

## · 基础研究 ·

# 维拉帕米在电磁场刺激骨髓间充质干细胞增殖与分化过程中的作用

刘伟军 吴华 葛保健 赵文春 任凯 钱红

**【摘要】目的** 研究在 50 Hz、0.8 mT 的电磁场条件下,维拉帕米(verapamil)对骨髓间充质干细胞增殖与分化的作用,以推断  $\text{Ca}^{2+}$  在此过程中的作用及其内流变化情况。**方法** 体外培养 SD 大鼠骨髓间充质干细胞,取第 4 代细胞,应用工频电磁场及维拉帕米干预,用四甲基偶氮唑蓝比色法检测其增殖活性,按照碱性磷酸酶(ALP)检测试剂盒说明书步骤检测 ALP 活性,并用改良 Gomori 钙钴法染色定性观察。**结果** 50 Hz、0.8 mT 的电磁场对骨髓间充质干细胞具有明显的促增殖( $P < 0.01$ )、抑分化( $P < 0.01$ )作用,但在加入维拉帕米后,这种增殖效应消失而抑分化效应减弱( $P < 0.01$ )。**结论** 在 50 Hz、0.8 mT 的电磁场作用下,骨髓间充质干细胞  $\text{Ca}^{2+}$  内流发生变化,且该变化在骨髓间充质干细胞向成骨方向分化过程中起部分抑制作用,而在促其增殖的过程中起主要作用。

**【关键词】** 电磁场; 维拉帕米; 碱性磷酸酶; 骨髓间充质干细胞

**Effects of Verapamil on the proliferation and differentiation of bone marrow mesenchymal caused by electromagnetic fields stimulation** LIU Wei-jun\*, WU Hua, GE Bao-jian, ZHAO Wen-chun, REN Kai, 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 Verapamil on the proliferation and differentiation of bone marrow mesenchymal stimulated by electromagnetic fields (EMF) of 50 Hz and 0.8 mT. **Methods** The 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 effected by EMFs and Verapamil. The colorimetric assay was used to measure the cellular proliferation and the activity of ALP. The modified Gomori staining was also used to observe the activity of ALP. **Results** EMFs of 50 Hz and 0.8 mT induced a significant increase of cellular proliferation ( $P < 0.01$ ) and inhibited the activity of ALP ( $P < 0.01$ ) in comparison to the controls, but Verapamil inhibited the increase and enhanced the activity of ALP. **Conclusion** EMFs of 50 Hz and 0.8 mT changed intracellular free calcium ion concentration of bone marrow mesenchymal stem cells, and the change contributed to promoting the cellular proliferation and inhibiting the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells.

**【Key words】** Electromagnetic fields; Verapamil; Alkaline phosphatase; Bone marrow mesenchymal stem cell

电磁场(electromagnetic fields, EMF)作为一种非侵入性治疗方法,在骨科领域常被用于治疗骨折延迟愈合、骨不连及骨质疏松等,并已取得满意疗效,但对其作用机制目前尚无很明确的解释。 $\text{Ca}^{2+}$  是细胞转导过程中十分重要的第二信使。有研究表明,在电磁场刺激下,细胞可能会通过电压门控钙通道的开放发生  $\text{Ca}^{2+}$  的内流<sup>[1]</sup>,因此本实验在 50 Hz、0.8 mT 的磁场条件下选择维拉帕米(verapamil)来观察其对电磁场刺激骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)的增殖与分化作用的影响,以推断  $\text{Ca}^{2+}$  在电磁场刺激骨髓间充质干细胞的增殖与分化过程中的作用和内流变化情况。

## 材料与方法

### 一、主要仪器及试剂

1. 主要试剂:DMEM-LG 培养基(美国 Hyclone 公司产),优质胎牛血清(Gibco 公司产),四甲基偶氮唑蓝[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT](Sigma 公司产),维拉帕米(verapamil),胰蛋白酶、二甲基亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO)(Amersco 公司产),碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)检测试剂盒及考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒(南京生物建成公司产)。

2. 主要仪器:电磁场发生器(海军工程大学电机系设计与制造)、倒置相差显微镜(OLYMPUS, 日本)、酶联免疫检测仪(DG3022A 型,华东电子管厂)、分光光度计(岛津 1240 紫外,日本)等。

基金项目:国家自然科学基金项目(No. 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(刘伟军、吴华、葛保健、任凯、钱红);海军工程大学电力电子技术应用研究所(赵文春)

## 二、材料

Sprague-Dawley 大鼠 6 只, 4~5 周龄, 体重为 100~120 g, 雌雄不限, 由华中科技大学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 U/ml) 冲洗骨髓腔, 将冲洗液反复吹打制成骨髓细胞悬液, 计数并调整细胞密度约  $5 \times 10^6$  个/ml 后直接将其接种于 50 ml 的培养瓶内, 置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度的细胞培养箱中进行培养, 接种后约 6 h 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. 实验分组及培养环境: 取生长良好的第 4 代细胞, 调节细胞密度至约  $1 \times 10^4$  个/ml, 将其分种于 A、B、C、D 共 4 块 96 孔板内, 每孔 200  $\mu$ l, 即为 A、B、C、D 组, 其中 A、B 组不加药, C、D 组加维拉帕米, 浓度为 20  $\mu$ mol/L。将 B、D 组于接种的第 2 天(约 24 h 后) 放置于置有磁场发生器的 37℃、5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度的细胞培养箱中进行曝磁培养, 磁场强度为 0.8 mT, 频率为 50Hz, 曝磁时间为每次 30 min, 间隔 12 h, 共 6 次。将 A、C 组放置于同样条件但无磁场发生器的培养箱中培养相同时间做为对照。

