

· 基础研究 ·

不同频率低强度脉冲电磁场对表皮干细胞增殖的影响

张鸣生 何斌 朱洪翔 吴博 庞文君 李东风 林秋雄 刘旋安 徐达传

【摘要】目的 观察不同频率的低强度脉冲电磁场 (LIPEMF) 对皮肤表皮干细胞 (ESC) 增殖作用的影响。**方法** 取人包皮皮片体外分离培养的第 2 代 ESC, 分为对照组与 LIPEMF 组, LIPEMF 组又根据不同刺激频率分为 1、10 和 50 Hz 组。对各组细胞进行细胞克隆计数, 计算克隆形成率 (CFE), 采用 MTT 法检测细胞增殖水平。**结果** 不同频率 LIPEMF 的刺激均能促进 ESC 增殖, 频率不同, 促增殖效应不一, 50 Hz 组作用效果最为明显, 与对照组比较, 生长曲线明显上移。ESC β_1 整合素和角蛋白 19 染色结果呈阳性。不同频率的 LIPEMF 组 ESC 的 CFE 明显高于对照组 ($P < 0.01$), 50 Hz 组的细胞 CFE 明显高于 1 Hz 组和 10 Hz 组 ($P < 0.01$)。**结论** LIPEMF 能明显促进 ESC 增殖, 频率是影响 ESC 增殖的重要因素之一。

【关键词】 表皮干细胞; 脉冲电磁场

The effects of a low intensity pulsed electromagnetic field on the proliferation of epidermal stem cells

ZHANG Ming-sheng*, HE Bin, ZHU Hong-xiang, WU Bo, PANG Wen-jun, LI Dong-feng, LIN Qiu-xiong, LIU Xuan-an, XU Da-chuan. * Institute of Clinic Anatomy, Nanfang Medical University, Guangzhou 510515, China

【Abstract】Objective To observe the effects of a low intensity pulsed electromagnetic field (LIPEMF) on the differentiation and regulation of skin epidermal stem cells (ESC). **Methods** Prepuces excised from healthy, young volunteers were used to culture ESC in vitro, identified by integrin β_1 and keratin 19 (K_{19}). The LIPEMF therapy group was divided into three sub-groups to receive 1 Hz, 10 Hz and 50 Hz fields. The ratio of clone cells formed was calculated. MTT was used to detect the growth curve of the cells. **Results** The LIPEMF stimulated the proliferation of ESC and the proliferation was different in every therapy group. The proliferation was highest in the 50 Hz group, who's growth curves were anterior to and higher than those of the control group. The integrin β_1 and K_{19} dying results showed that ESC growth was positive and that the formation of ESC clone cells was faster in every therapy group than in the control group. **Conclusion** LIPEMF can stimulate the proliferation of ESC. The frequency is an important determinant of the proliferation rate.

【Key words】 Epidermal stem cell; Pulsed electromagnetic field

正常情况下, 皮肤外层的表皮终身不断自我更新, 其基底层表皮干细胞 (epidermal stem cells, ESC) 按一定的规律进行增殖分化以取代外层终末分化细胞, 从而进行表皮的自我更新并保持皮肤正常的结构与功能^[1,2]。因此, ESC 在皮肤再生过程中有着举足轻重的作用, 被视为表皮及其附件如毛囊和汗腺等再生的基地。人出生后, 由于各种原因所致的皮肤损伤常不能达到解剖结构与功能的完全修复, 其主要原因之一在于人们对皮肤表皮细胞增殖、分化与再生机制尚未完全了解, 临床上也缺乏有效的促进表皮细胞增殖分化与再生修复的手段。本研究旨在探讨人 ESC 在体

外分选和培养的可能性, 以及不同频率的低强度脉冲电磁场 (low intensive pulsed electromagnetic fields, LIPEMF) 促进人 ESC 增殖的作用。

材料和方法

一、ESC 的培养方法

1. 表皮细胞的分离: 在无菌条件下取包皮环切术切除的包皮, 用含青霉素和链霉素的 PBS 缓冲液反复冲洗, 去除血渍, 室温下浸泡 30 min, 剔除皮下疏松组织, 剪成 0.5 mm × 0.5 mm 大小的皮条。将皮条放入 0.25% 的中性蛋白酶 (Gibco 公司生产) 溶液中, 密闭于 37℃ 培养箱中消化约 90 min; 取出皮条后用 PBS 冲洗 2 次, 轻轻撕下表皮层, 剪成 1 mm × 1 mm 大小的碎块; 将碎块放入 0.25% 的胰酶 (Gibco 公司生产) 中, 在 37℃ 培养箱中消化约 10 min, 用吸管轻轻吹打至表皮块成半透明; 以含 15% 胎牛血清的角质细胞培养液 (Gibco 公司生产) 中止消化。经

