

· 基础研究 ·

低频电磁场对大鼠主动脉平滑肌细胞骨桥蛋白基因表达的影响

胡涛 贾国良 王海昌 郭文怡 曹燕杰 王晓燕

【摘要】目的 观察不同磁场强度、不同作用时间的低频电磁场(LFEMF)对培养的大鼠主动脉的血管平滑肌细胞(VSMC)骨桥蛋白(OPN)基因表达的影响,以探讨磁场是否能用于经皮冠状动脉介入治疗(PCI)后再狭窄(RS)的防治。**方法** 用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液体外培养大鼠主动脉 VSMC,随机分为对照组、不同磁场强度(20, 40, 60 mT)及作用时间(10, 20, 30 min)实验组,应用反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)及 Western Blot 技术结合光密度扫描分析,观察 LFEMF 对 VSMC 的 OPN 表达的影响。**结果** 各 LFEMF 组均明显抑制 VSMC 的 OPN mRNA 和 OPN 蛋白的表达,且具有磁场强度依赖性抑制作用,但无时间依赖性($P < 0.05$)。**结论** LFEMF 能在基因水平上抑制 VSMC 的 OPN 的表达。

【关键词】 低频电磁场; 平滑肌细胞; 骨桥蛋白; 基因表达

Effects of low frequency electromagnetic field on the expression of osteopontin gene of the aortic vascular smooth muscle cells in rats HU Tao, JIA Guo-liang, WANG Hai-chang, GUO Wen-yi, CAO Yan-jie, WANG Xiao-yan. Department of Cardiology, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

【Abstract】Objective To investigate the effects of low frequency electromagnetic field (LFEMF) with different intensities and periods on the expression of osteopontin (OPN) gene of aortic vascular smooth muscle cells (VSMC) in rats, in order to explore whether or not LFEMF has protective and therapeutic effects on coronary restenosis (RS) after percutaneous coronary intervention (PCI). **Methods** Rodent VSMCs were cultured with DMEM supplemented with 10% calf plasma in vitro, and divided into a control group and LFEMF groups with different exposed intensities (20 mT, 40 mT, 60 mT) and periods (10 min, 20 min, 30 min), then the effects of LFEMF on OPN gene expression in VSMC were measured by using of RT-PCR and Western Blot analysis. **Results** The expression of OPN mRNA and protein was inhibited by LFEMF with different intensities and periods ($P < 0.05$), and positively relative to the intensities of LFEMF, but not periods. **Conclusion** The expression of OPN gene was significantly inhibited by LFEMF.

【Key words】 Low frequency electromagnetic field; Smooth muscle cells; Osteopontin; Gene expression

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)的增殖和迁移在动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)及经皮冠状动脉介入治疗(percutaneous coronary intervention, PCI)后再狭窄(restenosis, RS)的发生过程中起着重要作用,VSMC 的黏附、增殖、迁移能力与其表型密切相关。正常情况下,动脉壁中层的 VSMC 处于分化状态,呈收缩表型,无增殖和迁移能力。但在多种刺激因素作用下,VSMC 可由分化状态转变为未分化状态,从收缩表型转变为合成表型,并从中膜迁移至内膜进行大量增殖,这是导致 AS 及 PCI 术后 RS 的主要原因^[1]。差异显示技术证明骨桥蛋白(osteopontin, OPN)是 VSMC 表型转化的标志基因,其表达决定了 VSMC 的表型,此外其氨基酸序列中有一个细胞黏附基元,可与 VSMC 表面整合素受体结合,因此在 VSMC 黏附、增殖、迁移中起着极其重要的作用。很多

生长因子和细胞因子都是通过 OPN 途径导致 VSMC 黏附、增殖、迁移,但目前国内外研究较少^[2,3]。我科在既往研究中发现,适当的低频电磁场(low frequency electromagnetic field, LFEMF)可以抑制 VSMC 增殖、迁移,但其机制不明^[4]。LFEMF 是否通过 OPN 途径影响 VSMC 的增殖、迁移,国内外尚未见报道。本实验以原代培养的大鼠主动脉 VSMC 为对象,研究 LFEMF 对其 OPN 基因表达的影响,以期探讨磁场能否用于 RS 的防治提供一定的依据。

