

· 基础研究 ·

恒磁场对人脐静脉内皮细胞增殖的影响

李飞 贾国良 张荣庆 刘兵 赵新国

【摘要】 目的 研究不同强度的恒磁场对人脐静脉内皮细胞增殖的影响。方法 体外培养的第 3 代人脐静脉内皮细胞,分为对照组及不同剂量磁场组。各剂量磁场作用组的磁感应强度分别为 0.05 mT、0.1 mT、1 mT、10 mT、30 mT、60 mT 和 100 mT,磁场作用时间均为 48 h。用³H-TdR 法及 MTT 法测定细胞增殖。结果 0.05 mT 组细胞增殖显著高于对照组(0.292 ± 0.010 对 0.220 ± 0.008 , $P < 0.05$);0.1 mT 组细胞增殖与对照组相比无明显差异(0.231 ± 0.009 对 0.220 ± 0.008 , $P > 0.05$);其余剂量组细胞增殖均显著低于对照组($P < 0.05$)。结论 0.05 mT 的恒磁场可以促进人脐静脉内皮细胞的增殖。

【关键词】 恒磁场; 人脐静脉内皮细胞; 增殖

The effects of static magnetic field on the proliferation of human umbilical vein endothelial cells Li Fei, JIA Guo-liang, ZHANG Rong-qing, LIU Bing, ZHAO Xin-guo. Department of Cardiology, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

【Abstract】 Objective To investigate the effects of static magnetic field(SMF) on proliferation of human umbilical vein endothelial cells(HUVEC). Methods The 3rd generation of HUVECs cultured in vitro were exposed to different intensities of magnetic field including 0.05mT, 0.1mT, 1mT, 10mT, 30mT, 60mT and 100mT, respectively, for 48 hours. Cell proliferation was measured with ³H-TdR and MTT methods. Results As compared to the control group, the proliferative rate of the cells exposed to 0.05mT SMF was significantly higher(0.292 ± 0.010 vs 0.220 ± 0.008 , $P < 0.05$), there was no difference between the 0.1mT group and control group (0.231 ± 0.009 vs 0.220 ± 0.008 , $P > 0.05$), however, cell proliferation was attenuated significantly when SMF intensity was higher than 0.1mT($P < 0.05$). Conclusion 0.05mT SMF can accelerate the proliferation of HUVEC in vitro.

【Key words】 Static magnetic field; Human vein umbilical endothelial cells; Proliferation

血管内皮细胞增殖是临床许多病理及生理过程的基础。血管新生、经皮冠状动脉成形术(PTCA)后受损血管内皮细胞的覆盖、先天性心脏病(房缺、室缺和动脉导管未闭)手术治疗后心脏局部的愈合等均是血管内皮细胞增殖为基础的。近年来,缺血性心脏病已经成为危害我国人民健康的主要疾病之一。虽然 PTCA 的推广应用为治疗该类疾患开拓了新途径,但其疗效却受到术后再狭窄的影响^[1]。最近有学者证实,促进球囊损伤后血管内皮细胞的增殖,加快内皮细胞对受损血管内膜的覆盖,是防止再狭窄的有效途径之一^[2]。近几年来,分子搭桥已成为缺血性心脏病治疗的新热点。分子搭桥的基础,是利用一些促进内皮细胞增殖的因子,例如血管内皮细胞生长因子和碱性成纤维细胞生长因子等,促进血管新生。在此过程中,内皮细胞的增殖是一关键过程^[3]。本实验研究恒磁场对人脐静脉内皮细胞(HUVEC)增殖的影响,为缺血性心脏病的治疗寻找新途径。

材料与方法

一、材料

恒磁场由西北工业大学稀土永磁研究所提供,磁场由长 132 mm、宽 92 mm、厚 4~5 mm 的 N 极与 S 极对置的 7 对磁板产生。培养板置于两极之间,培养板位置的磁感应强度分别为 0.05 mT、0.1 mT、1 mT、10 mT、30 mT、60 mT 和 100 mT。DMEM:美国 Gibco 公司;ECGF(内皮细胞生长因子):德国宝林曼公司;新生牛血清:杭州四季青公司;MTT(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; β 液体闪烁记数仪:美国 Beckman 公司;550 型酶联免疫检测仪:美国 Bio-BAD 公司。

