

· 基础研究 ·

正弦波电磁场对鼠骨髓干细胞分化的生物学影响

黄仕龙 陈安民 郭风劲 李新志 罗正强 张衣北

【摘要】目的 研究 50 Hz 正弦波电磁场对大鼠骨髓干细胞分化的生物学影响。**方法** 取生长良好的第 4 代骨髓干细胞,随机分为实验组和对照组,实验组采用 50 Hz 正弦波电磁场间断刺激。分别绘制 2 组细胞生长曲线,MTT 法测定细胞增殖活性,流式细胞仪检测细胞凋亡情况,Western Blot 法检测细胞甲状旁腺激素相关蛋白(PTHrp)的表达,并进行定量分析。**结果** 曝磁早期细胞增殖活性的改变不明显,正弦波电磁场刺激 4 d 和 6 d 能明显促进细胞的增殖,2 组 OD 值比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与对照组比较,实验组骨髓干细胞的早期凋亡率、晚期凋亡率和总凋亡率均明显降低($P < 0.05$),PTHrp 蛋白的表达增强。**结论** 适当参数的工频正弦波电磁场能促进骨髓干细胞 PTHrp 蛋白的表达,从而调节其增殖能力,增强分化稳定性,抑制细胞凋亡。

【关键词】 电磁场; 细胞分化; 细胞增殖; 甲状旁腺激素相关肽

The biological effects of sinusoidal electromagnetic fields on proliferation and differentiation of precartilaginous stem cells in rats HUANG Shi-long, CHEN An-min, GUO Feng-jing, LI Xin-zhi, LUO Zheng-qiang, ZHANG Yi-bei. Department of Orthopedics, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

【Abstract】Objective To study the biological effects of sinusoidal electromagnetic fields (EMFs) on proliferation and differentiation of precartilaginous stem cells (PSCs) in rats in vitro. **Methods** The rodent PSCs were isolated and cultured in vitro. The fourth passage PSCs were randomly divided into an experiment group and a control group, and stimulated with sinusoidal EMFs under the same conditions. Cell proliferation was measured at different time points by using of MTT, and the growth curve was obtained. The apoptosis was analyzed by the use of flow cytometer and the expression of parathyroid hormone-related peptide (PTHrp) was detected with Western Blot. **Results** The cellular differentiation was inhibited with sinusoidal EMFs of 50 Hz frequency and 1mT intensity, while cell proliferation was promoted at 4 d after stimulation ($P < 0.05$). Compared with those in the control group, the early and total rates of apoptosis in experiment group were obviously decreased, but the expression of PTHrp protein was significantly increased. **Conclusion** Sinusoidal EMFs might regulate proliferation and differentiation, enhance the stability of PSCs and inhibit apoptosis by mediating the expression of PTHrp protein.

【Key words】 Electromagnetic field; Cell differentiation; Cell proliferation; Parathyroid hormone-related peptide

由于软骨病损后自身修复能力很差,各种原因导致的软骨缺损很难自愈,因而目前临床上对其尚无很好的治疗方法。骨与软骨的分化和发育是一个逐渐、连续的过程,软骨先后历经静止区、增殖区和肥大区,进而逐渐钙化。骨髓干细胞又称为骨髓静止区细胞,是一类可以分裂增殖、自我更新并具有多向分化潜能的细胞,它作为软骨细胞的种子细胞,可用于骨关节系统病理状态下软骨细胞的替代治疗,还能作为外源性基因载体用于基因治疗。目前,我们对于软骨细胞的增殖、分化规律和调控机制尚缺乏充分的认识,因此深入地研究骨骺分化和发育机制对了解骨与软骨的生长具有重要意义。

电磁场疗法在骨折延迟愈合及不愈合、先天性胫骨假关节等疾病的治疗中已取得了满意疗效,但其机

理还不十分明确。有研究证实,电磁场刺激可诱导骨髓间充质干细胞分化,对多种细胞的分化具有调节作用^[1],但对骨髓干细胞的影响尚有待探讨。为此,我们设计了本实验,旨在研究工频电磁场对体外培养的大鼠骨髓干细胞骨分化的生物学影响。

材料与方法

一、主要材料

实验动物:纯系清洁级 Sprague-Dawley (SD) 新生大鼠 12 只,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供,雌、雄不限。

