

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活性的影响

程何祥^{1,2}, 周廉², 贾国良¹, 王海昌¹, 郭文怡¹, 张荣庆¹, 于振涛², 李争显²

(1. 第四军医大学西京医院, 陕西省西安市 710032; 2. 西北有色金属研究院, 陕西省西安市 710016)

[关键词] 病理学与病理生理学; 恒磁场对内皮细胞一氧化氮生成及一氧化氮合酶活性的影响; Griess 法; 恒磁场; 糖基化终产物; 内皮细胞; 一氧化氮

[摘要] 目的 观察不同强度恒磁场对糖基化终产物作用下人脐静脉内皮细胞一氧化氮生成及一氧化氮合酶活性的影响。方法 采用体外培养第 3 代人脐静脉内皮细胞, 糖孵育法制备糖基化终产物修饰牛血清白蛋白。实验分为 6 组, 即对照组、糖基化终产物修饰牛血清白蛋白 (100 $\mu\text{g/L}$) 组及糖基化终产物修饰牛血清白蛋白+不同强度 ($1 \times 10^{-4}\text{T}$ 、 $5 \times 10^{-4}\text{T}$ 、 $10 \times 10^{-4}\text{T}$ 、 $20 \times 10^{-4}\text{T}$) 磁场组。各组细胞于培养及磁场作用 24 h 后收集标本, 用 Griess 法检测培养上清中一氧化氮水平, 并测定人脐静脉内皮细胞的一氧化氮合酶活性。结果 糖基化终产物修饰牛血清白蛋白组一氧化氮含量和一氧化氮合酶活性较对照组明显降低 ($P < 0.05$)。 $1 \times 10^{-4}\text{T}$ 、 $5 \times 10^{-4}\text{T}$ 、 $10 \times 10^{-4}\text{T}$ 和 $20 \times 10^{-4}\text{T}$ 恒磁场组一氧化氮生成、一氧化氮合酶活性显著高于糖基化终产物修饰牛血清白蛋白组 ($P < 0.05$)。结论 糖基化终产物修饰牛血清白蛋白可抑制人脐静脉内皮细胞的一氧化氮合酶活性和一氧化氮产生; $1 \times 10^{-4}\text{T} \sim 20 \times 10^{-4}\text{T}$ 的恒磁场可呈强度依赖性拮抗糖基化终产物修饰牛血清白蛋白对一氧化氮生成的抑制效应。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of Constant Magnetic Field on Nitric Oxide Production and Nitric Oxide Synthase Activity in Endothelial Cells Intervened by Advanced Glycosylation Endproduct

CHENG He-Xiang^{1,2}, ZHOU Lian², JIA Guo-Liang¹, WANG Hai-Chang¹, GUO Wen-Yi¹, ZHANG Rong-Qing¹, YU Zhen-Tao², and LI Zheng-Xian²

(1. Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China; 2. Northwest Institute for Non-ferrous Metal Research, Xi'an 710016, China)

[KEY WORDS] Constant Magnetic Field; Advanced Glycosylation Endproduct; Endothelial Cells; Nitric Oxide; Nitric Oxide Synthase; Griess Reagent

[ABSTRACT] Aim To investigate effects of constant magnetic field (CMF) on nitric oxide (NO) production and nitric oxide synthase (NOS) activity in human umbilical vein endothelial cells (hUVEC) intervened by advanced glycosylation endproduct (AGE). Methods The third passage of cultured hUVEC were used. AGE modified bovine serum albumin (AGE-BSA) was prepared by sugar incubation. The cells were divided into six groups: control group, AGE group (AGE-BSA 100 $\mu\text{g/L}$), AGE-BSA with $1 \times 10^{-4}\text{T}$, $5 \times 10^{-4}\text{T}$, $10 \times 10^{-4}\text{T}$ and $20 \times 10^{-4}\text{T}$ of constant magnetic field group. Samples were collected 24 h later. NO levels in the supernatant were determined using Griess reagent, and NOS activity of hUVEC was detected.

Results NO levels and NOS activity significantly decreased in AGE-BSA group ($P < 0.05$). In $1 \times 10^{-4}\text{T}$, $5 \times 10^{-4}\text{T}$, $10 \times 10^{-4}\text{T}$ and $20 \times 10^{-4}\text{T}$ groups, NO levels and NOS activity significantly increased compared with AGE-BSA group ($P < 0.05$).

