

· 基础研究 ·

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

李飞 程康 王海昌 徐可为 郭文怡 张荣庆

【摘要】目的 探讨脉冲电磁场对内皮前体细胞增殖及分化的影响。方法 采用密度梯度离心法分离 SD 大鼠骨髓内皮前体细胞,将细胞分为对照组及磁场组。磁场组细胞于培养第 5 天后给予低频脉冲电磁场干预,直至培养终点。细胞增殖活性采用 MTT 法测定,用流式细胞仪检测Ⅷ因子相关抗原、NOS₃ 表达阳性细胞。结果 从磁场作用第 5 天开始,磁场组细胞增殖活性明显高于对照组;磁场作用第 3 天时,磁场组细胞Ⅷ因子相关抗原、NOS₃ 表达阳性细胞数量均明显高于对照组,这种增高趋势持续至培养终点。结论 低频脉冲电磁场可促进大鼠骨髓来源内皮前体细胞的增殖及分化。

【关键词】 内皮前体细胞; 增殖; 分化; 脉冲电磁场

The effects of pulsed electromagnetic fields on proliferation and differentiation of endothelial progenitor cells

LI Fei*, CHENG Kang, WANG Hai-chang, XU Ke-wei, GUO Wen-yi, ZHANG Rong-qing. * Department of Cardiology, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

【Abstract】 Objective To investigate the effects of pulsed electromagnetic fields (PEMFs) on proliferation and differentiation of endothelial progenitor cells (EPCs). Methods EPCs were isolated from rat bone marrow by density gradient centrifugation. EPCs were exposed to PEMFs from the 5th day to the end of culture. MTT was used to measure the proliferation of EPCs. The expression of Ⅷ-related antigen and NOS₃ was evaluated by flow cytometry.

Results Compared with the control, the proliferating ability of EPCs exposed to PEMFs was stronger; the number of Ⅷ-related antigen and NOS₃ positive cells increased significantly in EPCs exposed in PEMFs. Conclusion PEMFs promotes the proliferation and differentiation of rat bone marrow EPCs.

【Key words】 Endothelial progenitor cells; Proliferation; Differentiation; Pulsed electromagnetic fields

内皮前体细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)是一组存在于骨髓、脐血及外周血中能定向分化为成熟血管内皮细胞的干细胞,在体内一些活性因子的调控下,内皮前体细胞能向缺血组织及血管损伤部位归巢,在新生血管形成及血管损伤修复过程中发挥重要作用。但是成体中骨髓及外周血内皮前体细胞数量较少,内皮前体细胞代偿性血管发生及内皮修复作用有限,故如何增加内皮前体细胞数量,促进内皮前体细胞动员、归巢已成为目前心血管领域中的一项研究热点。近年来研究发现,脉冲电磁场(pulsed electromagnetic fields, PEMFs)能促进骨髓间充质干细胞、血管内皮细胞的增殖、迁移及血管新生;然而关于 PEMFs 对内皮前体细胞的生物学效应则罕见报道。本研究探讨了低频 PEMFs 对大鼠骨髓来源内皮前体细胞增殖及分化功能的影响。现将相关结果报道如下。

材料与方法

一、材料

作者单位:710032 西安,西安交通大学材料与工程学院(李飞、徐可为);第四军医大学西京医院心脏内科(李飞、程康、王海昌、郭文怡、张荣庆)

共选取体重 100 g 左右的雄性 SD 大鼠 5 只,由第四军医大学动物实验中心提供。

二、实验仪器与试剂

脉冲电磁场发生仪由第四军医大学生物医学工程系研制,磁场频率为 15 Hz,磁感应强度为 0 ~ 100 mT (连续可调);β 液体闪烁计数仪由美国 Beckman 公司生产;流式细胞仪为美国 Coulter ELITEESP 型;550 型酶联免疫检测仪由美国 Bio-BAD 公司出品。实验试剂包括 DMEM(美国 Gibco 公司)、新生牛血清(杭州四季青公司)、MTT(又名四唑盐,美国 Sigma 公司)、二甲基亚砜(DMSO,美国 Sigma 公司)、³H-TdR(中国原子能研究所产品)、ECGS(美国 Sigma 公司)、VEGF 及 bFGF(美国 Sigma 公司)。

三、实验操作步骤

1. 大鼠骨髓内皮前体细胞分离、培养及鉴定:采用戊巴比妥钠(3%, 30 mg/kg 体重)腹腔注射麻醉大鼠,在无菌条件下取大鼠股骨组织,用生理盐水冲洗骨髓腔,收集细胞悬液,离心后去上清液,加入 DMEM 至 4 ml,倒入 6 ml 淋巴细胞分离液中,4℃ 下 900 r/min 离心 30 min,吸取单个核细胞,用 DMEM 洗涤 2 次,用含 20% FBS 及 ECGS 的 DMEM 调整其细胞浓度为 1 ×

