

- [ 6 ] Dawson, VL et al. , 1991, *Proc Natl Acad Sci USA*, **88**: 6368—6371.
- [ 7 ] Radi, R. et al. , 1991, *Arch Biochem Biophys*, **288**: 481—487.
- [ 8 ] Zhang, J. et al. , 1994, *Science*, **263**: 687—689.
- [ 9 ] Yun, HY. et al. 1996, *Ctri Rev Neurobiology*, **10**: 291—316.
- [ 10 ] Skaper, SD. et al. , 1992, *J Neurosci Res*, **33**: 330—337.

## CNTF PREVENTS SERUM OF BURN RAT MEDIATED CYTOTOXICITY IN CULTURED HIPPOCAMPAL NEURONS

CHEN Xiu Qing HANG Ai Jun LU Chang Ling WANG Cheng Hai BAO Xuan\*

(Institute of Neuroscience Research, Department of Neurobiology, Second Military University, Shanghai 200433

\* Shanghai Brain Research Institute, Academia Sinica)

### ABSTRACT

Using primary cultures of rat hippocampal neurons and the model of burn rats, observed the effects of ciliary neurotrophic factor on contents of NO and the number of neurons on hippocampus, observed effects of CNTF on the neurons survival and the content of NO which induced by serum of burn rat. The result showed that the numbers of hippocampal neuron decreased and the contents of NO increased in burn rats. The serum of burn rats could induce the cell survival rate decreased and the levels of NO increased. Ciliary neurotrophic factor (CNTF) could promoted neurons survived, decreased NO level which induced by serum of burn rat. The protective effects of CNTF against cytotoxicity were dependent on concentrations. Conclusion: These findings suggested that CNTF protected hippocampal neurons against serum of burn rat induced injury by preventing NO neurotoxicity.

**Key words:** Ciliary neurotrophic factor Hippocampal neurons Serum of burn rat Neurotoxicity

## 低强度瞬态电磁脉冲引发细胞电穿孔的实验初探\*

张 弘 刘长军 王保义 王子淑\*\* 王喜忠\*\* 陈明福\*\*

(四川大学无线电系 \*\*生物系 成都 610064)

细胞电穿孔是指在电场作用下细胞膜出现穿孔的一种生物物理现象。众多的研究者集中于研究单个或几个强电场脉冲作用下细胞膜或组织膜的穿孔, 实验中采用脉冲峰值场强一般均大于千伏每厘米, 脉冲宽度为几微秒至几毫秒<sup>[1-3]</sup>。少数研究者进行了低强度电场下相关生物效应的研究, 如 Tsong 等采用场强为 50—200V/cm 的低频电场, 在 *E. coli* (JM105) 细胞上成功地观察到质粒的电转染现象<sup>[4]</sup>, 但这种转染现象并不能直接证实细胞电穿孔的发生。

实验用低强度脉冲电场照射动物红细胞, 观察到了低强度瞬态脉冲电场可以导致细胞电穿孔的发生。

### 材 料 和 方 法

#### 一、实验系统

脉冲电磁源选用 MFD-1A 毫微秒脉冲发生器, 其脉冲波形近似为矩形。采用幅度 187V, 100ns 重复频率 300Hz 的电磁脉冲。实验前, 将仪器预热 30 分钟, 并用采样示波器测量验证脉冲的参数。

为较好的模拟空间辐射条件, 使用了自行研制的宽频带横电磁传输室, 称为 BTEM Cell。由于 BTEM Cell 具有良好的宽带频谱特性和较均匀的场分布, 可以满足瞬态电磁脉冲的传输和辐射要求。BTEM Cell

本文 1998 年 12 月 8 日收到, 1999 年 7 月 9 日接受。

\* 国家自然科学基金资助项目, 编号: 69771020。

的性能和在瞬态电磁脉冲生物效应研究中的应用可以参考文献<sup>[5-6]</sup>。

梯度脱水,以二氧化碳临界点干燥,镀金,扫描电镜观察。

### 三、细胞电融合

采用材料为鸡红细胞和兔红细胞,实验准备和接受电磁辐射的步骤与细胞电穿孔相同。辐射结束后,加1640培养基培养2小时;制片,以Giemsa染色10min,用显微镜观察。

