

· 基础研究 ·

50 Hz 电磁场对小鼠骨髓间充质干细胞增殖的影响

方真华 吴华 马伟明 赵文春

【摘要】目的 探讨小鼠骨髓间充质干细胞经脉冲电磁场辐射不同时间后其细胞增殖水平的变化。**方法** 用密度梯度离心法分离小鼠骨髓间充质干细胞,再经贴壁筛选法筛选,对生长良好的第 3 代小鼠骨髓间充质干细胞进行不同时间的脉冲电磁场辐射(频率 50 Hz、正弦波形、不同强度),用 MTT 法、流式细胞仪法测定细胞生长增殖水平及细胞周期变化。**结果** 小鼠骨髓间充质干细胞经脉冲电磁场辐射 3 d(每天 2 次,每次 30 min)后,各实验组细胞增殖水平均有明显提高,差异有显著性意义($P < 0.05$)。采用流式细胞仪测定细胞周期,发现各实验组($S + G_2/M$)期细胞数量较对照组均有不同程度的增长,差异有显著性意义($P < 0.05$)。各组均未发现 DNA 倍体异常细胞。**结论** 小鼠骨髓间充质干细胞经频率为 50 Hz、正弦波形、强度分别为 4 mT、3 mT、2 mT、1 mT 的脉冲电磁场辐射 3 d(每天 2 次,每次 30 min,间隔 12 h)后,能明显促进该细胞体外培养的增殖水平。

【关键词】 脉冲电磁场; 间充质干细胞; 增殖

The effects of pulsed electromagnetic fields on the proliferation of bone marrow stem cells in mice FANG Zhen-hua*, WU Hua, MA Wei-ming, ZHAO Wen-chun. * Department of Orthopedics, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

【Abstract】 Objective To study the effect of pulsed electromagnetic fields (PEMFs) on the proliferation of bone mesenchymal stem cells in mice. **Methods** The bone marrow mesenchymal stem cells were obtained by using gradient centrifuge method, and then selected by the adhesive method. The third generation cells were irradiated by use of pulsed electromagnetic fields of 50Hz, sinusoid wave, at different intensities and for different time. The method of MTT was employed to evaluate the level of proliferation. The parameters regarding the variation of the cell cycle were detected with the flow cytometry (FCM). **Results** The proliferation of the bone mesenchymal stem cells in mice was greatly accelerated after 3 days of irradiation by pulsed electromagnetic fields of 50Hz, sinusoid wave (twice daily, 30 min each time) at the intensities of 4mT, 3mT, 2mT and 1mT. The percentage of cells at the ($S + G_2/M$) phase was increased significantly ($P < 0.05$). No abnormal ploidy was found in every group. **Conclusion** Three days of irradiation (twice daily, 30 min each time) of pulsed electromagnetic fields of 50Hz, sinusoid wave at the intensities of 4mT, 3mT, 2mT and 1mT could increase the proliferation of bone mesenchymal stem cells of mice in vitro.

【Key words】 Pulsed electromagnetic fields; Mesenchymal stem cells; Proliferation

近年来的研究表明,骨髓中除了有造血干细胞外,还有一类起源于中胚层的未分化间充质细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)^[1]。MSCs 作为一种成体干细胞,具有极大的可塑性及多向分化的潜能,该类细胞可跨越胚层界限,向来源于中胚层、内胚层及神经外胚层的组织细胞分化,包括成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、肌腱细胞及神经元等^[2]。如同多能造血干细胞赋予骨髓组织强大的造血功能以维持血液系统的新陈代谢一样,多分化潜能的 MSCs 为骨组织的损伤修复提供了潜在的细胞来源,对于组织工程有极其重要的意义。自 20 世纪 70 年代以来,脉冲电磁场(pulsed electro-

magnetic fields, PEMFs)在矫形外科领域已日益受到重视,它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,随后 PEMFs 又被用于治疗先天性骨缺损、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等。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反应,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^[3]。本实验旨在通过研究 MSCs 在 PEMFs 辐射下增殖水平、细胞周期的变化,了解频率 50 Hz、正弦波形、不同辐射强度、不同辐射时间的 PEMFs 干预对小鼠 MSCs 增殖水平的影响,

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(方真华、吴华);海军工程大学电气工程系(赵文春、马伟明)