二、方法

1. HUVEC 的培养:无菌条件下取健康孕妇剖宫产脐带约 15~20 cm,将针头套管插入脐静脉,PBS 冲洗脐静脉直至液体清亮。把 0.1% 的 I 型胶原酶注入脐静脉,37℃ 消化 15 min,离心将细胞置入预先用明胶包

被的一次性培养瓶中,用含有 20% 新生牛血清、20 mg/ml ECGF 和 100 u/ml 肝素钠的 DMEM 培养基培养,待细胞铺满后传代,取 2~4 代细胞备用。

2. 实验分组:用生长状况良好的第 3 代细胞,分为 8 组,即对照组、0.05 mT 组、0.1 mT 组、1 mT 组、10 mT 组、30 mT 组、60 mT 组及 100 mT 组。对照组细胞不接触磁场,但其他条件与磁场组一致;各磁场组均于细胞传代后 8 h 开始曝磁,磁场持续作用 48 h。各组细胞接种数目及培养条件一致。

3. 四唑盐 (MTT) 比色法: HUVEC (细胞数 1×10^5 /L) 接种于 96 孔板,每孔加入 100 μ l 细胞悬液,每组 6 个复孔。培养 56 h 后每孔加入 MTT 溶液 (5 g/L) 20 μ l,继续孵育 4 h 终止培养,吸弃上清液,每孔加入 150 μ l DMSO 振荡 10 min,然后在 550 型酶联免疫检测仪测定各孔 $A_{490\text{ nm}}$ 。

4. ^3H -TdR 掺入实验: HUVEC (细胞数 1×10^5 /L) 接种于 96 孔板,每孔加入 100 μ l 细胞悬液,每组 6 个复孔。培养 40 h 后每孔加入 ^3H -TdR 50 μ l,继续培养 16 h,收集细胞,置于闪烁瓶中加入 PPO/POPOP 二甲苯闪烁液 500 μ l,在 β 液体闪烁记数仪上测定 cpm 值。

三、统计学分析

统计数据用 ($\bar{x} \pm s$) 表示,数据分析采用方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

结 果

一、HUVEC 的鉴定

光学显微镜下 HUVEC 呈多角形或长梭形,单层致密排列,呈铺路石状。VIII 因子染色可见 95% 以上的 HUVEC 膜有棕黄色颗粒分布。

二、恒磁场对人脐静脉内皮细胞增殖的影响

与对照组相比,0.05 mT 组细胞增殖显著高于对照组 ($P < 0.05$); 0.1 mT 组细胞增殖与对照组相比无明显差异;其余剂量组细胞增殖显著低于对照组 ($P < 0.05$)。MTT 法及 ^3H -TdR 法测定值趋势相同 (表 1、图 1)。

表 1 四唑盐 (MTT) 比色法测定恒磁场对人脐静脉内皮细胞增殖的影响 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组 别	MTT 比色值	组 别	MTT 比色值
对照组	0.220 ± 0.008	10 mT 组	$0.172 \pm 0.008^*$
0.05 mT 组	$0.292 \pm 0.010^*$	30 mT 组	$0.160 \pm 0.010^*$
0.1 mT 组	0.231 ± 0.009	60 mT 组	$0.180 \pm 0.009^*$
1 mT 组	$0.190 \pm 0.011^*$	100 mT 组	$0.123 \pm 0.008^*$

注: * 与对照组比较, $P < 0.05$

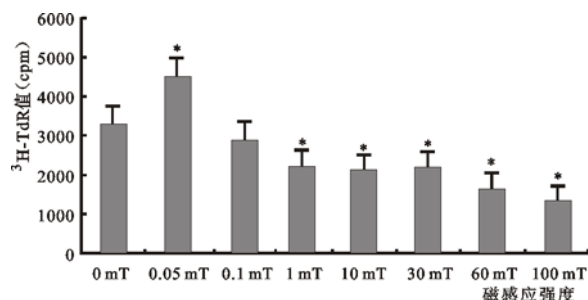


图 1 不同强度恒磁场对人脐静脉内皮细胞增殖的影响 (^3H -TdR 法)

