

· 基础研究 ·

不同频率脉冲电磁场诱导人骨髓间充质干细胞成骨分化的研究

宋晋刚 许建中 周强 罗飞 李洪鹏

【摘要】目的 探讨脉冲电磁场 (PEMF) 诱导人骨髓间充质干细胞 (MSCs) 成骨分化的适合频率。**方法** 选用场强 1.1 mT, 频率分别为 5, 25, 50, 75, 100 和 150 Hz 的 PEMF 作用于 MSCs, 每日 30 min, 连续作用 21 d, 光镜下观察细胞形态变化, 电镜下观察细胞超微结构, 酶化学法和放免技术检测细胞的碱性磷酸酶 (ALP) 含量和骨钙素 (OC) 表达情况。**结果** 不同频率 PEMF 作用组均能诱导 MSCs 向成骨细胞分化; 从 5 ~ 50 Hz 频段, PEMF 的成骨诱导作用随着频率的增加而增强; 从 50 ~ 150 Hz 频段, PEMF 的成骨诱导作用随着频率的增加而减弱。**结论** 频率是 PEMF 诱导 MSCs 成骨分化的重要影响因素之一, 50 Hz 可能为诱导 MSCs 体外成骨分化的适合频率。

【关键词】 骨组织工程; 脉冲电磁场; 间充质干细胞; 分化; 频率

An experimental study on inducing human mesenchymal stem cells into osteoblasts by different frequencies of pulsed electromagnetic fields SONG Jin-gang, XU Jian-zhong, ZHOU Qiang, LUO Fei, LI Hong-peng. Department of Orthopedics, South-West Hospital, the 3rd Military University, Chongqing 400038, China

【Abstract】Objective To study the suitable frequency of pulsed electromagnetic fields (PEMF) for inducing human mesenchymal stem cells (MSCs) differentiation. **Methods** The third generation of human mesenchymal stem cells were irradiated by different frequencies of PEMF of 5, 25, 50, 75, 100, 150 Hz, 1.1 mT, for 30 min/d for 21 days. Morphological changes of the MSCs were observed under phase contrast microscope. The activity of Alkaline phosphatase (ALP) and the expression of osteocalcin (OC) were measured by enzymology and radioimmunity methods to evaluate MSCs differentiation. **Results** Different frequencies of PEMF employed in this study showed different effects in inducing MSCs into osteoblasts. The differentiation of MSCs was increasing when the frequency of PEMF was increased gradually from 5 Hz to 50 Hz, and then decreasing when the frequency of PEMF was increased from 50 Hz to 150 Hz. **Conclusion** Frequency of PEMF was one of the most important factors in inducing MSCs differentiation. This study indicated that 50 Hz was the suitable frequency of PEMF for inducing MSCs into osteoblast in vitro.

【Key words】 Bone tissue engineering; Pulsed electromagnetic fields; Mesenchymal stem cells; Differentiation; Frequency

骨组织工程是利用组织工程的原理与技术来促进骨细胞的增殖与分化, 生成活体骨组织, 可用于骨缺损的修复和再生, 有望解决临床修复大范围骨缺损的难题^[1]。骨髓间充质干细胞 (mesenchymal stem cell, MSCs) 是目前广泛用于构建组织工程骨的种子细胞, 经体外扩增后, 常规采用化学诱导的方法使其向成骨细胞分化, 与支架材料形成复合物, 进而构建组织工程骨。

有研究表明, 脉冲电磁场 (pulsed electromagnetic fields, PEMF) 可促进成骨细胞的增殖分化、生长因子的分泌、细胞外基质的合成, 启动骨的重建, 加速骨的

发育, 促进骨的形成等^[2,3]。因此, 研究 PEMF 对 MSCs 的成骨诱导作用对于构建组织工程骨有重要意义。本实验通过研究不同频率的 PEMF 对 MSCs 体外成骨分化的影响, 以期找出其成骨诱导的适合频率, 为新型生物反应器的研制以及进一步研究 PEMF 促进 MSCs 增殖分化的机制提供实验依据。

材料和方法

一、主要试剂与仪器

主要试剂有: Percoll 液 (Sigma, 美国)、1:1 的 DMEM/F12 (Hyclone, 美国)、胎牛血清 (Hyclone, 美国)、ALP 检测试剂盒 (南京建成生物研究所)、骨钙素放免试剂盒 (北京中国原子能研究院)。主要仪器有: UV751GD 紫外/可见分光光度计 (上海仪器总厂)、可调试脉冲电磁作用仪 (解放军后勤工程学院)。

