

· 基础研究 ·

脉冲电磁场促进骨髓间充质干细胞 I 型胶原表达的初步研究

杨勇 吴华 陶超雄 李峰 李锐 赵文春

【摘要】目的 研究 15 Hz、1 mT 脉冲电磁场对骨髓间充质干细胞 I 型胶原表达的影响及其机制。**方法** 体外培养 SD 大鼠骨髓间充质干细胞,取第 3 代细胞,用 15 Hz、1 mT 脉冲电磁场每日刺激 8 h。用半定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测 I 型胶原 mRNA 的表达,用酶联免疫吸附测定(ELISA)和细胞免疫组织化学等方法检测 I 型胶原的表达;加入环磷腺苷依赖的蛋白激酶 A(cAMP-PKA)通路抑制剂和激动剂,并用 ELISA 和免疫组化的方法观察阻断和促进 cAMP-PKA 通路后脉冲电磁场对 I 型胶原表达的影响。**结果** 15 Hz、1 mT 的脉冲电磁场每日刺激 8 h 可明显促进骨髓间充质干细胞 I 型胶原的表达($P < 0.05$),加入 cAMP-PKA 通路抑制剂 H-89 后,脉冲电磁场促进 I 型胶原表达效应明显减弱,加入 cAMP-PKA 通路激动剂 8-Br-cAMP 后脉冲电磁场促进的 I 型胶原表达效应明显增强。**结论** 15 Hz、1 mT 脉冲电磁场可促进骨髓间充质干细胞 I 型胶原的表达,脉冲电磁场促进 I 型胶原表达的效应同 cAMP-PKA 通路密切相关。

【关键词】 脉冲电磁场; 骨髓间充质干细胞; I 型胶原

A preliminary study of type I collagen expression of bone marrow mesenchymal stem cells promoted by pulsed electromagnetic fields YANG Yong*, WU Hua, TAO Chao-xiong, LI Feng, LI Rui, ZHAO Wen-chun. * Department of Orthopedics, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China
Corresponding author: WU Hua, Email: wuhua360@yahoo.com.cn

【Abstract】Objective To study the influence of pulsed electromagnetic fields on the expression of type I collagen by bone marrow mesenchymal stem cells and its mechanism. **Methods** The bone marrow mesenchymal stem cells of SD rats were isolated and cultured in vitro. The third passage cells were harvested and exposed to pulsed electromagnetic fields (PEMFs) at 15 Hz and 1 mT 8 h/d for 3 days. A semi-quantitative RT-PCR technique was used to measure the type I collagen mRNA expression; ELISA and immunohistochemistry techniques were used to measure type I collagen expression. Inhibitors and promoters of the cAMP-dependent protein kinase A (cAMP-PKA) pathway were added. After the cAMP-PKA pathway had been inhibited or promoted, the effects of the PEMF on type I collagen expression were measured again using ELISA and immunohistochemistry. **Results** PEMFs at 15 Hz and 1 mT induced significant promotion of the expression of type I collagen ($P \leq 0.01$) in comparison with the controls. The type I collagen expression was reduced when the cAMP-PKA pathway inhibitor H-89 was added, and raised when the promoter 8-Br-cAMP was added. **Conclusion** PEMFs at 15 Hz 1 mT can promote type I collagen expression of bone marrow mesenchymal stem cells, and the effect is correlated with the cAMP-PKA pathway.

【Key words】 Pulsed electromagnetic fields; Bone marrow mesenchymal stem cells; Type I collagen

骨缺损、骨折不愈合一直是骨科领域的难点,也是研究的热点。骨髓间充质干细胞是一类具有多项分化潜能的细胞,能向成骨、成脂肪组织等多项组织细胞分化。利用其向成骨分化的特点治疗骨科系统的疾病已是骨科医生研究的热点^[1,2]。Bassett 等^[3]曾报道利用脉冲电磁场治疗骨折不愈合和骨不连具有很好的疗效。有研究表明,脉冲电磁场具有很好的促成骨效应,

并且可以促进骨髓间充质干细胞向成骨分化^[4],如促进骨髓间充质干细胞碱性磷酸酶、骨钙素、骨唾液蛋白等的表达,但其机制目前仍不是很清楚。I 型胶原是骨髓间充质干细胞向成骨分化的早期标记物之一^[5],因此也可以作为脉冲电磁场向成骨分化的评价指标。本研究旨在研究脉冲电磁场对骨髓间充质干细胞 I 型胶原表达的影响,探讨脉冲电磁场促进骨髓间充质干细胞向成骨分化的机制。

