

不同强度低频正弦交变电磁场对大鼠骨髓间充质干细胞成骨性分化的影响

程国政 李志锋 周建 韦哲 陈克明

中图分类号: R687 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2010)08-0558-05

摘要: 目的 研究不同强度低频正弦交变电磁场(Sinusoidal electromagnetic fields, SEMFs)对体外培养大鼠骨髓间充质干细胞(rat Mesenchymal stem cells, rMSCs)成骨性分化的影响,从中筛选出最佳强度参数。方法 原代培养大鼠骨髓间充质干细胞,每天在频率为 50 Hz,强度为 0.2 mT、0.6 mT、1.0 mT、1.4 mT、1.8 mT、2.2 mT、2.6 mT、3.0 mT 的磁场环境中照射 30 min。检测细胞碱性磷酸酶活性、骨钙素分泌量和钙化结节数;并在照射后 6、9、12、24 h 提取细胞总 RNA,用 Real-time PCR 法检测成骨性分化基因 Runx2/Cbfa1 表达情况。结果 磁场干预后细胞呈漩涡状排列和生长,1.8 mT 磁场强度明显促进 rMSCs 的成骨性分化,表现在此组的 ALP 活性、骨钙素分泌量、钙化结节数和 Runx2/Cbfa1 基因的表达量均高于其他组,亦显著高于对照组($P < 0.05$)。结论 在 50 Hz、0.2 ~ 3.0 mT 范围内,1.8 mT 最能促进骨髓间充质干细胞的成骨性分化,是此范围内最佳的治疗用磁场参数。

关键词: 正弦电磁场; 骨髓间充质干细胞; 成骨性分化

Effects of low frequency sinusoidal electromagnetic fields at different intensity on osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells CHENG Guozheng, LI Zhifeng, ZHOU

Jian, et al. Institute of Orthopedics, Lanzhou Military General Hospital, Lanzhou 730050, China

Corresponding author: CHEN Keming, Email: chkming@yahoo.com.cn

Abstract: **Objective** To investigate the effect of low frequency sinusoidal electromagnetic fields (SEMFs) at different intensities on the osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells (rMSCs) in vitro, and to choose the best intensity parameter. **Methods** Primary rat bone marrow mesenchymal stem cells were obtained from Wistar rats. They were exposed to sinusoidal electromagnetic fields with 50Hz frequency and 0.2mT, 0.6mT, 1.0mT, 1.4mT, 1.8mT, 2.2mT, 2.6mT and 3.0mT intensity, respectively, 30min per day. The osteogenic differentiation was assayed by measuring alkaline phosphatase activity (ALP), osteocalcin secretion and mineralized bone nodules. Total cellular RNA was extracted after 6, 9, 12 and 24 hours culturing and Runx2/Cbfa1 expression was examined using Real-time PCR. **Results** rMSCs were found to spread in a circinate shape after low frequency sinusoidal electromagnetic fields treatment. 1.8mT intensity strongly enhanced the osteogenic differentiation of rMSCs, indicated by significantly increased ALP activity, osteocalcin secretion, the number of mineralized bone nodules, and Runx2/Cbfa1 expression, comparing to the control and other groups. **Conclusion** Frequency sinusoidal electromagnetic fields at 50Hz and 0.2 ~ 3.0mT enhances the osteogenic differentiation of rMSCs. Among other frequencies, 1.8mT has the strongest effect on the osteogenic differentiation of rMSCs, indicating that it may be the optimal intensity for the clinical application.

Key words: Sinusoidal electromagnetic fields; Bone marrow mesenchymal stem cells; Osteogenic differentiation

基金项目: 甘肃省科技计划资助项目(092NKDA025)

作者单位: 730050 兰州,兰州军区兰州总医院骨科研究所(程国政、李志锋、周建、陈克明);兰州军区兰州总医院医学工程科(韦哲)

通讯作者: 陈克明, Email: chkming@yahoo.com.cn

目前,临床治疗骨质疏松症多采用药物疗法,该疗法在缓解症状的同时,其毒副作用也引起了人们的关注。随着生物医学工程学的发展,电磁场的生物效应在临床上的广泛应用^[1-4]为骨质疏松症的防治提供了一种新的思路。虽然国内外的大量研究结果表明电磁场对骨质疏松症具有良好的治疗作用,但是由于不同的研究者所采用的电磁场类型、参数、实验条件、实验对象及实验目的都不相同,所得到的实验结果也不尽一致^[5-8]。本文系统地研究了固定频率(50 Hz)不同强度的交变电磁场对骨髓间充质干细胞成骨性分化的影响,以期寻找最佳的参数配置,并为探讨电磁场抗骨质疏松症的分子机理提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

