

· 基础研究 ·

不同波形低频脉冲磁场对大鼠心肌微血管内皮细胞的影响

刘楠 李飞 王海昌 王晨 栗妍晖 谢晓波

【摘要】目的 研究在固定时间和频率的情况下不同波形的低频脉冲磁场(LF-PMFs)对大鼠心肌微血管内皮细胞(CMECs)增殖、细胞周期、凋亡、迁移、细胞骨架以及一氧化氮(NO)分泌能力的影响。**方法** 磁场频率为 15 Hz, 磁场强度分别为 0.6 mT、1.2 mT、1.8 mT、2.4 mT, 作用时间为 4 h/d, 连续作用 5 d 的情况下, 以矩形和三角形 2 种波形磁场分别作用于离体大鼠心肌微血管内皮细胞, 对照组不加干预。**结果** 矩形波磁场促进内皮细胞增殖($P < 0.01$), 使其细胞周期分布发生改变($P < 0.01$), DNA 合成期(S 期)和合成后期(G_2 期)细胞比例增加, 凋亡率降低($P < 0.05$), 细胞迁移能力显著增强($P < 0.01$), 曝磁后细胞骨架结构发生重构, 应力纤维增多, NO 分泌能力增加($P < 0.01$); 三角波磁场 0.6 mT 组和 2.4 mT 组促使 CMECs 增殖($P < 0.05$), 细胞周期改变($P < 0.05$), 凋亡率降低($P < 0.05$), 迁移能力增强($P < 0.05$), 细胞骨架重构, NO 分泌能力提高($P < 0.05$)。而三角波磁场 1.2 mT 组和 1.8 mT 组上述效果均不明显($P > 0.05$)。**结论** 大鼠 CMECs 的增殖、细胞周期、凋亡、迁移、细胞骨架以及 NO 分泌能力除受 LF-PMFs 频率和强度影响外, 还受磁场波形影响。

【关键词】 低频脉冲磁场; 心肌微血管内皮细胞; 增殖; 细胞周期; 凋亡; 迁移; 细胞骨架; 一氧化氮

The effects of low frequency pulsed magnetic fields with different waveforms on cardiac microvascular endothelial cells LIU Nan, LI Fei, WANG Hai-chang, WANG Chen, SU Yan-hui, XIE Xiao-bo. Department of Cardiovascular Medicine, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China
Corresponding author: WANG Hai-chang, Email: wanghc@fmmu.edu.cn

【Abstract】Objective To investigate the effects of low frequency pulsed magnetic fields (LF-PMFs) on proliferation, the cell cycle, apoptosis, migration, cytoskeleton formation and nitric oxide (NO) secretion in cardiac microvascular endothelial cells (CMECs). **Methods** LF-PMFs with rectangular and triangular waveforms at 15 Hz were tested. The CMECs were randomly divided into a control group, 0.6 mT group, 1.2 mT group, 1.8 mT group and 2.4 mT group. Except for the control group, the CMECs were exposed to LF-PMFs 4 h/day for 5 days. **Results** After 5 days of intervention with rectangular wave LF-PMFs the proliferation of CMECs accelerated and NO secretion was enhanced significantly. The percentages of cells at (S + G_2) phase increased significantly, whereas apoptosis rates were significantly lower than in the control group. The migration of CMECs was facilitated, stress fibers increased and cytoskeleton components were reorganized. After 5 days of intervention with triangular wave LF-PMFs proliferation of CMECs accelerated and NO secretion was significantly enhanced. The percentages of cells at (S + G_2) phase and migration increased, while apoptosis was inhibited. Cytoskeleton components were reorganized after exposure to 0.6 mT and 2.4 mT triangular waveform LF-PMFs. No significant change was detected with 1.2 mT and 1.8 mT triangular waveform LF-PMFs with regard to these variables. **Conclusions** The effects of LF-PMFs on proliferation, the cell cycle, apoptosis, migration, cytoskeleton formation and NO secretion function of CMECs were influenced by the waveform in addition to its intensity and frequency.