3. MTT 法检测各组细胞的增殖情况: 在最后一次曝磁后约 12 h, 于 4 组 96 孔板每孔加入 5 mg/ml 的 MTT 溶液 20  $\mu$ l, 于 37℃ 环境下避光 4 h, 吸取上清液, 加入 DMSO 150  $\mu$ l, 充分振荡使紫色结晶物溶解, 在酶标仪上测定 490 nm 波长处每孔的吸光度值。

4. ALP 的检测: 取第 4 代细胞, 以  $1 \times 10^4$  个/ml 的密度接种于 4 块 6 孔板内, 每孔 3 ml, 分组及培养情况同上。在最后一次曝磁后约 12 h, 分别将各孔细胞用 PBS 清洗干净后消化离心, 离心半径 17 cm, 1 000 r/min, 离心 10 min。将各孔离心后的细胞用 500  $\mu$ l 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, 计算出各孔的蛋白含量。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。

5. 改良 Gomori 钙钴法染色: 取第 4 代细胞, 以  $1 \times 10^4$  个/ml 的密度接种于已放置了清洁无菌的盖玻片的 4 块 6 孔板内, 每孔 3 ml, 分组及培养情况同上。在最后一次曝磁后约 12 h, 将盖玻片取出并用 PBS 清洗干净后用 70% 乙醇与丙酮 1:1 的混合液固定细胞, 水洗后将其放置于已配好的孵育液中, 在 37℃ 条件下孵育 4 h, 再用 20 g/L 的硝酸钴溶液作用 4 min, 流水洗净后浸入硫化铵溶液 3 min, 流水洗净后再用 10 g/L 伊红复染 5 min, 干燥后观察 ALP 染色情况。

## 四、统计学分析

数据均以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 应用 SPSS 13.0 软件, 应用单因素方差分析进行统计学分析。

## 结 果

### 一、电磁场对各组细胞增殖活性的影响

经曝磁 3 d 后, A 组细胞的增殖活性 (MTT 吸光值) 明显低于 B 组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), C、D 组细胞的增殖活性则无明显区别。A、C、D 组细胞的增殖活性也无明显区别(表 1)。

### 二、电磁场对各组细胞分化成骨的影响

经曝磁 3 d 后, B 组细胞的 ALP 活性明显低于 A 组, 差异有显著统计学意义 ( $P < 0.01$ ), D 组细胞的 ALP 活性明显低于 C 组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。A、C 组细胞的 ALP 活性无明显区别, 而 B 组的 ALP 活性较 D 组为低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )(表 1)。

表 1 电磁场对骨髓间充质干细胞的增殖活性、ALP 活性的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别  | MTT 吸光值            | ALP 活性 (U/g prot)    |
|-----|--------------------|----------------------|
| A 组 | 0.280 $\pm$ 0.36   | 55.43 $\pm$ 3.69     |
| B 组 | 0.311 $\pm$ 0.49 * | 15.91 $\pm$ 3.75 *   |
| C 组 | 0.278 $\pm$ 0.39   | 54.37 $\pm$ 3.71     |
| D 组 | 0.277 $\pm$ 0.47   | 24.52 $\pm$ 3.81 * # |

注: 与 A 组比较, \*  $P < 0.01$ ; 与 B 组比较, #  $P < 0.01$

### 三、骨髓间充质干细胞的 ALP 染色结果

骨髓间充质干细胞的 ALP 染色结果支持上述数据, 可见无曝磁的 A、C 组(图 1) 的染色明显深于 B、D

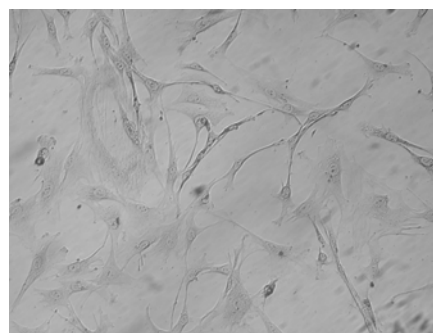


图 1 A、C 组的骨髓间充质干细胞 (ALP 染色,  $\times 200$ )

组(图 2、图 3),其大量细胞胞浆内均可见灰色或者棕色沉淀,部分细胞胞浆有黑色沉淀,随机计算 100 个细胞来求得阳性细胞的百分率,得到 A 组的积分值为  $(38 \times 1) + (22 \times 2) + (3 \times 3) + (1 \times 4) = 95$ , C 组的积分值为 99。因 B、D 组染色都很浅,未计算阳性细胞的百分率。

