

· 基础研究 ·

工频电磁场对骨髓间充质干细胞增殖、分化及其胞浆内钙离子浓度的影响

郝海虎 吴华 张海军 赵文春 钱红

【摘要】目的 研究工频电磁场刺激对骨髓间充质干细胞(MSC)的增殖与分化以及胞浆内钙离子浓度的影响。**方法** 体外培养 SD 大鼠骨髓间充质干细胞,取第 4 代细胞,应用工频电磁场进行干预。用四甲基偶氮唑蓝比色法检测其增殖活性,采用碱性磷酸酶(ALP)检测试剂盒检测 ALP 活性。应用 Fura-2/AM 对细胞进行染色,用细胞内双波长钙荧光系统测定细胞胞浆内游离钙离子的浓度。**结果** 50 Hz、1.1 mT 的电磁场对骨髓间充质干细胞具有明显的促增殖作用($P < 0.05$),使其 ALP 活性增高($P < 0.05$)。无论是放置在含诱导剂还是不含诱导剂培养基中的细胞,其胞浆内的钙离子浓度在电磁场刺激下都有不同程度的增高。**结论** 50 Hz、1.1 mT 的电磁场可促进 MSC 增殖,使其向成骨细胞分化。胞浆内钙离子浓度增加可能在细胞的增殖与分化过程中起着重要作用。

【关键词】 电磁场; 钙离子; 碱性磷酸酶; 骨髓间充质干细胞

The effects of electromagnetic fields on intracellular free calcium and the proliferation and differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells HAO Hai-hu*, WU Hua, ZHANG Hai-jun, ZHAO Wen-chun, QIAN Hong.

* Department of Orthopedics, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

【Abstract】 Objective To study the effects of a 50 Hz, 1.1 mT electromagnetic field (EMF) on intracellular free calcium and on the proliferation and differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. **Methods** Mouse bone marrow mesenchymal stem cells were isolated and cultured in vitro. The fourth passage cells were harvested and divided into groups A, B, C and D and stimulated with electromagnetic fields under different conditions. The cellular proliferation, differentiation (in terms of alkaline phosphatase activity), and the intracellular Ca^{2+} level were determined at different time points. **Results** EMFs of 50 Hz and 1.1 mT induced significantly increased cellular proliferation and enhanced cellular differentiation in comparison to the controls, and the intracellular free Ca^{2+} concentrations in the mesenchymal stem cells was significantly raised. **Conclusion** An EMF of 50 Hz and 1.1 mT can influence proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells. The increase of intracellular free calcium ion concentration in bone marrow mesenchymal stem cells induced by EMFs might play a role in the proliferation and differentiation of such cells.

【Key words】 Electromagnetic fields; Ca^{2+} concentrations; Alkaline phosphatase; Bone marrow mesenchymal stem cells

无论是动物实验还是临床应用,都证明电磁场(electromagnetic fields, EMFs)作为一种非创伤性疗法,对骨折、骨折延期愈合及骨不连等的治疗作用。但电磁场治疗上述疾病的具体机制到目前尚不明确。电磁场对细胞的影响包括整个膜蛋白的再分布、微丝的重组以及细胞内游离钙离子浓度($[\text{Ca}^{2+}]_i$)的改变^[1]。钙离子作为细胞内重要的第二信使之一,在细胞的增殖、分化方面起着非常重要的作用。因此本实验通过研究工频电磁场对体外培养的 Sprague-Dawley (SD) 大鼠骨

髓间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)增殖与分化的影响,并应用钙荧光系统分析 MSC 胞内钙离子浓度的变化,试图探讨电磁场对 MSC 的影响及其机制,旨在为电磁场更好地应用于骨科临床提供理论依据。

材料与方法

一、主要试剂及仪器

主要试剂包括:美国 Hyclone 公司产低糖 DMEM 培养液;美国 Gibco 公司产胎牛血清;美国 Sigma 公司产地塞米松、Vitamin C、 β -甘油磷酸钠、四甲基偶氮唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)、胰蛋白酶、二甲基亚砜 D-8779(dimethyl sulfoxide, DMSO)、

基金项目:国家自然科学基金项目(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(郝海虎、吴华、张海军、钱红);海军工程大学电力电子技术应用研究所(赵文春)

Fura-2/AM、N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙磺酸 (HEPES) 和 Triton X-100; 南京建成生物制品公司提供的碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 检测试剂盒。