注: * 与对照组 (0 mT) 比较, $P < 0.05$

讨 论

血管新生、冠脉成形术后再狭窄是目前心血管病学领域研究的两大热点;而内皮细胞增殖是血管新生、血管球囊损伤后修复的基本病理生理过程之一。因此内皮细胞增殖的调控愈来愈受到重视,目前已成为心血管病学领域研究的焦点。磁场对细胞增殖的影响一直是生物磁学专家感兴趣的课题,Ameia 等人^[4]发现,脉宽 5 ms、频率 15 Hz、磁感应强度为 0.1 mT 的脉冲磁场可促进人脐静脉内皮细胞及牛主动脉内皮细胞的增殖,并加快了内皮细胞在体外三维基质中的血管化过程。但恒磁场对内皮细胞增殖的作用尚未见报道。

本实验证实恒磁场对内皮细胞增殖的影响具有剂量依赖性,基本趋势是随着磁场磁感应强度的增大,逐渐抑制内皮细胞的增殖。0.05 mT 的弱恒磁场可以促进人脐静脉内皮细胞的增殖;0.1 mT 的恒磁场对内皮细胞的增殖无明显作用;当磁场磁感应强度大于 0.1 mT 时,磁场可以明显抑制内皮细胞的增殖,且随着磁感应强度的增大,抑制作用逐渐增强。

恒磁场促进内皮细胞的增殖具有潜在的临床应用价值。我科将血管内支架经磁化后安装入犬冠脉中,发现与非磁化支架比,磁化支架的再狭窄率显著降低。内皮增殖是血管新生的基础,促进血管新生是目前治疗缺血性心脏病的最新趋势。目前世界上主要应用心肌内注射 VEGF 蛋白或含有编码 VEGF 蛋白的寡核苷酸质粒来达到此目的^[5]。这些方法虽然取得了较好的疗效,但由于价格昂贵,技术要求高,并且是一种有创的方法,因此,在我国尚难以推广。磁疗在我国具有悠久的历史,且价格低廉,简便易行,更无任何痛苦。因此,我们可以利用磁场促进内皮细胞增殖这一现象,将磁疗用于缺血性疾病的治疗。

参 考 文 献

- 1 Casterella PJ, Teirstein PS. Prevention of coronary restenosis. Cardiol Rev, 1999, 7: 219-231.

- 2 Asahara T, Bauters C, Pastore C, et al. Local delivery of vascular endothelial growth factor accelerates reendothelialization and attenuates intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid artery. *Circulation*, 1995, 91: 2793-2803.
- 3 Freedman SB, Ismer JM. Therapeutic angiogenesis for coronary artery disease. *Ann Intern Med*, 2002, 136:54-71.
- 4 Ameia 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.
- 5 Epstein SE, Fuchs S, Zhou YF, et al. Therapeutic interventions for enhancing collateral development by administration of growth factors: basic principles, early results and potential hazards. *Cardiovasc Res*, 2001, 49:532-542.

(收稿日期:2002-12-18)

(本文编辑:郭铁成)

· 短篇论著 ·

三维牵引治疗腰椎间盘突出症 100 例

陈元伟

腰椎间盘突出症是常见病、多发病。牵引治疗是其保守治疗中的重要方法之一。牵引的种类多达十几种之多。其中立体牵引治疗实现了平面、成角、旋转牵引,而且治疗时间短,患者痛苦少,从而实现了传统正骨手法难以达到的治疗效果。我院应用三维牵引床治疗腰椎间盘突出症 100 例,现将临床治疗体会报告如下。

腰椎间盘突出症患者 100 例,男性 69 例,女性 31 例;年龄 17~70 岁,平均年龄 39.5 岁;病程少于半年者 17 例,半年~1 年 12 例,1 年以上 71 例,病程最长达 44 年。按发病诱因,其中腰部有外伤史者 32 例,持重物闪腰者 18 例,劳累 5 例,受凉 7 例,无明显诱因 38 例;按突出部位分, L_{4-5} 突出 24 例, L_5S_1 突出 23 例, L_{3-4} 及 L_{4-5} 突出 8 例, L_{4-5} 及 L_5S_1 突出 26 例, L_{3-4} 、 L_{4-5} 及 L_5S_1 突出 4 例;按膨出部位分, L_{3-4} 膨出 2 例, L_{4-5} 膨出 3 例;按突出伴膨出分, L_{4-5} 膨出、 L_5S_1 突出 6 例, L_{4-5} 突出、 L_5S_1 膨出 4 例;其中旁侧型 81 例,中央型突出 4 例,膨出型 5 例,突出伴膨出 10 例;按临床表现分,腰腿痛者 88 例,单纯腰痛者 6 例,单纯腿痛者 6 例。所有患者均经 X 线、CT 或 MRI 证实。突出间盘最小者 4 mm,最大者 10 mm。其诊断符合腰椎间盘突出症标准^[1]。排除严重内脏疾患和骨质疏松、脊柱结核、肿瘤、感染等病症后,即可行牵引治疗。

