

· 基础研究 ·

电磁场激活细胞外信号调节激酶通路在骨髓间充质干细胞增殖与分化成骨中的作用

赵东明 吴华 黄珊珊 黄飞 赵文春 杨勇 陶超雄

【摘要】目的 探讨电磁场作用于大鼠骨髓间充质干细胞对细胞外信号调节激酶(ERK)信号通路的影响,并进一步研究电磁场诱导所致 ERK 信号通路变化在骨髓间充质干细胞增殖与分化成骨中的作用。**方法** 体外培养大鼠骨髓间充质干细胞,取第 3 代细胞,分为对照组、暴磁组、PD98059 组和 PD98059 + 暴磁组。采用 Western blotting 法检测 ERK 通路的活性变化,采用四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测各组细胞的增殖活性,按照碱性磷酸酶(ALP)试剂盒说明书步骤检测各组细胞 ALP 活性。**结果** ①暴磁后 5 min, ERK1/2 磷酸化水平即明显高于对照组,1 h 后仍处于较高水平($P < 0.01$); PD98059 作用可明显抑制 ERK1/2 磷酸化水平的升高,提示 PD98059 可有效阻断 ERK 通路的激活。②MTT 法检测结果提示,暴磁后细胞的增殖活性明显升高,PD98059 可明显抑制这种效应。③暴磁组 ALP 活性明显高于对照组,PD98059 + 暴磁组 ALP 活性较暴磁组高($P < 0.01$),差异有统计学意义。**结论** 在 15 Hz、1 mT 的正弦波电磁场作用下,骨髓间充质干细胞 ERK 信号通路很快被激活,引起细胞增殖活性和 ALP 活性的改变,这为进一步研究磁场对骨髓间充质干细胞的促增殖和分化成骨机制提供了指导意义。

【关键词】 电磁场; 细胞外信号调节激酶信号通路; 骨髓间充质干细胞; 细胞增殖; 分化成骨

The effects of activating the ERK signaling pathway with an electromagnetic field on osteogenic proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells ZHAO Dong-ming*, WU Hua, HUANG Shan-shan, HUANG Fei, ZHAO Wen-chun, YANG Yong, TAO Chao-xiong. 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 investigate the effects of an electromagnetic field on the extra-cellularly regulated kinase (ERK) signalling pathway and to determine the impact of electromagnetic activation on osteogenic proliferation and differentiation in rat bone marrow mesenchymal stem cells. **Methods** Rat bone marrow mesenchymal stem cells were isolated and cultured in vitro. The third-passaged cells were divided into 4 groups (Control, PD98059, EMF and EMF + PD98059). Western blotting was used to detect the activation of the ERK signal pathway after exposure to an electromagnetic field. MTT assay was used to determine the activation of proliferation in the cells in the different groups. The cells' alkaline phosphatase activities were also detected. **Results** (1) The ERK signal pathway in these rat bone marrow mesenchymal stem cells was activated after exposure to a 15 Hz, 1 mT, sine wave form electromagnetic field for 5 min. Activation remained high for at least 1 h. PD98059 can effectively block the activation of the ERK signal pathway. (2) Cell proliferation was promoted after exposure to the electromagnetic field, and this effect could be significantly inhibited by PD98059. (3) Alkaline phosphatase was significantly elevated in these bone marrow mesenchymal stem cells after exposure to the electromagnetic field. The activation in the EMF + PD98059 group was slightly greater than in the EMF group. **Conclusion** Electromagnetic fields of 15 Hz and 1 mT can activate the ERK signal pathway and alter proliferation and osteogenic differentiation in the bone marrow mesenchymal stem cells of rats.

【Key words】 Electromagnetic fields; Kinase signalling pathway; Bone marrow, Mesenchymal stem cells; Cell proliferation; Osteogenic differentiation

大量的临床观察及动物实验表明,电磁场能促进

骨折处的新骨生成,使骨密度增高,但电磁场在骨骼生物学效应中的具体机制至今仍不十分清楚。骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一类来源于骨髓的具有多向分化潜能的细胞,有强大的增殖与分化能力。已有研究表明,电磁场有促进骨髓 MSCs 增殖和分化成骨的作用^[1,2],但对其具体的作用机制

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(赵东明、吴华、黄飞、杨勇、陶超雄);华中科技大学同济医学院组织胚胎学教研室(黄珊珊);海军工程大学电气与信息工程学院(赵文春)