SPF 级 Wistar 大鼠由甘肃中医学院动物实验中心提供(动物质量合格证号 SCXK 甘 2004-0006-152),DMEM/F₁₂ 培养基为 Gibco 公司产品,甘油磷酸钠,抗坏血酸,地塞米松,均购自 Sigma 公司,胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS)由兰州民海生物工程有限公司生产,碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)检测试剂盒为南京建成生物工程研究所产品,骨钙素 ELISA 检测试剂盒(ids, UK), Real-time PCR 试剂盒由大连宝生物公司(TakaRa)提供,所需引物均由上海生物工程有限公司(Sangon)合成。

1.2 电磁发生仪

实验所用正弦交变电磁发生仪由兰州军区兰州总医院骨科研究所与医学工程实验室共同研制,内径 120 mm,频率固定 50 Hz,磁感应强度 0~20 mT 精确可调,时间 0~60 min 连续可调。经高斯计检测,磁场环境稳定。电磁发生装置可放入细胞培养箱内,由导线与外部控制装置相连。实验期间,培养箱内温度始终处于 37℃。

1.3 大鼠骨髓间充质干细胞的培养

大鼠骨髓间充质干细胞(Rat mesenchymal stem cells, rMSCs)的培养方法同文献报道^[9]。体重 130 g 左右的 Wistar 大鼠脱颈处死后,75% 酒精中浸泡 15 min,在无菌超净工作台中取出后肢股骨和胫骨,冲出骨髓并悬浮于含 10% FBS 的 DMEM/F₁₂ 培养基中,37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养。

1.4 分组、成骨性诱导与电磁场干预

原代细胞按 2×10^4 /ml 的浓度接种于 27 只中皿中,每组 3 只共分为 9 组(含对照组),2 天后换

液,待细胞接近融合时换入诱导性培养液(10 mmol/L 的 β -甘油磷酸钠、 1×10^{-7} mol/L 地塞米松、50 μ g/ml 抗坏血酸),诱导当天在频率为 50 Hz,强度分别为 0.0 mT、0.2 mT、0.6 mT、1.0 mT、1.4 mT、1.8 mT、2.2 mT、2.6 mT、3.0 mT 的磁场环境中照射 30 min,对照组的电磁场强度为 0.0 mT。

1.5 细胞碱性磷酸酶活性

于电磁场干预、成骨性诱导培养的第 9 d 将培养液吸出,PBS 漂洗两次,按碱性磷酸酶(ALP)试剂盒操作步骤加入 500 μ l 基质液,37℃ 水浴 15 min 后加入 750 μ l 显色液,立即用紫外分光光度计测定碱性磷酸酶活性。

1.6 骨钙素含量

于电磁场干预、诱导培养后每 4 天更换一次培养液,每次留取 1 ml 旧培养液冻存于 -20℃,采用大鼠骨钙素放射免疫分析试剂盒(Rat-MID™ Osteocalcin EIA, Immunodiagnostic Systems Ltd, UK)进行骨钙素含量测定^[10]。

1.7 成骨性分化基因

于电磁场干预、诱导培养后 6、9、12、24 h 提取细胞总 RNA,琼脂糖电泳检测其完整性。测定其在 260 nm、280 nm、320 nm 处的吸光度值,得其浓度,按照 TakaRa 公司提供的 Prime Script™ RT reagent Kit 配制 20 μ l 反转录反应体系;使用 SYBR Premix Ex Taq™ Real-time PCR 试剂盒配制 20 μ l PCR 反应体系,采用实时荧光定量 PCR 法检测 Runx-2 基因表达情况。反应条件:95℃ 预变性 30 s,95℃ 变性 5 s,60℃ 退火 31 s,共进行 40 个循环。Runx2/Cbfa1 上游引物:5'-GCC TAC TTA CCC GTC TGA CTTT-3',下游引物:5'-GCC CAC TAT TGC CAA CTGC-3',扩增长度为 131 bp;内参照基因 GAPDH 上游引物:5'-GGC ACA GTC AAG GCT GAG AATG-3',下游引物:5'-ATG GTG GTG AAG ACG CCA GTA-3',扩增长度为 143 bp。

