

· 基础研究 ·

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

赵敏 许建中 周强 王序全 朱灏 秦辉 单建林

【摘要】目的 观察脉冲电磁场 (PEMFs) 对人骨髓间充质干细胞 (hMSCs) 向成骨细胞分化的影响。**方法** 分离并培养 hMSCs, 取第 3 代细胞, 分为对照组与处理组, 处理组细胞接受频率 12 Hz、场强 1.1 mT 的 PEMFs 刺激, 每日 8 h; 对照组细胞不接受 PEMFs 刺激。应用透射电镜观察 2 组细胞超微结构, 采用碱性磷酸酶染色、骨钙素免疫组织化学染色、四环素荧光标记等方法进行观测。**结果** 细胞培养 5~6 d 即可传代, 经 PEMFs 连续刺激 3 d 后, hMSCs 细胞形态发生变化, 3 周后聚集成细胞钙化结节。透射电镜下观察显示: 细胞比较成熟, 内质网扩张, 其碱性磷酸酶染色、骨钙素免疫组织化学染色和四环素荧光标记均为阳性。**结论** hMSCs 经特定频率和场强的 PEMFs 体外刺激后, 可向成骨细胞分化, 符合成骨细胞的形态学和生物学特性, 为体外构建组织工程化骨提供自体种子细胞。

【关键词】 脉冲电磁场; 骨髓间充质干细胞; 细胞分化; 成骨细胞

The effect of pulsed electromagnetic fields on the cellular differentiation from human mesenchymal stem cells to osteoblast ZHAO Min*, XU Jian-zhong, ZHOU Qiang, WANG Xu-quan, ZHU Hao, QIN Hui, SHAN Jian-lin.

* Orthopedic Research Center of Chinese PLA, Department of Orthopedics, Southwest Hospital, the 3rd Military Medical University, Chongqing 400038, China

【Abstract】Objective To observe the effect of pulsed electromagnetic fields (PEMFs) on the cellular differentiation from human mesenchymal stem cells (hMSCs) to osteoblast. **Methods** We isolated and cultured the hMSCs, then divided the passage three cells into the control group and the treatment group. The treatment group was stimulated by the PEMFs (12Hz pulse burst, 1.1mT peak, 8h/day). Transmission electron micrograph, cytochemical staining for alkaline phosphatase (ALP), cytochemical staining for osteocalcin expression and tetracycline fluorescence label were applied to measure the hMSCs differentiation. **Results** PEMFs treatment accelerated cellular differentiation significantly, hMSCs could be passed in 6 or 5 days, after 3 days of exposure. The cellular form was changed and they gradually congregated into a mineralized matrix in 3 weeks. A transmission electron micrograph of the third passage MSCs cultured with exposure to PEMFs showed expanded endoplasmic reticulum. Cytochemical staining for ALP and osteocalcin expression and tetracycline fluorescence label were positive. **Conclusion** PEMFs could accelerate the differentiation of hMSCs to osteoblast, which serves as the autogenous seeding cells for in vitro construction of tissue engineering bone.

【Key words】 Pulsed electromagnetic fields; Mesenchymal stem cells; Cellular differentiation; Osteoblast

人骨髓间充质干细胞 (human mesenchymal stem cells, hMSCs) 具有良好的成骨细胞分化潜能和成骨活性, 被认为是骨组织工程中种子细胞的最佳选择^[1,2], 如何定向诱导其成骨分化是解决骨组织工程中种子细胞来源的一个重要前提。关于脉冲电磁场 (pulsed electromagnetic fields, PEMFs) 对成骨细胞的刺激作用, 国内、外学者进行了大量的研究, 发现特定频率和场强

的 PEMFs 有利于细胞的增殖和分化, 并可刺激骨局部因子的产生, 加速骨基质矿化^[3-5]。但关于 PEMFs 诱导 hMSCs 向成骨细胞分化的研究尚未见报道。hMSCs 是骨修复中形成骨的重要的前祖细胞之一, 我们推测 PEMFs 刺激很可能对 hMSCs 产生一系列的生物学作用, 并促进骨形成。本实验通过观察 PEMFs 对 hMSCs 向成骨细胞分化的诱导作用, 旨在为临床上用于修复骨缺损的组织工程骨所需的种子细胞的来源提供新的思路。

