

· 基础研究 ·

恒磁场对 C-反应蛋白作用下大鼠内皮祖细胞增殖、凋亡及一氧化氮分泌的影响

程何祥 许旭东 张荣庆 栾荣华 郭文怡 王海昌 于振涛 周廉

【摘要】目的 观察恒磁场(CMF)对 C 反应蛋白(CRP)作用下大鼠骨髓来源内皮祖细胞(EPC)增殖、凋亡及一氧化氮(NO)分泌的影响。**方法** 密度梯度离心法获得 SD 雄性大鼠的骨髓 EPC, 无菌条件下培养 4 d; 实验分为 3 组: 空白对照组、CRP(12 $\mu\text{g/ml}$) 组及 CRP + CMF(0.1 mT、0.5 mT、1.0 mT) 组。各组皆于 24 h 后收集标本, MTT 法检测细胞增殖能力, 流式细胞仪检测细胞凋亡率, 硝酸还原酶法检测培养液中的 NO 含量。**结果** 与对照组相比, CRP 组细胞增殖(吸光度)显著降低($P < 0.05$), NO 分泌量显著降低($P < 0.05$), 细胞凋亡率显著增加($P < 0.05$); CRP + 0.5 mT 和 1.0 mT CMF 组细胞增殖吸光度显著高于 CRP 组($P < 0.05$), NO 分泌量显著高于 CRP 组($P < 0.05$), 细胞凋亡率显著低于 CRP 组($P < 0.05$)。**结论** 0.5 mT 和 1.0 mT CMF 可拮抗 CRP 的作用, 促进 EPC 的增殖及 NO 分泌并抑制 EPC 凋亡。

【关键词】 恒磁场; 内皮祖细胞; C 反应蛋白; 细胞增殖; 凋亡

Effects of constant magnetic field on proliferation, apoptosis and nitric oxide secretion of rat endothelial progenitor cells intervened by C-reactive protein CHENG He-xiang*, XU Xu-dong, ZHANG Rong-qing, LUAN Rong-hua, GUO Wen-yi, WANG Hai-chang, YU Zhen-tao, ZHOU Lian. * Department of Cardiology, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

【Abstract】Objective To investigate the effects of constant magnetic field (CMF) on proliferation, apoptosis and nitric oxide (NO) secretion of rat bone marrow-derived endothelial progenitor cells (EPCs) intervened by C-reactive protein (CRP). **Methods** EPCs were isolated from rat bone marrow by density gradient centrifugation and cultured on fibronectin-coated dishes. The cells were divided into five groups, i. e., control group, CRP (12 $\mu\text{g/ml}$) group, CRP plus CMF (0.1, 0.5, 1.0 mT) groups. Samples were collected 24 hours after incubation. Cell proliferation was measured by MTT chromatometry. Apoptosis rate was detected by flow-cytometry. NO content of culture medium was measured by nitrate reductase method. **Results** As compared with control group, cell proliferation in CRP group reduced significantly (0.265 ± 0.008 vs 0.316 ± 0.011 , $P < 0.05$), NO secretion also decreased significantly [$(22.7 \pm 4.5) \mu\text{mol/L}$ vs $(37.6 \pm 5.8) \mu\text{mol/L}$, $P < 0.05$], cell apoptosis rate elevated significantly [$(10.8 \pm 0.8)\%$ vs $(4.2 \pm 0.5)\%$, $P < 0.05$]. Cell proliferation in CRP plus 0.5 mT or 1.0 mT CMF group (0.295 ± 0.009 , 0.302 ± 0.010) were much more than those in CRP group ($P < 0.05$), NO secretion contents [$(28.3 \pm 4.9) \mu\text{mol/L}$, $(29.2 \pm 5.6) \mu\text{mol/L}$] were also much more than those in CRP group ($P < 0.05$), apoptosis rate [$(7.4 \pm 0.5)\%$, $(6.9 \pm 0.6)\%$] was significantly lower than that in CRP group ($P < 0.05$). **Conclusion** CMF at intensity of 0.5 mT and 1.0 mT can antagonize the effects of CR, promote proliferation of EPCs and secretion of NO and inhibit apoptosis rate of EPCs.