1.8 钙化结节数

于电磁场干预、诱导培养的第 14 d 将培养液吸出,PBS 洗两遍,10% 甲醛固定 5 min,蒸馏水漂洗 3 次。加入 0.1% 茜素红-Tris-HCl 染色液(pH 8.3),37℃ 水浴 30~60 min,蒸馏水漂洗,干燥,比较阳性克隆的多少。

1.9 统计学处理

检测结果以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组均数比较采用 SPSS 16.0 进行单因素方差分析(ONE-WAY ANOVA)方法,组间比较选用 LSD 法, $P <$

0.05 为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 表示差异有显著统计学意义。

2 结果

2.1 MSCs 形态学观察

培养 48 h, MSCs 呈三角形、纺锤形贴壁生长 (A), 培养第 4 天, 细胞形成克隆单位 (colony forming unit-fibroblast, CFU-F) (B), 第 9 天, 成骨性诱导培养并经电磁场干预后的细胞呈漩涡状生长 (C), 第 14 天, 形成钙化结节 (D)。见图 1。

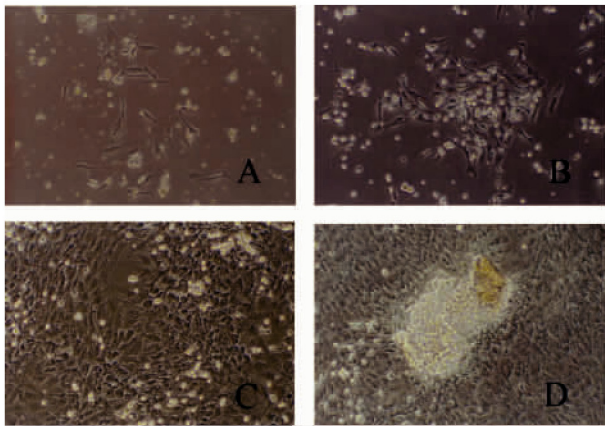


图 1 The rat mesenchymal stem cells after different days of culture (100 ×). Circinate growth has been observed in SEMFs-induced rMSCs culture. This phenomena was involved in cell migration.

2.2 ALP 活性

MSCs 经成骨性诱导培养后第 9 天用碱性磷酸酶试剂盒测定 ALP 活性, 电磁场干预组均高于对照组, 除 0.2 mT、0.6 mT 组外, 均有统计学意义。其中 1.8 mT 组比其他各组明显高于对照组, 具有显著的统计学意义, 提示此强度有可能就为最佳治疗强度。如图 2。

2.3 骨钙素含量

由表 1 可见, 电磁场干预组骨钙素分泌量均高于对照组。与对照组相比: 0.2 mT、0.6 mT 强度组始终无统计学意义; 3.0 mT 强度组始终有统计学意义; 1.0 mT 强度组仅在 12 ~ 16 d 时有统计学意义; 2.2 mT、2.6 mT 强度组在 4 ~ 8 d 时有显著统计学意义, 在其他干预阶段有统计学意义; 1.4 mT 强度组在 4 ~ 8 d 和 12 ~ 16 d 时有统计学意义, 在 8 ~ 12 d 时有显著统计学意义; 1.8 mT 强度组在电磁场干预初期 (0 ~ 4 d) 时, 具有统计学意义, 随着干预时间的延长该强度组始终显著高于对照组。

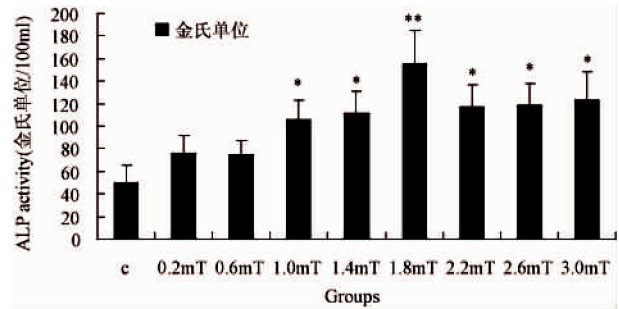


图 2 The intracellular alkaline phosphatase activity of MSCs after different days of osteogenic induction culture and SEMFs exposed. Alkaline phosphatase is a sign of enzyme of osteoblast. The higher activity indicates the more active osteogenic differentiation of MSCs

表 1 The value of osteocalcin secretion in culture media at different groups ($\bar{x} \pm s$)