通信作者:吴华,Email: wuhua360@yahoo.com.cn

尚无明确的解释。细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)是丝裂素活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)家族的重要成员,它们表达广泛,涉及细胞调节的许多生物学行为。多种刺激因子,如生长因子、细胞因子及病毒等均可激活这条信号通路,从而诱导多种细胞的增殖、分化、凋亡和细胞周期的变化等^[3-6]。有研究表明,60 Hz 的电磁场可激活人乳腺癌细胞中 ERK 信号通路,引起 ERK 磷酸化水平升高^[7]。而关于电磁场对骨髓 MSCs 中 ERK 信号通路影响的研究,以及 ERK 信号通路在电磁场促进该细胞增殖及分化中的作用,目前尚未见报道。本实验在 15 Hz、1 mT 的正弦波电磁场条件下观察 ERK 磷酸化水平的变化,并观察受 ERK 通路阻断剂——PD98059 干预后骨髓 MSCs 的增殖与分化成骨情况,推断 ERK 信号通路在电磁场刺激骨髓 MSCs 增殖与分化过程中的作用。

材料与方法

一、主要仪器及试剂

主要试剂包括美国 Hyclone 公司产达尔伯克 F12 最低必需培养基[1:1 Dulbecco's modified Eagle's medium and Ham's F12, DMEM/F12 (1:1)]和优质胎牛血清, Amersco 公司产胰蛋白酶, Biosource 公司产 PD98059, Sigma 公司产四甲基偶氮唑盐(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)和二甲基亚砷(DMSO), 南京建成生物工程研究所产碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)检测试剂盒和考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒, Santa Cruz 公司产小鼠抗 pERK1/2 及兔抗 ERK1/2 等。

主要仪器包括海军工程大学电机系设计与制造的电磁场发生器,本实验所用电磁场为频率 15 Hz、强度 1 mT 的正弦波电磁场,电磁场发生器置入条件为 37℃、5% CO₂、饱和湿度的细胞培养箱中;日本产 Olympus 倒置相差显微镜;华东电子管厂生产的 DG3022A 型酶联免疫检测仪等。

二、实验动物

Sprague-Dawley 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、大鼠骨髓 MSCs 的分离和体外培养

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骺端。用 5 ml 的注射器抽取 10 ml 含 10% 胎牛血清的 DMEM-F12 培养基(内含青霉素、链霉素各 100 U/ml),冲洗骨髓腔,将冲洗液反复吹打制成骨髓细胞悬液,计数并调整细胞密

度约 5×10^6 个/ml 后直接将其接种于 50 ml 的培养瓶内,置于条件为 37℃、5% CO₂、饱和湿度的细胞培养箱中进行培养,接种后约 24 h 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 MSCs。约 5~7 d 后,当细胞铺满单层的 90% 时,用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。

四、暴磁方法

暴磁时将细胞移入培养箱的磁场发生器线圈中央,按照规定时间进行暴磁,采用频率 15 Hz、强度 1 mT 的正弦波电磁场。

五、ERK 磷酸化水平的检测

采用 Western blotting 法检测暴磁后 ERK 磷酸化水平。取生长良好的第 3 代大鼠骨髓 MSCs,调节细胞密度至约 1×10^5 个/ml,均匀种于 7 个直径为 9 cm 的一次性培养皿中,每皿 8 ml,随机分为对照组和暴磁组,暴磁组再根据暴磁时间分为 5 min、10 min、15 min、30 min 和 1 h 等 5 个亚组。细胞培养 24 h 后按照相应的暴磁时间刺激细胞,磁刺激结束后同时收集细胞;加细胞裂解液(含 50 mmol/L Tris-HCl pH 值 7.4, 50 mmol/L NaCl, 1% Triton-100, 1 mmol/L EDTA pH 值 8.0, 100 μg/ml PMSF, 1:1000 Cocktail),匀浆后转移到离心管中,超声破碎(10 s, 3 次);4℃ 下以 $12000 \times g$ 离心 15 min,取上清;加 $5 \times$ 上样缓冲液(含 2 mol/L Tris-HCl pH 值 6.8, 20% SDS, 0.25% 甘油, 10% 2-巯基乙醇, 0.5% 溴酚蓝), 8%~12% SDS-PAGE 分离蛋白样品;取样品加入各个泳道,恒流(40 mA)下电泳;将蛋白质转移至硝酸纤维素膜上,100 V 恒压转膜 80 min;室温下将硝酸纤维素膜用 0.01% PBS 配制的 5% 脱脂牛奶封闭 1 h;加小鼠抗 pERK1/2 抗体(1:500)或兔抗总 ERK1/2(1:500),于 4℃ 下孵育过夜;用 5% 脱脂牛奶/0.01% PBS 漂洗 3 次,每次 10 min;加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔或羊抗小鼠 IgG(1:10000),在室温下孵育 2 h;用 0.01% PBS 漂洗 3 次,每次 10 min;将化学发光试剂 ECL 中的增强液和稳定的过氧化酶溶液按 1:1 比例混合后滴加到硝酸纤维素膜上,室温下反应 2 min;将硝酸纤维素膜放入保鲜膜中,包裹,装入片夹;在暗室内将胶片放在硝酸纤维素膜上曝光,自动 X 光冲片机冲洗胶片。

