

超短波对间充质干细胞粘附增殖及成骨能力的影响

刘玲 陈祢 王宝兰

新疆医科大学第一附属医院康复医学科 830054

通信作者:王宝兰,Email:wangbaolan66@163.com

【摘要】 目的 观察鼠骨髓间充质干细胞(rMSCs)受超短波作用后其粘附、增殖及成骨分化能力的变化。方法 将 rMSCs 置于超短波治疗仪上,以每日 1 次、每次 15 min 的条件进行处理,1 d 后检测细胞早期粘附能力,2 d 后借助倒置荧光显微镜观察细胞形态,1 d、3 d、7 d 检测细胞增殖能力,7 d 后检测成骨相关基因骨桥蛋白(OPN)表达量。结果 与未经超短波处理的对照组相比,接受超短波处理的超短波组早期细胞粘附数量为前者的 1.8 倍($P<0.05$);2 d 后超短波组比对照组细胞的伪足数量多,伪足铺展范围大;超短波组细胞连续培养 7 d 后,与对照组相比,其增殖能力提升($P<0.05$),OPN 表达上调($P<0.05$)。结论 超短波能影响 rMSCs 的早期粘附能力和形态,能促进其增殖和向成骨方向分化。

【关键词】 超短波; 增殖; 粘附; 骨髓间充质干细胞; 成骨分化

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金面上项目(2015211C067)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2019.04.001

Effects of ultrashortwave irradiation on the adhesion, proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells

Liu Ling, Chen Mi, Wang Baolan

Department of Rehabilitation Medicine, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China

Corresponding author: Wang Baolan, Email: wangbaolan66@163.com

【Abstract】 Objective To observe the effect of ultrashortwave irradiation on the adhesion, proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (rMSCs) in rats. **Methods** The rMSCs were put under ultrashortwave radiation for 15 minutes every day. Early cell adhesion was detected after 1 day of the treatment. The cell morphology was observed under an inverted fluorescence microscope on the 3rd day, the cell proliferation was measured on the 1st, 3rd and 7th day, while the expression of the osteogenic gene osteopontin was detected on the 8th day. **Results** Early cell adhesion increased 80% (a significant increase) and more pseudo-feet with a larger range of spread were observed. After 7 days of irradiation the proliferation and the expression of osteogenic gene osteopontin had both increased significantly. **Conclusion** Ultrashortwave irradiation can affect the early adhesion and morphology of rMSCs and promote their proliferation and osteogenic differentiation.

【Key words】 Ultrashortwave irradiation; Proliferation; Cell adhesion; Mesenchymal stem cells; Osteogenic differentiation

Fund program:The Xinjiang Uygur Autonomous Region Natural Science Fund (grant 2015211C067)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2019.04.001

目前,我国人口老龄化趋势加剧,牙齿缺失患者日益增多,种植牙因其舒适、美观、微创、咀嚼效能高等优点备受老年人欢迎,但种植牙的成功率和临床使用期限有赖于种植体周围骨组织的再生速度和质量,所以探寻促进头面部骨组织再生的新途径将会让很多牙齿缺失患者受益。以往研究报道,五官超短波电疗仪在消炎镇痛、创面愈合以及神经康复等方面疗效显著^[1-4],但其对骨组织及其相关细胞影响的研究甚少。

本研究采用超短波作用于 Sprague-Dawley (SD) 大鼠骨髓间充质干细胞 (rat bone marrow mesenchymal stem cells, rMSCs), 观察超短波对 rMSCs 细胞粘附、细胞形态、细胞增殖及成骨分化能力的影响,探讨超短波能否在促进神经康复、消炎镇痛及创面愈合的同时,还能促进干细胞向受损部位粘附及骨组织形成,旨在为需要骨及软组织再生的患者探寻一条无创、经济、安全、快速的康复之路。