材料与方法

一、主要仪器与材料

脉冲电磁场发生器 (中国医学科学院生物工程研

基金项目: 国家 863 计划重大专题项目 (No. 2003AA205002); 重庆市重点科技攻关基金资助项目 (No. 2003-13-6); 第三军医大学校科研基金资助项目 (No. XG200327); 2002 西南医院科技创新基金资助项目

作者单位: 400038 重庆, 第三军医大学附属西南医院全军矫形外科中心 (赵敏现工作单位: 解放军一八四医院骨科)

通讯作者: 许建中

究所研制)、Percoll 液(美国 Sigma 公司)、DMEM/F12 培养液(美国 Amersco 公司)、兔抗人骨钙素抗体(北京产)、二步法免疫组织化学检测试剂盒(北京产)、DAB 显色试剂盒(武汉产)、Philip TECNAI-10 型透射电镜(荷兰产)。

二、培养方法

1. hMSCs 的分离与原代培养:无菌抽取两侧髂骨骨髓 12 ml(骨髓由第三军医大学附属西南医院骨科患者捐献),抗凝,与 12 ml DMEM/F12 培养液充分混匀,用 1.073 g/ml Percoll 液分离。以 2 000 r/min 离心 20 min,吸取交界面云雾状有核细胞层,加入 D-Hanks 液 10 ml 反复吹打漂洗,1 500 r/min 离心 6 min,弃去上清液。在沉淀中加入含有 15% 胎牛血清的 DMEM/F12 原代培养液,吹打成单细胞悬液,计数有核细胞。以 3×10^5 个/cm² 的密度接种于培养瓶,置于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度孵箱内常规培养,48 h 后首次全量换液,弃去大量未贴壁细胞,以后隔日换液。

2. hMSCs 的传代培养:待细胞融合为单层后进行消化传代。弃去原代培养液,加入 0.25% 胰蛋白酶和 0.01% EDTA 消化液 4 ml,37℃ 下密闭消化 1~3 min 后,加入等量常规传代细胞培养液终止消化。以 1 000 r/min 离心 6 min,弃上清液,用 D-Hanks 液漂洗,加入适量的常规传代培养液,充分吹打计数。以 1×10^4 个/cm² 的密度传代培养,所测生长曲线稳定后,传至第 3 代。

三、分组与 PEMFs 刺激

第 3 代 hMSCs 经消化培养后制成细胞悬液,分为对照组和处理组。将处理组置于脉冲电磁场的 Helmholtz 线圈中,2 个线圈呈对偶式,间距 10 cm。线圈通过引线置于 CO₂ 孵箱中(采用霍尔效应测磁仪测得孵箱场强均匀性及稳定性良好),频率 12 Hz,场强 1.1 mT,每日持续刺激 8 h。对照组细胞置于不加脉冲电磁场,其余条件相同的孵箱中孵育。

四、hMSCs 的生物学特性检测

1. 活细胞动态观察:显微镜下观察细胞的形态变化和骨钙结节的形成情况,台盼蓝染色检测细胞活力。

2. 超微结构观察:处理组细胞经 PEMFs 连续刺激若干天,达到 80% 融合时进行消化离心,经 PBS 漂洗后收集细胞,弃去上清液,加入预冷的 3% 戊二醛固定,常规电镜包埋,超薄切片,于 Philip TECNAI-10 型透射电镜下观察。对照组同时进行观察。

3. 细胞碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)染色:取处理组细胞,接种于预置盖玻片的 6 孔培养板,经 PEMFs 连续刺激 6 d 后取出培养皿中盖玻片,用 PBS 洗 3 次,采用钙钴法(Gomori 法)染色。阳性细胞呈棕黑色。对照组不加脉冲电磁场,余操作方法相同。