六、PD98059 抑制效果的检测

用上述方法收集细胞,随机分为对照组、暴磁组和 PD98059 + 暴磁组,暴磁组和 PD98059 + 暴磁组再根据暴磁时间分为 5 min 和 1 h 等 2 个亚组。PD98059 + 暴磁组用 ERK 通路阻断剂——PD98059 (20 μmol/L)处理后暴磁。各组细胞分别提取总蛋

白,采用 Western blotting 法检测 ERK1/2 表达量及其磷酸化水平(pERK1/2)。

七、细胞增殖活性的检测

采用 MTT 法检测细胞的增殖活性变化。取生长良好的第 3 代细胞,以 2×10^3 个/孔接种于 96 孔培养板,随机分为对照组、暴磁组、PD98059 组和 PD98059 + 暴磁组。对照组及暴磁组每孔加入 200 μ l 含 10% 胎牛血清的 DMEM-F12 培养基(基础培养基),PD98059 + 暴磁组每孔加入浓度为 20 μ mol/L 的 PD98059 和含 10% 胎牛血清的 DMEM-F12 培养基(干预培养基)。对照组细胞置于培养箱中培养 3 d,暴磁组及 PD98059 + 暴磁组细胞置于安装有电磁场发生器的培养箱中(余条件同普通培养箱),每次处理 30 min,每天 2 次,共刺激 3 d。之后采用 MTT 法分析各组骨髓 MSCs 的存活和增殖能力,在酶标检测仪上检测 λ 为 490 nm 时各孔的吸光度值(OD 值)。

八、ALP 活性的检测

取生长良好的第 3 代细胞,以 1×10^5 个/孔接种于 6 孔培养板,随机分为对照组、暴磁组、PD98059 组和 PD98059 + 暴磁组。暴磁组及 PD98059 + 暴磁组细胞每天连续暴磁 8 h,共刺激 5 d,对照组细胞在普通培养基中培养 5 d。之后收集细胞,每孔加 1 ml 的 TritonX-100,在 4℃ 冰箱中过夜,超声粉碎后用考马斯亮蓝法测定细胞的蛋白质含量。按 ALP 试剂盒说明书进行操作,检测 λ 为 520 nm 时的 OD 值,计算 ALP 活性,以 U/g 蛋白表示。

九、统计学分析

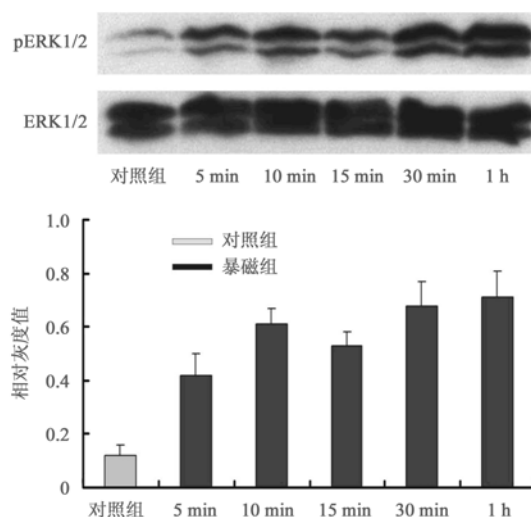
应用 SPSS 10.0 版统计软件对数据进行统计,数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验进行分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、Western blotting 检测结果

1. 暴磁后细胞 ERK 磷酸化水平的变化:电磁场刺激 5 min 后,ERK 磷酸化水平即升高,刺激 10 min 继续升高,至 1 h 仍居于较高水平,与对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$),见图 1。

2. ERK 通道阻断剂——PD98059 对电磁场作用后 ERK 磷酸化水平的影响:电磁场刺激 5 min 和 1 h 后,ERK 磷酸化水平明显升高,与对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$);加用阻断剂后再进行暴磁,ERK 磷酸化水平又回到较低水平;暴磁组和 PD98059 + 暴磁组相同时间点进行比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$),见图 2。提示 PD98059 可有效阻断 ERK 通路的激活。



