· 基础研究 ·

正弦波电磁场对大鼠椎间盘纤维环细胞的生物学影响

刘铁　游洪波　陈安民　赵东明　李锋

【摘　要】 **目的**　研究低频正弦波电磁场对大鼠椎间盘纤维环细胞增殖和细胞外基质的生物学影响。**方法**　体外培养大鼠生长良好的椎间盘纤维环细胞,取生长良好的第 3 代细胞,随机分为实验组和对照组,实验组采用 75 Hz 正弦波电磁场的间断刺激,对照组置于同样培养条件下但不暴磁。通过流式细胞术和四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测细胞周期和增殖活性,逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测椎间盘细胞胶原和蛋白聚糖(aggrecan)的表达情况,Alcian Blue 法检测糖胺多糖(sGAG)含量。**结果**　暴磁刺激初期细胞增殖效果不明显,刺激天数 >4 d 时能显著促进细胞增殖($P<0.05$),与对照组相比,实验组细胞 I、II 型胶原、蛋白聚糖的表达水平均显著上调($P<0.05$),GAG 含量也增加。**结论**　正弦波电磁场可以促进纤维环细胞的增殖,上调正常椎间盘细胞外基质 I、II 型胶原、蛋白聚糖的表达水平和 GAG 含量,可望为治疗椎间盘退变提供一种新的思路。

【关键词】 电磁场;　椎间盘;　纤维环细胞

Electromagnetic fields and the proliferation and matrix synthesis of annulus fibrosus cells

LIU Tie, YOU Hong-bo, CHEN An-min, ZHAO Dong-ming, LI Feng. Department of Orthopedics, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Corresponding author: LI Feng, Email: lifeng@tjh.tjmu.edu.cn

【**Abstract**】 **Objective**　To study the biological effects of sinusoidal electromagnetic fields (EMFs) on proliferation and extracellular matrix (ECM) formation by annulus fibrosus (AF) cells in rats. **Methods**　AF cells isolated from rats were randomly divided into a control group and an experimental group. The cells in the experimental group were stimulated with an EMF, while those in the control group were held under the same culture conditions but with no EMF. Flow cytometry and MTT were performed to observe the effects on the cell cycle and proliferation. Collagen and aggrecan expression were examined after amplification with a reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). Sulfated glycosaminoglycan (sGAG) content was detected by applying the Alcian blue method. **Results**　AF cell proliferation was not significant until after 4 days of stimulation. Compared with the control group, the expression of type I and II collagen and Aggrecan were up-regulated, and sGAG content was increased in the experimental group. **Conclusion**　AF cell proliferation was enhanced by EMF. Gene expression of collagen type I and II and Aggrecan increased, as well as sGAG levels. The results suggest an approach for treating of intervertebral disc degeneration.

【**Key words**】 Electromagnetic fields;　Intervertebral disc;　Annulus fibrosus cells

椎间盘退变是引起腰痛及继发性脊柱疾病的重要原因。椎间盘由软骨板、纤维环和髓核构成,对维持人体生理功能有重要作用。椎间盘退变后,纤维环和髓核含水量下降、胶原和蛋白聚糖减少、原纤维变性及胶原纤维沉积增加[1]。如何诱导其正常基因的表达,维持细胞外基质成分的合成和分泌,从而适应机体正常的负荷和运动要求,对延缓椎间盘退变可能有积极意义。

电磁场对很多组织和细胞都有一定的生物学效应,尤其是基因表达及其信号传导通路等作用已经成为目前研究的热点[2-4]。有研究表明,电磁场(electromagnetic fields, EMF)可以刺激间充质干细胞、软骨细胞相关基因的表达,调节其细胞外基质的分泌[5-7],但其对椎间盘细胞的作用还没有具体研究。本实验旨在初步研究电磁场对体外培养的椎间盘细胞的生物学影响。

材料与方法

一、主要试剂及仪器

1. 主要试剂:达尔伯克改良伊格尔/F12 培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium/F12, DMEM/F12)(美国 Gibco 公司);噻唑蓝(methyl thiazolyl tetrazalium, MTT),N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙磺酸(hydroxyethyl piperazine ethanesulfonic acid, HEPES),Triton X-100(美国 Ameresco 公司);二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO),胰酶,II 型胶原酶,Trizol 试剂(Trizol