材料与方 法

一、实验动物、试剂和仪器

SD 雄性大鼠,质量 30~50 g,购自新疆医科大学动物实验中心, α -MEM 培养基(Hyclone,美国),胎牛血清(中国),流式细胞仪(美国),CD90、CD34 单克隆抗体和 FITC 标记的二抗(美国),CCK-8(日本),倒置相差显微镜及照相系统(德国),酶联免疫仪(美国),DL-CII 型超短波电疗机(中国)。

二、实验细胞鉴定及分组

1. 细胞组织来源鉴定:采用全骨髓培养法获取 rMSCs,取第 2 代细胞,消化,重悬后,分别加入单克隆抗体 CD90、CD34 及经 FITC 标记的二抗,在 37 ℃ 细胞培养箱中培育 20 min 后,用 0.5 ml 预冷磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)将细胞重悬,用流式细胞仪检测干细胞表面标记物。经鉴定确定为间充质来源的干细胞后,取第 2~4 代细胞用于本实验。

2. 实验分组:将 rMSCs 接种到培养板上后,随机分为超短波处理组(超短波组)和对照组。在预设的时间点,将两组细胞转移至 DL-CII 型超短波电疗机中,超短波组每日给予 1 次电流 50 mA、15 min 微热量超短波处理,共持续 7 d。同时,也将对照组转移到另一台相同的超短波电疗机中,但不打开电源,无超短波输出,每日放置 15 min,同样持续 7 d。本实验中所使用的 DL-CII 型超短波电疗机输出功率为(50±20%)W,使用电源为交流电、220 V、50 Hz,工作频率为 43 MHz,所输出的连续式超短波波长为 6.977 m。电疗机工作的环境温度要求 5 ℃~40 ℃,相对湿度≤80%。电疗机上两个相对放置的圆形电极板间距 15 cm,长度为 12.8 cm 的细胞培养板用绿色无菌铺巾包被后,至于两电极板中间,详见图 1。



图 1 DL-CII 型超短波电疗机工作图

三、实验方法及观察指标

1. 细胞粘附:将第 2 代 rMSCs 制成单细胞悬液,以 1×10^3 /ml 的密度接种于 2 块 24 孔板中,随机标记为对照组和超短波组,放入 37 ℃ 细胞培养箱中孵育

30 min 后,将两组细胞按照实验分组中设置的条件,放入超短波电疗机中处理 15 min,吸弃培养液,用 PBS 轻柔漂洗,去除尚未粘附的细胞。已经粘附于培养板上的细胞用 75% 酒精固定后,加入 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 染液染色 5 min,标记细胞核。吸弃多余染液,PBS 清洗后,将细胞转移到荧光显微镜下,随机选 5 个视野拍照,采用 Image J 软件记录粘附细胞数量。

2. 细胞形态观察:在新 24 孔板中接种密度为 2×10^4 /ml 的细胞悬液,在细胞培养箱中孵育 24 h 后,其余处理方法同实验分组,在经超短波处理的第 2 天,每组随机选择 4 孔细胞,PBS 漂洗 3 次后,于倒置荧光显微镜下观察各组细胞形态并拍照。

3. 细胞增殖:将密度为 2×10^3 /ml 的 rMSCs 细胞悬液接种到 96 孔板中,孵育 24 h 后,处理方法同实验分组。分别在接受超短波电疗处理后的第 1、3、7 天,PBS 漂洗细胞 3 次,避光条件下加入配置好的 CCK-8 检测液 100 μ l/孔,每组设 4 个复孔,放入 37 ℃ 细胞培养箱中孵育 2 h,酶标仪 450 nm 波长处检测各孔吸光度(optical density, OD)值。

4. 基因表达检测:将 rMSCs 细胞悬液以 3×10^5 /ml 的密度接种于 6 孔板,处理方法同实验分组,在第 7 天,吸弃原培养液并漂洗细胞后,每孔加入 1 ml Trizol,提取细胞总 RNA,按照 2 μ g 反转 20 μ l 体系反转录 miRNA,采用逆转录-聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)检测成骨相关基因骨桥蛋白(osteopontin, OPN)的表达水平。通过公式 $X = 2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算超短波组的 OPN 经 GAPDH(内参)校正后相对于对照组的相对表达量。