4. 骨钙素的免疫组织化学染色:取处理组细胞,接种于预置盖玻片的 6 孔培养板,经 PEMFs 连续刺激 12 d 后取出培养皿中盖玻片,用 PBS 洗 3 次,95% 酒精固定 20 min,按二步法免疫组织化学检测试剂盒说明书操作,苏木素复染,盐酸酒精分色。阳性细胞胞浆呈棕黄色,胞核呈淡蓝色。对照组不给予脉冲电磁场,其余操作方法相同。

5. 四环素荧光标记:取处理组细胞,接种于预置盖玻片的 6 孔培养板,以 PEMFs 刺激,待培养板中出现圆形或卵圆形结节后,用 0.1 mg/ml 四环素培养液培养 30 min 后更换常规传代培养液,30 min 后取出盖玻片,以 PBS 洗 3 次,75% 酒精固定 30 min,荧光显微镜下观察,摄像记录。

结 果

一、原代 hMSCs 形态

原代培养的 hMSCs 经 24~48 h 开始贴壁生长,细胞逐渐变为短梭形,胞核较大;3~4 d 细胞呈集落分布;5~6 d 细胞增殖明显;7~9 d 排列呈漩涡状;10~12 d 融合成单层。随培养时间的延长,并未出现接触抑制。

二、传代培养的 hMSCs 形态

原代细胞消化传代接种后,2~4 h 开始贴壁、铺展,细胞呈梭形,形态单一,均匀生长,体积较原代细胞大;5~6 d 细胞即可铺满瓶底,排列规则。

三、PEMFs 刺激后 hMSCs 形态

传代细胞给予 PEMFs 刺激后,生长加快,3 d 后细胞逐渐增大,变为多角形或鳞形。台盼蓝染色示细胞活力达 99% 以上。随着培养时间的延长,细胞逐渐汇合,呈铺路石状(图 1);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 2)。

四、超微结构观察

处理组的 hMSCs 具有成熟细胞的表现,胞浆丰富,胞浆内质网扩张成池,高尔基复合体发达,出现髓鞘样小体,核浆比例小,分泌功能旺盛(图 3)。对照组的 hMSCs 为较幼稚的细胞,细胞核较大,胞浆小,核浆比例大,核仁明显,以常染色质为主(图 4)。

五、细胞 ALP 染色观察

处理组 hMSCs ALP 染色呈强阳性,网格计数法阳性率达 85.67%,胞浆呈棕黑色,并有黑色颗粒沉淀(图 5)。对照组 hMSCs 染色呈阴性。

六、骨钙素免疫组织化学染色观察

处理组 hMSCs 骨钙素免疫组织化学染色呈明显强阳性,胞浆内出现大量黄色颗粒(图 6)。对照组 hMSCs 同期染色,胞浆内未见黄色颗粒(图 7)。

七、四环素荧光标记观察

第 3 代 hMSCs 经 PEMFs 刺激 21 d 后开始出现结节,并逐渐增大,呈由透明到不透明的黑色团块。四环素荧光标记后,结节在荧光显微镜下呈明亮的金黄色荧光(图 8)。

讨 论

骨组织工程学的主要研究之一,是寻找可使种子细胞生长成为有功能组织的最佳环境,从而培养人工骨组织,为骨组织缺损的修复提供材料。作为骨组织工程的最佳种子细胞, hMSCs 向成骨细胞定向诱导分化的数量和功能状态是影响细胞复合体成骨效果的主要因素之一。PEMFs 作为一种安全、简便、有效的治疗手段已广泛应用于临床,且低频、低场强的 PEMFs 不会导致基因突变及染色体畸变。PEMFs 可启动骨的重建,加速骨的发育。应用 PEMFs 刺激体外培养的成骨细胞,可促进其增殖与分化,并增强生长因子、细胞外基质的合成与分泌,因此我们认为将 PEMFs 运用于骨组织工程具有重要意义。