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863) 重大专项 (No. 2003AA205020); 重庆市科技攻关项目 (No. 2003-13-6); 西南医院创新基金 (No. 2002-15)

作者单位: 400038 重庆, 第三军医大学附属西南医院骨科
通讯作者: 许建中

二、方法

1. MSCs 的分离与培养

无菌抽取 20 ~ 30 岁健康志愿者两侧髂骨骨髓 5 ~ 10 ml, 肝素抗凝。将采集到的骨髓用 1.073 g/ml Percoll 液分离, 以 $5 \times 10^5/\text{cm}^2$ 的密度接种于培养瓶内, 加含 15% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液, 置 37℃、5% CO_2 饱和湿度培养箱内常规培养。待细胞融合成单层并铺满瓶底 80% 后, 以 0.25% 胰蛋白酶消化, 按 1:3 传代, 用含 10% 胎牛血清的培养液继续培养。

2. 不同频率 PEMF 的作用

取第 3 代 MSCs 消化离心, 吹打制成细胞悬液, 分为对照组与 PEMF 作用组。PEMF 作用组又根据频率不同分为 5, 25, 50, 75, 100 和 150 Hz 作用组。每组以 $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ 的密度接种于 12 孔培养板中, 同时以 $5.0 \times 10^5/\text{ml}$ 的浓度接种于 50 ml 培养瓶中, 每瓶 2 ml。将不同频率的 PEMF 作用组置于 PEMF 的 Helmholtz 线圈中, 两线圈呈对偶式, 间距 10 cm, 经霍尔效应测磁仪测得场强均匀性及稳定性良好。通过引线将线圈置于培养箱中, 设定场强为 1.1 mT, 频率分别为 5, 25, 50, 75, 100 和 150 Hz, 作用时间每日 30 min, 连续作用 21 d。对照组细胞置于同等条件下的培养箱中, 不加 PEMF 作用。

三、观测指标

1. 形态学观察

每日在倒置相差显微镜下观察细胞形态变化及生长情况, 并于传代培养的第 1, 3, 5, 7, 14 和 21 天拍照记录。

2. 超微结构观察

MSCs 经 PEMF 作用, 细胞铺满瓶底约 80% 时消化离心, 用 PBS 洗涤 2 次, 2.5% 戊二醛固定, 不同浓度的丙酮依次脱水, 环氧树脂包埋, 行常规超薄切片, 以醋酸双氧铀-枸橼酸铅双染色, 在透射电镜下观察不同频率的 PEMF 作用组和对照组细胞的超微结构。

3. 碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 活性测定

分别于脉冲电磁场作用的第 3, 6, 9, 12 和 15 天, 取出各组 12 孔培养板, 消化离心, 收集细胞, PBS 洗涤 2 次, 调整细胞浓度至 $1 \times 10^5/\text{ml}$, 加入 0.5% Triton-X100, 4℃ 冰箱中放置 12 h。采用超声破碎细胞使其完全裂解。取 50 μl 细胞裂解液, 按试剂盒操作说明依次加入试剂, 用分光光度计在 520 nm 波长处检测其吸光度 (A) 值, 计算 ALP 活性, 并绘制成曲线。

4. 骨钙素 (osteocalcin, OC) 检测

分别于实验的第 7, 14 和 21 天, 取出各组 50 ml 培

养瓶, 经胰酶消化后, 取 1×10^6 个细胞, 离心后加入 1 ml PBS 与 Triton-X100, 按 1:1 混合, 4℃ 冰箱中过夜, 粉碎, 送西南医院核医学科, 采用放免法测定细胞内 OC 的含量。根据放射免疫竞争结合原理, 放射性标记物 ^{125}I -骨钙素和样品中所含骨钙素与有限量的骨钙素抗体竞争性结合, γ 计数器可测定沉淀物 cpm (每分钟计数, 放射性物质质量的单位), 以标准曲线计算样品 OC 的含量。

5. 钙结节染色

MSCs 经 PEMF 作用, 待培养板中出现圆形或卵圆形结节后, 取出盖玻片, 用 PBS 洗涤 3 次, 75% 酒精固定 30 min, 将固定后的细胞玻片置于茜素红染液中染色 5 ~ 10 min, 1% 醋酸溶液快速冲洗, 不同浓度的乙醇依次脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封片, 摄影记录。

