

· 基础研究 ·

脉冲电磁场对骨髓间充质干细胞成骨成脂肪分化的影响

杨勇 吴华 赵东明 赵文春 黎润光

【摘要】目的 研究 15 Hz、1 mT 脉冲电磁场对骨髓间充质干细胞向成骨、成脂肪分化的影响。**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 脉冲电磁场刺激,按照碱性磷酸酶 (ALP) 检测试剂盒说明书步骤检测 ALP 活性,用半定量逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 法检测骨髓间充质干细胞成骨、成脂肪指标的表达式,油红 O 染色观察其成脂肪诱导分化情况。**结果** 15 Hz、1 mT 脉冲电磁场明显促进骨髓间充质干细胞 ALP 活性 ($P < 0.01$) 以及成骨蛋白 (骨钙蛋白、骨桥蛋白) 的 mRNA 表达;抑制脂肪素、脂肪细胞结合蛋白 2 (AP-2) 等成脂肪转录因子的表达,抑制骨髓间充质干细胞向成脂肪分化。**结论** 15 Hz、1 mT 脉冲电磁场可促进骨髓间充质干细胞向成骨分化,抑制其向成脂肪分化。

【关键词】 脉冲电磁场; 骨钙蛋白; 骨桥蛋白; 碱性磷酸酶; 骨髓间充质干细胞

Effects on osteoblast and adipocyte differentiation of bone marrow mesenchymal stimulated by pulsed electromagnetic fields YANG Yong*, WU Hua, ZHAO Dong-ming, ZHAO Wen-chun, LI Run-guang. * 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 effects of pulsed electromagnetic fields (PEMFs) of 15Hz and 1mT on osteoblast differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. **Methods** The bone marrow mesenchymal stem cells were isolated and cultured in vitro, the third passage cells were harvested and half of them was exposed to PEMFs, another half exposed to sham PEMFs served as the control. The activity of ALP was measured. And the expression of osteoblast and adipogenesis was measured with the semi-quantitative RT-PCR, adipogenic differentiation was observed with the Oil Red O Staining. **Results** When compared with the control, PEMFs of 15 Hz and 1 mT significantly increased the activity of ALP ($P < 0.01$), promoted the osteocalcin and osteopontin expression, inhibited the transcription of Adipsin and AP-2 expression, and inhibited the adipogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. **Conclusion** PEMFs of 15 Hz and 1 mT could promote osteoblast differentiation and inhibit adipogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells.

【Key words】 Pulsed electromagnetic fields; Osteocalcin; Osteopontin; Alkaline phosphatase; Bone marrow mesenchymal stem cell

脉冲电磁场 (pulsed electromagnetic fields, PEMFs) 作为一种非侵入性手段治疗骨折、骨不连已有近 40 年的历史,其在活体的促成骨作用已被临床研究证实^[1],但其具体作用机制目前尚不十分清楚。骨髓间充质干细胞是一类具有多向分化潜能的干细胞,能在不同因素的作用下向成骨、成脂肪等多种组织分化。我们推测脉冲电磁场能定向促进骨髓间充质干细胞向成骨分化,抑制骨髓间充质干细胞向其他组织分化,从而促进骨折的愈合。本实验用 15 Hz、1 mT 脉冲电磁

场刺激骨髓间充质干细胞,从体外探讨脉冲电磁场的促进骨髓间充质干细胞向成骨分化并抑制其向成脂肪分化的作用。

材料与方法

一、主要试剂及仪器

主要试剂:美国 Hyclone 公司产 DMEM-LG、HG 培养基, Gibco 公司产优质胎牛血清, Amersco 公司产胰蛋白酶, 南京生物建成公司产碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 检测试剂盒及考马斯亮兰蛋白测定试剂盒, Amersco 公司产逆转录酶, 北京博大泰克的聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 试剂盒, 英骏公司的合成引物, Invitrogen 公司产 Trizol、胰岛素、异丁基甲基嘌呤及地塞米松。

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、赵东明、吴华), 小儿外科 (黎润光); 海军工程大学电力电子技术研究所 (赵文春)

通讯作者:吴华, Email: wuhua360@yahoo.com.cn

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),PCR仪,电泳仪,BIO-RAD 凝胶成像分析系统,分光光度计(岛津 1240 紫外,日本)等。