四、统计学方法

使用 SPSS 22.0 版统计学软件进行数据分析,实验所得数据以($\bar{x} \pm s$)表示,两组样本间细胞计数及相对表达量的比较均需先进行正态性检验,数据满足正态性及方差齐性,采用两样本 *t* 检验进行统计学检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

一、实验细胞组织来源鉴定

流式细胞仪检测显示:采用全骨髓培养法获取的细胞,阳性表达间充质干细胞表面标记 CD90 (99.1%),阴性表达造血干细胞表面标记 CD34 (1.6%),符合间充质来源的干细胞特征。

二、超短波对干细胞粘附能力的影响

将两组 rMSCs 培养 30 min,给予 15 min 的超短波处理后,用 DAPI 染液将粘附于培养板上的 rMSCs 细胞核进行染色,成功染色的细胞核表现为图 2 中亮蓝

色的点,每个亮点代表 1 个粘附于培养板上的细胞。如图 2 所示,超短波组早期细胞粘附数量明显多于对照组,用 Image J 软件记数两组粘附细胞数量并统计,结果显示超短波组早期细胞粘附数量为对照组的 1.8 倍(图 3),两组早期细胞粘附数量比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。

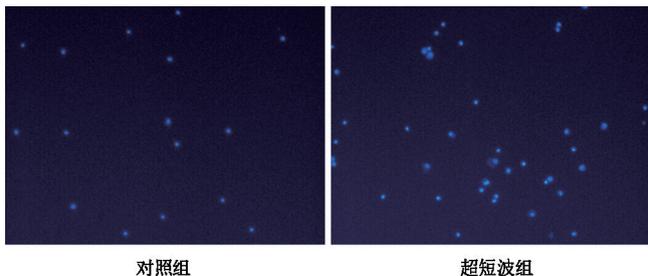


图 2 rMSCs 细胞培养 30 min 后细胞核荧光染色照片(DAPI 染色,×40)

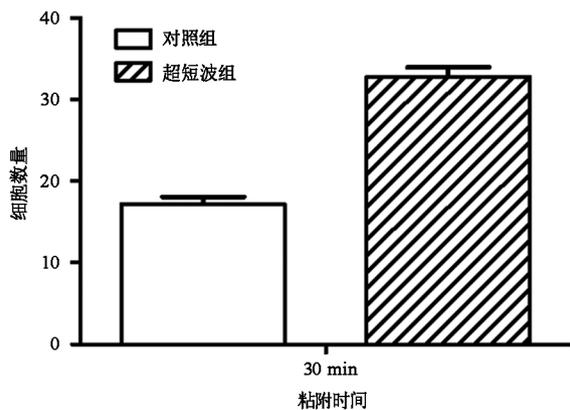


图 3 rMSCs 细胞培养 30 min 后细胞粘附数量

三、超短波对干细胞形态的影响

经超短波处理 2 d 后,显微镜观察结果如图 4 所示,对照组细胞形态均一,大多呈细长的长梭形;超短波组细胞中,除长梭形细胞外,还出现了较多多边形细胞(图 4 红色箭头所示),且与对照组细胞相比,超短波组纤长的细胞伪足数量增多,伪足铺展范围也更大(图 4 黄色箭头所示)。