主要试剂:DMEM/F12 培养基购自美国 Hyclone 公司,优质胎牛血清、青-链霉素、胶原酶 P、DNA 酶 I、胰蛋白酶、MTT 购自美国 Gibco 公司,兔抗鼠抗胶原甲状旁腺激素相关肽 (parathyroid hormone-related pep-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30371439)

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

tide, PTHrp) 购自美国 Saint Cruz 公司, 辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗购自美国 Pirece 公司, Annexin-V 凋亡检测试剂盒购自晶美公司, Percoll 分离液购自美国 Pharmacia 公司。

电磁场发生器: 50 Hz 正弦波电磁场发生器由海军工程大学电力电子技术应用研究所研制, 采用 Helmholtz 线圈, 直径 30 cm, 能产生 0 ~ 100 mT 的连续可调场强, 磁场均匀性好, 分布差异小于 1%。将该发生器置于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中, 以确保细胞曝磁时与对照组的培养条件一致。

二、细胞的取材与分组

1. 骨髓干细胞的取材: 参考 Boyan 等^[2] 所拟的方法并适当改良, 无菌分离新生 SD 大鼠股骨和胫骨, 去除软组织, 锐性分离骨髓与骨干之间的膨大和半透明组织后, 置于无血清的 DMEM/F12 培养基中, 充分剪碎后于 37℃ 下孵育过夜。根据 Weisser 等^[3] 所拟的方法, 将组织碎片置于 Hank's 平衡盐溶液配制的 0.1% 胰蛋白酶中, 于 37℃ 下温和振荡并孵育 20 min, DMEM/F12 洗涤后, 以 0.01% 的胶原酶 P 于 37℃ 下温和振荡并消化过夜, 然后以 0.1% 的胶原酶 P 于 37℃ 下处理 4 h, 以充分释放细胞。40 目筛网过滤、洗涤后以含 0.01% DNA 酶 I 的培养基重悬细胞, 小心移至新鲜配置的不连续 Percoll 密度梯度液顶层, 在 4℃ 下以 400 × g 离心 1 h。取第 4 层细胞(密度约为 1.053 g/ml) 观察、计数后接种于含 10% 胎牛血清和 50 μg/ml Vit C 的 DMEM/F12 培养基中, 5% CO₂、100% 湿度、37℃ 培养箱中培养 24 h 后换液, 以后每 72 小时换液 1 次, 细胞融合至 85% ~ 90% 传代。取传至第 4 代的细胞鉴定并进行后续实验研究^[4]。

2. 实验分组及处理: 取生长良好的第 4 代细胞, 随机分为实验组和对照组。对照组放置于 5% CO₂、100% 湿度、37℃ 的培养箱中; 实验组细胞贴壁后即开始曝磁。曝磁方法: 将细胞放置于频率为 50 Hz、强度为 1 mT 的正弦电磁场发生器线圈中央, 接受检测前每日曝磁 2 次, 每次 1 h, 间隔时间 12 h, 其余时间与对照组放置于相同的 CO₂ 培养箱中。每组分别绘制生长曲线, 进行 MTT 检测、流式细胞仪分析和 Western Blot 检测。

三、检测方法

1. 细胞分化情况的观察和生长曲线的绘制: 第 4 代细胞按每孔 1×10^4 个接种于 24 孔板中, 在倒置相差显微镜下观察细胞的生长情况, 记录贴壁时间、细胞形态和分裂情况。从曝磁次日起, 每日从实验组和对照组各取 3 孔, 用质量分数为 0.25% 的胰蛋白酶消化后计数, 取均数, 绘制生长曲线, 按以下公式计算细胞群体倍增时间 (population doubling time, PDT): $PDT = [\log 2 / (\log N_t - \log N_0)] \times t$, 其中 N_0 和 N_t 分别代表接

种时和培养 t 小时后的细胞数^[5]。

2. MTT 法检测细胞的增殖活性: 第 4 代细胞以每孔 1×10^3 个接种于 96 孔培养板, 分别于曝磁后第 2 天、第 4 天和第 6 天用 MTT 法检测各组骨髓干细胞的存活和增殖能力, 在 ELX-800UV 酶标检测仪上检测 $\lambda = 490$ nm 时各孔的吸光值。