注:各暴磁组与对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$)

图 1 电磁场激活 ERK 磷酸化随时间的变化($n = 10$)

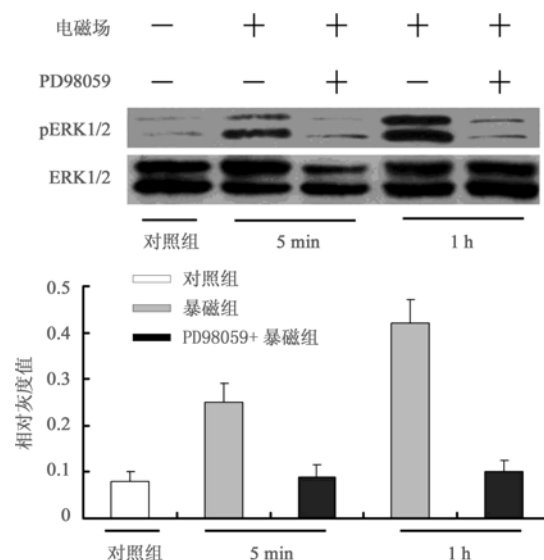


图 2 PD98059 对电磁场作用后 ERK 磷酸化水平的影响($n = 10$)

二、MTT 法检测细胞的增殖活性变化

电磁场刺激 3 d 后,暴磁组 MTT 产物 OD 值明显高于对照组($P < 0.01$);浓度为 20 μ mol/L 的 PD98059 可明显阻断该效应,PD98059 + 暴磁组 OD 值均明显低于暴磁组和对照组,差异均有统计学意义($P < 0.01$),见表 1。

表 1 MTT 产物吸光度值及 ALP 活性($n = 15, \bar{x} \pm s$)

组 别	n	OD 值	ALP 活性 (U/g 蛋白)
对照组	15	0.465 $\pm$ 0.023	21.23 $\pm$ 3.14
暴磁组	15	0.512 $\pm$ 0.025 ^a	26.86 $\pm$ 3.21 ^a
PD98059 组	15	0.387 $\pm$ 0.023 ^a	22.35 $\pm$ 4.03 ^a
PD98059 + 暴磁组	15	0.394 $\pm$ 0.022 ^{ab}	28.71 $\pm$ 3.87 ^{ab}

注:与对照组比较,^a $P < 0.01$;与暴磁组比较,^b $P < 0.01$

三、ALP 活性的检测结果

电磁场刺激 5 d 后,暴磁组 ALP 活性明显高于对照组($P < 0.01$);PD98059 + 暴磁组 ALP 活性也明显高于暴磁组($P < 0.01$),见表 1。

讨 论

很多研究已经证实,电磁场可促进骨髓 MSCs 增殖,并定向诱导其向成骨细胞分化^[8-10],但具体的机制,目前尚不清楚。本实验从细胞信号转导通路的角度,初步研究了电磁场照射后 ERK 通路的变化,以及该通路在电磁场促进骨髓 MSCs 增殖与分化成骨中的作用。本研究结果表明,电磁场可激活 ERK 信号通路,并可通过该通路调节骨髓 MSCs 的增殖与分化成骨,其在增殖方面的作用较成骨分化作用更为明显。

ERK 信号通路是细胞内重要的信号传导通路,通过 Ras-Raf-MEK-ERK1/2 的级联磷酸化反应,调节细胞的增殖和分化。ERK 信号通路的激活是通过 ERK 磷酸化而实现的。PD98059 可以选择性阻断 ERK 上游 MEK 的活化,是 ERK 通路激活过程的有效阻断剂。本研究结果显示,经 15 Hz、1 mT 的正弦波电磁场处理 5 min 后,大鼠骨髓 MSCs 的 ERK 磷酸化水平即升高,10 min 达到较高水平,1 h 后仍维持在较高水平。这表明,电磁场可快速激活大鼠骨髓 MSCs 的 ERK 信号通路,从而引发一系列的生物学效应。