材料与方法

一、主要材料与设备

Super Script II, TRIZOL Reagent, Taq DNA polymerase, dNTP (Invitrogen 公司); PCR 引物(上海生物工程公司); PCR Marker, 蛋白质 Marker(洛阳华美生物工程公司); 琼脂糖(Gibco BRL 公司); DMEM 干粉细胞培养基(Hyclone 公司); 山羊抗大鼠 OPN 单抗

(Santa Cruz 公司);HRP 结合兔抗山羊 IgG(武汉博士德生物工程公司);ECL 试剂盒(Amersham 公司);PK-2 型低频电磁治疗仪(苏州市无线电五厂);其它试剂均为进口分装或国产分析纯。

二、大鼠主动脉 VSMC 的体外培养

纯种雄性、体重为 200~250 g 的 SD 大鼠(第四军医大学实验动物中心提供),用 250 g/L 乌拉坦(1.2 g/kg 体重)麻醉,无菌条件下取出胸腹主动脉,按组织贴块法将中层平滑肌组织块种植入培养瓶壁,细胞从组织块边缘长出融合后,用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。光镜下观察细胞呈典型的峰-谷状表现,经肌动蛋白抗体免疫组化鉴定后,证实为 VSMC。实验用 5~8 代细胞。

三、电磁场作用

取同代对数生长期细胞,接种于 6 孔培养板中,静置培养 48 h,按实验分组继续培养 48 h。收集各组细胞进行反转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)和 Western Blot 分析。为避免误差干扰,在给予磁场作用时,所有培养瓶均置于同一室温下。全部实验重复 3 次。

四、实验分组

1. 对照组:无磁场作用。
2. 实验组:共分 9 组,分别在 20 mT、40 mT、60 mT 磁场中每 24 h 内各作用 10, 20, 30 min。电磁板 N、S 极对置,培养板位于两极中间,距电磁板 0.5 cm。

五、RT-PCR 分析

1. 常规提取 RNA。
2. 用于 OPN 基因序列扩增的引物序列:上游 5' CAA GGA GTA TAA GCA GAG GGC CA 3',下游 5' ACT CTT AGG GTC TAG GAC TAG CTT GT 3',扩增片段长度 200 bp;β-肌动蛋白(β-actin)引物序列:上游 5' GGT ATG GGT CAG AAG GAC TCC 3',下游 5' TGA TCT TCA TGG TGC TAG GAG CC 3',扩增片段长度 846 bp。
3. 反转录反应体系总反应体积 7 μl:10 × RT 缓冲液 2 μl, 25 mmol/L MgCl₂ 2 μl, 10 mmol/L dNTP 1 μl, 0.1 mmol/L DTT 2 μl。将 9 μl RNA 与 1 mmol/L OligdT 1 μl 及 OPN、β-actin 下游引物各 1 μl 混合, 70℃ 水浴 10 min, 冰浴 1 min 后加入反转录反应体系充分混匀, 42℃ 水浴 5 min, 加入 1 μl 反转录酶 Super Script II 混匀后 42℃ 水浴 60 min。
4. PCR 反应体系总反应体积 50 μl:反转录产物 2 μl, 10 × PCR 缓冲液 5 μl, 50 mmol/L MgCl₂ 1.5 μl, 10 mmol/L dNTP 1 μl, Taq 酶 0.5 μl, 上下游引物各 1 μl, 双蒸水 38 μl 混匀。反应条件如下:95℃ 下作用 3 min 后, 95℃ 变性 30 s, 56.5℃ 退火 20 s, 72℃ 延伸 45 s, 共 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 5 min。