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (No. 5001279); 广东省科技攻关资助项目 (No. 2005B34001007)

作者单位: 510515 广州, 南方医科大学临床解剖研究所 (张鸣生、徐达传); 广东省人民医院 (张鸣生、何斌、朱洪翔、吴博、庞文君、李东风、林秋雄、刘旋安)

通讯作者: 徐达传

200 目筛过滤后收集细胞悬液,以 1 500 转/min 离心 5 min (离心半径 17 cm),弃上清液,获得表皮细胞^[3-5]。

2. 表皮细胞的培养:表皮细胞用角质细胞培养液重悬,移入预先铺有 100 $\mu\text{g/ml}$ IV 型胶原的培养瓶中,在 37℃、5% CO_2 条件下培养,3 d 换液 1 次。

3. ESC 的分选:表皮细胞达到 60% ~ 80% 融合时,以 0.25% 胰酶消化成为单细胞,离心,重悬,种植于铺有 IV 型胶原的培养瓶中,在 37℃ 条件下培养 20 min,去除未贴壁细胞。贴壁细胞为干细胞。

二、LIPEMF 作用方法

取第 2 代 ESC 消化、离心、吹打,制成细胞悬液,以 1×10^4 个/ cm^2 的密度接种于 50 ml 培养瓶中,并按 200 个/孔接种于 96 孔培养板中,分为对照组与 LIPEMF 组。LIPEMF 组又根据刺激频率的不同分为 1, 10 和 50 Hz 组。将不同频率的 LIPEMF 组置于脉冲电磁场的 Helmholtz 线圈中,两线圈呈对偶式,间距 10 cm。通过引线将线圈置于培养箱中,设定场强为 5 mT,每日作用时间为 30 min,连续作用 12 d。对照组细胞置于同等条件的培养箱中,不加 LIPEMF。

三、免疫组织化学染色

于分组前取 ESC 及角质细胞做细胞玻片,用纯丙酮在室温下固定 20 min,用链菌素亲生物素-过氧化物酶 (streptavidin-peroxidase, S-P) 法进行 β_1 整合素和角蛋白 19 (keratin 19, K_{19}) 免疫组化染色鉴定。

四、形态学观察

取第 2 代培养至汇合的细胞,用 0.25% 的胰酶消化,制备细胞悬液,每日在倒置相差显微镜下观察各组细胞的形态变化和生长情况。

五、克隆形成率 (colony forming efficiency, CFE) 的计算

将各组的 96 孔培养板细胞置于 37℃、5% CO_2 的孵箱中培养至 2 周,于显微镜下观察克隆细胞并计数,以克隆细胞数 ≥ 32 (2^5) 为 1 个克隆。采用以下公式计算 CFE^[3]: $\text{CFE} = \text{细胞克隆数} / \text{接种细胞数} \times 100\%$ 。

六、四甲基偶氮唑盐比色法 (MTT 法) 检测细胞增殖水平

每日于 LIPEMF 刺激结束后,取各组 96 孔培养板细胞,每板分别隔日取 6 孔,每孔加入 5 mg/ml 的 MTT 溶液 20 μl ,于 37℃ 下避光 4 h,吸取上清液后每孔再加入二甲基亚砷 150 μl ,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 (OD_{490})。以时间为横轴、吸光度值为纵轴绘制细胞生长曲线。

七、统计学分析

应用 SPSS 11.0 版统计软件,采用单因素方差分析进行统计学处理,各组间数据采用 Tukey 法进行多重比较, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、免疫细胞化学染色

β_1 整合素和 K_{19} 免疫细胞化学染色均示细胞浆内出现棕黄色着色的阳性表达,见图 1 和图 2。

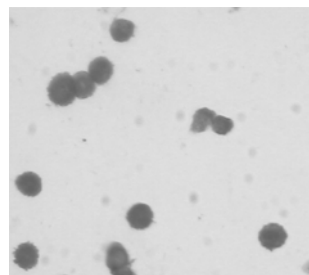


图 1 ESC β_1 整合素免疫组化染色结果 ($\times 400$)