从而为 MSCs 及 PEMFs 的临床应用提供实验依据。

材料与方法

一、材料

取 BALB/C 小鼠 15 只, 4 ~ 5 周龄, 体重 18 ~ 22 g, 雌雄不拘, 由同济医学院实验动物中心提供。

二、主要仪器及试剂

脉冲电磁场发生器由海军工程大学电机系设计与制造, 试剂均为美国 Sigma 公司产品, 包括 α -MEM 培养基 (Hyclone, 美国)、优质胎牛血清 FBS (Hyclone, 美国)、胰酶、Percoll 分离液、四甲基偶氮唑蓝 (MTT)、二甲基亚砜 (DMSO)、依地酸二钠 (EDTA)、碘化丙啉、RNA 酶。实验仪器还包括倒置相差显微镜 (OLYMPUS, 日本) 和酶联免疫检测仪 (DG3022A 型, 华东电子管厂) 等。

三、实验方法

1. 小鼠 MSCs 的体外分离及原代培养: 将小鼠颈椎脱臼处死后, 用 75% 的酒精浸泡 5 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侧骺端。用 20 ml 的注射器抽取 10 ml 浓度为 10% 的 FBS- α -MEM 培养基 (内含青霉素、链霉素各 100 μ g/ml) 冲洗骨髓腔。依次使用 7 号针头和 4 号针头反复吹打骨髓细胞悬液, 制成单细胞悬液后缓慢注入预先加有 50 ml Percoll (密度 1.082 g/ml) 分离液的离心管中, 在 4℃ 环境下, 500 g/min 离心 20 min。小心收集离心液界面上乳白色云雾状的细胞层, 用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 漂洗杂质 2 次, 再以 10% FBS- α -MEM 培养基漂洗, 以 180 g/min 离心 10 min, 去上清。最后计数 10% FBS- α -MEM 培养基中悬浮细胞数量, 当确认有核细胞的数量达到 $10^6 \sim 10^7$ 个/ml 后即进行原代培养接种。将细胞按照 1×10^6 个/ml 接种于 50 ml 的培养瓶中, 置于 37℃、5% CO₂、饱和湿度的细胞培养箱中进行培养。第 3 天半量换液, 以后每 2 天全量换液 1 次。于倒置相差显微镜下观察细胞培养全过程。

2. 小鼠 MSCs 的传代培养: 待细胞长至瓶底的 90% 后, 进行传代培养。吸出培养液, 用 PBS 洗涤 2 次, 加入 3 ml 混合液 (0.25% 胰酶 + 0.02% EDTA), 消化 3 ~ 5 min, 再加入 3 ml 含血清的培养基, 离心去除上清, 加入 10% FBS- α -MEM 完全培养基, 反复吹打后计数, 以 1×10^4 个/ml 的密度传代接种于 25 ml 培养瓶中。

3. PEMFs 辐射及细胞增殖水平测定: 当第 2 代细胞长至瓶底的 90% 时, 按上法消化, 调整细胞密度为 1×10^3 个/ml, 并接种于 5 块 96 孔板中, 每板设 60 孔,

200 μ l/孔, 每块板都设一不含细胞只含 10% FBS- α -MEM 培养基的调零孔。其中 4 块板为试验组, 另 1 板为对照组。从传代第 2 天即开始 PEMFs 辐射, 每天辐射 2 次, 每次 30 min, 间隔 12 h。采用频率 50 Hz、正弦波形的 PEMFs (强度分别为 4 mT、3 mT、2 mT、1 mT) 进行辐射干预, 每次辐射时均将培养板置于电磁场线圈的中央; 对照组无 PEMFs 辐射干预 (0 mT)。每板分别在实验第 1 天、第 2 天、第 3 天时各取 20 孔, 每孔加入 5 mg/ml 的 MTT 溶液 20 μ l, 于 37℃ 环境下避光 4 h, 吸取上清, 每孔加入 DMSO 150 μ 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 (OD₄₉₀)。

4. 流式细胞仪分析细胞周期: 当第 2 代细胞长满瓶底的 90% 时, 同上法消化, 调整细胞密度为 6×10^4 个/ml, 接种于 5 块 24 孔板中。从传代第 2 天即开始 PEMFs 辐射, 干预方法同前。于 4 d 后收集每板的细胞液, 以 180 g/min 离心 8 min。用 PBS 洗涤杂质 2 次后, 加入到浓度为 80% 的预冷乙醇中, 于 4℃ 环境中固定过夜, 再经 PBS 洗涤及离心 5 min 后, 去除上清, 加入 PC 缓冲液 100 μ l, 于室温下混匀并放置 30 min, 继续离心加 PBS 洗涤, 去上清后加 PI (100 μ g/ml)、RNA 酶 (100 μ g/ml) 各 10 μ l、PBS 40 μ l 避光 30 min 后, 采用流式细胞仪分析细胞增殖周期。以增殖指数 (proliferation index, PI) 分析 PEMFs 对小鼠 MSCs 分裂增殖水平的影响, $PI = [(S + G_2/M)/(G_0/G_1 + S + G_2/M)] \times 100\%$, 同时进行 DNA 倍体分析。