二、实验动物

取 SD 大鼠 6 只,4~5 周龄,体重为 100~120 g,雌雄不限,由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: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 20 ml 的注射器抽取 10 ml 浓度为 10% 的 DMEM-LG 培养基(内含青霉素、链霉素各 100 μg/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 5×10^6 个/ml 后将其直接接种于 50 ml 的培养瓶内,置于 37℃、5% CO₂ 及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. ALP 的检测:取第 3 代细胞以 1×10^5 个/ml 的密度接种于 6 块 6 孔板内,每孔 3 ml,共接种 30 个孔,分刺激组和对照组各 15 个孔。待细胞长到 80% 融合后,刺激组放入 15 Hz、1 mT 磁场中刺激,8 h/d,并在第 1,3,5,7,9 天收集刺激组与对照组细胞各 3 孔,将各孔细胞依次用 PBS 清洗干净后消化离心,离心速度为 1 000 转/s,时间为 10 min,将各孔离心好的细胞用 500 μl 三蒸水吹打均匀后,再用 0.1% 的 TritonX-100 裂解,按照考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒说明书步骤,在分光光度计上检测波长为 595 nm 的吸光值,计算出各自的蛋白含量。再按照 ALP 检测试剂盒说明书步骤,在分光光度计上检测波长为 520 nm 的吸光值,最后按照说明书上的公式结合所检测的蛋白含量算出各孔 ALP 的实际含量,以 U/g prot 表示。

3. 半定量逆转录聚合酶链反应(semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)法检测脉冲电磁场对骨髓间充质干细胞向成骨、成脂

肪分化的影响:取第 3 代骨髓间充质干细胞分别接种入 8 个培养瓶,细胞密度控制在 1×10^5 个/ml,分对照组和刺激组各 4 瓶。待细胞长到 80% 融合时,刺激组放入 15 Hz、1 mT 脉冲电磁场中刺激,8 h/d。于第 3,7,14,21 天在对照组和刺激组各收集一瓶细胞,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。选取的指标如表 1。重复上述试验 2 次。

表 1 PCR 引物设计序列

引物名称	引物序列	循环数	产物长度
骨钙蛋白	5'-ATGAGGACCTCTCTCTCTGCTC-3' 5'-GTGGTGCCATAGATGCGCTTG-3'	30	293 bp
骨桥蛋白	5'-AGCAGGAATACTAAGTGC-3' 5'-GATTATAGTGACACAGAC-3'	30	287 bp
脂肪素	5'-GAGGCGGCTGTATGTGTG-3' 5'-AGGCATTGTGGGAGAGCTTA-3'	30	337 bp
脂肪细胞结合蛋白 2	5'-TGTCTCCAGTGAAGAACTTCGATGA-3' 5'-ACTCTTGTGGAAGTCACGCTTT-3'	28	350 bp
磷酸甘油醛脱氢酶	5'-GTGCTGAGTATGTCGTGGAG-3' 5'-GTCCTCTGAGTGGCAGTGAT-3'	30	301 bp

4. 油红 O 染色观察成脂肪诱导分化:取第 3 代骨髓间充质干细胞分别接种入 6 个 35 mm 培养皿中,细胞密度控制在 1×10^5 个/ml,分刺激组和对照组各 3 个。待细胞长到 80% 融合后,均加入脂肪诱导培养基(5% DMEM-HG 培养基内含:1 μm/L 地塞米松,0.5 μm/L 异丁基甲基嘌呤,10 μg/ml 胰岛素,每 3 d 半量换液),并将刺激组放入 15 Hz、1 mT 磁场中刺激,8 h/d。2 周后取出细胞,做油红 O 染色^[2](10% 中性甲醛固定 5 min,再用 60% 的异丙醇浸泡 30 min,然后弃异丙醇加入已配好的油红 O 染色 1 h,60% 异丙醇洗 5 s,自来水冲洗 3 min,晾干后于倒置显微镜下观察)。

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、脉冲电磁场对骨髓间充质干细胞 ALP 的影响
在脉冲电磁场刺激下,刺激组 ALP 较对照组明显升高,并且在第 5 天左右出现最高峰,见表 2。