Conclusion AGE-BSA can inhibit NO production and NOS activity in hUVEC, whereas $1 \times 10^{-4}\text{T}$ to $20 \times 10^{-4}\text{T}$ of constant magnetic field can intensity-dependently antagonize the effects of AGE-BSA on NO production.

冠心病是威胁人类健康与生命的主要疾病之一。经皮冠状动脉介入治疗已成为冠心病的主要治疗手段, 但术后较高的再狭窄率 (约 15% ~ 20%) 严重影响了其疗效。研究表明, 内皮细胞与经皮冠状

动脉介入治疗后再狭窄的发生发展密切相关, 促进损伤内皮细胞的增殖修复及一氧化氮 (nitric oxide, NO) 的合成和分泌是防止再狭窄的有效途径之一^[1,2]。糖尿病患者是心血管疾病及冠状动脉介入治疗后再狭窄的高危人群, 同时其体内糖基化终产物 (advanced glycosylation endproduct, AGE) 明显增加。AGE 诱导的糖化氧化应激和对内皮细胞 NO 合成的抑制作用可能在糖尿病患者动脉粥样硬化及经皮冠状动脉介入治疗后再狭窄的发病机制中占重要的地位^[3-8]。已知磁场具有促进创伤修复、抗氧化

[收稿日期] 2004-10-21 [修回日期] 2005-08-29

[基金项目] 国家自然科学基金 (30270396) 资助

[作者简介] 程何祥, 博士后, 主治医师, 副教授, 从事冠心病及心律失常的基础与临床研究, E-mail 为 Chyx70@163.com。通讯作者周廉, 教授, 中国工程院院士, 从事材料学与超导研究, E-mail 为 lzhou@xanet.edu.cn。贾国良, 主任医师, 教授, 主要从事冠心病的基础与临床研究, E-mail 为 jgl75183@163.com。

和清除自由基^[9]、增加 NO 合成^[10]、促进内皮细胞增殖^[11,12]等效应,可能用于再狭窄的防治^[13-15]。本研究观察恒磁场对 AGE 作用下人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, hUVEC) NO 生成的影响,旨在为应用磁场防治冠状动脉介入治疗后再狭窄提供进一步的实验依据。

1 材料与方法

1.1 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 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 1×10^4 T、 5×10^4 T、 10×10^4 T 和 20×10^4 T。721 分光光度计为上海第三仪器厂产品。DMEM 购自美国 Gibco 公司,内皮细胞生长因子购自德国宝林曼公司,新生牛血清购自杭州四季青公司,iv 型胶原酶、胰蛋白酶、抗人 (II) 因子抗体、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、EDTA 购自美国 Sigma 公司,鲎(TCL)检测试剂盒购自美国 Endos 公司。NO 及一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)检测试剂盒为北京军事医学科学院生产。余试剂均为市售分析纯产品。

1.2 人脐静脉内皮细胞的分离培养

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。将 0.1% iv 型胶原酶 10 mL 注入脐静脉,37℃消化 15 min,离心(1 000 r/min, 10 min);将细胞置入预先用明胶裹被的培养瓶中,用含 20% 新生小牛血清、内皮细胞生长因子 20 g/L、肝素钠 100 ku/L 的 DMEM 培养基培养。待细胞铺满后用 0.25% 胰蛋白酶消化传代,取部分细胞进行爬片,实验用第 3 代细胞。内皮细胞鉴定采用 (II) 因子相关抗原免疫组织化学染色,细胞活性鉴定用台盼蓝拒染试验进行。

1.3 糖基化终产物修饰牛血清白蛋白的制备

采用糖孵育法制备 AGE 修饰牛血清白蛋白(AGE-BSA)。将葡萄糖用 pH7.4 PBS 液配制成 0.5 mol/L 溶液,无菌过滤 4℃保存。取 BSA 5.0 g/L 加入葡萄糖使终浓度为 50 mmol/L,在 37℃无菌孵育 8 周;上述孵育液中一同加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 EDTA 以减少氧化反应的产生,实验前用 pH7.4 PBS 透析去除未结合的葡萄糖及 EDTA。对照组 BSA 中不含葡萄糖及 EDTA,余条件一致。经荧光分光光度法鉴定,AGE-BSA 中 AGE 含量为 92.56 ku/g 蛋白。对照样本 AGE 含量不超过 0.85 ku/g 蛋白。制