基金项目:国家自然科学基金(30571873)

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

通讯作者:李锋,Email:lifeng@tjh.tjmu.edu.cn

reagent),阿新蓝(alcian blue)(美国 Invitrogen 公司)。

2. 主要仪器:Helmholtz 线圈式磁场发生器(海军工程大学研制),频率为 75 Hz,正弦波,场强为 2 mT,放置于 37℃、5% CO_2 饱和湿度的培养箱中;倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司);台式迷你离心机(美国 Eppendorf 公司);低温离心机(美国 Sigma 公司)。

二、实验动物

纯系 SD 大鼠,5 ~ 6 周龄,体重为 150 ~ 170 g,雌雄不拘,由华中科技大学同济医学院动物中心提供。

三、实验方法

1. 大鼠椎间盘纤维环细胞的分离及体外培养:将大鼠过量麻醉处死后,活力碘浸泡消毒 10 min,75% 酒精脱碘,在无菌条件下小心取出胸腰段脊柱,去除椎旁肌肉及韧带,在 10 倍手术显微镜下取出椎间盘,立即置入盛有磷酸缓冲液(phosphatic balance solution, PBS)的培养皿中,小心去除髓核,清理附着其上的韧带等组织,用 PBS 漂洗 3 遍,然后用眼科剪剪成 1 mm^3 的小块,用 0.25% 的胰酶消化 10 min,然后用 0.15% 的胶原酶,在 37℃ 下,轻柔振荡培养 3 h,然后用 200 目筛网过滤,以 1000 r/min 离心 6 min 去除胶原酶,PBS 平衡液洗 3 次,离心收集细胞,用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基(含青霉素 100 U/ml, 链霉素 100 U/ml)悬浮细胞,计数并调整细胞密度为 1×10^5 个/ml 后,接种入 50 ml 培养瓶中,置于 37℃、5% CO_2 饱和湿度的培养箱中培养,并于倒置显微镜下观察细胞培养全过程。

2. 实验分组及培养情况:取生长良好的第 3 代细胞以 1×10^3/孔接种于 96 孔细胞培养板,加入含 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的 DMEM/F12 培养基,置于 37℃、5% CO_2 饱和湿度的培养箱中培养,对于每个时间点,2 块板为实验组,2 块板为对照组,实验组从传代第 2 天开始磁场干预,每天辐射 1 次,每次持续6 h,采用频率为 75 Hz 正弦波形,强度为 2 mT 的脉冲电磁场(pulsed electromagnetic fields, PEMF)进行辐射干预,对照组无 PEMF 辐射干预。

3. 四甲基偶氮唑蓝(methyl thiazdyl tetrazalium, MTT)法检测椎间盘细胞的增殖活性:分别于第 1,2,4,8 天用 MTT 法分析各组椎间盘细胞的增殖情况,每孔加入 5 mg/ml 的 MTT 溶液 20 μl,于 37℃、5% CO_2 饱和湿度条件下避光培养 4 h,吸弃上清,每孔加入二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)150 μl,充分振荡溶解,在酶标仪上测定 490 nm 波长处的吸光度值(OD_{490})。

4. 逆转录聚合酶链反应(reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR)检测其正常细胞外基质表达情况:分别于第 1,8 天取实验组和对照组细胞,用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA,按照说明书进行逆转录,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase, GAPDH)作为内参照,采用半定量 PCR 方法检测实验组和对照组纤维环细胞相关 II 型胶原、蛋白聚糖基因的表达情况。引物序列见表 1。对 PCR 产物凝胶电泳条带行光密度测定,取基因与内参照比值的相对表达量的平均值进行比较。

表 1　引物序列

名　称	引物	大小
GAPDH	上游引物 GTGCTGAGTATGTCGTGGAG	295-310(bp)
	下游引物 GTCTTCTGAGTGGCAGTGAT	
蛋白聚糖	上游引物 GAGGAGCGAGTTCAACTCTTCAA	190-200(bp)
	下游引物 CCGCAGAGTCACAAAGACCAA	
II 型胶原	上游引物 CACTCATCTGTTGTGATGAGTTCTCC	175-180(bp)
	下游引物 CAACACACACCAGCGCAGTTT	
I 型胶原	上游引物 AAGATGTGCCACTCTGACTG	660(bp)
	下游引物 ATAGGTGATGTTCTGGGAGG	