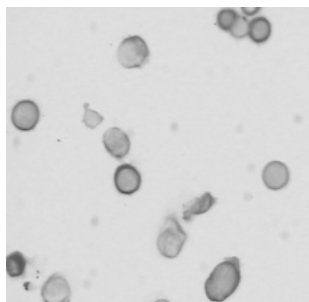


图 2 ESC K_{19} 免疫组化染色结果 ($\times 400$)

二、形态学观察

传代细胞在培养瓶内快速贴壁,随着换液次数的增加,虽然细胞的数量增加不显著,但可见细胞呈片状聚集样生长,最终呈克隆状生长。经 LIPEMF 刺激 2 d 后,各 LIPEMF 组中的细胞生长情况与对照组无明显差异。但经 LIPEMF 刺激 3 d 后,各 LIPEMF 组的细胞融合度均较对照组高,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;其中尤以 50 Hz 组最为明显,排列更为紧密,细胞密度最大 (图 3, 4)。

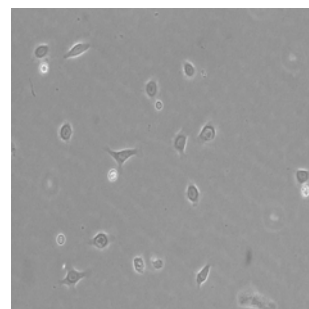


图 3 接种 2 d 的 ESC ($\times 200$)

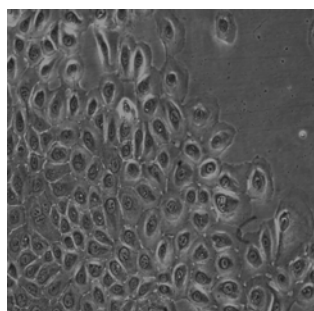


图 4 50 Hz 组经 LIPEMF 刺激 3 d 后 ESC 的生长情况 ($\times 100$)

三、CFE

对照组 CFE 为 $(13.65 \pm 2.68)\%$, 1 Hz 组、10 Hz 组和 50 Hz 组的 CFE 分别是 $(18.98 \pm 2.42)\%$, $(20.44 \pm 3.91)\%$ 和 $(27.59 \pm 5.36)\%$, 各 LIPEMF 组的 CFE 均明显高于对照组 ($P < 0.01$); 各 LIPEMF 组间比较, 50 Hz 组显著高于 1 Hz 组和 10 Hz 组 (均 $P < 0.01$)。

四、LIPEMF 对 ESC 增殖水平的影响

各组 ESC 生长曲线见图 5。不同频率的 LIPEMF 刺激均能促进 ESC 增殖, 其中以 50 Hz 作用效果最为显著, 生长曲线较对照组明显前移, 峰值增高。50 Hz 组的细胞增殖速度也较 1 Hz 组和 10 Hz 组快。

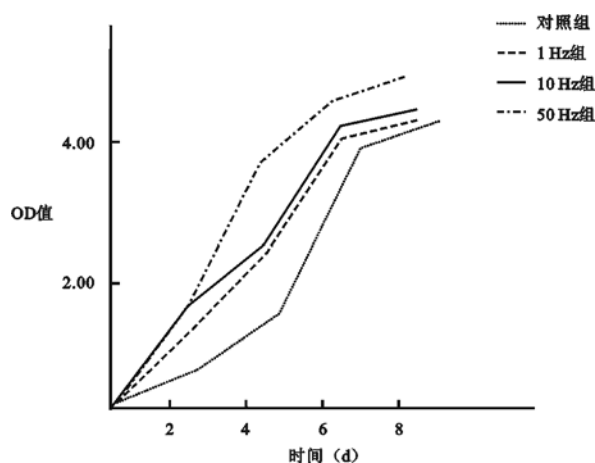


图 5 各组 ESC 生长曲线

讨 论

一、培养方法

原代表皮细胞的获取有组织块培养法及酶消化法两种^[3,4]。前者简单易行, 成功率高, 但由于组织块的原代细胞培养时间较长, 且并非每一个组织块都有细胞萌出, 细胞传代次数和最终获取的细胞数较少。因此本实验采用酶消化法进行培养, 由于表皮组织间质少, 且表皮细胞与培养瓶底的黏附性较其他细胞强, 适合用胰蛋白酶进行消化分离。