【Key words】 Low frequency pulsed magnetic fields; Cardiac microvascular endothelial cells; Proliferation; Cell cycle; Apoptosis; Migration; Cytoskeleton; Nitric oxide

研究表明,内皮细胞的增殖和迁移在成人血管新生方面起重要作用,而心肌微血管内皮细胞(cardiac

microvascular endothelial cells, CMECs)功能受损与众多心血管疾病(如冠心病、高血压和糖尿病心脏病变)密切相关。因此,CMECs在治疗心脏病变方面具有广泛的应用价值。磁场作为一种物理治疗手段在医学领域里发挥了重要作用。Yen-patton等^[1]最早报道脉冲磁场(pulsed magnetic fields, PMFs)能促进人脐静脉内

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2010.11.002

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30600580)

作者单位:710032 西安,第四军医大学研究生管理大队

通信作者:王海昌,Email: wanghc@fmmu.edu.cn

皮细胞和牛主动脉内皮细胞的增殖和体外血管化,后续研究发现体内外的血管化过程都能被磁场所影响。Tepper 等^[2]发现,低频脉冲磁场(low frequency pulsed magnetic fields, LF-PMFs)可促进血管新生,并推测这一作用与内皮细胞 FGF22 分泌增加有关。Hopper 等^[3]发现,LF-PMFs 促进骨折愈合的机制是对血管形成过程直接或者间接地产生影响。本实验旨在研究频率和作用时间固定的情况下,不同波形、不同强度的 LF-PMFs 对体外培养大鼠 CMECs 的增殖、细胞周期、凋亡、迁移、细胞骨架的影响,寻找一种新的促进血管生成的手段,从而为磁场的深入研究和应用于缺血性心脏病的治疗提供实验依据。

材料与方法

一、实验动物

Sprague-Dawley (SD) 雄性大鼠,清洁级,体重(100 ± 5)g,由第四军医大学实验动物中心提供。

二、主要仪器与试剂

1. 主要仪器:MCY-1 低频脉冲磁场治疗仪(西安世纪测控技术研究所),2 组线圈桶:外直径 230 mm,内直径 170 mm,深 200 mm,输出磁场强度:0.6 ~ 10 mT(峰值),激励波形分矩形波和三角波;倒置显微镜(日本 Olympus);CO₂ 培养箱(德国 Heraeus 公司,HERAcell150)。

2. 主要试剂:低糖 DMEM 培养基(美国 Hyclone 公司);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);血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)(美国 BD 公司);L-谷氨酰胺(美国 Biosharp 公司);乙二胺四乙酸(ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA)(生工生物工程上海有限公司);CCK-8(Cell Counting Kit-8)试剂(碧云天生物公司);Transwell 小室(美国 Millipore 公司);异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITCF)标记鬼笔环肽(美国 Sigma 公司);碘化吡啶(美国 Sigma 公司);马血清(美国 Sigma 公司);一氧化氮(NO)试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

三、方法

1. 细胞培养和鉴定:1% 异戊巴比妥腹腔注射麻醉大鼠,无菌条件下取左心室,以 75% 酒精浸泡 16 s,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)冲洗后修剪掉心室外膜。在培养皿中将心肌组织剪碎成 1 mm³ 碎块,利用 0.2% II 型胶原酶 37 °C 水浴振荡消化 5 ~ 6 min,再以 0.25% 胰蛋白酶水浴振荡消化 4 ~ 5 min,以完全培养液终止消化。收集上清液 100 目滤网滤过,滤后上清液 1000 转/min 离心 10 min,获得细

胞团块加入低糖 DMEM 完全培养液(含 15% FBS,青霉素 100 U/ml,链霉素 100 U/ml 和 L-谷氨酰胺 300 mg/ml)重悬,接种入鼠尾胶原包被的 50 ml 培养瓶,放入 5% CO₂、37 °C 恒温饱和湿度培养箱中培养。接种 6 h 后大部分贴壁首次换液,差速贴壁去除非贴壁细胞。24 h 再次换液,之后每 3 d 换液,3 ~ 4 d 后细胞集落生长,呈长梭形或多角形,折光性好。1 周左右细胞呈典型的“铺路石”样。待细胞铺满瓶底的 80% ~ 90% 时用 0.25% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA 混合消化液消化传代,取生长状态良好的 2 代细胞备用。

2. 实验分组:按完全随机化原则将生长状况良好的第 2 代细胞分为矩形波形磁场组和三角波形磁场组,每组又分为对照组和处理组,每个处理组内再各分为 0.6 mT、1.2 mT、1.8 mT 和 2.4 mT 4 个磁场强度组。对照组不曝磁,其他条件均与磁场组一致。各磁场组 CMECs 均于传代后镜下见细胞已贴壁时开始曝磁,分别采用频率为 15 Hz 的矩形波和三角波,脉冲磁场作用 4 h/d,连续 5 d。