5. 取 PCR 扩增产物 20 μl, 经 1.2% 琼脂糖凝胶(含 0.5 μg/ml EB)电泳, 采用 Alpha Innotech Corporation & Analysis System 凝胶成像系统进行检测, 并用 Labworks 软件对各阳性条带的密度进行测定。以 OPN 与 β-actin 的电泳条带的光密度比值作为 OPN mRNA 相对表达量。每次扩增过程中均设阴性对照防止产生非特异性的扩增产物。

六、Western Blot 分析

1. 按文献[5]的方法加以改进提取蛋白样品。
2. 配备 10% 分离胶与 6% 浓缩胶。取样品 20 μl 加样, 按常规 Western Blot 方法电泳转膜。
3. 转膜后用含脱脂奶粉的封闭液封闭, 将一抗, 即山羊抗大鼠 OPN 单抗用 PBS-T 按 1:200 稀释, 膜置于一抗封闭于塑料袋中, 37℃ 温箱平放温育 2 h。
4. 将二抗, 即生物素标记的兔抗山羊 IgG 用 PBS-T 按 1:100 稀释, 膜置于二抗封闭于塑料袋中, 37℃ 温箱平放温育 30 min。

5. 取出膜, 用 ECL 试剂盒在 Hyperfilm 上显示蛋白条带。采用 Alpha Innotech Corporation & Analysis System 凝胶成像系统进行检测, 并用 Labworks 软件对各阳性条带的密度进行测定。

七、统计学分析

统计数据用($\bar{x} \pm s$)表示, 数据处理应用 SPSS 12.0 统计软件进行 2 组均数 *t* 检验和多组均数的单因素方差分析。

结 果

一、LFEMF 对 OPN mRNA 表达的影响

RT-PCR 结果显示对照组与各实验组均检测到较高密度的 OPN mRNA 的阳性条带(图 1)。各个阳性条带的位置与预期的 OPN PCR 产物的大小相符。用 Labworks 软件对各阳性条带的密度进行测量, 以各 OPN 阳性条带的密度与 β-actin 阳性条带的密度相比, 所得的相对值光密度比值如表 1。结果显示对照组细胞表达一定量的 OPN 基因, 各实验组较对照组降低, 与对照组相比, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。相同作用时间不同磁场强度实验组之间比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 说明 LFEMF 的刺激作用具有磁场强度依赖性, 随磁场强度加大, 抑制 OPN mRNA 表达作用增强, 但无时间依赖性。

二、LFEMF 对 OPN 蛋白表达量的影响

Western Blot 结果显示, 对照组与各实验组均表达一定量的 OPN(图 2)。用 Labworks 软件对蛋白光密度进行定量分析结果如表 2。对照组细胞表达一定量的 OPN, 各实验组均较对照组降低, 与对照组相比, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。相同作用时间不同磁场

强度实验组之间比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),说明 LFEMF 的刺激作用具有磁场强度依赖性,随磁场强度增大,抑制 OPN 蛋白表达作用增强,但无时间依赖性。

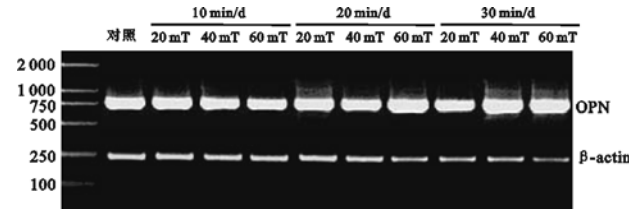


图 1 各组 RT-PCR 结果

表 1 各组光密度比值($\bar{x} \pm s$)

组 别	0 min/d	10 min/d	20 min/d	30 min/d
对照组	0.985 ± 0.032	-	-	-
20 mT 组	-	0.702 ± 0.102 *	0.717 ± 0.044 *	0.693 ± 0.029 *
40 mT 组	-	0.515 ± 0.033 *	0.504 ± 0.082 *	0.491 ± 0.041 *
60 mT 组	-	0.311 ± 0.027 #	0.298 ± 0.061 #	0.294 ± 0.063 #