四、统计学分析

应用 SPSS 11.0 统计软件, 采用单因素方差分析、F 检验进行统计学分析。组间数据采用 Tukey 法进行多重比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、倒置相差显微镜观察

第 3 代细胞接种后 4 h 完成贴壁, 24 h 后贴壁细胞开始分裂增殖。经 PEMF 连续作用 5 d 的 MSCs 较对照组密度高、体积大, 呈三角形、多角形或鳞形, 胞浆中含有较多的基质成分和颗粒状物质 (图 1, 2)。不同频率的 PEMF 作用组间细胞形态无明显差别。随培养时间的延长, 细胞逐渐汇合成铺路石状, 进而出现重叠生长, 基质堆积, 3 周后基质矿盐沉积并融合成圆形或卵圆形的钙化结节, 结节周围的细胞呈放射状分布 (图 3)。

二、超微结构观察

透射电镜下观察到经 PEMF 作用的 MSCs 较为成熟, 核浆比例小, 胞质内有丰富的细胞器, 如线粒体、粗面内质网、高尔基体等 (图 4); 而对照组的 MSCs 较为幼稚, 细胞核较大, 核浆比例大, 细胞器较少 (图 5)。

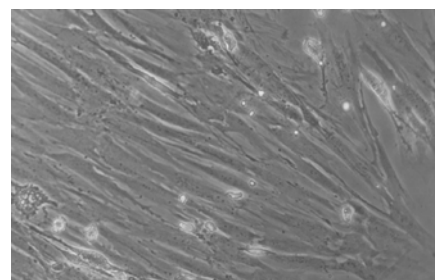


图 1 对照组 MSCs 传代培养第 5 天显微镜下观 ($\times 100$)

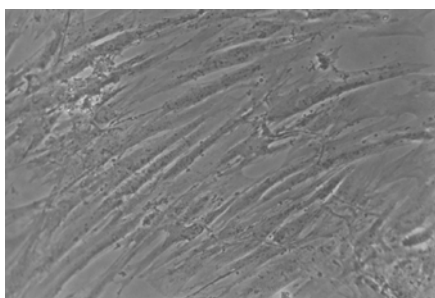


图2 经 PEMF 作用第 5 天的 MSCs 显微镜下观 (×100)

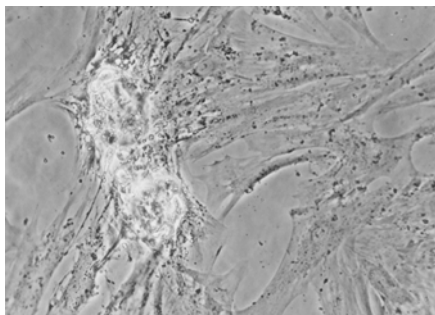


图3 经 PEMF 作用 3 周的 MSCs 显微镜下观 (×200)

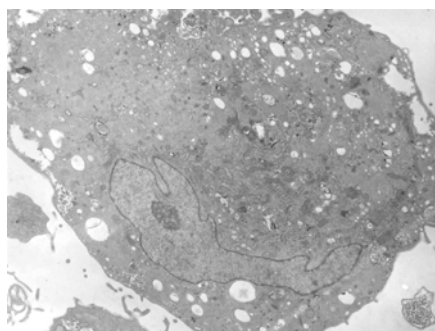


图4 经 PEMF 作用的 MSCs 超微结构观察(醋酸双氧铀-枸橼酸铅双染, ×7 000)

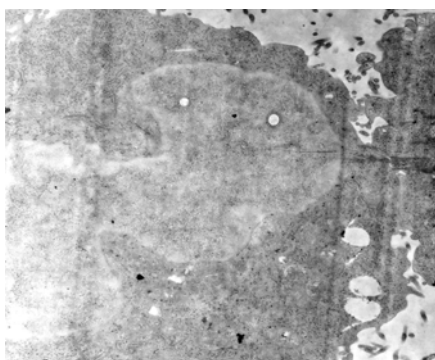


图5 对照组 MSCs 的超微结构观察(醋酸双氧铀-枸橼酸铅双染, ×7 000)

三、ALP 活性检测

将各组 MSCs ALP 活性绘制成曲线,可见 PEMF 作用第 3 天,不同频率的 PEMF 作用组 MSCs 的 ALP 活性即较对照组增强,且随着作用时间的延长,ALP 活性增强更为明显,于第 12 天达高峰,第 15 天时基本稳

定,但仍明显高于对照组水平 ($P < 0.05$);不同频率的 PEMF 作用组的 MSCs ALP 活性不一,50 Hz 作用组明显高于其它频率作用组 ($P < 0.05$,图 6)。