Group	0 ~ 4 d	4 ~ 8 d	8 ~ 12 d	12 ~ 16 d
C	0.67 ± 0.21	2.01 ± 0.19	4.09 ± 0.32	6.52 ± 0.28
0.2 mT	0.81 ± 0.14	2.07 ± 0.21	4.58 ± 0.31	6.78 ± 0.22
0.6 mT	0.88 ± 0.22	2.87 ± 0.17	5.79 ± 0.28	8.39 ± 0.12
1.0 mT	0.93 ± 0.13	3.31 ± 0.24	7.25 ± 0.13	12.87 ± 0.23*
1.4 mT	1.17 ± 0.26	4.89 ± 0.24*	10.03 ± 0.34**	14.08 ± 0.19*
1.8 mT	1.37 ± 0.25*	6.92 ± 0.18**	12.31 ± 0.22**	19.77 ± 0.22**
2.2 mT	1.30 ± 0.23*	6.77 ± 0.26**	11.87 ± 0.24*	18.66 ± 0.22*
2.6 mT	1.25 ± 0.27*	6.06 ± 0.11**	9.99 ± 0.30*	18.59 ± 0.17*
3.0 mT	1.27 ± 0.18*	5.99 ± 0.25*	9.87 ± 0.28*	16.33 ± 0.15*

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ VS control

2.4 Runx2/Cbfa1 基因表达

Runx2 和 GAPDH 两基因的扩增曲线都呈“S”型, 反应体系不含 PCR 阻害物质; 溶解曲线均只有一特异性峰, 无引物二聚体等非特异性扩增。两基因标准曲线的相关系数 (r^2) 分别为 0.998309 和 0.998464 均大于 0.98。不同时间点, Real-time PCR 检测结果显示: 电磁场干预组 Runx2 基因的表达量均高于对照组, 12 h 时仅 1.8 mT 组与对照组相比有统计学意义; 24 h 时 1.4 mT、1.8 mT、2.2 mT、2.6 mT 组与对照组相比有统计学意义, 其中 1.8 mT 组有显著的统计学意义。如图 3、4。

2.5 钙化结节

由图可见, 电磁场干预组的钙化结节均比对照组多, 其中 1.4 mT、1.8 mT、2.2 mT 组明显高于对照组, 尤以 1.8 mT 组钙化结节面积大、数目多与对照组差别最为明显; 但 0.2 mT、0.6 mT、1.0 mT、2.6 mT、3.0 mT 组间无显著差别。如图 5。

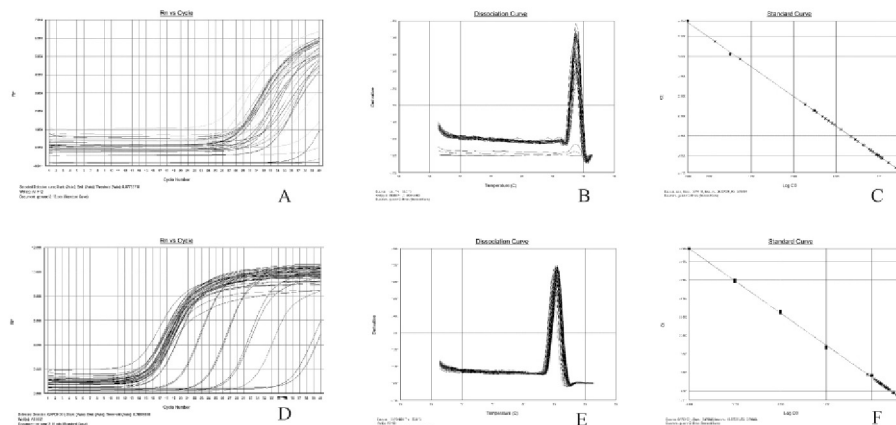


图3 Runx2 和 GAPDH 基因扩增在 rMSCs 所示 as described in figure A, B, C and figure D, E, F, respectively by Real-time PCR. Amplification plot (A,D); Dissociation Curve (B,E); Standard Curve (C,F)

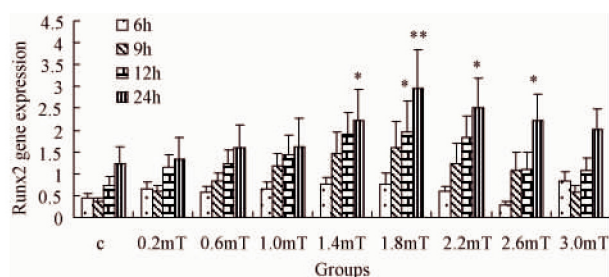


图4 Runx2 基因表达在 rMSCs 后不同小时和 SEMFs 暴露不同强度。Runx2, 或 Cbfa1 一个 homolog of the Drosophila Runt protein serves both as the earliest transcriptional regulator of osteoblast differentiation and as controller of bone formation by already differentiated osteoblast