四、指标检测

1. CCK-8 检测细胞增殖:将 CMECs 的单个细胞悬液以 1×10^4 个/ml 接种于 96 孔板,每孔体积 100 μ l,同时设空白对照孔(不加细胞),每组 10 个复孔,细胞贴壁后开始曝磁。将培养板在 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度培养箱中培养 5 d 后每孔加入 CCK-8 溶液 10 μ l,37 °C 继续孵育 4 h,用酶联免疫检测仪测定各孔 450 nm 处光吸收值(OD 值)。

2. Transwell 小室迁移实验:利用 Millipore 公司的 24 孔板插入式 Transwell 小室(多孔滤膜孔径规格为 8 μ m)检测脉冲磁场对 CMECs 迁移能力的影响。取 2×10^5 个 CMECs 用 100 μ l 含 5% FBS 的 DMEM 完全培养液重悬加入 Transwell 小室的上室,下室加入添加 10 ng/ml VEGF、5 ng/ml bFGF 和 10% FBS 的 DMEM 完全培养液。接种 2 h 镜下见细胞贴壁后实验组开始曝磁,刺激 4 h 后再将细胞放入 5% CO₂、37 °C 恒温饱和湿度培养箱中培养 4 h。将各组 Transwell 小室的多孔滤膜用 4% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 洗涤 3 次,用棉签擦去滤膜上面未迁移的细胞。滤膜下迁移细胞用结晶紫染色,200 倍倒置显微镜镜下随机选取 5 个视野拍照并计数。

3. 流式细胞术检测细胞周期:磁场作用 5 d 后,各组取约 1×10^6 个 CMECs, PBS 离心洗涤 2 次后加入 1 ml 生理盐水重悬,用预冷的无水乙醇 2 ml 快速振荡混匀,固定细胞,4 °C 下固定 1 h 后弃固定液, PBS 洗涤 2 次后加入 100 μ l PBS 重悬,并加入 1 ml DNA 荧光染料,室温下避光染色 15 min,利用流式细胞仪分析。

4. Hoechst33258 染色检测:取规格为 8 mm ×

8 mm 的清洁盖玻片铺于 24 孔细胞培养板内,将 CMECs 以 2×10^4 个/ml 密度接种到铺有盖玻片的 24 孔板内。每组 6 个平行样本。细胞贴壁后实验组开始曝磁,5 d 后取出各组细胞爬片,4% 多聚甲醛固定 20 min, PBS 洗涤 2 次。加入 0.5 ml Hoechst 染色液染色 5 min, PBS 洗涤 2 次,烘干爬片,荧光显微镜下每组细胞随机选取 5 个视野观察拍照。

5. 细胞骨架免疫荧光染色:取规格为 8 mm × 8 mm 的清洁盖玻片铺于 24 孔细胞培养板内,将 CMECs 以 2×10^4 个/ml 密度接种到铺有盖玻片的 24 孔板内。每组 6 个平行样本。细胞贴壁后实验组开始曝磁,5 d 后取出各组细胞爬片,4% 多聚甲醛固定 20 min, PBS 洗涤 2 次。马血清封闭非特异性表位 1 h 后, PBS 洗涤 2 次,加 FITC 标记的鬼笔环肽 (500 ng/ml) 37 °C 避光孵育 25 min。之后用 PBS 洗涤细胞爬片 2 min 洗去多余鬼笔环肽,加 PI (2 mg/ml) 套染细胞核。PBS 再次洗涤 2 min 后烘干爬片,荧光显微镜下每组细胞随机选取 5 个视野观察拍照。

6. 硝酸还原酶法检测 CMECs 培养液中 NO 含量的变化:将 CMECs 的单个细胞悬液以 1×10^4 个/ml 接种于 96 孔板,每孔体积 100 μl,同时设空白对照孔(不加细胞),每组 10 个复孔,细胞贴壁后开始曝磁。将培养板在 37 °C, 5% CO₂ 及饱和湿度培养箱中培养 5 d 后每孔吸取上清 100 μl,按试剂盒说明书检测各孔上清 NO₃⁻ 和 NO₂⁻ 浓度,计算 NO 分泌量。