【Key words】 Constant magnetic field; Endothelial progenitor cells; C-reactive protein; Cell proliferation; Apoptosis

近年来经皮腔内冠状动脉介入治疗(percutaneous coronary intervention, PCI)将冠心病的治疗带入一个新时代,但高达 20%~30% 的再狭窄率严重影响手术疗效。研究发现,内皮损伤及功能失调是再狭窄发生的

启动因素,促进内皮恢复已成为预防 PCI 术后再狭窄的新策略^[1]。内皮祖细胞(endothelial progenitor cell, EPC)是一种起源于骨髓的原始细胞,以 CD133、CD34、VEGF- R_2 等为标志,具有内皮系分化潜能,在一定条件下可定向分化为成熟的内皮细胞,参与损伤血管内皮的修复,并可以促进支架内皮化,因而对预防 PCI 后再狭窄具有重要意义^[2]。已知冠心病患者体内 C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP)的分泌增加,是 PCI 术后再狭窄主要的预测因子之一;一定浓度的 CRP 可抑制 EPC 的分化并促进其凋亡,降低 EPC 内皮

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2009.02.006

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30270396)

作者单位:710032 西安,第四军医大学西京医院心脏内科(程何祥、许旭东、张荣庆、栾荣华、郭文怡、王海昌);西北有色金属研究院(于振涛、周廉)

型一氧化氮合酶 mRNA 的表达^[3]。研究证实恒磁场 (constant magnetic field, CMF) 能促进血管内皮细胞的增殖、迁移, 具有抑制 PCI 后再狭窄的细胞生物学基础^[4,5]。本研究拟在体外培养条件下, 观察 CMF 对 CRP 作用下 EPC 增殖、凋亡及一氧化氮 (nitric oxide, NO) 分泌能力的影响, 旨在为应用 CMF 促进 PCI 后内皮修复提供实验依据。

材料与方法

一、材料与试剂

雄性 SD 大鼠, 体质量 (100 ± 5) g, 由第四军医大学实验动物中心提供。试剂和材料: Ficoll 淋巴细胞分离液购自中国医学科学院生物工程医学研究所, 胎牛血清为 Hyclone 产品; M199 为 Gibco 产品, 血管内皮生长因子 (VEGF) 及碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 为美国 CYTOLAB 产品, CRP 为美国 CALBIOCHEM 产品, NO 试剂盒购自南京建成生物工程研究所, DiI-ac-LDL 为美国 invitrogen 公司产品, FITC-UEA-I 为美国 Sigma 产品; ApoAlert™ AnnexinV 凋亡检测试剂盒为美国 Clontech 公司产品。仪器: 荧光显微镜 (Leica), 倒置相差显微镜 (Olympus), 离心机 (Sorvall), 酶联免疫检测仪 (美国 Bio-RAD 公司), Elite ESP 型流式细胞仪 (美国 COULTER 公司), UV22450 分光光度计 (日本 SHIMADZU 公司), CMF 发生装置 (西北工业大学稀土永磁研究所)。

二、细胞培养与检测方法

1. 大鼠骨髓 EPC 的分离: 颈椎脱臼法处死大鼠, 无菌条件下取出四肢长骨, 750 ml/L 酒精内浸泡 5 min, 用含肝素的培养液冲洗骨髓腔, 收集细胞悬液, 以 1:2 的比例叠加到 Ficoll 淋巴细胞分离液上, 保持液面清晰, 2000 r/min 离心 20 min, 小心吸取中间云雾状单核细胞层, 5 倍体积 M199 重悬, 1500 r/min 离心 10 min, 洗涤 2 次后弃上清, 用含胎牛血清 (100 ml/L)、VEGF (10 μ g/L) 及 bFGF (10 μ g/L) 的 M199 重悬细胞, 调整浓度为 4×10^8 /L, 接种于培养瓶中, 取 4 h 未贴壁的细胞, 在 37℃、50 ml/L CO₂ 条件下培养。

2. EPC 的表型鉴定: 将培养 4 d 的细胞与 DiI-ac-LDL (2.4 μ g/ml) 37℃ 下孵育 1 h, 然后用 40 g/L 多聚甲醛固定 10 min。PBS 液浸洗后将 FITC-UEA-I (10 μ g/ml) 加于上述标本, 37℃ 下孵育 1 h。用荧光显微镜进行鉴定, DiI-ac-LDL 和 FITC-UEA-I 染色双阳性细胞为正在分化的 EPC。

3. 实验分组: 细胞培养 4 d 后, 用 2.5 g/L 胰蛋白酶、0.2 g/L 乙二胺四乙酸消化, 全培养液重悬呈单细胞悬液后, 分别接种于 96 孔培养板 (以 1.5×10^4 细

胞/孔的密度) 及培养瓶 (以 5×10^5 细胞/瓶的密度)。实验分为 3 组: 空白对照组 (仅加入全培养液)、CRP (12 μ g/ml) 组及 CRP + CMF (0.1 mT、0.5 mT、1.0 mT) 组。各组皆于 24 h 后收集标本。CMF 干预的方法: 培养板置于 CMF 发生装置的 N 极与 S 极两极之间, 相应位置的磁感应强度分别为 0.1 mT、0.5 mT、1.0 mT, 于 CRP 加入的同时行 CMF 干预, 持续 24 h。