3. 流式细胞仪分析骨髓干细胞的凋亡情况: 第 4 代细胞接种于 75 ml 培养瓶中, 观察其生长情况。于曝磁后第 6 天细胞状态良好时, 用细胞刮刀将细胞从培养瓶底刮下, 按 Annexin-V 凋亡检测试剂盒说明书操作, 进行 Annexin-V 加碘化吡啶双标记, 用流式细胞仪分析细胞凋亡情况。

4. Western Blot 法检测蛋白的表达: 于细胞培养第 6 天生长状态良好时, 提取细胞总蛋白质, 用考马斯亮蓝法测定样品蛋白浓度。取 10 μg 总蛋白进行 10% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(电压 100 V, 电泳 40 min 后调整电压为 150 V, 继续电泳 2 h), 用半干法将蛋白转移至聚偏氟乙烯膜(80 mA, 2 h), 然后进行以下检测: ①将聚偏氟乙烯膜浸入含 5% 牛血清白蛋白的 Tris 缓冲液中, 4℃ 封闭过夜。②加入 1:200 的兔抗大鼠 PTHrp 多克隆抗体或 1:100 的兔抗鼠 β-actin 多克隆抗体, 4℃ 孵育过夜; 漂洗后加入辣根过氧化物酶标记的小鼠抗兔 IgG (1:2 000), 37℃ 下振荡并孵育 1 h; 弃孵育液, 再以 Tris 缓冲液漂洗 3 次, 每次 5 min。③采用化学发光法检测, 于 9 ml 的去离子水中分别加入化学发光试剂 ECL (enhanced chemiluminescence) 溶液 A 和溶液 B 各 0.5 ml, 充分混匀后滴加于聚偏氟乙烯膜正面, 暗室中曝光 X 线底片 10 min, 常规洗片, 扫描, 进行灰度分析。

四、统计学分析

实验所得数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 采用 SPSS 11.0 统计软件, 应用单因素方差分析进行统计学处理, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、细胞生长曲线和分化情况

每日于倒置相差显微镜下观察: 骨髓干细胞贴壁完成时间约为 4 ~ 7 h, 细胞形态呈上皮样细胞排列, 单层贴壁生长, 极少出现重叠生长的现象; 处于有丝分裂阶段和衰老退变的细胞为多边形、三角形。测得细胞分裂在第 6 天达到高峰, 形成平台期, 分裂指数为 36%, 实验组细胞群体倍增时间为 23.92 h, 对照组为 31.57 h (图 1)。

二、正弦波电磁场对骨髓干细胞增殖活性的影响

1 mT 正弦波电磁场干预 2 d, 实验组与对照组细胞的增殖活性比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 干预 4 d 及 6 d 后, 实验组细胞的增殖活性明显高于对照

组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

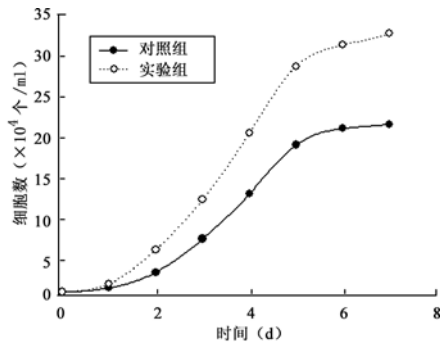


图 1 电磁场对大鼠骨髓干细胞生长曲线的影响

表 1 正弦波电磁场对大鼠骨髓干细胞增殖活性的影响 (OD 值, $\bar{x} \pm s$)

组 别	2 d	4 d	6 d
对照组	0.381 ± 0.130	0.402 ± 0.059	0.524 ± 0.167
实验组	0.395 ± 0.212	0.517 ± 0.153 *	0.628 ± 0.158 *

注:与对照组比较, * $P < 0.05$

三、电磁场对骨髓干细胞凋亡的影响

实验组大鼠曝磁 6 d 后,骨髓干细胞早期凋亡率、晚期凋亡率和总凋亡率均显著低于实验组 ($P < 0.05$ 或 0.01),见表 2。

表 2 曝磁 6 d 对骨髓干细胞凋亡率的影响 (%)

组 别	早期凋亡率	晚期凋亡率	总凋亡率
对照组	3.52 ± 0.127	2.17 ± 0.230	5.69 ± 0.259
实验组	1.67 ± 0.134 *	1.14 ± 0.153 #	2.81 ± 0.184 #

