

脉冲电磁场对大鼠破骨细胞功能分子的影响

黄晶晶 杨福军 赵吉 孙元明 刘晓秋 沈秀 赵阿津

中图分类号: R454.1; R543 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2011)12-1041-04

摘要: **目的** 研究脉冲电磁场(pulsed electromagnetic fields, PEMFs)对大鼠破骨细胞的作用。**方法** 取 10w 龄雌性 SD 大鼠随机分为三组:PEMFs 组、Control 组和 Sham 组;其中 PEMFs 组、Control 组进行双侧卵巢切除手术,Sham 组不切除卵巢。术后 12w 对 PEMFs 组大鼠进行 PEMFs 作用(70Hz, 2mT), Control 组和 Sham 组不进行 PEMFs 作用。作用结束后,取大鼠股骨骨髓,进行体外破骨细胞诱导培养。7 天后分别进行破骨细胞的抗酒石酸酸性磷酸酶(Tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP)检测和整合素 $\alpha_v\beta_3$ 、NF- κ B 受体激活子(receptor activator of NF- κ B, RANK)、组织蛋白酶 K(cathepsin K)免疫荧光染色检测。**结果** 经 PEMFs 作用后,TRAP 检测显示破骨细胞形态;免疫荧光染色显示阳性破骨细胞也明显减少。**结论** PEMFs 对破骨细胞功能分子的表达有抑制作用,提示 PEMFs 作用可以抑制 SD 大鼠破骨细胞的骨吸收活性。

关键词: 脉冲电磁场; 去卵巢大鼠; 破骨细胞

Effect of pulsed electromagnetic fields on rat osteoclasts HUANG Jingjing, YANG Fujun, ZHAO Ji, et al. Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Tianjing 300192, China

Corresponding author: YANG Fujun, Email: fjiang32@yahoo.com.cn

Abstract: **Objective** To study the effect of pulsed electromagnetic fields (PEMFs) on rat osteoclast rats.

Methods Ten-week-old female SD rats were randomly divided into three groups: PEMFs group, CONTROL group, and Sham group. The rats of PEMFs group and CONTROL group were ovariectomized bilaterally. The rats of Sham group were sham-ovariectomized. The rats of PEMFs group were exposed to PEMFs 12 weeks after ovariectomy. However, the rats of the other groups were not treated with PEMFs. Femoral bone marrow of SD rats was collected after PEMFs. The osteoclasts were induced and cultured in vitro. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) was measured after 7 days. Immunofluorescence stainings of integrin $\alpha_v\beta_3$, receptor activator of NF- κ B (RANK), and cathepsin K were also measured respectively. **Results** After exposure to PEMFs, the TRAP measurement showed the morphology of the osteoclast. The immunofluorescence staining showed that positive osteoclasts were significantly reduced. **Conclusion** PEMFs has inhibitive effect on osteoclasts and can inhibit the bone resorbing activity of the osteoclast in SD rats.

Key words: PEMFs; Ovariectomized rat; Osteoclasts

骨质疏松(OP)是以单位体积内骨组织量减少为特点的代谢性骨病。成骨细胞和破骨细胞是骨代

谢过程中维持骨量的两种主要细胞。成骨细胞是骨形成的主要功能细胞,负责骨基质的合成、分泌和矿化进而形成新骨;破骨细胞是骨吸收的主要功能细胞,负责骨基质的降解和消化,形成骨吸收陷窝。当骨吸收大于骨形成时,可以引起骨质丢失,进而引发骨质疏松。

OP是老年人群中一种常见的多发病。我国是世界上老年人口最多的国家,60岁以上的老人占我国人口总数的13%以上,随人类寿命的延长和人口

基金项目:天津市应用基础及前沿技术研究计划(08JCYBJC08500);国家自然科学基金(30970867);北京协和医学院研究生创新基金项目(院1123);中国医学科学院放射医学研究所基金(ST1108)