主要仪器包括: 日本 Olympus 倒置相差显微镜; 华东电子管厂产 DG3022A 型酶联免疫检测仪; 德国产 Till Photonics 细胞内双波长钙荧光系统; 电磁场发生器由海军工程大学电机系设计与制造, 包括 Helmholtz 线圈式磁场发生器, 频率为 50 Hz, 正弦波, 强度连续可调。

二、实验动物

选择纯种 SD 大鼠, 4~5 周龄, 体重 90~110 g, 雌雄不限, 由武汉大学医学院实验动物中心提供。

三、实验方法

1. MSC 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与胫骨。去除股骨周围肌肉组织, 剪去包括骺板在内的两骺端。用 10 ml 的注射器抽取 8 ml 浓度为 10% 的低糖 DMEM 培养液 (内含青霉素 100 U/ml、链霉素 100 U/ml) 冲洗骨髓腔, 用 3K1-8 型离心机, 以 1 000 r/min 离心 5 min (离心半径为 8 cm) 后, 弃去上清。然后加入适量含 20% 胎牛血清的培养基, 将冲洗液反复吹打制成骨髓细胞悬液, 计数并调节细胞密度约 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培养, 接种后约 24 h 首次换液 (首次为半量换液, 以免丢失尚未贴壁的 MSC), 以后每隔 3~4 d 进行全量换液 1 次。定期更换培养液 3~4 次后, 可完全去除非贴壁的球形骨髓造血细胞, 剩余的贴壁细胞主要为所需要的 MSC^[2]。培养 7~10 d, 当细胞铺满单层时, 用 0.25% 的胰蛋白酶消化, 进行 1:2 传代培养, 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 4 代细胞, 调节细胞密度约为 1×10^4 个/ml, 分别接种于 A、B、C、D 共 4 块 96 孔板内, 每孔 200 μ l。A 组作为阴性对照组; B 组细胞接种 36 h 后, 每天于置有电磁场发生器的条件为 37℃、5% CO₂、饱和湿度的细胞培养箱中培养, 电磁场频率为 50 Hz、强度为 1.1 mT, 电磁场干预时间为每次 30 min, 每次干预间隔 12 h; C 组于成骨诱导培养基 (含 10% 的胎牛血清、 10^{-8} mol/L 的地塞米松、50 μ g/ml 的维生素 C、10 mmol/L 的 β -甘油磷酸钠) 中培养; D 组加入成骨诱导培养基后进行暴磁处理, 方法同 B 组。将 A、C 组置于相同条件但无电磁场发生器的培养箱中培养相等时间后进行对比分析 (表 1)。

表 1 各组细胞培养方法的比较

组别	电磁场	成骨诱导剂
A 组	-	-
B 组	+	-
C 组	-	+
D 组	+	+

3. 各组细胞增殖活性的检测

采用 MTT 法检测各组细胞的增殖活性。MSC 经电磁场干预或直接培养 3 d, 并于最后 1 次处理结束后约 12 h 取各组 96 孔培养板; 每孔加入 5 mg/ml MTT 溶液 20 μ l, 避光继续培养 4 h; 吸弃上清液, 每孔中加入 DM-SO 150 μ l, 电动震荡仪震荡 10 min 使沉淀充分溶解; 在酶标仪上于波长为 490 nm 处检测各孔吸光度。

4. ALP 活性检测

MSC 经电磁场干预或直接培养 5 d, 并于最后 1 次处理后约 12 h 取各组 96 孔培养板, 弃去培养液; 用 0.01 mol/L 磷酸缓冲液洗各培养孔 3 次; 加入 0.2% Triton X-100 50 μ l, 4℃ 冰箱中过夜; 每孔加 ALP 缓冲液和基质液各 50 μ l, 37℃ 下孵育 15 min; 再加入显色液 100 μ l, 于波长为 450 nm 处检测各孔吸光度。

5. $[Ca^{2+}]_i$ 的测定

将细胞接种到预先放置细胞玻璃爬片的 24 孔培养板中, 并置于条件为 37℃、5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养。Fura-2/AM 负载细胞: MSC 经电磁场干预或直接培养 3 d, 并于最后 1 次处理后约 12 h 取各组 96 孔培养板, 用标准细胞外液替换原来的 DMEM 培养液; 加入 Fura-2/AM 荧光探针 (终浓度为 2 μ mol/L) 于 37℃ 培养箱中温育 30 min, 其中 B、D 组仍放置在有电磁场发生装置的培养箱中孵育; 用标准细胞外液 (成分为 NaCl 140 mmol/L、KCl 2.8 mmol/L、MgCl₂ 1 mmol/L、CaCl₂ 2 mmol/L、HEPES 10 mmol/L、葡萄糖 10 mmol/L、pH 值 7.3) 洗涤细胞 2 次, 除去多余的 Fura-2/AM; 于钙荧光成像系统下观察和记录。Till 测量系统可接受细胞内 Fura-2 经波长为 340 nm 和 380 nm 的激发光激发产生的荧光, 波长为 340 nm 和 380 nm 处荧光强度的比值 (R 值, 即 F_{340}/F_{380}) 与 $[Ca^{2+}]_i$ 呈正相关, 故可用 R 值表示 $[Ca^{2+}]_i$ 变化。