五、统计学分析

全部数据比较采用 SPSS 13.0 版软件进行统计学分析,各实验组与对照组比较采用单因素方差分析,2 组间比较采用独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、不同波形与不同磁场强度 LF-PMFs 对细胞增殖的影响

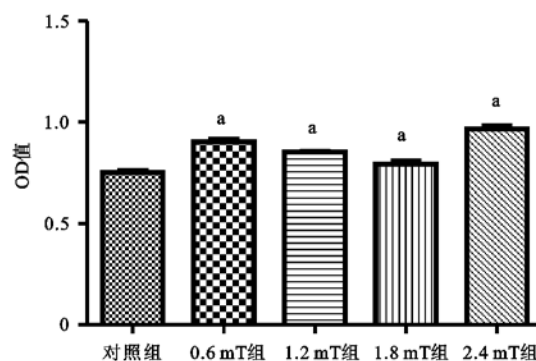
CCK-8 检测结果显示,矩形波磁场作用后 4 个实验组与对照组相比差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图 1。

三角波磁场作用后 0.6 mT 组和 2.4 mT 组与对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 1.2 mT 组和 1.8 mT 组与对照组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 2。

二、Transwell 小室实验检测不同波形与不同磁场强度 LF-PMFs 对 CMECs 迁移的影响

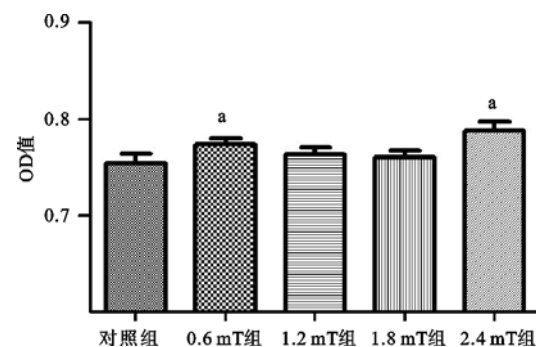
实验使用 Transwell 小室滤膜上孔径为 8 μm 的迁移孔,上室细胞通过迁移孔迁移到膜的背面。利

用结晶紫将迁移到膜背面的 CMECs 染色后在显微镜下观察并计数,图 3 为经各组磁场刺激细胞 4 h,于接种 10 h 后用结晶紫染色后拍摄的图像。经统计学分析,矩形波磁场可以促进 CMECs 迁移,各组迁移的细胞数(个/视野)与对照组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.01$),其中以 2.4 mT 组磁场强度作用最为明显,见图 4;三角波磁场 0.6 mT 组和 2.4 mT 组与对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 1.2 mT 组和 1.8 mT 组与对照组相比无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 5。