10^8 个/L。将细胞接种到被黏连蛋白包被的 96 孔及 6 孔培养板中,培养时加入 VEGF、bFGF,其终浓度分别为 $10 \mu\text{g/L}$ 和 $2 \mu\text{g/L}$;第 4 天时换液,去除非贴壁细胞,随后每 3~4 天换液 1 次。为了排除骨髓来源的单个核细胞混杂于内皮表型细胞中,本研究对新鲜分离的细胞进行 VIII 因子相关抗原免疫荧光分析,并在培养第 10 天时进行 flk-1、AC133、VIII 因子相关抗原免疫荧光染色分析以及 DIL-acLDL 吞噬功能分析。

2. 分组及 PEMFs 干预:将分离得到的内皮前体细胞随机分为对照组及磁场组。磁场组细胞于培养第 5 天时开始给予 PEMFs 干预,磁场频率为 15 Hz,磁感应强度为 1 mT,磁场持续作用 15 d,每天作用 6 h。对照组细胞不进行 PEMFs 处理,但其它培养条件均与磁场组一致。

3. 细胞增殖水平测定:各组分别于培养第 4,7,9,11,13 及 15 天时每孔 ($n=6$) 加入 MTT 溶液 (5 g/L) $20 \mu\text{l}$,继续孵育 4 h 后终止培养,吸弃上清液,每孔加入 $150 \mu\text{l}$ DMSO 振荡 10 min,然后在 550 型酶联免疫检测仪上测定各孔在 490 nm 时的光吸收值 (A 值)。

4. 流式细胞仪检测:分别取上述 2 组新分离的骨髓单个核细胞各 4 个标本 (每个标本约含细胞 1×10^4 个),其中 2 个标本加入抗 CD34 及 AC133,另 2 个标本则加入 VIII 因子抗体。经 FITC 标记后,通过流式细胞仪检测总细胞数目及标记阳性细胞的百分比。当细胞培养 4,7,11 及 15 d 时用胰酶消化细胞,制备细胞悬液,加入 VIII 因子相关抗原及 NOS_3 一抗,经 FITC 标记后,采用流式细胞仪双标检测总细胞数量及标记阳性细胞数目百分比。

四、统计学分析

本研究所得数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 SPSS 11.0 版统计学软件进行数据分析,重复测量数据比较选用方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、大鼠骨髓来源内皮前体细胞生长及鉴定

分离接种后前 4 天,发现培养细胞呈圆形;第 7 天左右,贴壁细胞呈簇状生长,中间细胞有部分呈圆型,周边细胞为梭形;到第 15 天时基本融合成片,呈铺路石样表现。新分离的骨髓单个核细胞 VIII 因子相关抗原表达均为阴性,表明未混杂分化成熟的内皮细胞。培养第 10 天时,通过免疫荧光染色检查可观察到 flk-

AC133、VIII 因子相关抗原表达阳性,DIL-acLDL 吞噬功能阳性 (图 1~4)。流式细胞仪检查未见新分离骨髓单个核细胞中有 VIII 因子相关抗原阳性表达细胞,约有 $(33.1 \pm 4.7)\%$ 的细胞呈 CD34 及 AC133 表达阳性。

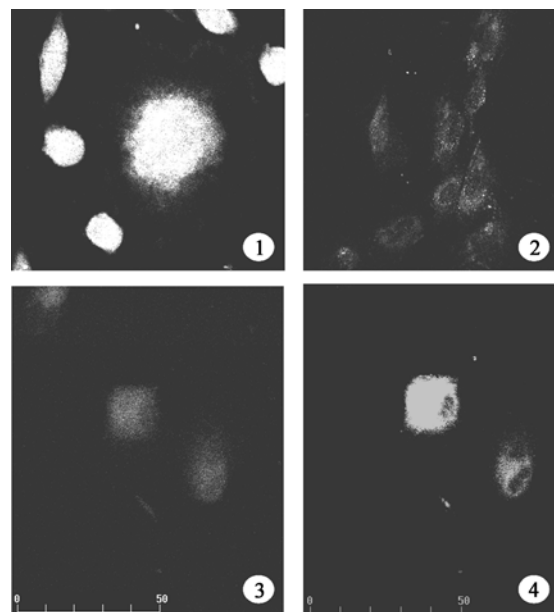


图 1 免疫荧光法检测 flk-1 阳性细胞 ($\times 400$); 图 2 免疫荧光法检测 VIII 因子相关抗原表达阳性细胞 ($\times 400$); 图 3 免疫荧光法检测 AC133 表达 ($\times 400$); 图 4 内皮前体细胞吞噬 DIL-acLDL ($\times 400$)