注:与对照组比较, * $P < 0.05$, # $P < 0.01$

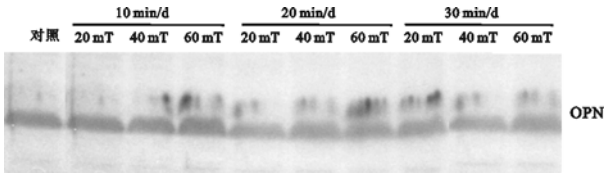


图 2 各组 Western Blot 结果

表 2 各组光密度值($\bar{x} \pm s$)

组 别	0 min/d	10 min/d	20 min/d	30 min/d
对照组	76 305.8 ± 265.2	-	-	-
20 mT 组	-	62 879.7 ± 249.4 *	61 558.3 ± 223.4 *	60 364.1 ± 211.1 *
40 mT 组	-	55 658.9 ± 208.3 *	54 901.5 ± 192.7 *	53 987.1 ± 206.5 *
60 mT 组	-	44 014.6 ± 205.3 #	43 364.1 ± 331.1 #	42 901.8 ± 187.1 #

注:与对照组比较, * $P < 0.05$, # $P < 0.01$

讨 论

AS 和 PCI 后 RS 的病理基础是血管内皮损伤所引发的 VSMC 黏附、增殖、向内膜下迁移及分泌细胞外基质,其机制非常复杂,众多的生长因子和细胞因子参与其中,一直是国内外研究的热点,但迄今尚未明确。近年来研究揭示,OPN 在其中起到重要作用。众多引起 VSMC 迁移、黏附与增殖,涉及 AS 和 PCI 术后 RS 的生长因子和细胞因子均可促进 OPN 表达,提示 OPN 参与了 PCI 术后的 RS 形成^[6,7]。

OPN 是一种酸性糖蛋白,最初由骨组织分离出来,在骨形成及重建过程中起重要作用,随后陆续发现 OPN 具有多种功能且在人体组织中分布广泛。Giachelli 等和 Ohsuzu^[8,9] 在克隆 RS 新生内膜,生成有关基因时发现一种上调基因,经测序发现其为 OPN,首次揭示了其在心血管疾病中的可能作用。随后在

AS 和 PCI 术后 RS、高血压等引起的血管重塑发病过程中也证实了 OPN 的存在,其在心血管系统中的作用逐渐被证实。许多参与 AS 和 PCI 术后 RS 的细胞因子均能够刺激 VSMC 过度表达 OPN^[10,11]。原位杂交免疫组织化学和 Western Blot 检测结果显示,不仅 AS 斑块和 RS 病变部位的 VSMC 内 OPN mRNA 呈高表达状态,而且 ECM 中的 OPN 含量也明显升高。利用抗 OPN 抗体可以降低 OPN 的表达从而抑制 VSMC 的表型转化、迁移和增殖,进而抑制 RS 的形成^[12]。应用 OPN 抑制剂阻断 OPN 的表达,可能是临床上治疗 PCI 术后 RS、动脉粥样硬化及高血压等新的策略。

磁场作用于生物体后,在生物体内引起一系列的生物学效应,为临床磁疗提供了理论基础。LFEMF 对 VSMC 的迁移、增殖有重要影响,但机制不明。OPN 最初由骨组织分离出来,它在骨形成及重建过程中起重要作用,而 LFEMF 对于骨的重建过程也起着重要作用,可以促进骨愈合,二者之间可能具有某种关系。本研究发现,适当强度和作用时间的 LFEMF 抑制 VSMC 的 OPN 的表达,RT-PCR 结果显示基因表达减少,而 Western Blot 条带光密度扫描也显示其表达的蛋白减少,说明 LFEMF 能在基因水平上抑制大鼠 VSMC 内 OPN 的表达,可能对 AS 和 PCI 术后的 RS 具有防治作用。本研究还发现,LFEMF 的抑制作用具有剂量-效应关系,无时间-效应关系。这些发现揭示了 LFEMF 抑制 VSMC 迁移、增殖的可能机制。既往研究还发现 LFEMF 可以改善内皮细胞功能,抑制基质金属蛋白酶活性^[13,14],为临床运用磁场防治 AS 和 RS 提供了新的思路和有利的理论依据,但仍有待进一步探讨。另外,客观疗效的合理评价也有待于大规模的多中心临床试验研究。

