

· 基础研究 ·

工频电磁场对小鼠骨髓间充质干细胞
BMP-2 和 TGF- β_1 mRNA 表达的影响

葛保健 方真华 赵文春 任凯 冷燕奎 吴华

【摘要】目的 研究工频电磁场对体外培养的小鼠骨髓间充质干细胞 BMP-2 和 TGF- β_1 mRNA 表达的影响。**方法** 体外分离培养小鼠骨髓间充质干细胞,取第 2 代细胞分组暴露,然后用 RT-PCR 技术分别检测各组细胞的 BMP-2 和 TGF- β_1 mRNA 表达,并进行定量分析。**结果** 适当强度及作用时间的工频电磁场刺激可使小鼠骨髓间充质干细胞 mRNA 表达明显增强。相同作用时间下,BMP-2 mRNA 的表达于 1.6 mT 场强中达最大值,而 TGF- β_1 mRNA 的表达则于 0.4 mT 场强中达最大值;1.6 mT 场强条件下,电磁场连续照射 5 d,每日 1 h,可使 BMP-2 和 TGF- β_1 mRNA 表达均达到最大值。**结论** 适当“窗口”的电磁场刺激对体外培养的小鼠骨髓间充质干细胞 BMP-2 和 TGF- β_1 mRNA 表达有明显的促进作用。

【关键词】 骨髓间充质干细胞; 骨生长因子; 逆转录 PCR; 电磁场

50Hz electromagnetic field (EMF) stimulation promotes mRNA expression of BMP-2 and TGF- β_1 in mouse bone marrow mesenchymal stem cells in vitro GE Bao-jian*, FANG Zhen-hua, ZHAO Wen-chun, REN Kai, LENG Yan-kui, WU Hua. * Department of Orthopaedics, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

【Abstract】 Objective To study the effects of 50Hz electromagnetic field (EMF) on mRNA expression of BMP-2 and TGF- β_1 in mouse bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) in vitro. **Methods** the mouse bone marrow mesenchymal stem cells were isolated and cultured in vitro. The second-passage cells were harvested and divided into different groups. 50Hz EMF stimulation was conducted accordingly. The expression of mRNA of BMP-2 and TGF- β_1 in the cells in every group was examined by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** Various intensities and times of exposure of 50Hz EMF induced a significant increase of BMP-2 and TGF- β_1 mRNA in comparison to the controls. The expression of BMP-2 mRNA peaked with the stimulation intensity of 1.6mT. The corresponding intensity for TGF- β_1 peak expression was 0.4mT. Both BMP-2 expression and TGF- β_1 mRNA expression were increased to peak in cells when exposed continuously for 60 minutes per day for 5 days. **Conclusion** Stimulation of 50Hz EMF can increase significantly the expression of BMP-2 and TGF- β_1 mRNA in mouse bone marrow mesenchymal stem cells in vitro.

【Key words】 Bone marrow mesenchymal stem cell; Skeletal growth factor; RT-PCR; Electromagnetic fields

电磁场疗法应用于临床,特别是用于骨折延迟愈合及不愈合、先天性胫骨假关节等疾病的治疗已取得满意疗效,但其机理还不十分明确。许多研究证实电磁场刺激可促进骨生长因子的分泌,而某些生长因子具有诱导骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)定向分化成骨的作用。为此,我们设计了本实验,旨在研究工频电磁场对体外培养的小鼠骨髓间充质干细胞骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)和转化生长因子 β_1 (transforming growth fac-

tor- β_1 , TGF- β_1) mRNA 表达的影响。

材料与方法

一、材料

1. 实验动物:清洁级昆明小鼠,由同济医学院实验动物中心提供,鼠龄 3~4 周,雌、雄不限。

2. 电磁场发生器:采用 Helmholtz 线圈,能生成场强为 0~100 mT 的连续可调的 50 Hz 正弦波电磁场,磁场均匀性较好,分布差异小于 1%^[1],由海军工程大学研制。

3. 试剂: α -MEM 培养基(Hyclone 公司),胎牛血清(Gibco 公司), Vitamin C (Sigma 公司),胰蛋白酶(Amersco 公司), TRIZOL (Invitrogen 公司), MMLV 逆转录酶(Promega 公司), OligodT15 (Sabc 公司), RNa-

基金项目:国家自然科学基金主任基金(No. 50347025)