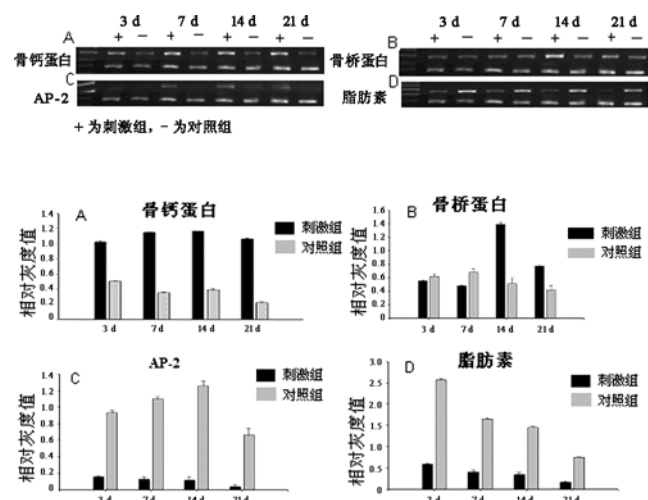
表 2 刺激组与对照组 ALP 活性的比较(U/g prot, $\bar{x} \pm s$)

组 别	ALP 活性				
	1 d	3 d	5 d	7 d	9 d
对照组	17.202 ± 0.416	18.475 ± 0.629	18.700 ± 0.530	19.430 ± 0.529	20.065 ± 0.459
刺激组	20.331 ± 0.160 ^a	37.030 ± 0.661 ^a	51.930 ± 0.630 ^a	46.272 ± 0.955 ^a	32.049 ± 0.273 ^a

注:与对照组比较,^aP < 0.01

二、RT-PCR 显示脉冲电磁场对骨髓间充质干细胞多向分化的影响

脉冲电磁场刺激下,骨钙蛋白、骨桥蛋白的 mRNA 表达较对照组高,骨钙蛋白 mRNA 在第 3 天即有升高,而骨桥蛋白 mRNA 在第 14 天左右才有表达增加。脂肪素和脂肪细胞结合蛋白 2 (adipocyte binding protein-2, AP-2) 等成脂肪转录因子在脉冲电磁场刺激下被抑制,重复实验,结果趋向一致。表明脉冲电磁场促进骨髓间充质干细胞向成骨分化,抑制骨髓间充质干细胞向成脂肪分化。见图 1。



注:A 和 B 显示脉冲电磁场刺激下骨钙蛋白、骨桥蛋白的 mRNA 表达较对照明显升高;C 和 D 显示脉冲电磁场抑制骨髓间充质干细胞 AP-2、脂肪素 mRNA 的表达

图 1 脉冲电磁场刺激下成骨、成脂肪指标表达情况

三、油红 O 染色显示脉冲电磁场抑制骨髓间充质干细胞向成脂肪分化

为进一步验证脉冲电磁场抑制骨髓间充质干细胞向成脂肪分化,我们加入成脂肪诱导培养基。2 周后可见对照组骨髓间充质干细胞内有大量的脂滴形成,油红 O 染色呈阳性;而刺激组无脂滴形成,油红 O 染色呈阴性,这表明脉冲电磁场抑制骨髓间充质干细胞向成脂肪分化,见图 2~5。

讨 论

研究表明,脉冲电磁场能促进骨髓间充质干细胞 ALP、骨形态蛋白-2 的表达^[3,4],具有促进骨髓间充质干细胞向成骨分化的作用。但它是否能定向诱导骨髓间充质干细胞向成骨分化鲜见报道。若要诱导骨髓间充质干细胞向某一种组织细胞分化,则必须同时抑制其向其他的组织细胞分化。ALP、骨钙蛋白及骨桥蛋白等是成骨细胞和成骨细胞分化成熟常表达的酶和蛋白,也常作为骨髓间充质干细胞向成骨分化的标志^[5];脂肪素和 AP-2 是骨髓间充质干细胞向脂肪分化的两

