

· 基础研究 ·

低频脉冲磁场对大鼠心肌微血管内皮细胞的影响

郭影 李飞 郭文怡 孙冬冬 路晓艳 张荣庆

【摘要】目的 观察低频脉冲磁场(LF-PMF)对体外培养大鼠心肌微血管内皮细胞(CMECs)增殖、迁移和成血管能力的影响。**方法** 用频率为 15 Hz,强度为 1.0 mT、1.4 mT、1.8 mT 的方波脉冲磁场干预 CMECs,每日作用 2 h,共 5 d。通过绘制细胞生长曲线观察细胞生长情况,流式细胞仪检测细胞周期,透射电镜观察细胞超微结构,划痕试验检测细胞迁移能力,管状结构形成试验检测细胞成血管能力。**结果** CMECs 经 1.4 mT 磁场干预后增殖加速,DNA 合成活跃,超微结构观察示线粒体数量增多、内质网发达等细胞活性增强表现,细胞迁移和管样结构形成能力增强,细胞迁移面积百分比达 86.10%。**结论** 磁场作用与磁场强度相关,1.4 mT 低频脉冲磁场可促进 CMECs 增殖、迁移,提高其细胞活性和成血管能力。

【关键词】 低频脉冲磁场; 心肌微血管内皮细胞; 增殖; 超微结构; 迁移; 管样结构形成

Effects of low frequency pulsed magnetic fields on cardiac microvascular endothelial cells GUO Ying*, LI Fei, GUO Wen-yi, SUN Dong-dong, LU Xiao-yan, ZHANG Rong-qing. *Department of Cardiology, Xijing Hospital, the 4th Military Medical University, Xi'an 710032, China

Corresponding author: GUO Wen-yi, Email: guowenyi@tom.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of low frequency pulsed magnetic fields (LF-PMFs) on the proliferation of cardiac microvascular endothelial cells (CMECs) and their ultrastructure, migration and angiogenic potential. **Methods** CMECs from rats were exposed in vitro to low frequency square wave pulsed magnetic fields (15 Hz) 2 h/d for 5 d. The cells were randomly divided into 4 groups (control, 1.0 mT, 1.4 mT and 1.8 mT). After 5 days of exposure, proliferation was detected in terms of the cells' growth curves, their cycle was detected with flow cytometry, and their ultrastructure was observed using transmission electric microscopy. A scratch assay was used to evaluate the CMECs migration, and their angiogenic potential was measured using a tube formation assay.

Results There was no significant effect of a 1.0 mT magnetic field on the cells' growth curve, cell cycle or ultrastructure. The 1.4 mT magnetic field did, however, accelerate the CMECs' proliferation. The peak of the cells' growth curve was higher and moved forward, and the percentage of cells in the S phase increased significantly compared with the control group. The effects of a 1.8 mT magnetic field on S phase development were similar to those of the 1.4 mT field, but the peak of the cells' growth curve was not moved forward. After exposure to a 1.4 mT or 1.8 mT magnetic field, the CMECs' ultrastructure changed and they appeared more viable and powerful. Their nucleoli became bigger and clearer than those of the control group. There were cavernous nucleoli or two nucleoli. The number of mitochondria increased. The endoplasmic reticulum was richer and full of protein secretions inside with many microvilli on the surface. The magnetic fields facilitated migration and tube formation in the CMECs significantly, and these effects were correlated with the magnetic field intensity (1.4 mT > 1.8 mT > 1.0 mT). The cell migratory percentage in the 1.4 mT group was 86.1%, while in the control group it was only 45.3%. When the CMECs were cultured on a collagen mixture, they were able to spontaneously reorganize into tube-like structures. After 5 d in culture, they grew to cord-like structures which were similar to the vascular trees seen in vivo. Tube-like and cord-like structures were much more numerous among the CMECs exposed to magnetic fields compared with the control group. **Conclusions** Magnetic fields of 1.4 mT can accelerate proliferation and migration, and elevate the activity and angiogenic potential of CMECs significantly.