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ VS control

3 讨论

近年来,大量研究表明电磁场具有“频率窗”和“强度窗”的特点^[11],即只有在一定范围内,其频率和强度达到一定数值时才会产生某种特定的生物效应。Lee 等^[12]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(10~100 Hz),且潘子昂等^[13]也发现电磁场的成骨效应集中在 75 Hz 以下频段。龚尔璋等^[14]认为磁感应强度在 100 Gs (10 mT) 以内的低强度电磁场其生物效应有见效快、维持时间长、无副作用等优点。故我们采用频率 50 Hz、10 mT 以内的正弦交变电磁场 (Sinusoidal electromagnetic fields, SEMFs) 进行辐射,以探讨此类电磁场的生物效应及作用机理。

本课题组在前期实验研究中已经采用 50 Hz,

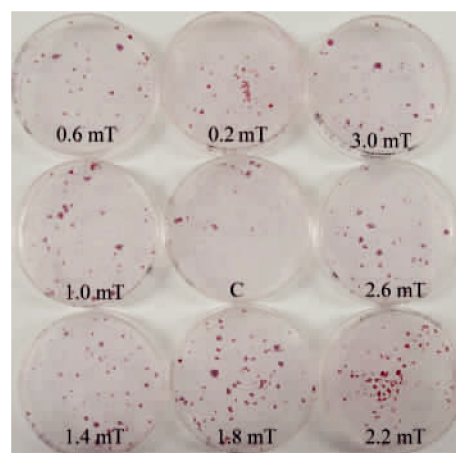


图5 矿化结节经茜素红染色。它们被比较在不同强度组和对照。一个红点代表一个钙化结节单位。更多的红点指示更活跃的成骨分化

强度分别为 0.14 mT、0.16 mT、0.18 mT 的电磁场每天干预去势雌性大鼠 30 min,90 天后测定大鼠全身及局部骨密度,并得到了较满意的结果^[15]。但动物实验存在周期长、可控性及重复性差等原因,因此为探究电磁场的作用机理细胞实验更为妥当。

骨髓中除了造血干细胞外,还有一类起源于中胚层且未分化的间充质干细胞。该类细胞作为一种成体干细胞,具有极大的可塑性和成骨性分化的潜能,因此对其成骨性分化研究为探究骨质疏松症的细胞机理具有极其重要的意义。我们以前期实验为基础,以 0.2 mT 作为起始干预强度,以 0.4 mT 为强度间距,选用 0.2 mT、0.6 mT、1.0 mT、1.4 mT、1.8 mT、2.2 mT、2.6 mT、3.0 mT 这 8 个磁感应强度

每天干预大鼠骨髓间充质干细胞(Rat mesenchymal stem cells, rMSCs) 30 min, 以观察其对 rMSCs 成骨性分化的影响。

碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)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,是 rMSCs 进行成骨性分化的早期标志之一^[16],ALP 活性越高,表明向成骨性分化的 rMSCs 越多。骨钙素(Osteocalcin, 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^[17]。因此,ALP 和 OC 是反映 rMSCs 体外分化为成熟骨细胞及基质钙化的两个重要指标。Runx2/Cbfa1 是一种成骨细胞早期转录因子,调节着已分化成骨细胞的骨形成过程^[18],如阻断成熟成骨细胞中 Runx2 的表达,可使成骨细胞标志物 I 型胶原表达下降,并阻断成骨过程^[19]。实验结果显示电磁场干预组 ALP 活性、OC 分泌量、Runx2/Cbfa1 基因表达量以及钙化结节数均高于对照组,特别是 1.4 mT ~ 2.2 mT 组。其中 ALP 活性在 0.2 mT ~ 1.8 mT 之间呈上升趋势,1.8 mT 达到最高,在 1.8 mT ~ 3.0 mT 有所下降,这种“强度窗”效应在 OC 分泌量、Runx2/Cbfa1 基因表达量以及钙化结节计数结果中均得到了验证。诸成骨性分化指标实验结果表明在 50 Hz、0.2 ~ 3.0 mT 范围内,1.8 mT 最能促进骨髓间充质干细胞的成骨性分化,是此范围内最佳的治疗强度。