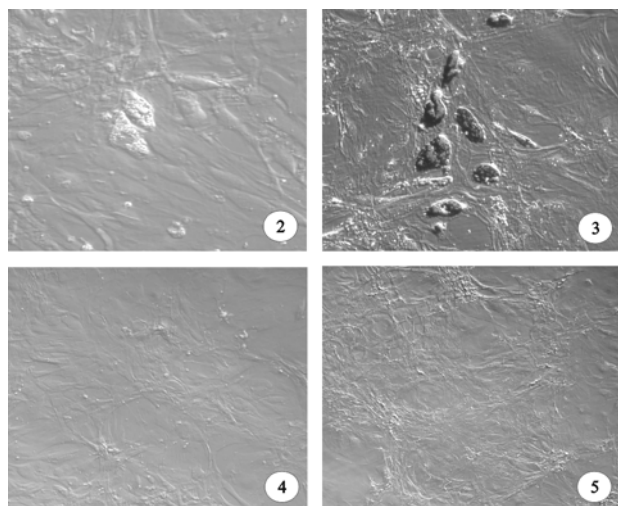


图 2 对照组在成脂肪诱导培养基作用 2 周后(油红 O 染色前, $\times 100$); 图 3 对照组在成脂肪诱导培养基作用 2 周后(油红 O 染色, $\times 100$); 图 4 刺激组在成脂肪诱导培养基作用 2 周后(油红 O 染色前, $\times 100$); 图 5 刺激组在成脂肪诱导培养基作用 2 周后(油红 O 染色, $\times 100$)

个重要的转录因子,常作为骨髓间充质干细胞向成脂肪分化的标志^[6]。本研究表明,脉冲电磁场能促进骨髓间充质干细胞多种成骨蛋白的表达,如 ALP、骨钙蛋白、骨桥蛋白;不仅如此,脉冲电磁场还抑制骨髓间充质干细胞脂肪素和 AP-2 等成脂肪转录因子的表达,并且在脂肪培养基诱导下也抑制其向成脂肪分化。这表明脉冲电磁场促进骨髓间充质干细胞向成骨分化,抑制其向成脂肪分化。同时也初步表明脉冲电磁场具有定向促进骨髓间充质干细胞向成骨分化的作用。

大量的临床研究表明,低频脉冲电磁场具有促成骨作用,而高频磁场的促成骨能力则较弱^[1]。有研究表明,15~30 Hz 的脉冲电磁场促成骨作用最强^[1]。因此本研究选择 15 Hz、1 mT 脉冲电磁场来刺激骨髓间充质干细胞。本研究也说明 15 Hz、1 mT 脉冲电磁场具有定向促进骨髓间充质干细胞向成骨分化的作用。

脉冲电磁场促进成骨的机制目前有多种假说,如钙离子效应、内分泌学说等。内分泌学说包括脉冲电磁场能促进细胞释放转化生长因子- β 、前列腺素 E_2 等^[7-9]。本研究首次报道脉冲电磁场具有抑制骨髓间充质干细胞向成脂肪分化的作用,即使是在加入成脂肪诱导培养基的条件下,其机制可能还是同其促进细胞释放细胞因子有关。葛保健等^[3]和 Wu 等^[10]用脉冲电磁场刺激骨髓间充质干细胞后发现细胞内环磷腺苷水平明显升高,骨形态蛋白-2 的表达也增加。Li 等^[11]研究发现,前列腺素 E 可通过环磷腺苷依赖的蛋白激酶 A、蛋白激酶 C 通路抑制软骨细胞的分化成熟。Zhao 等^[12]的研究也发现,骨形态蛋白-2 是通过激活环

磷酸盐依赖的蛋白激酶 A 通路来促进成骨的。这表明环磷酸盐及其依赖的蛋白激酶 A 通路可能在脉冲电磁场的促进成骨中发挥着重要的作用,也可能是脉冲电磁场抑制骨髓间充质干细胞向成脂肪分化的通路基础。这也是我们下一步要研究的重点。

本研究只探讨了脉冲电磁场促进骨髓间充质干细胞向成骨分化,抑制骨髓间充质干细胞向成脂肪分化。至于脉冲电磁场是否抑制骨髓间充质干细胞向其他方向分化(如成肌肉细胞、成神经细胞等)还有待进一步的研究。

另外脉冲电磁场的促成骨作用同药物、转录因子相比,其优点在于非侵入性和体外的易调控性。利用脉冲电磁场来刺激附有干细胞的支架载体使其定向成骨分化,并移入骨缺损处从而促进骨缺损的愈合则是一个新的方法,也易于体外控制,这也为骨组织工程提供了一个良好的途径。