【Key words】 Low frequency pulsed magnetic fields; Cardiac microvascular endothelial cells; Prolifera-

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2010.02.003

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30600580)

作者单位:710032 西安,第四军医大学西京医院心血管内科(郭影、李飞、郭文怡、孙冬冬、路晓艳、张荣庆);宁夏医科大学附属医院心脏中心(郭影)

通信作者:郭文怡,Email:guowenyi@tom.com

tion; Ultrastructures; Migration; Tube formation

20 世纪以来,缺血性心脏病逐年攀升,目前已成为威胁人类健康的主要疾病之一。血运重建、恢复血供是治疗缺血性心脏病的有效措施。心肌微血管内皮细胞(cardiac microvascular endothelial cells, CMECs)与心肌重塑和缺血心肌的血管生成密切相关,如何促进其增殖、迁移和形成新生血管具有重要的临床意义。

1988 年,人们发现脉冲电磁场能够促进离体内皮细胞的增殖和血管发生^[1],之后,人们展开了对脉冲磁场体内、外作用的广泛研究。目前,脉冲磁场作为非侵入性物理疗法治疗骨质疏松、骨折延迟愈合及骨不连已经取得了良好的临床效果,大量研究也表明脉冲磁场能够改变脐静脉内皮细胞、成骨细胞、表皮细胞、神经干细胞等的活性^[1-4]。有实验表明,脉冲磁场的生物学效应随磁场强度、频率甚至作用时间的不同而改变,其相互关系并非单调递增或单调递减,而是存在一定的“窗口”效应,细胞本身也有对磁场刺激产生反应的“生物窗”,即某一强度、频率的磁场只对某一特定的细胞群起作用^[5-7]。目前对磁场应用的有效频率、作用时间和强度等参数尚无定论,限制了磁场在临床上的应用。

本实验旨在研究频率和作用时间固定时,不同强度的低频脉冲磁场(low frequency pulsed magnetic fields, LF-PMF)对体外培养大鼠 CMECs 的生长曲线、细胞周期、超微结构、迁移和成血管能力的影响,并寻找该条件下磁场发挥作用的适宜强度,从而为低频脉冲磁场的临床应用提供实验依据。

材料与方法

一、实验动物

Sprague-Dawley 雄性大鼠,清洁级,体重 110 ~ 150 g,由第四军医大学实验动物中心提供。

二、主要仪器及试剂

仪器包括 MCY-1 型低频脉冲磁场治疗仪(由西安世纪测控技术研究所提供),2 组线圈桶:外直径为 230 mm,内直径为 170 mm,深 200 mm,输出磁场强度为 0.6 ~ 10 mT(峰值);倒置显微镜(日本 Olympus 公司);JEM-2000EX 透射电子显微镜(日本 Jeol 电子公司)。

试剂包括低糖 Dulbecco 改良 Eagle 培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)和胎牛血清(美国 Hyclone 公司);II 型胶原酶(美国 Invitrogen 公司);胰蛋白酶(西安宝信生物科技有限公司);L-谷氨酰胺(美国 Biosharp Amresco 公司);羟乙基哌

嗪乙磺酸和细胞外基质凝胶(美国 Sigma 公司);乙二胺四乙酸(生工生物工程上海有限公司);牛 I 型胶原(第四军医大学口腔组织工程中心)。

三、CMECs 的培养

用 1% 异戊巴比妥麻醉大鼠,无菌下取左心室,75% 酒精浸泡 16 s,磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)冲洗后修剪掉内外膜。将心肌组织剪碎成 1 mm³ 大小,0.2% II 型胶原酶水浴消化 5 ~ 6 min,吹打后用 0.25% 胰酶水浴,消化 4 ~ 5 min,完全培养液终止消化。用滤网过滤后,取上清液以 1000 转/min 离心 10 min,所得细胞用含 15% 胎牛血清、青霉素 100 U/ml、链霉素 100 U/ml 和 L-谷氨酰胺 300 mg/L 的低糖 DMEM 完全培养液重悬,接种入鼠尾胶原包被的培养瓶中。6 h 后首次换液,24 h 后再次换液。待细胞铺满瓶底的 80% ~ 90% 时消化传代,取生长状态良好的第 2 代细胞备用。

四、鼠尾胶原的制备

取 5 根成年大鼠鼠尾,置于 75% 的酒精中浸泡 30 min;无菌条件下撕下尾腱,剪碎。浸入 100 ml 0.1% 的醋酸中,置于 4℃ 冰箱中,不时振荡。48 h 后离心收集上清,用 0.1% 的醋酸稀释上清液,再用 0.1 mmol/L NaOH 调节酸碱度为中性后备用。