注:与对照组比较, # $P < 0.05$, * $P < 0.01$

四、电磁场对骨髓干细胞 PTHrp 蛋白表达的影响

Western Blot 检测结果显示,实验组细胞有高表达的 PTHrp 蛋白条带,而对照组仅有低水平的内源性 PTHrp 蛋白表达(图 2)。

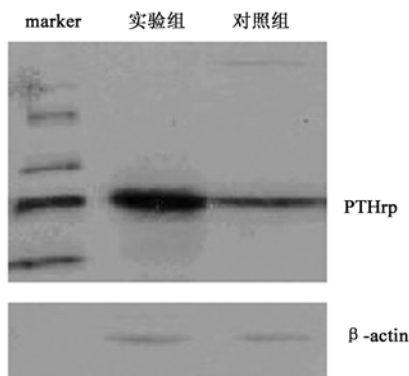


图 2 电磁场对骨髓干细胞 PTHrp 蛋白表达的影响

讨 论

外源性磁场作用于生物体会产生一定的生物学效应,但不同类型、不同强度的磁场效果不同。有报道认

为,长时间、大剂量的磁场作用会产生一系列的副作用^[6]。有研究显示,稳恒磁场可使遗传密码发生变异,对动物的条件反射活动有抑制作用,对大鼠胚胎体外培养的神经细胞分化也有抑制作用^[7]。本研究采用磁场强度为 1 mT 的正弦波磁场间断刺激大鼠骨髓干细胞,结果显示磁场可增强细胞分化的稳定性,明显促进细胞的增殖。细胞凋亡是一种特殊的死亡形式,不同于细胞坏死,是由凋亡抑制基因 Bcl22 及促进基因 Bax、Fax 等共同调控的细胞主动性“自杀”过程^[8]。本研究结果显示,50 Hz 正弦波电磁场对实验组细胞的凋亡,特别是早期凋亡有明显抑制作用,其机制可能与凋亡调控基因有关。

近年来,磁场的细胞分子生物学效应引起了人们的广泛重视。无论是生物整体还是单个细胞,其生命现象均与内环境的金属离子浓度、细胞膜的离子通透性、带电物质的迁移运动等密切相关。磁场作为一种物理因素,对运动的带电物质有洛伦兹力作用,影响细胞膜的离子通透性和膜两侧的电位,可引起机体内环境失衡,从而影响带电物质的转移过程,产生生物学效应。但是,磁场与细胞膜的相互作用、跨膜信号的传递及其对细胞生理功能调节的具体机制尚未完全阐明。我们推测磁场可能通过某种信号转导通路来促进 PTHrp 基因的表达,进而通过已知的 PTHrp-Ihh 信号轴调控骨髓干细胞的增殖与分化。至于磁场是通过何种方式来调控 PTHrp 基因的表达,还有待进一步的深入探讨。

参 考 文 献

- 1 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.
- 2 Boyan BD, Schwartz Z, Swain LD, et al. Differential expression of phenotype by resting zone and growth region costochondral chondrocytes in vitro. Bone, 1988, 9: 185-194.
- 3 Weissner J, Riemer S, Schmidl M, et al. Four distinct chondrocyte populations in the fetal bovine growth plate: highest expression levels of PTH/PTHrP receptor, indian hedgehog, and MMP-13 in hypertrophic chondrocytes and their suppression by PTH (1-34) and PTHrP (1-40). Exp Cell Res, 2002, 279: 1-13.
- 4 Schwartz Z, Ehland H, Sylvia VL, et al. 1α-, 25-dihydroxyvitamin D3 and 24R, 25-dihydroxyvitamin D3 modulate growth plate chondrocyte physiology via protein kinase C-dependent phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase. Endocrinology, 2002, 143: 2775-2786.
- 5 肖渝平. 软骨细胞的培养. 见: 薛庆善, 主编. 体外培养的原理与技术. 北京: 科学出版社, 2001. 494-498.
- 6 Lacy-Hulbert A, Metcalfe JC, Hesketh R. Biological responses to electromagnetic fields. FASEB J, 1998, 12: 395-420.
- 7 端礼荣, 吴全义, 刘方平. 稳恒磁场对大鼠胚胎中脑神经细胞发育的影响. 中华预防医学杂志, 2004, 38: 190-192.
- 8 张卓立, 李俊峡, 陆军, 等. 强恒磁场对在体大鼠缺血再灌注心肌细胞凋亡的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2001, 23: 340-342.

(修回日期: 2005-10-20)

(本文编辑: 吴 倩)