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(葛保健、方真华、任凯、冷燕奎、吴华);海军工程大学电力电子技术应用研究所(赵文春)

sin(华美公司), dNTPs(Roche 公司), Taq DNA 聚合酶(晶美生物技术公司), DEPC(TBD 公司), 琼脂糖粉剂(Amersco 公司), 100 bp DNA Ladder(北京中山生物技术有限公司)。

4. 引物由北京赛百胜生物工程公司合成, 引物序列如下。①BMP-2: 上游引物——5'-GCC CAT TTA GAG GAG AAC CCA GGT GT-3', 下游引物——5'-CAT CAC TGA AGT CCA CAT ACA AAG GGT G-3', 产物长度 232 bp。②TGF- β_1 : 上游引物——5'-TGC TAA TGG TGG ACC GCA ACA AC-3', 下游引物——5'-ACC AAG GTA ACG CCA GGA ATT GTT GCT-3', 产物长度 218 bp。③ β -actin 内参照引物序列: 上游引物——5'-ATG TTT GAG ACC TTC AAC AC-3', 下游引物——5'-CAC GTC ACA CTT CAT GAT GG-3', 产物长度 489 bp。

二、方法

1. 骨髓间充质干细胞的分离和体外培养: 将小鼠用颈椎脱臼法处死, 置 70% 酒精中浸泡 5 min, 在无菌操作台上取双侧股骨和胫骨, 剔除附着的软组织后用含 15% 胎牛血清的 α -MEM 培养基冲洗骨髓腔。用 3K-18 型离心机, 离心半径 8 cm, 1 000 r/min 离心 8 min 后弃上清, 加入适量培养基吹打成细胞悬液, 计数并调整细胞密度约 5×10^6 个/ml。然后将细胞接种至 50 ml 培养瓶, 置 37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养, 接种后第 4 天首次换液。由于骨髓冲洗液中红细胞、白细胞及造血干细胞在体外培养条件下主要呈悬浮状态, 故通过体外单层细胞培养并定期更换培养液, 即可将其剔除, 所余的贴壁生长细胞主要为 MSCs。培养 7~10 d 后, 细胞铺满单层, 按 1:2 消化传代; 继续培养 1~2 d, 细胞贴壁后开始分组暴磁。

2. 电磁场刺激骨髓间充质干细胞: ①不同强度电磁场分组刺激——实验分为 A、B、C、D、E 5 组, 每组随机取 5 瓶第 2 代细胞。其中 A 组为阴性对照组, B 组为阳性对照组, C、D、E 组为电磁场刺激组。B 组于传代时加入含成骨性诱导剂^[2](含 10^{-8} mol/L 地塞米松, 10 mmol/L β -甘油磷酸钠, 50 mg/L Vitamin C) 的培养基, A、C、D 和 E 组均不加诱导剂。A、B 组不给予磁场刺激; C、D 和 E 组于细胞贴壁后即开始暴磁, 将细胞放入电磁场发生器线圈中央的恒温塑料箱中, 分别于 0.4, 0.8, 1.6 mT 场强中进行电磁场刺激, 每日均连续刺激 1 h, 5 d 后检测各组各项指标。②相同场强不同作用时间分组刺激——实验共分 A、B、C、D 4 组, 每组随机取 5 瓶第 2 代细胞, 均不加成骨性诱导剂。其中 A 组为阴性对照组, 不进行电磁场刺激; B、C、D 组为电磁场刺激组, 在 1.6 mT 场强条件下每日分别给予 15, 30 和 60 min 的连续电磁场刺激, 5 d 后检测各项指标。