参 考 文 献

- 1 Gorski DH, Walsh K. Control of vascular cell differentiation by homeobox transcription factors. Trends Cardiovasc Med, 2003, 13:213-220.
- 2 Standal T, Hjorth-Hansen H, Rasmussen T. Osteopontin is an adhesive factor for myeloma cells and is found in increased levels in plasma from patients with multiple myeloma. Haematologica, 2004, 89:174-182.
- 3 Li G, Oparil S, Kelpke SS. Fibroblast growth factor receptor-1 signaling induces osteopontin expression and vascular smooth muscle cell-dependent adventitial fibroblast migration in vitro. Circulation, 2002, 106:854-859.
- 4 吕安林,高歌,贾国良,等. 恒磁场对离体兔动脉平滑肌细胞的抑制效应. 中华物理医学与康复杂志, 2000, 23:288-300.
- 5 Ramakrishnan PR, Lin WL, Sodek J, et al. Synthesis of noncollagenous extracellular matrix proteins during development of mineralized nodules by rat periodontal ligament cells in vitro. Calcif Tissue Int, 1995, 57: 52-59.
- 6 Renault MA, Jalvy S, Belloc I, et al. AP-1 is involved in UTP-induced

- osteopontin expression in arterial smooth muscle cells. *Circ Res*, 2003, 93:674-681.
- 7 Bidder M, Shao JS, Charlton-Kachigian N, et al. Osteopontin transcription in aortic vascular smooth muscle cells is controlled by glucose-regulated upstream stimulatory factor and activator protein-1 activities. *J Biol Chem*, 2002, 277:44485-44496.
 - 8 Giachelli C, Bae N, Lombardi D, et al. Molecular cloning and characterization of 2BT, a rat mRNA which distinguishes smooth muscle cell phenotypes in vitro and is identical to osteopontin (secreted phosphoprotein I, 2aR). *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, 177:867-873.
 - 9 Ohsuzu F. The roles of cytokines, inflammation and immunity in vascular diseases. *J Atheroscler Thromb*, 2004, 11:313-321.
 - 10 Angelucci A, Festuccia C, Gravina GL, et al. Osteopontin enhances the cell proliferation induced by the epidermal growth factor in human prostate cancer cells. *Prostate*, 2004, 59:157-166.
 - 11 Leali D, Dell'Era P, Stabile H, et al. Osteopontin (Eta-1) and fibroblast growth factor-2 cross-talk in angiogenesis. *J Immunol*, 2003, 171:1085-1093.
 - 12 Panda D, Kundu GC, Lee BI, et al. Potential roles of osteopontin and alphaVbeta3 integrin in the development of coronary artery restenosis after angioplasty. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94:9308-9313.
 - 13 胡涛, 吕安林, 张荣庆, 等. 低频电磁场对培养的人脐静脉内皮细胞一氧化氮合酶的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2001, 23:288-290.
 - 14 胡涛, 贾国良, 王海昌, 等. 低频电磁场对大鼠主动脉平滑肌细胞基质金属蛋白酶的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2005, 27:452-454.

(修回日期:2005-11-15)

(本文编辑:松 明)

· 个案报道 ·

氩-氟激光治疗婴儿阴囊溃疡 1 例

彭秀琼

一、资料与方法

患儿男, 年龄 2 个月, 阴囊溃疡 1 月余, 于 2004 年 2 月 28 日来我院就诊。患儿为第 1 胎, 足月顺产, 母乳喂养。出生后第 5 天发现阴囊左侧有一红点, 逐渐变大, 至第 8 天成为大小约 1.0 cm × 1.0 cm 的红色斑块且破溃。当地就诊时予以金霉素眼膏, 肤轻松软膏等局部涂擦, 10 d 后溃疡扩大, 底部加深; 再次前往当地就医, 诊断为“睾丸鞘膜积液伴溃疡”, 以抗生素静脉点滴数日, 疗效不明显, 遂来我院就诊。