注:与对照组比较, ^a $P < 0.01$, $n = 18$

图 1 CCK-8 法检测矩形波磁场作用下不同强度 LF-PMFs 对大鼠 CMECs 增殖的影响



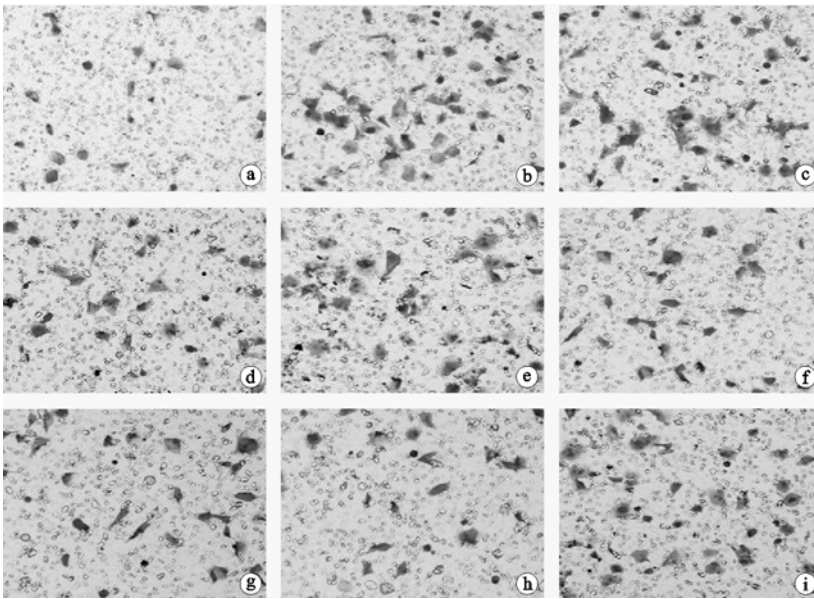
注:与对照组比较, ^a $P < 0.05$, $n = 18$

图 2 CCK-8 法检测三角波磁场作用下不同强度 LF-PMFs 对大鼠 CMECs 增殖的影响

三、流式细胞仪检测不同波形与不同磁场强度 LF-PMFs 对 CMECs 细胞周期的影响

经流式细胞仪检测,细胞经矩形波磁场作用后,各组与对照组比较 G₁ 期, S 期和 G₂ 期的差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 其中 2.4 mT 组变化最为显著, 见表 1; 经三角波磁场作用后 2.4 mT 和 0.6 mT 对细胞周期均有影响 ($P < 0.05$), 1.2 mT 和 1.8 mT 与对照组相比无统计学意义, 见表 2。

四、Hoechst33258 染色检测不同波形与不同磁场强度 LF-PMFs 作用后 CMECs 的凋亡情况



注:a 为对照组,b 为矩形波 0.6 mT 组,c 为矩形波 1.2 mT 组,d 为矩形波 1.8 mT 组,e 为矩形波 2.4 mT 组,f 为三角波 0.6 mT 组,g 为三角波 1.2 mT 组,h 为三角波 1.8 mT 组,i 为三角波 2.4 mT 组

图 3 Transwell 小室法检测不同波形与不同强度 LF-PMFs 对 CMECs 迁移能力的影响(结晶紫染色, $\times 200$)

表 1 流式细胞仪检测不同磁场强度矩形波磁场作用对大鼠 CMECs 细胞周期的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	G ₁ (%)	G ₂ (%)	S(%)
对照组	3	78.63 $\pm$ 1.12	1.38 $\pm$ 0.17	19.99 $\pm$ 0.96
0.6 mT 组	3	57.59 $\pm$ 2.44 ^b	2.86 $\pm$ 0.23 ^b	41.02 $\pm$ 0.95 ^b
1.2 mT 组	3	58.25 $\pm$ 2.20 ^b	2.70 $\pm$ 0.14 ^b	39.05 $\pm$ 2.08 ^b
1.8 mT 组	3	63.60 $\pm$ 1.53 ^b	2.32 $\pm$ 0.26 ^b	34.02 $\pm$ 1.27 ^b
2.4 mT 组	3	44.83 $\pm$ 4.84 ^b	3.55 $\pm$ 0.53 ^b	51.62 $\pm$ 4.31 ^b

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$

表 2 流式细胞仪检测不同磁场强度三角波磁场作用对大鼠 CMECs 细胞周期的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	G ₁ (%)	G ₂ (%)	S(%)
对照组	3	78.62 $\pm$ 3.93	6.79 $\pm$ 0.95	14.59 $\pm$ 3.00
0.6 mT 组	3	64.62 $\pm$ 2.19 ^a	10.65 $\pm$ 0.73 ^a	24.73 $\pm$ 1.55 ^a
1.2 mT 组	3	72.30 $\pm$ 2.96	8.74 $\pm$ 1.78	18.77 $\pm$ 1.60
1.8 mT 组	3	77.97 $\pm$ 2.25	8.32 $\pm$ 0.65	13.71 $\pm$ 1.66
2.4 mT 组	3	61.33 $\pm$ 0.73 ^a	13.34 $\pm$ 0.72 ^a	25.32 $\pm$ 1.14 ^a

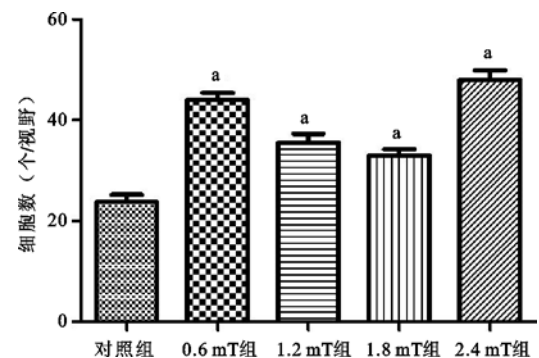
注:与对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$

图 6 示荧光显微镜下,经紫外光激发,典型的凋亡形态学改变:核染色质聚集、核碎裂、胞质浓缩(B)。而正常细胞核呈均匀的蓝色荧光(A),凋亡率用 $[B/(A+B)]\%$ 表示。经统计学分析,矩形波磁场作用后各组凋亡率均有降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 7。三角波磁场作用后,0.6 mT 组和 2.4 mT 组凋亡率降低($P < 0.05$),1.2 mT 组和 1.8 mT 组凋亡率与对照组相比差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 8。