四、统计学分析

实验所得数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 12.0 版统计软件, 应用单因素方差分析进行统计学处理。

结 果

一、电磁场对各组细胞增殖活性的影响

细胞干预 3 d 后, B 组细胞的 MTT 吸光度 (增殖活性) 明显较 A 组高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 而

C、D 组的 MTT 吸光度(增殖活性)较 A 组低,其中 C 组与 A 组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

二、电磁场对各组细胞分化成骨的影响

细胞干预 5 d 后,B、C、D 组细胞的 ALP 活性均明显较 A 组高,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 0.05);D 组的 ALP 活性明显高于 B、C 组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

三、电磁场对各组细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响

接受电磁场刺激的 B、D 组 $[Ca^{2+}]_i$ 明显比 A 组高,差异有统计学意义($P < 0.01$);D 组 $[Ca^{2+}]_i$ 明显高于 C 组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 2 电磁场对骨髓间充质干细胞的增殖活性、ALP 活性及钙离子浓度的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	MTT 吸光度	ALP 活性吸光度	钙荧光值(R 值)
A 组	0.282 ± 0.17	0.255 ± 0.06	550.14 ± 28.15
B 组	0.310 ± 0.28 ^a	0.284 ± 0.03 ^{ac}	664.12 ± 10.76 ^b
C 组	0.255 ± 0.52 ^a	0.335 ± 0.13 ^{bc}	549.27 ± 26.14 ^c
D 组	0.264 ± 0.26	0.356 ± 0.44 ^b	647.11 ± 11.23 ^b

注:与 A 组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与 D 组比较,^c $P < 0.05$

讨 论

电磁环境是骨组织所处的重要微环境之一,临床上常被用于治疗骨折延迟愈合、骨不连、骨质疏松等,并已取得满意疗效,但对其作用机制目前尚无明确的解释。钙离子是细胞转导过程中十分重要的第二信使。Cho 等^[3]的研究表明,在 1 Hz 或 10 Hz 的电磁场刺激下,人肝癌细胞可能通过电压门控钙通道的开放导致钙离子的内流,使细胞内的钙离子浓度增高至 4 倍。Wang 等^[4]的研究也表明,在一定强度的电磁场作用下,成骨细胞内钙离子浓度为对照组的 2.3 倍。大量研究表明,电磁场是通过与细胞膜相互作用以及跨膜信号的传递来调节细胞的生理功能。钙离子的变化影响着诸多细胞的生理功能,已成为人们普遍关注的焦点。

MSC 是一类具有多向分化潜能的细胞,终身存在于骨髓中,具有典型的干细胞特点,有强大的扩增与增殖能力,在一定的诱导条件下可以向成骨细胞分化^[5]。利用 MSC 的这一特性,可为人类的细胞移植提供可靠的自体资源,来治疗临床上的骨折延迟愈合、骨不连以及脊柱椎体融合术后患者等。但 MSC 在骨髓中的含量少,因此将体内 MSC 在离体条件下进行分离纯化并进行体外扩增、诱导分化成大量的成骨细胞就显得尤为重要。MTT 法是一种检测细胞增殖的方法,可间接地反映活细胞的数量和功能。本实验结果表明,经过电磁场干预后,B 组的吸光度较 A 组大,差异有统计学意义($P < 0.05$),证明 EMF 作用可促进 MSC 的增殖;C 组的吸光度较 A 组低,差异有统计学意义

($P < 0.05$),说明成骨诱导剂对 MSC 的增殖起到了部分抑制作用。ALP 活性是 MSC 在体外分化为成熟骨细胞的重要标志之一^[6]。本实验发现,经电磁场干预后,MSC 的 ALP 活性比对照组强,而加入成骨诱导剂后再经电磁场干预的 MSC,其 ALP 活性更强,这证明 MSC 经电磁场作用后,可向成骨细胞分化。