5. 糖胺多糖(sulfated glycosaminoglycans, sGAG)含量的检测:分别于第 1,2,4,8 天取实验组和对照组细胞利用 Alcian Blue 法[8] 检测其 sGAG 含量。方法为采用木瓜蛋白酶消化细胞,取 50 μl 样本与 50 μl 8 mol/L盐酸胍混匀,依次加入 50 μl 0.05 mol/L 硫酸(sulfuric acid, H_2SO_4)、0.75% Triton X-100,室温静置 15 min后,加入 750 μl Alcian Blue 工作溶液 4℃ 反应 1 h,12000 r/min 离心 15 min,弃上清,750 μl DMSO 洗液室温下振洗 15 min, 弃上清。以 500 μl 溶解液(4.0 mol/L盐酸胍,33% 异丙醇,0.25% TritonX-100)重溶 Alcian Blue-蛋白聚糖沉淀复合物,振荡 15 min,移入 96 孔板中,酶标仪 600 ~ 620 nm 波长处测定吸光值。将硫酸软骨素(chondroitin sulfate, CS)贮液(0.5 g/L)梯度稀释至 1,2,10,20,30,40 mg/L, 用相同方法测定标准溶液的吸光度,制定标准曲线,标准曲线在相同条件下重复 3 次。

6. 流式细胞术(flow cytometry, FCM)检测:收集第 8 天实验组和对照组细胞,调整细胞浓度为 1×10^6 个/ml,PBS 洗 2 次,去上清。用 70% 冷乙醇 4℃ 固定过夜,离心去乙醇,PBS 洗 1 次,去上清,加碘化丙啶染液(含 RNaseA)300 μl 重悬细胞,4℃ 避光反应过夜,上机检测,测定细胞周期,观察 G1 期、S 期、G2 期、M 期细胞各占的百分比。

四、统计学分析

实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS 12.0 版软件进行统计分析,采用 student't 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结　　果

一、椎间盘纤维环细胞的分离与培养

将纤维环细胞接种入培养瓶中,可见细胞呈短梭形,多边形,单层生长,折光性好。台盼蓝拒染法提示活细胞率 >95%,随着时间的延长细胞不断增多,呈集落样生长,8 d 左右融合成片。见图 1。

注:细胞形态多样,以梭形、多边形为主

图 1　大鼠纤维环细胞(未染色,×100)

二、PEMF 对细胞增殖情况的影响

在暴磁刺激前 2 d,实验组与对照组增殖活性相比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。随着干预时间的延长,刺激 4 d 后实验组细胞的增殖活性均高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 2。

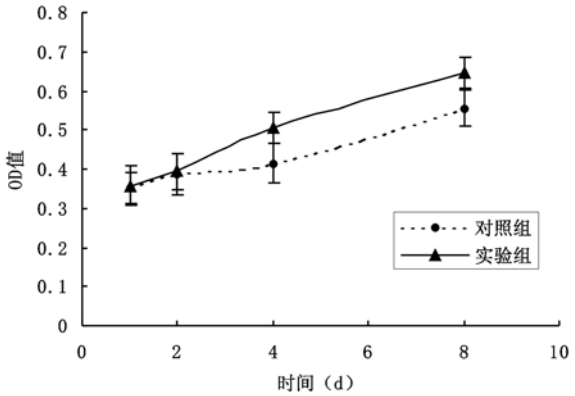

图 2　电磁场对大鼠椎间盘纤维环细胞增殖的影响

三、细胞外基质表达情况

RT-PCR 结果显示,磁场刺激第 1 天,各组之间差异无统计学意义($P>0.05$),刺激 8d 后蛋白聚糖,II 型胶原,I 型胶原的表达相对增高,光密度测量提示与对照组相比差异具有统计学意义($P<0.05$)。见图 3。