五、分组及曝磁处理

取生长状况良好的第 2 代 CMECs,根据磁场强度不同随机分为对照组、1.0 mT 组、1.4 mT 组和 1.8 mT 组。对照组不曝磁,其他条件均与磁场组一致。各磁场组 CMECs 均于传代第 2 天开始曝磁,采用频率为 15 Hz 的方波磁场刺激,每日 2 h,持续作用 5 d。

六、绘制细胞生长曲线

将 CMECs 消化制成单细胞悬液,调整细胞密度约 10⁴ 个/ml,均匀接种入 24 孔板,第 2 天起每天曝磁后取 3 孔细胞消化,细胞计数板计数,共计 7 d。所得数据以培养时间为横轴,细胞数对数为纵轴,用微软 Excel 2003 版软件绘制细胞生长曲线。

七、流式细胞术检测细胞周期

取约 1 × 10⁶ 个曝磁后 CMECs,离心并用 PBS 洗涤 2 次后加入 1 ml 生理盐水重悬,用预冷的无水乙醇 2 ml 快速混匀,固定细胞,4℃ 下固定 1 h 后弃固定液, PBS 洗涤 2 次后加入 100 μl PBS 重悬,并加入 1 ml DNA 荧光染料,室温下避光染色 15 min,上机(流式细胞仪)分析。

八、超微结构观察

CMECs 曝磁 5 d 后,用 PBS 洗涤 2 遍后消化,3000 转/min 离心 10 min,获得细胞团块;用电镜固定液固

定,常规脱水,包埋,超薄切片,醋酸铀-柠檬酸铅双染色,透射电子显微镜观察细胞超微结构并摄片。

九、细胞迁移试验

将密度为 5×10^5 个/ml 的 CMECs 接种于包被鼠尾胶原的 24 孔板,每组平行 3 个样本,常规培养至形成细胞单层。吸弃大部分培养液,送辐照中心进行 Co 60 辐射,辐射强度 10 Gy,时间 2 min。照射后在细胞单层上用 10 μ l 无菌移液器枪头划出“一”字形划痕,PBS 冲洗后加入完全培养液。于 100 倍倒置显微镜镜下随机选取 3 个视野拍照标记后曝磁,6 h 后再次拍摄标记区。用 Photoshop 软件测量 2 次拍摄视野划痕后无细胞面积,两者之差即为细胞迁移面积。计算细胞迁移面积占初始划痕区面积百分比,所得数值进行统计学比较。

十、管样结构形成试验

ECM-gel 和牛 I 型胶原按 1:4 混合,包被 48 孔板。取密度为 $(2 \sim 3) \times 10^4$ 个/ml 的 CMECs 500 μ l,接种入 48 孔板,每组平行 3 个样本。细胞贴壁后开始曝磁,24 h 后拍照,5 d 后再次拍照。

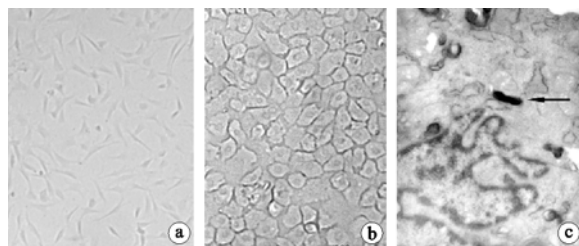
十一、统计学分析

所有数据均用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,各组间比较采用 SPSS 12.0 版统计软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、大鼠 CMECs 的培养和鉴定

微血管段培养 6 h 后大部分贴壁,3~4 d 后细胞集落生长,呈长梭形或多角形,折光性好(图 1a)。1 周左右细胞呈典型的“铺路石”样(图 1b)。电镜下见内皮细胞特有的超微结构——Weible-Palade(WP)小体(图 1c)。