3. 检测各组细胞 BMP-2 和 TGF- β_1 mRNA 的表达: ①细胞总 RNA 的提取——用 TRIZOL 一步法提取各组细胞总 RNA(具体步骤按 TRIZOL 操作说明书进行), 检测浓度及纯度, 置 -70℃ 冰箱中备用。②cDNA 的合成——根据所测 RNA 浓度, 各组取 2~10 μ g 于 70℃ 下变性 5 min, 置冰浴 3 min, 分别加入 $5 \times$ buffer(逆转录酶的缓冲液) 4 μ l, dNTPs (10 mmol/L)、OligodT18 (1 μ g/ μ l) 1 μ l, RNasin 1 μ l (20 U)、MMLV 逆转录酶 1 μ l (100~200 U), 补足 DEPC 处理水至 20 μ l。37℃ 下温育 1 h, 95℃ 加热 5 min 终止反应, 然后放置 4℃ 冰箱保存。③PCR 反应——取各组 cDNA 2~10 μ g, 分别加入 $10 \times$ buffer (Taq 酶的缓冲液) 5 μ l、MgCl₂ (25 mmol/L) 3 μ l, dNTPs (10 mmol/L) 1 μ l、上/下游引物 (10 pmol/ μ l) 各 1 μ l、内参上/下游引物各 1 μ l、Taq 酶 (2~2.5 U) 1 μ l, 补足 H₂O 至 50 μ l。95℃ 预变性 5 min, 于 95℃ 变性 45 s, 54℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 45 s, 依次进行 35 个循环, 最后于 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保存。④电泳——1.5% 琼脂糖凝胶, 85 V 电压下行各组 PCR 产物电泳, 英国 UVP GDS8000 凝胶成像分析系统照相并进行各电泳条带吸光度值分析。

三、统计学分析

各组数据(电泳目的条带与内参条带吸光度比值)用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SAS 8.0 统计软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

结 果

一、不同强度电磁场刺激对小鼠骨髓间充质干细胞 BMP-2 及 TGF- β_1 mRNA 表达的影响

电泳检测显示, 各组细胞 BMP-2、TGF- β_1 及内参照 mRNA 均有不同程度的表达(图 1, 2)。统计学分析表明, 受电磁场刺激后, C、D、E 组 BMP-2 及 TGF- β_1 mRNA 的表达均较 A 组明显增强 ($P < 0.01$)。其中 E 组 BMP-2 mRNA 的表达达到最大值, 并且较 B 组明显增加 ($P < 0.01$), D 组与 B 组差异无显著性意义, C 组则明显弱于 B 组 ($P < 0.01$)。而 TGF- β_1 mRNA 的表达在 C 组达到最大值, 并较 B 组明显增强 ($P < 0.01$), 其他场强组的表达均较 B 组弱 ($P < 0.01$) (表 1)。

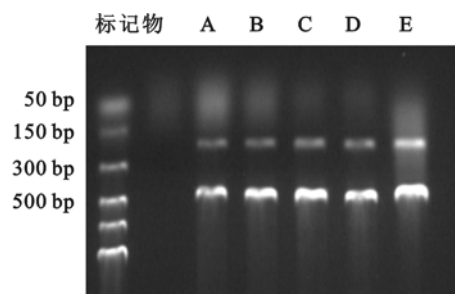
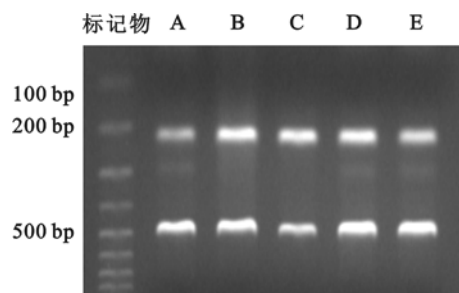


图 1 不同场强组 BMP-2 及内参照 mRNA 表达的电泳条带

图2 不同场强组 TGF- β_1 及内参 mRNA 表达的电泳条带表1 不同场强组 BMP-2 及 TGF- β_1 电泳条带和
内参条带吸光度比值($\%$, $\bar{x} \pm s$)

分组	BMP-2	TGF- β_1
A	22.05 $\pm$ 0.24	48.50 $\pm$ 0.21
B	26.66 $\pm$ 0.17 *	113.00 $\pm$ 0.13 *
C	24.08 $\pm$ 0.28 * Δ	126.20 $\pm$ 0.21 * Δ
D	26.40 $\pm$ 0.16 * $\Delta\Delta$	84.70 $\pm$ 0.18 * Δ
E	57.74 $\pm$ 0.23 * Δ	70.90 $\pm$ 0.20 * Δ

注:与 A 组相比, * $P < 0.01$; 与 B 组相比, $\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta P > 0.05$ 二、不同作用时间相同场强刺激对小鼠骨髓间充质干细胞 BMP-2 及 TGF- β_1 mRNA 表达的影响

电泳检测显示,各组细胞 BMP-2、TGF- β_1 及内参 mRNA 均有不同程度的表达(图3,4)。各组结果经统计学分析表明:受电磁场刺激后,各组两种因子 mRNA 表达均较 A 组明显增强($P < 0.01$),其中 D 组两种因子表达均达到最大值。随着作用时间的延长,两种因子表达均呈增强趋势,且各组间差异均有显著性意义($P < 0.01$)(表2)。