本实验中,我们应用频率为 12 Hz、场强为 1.1 mT 的 PEMFs 刺激 hMSCs,每日 8 h,连续刺激 6 d,能明显促进 hMSCs 向成骨细胞分化。显微镜下观察到,传代细胞给予 PEMFs 刺激后生长加快,细胞逐渐增大,变为多角形或鳞形,随着时间的推移汇合为铺路石状,出现重叠生长、基质堆积,进而出现矿盐沉积并融合成圆形或卵圆形的钙化结节。四环素是新生骨组织的特异性标志物,钙化结节经四环素荧光标记后呈阳性,在荧光显微镜下有明亮的金黄色荧光^[6],证明这些结节是新生骨组织,提示 hMSCs 经 PEMFs 刺激后具有成骨能力。

细胞内大量的粗面内质网、丰富的高尔基复合体是细胞分泌功能旺盛的标志,说明细胞处于良好的功能状态,粗面内质网还可反映细胞的分化程度。本实验采用透射电镜观察细胞的超微结构,发现对照组的 hMSCs 为较幼稚的细胞,其细胞核较大,胞浆少,核浆比例大,核仁明显,以常染色质为主;而处理组的 hMSCs 具有成熟细胞的表现,胞浆丰富,胞浆内质网扩张成池,高尔基器发达,核浆比例小,细胞外基质分泌旺盛,并有钙盐沉积,均符合成骨细胞的电镜下特征^[7]。

骨钙素和 ALP 是成骨细胞分化成熟的重要标志之一,也是参与骨组织形成、代谢及再生的重要物质。骨钙素是目前唯一已知的由成骨细胞产生的骨特异性蛋白,又称骨玻璃蛋白,与成骨细胞的数目、矿物质的沉积呈正相关,可反映骨形成的活性,出现在骨细胞分化的终末阶段^[8]。ALP 能水解有机磷酸酶,使局部磷酸根浓度增高,还可破坏钙化抑制剂,从而启动钙化过程^[9]。本实验中,处理组 hMSCs 的骨钙素免疫组织化学染色和 ALP 染色均为强阳性,而对照组为阴性,证实了经 PEMFs 作用后的 hMSCs 具有成骨活性,即有相当一部分 hMSCs 已经诱导成为成骨细胞。

MSCs 的成骨分化受到细胞因子、激素、物理作用等多方面因素的影响。近年来,许多学者从不同的角度对 MSCs 的成骨分化调控进行了深入研究。Uludag 等^[10]的研究证实,骨形态形成蛋白(bone morphogenic protein, BMP)移植可提高 IGF-1、IGF-2、TGF- β 等的表达,从而刺激 MSCs 向成骨方向分化。有文献报道,特定参数的 PEMFs 作用能促进成骨细胞增殖,并能诱导其产生各种骨生长因子^[5,11,12]。而本实验证实,PEMFs 能明显促进 hMSCs 的成骨分化。至于 PEMFs