## 结果和讨论

电融合实验中的细胞融合的比率相当低,小于5%。可以观察到鸡和鸡红细胞、鸡和兔红细胞、兔和兔红细胞之间的电融合。图2为鸡和兔红细胞电融合的照片。(只选了一张作代表)

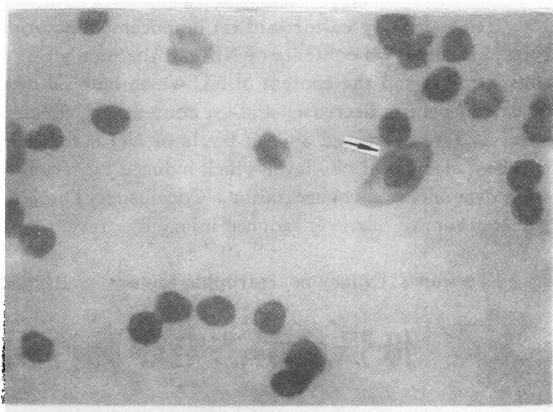


图2 鸡和兔红细胞融合

通过扫描电镜可以观察到细胞膜的电穿孔

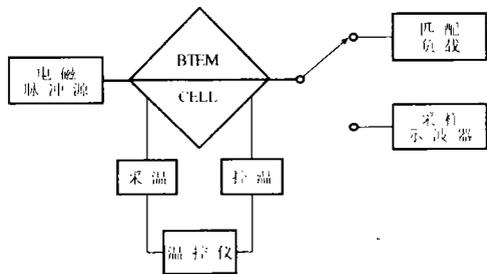


图1 实验系统图

实验系统如图1所示,生物样品置于 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 恒温控制的BTEM Cell中。在Cell内可防止外界电磁场辐射的干扰,同时在辐射腔中为样品提供了一个较为均匀的电磁场分布,以便实验结果的分析 and 比较。

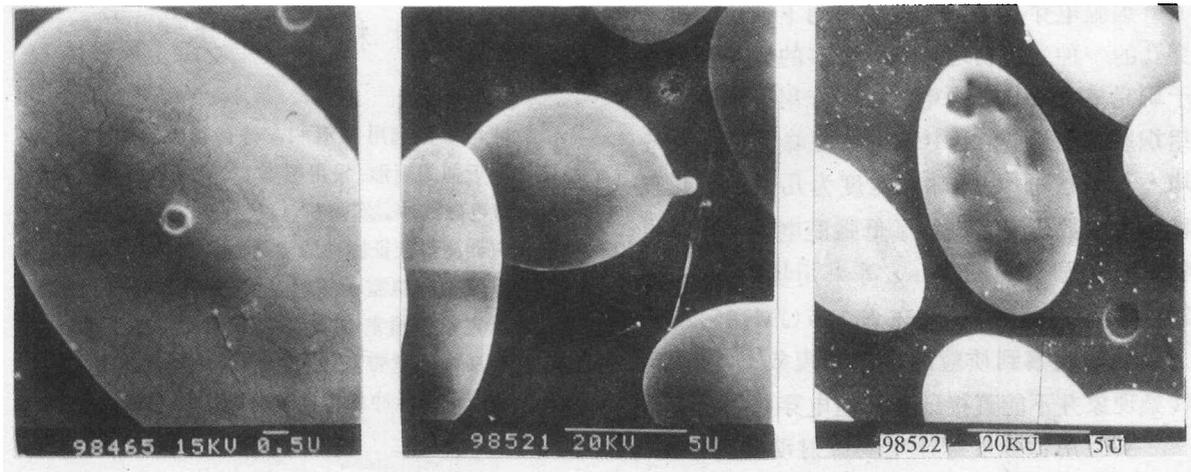
### 二、电穿孔的扫描电镜观察

#### 1. 配置等渗低电导液

3mmol/L Tris-Cl, 1mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 10%蔗糖配成溶液后,用HCl调节 $\text{pH}=7.4$ 备用。电穿孔和电融合实验中,细胞在接受电磁辐射时均处于此等渗低电导液中。