细胞增殖分化的调节是一个非常复杂的过程,是通过外界的物理刺激、细胞因子等的参与,膜内蛋白的重新分布^[7],以及第二信使、Notch 信号系统^[8]等多种信号通道的参与来实现。从本实验的结果可知,电磁场可促进 MSC 的增殖与分化,经电磁场干预的 MSC 钙离子浓度明显高于对照组,因此推断 $[Ca^{2+}]_i$ 升高对 MSC 的增殖与分化起着非常重要的作用。 $[Ca^{2+}]_i$ 升高一般部分来源于外钙内流,部分来源于钙库释放,可能存在以下两种途径:(1)增大细胞膜的通透性,使细胞外钙离子流入细胞内;(2)影响细胞内钙库(例如细胞核、线粒体、内质网等)的细胞器膜,促进钙离子释放。但是,大量的报道都证实了磁场并不影响细胞内钙库中钙离子的释放,故推测其浓度的升高是细胞外钙离子的内流造成^[9-11]。众所周知,钙离子信使在细胞的信号转导调节中起着非常重要的作用,它可以调节磷脂酶 C 和磷酸蛋白酶 C 这两种关键酶的活性,还可以抑制内质网膜上 IP3 与其受体结合,抑制肌醇磷脂的重新合成,从而达到调节肌醇磷脂信号系统的目的。另外,钙离子信号系统还可以激活磷脂酶 A2,产生花生四烯酸,调节细胞反应。因此,钙离子信号系统处于多种细胞信号传递途径的中心位置,对细胞的生物学效应起着很重要的作用。可见促进 $[Ca^{2+}]_i$ 增高,对细胞的增殖与分化具有重要作用。本实验检测了细胞经电磁场干预后 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化,至于细胞受电磁场刺激后 $[Ca^{2+}]_i$ 的动态变化还有待进一步研究。

总之,本实验结果表明电磁场对 MSC 的增殖和分化起着非常重要的作用,该作用与细胞内的第二信使钙离子密不可分,这为我们进一步探索电磁场在骨组织工程修复骨缺损中的生物学效应机制提供了一条有效的途径。另外,关于不同参数的电磁场对细胞增殖与分化的影响及其生物学机制也有待日后进一步研究,为日后临床应用提供实验基础。

参 考 文 献

- [1] Pessina GP, Aldinucci C, Palmi M, et al. Pulsed electromagnetic fields affect the intracellular calcium concentrations in human astrocytoma cells. Bioelectromagnetics, 2001, 22:503-510.
- [2] Meirelles LS, Nardi NB. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. Br J Haematol, 2003, 123:702-711.
- [3] Cho MR, Thatte HS, Silvia MT, et al. Transmembrane calcium influx induced by AC electric fields. FASEB J, 1999, 13:677-683.

- [4] Wang Q, Zhong S, Ouyang J, et al. Osteogenesis of electrically stimulated bone cells mediated in part by calcium ions. Clin Orthop Relat Res, 1998, 348: 259-268.
- [5] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science, 1999, 284: 143-147.
- [6] Alborzi A, Mac K, Glackin CA, et al. Endochondral and intramembranous fetal bone development: osteoblastic cell proliferation, and expression of alkaline phosphatase, m-twist, and histone H4. J Craniofac Genet Dev Biol, 1996, 16: 94-106.
- [7] Bersani F, Marinelli F, Ognibene A, et al. Intramembrane protein distribution in cell cultures is affected by 50 Hz pulsed magnetic fields. Bioelectromagnetics, 1997, 18: 463-469.
- [8] 鲁苗壮, 吴祖泽, 张群伟, 等. 激活 Notch 信号通路促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化. 科学通报, 2004, 49: 554-557.
- [9] Karabakhtsian R, Broude N, Shalts N, et al. Calcium is necessary in the cell response to electromagnetic fields. FEBS Lett, 1994, 349: 1-6.
- [10] Liburdy RP, Callahan DE, Harland J, et al. Experimental evidence for 60 Hz magnetic fields operating through the signal transduction cascade: effects on calcium influx and c-MYC mRNA induction. FEBS Lett, 1993, 334: 301-308.
- [11] Fanelli C, Coppola S, Barone R, et al. Magnetic fields increase cell survival by inhibiting apoptosis via modulation of Ca^{2+} influx. FASEB J, 1999, 13: 95-102.
- (收稿日期: 2006-06-20)
(本文编辑: 吴倩)