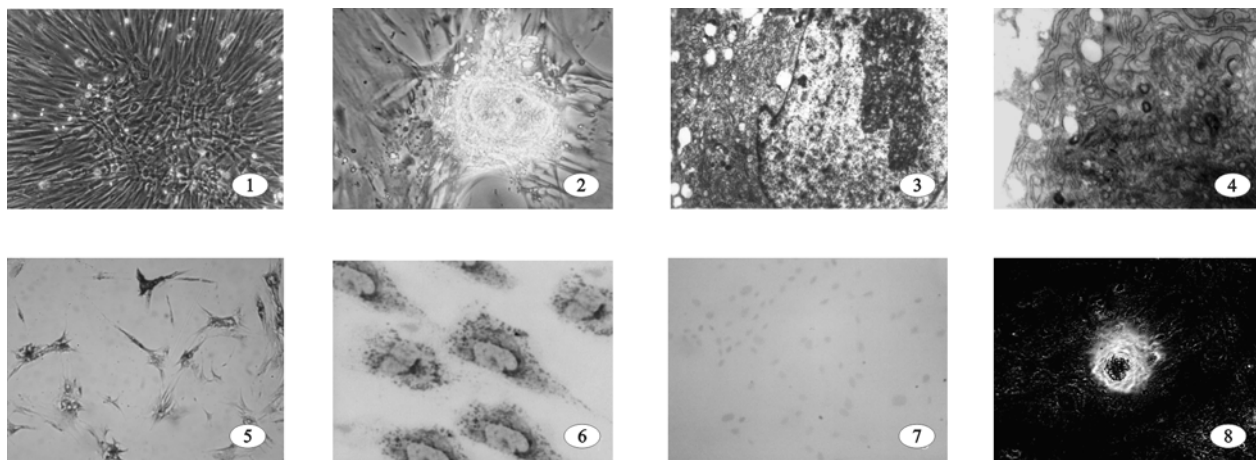


图 1 第 3 代 hMSCs 受 PEMFs 刺激后 8 d 汇合成铺路石状($\times 100$); 图 2 第 3 代 hMSCs 受 PEMFs 刺激后 21 d 出现矿化结节($\times 400$); 图 3 处理组的 hMSCs 内质网扩张($\times 7\,000$); 图 4 对照组 hMSCs 电镜下观($\times 7\,000$); 图 5 处理组 ALP 染色阳性($\times 100$)(注:胞质内有灰黑色颗粒或块状沉淀); 图 6 处理组 hMSCs 骨钙素免疫组织化学染色阳性($\times 400$)(注:胞浆内出现大量棕黄色颗粒); 图 7 对照组骨钙素免疫组织化学染色阴性($\times 100$); 图 8 第 3 代 hMSCs 受 PEMFs 刺激 21 d 荧光显微镜下观(四环素荧光标记, $\times 400$)(注:细胞钙化结节呈明亮的黄色荧光)

能否在促进 hMSCs 分化的同时诱导 hMSCs 产生 BMP、PDGF、IGF 等骨生长因子,从而进一步促进 hMSCs 的成骨分化,有待于我们日后进一步研究。

致谢:特此感谢中国医学科学院天津生物工程研究所屈承端教授对本研究的支持与帮助!

参 考 文 献

- 1 Bruder SP, Kurth AA, Shea M, et al. Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*, 1998, 16:155-162.
- 2 Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med*, 2001, 226:507-520.
- 3 Inoue N, Ohnishi I, Chen D, et al. Effect of pulsed electromagnetic fields (PEMF) on late-phase osteotomy gap healing in a canine tibial model. *J Orthop Res*, 2002, 20:1106-1114.
- 4 Diniz P, Shomura K, Soejima K, et al. Effects of pulsed electromagnetic field (PEMF) stimulation on bone tissue like formation are dependent on the maturation stages of the osteoblasts. *J Bioelectromagnetics*, 2002, 23:398-405.
- 5 Torricelli P, Fini M, Giavaresi G, et al. Biomimetic PMMA-based bone substitutes: a comparative in vitro evaluation of the effects of pulsed electromagnetic field exposure. *J Biomed Mater Res*, 2003, 64:182-188.

- 6 Lillio RD, Fullmer HM. Histopathologic technique and practical histochemistry. 4th ed. New York: McGraw Hill, 1976. 798-804.
- 7 Rodan GA, Rodan SB. The cell of bone. In: Riggs BL, Melton LJ, eds. Osteoporosis: etiology, diagnosis, and management. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Raven, 1995. 205.
- 8 Pero-Antic A, Nastic-Miric D, Milikic V, et al. Serum osteocalcin in children with chronic renal insufficiency. *Srp Arh Celok Lek*, 1996, 124:227-231.
- 9 刘侠, 乐以伦. 碱性磷酸酶与钙化. *中国生物医学工程学报*, 1997, 16:71-82.
- 10 Uludag HD, Augusta D, Golden J, et al. Implantation of recombinant human bone morphogenetic proteins with biomaterial carriers: a correlation between protein pharmacokinetics and osteoinduction in the rat ectopic mode. *J Biomed Mater Res*, 2000, 50:227-238.
- 11 Kveiborg M, Flyvbjerg A, Eriksen EF, et al. Transforming growth factor-beta stimulates the production of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-binding protein-3 in human bone marrow stromal osteoblast progenitors. *J Endocrinol*, 2001, 169:549-561.
- 12 Lohmann CH, Schwartz Z, Liu Y, et al. Pulsed electromagnetic fields affect phenotype and connexin 43 protein expression in MLO-Y4 osteocyte-like cells and ROS 17/2.8 osteoblast-like cells. *J Orthop Res*, 2003, 21:326-334.