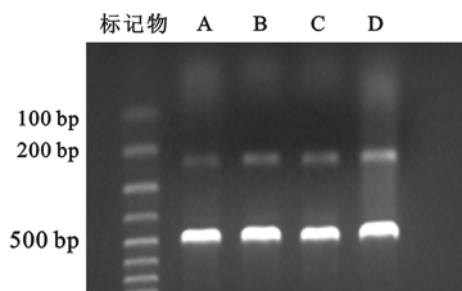
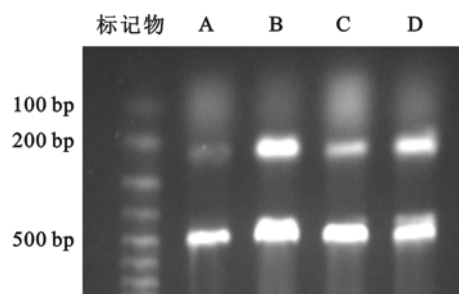


图3 不同作用时间组 BMP-2 及内参 mRNA 表达的电泳条带

图4 不同作用时间组 TGF- β_1 及内参 mRNA 表达的电泳条带表2 不同作用时间组 BMP-2 及 TGF- β_1 电泳条带和
内参条带吸光度比值($\%$, $\bar{x} \pm s$)

分组	BMP-2	TGF- β_1
A	11.15 $\pm$ 0.18	21.67 $\pm$ 0.23
B	16.16 $\pm$ 0.20 *	37.04 $\pm$ 0.11 *
C	18.33 $\pm$ 0.05 * Δ	40.81 $\pm$ 0.36 * Δ
D	28.06 $\pm$ 0.11 * $\Delta\Delta$	75.20 $\pm$ 0.16 * $\Delta\Delta$

注: * 与 A 组相比, $P < 0.01$; Δ 与 B 组相比, $P < 0.01$; $\Delta\Delta$ 与 C 组相比, $P < 0.01$

讨 论

电磁场作为一种非侵入性治疗方法,在骨科领域主要用于治疗骨折延迟愈合及不愈合、先天性胫骨假关节以及骨质疏松等疾病,并已取得满意疗效,但目前对其作用机制却无明确解释。近年来,关于电磁场刺激成骨机理的研究逐步开展起来。一些体外实验证实,电磁刺激具有促进多种骨生长因子合成和分泌的作用,并被认为是电磁场促进骨愈合的机制之一^[3]。

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^[4],其本身可分泌一些具有调节自我分化能力的细胞因子。BMP-2 及 TGF- β_1 在骨细胞形成中具有重要作用。BMP 来源于骨及骨源性细胞,为骨代谢的旁分泌产物,它是一类具有骨和软骨诱导活性的蛋白质,能诱导未分化间充质干细胞经过趋化、分裂、分化 3 个环节不可逆分化为软骨细胞和成骨细胞,诱导新骨形成,但对已分化成熟的软骨细胞和骨细胞无促进增殖的作用^[5]。TGF- β 是一类对多种结缔组织细胞具有复杂生物效应的生长因子,可促进未分化或分化早期的软骨细胞增殖,使间充质干细胞向软骨细胞分化,还可增加 II 型胶原及蛋白多糖的合成^[6]。目前,国内、外的研究主要集中在电磁场对体外培养的成骨细胞合成及分泌 BMP 及 TGF- β 的影响上,如 Nagai 等^[7],通过体外实验证实了电磁场可以刺激鸡胚颅盖骨表达 BMP-2 及 BMP-4,并指出电磁场的靶细胞可能是颅盖骨中的骨生成细胞。Zhong 等^[8]将 MC3T3-E1 成骨细胞株暴露于 60 Hz 的正弦电容耦合电场中,发现用 RT-PCR 技术检测暴露 2 h 以上的细胞株, TGF- β_1 mRNA 水平明显高于对照组。

本实验的出发点是假设骨折不愈合是由于骨髓间充质干细胞处于静止状态而未能定向分化为骨源性细胞,而电磁场刺激有可能促进骨髓间充质干细胞向骨源性细胞定向分化。实验结果表明:电磁场能使骨髓间充质干细胞 BMP-2 及 TGF- β_1 mRNA 显著表达,而这两种因子的显著表达则是干细胞向骨源性细胞转化并增殖的确切信号之一。此外,各组实验结果还表明,在不同场强组中,用 1.6 mT 场强,每天连续刺激 1 h,