作者单位:300192 天津,北京协和医学院,中国医学科学院放射医学研究所

通讯作者:杨福军,Email: fjiang32@yahoo.com.cn

的老龄化,OP 发病率有逐年上升趋势。寻找有效的预防和治疗骨质疏松的方法已成为我国亟待研究的课题。

目前,骨质疏松治疗药物主要分为两大类:抑制破骨细胞活性以阻断骨吸收的抗骨吸收药和促进成骨细胞活性以刺激骨形成的促骨形成药。由于现有药物或是存在有效治疗期限的限制(如双膦酸盐、甲状旁腺激素),或是给药途径或费用的限制(甲状旁腺激素)^[1],因而,研究开发新的治疗手段进行综合防治十分必要。

近年来,关于骨组织对低频电磁场的反应方面已经开展了许多工作^[2]。发现低频、低能量 PEMFs 对许多生物组织(如骨和软骨)发挥作用^[3]。体内和体外研究表明,低频 PEMFs 可以促进骨组织的自我重建^[2]。表现在 PEMFs 可以改变骨细胞的增殖、分化,细胞外基质合成和刺激促成骨作用细胞因子的产生^[3]。因此,PEMFs 已应用于一些骨疾患的治疗,如骨质疏松、骨坏死、骨折和骨不连等^[4,5]。骨重建的过程是在骨吸收处先出现破骨细胞产生骨吸收,破骨细胞消失后(已证实破骨细胞消失是细胞凋亡的结果^[6]),出现由间质干细胞(Mesenchymal Stem Cells, MSCs)形成的成骨细胞,形成新骨,再被内衬细胞覆盖^[7]。目前,关于 PEMFs 治疗骨质疏松机理的研究方面,对成骨细胞的研究较多,而对于骨重建中首先出现的破骨细胞的影响研究较少。

本文通过观察 PEMFs 对破骨细胞的影响,继而探讨 PEMFs 治疗骨质疏松的机理。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与实验仪器

α -MEM 培养基(Gibco 公司),胎牛血清(HyClone 公司),M-CSF(PEPROTECH 公司),GM-CSF(PEPROTECH 公司),1,25-(OH)₂-Vitamin D₃(sigma 公司),RANKL(PEPROTECH 公司),地塞米松(天津金耀氨基酸有限公司),抗酒石酸酸性磷酸酶检测试剂盒(中国医学科学院血研所科技公司),大鼠淋巴细胞分离液(天津灏洋生物制品科技有限公司),羊血清工作液(中山金桥公司), α , β ₃ antibody(ABCAM 公司),RANK antibody(Santa Cruz 公司),cathepsin K antibody(ABCAM 公司),二抗(中山金桥公司),Mounting Medium(Vector Laboratories)。

超净工作台(苏州净化 SW-CJ-2FD),倒置显微镜(OLYMPUS IM),荧光显微镜(NIKON ECLIPSE

90i),CO₂ 培养箱(NAPCO MODEL 5410),脉冲电磁场发生仪(为中国医学科学院放射医学研究所自行研制开发,峰值磁场可调范围:1~40mT,频率可调范围:70~250 Hz)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞获得和培养:10w 龄雌性 SD 大鼠随机分为三组:PEMFs 组、Control 组和 Sham 组。每组 7 只大鼠,PEMFs 组、Control 组进行双侧卵巢切除手术,Sham 组不切除卵巢,只是切除卵巢附近相同体积的脂肪组织。术后 12w,SD 大鼠已成熟,骨质疏松模型已形成。对 PEMFs 组大鼠进行 PEMFs 作用,作用方式为 2mT,70Hz,隔天作用 1 次,每次 1h,连续作用 8w。Control 组和 Sham 组不进行 PEMFs 作用,隔天放入相同环境中 1h。

作用 8w 后(此时大鼠周龄为 30w),乙醚麻醉、断颈处死大鼠,取其股骨骨髓。经大鼠淋巴细胞分离液分离出单核细胞后进行培养。培养体系为含 10% 胎牛血清的 α -MEM, M-CSF 20ng/ml, GM-CSF 200U/ml, 1,25-(OH)₂-Vitamin D₃ 10⁻⁸ mol/L, 地塞米松 10⁻⁷ mol/L, RANKL 10ng/ml, 37℃, 5% CO₂。细胞接种于 24 孔板,每孔铺板前预先放入一玻片以制作细胞爬片。