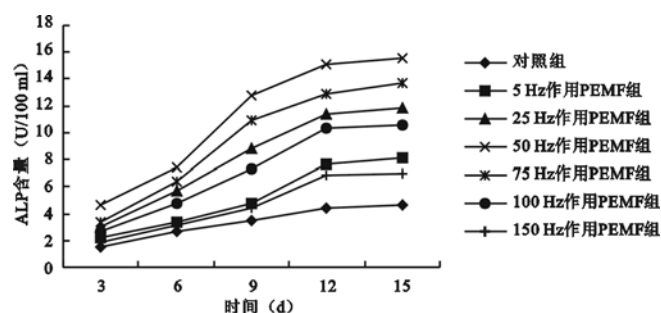


图6 各组 MSCs ALP 活性曲线

注:不同频率的 PEMF 作用组与对照组相应时间点比较, $P < 0.05$; 50 Hz 作用组与其它频率作用组相应时间点比较, $P < 0.05$

四、OC 定量检测

FEMEs 作用第 7 天,不同频率的 PEMF 作用组 MSCs 的 OC 开始出现少量表达,对照组无表达;第 14 天,不同频率的 PEMF 作用组 MSCs 的 OC 含量增高,而对照组仍无表达;第 21 天,对照组 OC 出现少量表达,不同频率的 PEMF 作用组 MSCs 的 OC 含量明显高于对照组 ($P < 0.01$)。PEMF 作用频率不同,细胞 OC 含量不一,50 Hz 作用组 OC 含量明显高于其它频率作用组 ($P < 0.05$,表 1)。

表1 不同频率 PEMF 作用 MSCs 的 OC 含量测定
(ng/ml, $\bar{x} \pm s$)

组 别	OC 含量		
	7 d	14 d	21 d
对照组	0	0	$0.99 \pm 0.13^{\#}$
PEMF 作用组			
5 Hz 作用组	0.62 ± 0.12	1.24 ± 0.16	$6.16 \pm 0.22^{* \#}$
25 Hz 作用组	0.65 ± 0.13	1.43 ± 0.23	$8.01 \pm 0.28^{* \#}$
50 Hz 作用组	0.73 ± 0.12	1.62 ± 0.24	$14.80 \pm 0.25^{*}$
75 Hz 作用组	0.72 ± 0.14	1.48 ± 0.15	$11.36 \pm 0.23^{* \#}$
100 Hz 作用组	0.71 ± 0.08	1.30 ± 0.13	$6.21 \pm 0.22^{* \#}$
150 Hz 作用组	0.61 ± 0.07	1.18 ± 0.16	$5.25 \pm 0.25^{* \#}$

注:与对照组比较, $^{*} P < 0.01$;与 50 Hz 作用组比较, $^{\#} P < 0.05$

五、茜素红钙结节染色

MSCs 经 PEMF 作用 21 d 后,基质矿盐沉积并融合成圆形或卵圆形的钙化结节,结节周围的细胞呈放射状分布,茜素红钙结节染色呈阳性,可见橘红色钙结节。对照组钙结节染色呈阴性。

讨 论

构建理想的组织工程骨,首先要有生物学特性较佳的种子细胞。间充质干细胞来源于中胚层,属于成体干细胞,具有很强的增殖能力和多向分化潜能^[4],是目前常用的种子细胞,其成骨分化作用受细胞因子、

激素、物理因子等多种因素的影响。

PEMF 作为一种非侵入性疗法在骨折延迟愈合及骨不连的治疗中均取得了满意疗效,现在已经被用于治疗先天性骨缺损、骨坏死、骨移植及脊柱椎体融合术后等骨科疾病。研究表明,PEMF 能广泛地介导细胞外基质的合成,增强成骨细胞 ALP 的表达,促进 OC 及胶原的合成与分泌^[5],而 MSCs 又是骨修复过程中形成成骨细胞的重要始祖细胞之一,因此我们推测 PEMF 能够对 MSCs 产生类似的生物学效应,并促进成骨。这一推论在本实验室的前期工作中已得到了证实^[6,7]。