二、PEMFs 对内皮前体细胞增殖及活性的影响

在 PEMFs 干预前,2 组细胞生长活性间差异无统计学意义 ($P > 0.05$);经 PEMFs 作用 2 d 后,发现磁场组细胞增殖活性呈升高趋势,但与对照组比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$);在培养第 9,11,13 及 15 天 (即磁场作用第 5,7,9,11 天)时,发现磁场组细胞增殖活性明显高于对照组 (表 1)。

三、PEMFs 对内皮前体细胞分化功能的影响

本研究将 VIII 因子相关抗原及 NOS_3 表达阳性视为成熟内皮细胞的标志。通过流式细胞仪检测后发现,培养第 4 天 (即 PEMFs 干预前)时,2 组 VIII 因子相关抗原及 NOS_3 阳性细胞百分比间差异无统计学意义 (9.50 ± 1.10 vs 8.12 ± 2.10),培养第 7 天 (磁场作用第 3 天)时,磁场组 VIII 因子相关抗原及 NOS_3 阳性细胞百分比开始高于对照组 (31.47 ± 2.15 vs 24.32 ± 3.12 , $P < 0.05$);培养第 11,15 天时,磁场组 VIII 因子相关抗原及 NOS_3 阳性细胞百分比均显著高于对照组 (62.92 ± 3.45 vs 43.72 ± 4.12 , 87.14 ± 4.15 vs 61.13

表 1 PEMFs 对原代大鼠骨髓内皮前体细胞增殖活性的影响 (MTT 法)

组 别	标本数量	内皮前体细胞增殖活性 ($\bar{x} \pm s$)					
		培养 4 d	培养 7 d	培养 9 d	培养 11 d	培养 13 d	培养 15 d
磁场组	6	0.08 ± 0.02	0.18 ± 0.04	0.29 ± 0.03^a	0.34 ± 0.02^a	0.37 ± 0.04^a	0.38 ± 0.02^a
对照组	6	0.09 ± 0.01	0.16 ± 0.03	0.22 ± 0.04	0.27 ± 0.03	0.32 ± 0.03	0.33 ± 0.03

注:与对照组比较, $^a P < 0.05$

± 5.10 , $P < 0.05$), 具体情况参见图 5。

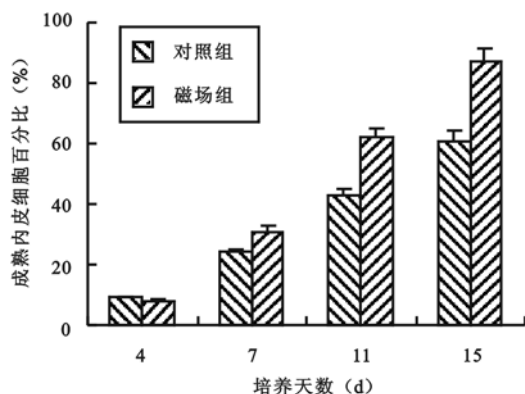


图 5 PEMFs 对内皮前体细胞分化功能的影响

讨 论

Asahara 等于 1997 年证实成体外周血液中存在一类成熟血管内皮细胞的前体细胞, 进一步研究后发现这类细胞能够在缺血部位形成毛细血管结构(即血管发生)^[1,2]。这些发现打破了既往认为血管发生只存在于胚胎期的观点, 为缺血性疾病的治疗提供了新的思路, 使内皮前体细胞移植成为治疗性血管形成的新策略之一; 同时在组织工程学方面, 内皮前体细胞被认为是极有前途的构建血管组织的种子细胞^[3,4]。因此如何促进内皮前体细胞的增殖及分化已成为人们关注的焦点。目前已发现促进内皮前体细胞增殖、分化的因子包括血管内皮细胞生长因子、成纤维细胞生长因子、表皮生长因子、凝血酶、促红细胞生成素等。