四、统计学分析

所有数据均以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 应用 SPSS 10.0 软件进行统计学分析, 采用 q 检验, $P < 0.05$ 为差异具有显著性意义。

结 果

一、MSCs 的形态学观察

在倒置显微镜下, 原代培养的 MSCs 于 24 h 后开始有细胞贴壁现象发生 (图 1), 细胞伸展成长梭型或多角型; 48 h 后开始有细胞集落形成, 贴壁细胞增多; 4 d 后细胞成典型的成纤维细胞形态; 10 d 后细胞集落不断扩大而融合成单层 (图 2)。传代后的细胞均匀分布生长, 于 2 h 后开始有细胞贴壁; 24 h 内细胞完全贴壁, 成条索状; 5 d 后长满瓶底。经 PEMFs 辐射第 1 天、第 2 天后, 各 PEMFs 实验组中的细胞生长情况与对照组无显著性差异。但经 PEMFs 辐射第 3 天后, 各实验组的细胞融合度均较对照组高, 其中尤以频率 50 Hz、正弦波形、强度为 1 mT 的 PEMFs 辐射实验组最为明显。我们在第 4 天时发现, 强度为 1 mT 的 PEMFs 实验组细胞已完全融合成单层。

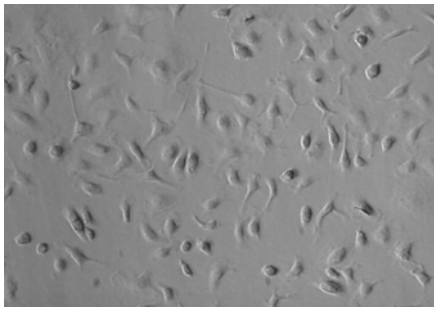


图 1 原代培养的 MSCs 于 24 h 后细胞开始贴壁 (×100)

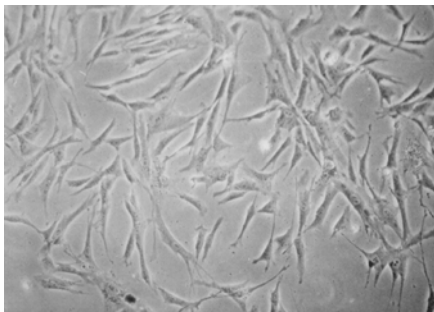


图 2 原代培养 10 d 后的 MSCs 扩大并融合成单层 (×200)

二、PEMFs 对小鼠 MSCs 增殖水平的影响

各实验组细胞的 OD 值见表 1。从表 1 可见,经 PEMFs 辐射第 1 天,第 2 天(间隔 12 h、每次 30 min)后,各实验组和对照组间的 OD 值差异均无显著性意义。当辐射第 3 天(间隔 12 h、每次 30 min)后,各实验组和对照组间的 OD 值差异有显著性意义($P < 0.05$)。其中尤以强度为 1 mT 的实验组最为明显,和对照组比较,差异有极显著性意义($P < 0.01$)。

表 1 MTT 法测定 PEMFs 对 MSCs 增殖水平的影响
($OD_{490}, \bar{x} \pm s$)

组 别	n	经不同时间的 PEMFs 辐射后 MSCs 增殖水平的变化 (%)		
		24 h 后	48 h 后	72 h 后
对照组	20	22.00 ± 1.90	29.70 ± 1.31	35.90 ± 1.02
1 mT 实验组	20	22.46 ± 1.80	28.12 ± 1.32	51.60 ± 1.83 **
2 mT 实验组	20	22.04 ± 1.90	30.21 ± 1.75	50.79 ± 1.40 *
3 mT 实验组	20	21.27 ± 1.40	30.40 ± 1.53	40.95 ± 1.60 **
4 mT 实验组	20	22.38 ± 1.50	30.85 ± 1.37	47.90 ± 1.87 *

注:与同时段对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

三、不同强度的 PEMFs 辐射对小鼠 MSCs 细胞周期的影响

在所有检测的细胞样本中均未发现有 DNA 倍体异常的细胞(diploid:100%)。从表 2 可以看出,经过连续 3 d(每天 2 次,每次持续 30 min,间隔 12 h)的 PEMFs 辐射后,各实验组和对照组相比,其 G_0/G_1 细胞比例降低,($S + G_2$)/M 期细胞比例增加,PI 值较对照组升高,差异有显著性意义($P < 0.05$)。