为了进一步研究 ERK 通路在电磁场对骨髓 MSCs 产生生物学效应过程中所起的作用,本实验先用 ERK 通路阻断剂 PD98059 阻断该通路,然后进行暴磁处理,观察骨髓 MSCs 的增殖活性和 ALP 活性变化。ALP 的表达及活性代表骨的形成状况,表明向成骨细胞分化的开始^[11],与成骨细胞的分化、成熟呈正相关,故本实验选择检测 ALP 活性作为观察骨髓 MSCs 向成骨细胞分化程度的指标。结果如表 1 所示,电磁场可显著促进骨髓 MSCs 增殖;阻断 ERK 通路后,骨髓 MSCs 的增殖活性明显受到抑制,并且电磁场对该细胞的促增殖效应亦被显著抑制;但 PD98059 + 暴磁组的增殖活性仍较 PD98059 组高。这提示我们:①通过激活 ERK 信号通路而促进骨髓 MSCs 的增殖可能是电磁场促细胞增殖的主要途径之一;②PD98059 + 暴磁组细胞的增殖活性稍高于 PD98059 组,差异有统计学意义,即 PD98059 尚不能完全阻断电磁场的促增殖效应,提示电磁场还可能同时通过激活其他通路促进骨髓 MSCs 的增殖。ALP 活性检测结果显示,电磁场作用可显著增强 ALP 的活性;阻断 ERK 通路后,PD98059 组的 ALP 活性稍高于对照组,PD98059 + 暴磁组的 ALP 活性也稍高于暴磁组,差异有统计学意义,提示 ERK 通路在电磁场增强 ALP 活性过程中的

作用不是很显著,至于阻断该通路为什么会使 ALP 活性轻度升高,尚有待进一步研究。Suzuki 等^[12]阻断成骨样细胞 MC3T3-E1 的 ERK 信号通路后,检测细胞增殖活性和细胞内 ALP 活性的变化,发现在细胞的增殖期,细胞增殖受到显著抑制;而 ERK 阻断剂对处于细胞分化期的细胞内 ALP 活性变化没有很强的影响,甚至使其活性轻度升高。本实验对骨髓 MSCs 的研究结果与上述结论是一致的,而对于 ERK 信号通路在骨髓 MSCs 分化成骨中的作用及机制,尚需进一步研究。

综上所述,15 Hz、1 mT 正弦波电磁场可激活骨髓 MSCs 内 ERK 信号通路,并且主要通过该机制促进骨髓 MSCs 的增殖;而在电磁场促进骨髓 MSCs 分化成骨的过程中,激活 ERK 信号通路所起的作用较小。而以上结果的具体作用机制,尚需进一步研究加以揭示,以便更好地为电磁场在临床上用于促进骨愈合提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] 方真华,吴华,马伟明,等. 50Hz 电磁场对小鼠骨髓间充质干细胞增殖的影响. 中华物理医学与康复杂志,2004,26:1-4.
- [2] 赵敏,许建中,周强,等. 脉冲电磁场诱导人骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的研究. 中华物理医学与康复杂志,2005,27:5-8.
- [3] Manning G, Whyte DB, Martinez R, et al. The protein kinase complement of the human genome. Science, 2002, 298:1912-1934.
- [4] Black EJ, Walker M, Clark W, et al. Cell transformation by v-Jun deactivates ERK MAP kinase signalling. Oncogene, 2002, 21: 6540-6548.
- [5] Tang D, Wu D, Hirao A, et al. ERK activation mediates cell cycle arrest and apoptosis after DNA damage independently of p53. J Biol Chem, 2002, 277:12710-12717.
- [6] Zhang W, Lee JC, Kumar S, et al. ERK pathway mediates the activation of Cdk2 in IGF-1-induced proliferation of human osteosarcoma MG63 cells. J Bone Miner Res, 1999, 14:528-535.
- [7] Nie K, Henderson A. MAP kinase activation in cells exposed to a 60 Hz electromagnetic field. J Cell Biochem, 2003, 90:1197-1206.
- [8] 赵文春,马伟明,赵治华,等. 工频磁场刺激小鼠 MSCs 体外增殖与分化的初步研究. 生物医学工程学杂志,2005,22:510-513.
- [9] 方真华,吴华,马伟明,等. 50 Hz 电磁场对小鼠骨髓间充质干细胞增殖的影响. 中华物理医学与康复杂志,2004,26:1-4.
- [10] 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. 中华物理医学与康复杂志,2007,29:517-520.
- [11] Mutaglia A, Cancedda R, Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. J Cell Sci, 2000, 113:1161-1166.
- [12] Suzuki A, Guicheux J, Palmer G, et al. Evidence for a role of p38 MAP kinase in expression of alkaline phosphatase during osteoblastic cell differentiation. Bone, 2002, 30:91-98.

(修回日期:2008-03-20)

(本文编辑:吴 倩)