4. MTT 比色法检测细胞增殖: 96 孔培养板收集的各组标本, 每孔加浓度为 5 g/L 的 MTT 溶液 20 μ l, 在 37℃、50 ml/L CO₂ 孵箱中继续孵育 4 h; 终止培养, 吸弃上清液, 每孔加入 150 μ l 的 DMSO, 振荡 10 min, 在酶联免疫检测仪上 490 nm 波长处测定各孔吸光度 (A_{490}), 用只加培养液不加细胞的空白孔调零。

5. 流式细胞仪双标法检测细胞凋亡率: 各组细胞用 0.01 mol/L PBS 冲洗, 1.25 g/L 胰蛋白酶消化收集细胞; 离心去除固定液, 用含血清培养液洗 1 遍, 用 ApoAlert™ AnnexinV 凋亡检测试剂盒染色, 5×10^5 细胞用 1 $\times$ Binding buffer 漂洗 1 次; 细胞重悬于 200 μ l 1 $\times$ Binding buffer。加入 Annexin V 5 μ l 和碘化丙啶 (PI) 10 μ l, 室温避光 10 ~ 20 min, 上机 (流式细胞仪) 测试。Annexin V⁺/PI⁻ 细胞数量代表凋亡细胞数量。

6. NO 水平测定: 采用硝酸还原酶法。每孔吸取上清 100 μ l, 按试剂盒说明书检测各孔上清 NO 水平。

三、统计学分析

实验重复 8 次, 数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示。应用 SPSS 10.0 进行数据统计, 采用单因素多组资料的方差分析 (One-Way ANOVA), 进行 F 检验 (方差不齐时采用 F' 检验), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、细胞形态观察与表型鉴定

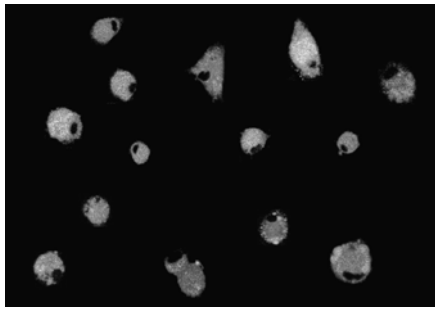
细胞培养第 4 天, 倒置相差显微镜观察细胞成多角形; DiI-ac-LDL 与 FITC-UEA-I 双染后, 经激光共聚焦显微镜观察显示, 95% 以上的细胞呈现 DiI-ac-LDL 和 FITC-UEA-I 双阳性表达 (桔黄色), 为正在分化的 EPC (图 1)。

二、CRP 对 EPC 增殖、凋亡、NO 分泌的影响

12 μ g/ml 的 CRP 作用 24 h 后, 与空白对照组相比, EPC 增殖 (吸光度) 和 NO 分泌量明显降低, 凋亡率明显升高 ($P < 0.05$), 表 1。

三、CMF 对 CRP 作用下 EPC 增殖、凋亡及 NO 分泌的影响

与 CRP 组相比, 0.5 mT 和 1.0 mT CMF 组 EPC 的增殖 (吸光度) 显著增高, 凋亡率显著降低, NO 分泌量显著增高 ($P < 0.05$), 表 1。



注:显示 DiI-ac-LDL 和 FITC-UEA-I 双染阳性,呈桔黄色,为正在分化的 EPC

图 1 激光共聚焦显微镜检测细胞表面标志(DiI-ac-LDL 和 FITC-UEA-I 双染, $\times 400$)

表 1 各组细胞增殖(吸光度)、凋亡率及 NO 的分泌量的比较($n=8, \bar{x} \pm s$)

组 别	吸光度 (A_{490})	凋亡率 (%)	NO 分泌量 ($\mu\text{mol/L}$)
空白对照组	0.316 ± 0.011	4.2 ± 0.5	37.6 ± 5.8
CRP 组	0.265 ± 0.008^a	10.8 ± 0.8^a	22.7 ± 4.5^a
CRP + 0.1 mT CMF 组	0.269 ± 0.007	10.3 ± 0.6	23.9 ± 5.2
CRP + 0.5 mT CMF 组	0.295 ± 0.009^b	7.4 ± 0.5^b	28.3 ± 4.9^b
CRP + 1.0 mT CMF 组	0.302 ± 0.010^b	6.9 ± 0.6^b	29.2 ± 5.6^b