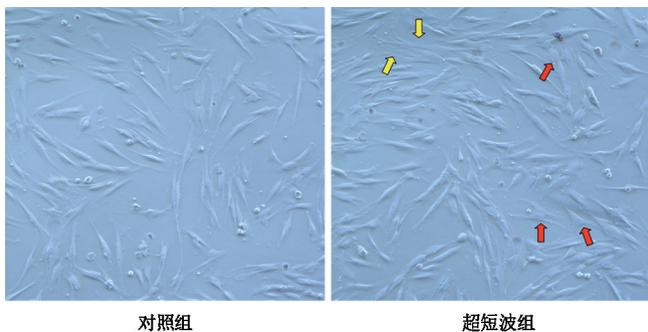
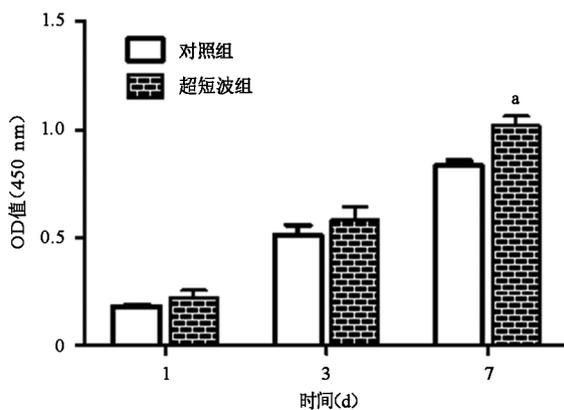


图 4 超短波对 rMSCs 细胞形态的影响(×40)

四、超短波对干细胞增殖能力的影响

经超短波处理 1 d 和 3 d 时,超短波组细胞数略高

于对照组,但两组细胞增殖无明显差异($P>0.05$);经超短波处理 7 d 时,与对照组相比,超短波组的细胞数明显($P<0.05$)增多。

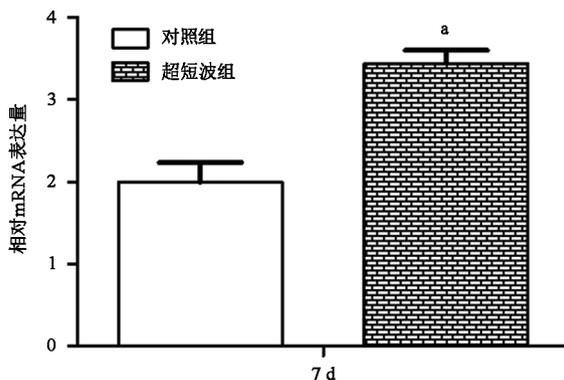


注:与对照组比较,^a $P<0.05$

图 5 超短波对 rMSCs 细胞增殖的影响

五、超短波对干细胞成骨相关基因表达的影响

RT-PCR 检测结果显示,经超短波处理 7 d,超短波组细胞成骨基因 OPN 的表达水平显著高于对照组($P<0.05$)。详见图 6。



注:与对照组比较,^a $P<0.05$

图 6 超短波对 rMSCs 成骨相关基因 OPN 表达的影响

讨 论

五官科超短波理疗仪可以形成 20~43 MHz 的高频电磁场。电磁场对软组织及硬组织的再生作用主要体现在以下几个方面。首先,组织再生需要足量的细胞才能进一步分化成各类组织,而电磁场恰恰可以促进细胞的增殖。研究表明,外加磁场能影响成骨细胞系 MC3T3-E1 的形态、增殖、凋亡和周期^[5];将大鼠成骨细胞置于不同强度磁场中 7 d,结果显示 300 Gs 的磁场可以显著促进成骨细胞的增殖^[6]。把人间充质干细胞放入 400~450 kHz 的高频电场中,发现高频电场在不影响人间充质干细胞多向分化潜能的前提下,还可以上调干细胞增殖基因 PCNA 的表达,促进肌肉骨骼损伤区域干细胞的增殖^[7]。在本实验中,rMSCs

经超短波处理后,其细胞增殖得到了促进。在骨及软组织缺损部位,干细胞在不降低其成骨等多向分化潜能的基础上,增殖进一步得到强化,干细胞分化出的骨组织和软组织数量增多,加快软组织的再生与愈合也就比较容易实现,这对于急于修复颌面部缺损组织的患者及急于用种植牙修复缺失牙的患者是有益的。