1.2.2 结果观察

(1) TRAP 检测

根据 TRAP 染色试剂盒说明书进行。将细胞爬片取出固定,滴加作用液数滴,于 37℃ 湿盒内孵育 60min,流水冲净后滴加复染液复染,1% 盐酸酒精分化,0.5% 氨水浸泡 1~5s,晾干后中性树脂封片。

(2) 免疫荧光染色检测

PBS 漂洗细胞爬片,2% 多聚甲醛室温固定。Triton-X100 破膜后,加封闭液。分别加一抗:整合素 α , β ₃、NF- κ B 受体激活子(receptor activator of NF- κ B, RANK)、组织蛋白酶 K(cathepsin K),阴凉处静置 1~2h。荧光标记二抗,室温下避光静置 1h。PBS 清洗、封片。

1.3 统计学分析

所有数据采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,数据以均数 $\pm$ 标准差表示,两样本比较采用独立样本 *t* 检验,*P* < 0.05 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 TRAP 检测结果

破骨细胞内抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)活性部位呈现红色沉淀,细胞核染色蓝色(图 1)。

2.2 免疫荧光染色检测结果

荧光显微镜下(200×)每张玻片随机选取 5 个视野,计数视野中的细胞总数与阳性破骨细胞数,计算阳性破骨细胞百分数,见表 1。与只加一抗或只加二抗的玻片做对比,阳性破骨细胞在荧光显微镜下体积较大,内有多个细胞核,荧光显色十分明显(见图 2~4)。

阳性破骨细胞百分数(%) = 同一视野内阳性破骨细胞数/同一视野内破骨细胞总数 × 100%

表 1 免疫荧光染色检测结果示阳性破骨细胞百分数(%)

组别	$\alpha_v\beta_3$	RANK	cathepsin K
PEMFs 组	16.9 ± 5.8	17.6 ± 9.0	11.3 ± 2.4
Control 组	28.2 ± 14.7	43.8 ± 14.3	22.0 ± 3.5
Sham 组	19.3 ± 7.7	36.1 ± 5.7	14.0 ± 4.7

表 2 PEMFs 组和 Control 组相比较, $\alpha_v\beta_3$ 、RANK、cathepsin K 经 PEMFs 作用后,阳性破骨细胞均明显减少;Control 组与 Sham 组的 $\alpha_v\beta_3$ 、RANK、cathepsin K 相比,均减少。

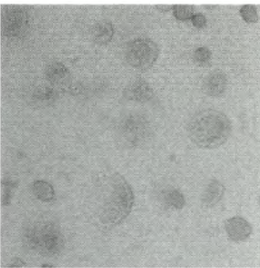


图 1 破骨细胞 TRAP 染色(×100)

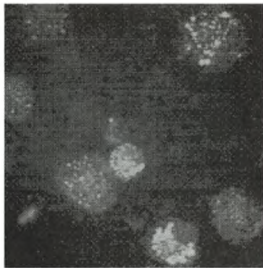


图 2 破骨细胞 RANK (×200)

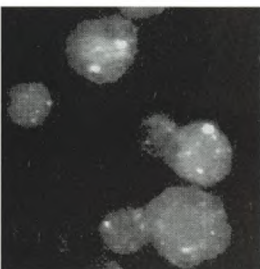


图 3 破骨细胞 $\alpha_v\beta_3$ (×200)

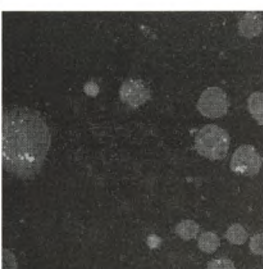


图 4 破骨细胞 cathepsin K(×200)

3 讨论

PEMFs 治疗具有无创性、见效快、操作简便、适用范围广、可长期使用、无副作用等优点,在临床上的应用日趋广泛。过去几十年中,已有许多成功治疗骨不连和骨折愈合等骨科疾病的报道。Tabrah^[8]