以往的文献^[4,5]常采用 3T3 细胞作为 ESC 培养的滋养支持物。3T3 细胞可分泌大量细胞因子, 以促进

ESC 的生长和贴壁, 因此得到了广泛的应用。但 3T3 细胞毕竟属于异种细胞, 而且长期维持 3T3 细胞株需要一定的条件和技术。应用 IV 型胶原铺底配制方便, 不需特殊条件, 价格较低; 并且, IV 型胶原除了能快速黏附干细胞利于纯化外, 还具有维持 ESC 的特性, 促进干细胞集落形成的作用。故本实验应用 IV 型胶原铺底培养 ESC, 实验结果表明该方法较为实用。

二、ESC 的鉴定

ESC 的显著特点之一是对基底膜的黏附, 干细胞通过表达整合素实现对基底膜各种成分的黏附。整合素是一种由 α 亚基和 β 亚基组成的双亚基蛋白, 不同的 α 亚基与不同的 β 亚基可组成多种整合素, 其中由 $\beta 1$ 亚基组成的整合素在 ESC 与基底膜的黏附中起着重要作用。干细胞高水平表达三种整合素家族: $\alpha 2\beta 1$ 、 $\alpha 3\beta 1$ 和 $\alpha 5\beta 1$, 其中 $\alpha 2\beta 1$ 整合素是区分 ESC 与暂时增殖细胞及终末分化细胞的第一表面标记物。各种整合素作为受体分子与基底膜各种成分的配体结合, 是干细胞维持其特性的基本条件, 例如 $\alpha 2\beta 1$ 是胶原和层黏连蛋白的受体, $\alpha 3\beta 1$ 是层黏连蛋白和 kalinin 的受体, 而 $\alpha 5\beta 1$ 是纤维连接蛋白的受体。干细胞对基底膜的脱黏附是诱导干细胞脱落, 使干细胞群落进入分化周期的重要调控机制之一^[6]。另有研究发现^[7,8], $\beta 1$ 整合素表达水平的高低与细胞体外克隆形成能力呈正相关, 高表达 $\beta 1$ 整合素的细胞具有更强的克隆形成能力, 传代次数显著多于低表达的细胞; 将其移植到皮肤缺损创面后能生成完整的上皮层, 表明 $\beta 1$ 整合素高表达的细胞富含干细胞。因此, 有学者认为整合素 $\beta 1$ 的表达可作为 ESC 的标记^[9]。角蛋白是表皮细胞的结构蛋白, 随着分化程度的变化, 表皮细胞表达不同的角蛋白, 因而可用于鉴别 ESC。ESC 表达 K_{19} ; 暂时增殖细胞表达角蛋白 5 (keratin 5, K_5) 和角蛋白 14 (keratin 14, K_{14}); 终末分化细胞表达角蛋白 1 (keratin 1, K_1) 和角蛋白 10 (keratin 10, K_{10})。1996 年, Michel 等提出 K_{19} 可能是毛囊 ESC 的标志^[10]。因此, 本实验选用整合素 $\beta 1$ 和 K_{19} 作为鉴别干细胞的标记物, 结果发现我们培养的 ESC 能高表达 $\beta 1$ 整合素和 K_{19} 。

三、LIPEMF 对 ESC 增殖的影响

磁场可分为稳恒磁场和动磁场, 脉冲电磁场在矫形外科和康复医学领域已日益受到重视, 它作为一种非侵入性疗法应用于骨折延迟愈合及骨不连、先天性骨缺损、关节固定失败、骨坏死 (如股骨头无菌性坏死)、骨移植及脊柱椎体骨性融合术后治疗, 以及促进创面愈合等。近年有应用低强度电磁场促进骨髓干细胞分化和增殖的研究^[11]。

本实验应用不同频率的 LIPEMF 作用于 ESC, 各组生长曲线显示 50 Hz 组的细胞增殖速度明显快于对

照组和其他频率的 LIPEMF 组。这说明脉冲电磁场对细胞具有“生物窗”和“频率窗”效应,即某一特定频率、特定强度范围的脉冲电磁场对某一特定的细胞起较强的作用^[11,12]。