备的样品经 TCL 试剂盒检测,其内毒素含量低于 0.5 kEU/L。

1.4 实验分组及处理

取生长状况良好的第 3 代细胞,以 1×10^7 /L 细胞数接种于 96 孔板,每孔加入 100 μ L 细胞悬液,每组 5 个复孔,并同时进行了细胞爬片。细胞在接近融合生长时,换用无血清培养基培养 24 h。实验随机分为 6 组:对照组不予 AGE-BSA 及磁场干预;AGE 组在培养基中加入 AGE-BSA 100 μ g/L; 1×10^4 T 恒磁场组在培养基中加入 AGE-BSA 100 μ g/L,并置于 1×10^4 T 恒磁场中; 5×10^4 T 恒磁场组在培养基中加入 AGE-BSA 100 μ g/L,并置于 5×10^4 T 恒磁场中; 10×10^4 T 恒磁场组在培养基中加入 AGE-BSA 100 μ g/L,并置于 10×10^4 T 恒磁场中; 20×10^4 T 恒磁场组在培养基中加入 AGE-BSA 100 μ g/L,并置于 20×10^4 T 恒磁场中。各组细胞接种数目及培养条件一致,均于 24 h 后收集培养液和细胞标本。

1.5 一氧化氮浓度测定

用 Griess 法测定培养基中一氧化氮的稳定代谢产物亚硝酸盐(NO^2)浓度。测定方法按照 NO 试剂盒说明书操作。收集的培养液与 Griess 试剂[1% 对氨基苯磺酰胺, 0.1% N (1 萘基) 乙二胺, 2.5% 磷酸]反应,721 分光光度计检测,从亚硝酸钠标准曲线上换算 NO 值,以 fmol/d 表示。

1.6 一氧化氮合酶活性测定

按照 NOS 试剂盒说明书操作。NOS 活性测定原理:NOS 催化 L 精氨酸和分子氧反应形成 NO, NO 与亲合性物质生成有色化合物,在 530 nm 波长下测定吸光度,以此代表细胞 NOS 活性。细胞破碎采用超声波法裂解,蛋白定量采用 Lowry 法。酶活性定义为每毫克组织蛋白中生成 1 nmol NO 为一个活性单位。 $\text{NOS 活性} = (\text{测定管吸光度} - \text{空白管吸光度}) \div \text{呈色物纳摩尔消光系数} \times (\text{反应液总体积} \div \text{取液量}) \times 1/(\text{比色光径} \times \text{时间}) \div \text{样品蛋白质含量}$,其中呈色物纳摩尔消光系数为 38.3×10^6 。

1.7 统计学处理

实验重复 6 次,每组 5 个复孔,故 $n = 30$ 。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素多组资料的方差分析(One-Way ANOVA),进行 F 检验(方差不齐时采用 F' 检验), $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 人脐静脉内皮细胞的鉴定

倒置光学显微镜下 hUVEC 呈多角形或长梭形,

单层致密排列; 原代和第 3 代 hUVEC 进行抗人 (II) 因子相关抗原染色, 可见 95% 以上的 hUVEC 膜有棕黄色颗粒分布, 证实其为内皮细胞。台盼蓝染色示 98% 以上实验用细胞为活细胞。

2.2 恒磁场对一氧化氮浓度的影响

由表 1 (Table 1) 可见, hUVEC 与 100 $\mu\text{g/L}$ 的 AGE-BSA 共同培养 24 h, 上清 NO 浓度显著降低 ($P < 0.05$); $1 \times 10^{-4}\text{T}$ 、 $5 \times 10^{-4}\text{T}$ 、 $10 \times 10^{-4}\text{T}$ 和 $20 \times 10^{-4}\text{T}$ 恒磁场组 NO 浓度显著高于 AGE 组 ($P < 0.05$), 即细胞上清 NO 浓度随着恒磁场强度的增加而呈强度依赖性增加。

2.3 恒磁场对一氧化氮合酶活性的影响

由表 1 (Table 1) 可见, hUVEC 与 100 $\mu\text{g/L}$ 的 AGE-BSA 共同培养 24 h, 细胞 NOS 活性显著降低 ($P < 0.05$); $1 \times 10^{-4}\text{T}$ 、 $5 \times 10^{-4}\text{T}$ 、 $10 \times 10^{-4}\text{T}$ 和 $20 \times 10^{-4}\text{T}$ 恒磁场组 NOS 活性显著高于 AGE 组 ($P < 0.05$), 即细胞 NOS 活性随着恒磁场强度的增加而呈强度依赖性增加。