随着现代科技的迅猛发展, 人们在日常生活中不可避免地接触各类电磁场, 其对人体的生物学效应也越来越受到关注。近年来研究发现, 电磁场能够影响一些干细胞的增殖及分化。赵敏等^[5]发现频率 12 Hz、磁感应强度为 1.1 mT 的 PEMFs 能促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化; Ventura 等^[6]证实极低频电磁场能促进胚胎干细胞向心肌细胞分化; 张鸣生等^[7]发现, 低强度 PEMFs 可促进表皮干细胞增殖。电磁场是否影响内皮前体细胞增殖及分化目前尚不清楚。已有研究证实, 低频 PEMFs 可以促进成熟血管内皮细胞增殖及血管化。Yen-Patten 等^[8]发现脉宽 5 ms、频率 15 Hz、磁感应强度为 0~0.1 mT 的 PEMFs 可促进人脐静脉内皮细胞及牛主动脉内皮细胞增殖。Tepper 等^[9]利用频率 15 Hz、磁感应强度为 0~1.2 mT 的 PEMFs 再次证实了 Patten 的研究结果, 并且还进一步发现低频 PEMFs 具有促进血管新生的功效, 该作用可能与内皮细胞 FGF-2 分泌增加有关。在上述研究背景下, 本实验探讨了低频 PEMFs 对大鼠来源骨髓内皮前体细胞增殖及分化功能的影响, 希望能找到促进内皮前体细胞增殖及分化的新途径。

本研究结果表明, 频率为 15 Hz、磁感应强度为 1 mT 的脉冲磁场作用可以促进大鼠骨髓来源内皮前体细胞增殖, 并且这种作用具有累积效应。在 PEMFs 作用第 3 天时, 未观察到磁场对内皮前体细胞增殖功能具有促进作用; 而在磁场开始作用第 5 天时, 发现磁场组细胞增殖活性明显高于对照组。低频 PEMFs 对内皮前体细胞分化的影响与其对细胞增殖的促进作用并不同步, 如在磁场作用第 3 天, 磁场组便有较多细胞表现为成熟内皮细胞表型。低频 PEMFs 影响内皮前体细胞增殖及分化的具体机制目前尚不清楚, 但一般来讲, 磁场作用的部位可能为细胞膜表面受体、胞内蛋白激酶级联相关途径、离子通道以及胞内游离钙离子等^[10,11]。与激素、生长因子等作用机制不同, 磁场效应一般不具有明确、专一的下游信号通路, 这为研究磁场的生物学效应带来很大困难。随着基因芯片及蛋白质组学技术的出现, 为以后更全面、深入地探讨磁场生物学效应创造了条件。

综上所述, 内皮前体细胞为治疗性血管形成、组织工程等开辟了新的途径, 低频 PEMFs 可促进内皮前体细胞增殖、分化, 表明低频 PEMFs 在治疗缺血性疾病、构建组织工程方面具有巨大的潜在应用价值。

参 考 文 献

- [1] Asahara T, Murohara T, Sullivan T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 1997, 14: 964-967.
- [2] Tepper OM, Capla JM, Galiano RD, et al. Adult vasculogenesis occurs through in situ recruitment, proliferation, and tubulization of circulating bone marrow-derived cells. *Blood*, 2005, 105: 1068-1077.
- [3] Levenberg S. Engineering blood vessels from stem cells: recent advances and applications. *Curr Opin Biotechnol*, 2005, 16: 516-523.
- [4] Aperi T, Schmidt A, Duchrow M, et al. Autologous blood vessels engineered from peripheral blood sample. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2007, 33: 33-39.
- [5] 赵敏, 许建中, 周强, 等. 脉冲电磁场诱导骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的研究. *中华物理医学与康复杂志*, 2005, 27: 5-8.
- [6] Ventura C, Maioli M, Asara Y, et al. Turning on stem cell cardiogenesis with extremely low frequency magnetic fields. *FASEB J*, 2005, 19: 155-157.
- [7] 张鸣生, 何斌, 朱洪翔, 等. 不同频率低强度脉冲电磁场对表皮干细胞增殖的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2006, 28: 726-729.
- [8] Yen-Patten GP, Patten WF, Beer DM, et al. Endothelial cell response to pulsed magnetic fields: stimulation of growth rate and angiogenesis in vitro. *J Cell Physiol*, 1988, 134: 37-46.
- [9] 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.
- [10] Lupke M, Frahm J, Lantow M, et al. Gene expression analysis of ELF-MF exposed human monocytes indicating the involvement of the alternative activation pathway. *Biochem Biophys Acta*, 2006, 1763: 402-412.
- [11] Patterson TE, Sakai Y, Grabner MD, et al. Exposure of murine cells to pulsed electromagnetic fields rapidly activates the mTOR signaling pathway. *Bioelectromagnetics*, 2006, 27: 535-544.

(修回日期: 2007-02-20)

(本文编辑: 易 浩)