脉冲电磁场如何对细胞产生促增殖效应?目前可能的解释包括脉冲电磁场可增加钙离子内流,调节胞内钙离子浓度,利用钙离子的第二信使作用而改变细胞行为^[13];通过物理效应直接促进细胞的增殖与分化等^[14,15]。有研究表明,一定强度的磁场能促进活细胞增殖反应及细胞转化,使细胞表面蛋白分子产生电泳现象,从而调节受体、配体结合信号转导系统,使细胞内的 cAMP 水平呈现升高趋势而促发一系列的磷酸化生物信号放大反应,进而调控细胞增殖水平^[16]。

本实验证实,LIPEMF 作用能促进细胞增殖,频率是 LIPEMF 促进 ESC 增殖的重要影响因素之一。这为脉冲电磁场促进创面愈合提供了实验依据,同时也为 ESC 体外短时间扩增提供了一条可行途径。至于脉冲电磁场如何促进 ESC 的增殖,以及脉冲电磁场作用的最佳频率乃至不同强度的作用还有待于进一步探索。

参 考 文 献

- 1 Janes SM, Lowell S, Hutter C. Epidermal stem cells. J Pathol, 2002, 197:479-491.
- 2 Morasso MI, Tomic - Canic M. Epidermal stem cells; the cradle of epidermal determination, differentiation and wound healing. Biol Cell, 2005, 97:173-183.
- 3 杨玲, 刘善荣, 作敏娟, 等. 成人体表皮干细胞的定位及分离培养. 第二军医大学学报, 2004, 25:15-817.
- 4 Toma JG, McKenzie IA, Bagli D, et al. Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. Stem Cells, 2005, 23:727-737.
- 5 Varani J, Lateef H, Fay K, et al. Antagonism of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase ameliorates the psoriatic phenotype in organ-cultured skin. Skin Pharmacol Physiol, 2005, 18:123-131.
- 6 Kaur P, Li A. Adhesive properties of human basal epidermal cells: an analysis of keratinocyte stem cells, transit amplifying cells, and post mitotic differentiating cells. J Invest Dermatol, 2000, 114:413-420.
- 7 Olszewski WL. Stem cells of the human skin epithelium——can they be isolated and resume function as single-cells transplanted into recipient skin defects? Ann Transplant, 2004, 9:34-36.
- 8 Bellemare J, Roberge CJ, Bergeron D, et al. Epidermis promotes dermal fibrosis; role in the pathogenesis of hypertrophic scars. J Pathol, 2005, 206:1-8.
- 9 Dunnwald M, Tomanek A, Alexandruas D, et al. Isolating a pure population of epidermal stem cells for use in tissue engineering. Exp Dermatol, 2001, 10:45-54.
- 10 Michel M, Torok N, Godbout MJ, et al. Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells in vivo and in vitro: keratin 19 expressing cells are differentially localized in function of anatomic sites and their number varies with donor age and culture stage. J Cell Sci, 1996, 109:1017-1028.
- 11 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.
- 12 Rubin CT, Meleod KJ, Titus L, et al. Formation of osteoblast-like cells is suppressed by low frequency, low intensity electric fields. J Orthop Res, 1996, 14:7-15.
- 13 Spadaro JA, Bergstrom WH. In vivo and in vitro effects of a pulsed electromagnetic field on net calcium flux in rat calvarial bone. Calcif Tissue Int, 2002, 70:496-502.
- 14 Panagopoulos DJ, Karabarbounis A, Margaritis LH. Mechanism for action of electromagnetic fields on cells. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 298:95-102.
- 15 宋晋刚, 许建中, 周强, 等. 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. 中华物理医学与康复杂志, 2005, 27:134-137.
- 16 Lee RC, Canaday DJ, Dong H. A review of the biophysical basis for the clinical application of electric fields in soft-tissue repair. J Burn Care Rehabil, 1993, 14:319-335.

(收稿日期:2006-10-02)

(本文编辑:吴倩)

《中华物理医学与康复杂志》2006 年第 11 期“继续教育园地”答题卡

姓 名	_____	1.	A	B	C	D	E
性 别	_____	2.	A	B	C	D	E
职 称	_____	3.	A	B	C	D	E
工作单位	_____	4.	A	B	C	D	E
联系电话	_____	5.	A	B	C	D	E
地 址	_____						
邮 编	_____						

(该答题卡复印有效)

答题卡请寄: 430030 武汉市解放大道 1095 号同济医院《中华物理医学与康复杂志》编辑部收