注:与空白对照组比较, $^aP < 0.05$;与 CRP 组比较, $^bP < 0.05$

讨 论

研究表明,内皮损伤及功能失调是 PCI 术后再狭窄发生的启动因素^[1],而骨髓来源 EPC 的动员与分化在 PCI 术后内皮恢复中起重要作用^[2]。一定浓度的 CRP 可促进培养的 EPC 凋亡,抑制 EPC 表面标志内皮细胞特异性的 Tie-2、lectin 及 VE-cadherin 的表达,降低 EPC 内皮型一氧化氮合酶 mRNA 的表达,减少 NO 的释放^[3],因此 CRP 可能通过抑制 EPC 数量及功能而减弱 EPC 对损伤内皮的修复能力。目前促进内皮恢复的方法包括:药物(他汀类、雌激素等)动员 EPC 向球囊损伤部位迁移、内皮细胞生长因子基因导入治疗、支架表面种植内皮细胞或 EPC、支架表面包被 CD34 + 抗体以捕捉 EPC 等。其中内皮祖细胞捕捉支架的安全性和可行性最近已被临床试验所证实,但尚未达到非常理想的远期效果^[6]。为此,仍有必要继续探索有效促进内皮恢复的新措施,而磁场可能是一种有效的干预手段。

已知磁场作用于机体后可引起一系列生物学效应,如改善微循环、抗炎抗氧化、影响细胞增殖等,适当强度的磁场有可能影响再狭窄产生的诸多因素。近年研究发现,成年犬磁化冠状动脉内支架植入术后再狭窄率显著低于对照组^[7],磁场暴露 1 周明显抑制小鼠动静脉旁路的新生内膜形成^[8],将不锈钢支架磁化后植入猪的冠状动脉,可增强内皮祖细胞的捕获、加快支

架局部内皮化^[9],表明磁场对血管内支架植入及动脉旁路移植术后内膜增殖与再狭窄有抑制作用。体外实验研究证实,弱 CMF 能促进血管内皮细胞的增殖、迁移,具有抑制 PCI 后再狭窄的细胞生物学基础^[4,5]。李飞等^[10]发现,低频脉冲电磁场还可促进大鼠骨髓来源 EPC 的增殖及分化。但 CMF 是否对 EPC 产生类似的影响尚不清楚。

本研究观察了 CMF 对 CRP 作用下大鼠骨髓来源 EPC 增殖、凋亡及 NO 分泌的影响,结果发现:12 $\mu\text{g/ml}$ 的 CRP 可抑制 EPC 的增殖,促进其凋亡,抑制 NO 分泌;而 0.5 mT 和 1.0 mT 的 CMF 能对抗 CRP 对 EPC 的作用,促进 EPC 的增殖及 NO 分泌,抑制 EPC 凋亡。这表明弱 CMF 能通过对 EPC 增殖及功能的影响来促进内皮修复,因此弱 CMF 干预有望成为预防 PCI 术后再狭窄的新途径。

然而 CMF 的作用机制尚不清楚,可能与磁场影响生物膜对带电离子的通透能力、改变培养液中离子浓度和运动速度,进而影响细胞的代谢、生理和生化过程有关。关于更强 CMF(> 1.0 mT)对 EPC 的影响也需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Versari D, Lerman LO, Lerman A. The importance of reendothelialization after arterial injury. *Curr Pharm Des*, 2007, 13: 1811-1124.
- [2] Werner N, Nickenig G. Clinical and therapeutic implications of EPC biology in atherosclerosis. *J Cell Mol Med*, 2006, 10: 318-332.
- [3] Verma S, Kuliszewski MA, Li SH, et al. C-Reactive protein attenuates endothelial progenitor cell survival, differentiation, and function: further evidence of a mechanistic link between C-reactive protein and cardiovascular disease. *Circulation*, 2004, 109: 2058-2067.
- [4] Matsumoto H, Kira K, Kondoh K, et al. Effects of alternately static micromagnetic fields on intravascular endothelial lining. *Angiology*, 1992, 43: 757-764.
- [5] 李飞,贾国良,张荣庆,等. 恒磁场对人脐静脉内皮细胞增殖的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2003, 25: 133-135.
- [6] Aoki J, Serruys PW, van Beusekom H, et al. Endothelial progenitor cell capture by stents coated with antibody against CD34: the HEALING-FIM (Healthy Endothelial Accelerated Lining Inhibits Neointimal Growth-First In Man) registry. *J Am Coll Cardiol*, 2005, 45: 1574-1579.
- [7] Lv AL, Jia GL, Gao G, et al. The effect of magnetic stent on coronary restenosis after PTCA in dogs. *Chin Med J*, 2001, 114: 821-823.
- [8] Henderson B, Tagwerker A, Mayrl C, et al. Progression of arteriovenous bypass restenosis in mice exposed to a 50 Hz magnetic field. *Cell Stress Chaperones*, 2003, 8: 373-380.
- [9] Pislariu SV, Harbuzariu A, Gulati R, et al. Magnetically targeted endothelial cell localization in stented vessels. *J Am Coll Cardiol*, 2006, 48: 1839-1845.
- [10] 李飞,程康,王海昌,等. 脉冲电磁场对原代大鼠骨髓来源内皮前体细胞生长及分化的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2007, 29: 514-516.

(修回日期:2008-12-26)

(本文编辑:阮仕衡)