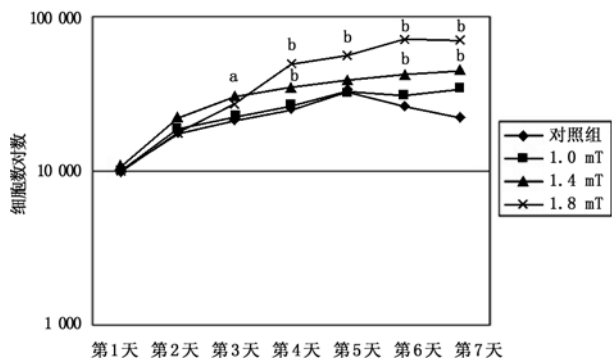
注:a. 培养第 4 天($\times 100$);b. 培养第 1 周($\times 100$);c. 培养第 1 周,箭头示 WP 小体(醋酸铀-柠檬酸铅双染色, $\times 30\,000$)

图 1 大鼠 CMECs 的培养与鉴定

二、细胞生长曲线

1.0 mT 组与对照组比较,第 7 天细胞数差异有统计学意义。1.4 mT 组与对照组比较,细胞生长曲线明显前移并且峰值增高,第 3,4,6,7 天细胞数差异有统计学意义。1.8 mT 组与对照组比较,第 4~7 天细胞

数差异有统计学意义。见图 2。



注:与对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$

图 2 不同强度 LF-PMF 刺激时大鼠 CMECs 的生长曲线

三、LF-PMF 对 CMECs 细胞周期的影响

流式细胞仪检测结果显示,细胞经 5 d 曝磁后,对照组与其余各组比较, G_1 期、S 期和 G_2 期各期的细胞比例差异均有统计学意义,其中 1.4 mT 组变化最为显著, G_1 期明显缩短,见表 1。

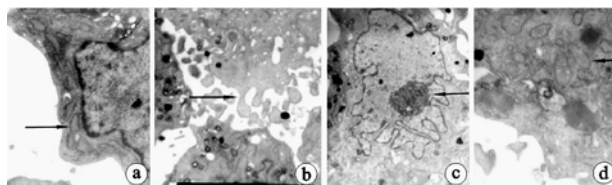
表 1 LF-PMF 对大鼠 CMECs 细胞周期的影响($\%$, $\bar{x} \pm s$)

组 别	孔数	G_1	S	G_2
对照组	3	93.00 $\pm$ 0.24	3.90 $\pm$ 0.18	3.20 $\pm$ 0.08
1.0 mT 组	3	91.10 $\pm$ 0.25 ^b	4.60 $\pm$ 0.13 ^b	4.30 $\pm$ 0.12 ^b
1.4 mT 组	3	84.80 $\pm$ 0.35 ^b	13.10 $\pm$ 0.15 ^b	2.10 $\pm$ 0.50 ^b
1.8 mT 组	3	86.90 $\pm$ 0.18 ^b	9.10 $\pm$ 0.15 ^b	3.90 $\pm$ 0.34 ^a

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$

四、LF-PMF 对 CMECs 超微结构的影响

透射电镜观察见 1.0 mT 磁场对 CMECs 超微结构无明显影响。1.4 mT 和 1.8 mT 磁场作用后 CMECs 呈现细胞核核仁大而明显,以常染色质为主,个别细胞有海绵状核仁和双核仁;线粒体形态正常,数量增多,嵴轻度扩张;内质网发达,内可见少量蛋白分泌物;细胞表面微绒毛增多,见图 3。



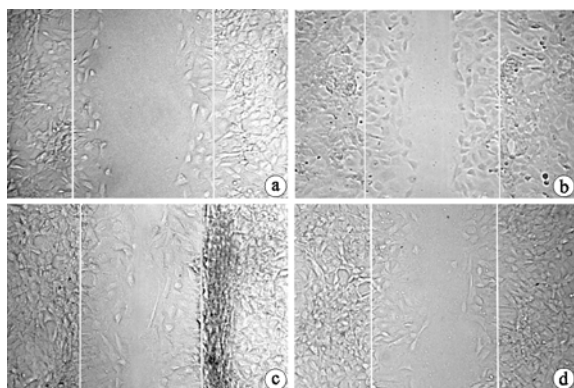
注:a. 1.4 mT 组,箭头示内质网($\times 30\,000$);b. 1.4 mT 组,箭头示微绒毛($\times 12\,000$);c. 1.8 mT 组,箭头示海绵状细胞核($\times 15\,000$);d. 1.8 mT 组,箭头示线粒体($\times 30\,000$)