五、细胞骨架染色

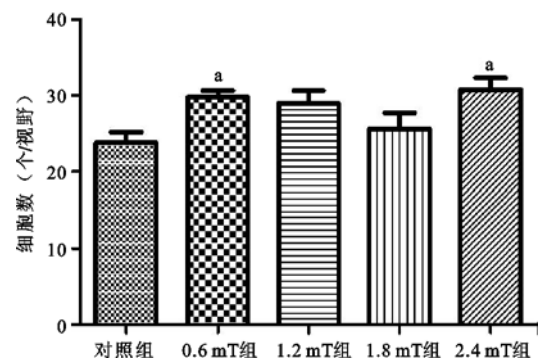
经矩形波磁场作用后细胞与对照组比较细胞骨架结构发生重组,荧光强度增加,其中绿色荧光示 FITC-鬼笔环肽标记的细胞骨架,红色荧光示碘化吡啶(PI)

标记的细胞核。肌动蛋白染色清晰,应力纤维增多,并集中在细胞膜下,形成绿色束样结构,0.6 mT 组和 2.4 mT 组变化显著。三角波磁场作用后 0.6 mT 和 2.4 mT 亦有相同表现,见图 9。



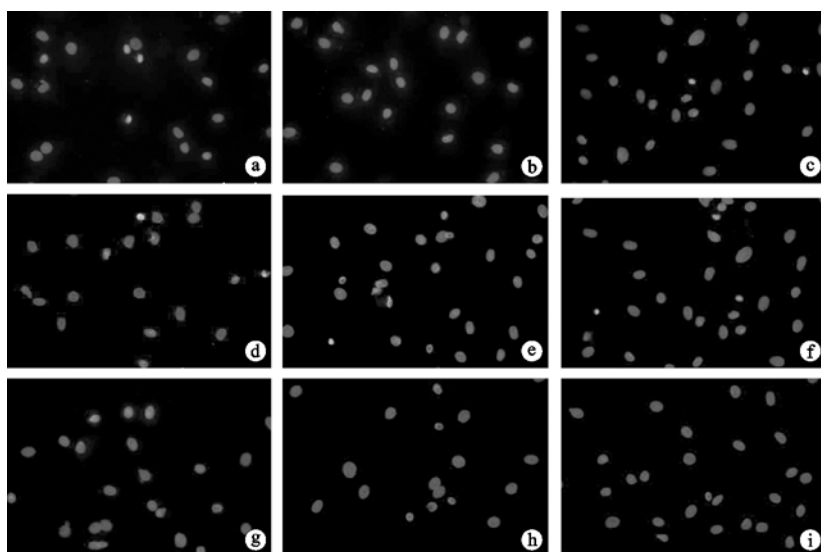
注:与对照组比较,^a $P < 0.01$, $n = 5$

图 4 Transwell 小室法比较矩形波磁场作用下不同磁场强度 LF-PMFs 对 CMECs 迁移能力的影响



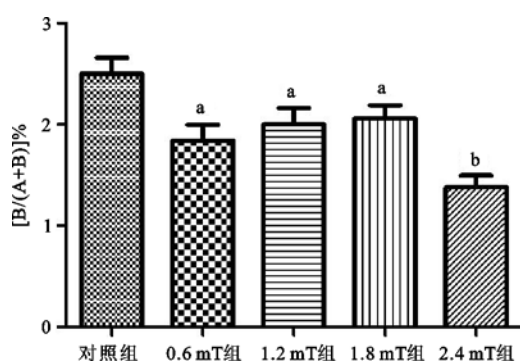
与对照组比较,^a $P < 0.05$, $n = 5$

图 5 Transwell 小室法比较三角波磁场作用下不同磁场强度 LF-PMFs 对 CMECs 迁移能力的影响



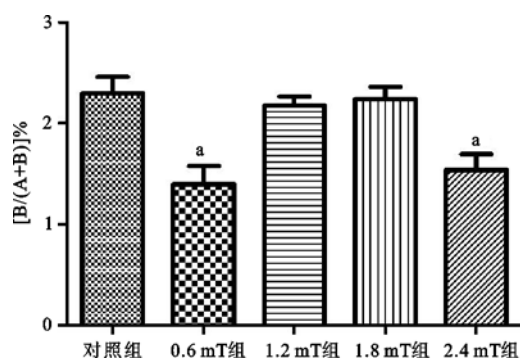
注:a 为对照组,b 为矩形波 0.6 mT 组,c 为矩形波 1.2 mT 组,d 为矩形波 1.8 mT 组,e 为矩形波 2.4 mT 组,f 为三角波 0.6 mT 组,g 为三角波 1.2 mT 组,h 为三角波 1.8 mT 组,i 为三角波 2.4 mT 组