· 研究简报 ·

电刺激椎动脉周围神经丛对椎-基底动脉血液动力学的影响

孙建民 崔新刚 李广桐

【摘要】目的 通过电刺激椎动脉周围神经丛, 观测椎-基底动脉系统的变化, 以了解椎动脉型颈椎病的病理机制, 并为其治疗提供理论依据。**方法** 新西兰大白兔 20 只, 电刺激左侧椎动脉和其周围神经丛, 采用彩色多普勒超声分别监测左、右侧椎动脉和基底动脉的血流变化, 然后用 1% 的利多卡因封闭上述刺激区后再次检测。**结果** 左侧椎动脉周围受到电刺激后左、右侧椎动脉和基底动脉的平均血流速度、搏动指数以及阻力指数均较刺激前明显升高 ($P < 0.01$); 而 1% 的利多卡因封闭后, 左、右侧椎动脉和基底动脉的平均血流速度、搏动指数以及阻力指数较刺激前均无明显变化 ($P > 0.05$)。**结论** 左、右侧椎动脉之间和椎动脉与基底动脉之间, 存在着协同反射, 椎-基底动脉的痉挛是由椎动脉周围的神经丛介导的, 减少对椎动脉及其周围神经丛的刺激, 将有助于改善椎动脉型颈椎病症状。

【关键词】 血液动力学; 椎-基底动脉; 彩色多普勒超声; 大白兔

许多临床研究表明, 在椎动脉型颈椎病中病理因素对椎动脉及其周围神经丛的刺激比对椎动脉的压迫更能够引起椎动脉系统的血流障碍, 机械性压迫可能不是造成椎动脉型颈椎病的根本原因, 而交感神经受到激惹才是引发椎动脉供血不足的主要原因^[1,2]。至今为止, 交感神经引起椎动脉供血不足的机制尚未完全明了。本研究旨在通过电刺激模拟椎动脉周围神经丛受刺激状态, 并同时采用彩色多普勒超声监测左右椎动脉及基底动脉血流的变化。

材料与方法

一、实验动物

20 只健康新西兰大白兔, 雌、雄不限, 平均月龄 3 个月, 体重 2.5 ~ 3.0 kg。

二、实验和检测方法

室温保持在 20 ~ 25℃, 心跳保持在每分钟 180 ~ 260 次, 体温 (肛门温度) 保持 38.5 ~ 39.5℃, 呼吸每分钟 40 ~ 50 次, 血压 13.5 ~ 16.0 kPa。

椎动脉检测: 颈部前正中入路切开皮肤皮下, 将气管向右侧牵开, 暴露椎前筋膜, 按骨性标志确定 C_5 ~ C_6 横突, 将颈长肌向

外侧牵开, 暴露 C_5 横突的下缘、 C_6 横突的上缘和 C_5 ~ C_6 间盘左、后外侧缘, 椎动脉和其周围神经丛位于此区域, 作为电刺激区域。检测为 C_5 横突的下缘、 C_6 横突的上缘和 C_5 ~ C_6 间盘左前外侧缘, 采用青岛产 G6805-1 电刺激仪, 电极两个直径 1.5 cm 的极片, 连接 2 枚直径为 0.2 mm 的银针探头, 一枚探头插入椎动脉周围, 另一枚探头插入胸部肌肉内。牵开颈动脉鞘, 探头对准 C_3 ~ C_4 椎体的外侧, 与椎动脉呈 30 ~ 40°; 在基底动脉检测前, 将探头置于枕外隆突后方枕窗, 与基底动脉流向呈 30°。输出电压 6 ~ 10 V, 输出频率 10 ~ 16 Hz, 刺激持续时间 10 s, 间隔 30 min (血压、呼吸等指数恢复至刺激前状态), 开始第 2 次刺激。2 d 后进行封闭后检测, 在 C_5 横突的下缘、 C_6 横突的上缘和 C_5 ~ C_6 间盘左前外侧缘的椎动脉周围, 用 1% 的利多卡因封闭椎动脉周围神经丛, 刺激部位、方法同封闭前。采用彩色多普勒超声 (法国产 Explorer CVS CE0318 动物实验型) 沿椎-基底动脉的走行位置分别检测两种状态下 (椎动脉周围封闭前、后) 刺激前、后 20 只兔左、右侧椎动脉和基底动脉的血流变化。

四、统计学分析

采用 SPSS 10.0 软件, 行独立样本 t 检验。分别比较刺激和封闭前、后椎动脉及基底动脉血流变化, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

电刺激后, 大白兔左、右侧椎动脉和基底动脉的平均血流