图 3 曝磁第 5 天 CMECs 超微结构改变(醋酸铀-柠檬酸铅双染色)

五、LF-PMF 对 CMECs 迁移能力的影响

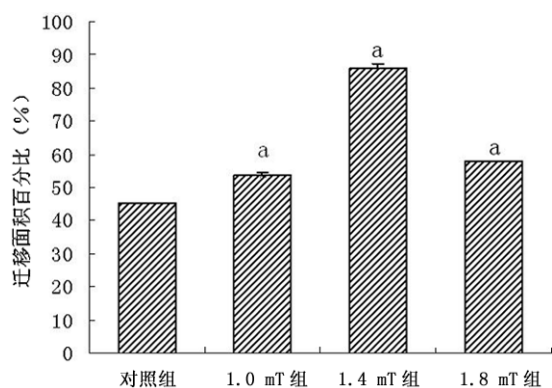
对照组迁移面积百分比($45.30\% \pm 0.20\%$)与 1.0 mT 组($53.90\% \pm 0.10\%$)、1.4 mT 组($86.10\% \pm 0.05\%$)和 1.8 mT 组($57.80\% \pm 0.15\%$)比较,差异

均有统计学意义($P < 0.01$),特别是 1.4 mT 组迁移细胞已接近填满划痕区域,见图 4 和 5。



注:a. 对照组;b. 1.0 mT 组;c. 1.4 mT 组;d. 1.8 mT 组

图 4 不同强度 LF-PMF 作用时 CMECs 的迁移情况($\times 100$)



注:与对照组比较,^a $P < 0.05$

图 5 不同强度 LF-PMF 作用时 CMECs 迁移面积百分比比较

六、LF-PMF 对 CMECs 成血管能力的影响

CMECs 在包被细胞外基质凝胶的培养板上自发形成管腔样结构,接种后 24 h 拍照即见各组均有管腔样结构形成,各曝磁组与对照组比较,管腔样结构增

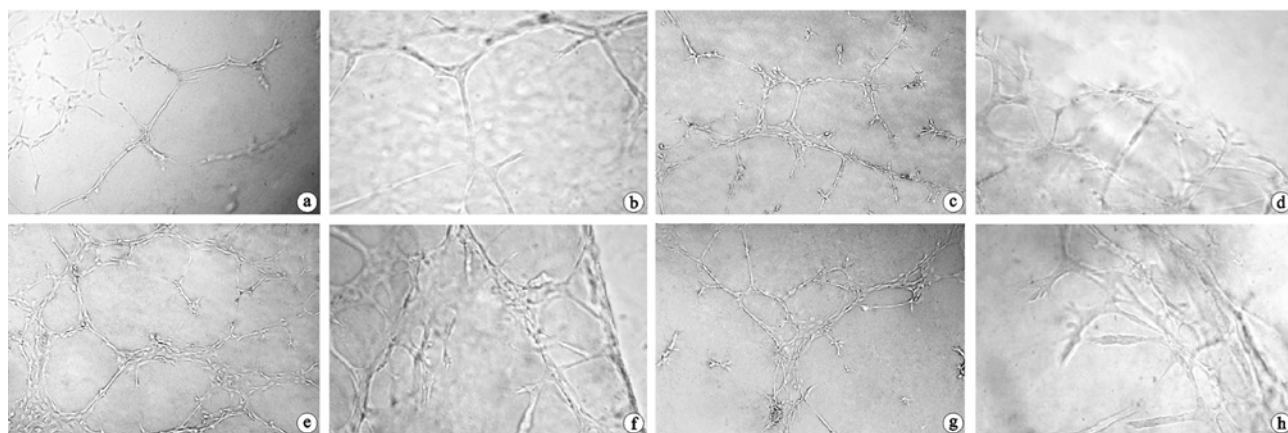
加。板内所铺胶原第 3 天开始收缩,CMECs 在收缩的胶原内伸展生长,相互连接形成血管树样,各曝磁组与对照组比较,树样结构密度大,分枝多,其中 1.4 mT 组最为显著,见图 6。