参 考 文 献

- [1] Joseph A, Buckwalter, 主编, 陈启明, 主译. 骨科基础科学. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 129-130.
- [2] 郭征, 刘流, 主编. 医学组织工程技术与临床应用. 北京: 北京出版社, 2004: 129-130.
- [3] 葛保健, 方真华, 赵文春, 等. 工频电磁场对小鼠骨髓间充质干细胞 BMP-2 和 TGF- β 1 mRNA 表达的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2004, 26: 262-265.
- [4] 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.
- [5] Mwale F, Wang HT, Nalea V, et al. The effect of glow discharge plasma surface modification of polymers on the osteogenic differentiation of committed human mesenchymal stem cell. Biomaterials, 2006, 27: 2258-2264.
- [6] Akavia UD, Shur I, Rechavi G, et al. Transcriptional profiling of mesenchymal stromal cells from young and old rats in response to Dexamethasone. BMC Genomics, 2006, 7: 95.
- [7] De Mattei M, Caruso A, Pezzetti F, et al. Effects of pulsed electromagnetic fields on human articular chondrocyte proliferation. Connect Tissue Res, 2001, 42: 269-279.
- [8] De Mattei M, Pasello M, Pellati A, et al. Effects of electromagnetic fields on proteoglycan metabolism of bovine articular cartilage explants. Connect Tissue Res, 2003, 44: 1549.
- [9] Lohmann CH, Schwartz Z, Liu Y, et al. Pulsed electromagnetic field stimulation of MG63 osteoblast-like cells affects differentiation and local factor production. J Orthop Res, 2000, 18: 637-646.
- [10] Wu H, Ren K, Zhao WC, et al. Effect of electromagnetic fields on proliferation and differentiation of cultured mouse bone marrow mesenchymal stem cells. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2005, 25: 185-187.
- [11] Li TF, Zuscik MJ, Ionescu AM, et al. PGE2 inhibits chondrocyte differentiation through PKA and PKC signaling. Exp Cell Res, 2004, 300: 159-169.
- [12] Zhao L, Yang S, Zhou GO, 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.

(修回日期: 2007-03-20)

(本文编辑: 松 明)

· 短篇论著 ·

综合疗法治疗腰椎管狭窄症按 CT 分型疗效观察

尹兰山 常胜男

腰椎管狭窄症(lumbar spinal stenosis, LSS)是一种常见病,给患者生活及工作造成极大的影响,临床非手术治疗效果差。自 2002 年来,我们应用骶管注射与物理因子疗法对我院收治的 128 例 LSS 患者进行治疗,并对依据 CT 分型的各型患者疗效进行对比观察,现报道如下。

一、资料与方法

1. 一般资料: 2002 年 3 月至 2005 年 12 月我院收治的腰椎管狭窄症患者 128 例,均在专科医院进行 CT 检查,符合《中医病证诊断疗效标准》中 LSS 诊断标准^[1]。其中男 80 例,女 48 例;年龄为(50.41 ± 8.72)岁;病程为(5.20 ± 2.23)年;腰骶疼痛 112 例,下肢放射痛、感觉减弱或麻木 98 例,间歇跛行 117 例,合并马尾神经损害症状 20 例;CT 分型^[2] I 型 32 例, II 型 40 例, III 型 56 例。纳入标准: ①治疗前 1 个月内未行骶管注射

治疗;②对所用药物无过敏史;③能坚持 1 个月治疗并同意如实填写问卷表;④未行 LSS 手术治疗;⑤治疗期间不用其他任何药物。排除标准: ①妊娠或哺乳期妇女;②有严重心脑血管疾病;③有头痛、心绞痛、慢性疼痛而影响疗效判定者;④ II 度以上的腰椎滑脱、强直性脊柱炎、腰椎骨质疏松患者;⑤腰椎肿瘤、结核患者;⑥晕针、精神性疾病患者。

2. 治疗方法: (1)骶管注射疗法,注射用药为地塞米松 5 ~ 10 mg, 2% 利多卡因 5 ml, 胞二磷胆碱 0.25 mg, 肌苷 200 mg, Vit B₁₂ 0.5 mg, 加注射用水配制成 20 ml 混合液。按无菌操作要求,将上述药物混匀后,以 7 号注射针头经骶管缓慢注入硬膜外,注射时患者俯卧,耻骨联合部用枕头垫高约 10 ~ 15 cm,呈头低臀高位,双下肢自然放松,针头垂直穿过皮肤、皮下组织,当刺破骶管裂孔纤维膜有落空感后,将针尾向下与皮肤呈 20 ~ 30°角,回抽无血液及脑脊液时,缓慢注入药液 5 ~ 6 ml,观察注射无阻力、皮下无隆起状及患者无不良反应后,缓慢注射