其次,电磁场能影响骨代谢多项进程。OPN 可以同多种整合素相结合,激发细胞与细胞间的粘附,增加细胞与胞外基质间的物质交流,促进细胞迁移,减少细胞死亡,增加免疫球蛋白的产量,诱导粘着斑激酶与桩蛋白的磷酸化,改变细胞内钙水平,促进钙磷的沉积^[8-12]。当 OPN 缺乏时,干细胞成骨分化受到抑制;当补充缺乏的 OPN 后,干细胞分化方向逆转,表现为成骨分化得到促进,成脂分化受到抑制^[13]。有研究发现,60 kHz 的高频电场可以诱导人脂肪来源的干细胞向成软骨方向分化^[14-15]。Asgarifar 等研究表明,500 V、10 kHz 的高频电场不仅不会破坏骨组织结构,还能够提高骨骼样本的抗压强度和韧性^[16]。有研究发现,高频电磁场可以促进骨与血管的生成,从而加速骨折的修复进程^[17]。rMSCs 向愈合部位迁移是骨形成过程中的重要步骤,在骨愈合过程中,电磁场的存在可以诱导干细胞向愈合部位迁移^[18]。可见,在一定条件下,电磁场可以优化骨的多项物理性能,促进骨与血管的再生、促进干细胞向受损区迁移,加速骨折修复进程。也有学者在基因芯片技术辅助下,观察到电磁场可使多种基因发生改变,且上调基因数居多^[15]。所以本实验将 OPN 的基因表达量作为观察指标,发现超短波能上调成骨相关基因 OPN 的表达,对 rMSCs 的成骨分化具有积极影响。

电磁场作用于生物体,能引起两类生物效应,一类是使其温度升高,并由此引起生理和病理变化,称为热效应;另一类是指除热效应以外的方式改变生物生理生化过程的效应,称为非热效应,如暴露在电磁场中,生物大分子、细胞、组织与器官、整体出现生化和生理反应,而生物体无明显升温^[19]。本实验中通过超短波形成的高频电磁场干预骨髓间充质干细胞的增殖、粘附、分化、骨代谢等属非热效应。有研究发现,电磁场可以营造出等离子体环境,而非热效应生物等离子体可以诱导成骨细胞系 MC3T3 细胞向成骨分化并促进新骨形成,但具体机制尚未阐明^[20]。有研究表明,利用磁场的非热效应可以诱导特定细胞凋亡,改变细胞膜的结构和功能,影响动物免疫功能,改善肿瘤患者的主观症状和生活质量,在治疗恶性肿瘤方面具有潜在的应用前景^[21]。关于电磁非热效应机制的研究假说较多,有研究者认为电磁非热效应改变了细胞膜的信号转导,从而减少离子通道的形成及开闭频率;有研究

者认为电磁非热效应是由于产生了自由基从而影响细胞膜结构;也有学者认为电磁的非热效应是激活了控制细胞代谢和生长的酶系统,导致相应的基因、细胞因子发生改变,从而影响细胞的增殖分化及其相对应的功能;还有学者认为电磁的非热效应是多种基因协同调控及蛋白表达的结果^[22-24]。遗憾的是,目前针对电磁非热效应作用机理的研究尚不多,如何更充分合理的利用电磁非热效应有待更深入的研究。

综上所述,超短波理疗仪形成的高频电磁场,通过非热效应可以影响 rMSCs 的形态,促进 rMSCs 的粘附及增殖,并诱导干细胞向成骨方向分化。本研究通过观察超短波对 rMSCs 多项细胞行为的影响,初步证明将超短波理疗仪应用到头面部大面积骨缺损的修复、种植牙对缺失牙齿的修复、甚至各种骨折的愈合方面具有可行性,为缩短患者因外伤所致的面部缺陷期,加速骨折或种植牙等软组织修复进程提供了新思路与新方法。