讨 论

本实验取材于 75% 酒精浸泡 16 s 并修剪掉内外膜的左心室心肌组织,去除了冠脉血管和内膜血管,利用酶消化法和差速贴壁法培养细胞,该细胞生长 1 周后呈典型的内皮细胞“铺路石”样外观,电镜下可见 WP 小体(该小体系内皮细胞所特有的杆状细胞器,参与蛋白质Ⅷ因子的合成与储存,是鉴定内皮细胞的依据之一),证明该细胞是 CMECs。

磁场作为一种操作简单的无创性物理疗法用于临床治疗由来已久,人们发现磁场可以通过促进局部血管新生,成骨细胞合成基质和提高碱性磷酸酶活性来加快骨折愈合^[2,8]。Vianale 等^[9]发现,磁场能促进人角质化细胞生长,减少炎症因子产生,抑制炎症进程。Callaghan 等^[3]研究发现,磁场能够通过增加内源性成纤维细胞生长因子-2(fibroblast growth factor-2, FGF-2)释放,促进正常小鼠和糖尿病小鼠皮肤创伤模型的皮肤愈合。

不同细胞系对磁场的反应不同。Yen-Patton 等^[1]研究表明,内皮细胞对磁场反应敏感。本实验选取与血管新生密切相关的 CMECs 作为研究对象。脉冲磁场的生物学作用存在明显的“窗口”效应。Lee 和 McLeod^[10]认为最有效的磁场频率应接近机体正常功能活动频率,人体肌肉收缩的动力频率在 10 ~ 100 Hz 间,本实验选取 15 Hz 的脉冲磁场刺激 CMECs,结果发现:1.4 mT 脉冲磁场能促进 CMECs 增殖,使其提前进入对数生长期,细胞周期 G_1 期缩短, DNA 合成活跃,



注:a. 对照组培养第 1 天($\times 100$);b. 对照组培养第 5 天($\times 200$);c. 1.0 mT 组曝磁第 1 天($\times 100$);d. 1.0 mT 组曝磁第 5 天($\times 200$);e. 1.4 mT 组曝磁第 1 天($\times 100$);f. 1.4 mT 组曝磁第 5 天($\times 200$);g. 1.8 mT 组曝磁第 1 天($\times 100$);h. 1.8 mT 组曝磁第 5 天($\times 200$)

图 6 CMECs 在不同强度 LF-PMF 作用下形成血管样结构

细胞数目明显增加。同时,应用透射电镜观察超微结构发现,磁场干预后细胞分裂增殖活跃;线粒体数目增多,能量储备充足;内质网发达,细胞合成蛋白丰富;细胞表面微绒毛增多。超微结构的变化说明磁场在促进 CMECs 增殖的同时还能提高其细胞活性。1.8 mT 的脉冲磁场与 1.4 mT 脉冲磁场有相似的生物学效应,但未能使 CMECs 提前进入对数生长期。1.0 mT 脉冲磁场仅表现为促进 DNA 合成,对细胞生长曲线和超微结构都无明显影响。

内皮细胞迁移是血管发生的基本环节,本实验采用体外划痕法观察了脉冲磁场对 CMECs 迁移能力的影响。试验中我们用 Co 60 辐射 CMECs,抑制了细胞的增殖能力,划痕区出现的细胞均可视为迁移细胞^[11]。研究结果显示,磁场可明显促进 CMECs 迁移,迁移率和磁场强度相关,和对照组比较,1.4 mT 磁场作用最强,细胞迁移百分比高达 86.10%,1.8 mT 磁场作用次之,1.0 mT 磁场作用最弱。细胞迁移是一个多步骤的协调过程,细胞骨架蛋白、微丝和微管的动态变化为细胞运动提供主要动力。Delle 等^[12]研究发现,人脐静脉内皮细胞经磁场刺激后,其细胞骨架成分发生重排,此变化是否与细胞迁移能力的改变有关及具体机制还有待研究。