查体: 患儿发育正常, 营养中等, 精神佳, 体温 37℃, 体重 4.15 kg, 外生殖器发育正常, 阴囊左侧有一大小约 2.0 cm × 1.0 cm 的溃疡, 边界清楚, 稍充血, 肉芽组织淡红, 分泌物少许, 溃疡底部光滑, 不硬, 无触血。患儿父母亲健康, 无家族过敏史, 否认有性不洁史和性传播疾病史。实验室检查: 血常规正常, 溃疡面分泌物培养结果为乳球菌(lactococcus)阳性, 血清梅毒抗体阴性。父、母血清梅毒抗体阴性。诊断为阴囊皮肤感染伴慢性溃疡。

治疗方法: (1) 热水坐浴, 每日 2 次, 每次 5 min; (2) 氩-氟(He-Ne)激光局部照射, 采用 He-Ne 激光治疗仪, 输出功率为 20 mW, 照射距离为 40 ~ 60 cm, 光斑直径 1 cm, 每日照射 1 次, 每次 3 ~ 5 min。

二、结果

He-Ne 激光照射第 2 天, 溃疡底部肉芽开始生长, 色泽鲜红湿润; 第 4 天溃疡面缩小, 底部变浅; 至第 7 天溃疡基本愈合。半个月后复查示, 局部光滑, 无瘢痕形成; 2 个月后复查无异常。

三、讨论

婴幼儿外阴和臀部的软组织感染较为常见, 经久不愈的大

溃疡却较少见, 尤其是阴囊处。其感染原因多为尿液、尿布或粪便刺激等, 导致局部出现潮红、皮疹, 即人们常说的“红臀”。由于婴幼儿皮肤屏障薄弱, 抵抗力低, 加上淋巴系统尚未发育成熟, 对炎症的局限性较差, 炎症易向周围甚至全身扩散^[1]。感染轻者可影响患儿的日常生活, 重者即可影响到患儿的发育乃至造成生命危险。

婴幼儿臀部软组织感染病菌常为金黄色葡萄球菌、大肠杆菌等。据报道, 目前杆菌查出率较高, 以厌氧菌感染明显^[1]。本例患儿溃疡分泌物培养结果为乳球菌阳性, 该菌为乳酸乳球菌乳脂亚种, 是皮肤、黏膜的常见兼性厌氧菌群, 一般不致病, 采用 He-Ne 激光照射配合局部清洁, 疗效显著。He-Ne 激光为一种低能量的弱激光, 对局部组织可产生刺激作用, 对慢性溃疡有较好的疗效。He-Ne 激光照射可促进血管扩张, 加快血液循环, 促进成纤维细胞增殖, 使溃疡周围组织再生, 且具有抑制细菌生长、消炎、止痛、增强免疫等作用, 能加速溃疡面的愈合^[2,3], 是一种简便、无损害、无痛苦的有效方法。另外, 为了抑制婴幼儿外阴、臀部皮肤的感染, 保持局部的清洁与干燥也非常必要。同时还应加强抚养人对婴幼儿的护理知识宣教, 以减少患儿病痛, 提高生活质量, 促进婴幼儿的健康生长和发育。

参 考 文 献

- 1 褚福棠, 主编. 实用儿科学. 第 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002. 644-646, 2304-2322.
- 2 陈虹霞, 高光煌, 钱焕文. 低强度激光对细胞增殖作用的研究进展. *中华物理医学与康复杂志*, 2001, 23:246-248.
- 3 马兰英, 邱慧艳. 氩-氟激光加远红外线照射治疗难愈性创面 60 例. *中华物理医学与康复杂志*, 2004, 26:190.

(修回日期:2005-11-12)

(本文编辑:吴 倩)