(修回日期:2004-05-27)

(本文编辑:吴倩)

· 个案报道 ·

微波辅助治疗外伤后胰腺漏液 1 例

董雪梅

一、病例介绍

患者男, 24 岁, 2004 年 4 月 24 日因车祸后左上腹疼痛入院, CT 检查显示脾脏挫裂伤, 立即行剖腹探查术。术中见脾下极膈面有长约 4.0 cm 的裂伤, 脏面有长约 6.0 cm 的裂口通向脾门, 为贯通伤, 内有凝血块, 伤面有活动性出血; 胰尾部被膜有长约 4.0 cm 裂伤伤口。行脾切除术、自体脾移植术、胰腺被膜修补术, 术中放置脾窝引流管及盆腔引流管, 术后立即给予抗菌素及补液治疗。

术后第 10 天取脾窝引流液查淀粉酶, 为 60 苏氏 U/dl (正常值为 80~180 苏氏 U/dl); 第 12 天采用速滤法复查淀粉酶, 为 1 080 U/L (正常值为 0~96 U/L)。术后第 3 周做 B 超检查, 可见胰腺前方有 4.0 cm × 1.3 cm 及 4.4 cm × 1.8 cm 的异常回声区。

二、微波治疗方法

术后第 4 周行微波治疗, 采用 MH-A 型微波热疗机, 频率 915 MHz, 辐射器为直径 16 cm、高 16 cm 的圆柱体, 以左锁骨中线与肋缘交点为中心, 距皮肤约 2~5 cm, 波长为 0.33 m, 输出功率为 50~70 W, 治疗剂量以患者感觉温热为宜。治疗每次 30 min, 每日 1 次, 共 10 次。微波治疗期间除继续应用抗菌素治疗外, 未行其它治疗。

三、结果

微波治疗期间患者脾窝引流液逐渐减少, 每日平均约 3 ml。治疗 5 次后复查 B 超, 胰尾部可见 3.0 cm × 0.8 cm 大小

的液性暗区; 速滤法复查引流液淀粉酶, 为 49 U/L。10 次治疗结束后再次复查 B 超, 未见异常, 次日拔除引流管。观察 1 周后痊愈出院。

四、讨论

由于当前交通事故频发, 国内胰腺外伤的比率已达腹部外伤的 2%^[1]。胰腺是人体主要的消化腺之一, 其分泌的胰液中含有消化蛋白、脂肪及碳水化合物的各种胰酶。胰外伤后, 胰液外渗, 当胰蛋白酶被激活后, 可进而激活各种胰消化酶原, 破坏组织, 导致严重的后果。我们采用微波治疗外伤后胰腺漏液患者 1 例, 疗效较好。笔者认为, 915 MHz 微波波段属于分米波, 作用较深, 可使受辐射作用的局部小动脉和毛细血管扩张, 从而促进局部组织的血液和淋巴循环, 增强组织代谢, 提高组织再生和修复能力; 同时还可增强网状内皮系统功能, 使炎性组织中钙离子增加, 钾离子减少, 起到消炎的作用。应该注意的是, 采用微波进行腹腔治疗尤其是患者有渗漏液时, 治疗剂量不宜过大, 温度不宜过高, 以免造成脏器损害。总之, 微波治疗胰腺漏液简单、方便、经济、无痛苦, 是较好的治疗方法之一。

参 考 文 献

- 1 石美鑫, 主编. 实用外科学. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002. 695.

(收稿日期:2004-09-25)

(本文编辑:吴倩)