治疗时,患者俯卧于牵引床上,胸背部与臀腿部分别固定在牵引床胸腹板及臀腿板上,将腰椎间盘突出部位置于上、下两板之间的间隙处。然后根据患者身高、体重、病变部位、突出大小、突出类型及临床体征计算治疗数据,输入微机。纵向牵引距离为 58~70 mm;倾角 15~25°;转角 15~25°,旋转方向与患侧一致。在迅速牵引瞬间,医生用双手拇指重叠固定在突出椎间盘的上位椎体上,并向下推压,使下位椎体产生旋转及牵拉运动 2~3 次。治疗结束后,嘱患者卧硬板床休息 6 h,6 h 内禁止翻身、侧卧,6 h 后可戴护腰下地轻微活动。留院观察或住院期间,静卧 3 d,限制活动,同时辅以 20% 甘露醇加地塞米松 10 mg,5% 葡萄糖生理盐水加氯化钾 5 ml 静脉点滴,每日 2 次,共 3 d。100 例患者中 1 次牵引 72 例,2 次牵引 20 例,3 次牵引 8 例,总牵引次数 136 次,平均牵引 1.36 次。无任何不良反应

发生。

疗效评定标准^[2]为:优—症状体征完全消失,恢复原来工作;良—症状体征基本消失,残留轻度腰部不适或下肢麻木,可恢复原来工作或改换轻工作;可—症状体征部分消失,需要进行一些辅助治疗,能做一些轻工作;差—症状体征无好转或加重。

结果 优 73 例,占 73%;良 22 例,占 22%;可 2 例,占 2%;差 3 例,占 3%。

注意事项与体会 ①由于患者对三维牵引治疗腰椎间盘突出症这一方法缺乏足够的认识,因而患者容易产生恐惧的心理,加上以前久治不愈而对此病治疗失去信心,致使不能密切配合治疗而影响疗效,所以牵引前医生有必要向患者讲明三维牵引操作方法及其安全性。②牵引前饮食要适量,大、小便要排空;牵引后卧床期间,嘱患者食用高蛋白、高维生素、易消化的软食或半流食,防止便秘。③血压偏高或精神过度紧张者,应先服药后治疗。④神经根水肿严重的重症患者,活动受限,腰腿疼痛剧烈,不能平卧或不能配合治疗者,可以先静脉点滴 20% 甘露醇 250 ml 与地塞米松 10 mg,持续 3 d,待脱水消肿后,再行三维牵引治疗,牵引前嘱患者尽量平卧硬板床休息,以缓解因神经根水肿而引起的疼痛,并在床上进行排大、小便练习,以避免因牵引后绝对卧床时出于体位的不习惯而造成尿潴留或便秘。⑤捆绑固定的松紧度一定要合适,捆绑过松,人机配合不当,达不到治疗目的;反之,捆绑过紧容易造成呼吸困难,严重者甚至造成胸部肋骨损伤及软组织损伤。

所有患者 1 周后出院,出院后要加强对腰背肌锻炼,坚持戴护腰 1~2 个月,防止腰部受凉,3~6 个月内避免负重及过急、过猛的弯腰动作;扫地、搬物、打喷嚏等弯腰时要慢慢进行,以防复发。

参 考 文 献

- 1 胡有谷,主编. 腰椎间盘突出症. 第 2 版. 北京:人民卫生出版社, 1995. 221.
- 2 李金学,蒋位庄,范明,等. 计算机控制牵引复位治疗腰间盘突出症临床观察. 中医正骨, 1997, 6:13-16.

(收稿日期:2002-11-21)

(本文编辑:熊芝兰)