材料与方法

一、主要仪器及试剂

1. 主要试剂:美国 Hyclone 公司产低糖必需基本培养基(Dulbecco's minimum essential medium-low glucose,

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2009.07.004

基金项目:国家自然科学基金面上项目(50477043)

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院骨科(杨勇、吴华、陶超雄、李峰、李锐);海军工程大学电力电子技术研究所(赵文春)

通信作者:吴华,Email: wuhua360@yahoo.com.cn

DMEM-LG), Gibco 公司产优质胎牛血清, Amersco 公司产胰蛋白酶, Amersco 公司产逆转录酶, 北京博大泰克的逆转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 试剂, 英骏公司合成引物, 上海森雄科技实业有限公司的 I 型胶原检测酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒, 北京中杉金桥的 I 型胶原抗体和免疫组化试剂盒, BIOSOURCE 公司产 H-89 (Lot Number: 1402330), sigma 公司产 8-Br-cAMP (CAS Number: 23583-48-4)。

2. 主要仪器: 海军工程大学电机系设计与制造的电磁场发生器, 倒置相差显微镜 (OLYMPUS, 日本), eppendorf 产 PCR 仪, BIO-RAD 凝胶成像分析系统, 分光光度计 (岛津 1240 紫外, 日本), 酶标仪等。

二、实验动物

SD 大鼠 6 只, 4~5 周龄, 体重 100~120 g, 雌雄不限, 由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。

三、实验方法

1. 骨髓间充质干细胞的分离及体外培养: 参照文献[6], 将大鼠颈椎脱臼处死后, 用 75% 的酒精浸泡 10 min, 在无菌操作台上分离双侧股骨, 去除股骨周围肌肉组织, 剪去包括骺板在内的两侧骺端。用 20 ml 的注射器抽取 10 ml 含 10% 胎牛血清的 DMEM-LG (内含青霉素、链霉素各 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 冲洗骨髓腔。反复吹打骨髓细胞悬液后, 计数并调整细胞密度约为 5×10^6 个/ml 后直接将其接种于 50 ml 的培养瓶内, 置于 37℃、5% CO_2 、饱和湿度的细胞培养箱中进行培养, 接种后约 6 h 开始换液, 以后每 2~3 d 换液 1 次。由于骨髓冲洗液中红细胞、白细胞以及造血干细胞在体外主要呈悬浮状态, 故通过体外单层细胞培养并定期换液可将其剔除, 所余的贴壁生长细胞主要为骨髓间充质干细胞。约 7~10 d 后, 当细胞铺满单层时, 用 0.25% 的胰蛋白酶消化传代。

2. 磁场暴露: 磁场装置由海军工程大学设计, 能产生各种不同频率、场强的电磁场, 本研究选用 15 Hz、1 mT 的脉冲电磁场。

3. 半定量 RT-PCR 法检测脉冲电磁场对骨髓间充质干细胞 I 型胶原表达的影响: 取第 3 代骨髓间充质干细胞分别种入 6 个 60 mm 的培养皿中, 细胞密度控制在 3×10^5 个/ml, 分对照组和脉冲电磁场 (pulsed electromagnetic field, PEMF) 组 (PEMF 组) 每组 3 皿。待细胞贴壁后, PEMF 组放入 15 Hz、1 mT 脉冲电磁场中每日刺激 8 h。并于第 3 天收集细胞, 提取 RNA, 进行逆转录, PCR, 2% 琼脂糖凝胶电泳, 以及凝胶成像及分析。I 型胶原上游引物序列为 5'-CTGGACAGCGTG-GTGTGGTCGGTCT-3', 下游引物序列为 5'-GGGCTGCG-GATGTTCTCAATCTG-3', 产物大小为 880 bp。内参

GAPDH 上游引物序列为 5'-GTGCTGAGTATGTCGTG-GAG-3', 下游引物序列为 5'-GTCTTCTGAGTGGCAGT-GAT-3', 产物大小为 301 bp。采用双温 PCR, 即: ① 95℃ 3 min, ② 94℃ 30 s, ③ 68℃ 50 s, ④ 重复②、③ 27 次, ⑤ 68℃ 10 min, PCR 结束。