等人研究了 PEMFs 对绝经后妇女桡骨骨密度的影响,发现骨密度在治疗后有显著提高。Massari^[9] 等对股骨头坏死患者进行跟踪研究,发现短期 PEMFs 刺激可能保护关节软骨,长期 PEMFs 刺激可能促进骨坏死区域的成骨活力。

PEMFs 对于机体多个部位有影响作用。脉冲电磁场疗法对骨病的治疗作用已得到肯定,其适应证也进一步扩展到创伤修复、神经再生、糖尿病及心脑血管疾病等,甚至有应用 PEMF 治疗肿瘤的报道。王爱民等^[10]通过实验发现 PEMFs 能显著地增强骨细胞、纤维细胞、血管内皮细胞、神经细胞等多种细胞和组织的活力,从而推测 PEMFs 可能对细胞某个共有环节,如细胞膜蛋白 cAMP、DNA 等发生催化促进作用,这种作用对损伤后处于修复状态的细胞尤为突出。PEMFs 作用是整体且复杂的,至今 PEMFs 治疗 OP 的作用机制还不十分明确。本实验选取 OC 作为研究对象,着眼于研究 PEMFs 对于 OC 细胞分化和主要功能的影响。

有研究表明 PEMFs 能加速破骨细胞凋亡,但 PEMFs 对大鼠活体作用下,对破骨细胞 $\alpha_v\beta_3$ 、RANK、cathepsin K 的作用还未见报道。因此本研究把 $\alpha_v\beta_3$ 、RANK、cathepsin K 作为检测破骨细胞的指标有其重要意义。另外,TRAP 是破骨细胞的标志酶,因而作为检测破骨细胞的重要指标之一。

整合素是破骨细胞上的一类跨膜蛋白,是由 α 、 β 两个亚单位组成的异源二聚体。根据其 α 和 β 亚基的不同又分为多种类型。近年来发现,整合素 $\alpha_v\beta_3$ 在骨吸收中有重要作用,活性 $\alpha_v\beta_3$ 可促使破骨细胞向 $\alpha_v\beta_3$ 配体迁移,并促进骨吸收^[11]。RANK 是位于破骨细胞及其前体细胞表面的 I 型跨膜受体蛋白,从属于肿瘤坏死因子(Tumor necrosis factor, TNF)受体超家族,与 NF- κ B 受体激活子配体(receptor activator of NF- κ B Ligand, RANKL)结合后可激活细胞内的信号转导系统,通过转录因子启动特定基因的表达,合成特异性蛋白质,使前体细胞分化为成熟的破骨细胞^[12]。cathepsin K 是一种溶酶体半胱氨酸蛋白酶,在骨再吸收过程中由破骨细胞特异性表达,而且能有效降解骨细胞外基质。cathepsin K 已经作为骨疾病治疗靶标倍受关注^[13]。

本研究发现,去卵巢大鼠活体接受 PEMFs 作用,应用 $\alpha_v\beta_3$ 、RANK、cathepsin K 免疫荧光染色显示 PEMFs 组较 Control 组阳性表达破骨细胞均明显减少,Control 组阳性破骨细胞较 Sham 组增多,PEMFs 组较 Sham 组阳性细胞数目差异不大。表明

骨质疏松模型大鼠活体在接受 PEMFs 作用后,破骨细胞主要功能分子的阳性表达减少并接近正常值,说明 PEMFs 对骨质疏松时破骨细胞活性具有抑制作用。RANK 表达减少说明前体细胞分化为成熟破骨细胞的数量降低; $\alpha_v\beta_3$ 表达减少说明破骨细胞向 $\alpha_v\beta_3$ 配体迁移受阻,导致骨吸收能力降低;cathepsin K 降低说明破骨细胞表达的功能蛋白量降低,即降解骨细胞外基质的能力降低。上述数据综合说明 PEMFs 对破骨细胞的分化和功能有直接的抑制作用,可以抑制破骨细胞的发育和骨吸收活性有关分子的表达。

通过研究 PEMFs 对 OC 的 $\alpha_v\beta_3$ 、RANK、cathepsin K 的作用,可以更深入的理解破骨细胞在骨代谢过程中尤其是骨质疏松发生、发展过程中的作用机制。对于其信号转导机制透彻的了解,有助于采取科学的治疗手段,从而为骨代谢相关疾病的治疗提供理论指导。

