

恒磁场对人脐静脉内皮细胞活性及超微结构的影响

李 飞¹, 王海昌¹, 郭文怡¹, 张荣庆¹, 刘 兵¹, 徐可为², 憨 勇¹

(1. 第四军医大学西京医院心脏内科, 陕西省西安市 710032;

2. 西安交通大学材料科学与工程学院, 陕西省西安市 710049)

[关键词] 生物电磁学; 恒磁场对内皮细胞的损伤作用; 流式细胞仪; 人脐静脉内皮细胞; 恒磁场; 细胞凋亡; 超微结构

[摘 要] 目的 探讨恒磁场对血管内皮细胞活性、超微结构及凋亡的影响。方法 将人脐静脉内皮细胞暴露于 0.05、0.1、1 及 5 mT 恒磁场中, 四唑盐比色法测定细胞增殖, 采用透射电镜观察内皮细胞超微结构, 流式细胞仪观测内皮细胞凋亡。结果 0.05 mT 恒磁场促进内皮细胞的增殖活性, 0.1 mT 恒磁场对细胞增殖无明显影响, 1 mT、5 mT 恒磁场抑制细胞增殖。0.05 mT、0.1 mT、1 mT 恒磁场不引起细胞坏死, 但 1 mT 恒磁场可引起部分细胞变性, 5 mT 恒磁场不但引起细胞变性, 还可以导致细胞坏死。0.05 mT、0.1 mT、1 mT 恒磁场没有引起细胞凋亡, 5 mT 恒磁场导致 8.4% 细胞凋亡。结论 恒磁场对人脐静脉内皮细胞的生物学效应与磁感应强度有关, 5 mT 恒磁场对人脐静脉内皮细胞具有损害作用。

[中图分类号] Q64

[文献标识码] A

Biologic Effects of Static Magnetic Field on Proliferation and Ultra-Microstructure of Human Umbilical Vascular Endothelial Cell

LI Fei, WANG Hai-Chang, GUO Wen-Yi, ZHANG Rong-Qing, LIU Bing, XU Ke-Wei, and HAN Yong

(Department of Cardiology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Shanxi 710032, China)

[KEY WORDS] Human Umbilical Vascular Endothelial Cell; Static Magnetic Field; Cell Apoptosis; Ultra-Microstructure; Cell Proliferation; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of static magnetic field on proliferation, ultra-microstructure, apoptosis of human umbilical vascular endothelial cells. **Methods** The effects of static magnetism on proliferation of human umbilical vascular endothelial cells was observed by MTT; transmission electric microscopy was used to evaluate the ultra-microstructure of human umbilical vascular endothelial cells; apoptosis of human umbilical vascular endothelial cells was studied by flow cytometry and transmission electric microscopy. **Results** 0.05 mT magnetism can accelerate the proliferation of human umbilical vascular endothelial cells; 0.1 mT magnetism has no effects on the growth of human umbilical vascular endothelial cells, however, magnetism of 1 mT, 5 mT attenuate growth of human umbilical vascular endothelial cells. 5 mT static magnetism could induce apoptosis and necrosis of human umbilical vascular endothelial cells. **Conclusion** The effects of static magnetism on human umbilical vascular endothelial cells is double edged sword, 5 mT static magnetic field does harm to human umbilical vascular endothelial cells.

动脉粥样硬化是引起冠心病、脑梗死、肢端功能丧失等一系列重大疾病的原因。动脉粥样硬化实际上是动脉壁对各种损伤的一种反应, 内皮细胞损伤是动脉粥样硬化的始动及关键因素。磁场是广泛分布于周围环境的一种物理现象, 某些职业更要求人体暴露于较高磁感应强度的磁场中, 本研究旨在探讨磁场对人脐静脉内皮细胞活性、超微结构及凋亡的影响。

[收稿日期] 2005-05-06

[修回日期] 2006-01-10

[作者简介] 李飞, 博士, 主要从事冠心病的基础及临床研究, E-mail 为 lifei01@fmmu.edu.cn。王海昌, 主任医师, 教授, 主要从事冠心病的基础及临床研究。通讯作者徐可为, 教授, 主要从事冠心病的基础与临床研究。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