4. ELISA 法检测 I 型胶原: 取第 3 代骨髓间充质干细胞分别种入 35 mm 培养皿中, 1×10^5 个/皿, 分 PEMF 组和对照组。PEMF 组放入 15 Hz、1 mT 脉冲磁场中每日暴磁 8 h, 共 3 d。暴磁后取出细胞, 加入 0.2% Triton 1 ml 作用 30 min 后, 3000 rpm 离心 5 min, 取上清。然后按照 ELISA-I 型胶原检测说明书操作检测 I 型胶原的表达。

5. 免疫组织化学检测 I 型胶原的表达: 取盖玻片泡酸洗净后放入 12 孔板, 以 8×10^3 个/孔种上骨髓间充质干细胞, 分对照组、PEMF 组、PEMF + H-89 (10 μm) 组、PEMF + 8-Br-cAMP (200 μm) 组、H-89 (10 μm) 组和 8-Br-cAMP (200 μm) 组, 每组 3 孔。PEMF 组、PEMF + H-89 (10 μm) 组和 PEMF + 8-Br-cAMP (200 μm) 组在一个 12 孔板中。对照组、H-89 (10 μm) 组和 8-Br-cAMP (200 μm) 组在另一个 12 孔板中。需要加抑制剂 H-89 和激动剂 8-Br-cAMP 的组分别在培养基中加入相应浓度的抑制剂或激动剂。PEMF 组、PEMF + H-89 (10 μm) 组和 PEMF + 8-Br-cAMP (200 μm) 组放入 15 Hz、1 mT 脉冲磁场中刺激, 每日 8 h, 共作用 3 d。其余组在另一个培养箱中培养。3 d 后, 按照免疫组织化学染色说明书染色后, 显微镜下观察拍照。具体是: ① 10% 甲醛固定 20 min, 磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 洗 3 min $\times$ 3 次; ② 0.1% 曲通作用 20 min 以破膜, PBS 洗 3 min $\times$ 3 次; ③ 3% 双氧水孵育 10 min, PBS 洗 3 min $\times$ 3 次; ④ 滴加封闭用正常动物血清工作液室温孵育 15 min, 不洗; ⑤ 滴加一抗 (1:500 稀释) 4℃ 湿盒过夜, PBS 洗 3 min $\times$ 3 次; ⑥ 滴加生物素化二抗工作液, 37℃, 15 min, PBS 洗 3 min $\times$ 3 次; ⑦ 滴加辣根过氧化物酶标记的工作液 37℃, 15 min, PBS 洗 3 min $\times$ 3 次; ⑧ 二氨基联苯胺 (diaminobenzidine, DAB) 显色; ⑨ 苏木素复染后光镜下观察拍照。

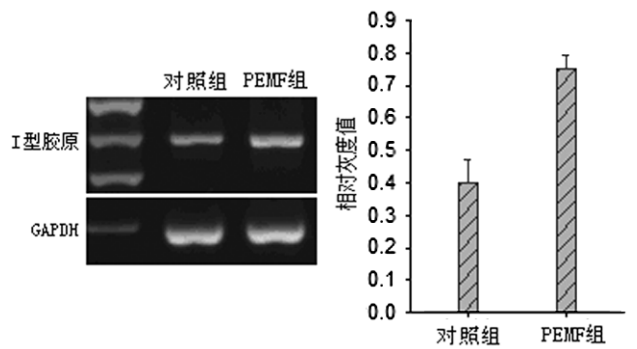
四、统计学分析

数据均以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 应用 SPSS 13.0 版软件进行统计学分析, 应用单因素方差分析进行统计学处理。

结 果

一、脉冲电磁场对大鼠骨髓间充质干细胞 I 型胶原 mRNA 表达的影响

在脉冲电磁场作用下 (15 Hz、1 mT、8 h/d, 共 3 d), 骨髓间充质干细胞 I 型胶原 mRNA 的表达明显升高。见图 1。

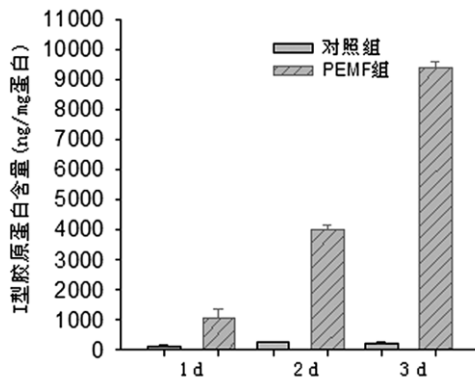


注:对照组相对灰度值为(0.399 ± 0.121),PEMF 组为(0.751 ± 0.051), $n=3$, $P<0.05$

图1 脉冲电磁场对 I 型胶原 mRNA 表达的影响

二、脉冲电磁场促进骨髓间充质干细胞 I 型胶原的表达

为了再次说明脉冲电磁场是否促进骨髓间充质干细胞 I 型胶原的表达,我们用 ELISA 法再次检测了 I 型胶原的表达情况,结果同 RT-PCR 法一致。见图 2。