表 2 不同强度 PEMFs 辐射对 MSCs 细胞周期的影响

PEMFs 强度	细胞周期($\bar{x} \pm s$)			PI 值
	G_0/G_1	S	G_2/M	
0 mT	76.4 ± 0.32	8.9 ± 0.11	14.7 ± 0.12	23.4
1 mT	74.3 ± 0.15	16.5 ± 0.12	14.2 ± 0.26	35.7 **
2 mT	67.8 ± 0.15	14.4 ± 0.31	17.8 ± 0.20	32.2 *
3 mT	69.7 ± 0.74	12.9 ± 0.29	17.4 ± 0.18	30.3 *
4 mT	69.6 ± 0.37	13.1 ± 0.14	17.30 ± 0.70	30.4 *

注:与 0 mT 比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

讨 论

近年来的研究表明,骨髓间充质干细胞具有干细胞的共性,即具有自我更新并多向分化的潜能,在特定的条件下可向骨、软骨、脂肪、肌肉及肌腱等组织分化,因此可利用这一特性建立多种细胞或组织的体外分化模型,从而为人类的细胞移植或组织器官重建提供可靠的自体资源^[1]。在骨外科及康复医学领域中,国内、外学者正在积极探讨利用自体 MSCs 来修复肌肉骨骼系统的缺损。但是 MSCs 在骨髓中的丰度并不高,大约只有十万分之一,因此将体内的骨髓 MSCs 在离体条件下进行分离纯化并实行体外扩增就显得尤为重要。PEMFs 作为一种非侵入性的疗法治疗骨不连及其它骨科疾病已被证实具有确切的临床疗效^[2,4],但由于以往认识的局限性,MSCs 在 PEMFs 促进骨折愈合的机制中所起的作用一直未被重视。

本实验参考 Bassett 等^[5]关于不同参数 PEMFs 对骨折影响的报道,并结合体外培养 MSCs 的特点,特设计应用频率 50 Hz、正弦波形及不同强度的 PEMFs 进行不同时间的辐射,以观察其对 MSCs 的影响。选择这一频率和强度窗口的根据如下:①PEMFs 对细胞具有“生物窗”和“频率窗”效应,某一特定频率、特定强度范围的脉冲电磁场只对某一特定的细胞起作用^[6];②骨骼系统的内生性活动频率范围是从步态频率(1 ~ 5 Hz)到肌肉收缩的动力频率(10 ~ 100 Hz)间变化,而 Lee 等^[7]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,故我们认为将 PEMFs 频率设置为 50 Hz 较佳。MTT 法是一种检测细胞增殖的方法。因为活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使显色剂四唑盐 MTT 还原成“蓝紫色结晶”,并沉淀在细胞中,DMSO 能溶解细胞中的结晶物^[8],所以用酶联免疫检测仪在 490 nm 处测其吸光度值,可间接地反映活细胞的数量与功能。本实验结果说明,4 mT 实验组、3 mT 实验组、2 mT 实验组于 PEMFs 辐射第 3 天后,其 OD 值与对照组比较,差异有显著性意义($P < 0.05$);1 mT 组和对照组比较,差异有极显著性意义($P < 0.01$)。进一步证明了我们实验设计的 PEMFs“频率与强度窗口”对 MSCs 的生长与增殖作用是有效的。本实验一

方面为体外扩增 MSCs 开辟了新的途径;另一方面也说明了 PEMFs 在治疗骨折时,可能也同时刺激了 MSCs 的增殖,使其在体内分化为成骨细胞而促进骨折愈合。本实验中,我们发现经 PEMFs 辐射第 1 天和第 2 天后,各强度实验组细胞增殖水平与对照组比较,差异均无统计学意义,可能是细胞的增殖对外电磁场有敏感特异性,由于包括频率、波型、时间等在内的多种因素的共同影响,实验组细胞在第 1 天、第 2 天可能还来不及作出相应反应。因此,一定的时间跨度也是 PEMFs 产生生物学效应的必要条件。