表 1. 各组培养基内一氧化氮生成量和内皮细胞一氧化氮合酶活性 ($\bar{x} \pm s$, $n = 30$)

Table 1. NO levels in culture medium and NOS activity of hUVEC in different groups

分 组	NO 生成 (fmol/d)	NOS 活性 ($10^3/\text{g protein}$)
对照组	29.35 \pm 3.40	115.83 \pm 8.40
AGE-BSA	11.35 \pm 2.58 ^a	55.63 \pm 7.45 ^a
$1 \times 10^{-4}\text{T}$	14.48 \pm 2.29 ^{ab}	67.92 \pm 8.15 ^{ab}
$5 \times 10^{-4}\text{T}$	16.43 \pm 2.42 ^{ab}	77.30 \pm 7.46 ^{ab}
$10 \times 10^{-4}\text{T}$	19.03 \pm 2.82 ^{ab}	82.36 \pm 7.68 ^{ab}
$20 \times 10^{-4}\text{T}$	21.09 \pm 2.78 ^{ab}	89.65 \pm 7.75 ^{ab}

a: $P < 0.05$, 与对照组比较; b: $P < 0.05$, 与 AGE-BSA 组比较。

3 讨论

经皮冠状动脉介入治疗后再狭窄是目前心血管病领域的研究热点。大量研究表明, 再狭窄的主要病理变化为血管中膜平滑肌细胞向内膜移行、增殖并产生大量基质, 使内膜明显增厚; 同时内皮细胞破坏及功能受损、其合成和分泌保护性因子 (如 NO) 的减少也是促进再狭窄的重要原因^[1,2]。NO 是目前已知最重要的内皮细胞衍生的血管舒张因子, 可引起血管舒张、血流增加, 并抑制血小板粘附聚集, 抑制粒细胞、淋巴细胞和单核细胞粘附于血管内皮等。这些作用使 NO 成为一种重要的防护动脉粥样硬化形成及再狭窄发生的因素^[1,2]。

临床发现, 糖尿病患者较非糖尿病患者冠心病发病率增加, 且经皮冠状动脉介入治疗后再狭窄发生率也显著增加^[3,5]。糖尿病患者心血管病并发症的高发可能为多种因素所致, 其中循环 AGE 滞留是普遍存在的重要特征。糖尿病病患者于持续高血糖, 体内蛋白质被葡萄糖非酶促修饰 (糖化氧化反应) 形成 AGE。AGE 对血管内皮细胞损害导致其功能失调, 从而诱发以血管病变为主的多种并发症^[6]。AGE 修饰蛋白可引起血管平滑肌细胞 p21ras 活化, 导致 MAPK 通路中 ERK 的激活; 也可通过激活 p38 MAPK 通路抑制内皮细胞生成 NO, 这可能是 AGE 修饰蛋白参与糖尿病患者动脉粥样硬化发生发展的重要机制^[7,8]。此外, AGE 及其受体在与再狭窄过程相关的所有细胞 (如炎性细胞、平滑肌细胞) 上出现, 在血管壁上 AGE 及其受体的相互作用可导致炎症反应、氧化应激、平滑肌细胞增殖及细胞外基质产生, 最终引起内膜过度增生与再狭窄。因此, 血管壁上 AGE 的积聚可能是糖尿病患者介入治疗后再狭窄率高的共同机制^[4,5]。

磁场作用于生物体后可引起一系列生物学效应, 如降低血液粘度、改善微循环、加速创伤愈合修复、抑制凝血、抗氧化和清除自由基^[9]、增加 NO 合成^[10]、促进内皮细胞增殖^[11,12] 等。提示适当强度的磁场可能影响再狭窄产生的诸多因素, 达到防治冠状动脉介入术后再狭窄的目的。近年发现, 体外应用交变磁场可显著抑制猪冠状动脉支架植入术后内膜增生^[13], 成年犬磁化冠状动脉内支架植入术后再狭窄率显著低于对照组^[14,15], 表明磁场对血管内支架植入术后内膜增生与再狭窄具有抑制作用。