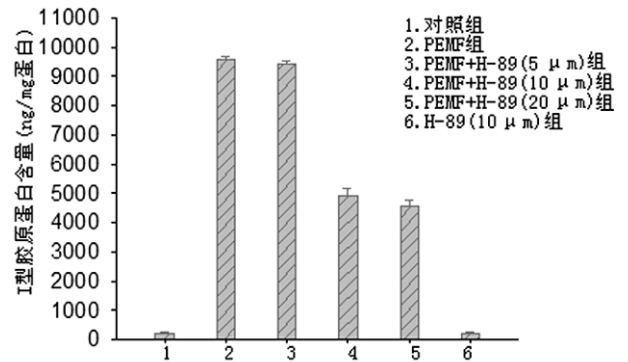


注:脉冲电磁场刺激骨髓间充质干细胞 1,2,3 d (15 Hz、1 mT、8 h/d) 均明显促进 I 型胶原的表达, $n=3$, $P<0.01$

图2 脉冲电磁场对骨髓间充质干细胞 I 型胶原表达的影响

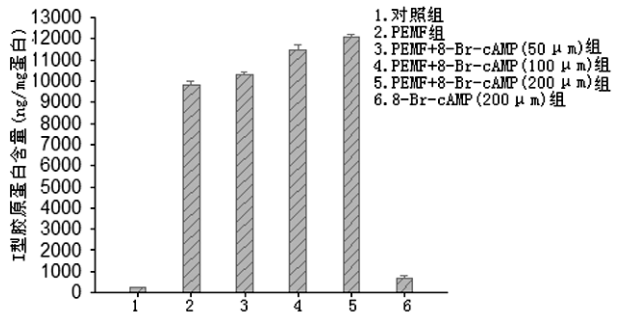
三、cAMP 及其依赖的 PKA 信号通路的激活或抑制影响着脉冲电磁场促进骨髓间充质干细胞 I 型胶原表达的效应

为了观察环磷腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)及其依赖的蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 通路是否同脉冲电磁场促进 I 型胶原表达相关,我们在培养基中加入了 PKA 的抑制剂 H-89 或激动剂 8-Br-cAMP,并同时予以电磁场刺激 3 d。结果显示,在加入 H-89 后脉冲电磁场的促进 I 型胶原表达的效应明显降低,并且随着 H-89 浓度的增加抑制作用也越显著,在 H-89 浓度为 10 μm 时达到最大的抑制效率,而单独应用 H-89 并不影响 I 型胶原的表达。在加入该通路的激动剂 8-Br-cAMP 后脉冲电磁场促 I 型胶原表达的效应有所增加,且随着 8-Br-cAMP 浓度的增加促进 I 型胶原表达的效应也增加,而单独应用 8-Br-cAMP 也并不影响 I 型胶原的表达。见图 3 和图 4。



注:脉冲电磁场刺激骨髓间充质干细胞 3 d (15 Hz、1 mT、8 h/d),并同时加入 H-89 抑制骨髓间充质干细胞的 cAMP 依赖的蛋白激酶 A 通路后,脉冲电磁场促进 I 型胶原表达的影响受到抑制,并且随着浓度的增加,抑制效应也增加,但却不能完全抑制。 $n=3$, $P<0.01$

图3 加入蛋白激酶 A 抑制剂 H-89 后 I 型胶原的表达



注:脉冲电磁场刺激骨髓间充质干细胞 3 d (15 Hz、1 mT、8 h/d),并同时加入 8-Br-cAMP 激动剂后,脉冲电磁场促进骨髓间充质干细胞 I 型胶原表达增强,但单独的 cAMP 激动剂并不能促进 I 型胶原表达的明显增加。 $n=3$, $P<0.01$