众所周知,细胞的生长周期主要有生长前期(G_1)、DNA 合成期(S)期及有丝分裂期(G_2/M)。S 期和 G_2/M 期一般都很稳定,细胞周期所经历的时间差异主要取决于 G_1 期的长短。本实验结果表明,各实验组 MSCs 经频率 50 Hz、正弦波形、连续 3 d(每天 2 次、每次 30 min,间隔 12 h)的 PEMFs(强度分别为 1 mT, 2 mT, 3 mT, 4 mT)辐射后,与对照组比较,其 G_1 期比例均明显缩短,增殖期细胞(S + G_2/M)的比例亦提高。各实验组 PI 均较对照组提高,差异有显著性意义($P < 0.05$),其中尤以强度为 1 mT 实验组最明显,其 PI 值(35.7%)较对照组(23.4%)显著提高($P < 0.01$)。从本实验中,我们还发现频率 50 Hz、正弦波形的 PEMFs 连续 3 d(每天 2 次、每次 30 min;强度分别为 1 mT, 2 mT, 3 mT, 4 mT)辐射可使 MSCs 进入细胞增殖周期的细胞数目显著增多,从而明显提高细胞的增殖水平,同时,我们并未发现经 PEMFs 辐射各组细胞 DNA 有含量异常的现象,至少在观察期间如此。因而我们认为此频率窗口的 PEMFs 不会引起细胞恶变,临床使用安全、有效。

脉冲电磁场如何对细胞产生促增殖效应,目前可能的解释是:(1)影响细胞分子的合成,Binderman 等^[9]研究发现,将成骨细胞暴露于频率 3 Hz 的电磁场中,其 DNA 和 cAMP 同步升高;(2)可增加钙离子内流,调节胞内钙离子浓度,借钙离子的第二信使作用而改变细胞行为^[10];(3)通过物理效应直接促进细胞增殖与分化^[11]。

本实验证实一定频率、一定强度范围、一定作用时间的脉冲电磁场辐射能促进细胞增殖,为 PEMFs 治疗骨不连提供了实验依据,同时也为骨髓间充质干细胞体外短时间扩增提供了一条可行的途径。当然,在电磁生物学领域中,一些基本的生物学机制尚需进一步探讨,关于 PEMFs 如何促进 MSCs 的增殖,还有待于我们继续探索。

参 考 文 献

- 1 Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999, 284:143-147.
- 2 Woodbury D, Schwarz ET, Prockop DJ, et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res*, 2000, 61:364-367.
- 3 Lee RC, Canaday DJ, Doong 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.
- 4 Bassett CA, Mitchell SN, Schink MM. Treatment of therapeutically resistant non-unions with bone grafts and pulsing electromagnetic fields. *J Bone Joint Surg*, 1982, 64:1214-1220.
- 5 Bassett CA, Valdes MG, Hernandez E. Modification of fracture repair with selected pulsing electromagnetic fields. *J Bone Joint Surg*, 1982, 64:888-892.
- 6 Rubin CT, McLeod 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.
- 7 Lee JH, McLeod KJ. Morphologic responses of osteoblast-like cells in monolayer culture to ELF electromagnetic fields. *Bioelectromagnetics*, 2000, 21:129-136.
- 8 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养. 西安:世界图书出版西安公司, 1996. 186-187.
- 9 Binderman I, Somjen D, Shimshoni Z, et al. Stimulation of skeletal-derived cell cultures by different electric field intensities is cell-specific. *Biochim Biophys Acta*, 1985, 21:273-279.
- 10 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.
- 11 Panagopoulos DJ, Karabarbounis A, Margaritis LH. Mechanism for action of electromagnetic fields on cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 298:95-102.

(修回日期:2003-06-25)

(本文编辑:易 浩)

· 消息 ·

Rehabilitation Medicine: Principles & Practice 中文版现已出版

由国际康复医学界权威 DeLisa 教授主编的 *Rehabilitation Medicine: Principles & Practice* 一书,是美国和欧洲物理医学与康复专科医师考试与资格认证委员会规定的必读书。该书论述全面,有四大部分 71 章 2 千余页,几乎涵盖康复医学的所有理论与技术,非常实用。现已由武汉同济医院南登崑和郭正成两位教授领衔、国内 20 余所医学院校和大型医院的专家教授共同参与翻译成中文,书名《康复医学—理论与实践》,中文版序言由 DeLisa 教授亲自捉笔撰写。是各医学院校、医院教师、医师、治疗师学习和参考的必备书籍。

中文版于 2004 年 1 月由世界图书出版西安公司出版发行,国际书号 ISBN 7-5062-6132-4/R·636。每本定价 580 元,该书印数不多,订购者请速与该公司联系。地址:710001 西安南大街 17 号;电话:029-87283990, 87233647;传真:029-87279676 或 87279675;开户银行:建行西安南大街支行;帐号:575-26329858;责任编辑:王佳(wang_6514@sohu.com)。

(武汉同济医院康复资源中心 供稿)