DMEM 培养基、HEPES、L-谷氨酰胺购于美国 Gibco 公司, TUNEL 试剂盒 (ApoAlert™ DNA Fragmentation Assay Kit) 及 ApoAlert™ AnnexinV Apoptosis Detection Kit (K2025-1) 购于美国 Clontech 公司, iv 型胶原酶、蛋白酶 K、RNase A、碘化丙啶、TritonX-100 购于美国 Sigma 公司。流式细胞仪 (美国 Coulter ELITEES 型), 透射电子显微镜 (日本 JEM-2000EX 型)。

1.2 恒磁场的制备

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 45 mm, N 极与 S 极

对置的 4 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、0.1、1 及 5 mT。

1.3 人脐静脉内皮细胞的培养

无菌条件下取健康孕妇剖腹产脐带约 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 iv 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 g/L ECGF、100 ku/L 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。

1.4 实验分组

实验分为 5 组: 对照组、0.05、0.1、1 及 5 mT 恒磁场组。取第 2~4 代细胞, 以 10^5 /瓶接种于 25 cm² 一次性培养瓶中, 培养 24 h 后, 将各磁场组细胞放入不同磁感应强度磁场中 48 h。

1.5 细胞活性测定

倒置显微镜下观察细胞生长形态, MTT 法测定细胞增殖活性, 台盼蓝染色测定细胞活性。

1.6 人脐静脉内皮细胞超微结构及凋亡的观察

用 0.125% 胰蛋白酶消化使细胞脱落后, 用 PBS 液清洗两遍, 3 000 r/min 离心 15 min, 使细胞沉淀结块; 去上清液, 用电镜固定液(2.5% 戊二醛及 1% 四氧钼酸) 固定; 常规脱水, 包埋, 超薄切片, 醋酸铀-柠檬酸铅双染色, 透射电镜观察超微结构并摄片。每份标本随机取 6 个视野, 观察细胞的结构、形态, 并记录发生变性、坏死及凋亡的细胞。

1.7 流式细胞仪双标法检测细胞凋亡率

用 0.01 mol/L PBS 冲洗内皮细胞, 0.125% 胰蛋白酶消化收集细胞; 离心去除固定液, 用含血清培养液洗一遍, 用 ApoAlert™ Annexin V Apoptosis Detection kit 染色: 5×10^5 细胞用 $1 \times$ Binding buffer 漂洗一次, 细胞重悬于 200 μ L $1 \times$ Binding buffer, 加入 Annexin V 5 μ L 和碘化丙啉 10 μ L, 室温避光 10~20 min, 上机测试(激发波长 488 nm)。Annexin V⁺/PI 细胞代表凋亡细胞, Annexin V⁻/PI⁺ 代表坏死细胞。

1.8 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用方差分析, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 细胞活性

台盼蓝染色显示, 0.05、0.1 及 1 mT 组细胞死亡与对照组相比无明显增加, 当磁感应强度为 5 mT 时, 10% 的细胞发生死亡。MTT 法显示, 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, 1 mT 及 5 mT 组细胞增殖显著低于对照组($P < 0.05$)。见表 1。

表 1. 恒磁场对人脐静脉内皮细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$)

分组	n	活性
对照组	6	220 $\pm$ 8
0.05 mT	6	272 $\pm$ 10 ^a
0.1 mT	6	231 $\pm$ 9
1 mT	6	190 $\pm$ 11 ^a
5 mT	6	172 $\pm$ 8 ^a

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较。

2.2 细胞凋亡率及坏死率

对照组、0.05 mT 组、0.1 mT 组及 1 mT 组细胞既未发生凋亡, 亦未发生坏死。5 mT 组有 8.4% 的细胞发生凋亡, 与其他四组相比差别显著($P < 0.05$); 5 mT 组有 7.3% 的细胞发生坏死, 与其他四组相比差别显著($P < 0.05$)。见图 1。