为阐明磁场对经皮冠状动脉介入治疗后再狭窄的影响及机理, 本文研究了恒磁场对 AGE-BSA 作用下 hUVEC 的 NO 生成及 NOS 活性的影响。结果发现, 100 $\mu\text{g/L}$ AGE-BSA 可抑制 NO 合成, 与既往研究结果一致^[6,7]; 而 $1 \times 10^{-4}\text{T} \sim 20 \times 10^{-4}\text{T}$ 的恒磁场可强度依赖性拮抗 AGE-BSA 对 hUVEC 生成 NO 的抑制效应。表明恒磁场对血管内皮细胞具有保护作用, 可能干预糖尿病患者血管并发症的发生发展。由于血管壁上 AGE 的积聚可能是糖尿病患者介入治疗后再狭窄率高的共同机制^[4,5], 而恒磁场可拮抗 AGE-BSA 对 hUVEC 的抑制效应, 因而有可能用于防治糖尿病患者冠状动脉介入治疗后再狭窄的发生。

恒磁场拮抗 AGE-BSA 而增加 hUVEC 生成 NO 效应的机制尚不清楚, 恒磁场的这种调节作用可能与其对 NO 的生物合成、释放、运转、代偿等刺激作

用有关^[9, 10]。如通过影响生物膜对带电离子的通透能力, 进而影响细胞代谢和生化过程所需酶的活性或功能; 影响生物电能量的大小及传导方向, 使细胞生理生物化学反应加速; 直接促进细胞 DNA 的合成, 影响细胞周期进程; 以及通过清除自由基及抗氧化作用, 拮抗 AGE 的作用。但尚需进一步研究。

[参考文献]

- [1] Maurice T, Vallet B, Bauters C, Dupuis B, Lablanche JM, Bertrand ME. Role of endothelial cells in restenosis after coronary angioplasty. *Fundam clin pharmacol*, 1996, **10** (3): 234-242
- [2] Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*, 2000, **87** (10): 840-844
- [3] Wendt T, Bucciarelli L, Qu W, Lu Y, Yan SF, Stern DM, et al. Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) and vascular inflammation: insights into the pathogenesis of macrovascular complications in diabetes. *Curr Atheroscler Rep*, 2002, **4** (3): 228-237
- [4] Aronson D. Potential role of advanced glycosylation end products in promoting restenosis in diabetes and renal failure. *Med Hypotheses*, 2002, **59** (3): 297-301
- [5] Sakaguchi T, Yan SF, Yan SD, Belov D, Rong LL, Sousa M, et al. Central role of RAGE-dependent neointimal expansion in arterial restenosis. *J Clin Invest*, 2003, **111** (7): 959-972
- [6] 张桂林, 刘尚喜, 邓鹤秋, 张训. 晚期糖基化终产物激活内皮细胞核因子 κ B. *中国动脉硬化杂志*, 2005, **13** (3): 329-331
- [7] 严金川, 黄晓明, 刘乃丰. 糖基化终产物对人脐静脉内皮细胞产生一氧化氮量及其合酶的影响. *中国病理生理杂志*, 1999, **15** (7): 660-662
- [8] 郭志坚, 侯凡凡, 张训, 刘志强, 王力. 晚期糖基化终产物通过 p38 信号通路抑制内皮细胞合成一氧化氮的研究. *中华医学杂志*, 2002, **82** (19): 1 328-331
- [9] Di Carlo AL, White NC, Litovitz TA. Mechanical and electromagnetic induction of protection against oxidative stress. *Bioelectrochemistry*, 2001, **53** (1): 87-95
- [10] 胡涛, 吕安林, 张荣庆, 李兰荪, 贾国良, 曹艳杰. 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** (5): 288-290
- [11] Matsumoto H, Kira K, Kondoh K, Hiramatsu K. Effects of alternately static micromagnetic fields on intravascular endothelial lining. *Angiology*, 1992, **43** (9): 757-764
- [12] 李飞, 贾国良, 张荣庆, 刘兵, 赵新国. 弱恒磁场对人脐静脉及兔主动脉内皮细胞增殖的影响. *中国病理生理杂志*, 2003, **19** (6): 772
- [13] Stefanadis C, Toutouzas K, Tsiamis E, Vlachopoulos C, Tsekoura D, Toutouzas P. Hyperthermia of arterial stented segments by magnetic force: a new method to eliminate intimal hyperplasia. *J Am Coll Cardiol*, 2001, **37** (Suppl A): 2A
- [14] Lu A, Jia G, Gao G, Wang X. The effect of magnetic stent on coronary restenosis after PTCA in dogs. *Chin Med J (Engl)*, 2001, **114** (8): 821-823
- [15] 吕安林, 贾国良, 郭文怡, 杨省利, 王小燕, 胡涛. 磁化支架防治犬 PTCA 术后冠状动脉再狭窄. *第四军医大学学报*, 2002, **23** (10): 911-913

(此文编辑 文玉珊)