyrosine hydroxylase gene expression in rat adrenal glands. Neuroendocrinology, 1995, 61(1): 85 ~ 88

(2000-02-14 收稿，2000-06-01 收修改稿)



1. 磁场处理后大鼠肾上腺皮质球状带、束状带、网状带 NADPH-d 阳性细胞, × 132; 2. 正常大鼠肾上腺皮质球状带、束状带、网状带细胞(HE 染色), × 132; 3. 磁场处理后大鼠肾上腺被膜下、被膜中的 NPY 阳性神经纤维(箭头所示), × 264; 4. 正常大鼠肾上腺皮质及被膜(HE 染色), × 264



1. 磁场处理后大鼠肾上腺髓质(M)NADPH-d 阳性神经细胞(箭头 a 所示), NADPH-d 阳性非神经细胞(箭头 b 所示), NPY 阳性细胞(箭头 c 所示)及皮质(C)，×264；2. 磁场处理后大鼠肾上腺髓质 NADPH-d 与 NPY 双阳性神经节细胞(箭头 a 所示)高倍观察，×528；3. 磁场处理后大鼠肾上腺髓质 NPY 阳性细胞(箭头 c 所示)，NADPH-d 阳性非神经细胞(箭头 b 所示)高倍观察，×528；4. 正常大鼠肾上腺髓质(M)和皮质(C)(HE 染色)，×264；5. 磁场处理后大鼠肾上腺皮质 NPY 阳性神经节细胞(箭头所示)，×528