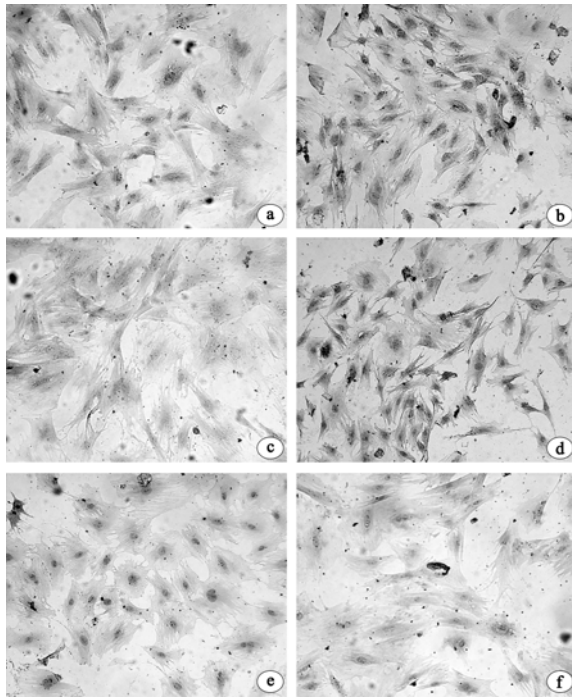
图4 加入蛋白激酶 A 激动剂 8-Br-cAMP 后 I 型胶原的表达

为进一步确定我们的上述结果,我们又做了细胞的免疫组化,同样加入该通路的激动剂和阻滞剂,观察 I 型胶原的表达。结果显示,与 ELISA 法的结果一致。见图 5。

讨 论

体内外研究表明,在各种不同的频率中,15 Hz 的脉冲电磁场的促成骨作用最强^[7],因此本研究选用 15 Hz、1 mT 的脉冲电磁场,我们以前的实验也表明,15 Hz、1 mT 的脉冲电磁场具有较好的促成骨作用(如促进骨钙蛋白 mRNA 的表达)^[8]。本研究表明,15 Hz、1 mT 的脉冲电磁场还可促进骨髓间充质干细胞 I 型胶原的表达。

I 型胶原是成骨细胞分化成熟的重要指标之一,也常常作为骨髓间充质干细胞向成骨分化的早期检测指标。cAMP 是细胞内重要的信号分子,cAMP 及其依赖的信号通路同多个细胞的分化密切相关,如用 BMP2 作用大鼠骨髓间充质干细胞,会引起细胞内 cAMP 的升高,并使其依赖的 PKA 等磷酸化。进一步研究发现,BMP2 的促成骨分化作用是依赖于其激活的 cAMP-PKA 通路的^[9]。我们前面的试验表明,脉冲



注:a. 对照组;b. 脉冲电磁场作用 3 d 后;c. 在培养基中加入蛋白激酶 A 抑制剂 H-89 (10 μm) 并予以脉冲电磁场刺激 3 d 后;d. 在培养基中加入蛋白激酶 A 激动剂 8-Br-cAMP (200 μm) 并予以脉冲电磁场刺激 3 d 后;e. 在培养基中加入蛋白激酶 A 抑制剂 H-89 (10 μm) 培养 3 d 后;f. 在培养基中加入蛋白激酶 A 激动剂 8-Br-cAMP (200 μm) 培养 3 d 后

脉冲电磁场促进骨髓间充质干细胞 I 型胶原的表达,用 H-89 抑制 cAMP 蛋白激酶 A 通路后,脉冲电磁场的促 I 型胶原表达的效应明显减弱,免疫组织化学反应呈阴性

图 5 免疫组织化学显示 I 型胶原的表达 (免疫组化染色, $\times 100$)

电磁场能促进骨髓间充质干细胞 cAMP 的升高^[4],为此我们认为脉冲电磁场促进 I 型胶原表达也可能与 cAMP 有关。H-89 是 cAMP, PKA 等的抑制剂,8-Br-cAMP 是 PKA 的激动剂^[9-11]。为了验证脉冲电磁场促进 I 型胶原的表达是否与 cAMP 及其依赖的信号通路相关,我们加入该通路的抑制剂 H-89,看是否会抑制脉冲电磁场的促 I 型胶原表达的效应。我们又加入该通路的激动剂 8-Br-cAMP,看是否促进 I 型胶原的表达。结果显示,在加入 H-89 后脉冲电磁场的促进 I 型胶原表达的效应明显降低,而在加入该通路的激动剂后脉冲电磁场的促 I 型胶原表达的效应有所增加。表明脉冲电磁场促进骨髓间充质干细胞 I 型胶原的表达与 cAMP-PKA 通路密切相关。这也可以部分解释脉冲电磁场的促成骨效应。本研究还表明,即使加入足量 cAMP-PKA 通路的抑制剂,也只能部分抑制脉冲电磁场促进的 I 型胶原的表达,由此我们推测 cAMP-PKA 通路并不在脉冲电磁场的促进 I 型胶原表达中起关键性的作用,也许还存在其他的机制。