本实验结果表明,正弦交变电磁场的确具有促进骨髓间充质干细胞成骨性分化的生理功能,且其生物效应存在强度窗口,窗口效应一方面表明电磁场对骨髓间充质干细胞影响的非线性特征,另一方面也揭示了电磁场生物效应并非是单一途径。本课题组将以此为基础,进一步从信号转导的角度,多途径、多方位的去探究电磁场抗骨质疏松症的分子机理。

【参 考 文 献】

- [1] Friedenber ZB, Harlow M C, Brighton CT. Bioelectric potentials in bone. J Bone Joint Surg, 1966, 48(5):915-923.
- [2] Bassett CA, Pilla AA, Pawluk RJ. A non-operative salvage of surgically-resistant pseudarthroses and non-unions by pulsing electromagnetic fields: A preliminary report. Clin Orthop Relat Res, 1977, 124:128-143.
- [3] Adey WR. Electromagnetic fields, the modulation of brain tissue functions—a possible paradigm shift in biology. In: Smith B, Adelman G, editors. International encyclopedia of neuroscience. 3rd ed. New York: Elsevier, 2004.
- [4] Del Seppia C, Ghione S, Luschi P, et al. Pain perception and electromagnetic fields. Neurosci Biobehav Rev, 2007, 31:619-642.
- [5] Chang K, Chang WH, Huang S, et al. Pulsed electromagnetic fields stimulation affects osteoclast formation by modulation of osteoprotegerin, RANK ligand and macrophage colony-stimulating factor. J Orthop Res, 2005, 23:1308-1314.
- [6] Chang WHS, Chen LT, Sun JS, et al. Effect of pulse burst electromagnetic field stimulation on osteoblast cell activities. Bioelectromagnetics, 2004, 25:457-465.
- [7] Chang K, Chang WHS, Tsai MT, et al. Pulsed electromagnetic fields accelerate apoptotic rate in osteoclasts. Connect Tissue Res, 2006, 47:222-228.
- [8] Sontag W, Kalka D. No effect of pulsed electromagnetic fields on PC12 and HL-60 cells Radiat Environ Biophys, 2006, 45: 63-71.
- [9] Chen KM, Ge BF, Liu XY, et al. Directed differentiation of rat bone marrow stromal cells into osteoblast *in vitro*. J Lanzhou University (Natural Science), 2003, 39(1):69-73 (in Chinese).
- [10] Chen KM, Ge BF, Ma HP, et al. The serum of rats administered flavonoid extract from Epimedium sagittatum but not the extract itself enhances the development of rat calvarial osteoblast-like cells *in vitro*. Pharmazie, 2004, 59(1):61-64.
- [11] Frohlich H. What are non-thermal electric biological effects. Bioelectromagnetics, 1982, 3(1):45-46.
- [12] Lee J H, McLeod KJ. Morphologic responses of osteoblast like cells in monolayer culture to ELF electromagnetic fields. Bioelectromagnetics, 2000, 21:129-136.
- [13] Pan ZA, Li FG, Liu ZH. Pulsed electromagnetic fields therapy and its application in preventing and curing osteoporosis. Chinese Journal of Osteoporosis, 2005, 11(3):384-386 (in Chinese).
- [14] 龚尔璋, 胡新珉. 医用物理学. 北京: 科学技术文献出版社, 1993.
- [15] Li ZF, Cheng GZ, Zhai YK, et al. Effect of low intensity pulsed electromagnetic fields on bone mineral density of different anatomic region in ovariectomized rats. Chin J Osteoporos, 2009, 15(12):882-884 (in Chinese).
- [16] Chen KM, Ge BF, Ma HP, et al. Effects of icariin on the osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells *in vitro*. Chin J Osteoporos, 2008, 14(9):642-645 (in Chinese).
- [17] Levy MM, Joyner CJ, Viridi AS, et al. Osteoprogenitor cells of mature human skeletal muscle tissue: an *in vitro* study. Bone, 2001, 29:317-322.
- [18] Gerard Karsenty, Minireview: Transcriptional Control of Osteoblast Differentiation, Endocrinology, 2005, 142(7):72731-72733.
- [19] Wang GH, Li QF, et al. Cbfa1/Runx2 and regulation of osteoblast differentiation. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2005, 17(1):40-44 (in Chinese).

(收稿日期: 2010-03-22)