#### 2. 实验步骤

取鸡红细胞以D-Hanks液洗3次,等渗低电导液洗1次;取5滴鸡红细胞用等渗低电导液稀释到5ml,分为6组各加样0.1ml,1组作对照,其余5组置于BTEM Cell中分别接受辐射20、40、60、80、100min;辐射结束后,加0.5ml1%戊二醛;以FORMAOR膜支撑,戊二醛-锇酸双固定法固定;丙酮-醋酸异戊脂浓度



(a)

(b)

(c)

图3 细胞电穿孔照片

现象。根据初步统计,细胞的电穿孔率大于2%,穿孔的直径为20nm至500nm左右。在不同的照射时间20—100分钟之间,都可以观察到穿孔现象,其中在100分钟穿孔率最高。在对照组中没有观察到电穿孔现象。图3为扫描电镜拍摄到的电穿孔照片,其中(a)为穿孔照片;(b)为细胞电穿孔期间细胞质外喷的照片;(c)为穿孔愈合时细胞膜上形成的凹陷。结果提示持续的低强度脉冲电场很可能导致细胞膜的可逆性电击穿,所以膜可以在穿孔后自行融合。这样可以提高细胞存活率,对于红细胞来说也不易发生溶血现象。

实验中样品处的峰值场强小于25V/cm,根据简化的球形细胞电学模型,可以估算脉冲所激发的跨膜电位<sup>[7]</sup>小于20mV,远达不到500mV的电击穿跨膜电位,所以单个或几个低强度脉冲电场不能直接导致细胞膜的击穿。但以持续的低强度电场脉冲作用于鸡、兔的红细胞,本实验首次证实了低强度瞬态电磁脉冲可以导致细胞电穿孔的发生。和强电场的电穿孔方法相较,可能对生物体比较安全,有利于电穿孔在生物医学工程中应用。到目前为止,国内外有关低强度瞬态电磁脉冲导致的细胞电穿孔的

研究工作很少,其机理也不十分清楚,有待进一步的探讨。

## 摘 要

采用宽频带横电磁传输室,通过实验观察到低强度瞬态电磁脉冲作用下产生的细胞电穿孔现象,并提出了初步分析及其应用前景。

关键词:瞬态电磁脉冲 电穿孔 电融合

## 参 考 文 献

- [1] Weaver, J. C., 1995, *Radio Science*, **30**: (1): 205.
- [2] Song, T. Y., 1991, *Biophysical Journal*, **60** (8): 297.
- [3] Zimmermann, U., 1982, *Biochemical et biophysica acta*, **694**: 227.
- [4] Tsong, T. Y., 1990, *Biophysical Journal*, **58** (10): 897.
- [5] 王保义等, 1997, *中国科学(C辑)*, **27**(1): 36.
- [6] Huang, K. M., Liu, Y. Q., 1994, *IEEE Trans EMC*, **36**(4): 335.
- [7] Gailey, P. C. Easterly, C. E., 1994, *Electro-and Magnetobiology*, **13**(2): 159.

## EXPERIMENTAL STUDY ON ERYTHROCYTE ELECTROPORATION BY LOW INTENSITY TRANSIENT ELECTROMAGNETIC PULSES\*

ZHANG Hong LIU Chang Jun WANG Bao Yi

\*WANG Zi Shu \*WANG Xi Zhong \*CHEN Ming Fu

(Department of Radio-Electronics, \* Biology Department, Sichuan University, Chengdu 610064)

### ABSTRACT

The phenomena of cell electroporation due to low intensity transient electromagnetic pulses were observed by using a broad band transverse EM-wave cell (BTEM CELL). The experimental results and some analyses were presented.

Key words: Electromagnetic pulses Electroporation Cell fusion

\* This report is supported by National Natural Science Foundation of China(69771020).