本研究也存在以下不足:第一,有研究表明,脉冲电磁场可以促进成骨细胞骨形态蛋白的表达,并促进骨形

态蛋白 2、前列腺素 E2 等的释放,脉冲电磁场是否也促进骨髓间充质干细胞释放骨形态蛋白等,本研究没有讨论。前面我们提到在骨形态蛋白的作用下,骨髓间充质干细胞内的 cAMP-PKA 通路会被激活,并且同其促成骨分化的效应密切相关。那么脉冲电磁场是促进细胞释放骨形态蛋白等才激活 cAMP-PKA 通路,促进 I 型胶原的表达,还是脉冲电磁场直接激活 cAMP-PKA 通路并促进 I 型胶原的表达,这一点有待进一步的试验来证实。第二,本研究只是表明脉冲电磁场激活的 cAMP-PKA 通路与促进 I 型胶原的表达是相关的,I 型胶原是骨髓间充质干细胞向成骨分化的早期表达指标,是否其他的成骨指标的表达也与这一个通路相关呢?第三,骨髓间充质干细胞向成骨分化包括早期分化和分化成熟两个阶段,我们的研究只是表明在促进早期分化中发挥着重要的作用,其对成熟分化的重要影响也有待研究。

尽管有诸多不足,但本研究初步表明,脉冲电磁场是通过作用某些信号通路来促进骨髓间充质干细胞向成骨分化的,这为脉冲电磁场促成骨作用机制的研究奠定了初步的基础,也部分解释了脉冲电磁场的促成骨作用。

参 考 文 献

- [1] Chan J, O'Donoghue K, Kennea N, et al. Myogenic potential of fetal mesenchymal stem cells. *Ann Acad Med Singapore*, 2003, 32(5 Suppl):S11-13.
- [2] Gao J, Caplan AI. Mesenchymal stem cells and tissue engineering for orthopaedic surgery. *Chir Organi Mov*, 2003, 88:305-316.
- [3] Bassett CA. Fundamental and practical aspects of therapeutic uses of pulsed electromagnetic fields (PEMFs). *Crit Rev Biomed Eng*, 1989, 17:451-529.
- [4] Wu H, Ren K, Zhao W, et al. Effect of electromagnetic fields on proliferation and differentiation of cultured mouse bone marrow mesenchymal stem cells. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*, 2005, 25:185-187.
- [5] Zhang W, Yang N, Shi XM. Regulation of mesenchymal stem cell osteogenic differentiation by glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ). *J Biol Chem*, 2008, 283:4723-4729.
- [6] Mok PL, Leong CF, Cheong SK. Isolation and identification of putative mesenchymal stem cells from bone marrow. *Malays J Pathol*, 2003, 25:121-127.
- [7] 陈启明, 主译. 骨科基础科学. 北京:人民卫生出版社, 2001:129-130.
- [8] 杨勇, 吴华, 赵东明, 等. 脉冲电磁场对骨髓间充质干细胞成骨成脂肪分化的影响. *中华物理与康复医学杂志*, 2007, 29:517-520.
- [9] Zhao L, Yang S, Zhou GQ, et al. Downregulation of cAMP-dependent protein kinase inhibitor gamma is required for BMP-2-induced osteoblastic differentiation. *Int J Biochem Cell Biol*, 2006, 38:2064-2073.
- [10] Li TF, Zuscik MJ, Ionescu AM, et al. PGE2 inhibits chondrocyte differentiation through PKA and PKC signaling. *Exp Cell Res*, 2004, 300:159-169.
- [11] Kasagi Y, Horiba N, Sakai K, et al. Involvement of cAMP-response element binding protein in corticotropin-releasing factor (CRF)-induced down-regulation of CRF receptor 1 gene expression in rat anterior pituitary cells. *J Neuroendocrinol*, 2002, 14:587-592.

(修回日期:2009-02-08)

(本文编辑:松 明)