2.3 恒磁场对细胞超微结构及凋亡的影响

0.05 和 0.1 mT 恒磁场组对细胞的超微结构无明显影响; 1 mT 组可见部分细胞发生变性, 5 mT 组有较多细胞发生变性, 其数目明显多于 1 mT 组, 并且细胞出现坏死。细胞变性表现为细胞溶酶体增加, 内质网及线粒体肿胀, 染色质边染, 但细胞膜完整; 细胞坏死表现为内质网及线粒体肿胀, 细胞核碎裂, 核浓缩, 核膜断裂(图 2A 和 2B)。透射电镜下, 对照组、0.05、0.1 及 1 mT 组未见凋亡细胞, 5 mT 组可见部分细胞发生凋亡, 表现为胞浆浓缩, 核染色质浓集于胞核周围, 呈车轮状分布, 部分呈新月状, 细胞器相对完整, 细胞膜完整(图 2C)。

3 讨论

血管内皮细胞是调整血管壁稳态的重要因素, 内皮细胞的损伤与动脉粥样硬化、血管成形术及支架术后再狭窄的发生密切相关。内皮细胞凋亡的发生参与了许多病理生理过程。脂蛋白、炎症因子、氧自由基、辐射等均可导致内皮细胞的凋亡^[1-4]。

磁场是一种常见的物理现象, 磁场对人体的生物学效应很复杂, 不同性质、不同磁感应强度的磁场对同一种组织的作用不同, 而相同的磁场作用于不同的组织、细胞也可产生不同的生物学效应。关于磁场对血管内皮细胞作用的研究报道不多, 但已经证实, 磁场可以影响血管内皮细胞的增殖及分化。