图 6 hoechst3258 染色法检测不同波形与不同磁场强度 LF-PMFs 对 CMECs 凋亡的影响 (hoechst 染色, $\times 200$)



注:与对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$, $n = 5$

图 7 矩形波磁场作用下不同磁场强度 LF-PMFs 对 CMECs 凋亡率的影响



注:与对照组比较,^a $P < 0.05$, $n = 5$

图 8 三角波波磁场作用下不同磁场强度 LF-PMFs 对 CMECs 凋亡率的影响

六、NO 分泌能力测定

经矩形波磁场作用 5 d 后,NO 分泌能力测定显示,与对照组相比,各组 NO 分泌能力均有明显提高 ($P < 0.01$),经三角波磁场作用后,0.6 mT 组和 2.4 mT 组与对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$),1.2 mT 组和 1.8 mT 组与对照组相比差异未见统计学意义 ($P > 0.05$),见表 3。

表 3 不同波形与不同磁场强度低频脉冲磁场对 CMECs NO 分泌能力的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	<i>n</i>	矩形波组 NO ($\mu\text{mol/L}$) 分泌	三角波组 NO ($\mu\text{mol/L}$) 分泌
对照组	5	17.80 ± 3.70	17.60 ± 4.61
0.6 mT 组	5	29.20 ± 3.34^b	27.60 ± 5.94^a
1.2 mT 组	5	27.00 ± 3.16^b	20.00 ± 4.35
1.8 mT 组	5	26.40 ± 3.64^b	19.80 ± 4.14
2.4 mT 组	5	33.40 ± 4.09^b	28.20 ± 4.20^a

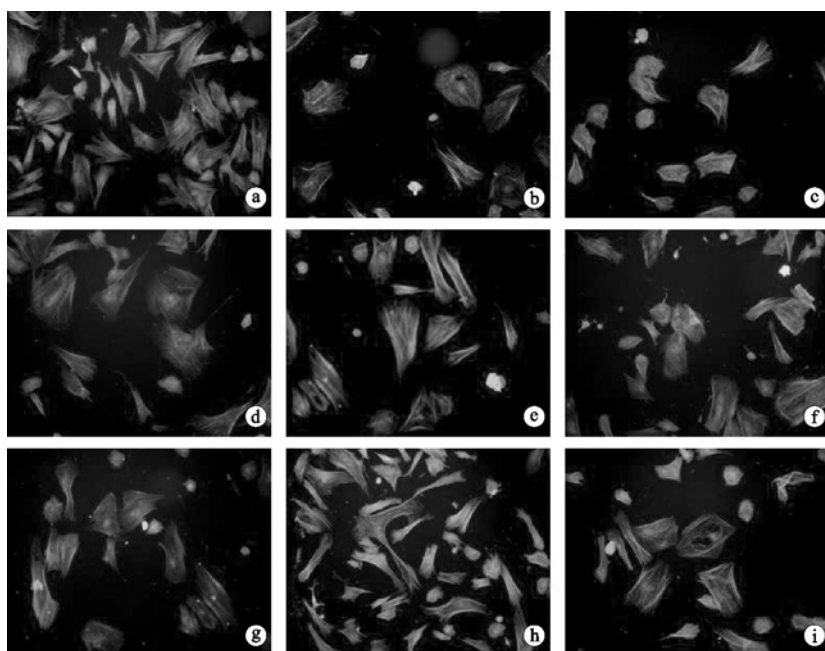
注:与对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$