在电磁场的各项参数中,频率对电磁场所产生的生物学效应有较大的影响。有研究认为,电磁场产生生物学效应的频率范围大约在 1 ~ 100 Hz^[8]。骨骼系统的内生性活动频率范围在步态频率(1 ~ 5 Hz)到肌肉收缩的动力频率(10 ~ 100 Hz)间变化。Lee 等^[9]认为,最有效的电磁场频率范围应接近机体正常功能活动频率。我们参考 Bassett 等^[10]关于不同参数的 PEMF 对骨折愈合影响的报道及相关文献,在 1 ~ 150 Hz 频率范围间选择 5, 25, 50, 75, 100 和 150 Hz 频段,研究不同频率 PEMF 作用对 MSCs 向成骨细胞分化的作用,以期找出诱导 MSCs 成骨分化的适合频率。

本研究结果显示,倒置相差显微镜下观察到经 PEMF 作用的 MSCs 体积明显较对照组大,呈三角形、多角形或鳞形,细胞内颗粒状物质增多,基质分泌旺盛。透射电镜观察到,经 PEMF 作用的 MSCs 较为成熟,分化程度较高;而对照组的 MSCs 较为幼稚,分化程度低。3 周后形成圆形或卵圆形的矿化小结,经茜素红染色为阳性。ALP 是成骨细胞的早期标志酶,在成骨过程中水解磷酸酯,为羟基磷灰石的沉积提供必要的磷酸,有利于成骨,可标志成骨分化的开始^[11];OC 是成骨细胞特异性合成和分泌的一种非胶原蛋白,在钙离子存在的条件下,与羟基磷灰石结合并稳定其构象,是向成骨细胞分化的最具特征性的标志物^[12]。因此,ALP 和 OC 是反映成骨细胞在体外分化为成熟骨细胞及基质钙化的两个重要指标^[13]。本研究同时发现,不同频率的 PEMF 作用组细胞第 3 日即可检测到 ALP 的表达,并随着时间延长,表达水平逐渐增高,提示细胞的成骨分化已经开始;1 周后出现 OC 的表达,3 周后达到较高水平,与矿化小结出现的时间相一致。而对照组 ALP 活性始终很低,OC 几乎没有表达。这证明 MSCs 经 PEMF 作用后,可向成骨细胞分化。不同频率的 PEMF 作用组间比较发现,PEMF 诱导 MSCs

成骨分化的效果与作用频率有关:从 5 ~ 50 Hz 频段,随着频率的增加,其成骨诱导作用逐渐增强;从 50 ~ 150 Hz 频段,随着频率的增加,其成骨诱导作用逐渐减弱。

我们推测,频率是 PEMF 成骨诱导的重要影响因素之一,PEMF 的作用频率不同,对细胞的成骨诱导作用不一,50 Hz 可能为诱导体外 MSCs 向成骨细胞分化的适合频率。关于不同频率的 PEMF 促进 MSCs 成骨的生物学机制,还有待日后进一步深入探讨。

参 考 文 献

- 1 Robert F. Tissue engineers build new bone. *Science*, 2000, 289: 1498-1500.
- 2 方真华, 吴华, 马伟明. 50Hz 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.
- 3 Diniz P, Shomura K, Soejima K. Effects of pulsed electromagnetic field (PEMF) stimulation on bone tissue like formation are dependent on the maturation stages of the osteoblasts. *Bioelectromagnetics*, 2002, 23: 398-405.
- 4 Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999, 284: 143-147.
- 5 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.
- 6 赵敏, 许建中, 周强. 脉冲电磁场促进人骨髓间充质干细胞成骨的研究. *中国矫形外科*, 2004, 12: 439-443.
- 7 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.
- 8 Muehsam DJ, Pilla AA. The sensitivity of cells and tissues to exogenous fields; effects of target system initial state. *Bioelectrochem Bioenerg*, 1999, 48: 35-42.
- 9 Lee JH, McLeod KJ. Morphologic responses of osteoblast-like cells in monolayer culture to ELF electromagnetic fields. *Bioelectromagnetics*, 2000, 21: 129-136.
- 10 Bassett CA, Valdes MG, Hernandez E. Modification of fracture repair with selected pulsing electromagnetic fields. *J Bone Joint Surg*, 1982, 64: 882-892.
- 11 Aubin JE, Liu F, Malaval L, et al. Osteoblast and chondroblast differentiation. *Bone*, 1995, 17: 77-83.
- 12 Levy MM, Joyner CJ, Virdi AS, et al. Osteoprogenitor cells of mature human skeletal muscle tissue; an in vitro study. *Bone*, 2001, 29: 317-322.
- 13 Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, et al. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro; reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol*, 1990, 143: 420-430.

(修回日期: 2005-01-20)

(本文编辑: 吴 倩)