持续 5 d, 可使 BMP-2 mRNA 的表达达到最大值。而 0.4 mT 场强可使 TGF- β_1 mRNA 的表达达到最大值。在不同作用时间组中, 连续刺激 1 h 可使 BMP-2 及 TGF- β_1 mRNA 表达均达到最大值。由此我们初步认为电磁场不仅能促进以上两种因子的合成和分泌, 而且其作用具有一定的时间和强度依赖性。

电磁场刺激骨生长因子基因表达的具体机制目前还不十分清楚, 但这并不妨碍我们可以采用这种方法预先获得已定向分化的骨源性细胞, 并用于临床植入“活骨”的尝试。关于理想的磁场刺激“窗口”及其促进间充质干细胞定向分化的机制, 还有待进一步探讨。

参 考 文 献

- 1 赵文春, 赵治华, 马伟明, 等. 基于综合补偿的磁场发生器的研制. 电工电能新技术. 2003, 22: 69-72.
- 2 Grigoriadis AE, Heersche JN, Aubin JE. Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone derived clonal cell population effect of dexamethasone. Cell Biol, 1988, 106: 2139-2151.

- 3 Herrmeier K, Spaanner M, Trager J, et al. Effects of extremely low frequency electromagnetic field (EMF) on collagen type I mRNA expression and extracellular matrix synthesis of human osteoblastic cells. Bioelectromagnetics, 1998, 19: 222-231.
- 4 周强, 李起鸿, 杨柳. 骨髓间充质干细胞及在软骨组织工程中的研究进展. 临床骨科杂志, 2001, 4: 319-323.
- 5 郑磊, 王前, 裴国献. 电磁方法促进骨愈合的机制探讨——骨生长因子. 国外医学生物医学工程分册, 1999, 22: 153-158.
- 6 王亦璠, 主编. 骨与关节损伤. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002. 158-159.
- 7 Nagai M, Ots M. Pulsing electromagnetic fields stimulates mRNA expression of bone morphogenetic protein-2 and 4. J Dent Res, 1994, 73: 1601-1605.
- 8 Zhuang H, Wang W, Seldes RM, et al. Electrical stimulation induces the level of TGF- β_1 mRNA in osteoblastic cells by a mechanism involving calcium/calmodulin pathway. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 237: 225-229.

(收稿日期: 2003-12-23)

(本文编辑: 吴 倩)

· 消息 ·

近期国际康复会议

Towards Global Partnerships: Working together for Effective Clinical Practice, An international conference organised by the *International Journal of Therapy and Rehabilitation*, 25-27 August, 2004, Corinthia San Gorg Hotel, Malta.

Contact: tania@markallengroup.com

Rehabilitation in Vascular Diseases of Central Nervous System, 1-4 September, 2004, Rzeszów (south-east Poland).

Visit: www.szpital2.rzeszow.pl

3rd World Congress of the World Institute of Pain, 22-25 September, 2004, Barcelona, Spain.

Contact: info@clinicadeldolor.com

3rd ISPRM World Congress, 10-14 April, 2005 in Sao Paolo, Brazil.

Visit: www.isprm.org/brazil

5th Mediterranean Congress on PM&R, September 30-October 03, 2004, Antalya, Turkey.

Visit: www.medcongress.org or contact Pr. Tansu at Arasil, tansu@surf.net.tr

19th Annual Congress of the Société Française de Médecine Physique et de Réadaptation, September 30 -October 2, 2004, Cité de Sciences & de L'industrie, Paris, France.

Contact: sofmerparis2004@rth.ap-hop-paris.fr

66th Annual Assembly of the American Academy of Physical Medicine and Rehabilitation (AAPM&R), 07-10 October, 2004, Phoenix, Arizona, USA.

Visit: www.aaprmr.org

5th Interdisciplinary World Congress on Low Back & Pelvic Pain, 10-13 November, 2004, Melbourne, Australia.

Visit: www.worldcongresslbp.com

11th World Congress on Pain (IASP), 21-26 August, 2005, Sydney, Australia.

Visit: www.iasp-pain.org

43rd Annual Scientific Meeting of the ISCOS, International Spinal Cord Society, 27-30 September, 2004, Athens, Greece.

Visit: www.triaenatours.gr