讨 论

随着医学的快速发展,磁场作为一种可施加于人体的非侵入性外来物理因子,对其生物效应的研究已成为国内外的研究热点。而在各种电磁环境中,脉冲磁场(pulsed magnetic fields, PMFs)可能对生物体的影响更大。在血管形成方面,已发现 PMEs 可促进内皮细胞增殖,使血管内皮损伤处再内皮化过程得到加快,并可促使心肌梗死后血管形成^[4-6]。CMECs 的增殖、迁移、周期、凋亡、细胞骨架等是血管形成的起始和必不可少的过程,因此我们重点研究了 LF-PMFs 对 CMECs 上述能力的影响。

LF-PMFs 的生物效应随磁场强度、频率甚至作用时间的不同而不同,其相互关系并非单调递增或单调递减的线性关系,而是存在一定的“窗口”效应,细胞本身也有对磁场作用产生反应的“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^[7-9]。而这种作用目前尚无统一标准参考。

鉴于人体不同组织的电阻抗与磁阻抗的差别和刺激用电磁场波形的多样性,有必要研究不同波形 LF-PMFs 作用于离体心肌微血管内皮细胞后各项生物学指标的变化情况,其结果对进一步探究 LF-PMFs 作用



注:a 为对照组,b 为矩形波 0.6 mT 组,c 为矩形波 1.2 mT 组,d 为矩形波 1.8 mT 组,e 为矩形波 2.4 mT 组,f 为三角波 0.6 mT 组,g 为三角波 1.2 mT 组,h 为三角波 1.8 mT 组,i 为三角波 2.4 mT 组

图 9 不同波形与不同磁场强度 LF-PMFs 作用时 CMECs 细胞骨架改变(绿色荧光示 FITC-鬼笔环肽,红色荧光示碘化吡啶(PI), $\times 200$)

与血管生成的关系和指导缺血性心脏病的临床治疗与康复均有重要意义。

本实验选取了矩形和三角形 2 种代表性磁场波形做研究,每种波形都在相同的时间和频率作用下选取 0.6 mT,1.2 mT,1.8 mT 和 2.4 mT 4 个 LF-PMFs 强度做比较。研究表明,矩形波磁场对 CMECs 的增殖、NO 分泌能力以及迁移均有明显促进作用,细胞 G₂ 和 S 期的比例明显增多,并且使 CMECs 的细胞骨架发生明显的重构,凋亡率有所降低;而三角波形 1.2 mT 和 1.8 mT 组磁场作用后,CMECs 的增殖、细胞周期、凋亡、细胞迁移、NO 分泌能力均未发生明显改变,细胞骨架与对照组细胞也未见明显变化,0.6 mT 和 2.4 mT 组与对照组相比均有一定的生物学改变。矩形波磁场作用后的细胞以 0.6 mT 和 2.4 mT 组各项生物学指标变化最为明显,这也充分说明磁场对细胞的生物学效应存在“窗口”效应。

综上所述,本研究发现,不同波形的 LF-PMFs 对 CMECs 所产生的影响大不相同:矩形波磁场作用下 0.6 mT 和 2.4 mT 组细胞的增殖能力明显增加,G₂ 期和 S 期的细胞数量增多,细胞迁移能力显著提高,细胞骨架应力纤维增多,细胞凋亡率明显降低,NO 分泌能力显著增强。由于这些指标都与血管生成有着密切的联系,因而本研究为临床上更好地选取合适波形和强度的 LF-PMFs 治疗缺血性心脏病提供了良好的体外实验依据,有望促进 LF-PMFs 在缺血性心脏病治疗中的更好应用。

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] Tepper OM, Callaghan MJ, Chang EI, et al. Electromagnetic fields increase in vitro and in vivo angiogenesis through endothelial release of FGF22. *FASEB J*, 2004, 18: 1231-1233.
- [3] Hopper RA, Verhalen JP, Tepper O, et al. Osteoblasts stimulated with pulsed electromagnetic fields increase HUVEC proliferation via a VEGF-A independent mechanism. *Bioelectromagnetics*, 2009, 30: 189-197.
- [4] Kalka C, Masuda H, Takahashi T, et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 3422-3427.
- [5] Kawamoto A, Gwon HC, Lwaguro H, et al. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells formyocardial ischemia. *Circulation*, 2001, 103: 634-637.
- [6] Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med*, 2001, 7: 430-436.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] Sabine Ivancsits, Alexander Pilger, Elisabeth Diem, et al. Cell type-specific genotoxic effects of intermittent extremely low-frequency electromagnetic fields. *Mutat Res*, 2005, 583: 184-188.

(修回日期:2009-12-23)

(本文编辑:松 明)