血管形成机制包括血管新生、血管发生和动脉形成。成人缺血性心脏病的血管形成机制主要是以出芽方式实现的血管新生。Tepper 等^[13]研究发现,脉冲磁场能够刺激内皮细胞释放 FGF-2,轻度上调血管生长因子如血管生成素-2 (angiopoietin-2, Ang-2)、血小板生成素 (thrombopoietin, TPO) 和表皮生长因子-2 (epidermal growth factor-2, EGF-2),从而促进人脐静脉内皮细胞在体内外的血管化。Gallaghan 等^[3]也发现,脉冲磁场通过促进内源性 FGF-2 释放,可加快正常人和糖尿病患者创伤区血管新生。可见脉冲磁场可能通过上调 FGF-2 等生长因子而影响周围组织细胞,刺激局部血管发生。CMECs 的增殖、迁移和管样结构形成是血管新生的基础^[14]。本实验证明,脉冲磁场也能促进 CMECs 的体外血管化。我们采用的胶原混合物富含多种胶原成分和生长因子,类似于体内基质,有收缩特性,CMECs 在胶原混合物表面自发形成管腔样结构,经脉冲磁场干预后,管腔样结构数量增多,胶原收缩后管腔样结构形态发生变化而更接近体内血管树。结果显示,同样是 1.4 mT 磁场作用强于 1.8 mT 磁场作用,1.0 mT 磁场作用最弱。

总之,磁场生物学作用与强度相关,1.4 mT 的低

频脉冲方波磁场对体外培养的 CMECs 有促进其增殖、迁移的作用,可提高细胞活性,增强成血管能力。但关于磁场应用的适宜时间窗、强度窗及作用机制还有待深入研究。

参 考 文 献

- [1] Yen-Patton GP, Patton WF, Beer DM, et al. Endothelial cell response to pulsed electromagnetic fields: stimulation of growth rate and angiogenesis in vitro. *J Cell Physiol*, 1988, 134: 37-46.
- [2] Martino CF, Belchenko D, Ferguson V, et al. The effects of pulsed electromagnetic fields on the cellular activity of SaOS-2 cells. *Bioelectromagnetics*, 2008, 29: 125-132.
- [3] Callaghan MJ, Chang EI, Seiser N, et al. Pulsed electromagnetic fields accelerate normal and diabetic wound healing by increasing endogenous FGF-2 release. *Plast Reconstr Surg*, 2008, 121: 130-141.
- [4] Piacentini R, Ripoli C, Mezzogori D, et al. Extremely low-frequency electromagnetic fields promote in vitro neurogenesis via upregulation of Ca(v)1-channel activity. *J Cell Physiol*, 2008, 215: 129-139.
- [5] Lin Y, Nishimura R, Nozaki K, et al. Effects of pulsing electromagnetic fields on the ligament healing in rabbits. *J Vet Med Sci*, 1992, 54: 1017-1022.
- [6] 席晓莉, 吴道澄, 张建保, 等. 极低频脉冲磁场对小鼠自由基及血液流变学的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 1999, 21: 185-185.
- [7] Sabine I, Alexander P, Elisabeth D, et al. Cell type-specific genotoxic effects of intermittent extremely low-frequency electromagnetic fields. *Mutat Res*, 2005, 583: 184-188.
- [8] Midura RJ, Ibiwoye MO, Powell KA, et al. Pulsed electromagnetic field treatments enhance the healing of fibular osteotomies. *J Orthop Res*, 2005, 23: 1035-1046.
- [9] Vianale G, Reale M, Amerio P, et al. Extremely low frequency electromagnetic field enhances human keratinocyte cell growth and decreases proinflammatory chemokine production. *Br J Dermatol*, 2008, 158: 1189-1196.
- [10] Lee JH, McLeod KJ. Morphologic responses of osteoblast-like cells in monolayer culture to ELF electromagnetic fields. *Bioelectromagnetics*, 2000, 21: 129-136.
- [11] 王玉祥, 田野, 阎保强, 等. 原代培养人脐静脉内皮细胞电离辐射效应的初步研究. *肿瘤防治杂志*, 2003, 10: 1182-1185.
- [12] Delle Monache S, Alessandro R, Iorio R, et al. Extremely low frequency electromagnetic fields (ELF-EMFs) induce in vitro angiogenesis process in human endothelial cells. *Bioelectromagnetics*, 2008, 29: 640-648.
- [13] Tepper OM, Callaghan MJ, Chang EI, et al. Electromagnetic fields increase in vitro and in vivo angiogenesis through endothelial release of FGF-2. *FASEB J*, 2004, 18: 1231-1233.
- [14] Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*, 2000, 6: 389-395.

(收稿日期: 2009-05-20)

(本文编辑: 吴 倩)