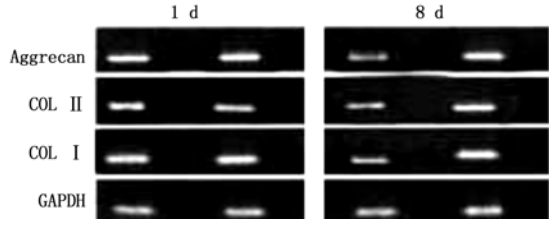

图 3　PEMF 刺激 8 d 后纤维环细胞相关基因表达情况

四、sGAG 分泌情况

以其吸光度为 Y 对标准溶液的质量浓度 X 作线性回归,得到标准曲线方程为 $Y=0.0019X+0.0474$,$r=0.9951$,结果表明,在 2 ~ 400 μg/ml 范围内标准溶液含量与吸光度之间呈良好的线性相关。具体结果见表 2,每个时间点 2 组之间的差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 2　GAG 分泌情况(μg/ml,$\bar{x}\pm s$)

组　别	第 1 天	第 2 天	第 4 天	第 8 天
对照组	101.2 ±3.1	93.5 ±2.4	80.7 ±3.6	68.9 ±1.2
实验组	103.1 ±1.5[a]	97.4 ±2.3[a]	88.1 ±2.7[a]	81.5 ±2.7[b]

注:与对照组比较第,[a]$P<0.05$,[b]$P<0.01$

五、PEMF 对细胞周期的影响

经过 PEMF 刺激 8 d 后,对照组 G_0/G_1 期细胞为(80.2 ±3.1)%,实验组为(72.4 ±2.7)%;而 S 期对照组为(6.2 ±2.1)%,实验组为(15.4 ±1.3)%,差异有统计学意义($P<0.05$)。

讨　论

椎间盘退变是脊柱外科面临的常见疾病,其发病率很高,而且严重影响患者的生活质量[9]。由于成熟椎间盘细胞缺乏血管,难以自身修复,退变后往往引起一系列继发性脊柱退行性疾病。作为椎间盘维持负重的最主要结构之一的纤维环,主要由胶原、蛋白多糖、非胶原蛋白、细胞成分和水组成,在正常情况下含水量占 60% ~70%。蛋白多糖单体分子和硫酸软骨素通过连接蛋白聚集形成大分子的蛋白聚糖,并与胶原纤维相互交叉偶联组成有序的基质结构,可以对抗张力和压力[10]。随着年龄的增长,蛋白多糖和糖胺多糖显著减少,含水量减少,低分子量糖蛋白增加,椎间盘里原有的调节稳态被打乱,使胶原纤维不稳和纤维板层间的滑动,引起退变。如何改变这一状况,成为亟待解决的问题。

电磁生物效应学是电磁学与生物学相结合的一门新兴学科,主要研究不同类型的电磁场对生物不同水平的效应及机制。现已发现电磁场对生物体有众多效应,这些效应不是单一的,而是从不同水平进行作用的结果,其中既有有益的也有有害的,与电磁场的频率、强度及暴露时间有很大关系。为了减少电磁场的辐射效应,一般研究均采用低频、低能量级电磁场,即强度在 0 ~ 100 mT,频率在 1 ~ 100 Hz,电场强度在10 ~ 100 mA/m^2[2, 11]。

低频、低能量级电磁场对体内多种组织细胞都有生物学作用。作为一种无创性治疗方法,它在骨科被用于治疗骨不连、骨折延迟愈合和骨质疏松等疾病,取

得了较好疗效。不少文献报道,PEMF 可以通过影响软骨细胞及其细胞外基质的情况,干预骨关节炎的进展[12-15]。其机制包括可以上调 TGF-beta 超家族的基因表达水平,保护软骨外基质的完整性并促进其分泌,增加 GAG 水平,抑制 IL-1,MMP 等来干预软骨代谢,另外电磁场还可以通过对细胞周围环境的改变,进而间接影响细胞增殖等效应。我们设想 PEMF 是否可以通过同样机制来延缓椎间盘的退变。经过复习文献我们没有发现 PEMF 对椎间盘影响的报道,于是我们设计了本实验来初步了解 PEMF 对椎间盘纤维环细胞的细胞外基质合成的影响。