参 考 文 献

- [1] 芦丹,汪亚群,叶苏,等.综合康复治疗肩关节周围炎的疗效观察[J].中华物理医学与康复杂志,2017,39(3):211-213. DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2017.03.013.
- [2] 谷玉静,王瑞平,冯晓东,等.超短波联合紫外线治疗化脓性扁桃体炎的疗效观察[J].中华物理医学与康复杂志,2015,37(4):308-309. DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2015.04.021.
- [3] 乔鸿飞,张巧俊,袁海峰,等.超短波对糖尿病大鼠溃疡创面碱性成纤维细胞生长因子表达的影响[J].中华物理医学与康复杂志,2015,37(9):653-657. DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2015.09.003.
- [4] 樊永梅,张长杰,彭文娜,等.无热量超短波治疗对大鼠脑缺血再灌注损伤后 SPCA1 的影响[J].中华物理医学与康复杂志,2018,40(1):11-14. DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2018.01.002.
- [5] 杨宪园,王哲,张健,等.抗磁悬浮影响粘附在微载体上成骨细胞的形态和功能[J].航天医学与医学工程,2014,27(6):391-397.
- [6] 仇丽鸿,包扬,钟鸣,等.静磁场对大鼠成骨细胞增殖分化功能的影响[J].实用口腔医学杂志,2005,21(5):606-609. DOI:10.3969/j.issn.1001-3733.2005.05.008.
- [7] Hernández-Bule ML, Paíno CL, Trillo MÁ, et al. Electric stimulation at 448 kHz promotes proliferation of human mesenchymal stem cells [J]. Cell Physiol Biochem, 2014, 34(5):1741-1755. DOI: 10.1159/000366375.
- [8] Kariya Y, Kanno M, Matsumoto-Morita K, et al. Osteopontin Oglycosylation contributes to its phosphorylation and cell-adhesion properties [J]. Biochem J, 2014, 463(1):93-102. DOI: 10.1042/BJ20140060.
- [9] Johnson GA, Burghardt RC, Bazer FW. Osteopontin: a leading candidate adhesion molecule for implantation in pigs and sheep [J]. J Anim Sci Biotechnol, 2014, 5(1):56. DOI: 10.1186/2049-1891-5-56. eCollection 2014.
- [10] Chatakun P, Núñez-Toldrà R, Díaz López EJ, et al. The effect of five proteins on stem cells used for osteoblast differentiation and proliferation: a current review of the literature [J]. Cell Mol Life Sci, 2014, 71