科学研究和临床试验已经证实 PEMFs 是治疗骨质疏松的一种有效方法,而且相对药物治疗来说,PEMFs 治疗具有无创性、见效快等优点,并有显著增加骨形成能力,促进骨愈合的功效^[14]。故其在临床上的应用日趋广泛。目前,治疗骨质疏松所用的参数诸如频率、强度、脉冲等各不相同,还不清楚参数的最佳配置,而且 PEMFs 作用于骨质疏松的机制尚未完全清楚,这些都有待于我们进一步的深入研究。

【参 考 文 献】

- [1] Robert P. Heaney, Robert R. Recker. Combination and Sequential Therapy for Osteoporosis. *The New England Journal of Medicine*, 2005, 353(6): 624-625.
- [2] Chuanyong Qu, Qing-Hua Qin, Yilan Kang. A hypothetical mechanism of bone remodeling and modeling under electromagnetic loads. *Biomaterial*, 2006, 27(11): 4050-57.
- [3] De Mattei M, Fini M, Setti S, et al. Proteoglycan synthesis in bovine articular cartilage explants exposed to different low-frequency low-energy pulsed electromagnetic fields. *OsteoArthritis and Cartilage*, 2007, 15(2): 163-168.
- [4] 姜友昭,陈兵. 脉冲电磁场治疗原发性骨质疏松近期疗效观察. *中国骨质疏松杂志*, 2005, 11(8): 365-367.
- [5] Satter SA, Islam MS, Rabbani KS. Pulsed electromagnetic fields for the treatment of bone fractures. *Bangladesh Med Res council Bull*, 1999, 25(1): 6-10.
- [6] Bouncei E, Silverstein G. Does apoptosis play a role in bone remodeling. *Italian Journal of Mineral and Electrolyte Metabolism*, 1998, 12(1): 1-4.
- [7] Parfitt AM, Mundy GR, Roodman GD, et al. A new model for the regulation of bone resorption, with particular reference to the effects of bisphosphonates. *Bone and Mineral Research*, 1996, 11: 150-159.
- [8] Tabrah FL, Ross P, Hoffmeier M, et al. Clinical report on long-term bone density after short-term EMF application. *Bioelectromagnetics*, 1998, 19(2): 75-78.
- [9] Massari L, Fini M, Cadossi R, et al. Biophysical stimulation with pulsed electromagnetic fields in osteonecrosis of the femoral head. *Bone Joint Surg Am*, 2006, 88: 56-60.
- [10] 王爱民,杜全印. 电磁场诱导关节软骨再生的实验研究. *骨与关节损伤杂志*, 1995, 10(2): 91-93.
- [11] Faccio R, Grano M, Colucci S, et al. Localization and possible role of two different $\alpha\beta_3$ integrin conformations in resting and resorbing osteoclasts. *Cell Sci*, 2002, 115(14): 2919-2929.
- [12] Wei S, Teitelbaum S L, Wang M W, et al. Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand activates nuclear factor- κ B in osteoclast. *Endocrinology*, 2001, 142: 1290-1295.
- [13] Jukka Morko, Riku Kiviranta, Mika T. K., et al. Overexpression of cathepsin K accelerates the resorption cycle and osteoblast differentiation in vitro. *Bone*, 2009(44): 717-728.
- [14] Boopalan PR, Chittaranjan SB, Balamurugan R, et al. Pulsed electromagnetic field (PEMF) treatment for fracture healing. *Curr Orthop Pract*, 2009, 20(4): 423-428.

(收稿日期: 2011-07-15)

脉冲电磁场对大鼠破骨细胞功能分子的影响

作者: [黄晶晶](#), [杨福军](#), [赵吉](#), [孙元明](#), [刘晓秋](#), [沈秀](#), [赵阿津](#)
作者单位: [300192 天津, 北京协和医学院, 中国医学科学院放射医学研究所](#)
刊名: [中国骨质疏松杂志](#) 
英文刊名: [Chinese Journal of Osteoporosis](#)
年, 卷(期): 2011, 17 (12)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201112002.aspx