本研究中,我们选择 75 Hz、2 mT 的正弦波 PEMF 来刺激椎间盘细胞。与对照组相比,PEMF 干预能促进椎间盘纤维环细胞的增殖,其效应是随着时间的延长而增加的,干预 4 d 后,2 组的差异有统计学意义。流式细胞术的结果进一步说明,细胞的增殖可能是由于 PEMF 使 S 期细胞含量相对增加,促进 DNA 合成引起。同时我们发现,实验组中 I,II 型胶原,蛋白聚糖的表达和 sGAG 含量也均有不同程度的上升。提示 PEMF 可以促进椎间盘的胶原和糖蛋白成分的分泌,维持其含量的相对稳定。这些结果对缓解椎间盘退变是有意义的。

综上所述,电磁场作为一种外源性刺激手段,对椎间盘纤维环细胞的增殖和细胞外基质保护过程中有积极作用,但其确切机制还不清楚,有待进一步实验证实。

参 考 文 献

[1] 张旗涛, 王立春, 姚猛,等. 椎间盘退行性变的生物学机制. 中华骨科杂志, 2006, 26: 206-210.

[2] Frey A H. Electromagnetic field interactions with biological systems. FASEB J, 1993, 7: 272-281.

[3] Parivar K, Kouchesfehani MH, Boojar MM, et al. Organ culture studies on the development of mouse embryo limb buds under EMF influence. Int J Radiat Biol, 2006, 82: 455-464.

[4] Patterson TE, Sakai Y, Grabiner MD, et al. Exposure of murine cells to pulsed electromagnetic fields rapidly activates the mTOR signaling pathway. Bioelectromagnetics, 2006, 27: 535-544.

[5] Funk RH, Monsees TK. Effects of electromagnetic fields on cells: physiological and therapeutical approaches and molecular mechanisms of interaction. A review. Cells Tissues Organs, 2006, 182: 59-78.

[6] Jahns ME, Lou E, Durdle NG, et al. The effect of pulsed electromagnetic fields on chondrocyte morphology. Med Biol Eng Comput, 2007, 45: 917-925.

[7] Taylor KF, Inoue N, Rafiee B, et al. Effect of pulsed electromagnetic fields on maturation of regenerate bone in a rabbit limb lengthening model. J Orthop Res, 2006, 24: 2-10.

[8] Björnsson S. Quantitation of proteoglycans as glycosaminoglycans in biological fluids using an alcian blue dot blot analysis. Anal Biochem, 1998, 256: 229-237.

[9] Anderson DG, Risbud M V, Shapiro I M, et al. Cell-based therapy for disc repair. Spine J, 2005, 5: 297-303.

[10] 于胜吉,孙秀芳,邱贵兴,等. 周期性压力作用下椎间盘细胞中整合素 α_3 的表达. 中华物理医学与康复杂志, 2005, 4: 209-213.

[11] 童珊, 黄华, 陈槐卿,等. 电磁场细胞生物效应研究进展. 国外医学生物医学工程分册, 2004, 27: 257-260.

[12] Aaron RK, Boyan BD, Ciombor DM, et al. Stimulation of growth factor synthesis by electric and electromagnetic fields. Clin Orthop Relat Res, 2004, 419: 30-37.

[13] De Mattei M, Fini M, Setti S, et al. Proteoglycan synthesis in bovine articular cartilage explants exposed to different low-frequency low-energy pulsed electromagnetic fields. Osteoarthritis Cartilage, 2007, 15: 163-168.

[14] Fini M, Giavaresi G, Carpi A, et al. Effects of pulsed electromagnetic fields on articular hyaline cartilage: review of experimental and clinical studies. Biomed Pharmacother, 2005, 59: 388-394.

[15] Aaron RK, Wang S, Ciombon DM. Upregulation of basal TGF-beta levels by EMF coincident with chondrogenesis-implications for skeletal repair and tissue engineering. J Orthop Res, 2002, 20: 233-240.

(修回日期:2008-04-09)
(本文编辑:松　明)

《中华物理医学与康复杂志》2008 年第 8 期"继续教育园地"答题卡

(文章见本期 570-573 页,测试题见本期 508 页)

姓　名 _____　性别 _____

职　称 _____

工作单位 _____

联系电话 _____　邮编 _____

地　址 _____

1. A　B　C　D
2. A　B　C　D　E　F
3. A　B　C　D　E　F
4. A　B　C　D
5. A　B　C　D　E　F

答题卡请寄: 430030　武汉市解放大道 1095 号同济医院《中华物理医学与康复杂志》编辑部收(该答题卡复印有效)