- (1);113-142. DOI: 10.1007/s00018-013-1326-0.
- [11] Hunter GK. Role of osteopontin in modulation of hydroxyapatite formation[J]. *Calcif Tissue Int*, 2013, 93(4): 348-354. DOI: 10.1007/s00223-013-9698-6.
- [12] Clemente N, Raineri D, Cappellano G, et al. Osteopontin bridging innate and adaptive immunity in autoimmune diseases[J]. *J Immunol Res*, 2016, 12(20): 7675437. DOI: 10.1155/2016/7675437.
- [13] Chen Q, Shou P, Zhang L, et al. An osteopontin-integrin interaction plays a critical role in directing adipogenesis and osteogenesis by mesenchymal stem cells[J]. *Stem Cells*, 2014, 32(2): 327-337. DOI: 10.1002/stem.1567.
- [14] Esfandiari E, Roshankhah S, Mardani M, et al. The effect of high frequency electric field on enhancement of chondrogenesis in human adipose-derived stem cells[J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2014, 17(8): 571-576.
- [15] 任东青, 金娟, 李晓娟, 等. 电磁脉冲诱导小鼠肠组织基因表达谱的变化[J]. *卫生研究*, 2008, 37(1): 22-24. DOI: 10.3969/j.issn.1000-8020.2008.01.007.
- [16] Asgarifar H, Oloyede A, Zare F. The effect of high voltage, high frequency pulsed electric field on slain ovine cortical bone[J]. *J Med Signals Sens*, 2014, 4(2): 113-121.
- [17] Iryanov YM, Kiryanov NA. Reparative osteogenesis and angiogenesis in low intensity electromagnetic radiation of ultra-high frequency[J]. *Vestn Ross Akad Med Nauk*, 2015, 10(3): 334-340.
- [18] Zhao Z, Watt C, Karystinou A, et al. Directed migration of human bone marrow mesenchymal stem cells in a physiological direct current electric field[J]. *Eur Cell Mater*, 2011, 29(22): 344-358.
- [19] 包家立. 电磁医疗设备的生物物理基础与应用[J]. *中国医疗设备*, 2016, 31(4): 6-13, 29. DOI: 10.3969/j.issn.1674-1633.2016.04.002.
- [20] Han I, Choi EH. The role of non-thermal atmospheric pressure bio-compatible plasma in the differentiation of osteoblastic precursor cells, MC3T3-E1[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(22): 36399-36409. DOI: 10.18632/oncotarget.16821.
- [21] 朱明辉, 杨震, 喻航, 等. 磁场非热效应治疗恶性肿瘤的研究进展[J]. *转化医学电子杂志*, 2017, 4(3): 7-11. DOI: 10.3969/j.issn.2095-6894.2017.03.002.
- [22] 刘晓冬, 徐冶, 王晓军, 等. 微波辐射非热效应对 A549 细胞损伤反应的研究[J]. *中外医疗*, 2013, 32(6): 21-23. DOI: 10.3969/j.issn.1674-0742.2013.06.013.
- [23] Trošić I, Pavičić I, Marjanović AM, et al. Non-thermal biomarkers of exposure to radiofrequency/microwave radiation[J]. *Arh Hig Rada Toksikol*, 2012, 63(1): 67-73. DOI: 10.2478/10004-1254-63-2012-2123.
- [24] 陈群. 工频电磁环境非热效应研究进展[J]. *国外医学(医学地理分册)*, 2013, 34(2): 129-132. DOI: 10.3969/j.issn.1001-8883.2013.02.015.

(修回日期: 2018-10-20)

(本文编辑: 凌 琛)

• 外刊撷英 •

A Hierarchy of corticospinal plasticity in human hand and forearm muscles

BACKGROUND AND OBJECTIVE The ability of the motor system to show plastic change underlies skill learning, and also permits recovery after injury.

METHODS One puzzling observation is that after stroke, upper limb flexor muscles show good recovery but extensors remain weak; this is a major contributor to residual disability. We hypothesised that there might be differences in potential for plasticity across hand and forearm muscles, and investigated this using two protocols based on transcranial magnetic brain stimulation (TMS) in healthy human subjects. Baseline TMS responses were recorded from two intrinsic hand muscles, flexor digitorum superficialis (FDS) and extensor digitorum communis (EDC).

RESULTS In the first study, paired associative stimulation (PAS) was delivered by pairing motor point stimulation of FDS or EDC with TMS. Responses were then remeasured. Increases were greatest in the hand muscles, smaller in FDS, and non-significant in EDC, irrespective of whether stimulation of FDS or EDC was used. In the second study, intermittent theta-burst rapid-rate TMS was applied instead of PAS. In this case, all muscles showed similar increases in TMS responses.

CONCLUSION We conclude that the potential to show plastic changes in motor cortical output has a gradient; hand muscles > flexors > extensors. However, this was only seen in a protocol which requires integration of sensory input (PAS), and not when plasticity was induced purely by cortical stimulation (rapid rate TMS). This observation may relate to why functional recovery tends to favour flexor and hand muscles over extensors.

【摘自: Foyals KMR, Baker SN. A Hierarchy of corticospinal plasticity in human hand and forearm muscles. *J Physiol*, 2019, Mar 6. DOI: 10.1113/JP277462.】