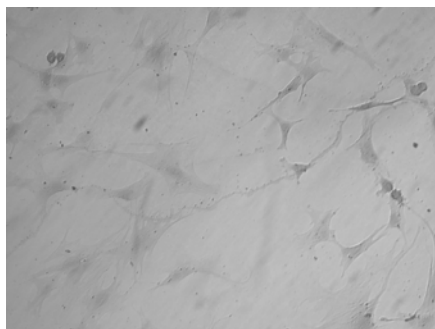


图 2 B 组的骨髓间充质干细胞(ALP 染色,  $\times 200$ )



图 3 D 组的骨髓间充质干细胞(ALP 染色,  $\times 200$ )

## 讨 论

电磁场作为一种非侵入性治疗方法,在骨科领域常被用于治疗骨折延迟愈合、骨不连及骨质疏松等,并已取得满意疗效,但对其作用机制目前尚无很明确的解释。 $\text{Ca}^{2+}$  是细胞转导过程中十分重要的第二信使。Tonini 等<sup>[1]</sup>的研究表明,在 50 Hz、低强度的电磁场刺激下,神经母细胞瘤细胞可能会通过电压门控钙通道的开放发生  $\text{Ca}^{2+}$  内流。Wang 等<sup>[2]</sup>的研究也表明,在一定强度的电磁场作用下成骨细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  的浓度是对照组的 2.3 倍。维拉帕米是一种选择性钙拮抗剂,能抑制  $\text{Ca}^{2+}$  内流,因此在曝磁的培养细胞中加入一定浓度的维拉帕米来观察其在骨髓间充质干细胞的增殖与分化过程中的作用,可以间接推论出  $\text{Ca}^{2+}$  在电磁场刺激骨髓间充质干细胞的增殖与分化过程中是否发生内流变化及这种变化的后果与意义。

骨髓间充质干细胞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<sup>[3]</sup>。ALP 是成骨细胞和成骨细胞分化的代表性酶,它作为成骨细胞表型特征之一,在体外钙化中起关键

性作用。目前普遍认为,ALP 能够水解有机磷酸酶,使局部  $\text{PO}_4^{3-}$  浓度升高,并可破坏钙化抑制剂,从而启动钙化<sup>[4]</sup>,因此可以把 ALP 作为骨髓间充质干细胞向成骨细胞转化的重要标志。本实验中 B 组在 0.8 mT 的磁场强度下刺激 6 次后,ALP 含量明显减少,说明在此强度下磁场对骨髓间充质干细胞向成骨细胞转化是起抑制作用的,然而这种抑制效应在加入维拉帕米的 D 组中明显减弱,说明维拉帕米在此强度的磁场刺激下能弱化这种抑分化作用,进一步可以推断,在此强度的电磁场刺激下骨髓间充质干细胞的  $\text{Ca}^{2+}$  内流发生变化,并且这种变化在骨髓间充质干细胞向成骨细胞方向转化的抑制过程中起部分作用。方真华等<sup>[5]</sup>的研究证明,一定强度的 50 Hz 电磁场对骨髓间充质干细胞起促增殖的作用。本实验中,在 0.8 mT 的磁场强度下刺激 6 次后,有磁无药的 B 组骨髓间充质干细胞也较无磁无药的 A 组有较大幅度增殖,但是这种促增殖作用在加入维拉帕米后几乎完全消失,因此可以推断, $\text{Ca}^{2+}$  内流的变化在此强度的电磁场促骨髓间充质干细胞增殖的过程中起主要作用。

钙调蛋白是  $\text{Ca}^{2+}$  在细胞内最为重要的靶分子,两者的复合物能活化其下游的激酶,并进一步对神经递质的合成、细胞分裂等多种功能起调节作用。Okano 等<sup>[6]</sup>的研究表明,钙调蛋白可与 20 多种酶和数种细胞膜成分相结合,通过与其结合的蛋白质相互作用,传递  $\text{Ca}^{2+}$  信号,引起细胞内反应,从而促进真核细胞的生长。因此进一步探讨钙调蛋白在电磁场对生物细胞影响中的作用很有必要。另外,虽然本实验中电磁场对骨髓间充质干细胞向成骨细胞转化是起抑制作用,但并不妨碍我们对其他窗口的尝试,从而进一步弄清电磁场对生物细胞的影响,也为以后骨科临床提供依据。

## 参 考 文 献

- 1 Tonini R, Baroni MD, Masala E, et al. Calcium protects differentiating neuroblastoma cells during 50Hz electromagnetic radiation. *Biophys J*, 2001, 81: 2580-2589.
- 2 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, 3: 259-268.
- 3 Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999, 284: 143-147.
- 4 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.
- 5 方真华, 吴华, 马伟明, 等. 50 Hz 电磁场对小鼠骨髓间充质干细胞增殖的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2004, 26: 1-4.
- 6 Okano H, Cyert MS, Ohya Y. Importance of phenylalanine residues of yeast calmodulin for target binding and activation. *J Biol Chem*, 1998, 273: 26375-26382.

(修回日期: 2005-11-18)

(本文编辑: 松 明)