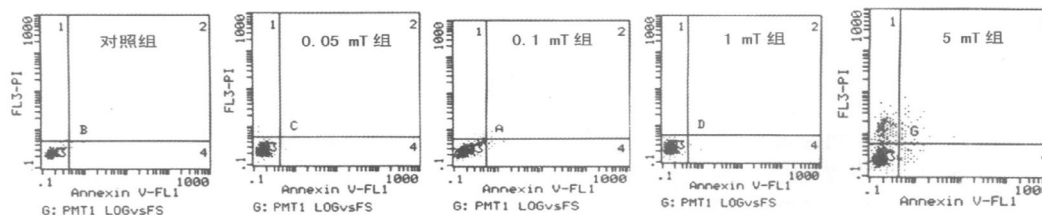


图 1. 流式细胞仪双标法检测细胞凋亡率及坏死率

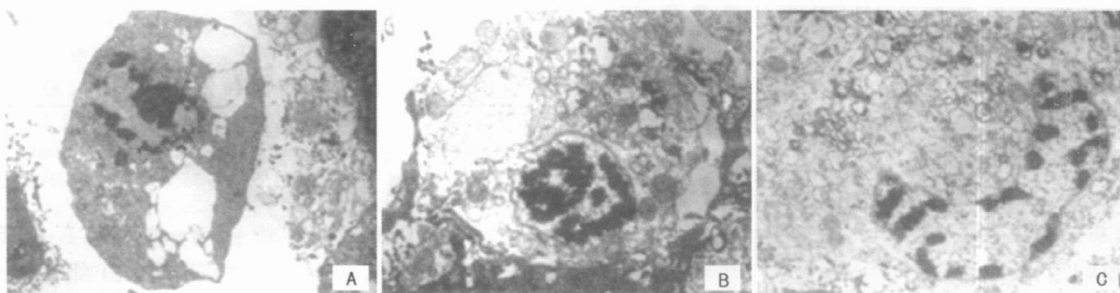


图 2. 透射电镜观察恒磁场对人脐静脉内皮细胞的影响 A 中可见变性的细胞, B 中可见坏死的细胞, C 中可见凋亡的细胞。

研究发现, 波长 5 ms、频率 15 Hz、磁感应强度为 0.1 mT 的脉冲磁场促进人脐静脉内皮细胞及牛主动脉内皮细胞的增殖, 并加快内皮细胞在体外三维基质中的血管化过程^[5]。近年来, 人们研究了磁场与细胞凋亡的关系, 但目前尚未得出统一的结论。Ding 等^[6]发现 60 Hz、5 mT 的电磁场可以促进由过氧化氢介导的凋亡过程。Lai 等证实 0.01 mT、60 Hz 的电磁场可以直接导致大鼠的脑细胞发生凋亡。但也有学者发现磁场也可以抑制凋亡的发生, 有人观察到低频电磁场可以抑制由过氧化氢及嘌呤霉素引发的人神经母细胞瘤细胞及大鼠垂体细胞的凋亡^[7]。国内研究发现, 1 mT 恒磁场可以抑制糖基化终产物诱导的内皮细胞 NO 及 NOS 的减低^[8]。关于磁场对血管内皮细胞凋亡的影响尚未见报道。

本实验研究了不同磁感应强度恒磁场对人脐静脉内皮细胞活性及超微结构影响, 结果发现在磁感应强度为 0.05 mT、0.1 mT 时, 恒磁场对人脐静脉内皮细胞的超微结构无明显影响, 当磁感应强度上升到 1 mT 时, 有部分细胞发生了变性; 当磁感应强度为 5 mT 时, 变性的细胞数目增加, 并且部分细胞发生了坏死。恒磁场对人脐静脉内皮细胞凋亡也与磁感应强度有关, 在 0.05 mT、0.1 mT、1 mT 时, 恒磁场无致细胞凋亡作用; 当磁感应强度为 5 mT 时, 8.4% 的细胞发生了凋亡。并且 0.05 mT 的恒磁场促进脐静脉内皮细胞增殖。这些研究证实恒磁场对血管内皮细胞的生物学效应依赖于其磁感应强度, 弱恒磁

场(0.05 mT) 促进人脐静脉内皮细胞的增殖, 较高磁感应强度(5 mT) 的磁场对血管内皮细胞具有损害作用。作用时间也是影响磁场作用的重要因素, 本研究中观察到内皮细胞传代后到铺满培养瓶约需要 48 h, 所以把磁场作用时间定为 48 h。磁场对内皮细胞具有双刃剑的作用, 由于内皮细胞在动脉粥样硬化中的重要性, 研究磁场对血管的生物学效应具有一定的实际意义。

[参考文献]

- [1] 黄颖, 陈运贞. 过氧化体增殖物激活型受体抑制氧化型脂蛋白致血管内皮细胞凋亡[J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, 12 (4): 419-422
- [2] Shin HK, Kim YK, Kim KY, Lee JH, Hong KW. Remnant lipoprotein particles induce apoptosis in endothelial cells by NAD(P)H oxidase-mediated production of superoxide and cytokines via lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 activation: prevention by cilostazol[J]. *Circulation*, 2004, 109 (8): 1022-1028
- [3] Cantara S, Donnini S, Giachetti A, Thorpe PE, Ziche M. Exogenous B44/Bc2 peptide reverts coronary endothelial cell apoptosis induced by oxidative stress[J]. *J Vasc Res*, 2004, 41 (2): 202-207
- [4] Rose RW, Grant DS, O'Hara MD, Williamson SK. The role of laminin-1 in the modulation of radiation damage in endothelial cells and differentiation[J]. *Radiat Res*, 1999, 152 (1): 14-28
- [5] Ameia CP, Patton WF, Beer DM, Jacobson BS. Endothelial cell response to pulsed electromagnetic fields: stimulation of growth rate and angiogenesis in vitro[J]. *J Cell Physiol*, 1988, 134: 37-46
- [6] Ding GR, Nakahara T, Hirose H, Miyakoshi J. Extremely low frequency magnetic fields and the promotion of H₂O₂-induced cell death in HL-60 cells[J]. *Int J Radiat Biol*, 2004, 80 (4): 317-324
- [7] Lai H, Singh NP. Magnetic-field-induced DNA strand breaks in brain cells of the rat[J]. *Environ Health Perspect*, 2004, 112 (6): 687-694
- [8] 程何祥, 周廉, 贾国良, 王海昌, 郭文怡, 张荣庆, 等. 恒磁场对糖基化终产物作用下内皮细胞一氧化氮生成和一氧化氮合酶的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2005, 13 (5): 537-540

(此文编辑 文玉珊)