

脉冲电磁场对大鼠骨髓间充质干细胞活性的影响

张 敏, 李维娜, 高贺奇, 张晓军

第四军医大学生物医学工程系物理教研室, 陕西 西安 710032

【摘要】目的:探讨脉冲电磁场(Pulsed Electromagnetic Field, PEMF)对在二维、三维支架材料条件下培养的大鼠骨髓间充质干细胞(Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells, BMSCs)活性的影响。**方法:**采用频率15 Hz、磁感应强度1 mT的PEMF作用于BMSCs,对于二维培养的BMSCs检测增殖活性和碱性磷酸酶(ALP)活性;对于三维培养的BMSCs检测细胞活性、细胞骨架以及增殖率。**结果:**PEMF处理4 d、7 d可以显著地增加BMSCs的增殖能力($P<0.05$),PEMF处理14 d显著提高了ALP活性($P<0.05$)。PEMF处理不仅能促进接种于支架材料中BMSCs活性和保持其长梭形形态,而且还能显著增加BMSCs在支架材料中的增殖率($P<0.01$)。**结论:**PEMF在15 Hz、1 mT条件下可以显著地促进BMSCs的增殖和成骨分化,而且能够促进BMSCs在骨支架材料中的活性。

【关键词】脉冲电磁场;骨髓间充质干细胞;增殖;组织工程骨

【中图分类号】R454.1

【文献标识码】A

【文章编号】1005-202X(2015)06-0777-04

Effects of pulsed electromagnetic fields on viability of rat bone marrow mesenchymal stem cells

ZHANG Min, LI Wei-na, GAO He-qi, ZHANG Xiao-jun

Department of Physics, School of Biomedical Engineering, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

Abstract: Objective To investigate the effect of pulsed electromagnetic fields (PEMF) on viability of rat bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) cultured in two-dimensional (2D) and three dimensional (3D) scaffolds. **Methods** PEMF of 15 Hz and 1 mT was applied to stimulate BMSCs. The proliferation activity and alkaline phosphatase (ALP) activity of BMSCs cultured in 2D scaffolds and the cell viability, morphology and proliferation rate of BMSCs cultured in 3D scaffolds were examined. **Results** The proliferation ability of BMSCs was promoted after the PEMF simulation for 4 d, 7 d ($P<0.05$) and ALP activity was also significantly improved after the PEMF simulation for 14 d ($P<0.05$). PEMF stimulation promoted the cell viability of BMSCs cultured in scaffolds, maintaining the long spindle shape, and significantly increased the proliferation rate of BMSCs in scaffolds ($P<0.01$). **Conclusion** PEMF of 15 Hz and 1 mT significantly increases the proliferation and osteogenic differentiation of BMSCs, and promotes the cell viability of BMSCs in scaffolds.

Key words: pulsed electromagnetic fields; bone marrow mesenchymal stem cells; proliferation; tissue engineered bone

前言

大范围、大节段骨缺损的修复一直是临床治疗的难点^[1],骨组织工程在治疗临床骨缺损方面,展现出了巨大潜在的应用前景。骨组织工程的核心是建立由细胞和生物材料所构成的三维复合体,但组织工程骨应用于临床仍需要解决两个问题:一是如何快速、有效地扩增足够数量的种子细胞;二是如何使种子细胞在支架材料中保持活性从而形成骨组织。骨髓间充质干

细胞(Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells, BMSCs)具有来源稳定、取材方便、在一定的诱导条件下可向成骨细胞分化,是骨组织工程的理想种子细胞之一^[2-3]。

极低频脉冲电磁场(Pulsed Electromagnetic Field, PEMF)已经广泛应用到骨折、骨不连、骨质疏松等骨相关疾病的治疗中^[4]。研究显示PEMF一方面促进成骨细胞增殖和分化形成骨组织^[5],另一方面通过改善患区的微环境来促进骨质生成^[6]。但目前利用PEMF处理组织工程骨的种子细胞的相关研究较少,而且以往研究显示PEMF能否促进BMSCs增殖和分化为成骨细胞存在争议^[7-8]。本实验旨在研究PEMF对骨组织工程种子细胞——BMSCs增殖、成骨分化的影响,同时检测PEMF对接种于骨支架材料中的BM-

【收稿日期】2015-08-10

【基金项目】国家自然科学基金(51377163, 60901038);陕西省自然科学基金(2014JM4108)

【作者简介】张 敏(1984-),女,硕士研究生。

【通信作者】张晓军(1975-),男,博士,副教授。Tel: 029-84774834; E-mail: zy04310@fmmu.edu.cn。

SCs活性和增殖的影响,为组织工程骨的种子细胞扩增与活性提供实验观测依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性清洁级2周龄SD大鼠,由第四军医大学实验动物中心提供。

1.2 主要仪器和试剂

CO₂恒温细胞培养箱(Thermo公司),倒置相差显微镜(Olympus公司),洁净工作台(苏州净化设备厂),激光共聚焦显微镜及照相系统(Olympas公司),酶联免疫仪(Bio-RAD公司), α -DMEM培养基(Gibeco公司),胎牛血清(杭州四季青生物制品公司),胰蛋白酶、MTT及二甲基亚砷(Sigma公司分装),碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, ALP)试剂盒(北京中生北控生物科技股份有限公司),Triton X-100(华美生物工程公司),MTS(Promega公司),Live/Dead试剂盒,鬼笔环肽试剂盒及DAPI(Invitrogen公司)。

1.3 极低频电磁刺激仪

极低频电磁刺激仪是由两部分组成^[9]:一部分是信号发生器,可以产生频率、电压可调的多种波形;另一部分为密绕螺线管,其长度为16 cm、半径为8 cm,螺线管中心轴线上的磁感应强度用高斯计进行测量。本实验采用频率为15 Hz,磁感应强度为1 mT、占空比为50%的矩形PEMF。

1.4 BMSCs原代培养

将2周龄雄性SD大鼠断颈处死,70%乙醇浸泡5 min,无菌条件下取股骨、胫骨,剔出周围肌肉组织,剪去两端骨髓,用 α -DMEM培养基反复冲洗骨髓腔,吹打制成单细胞悬液,1000 r/min \times 5 min。将分离的细胞用含10%胎牛血清的 α -DMEM培养基制成单细胞悬液,接种于培养瓶中,置于37℃、5% CO₂、95%湿度的培养箱中进行原代培养。

1.5 PEMF对BMSCs增殖的影响

用胰蛋白酶消化第3代的BMSCs,用含10%胎牛血清的 α -DMEM培养基稀释成 5×10^4 个/mL的细胞悬液,以每孔200 μ L接种于96孔培养板。接种24 h后,将培养板置于螺线管中心位置连续作用7 d,每天处理1 h,对照组细胞置于同等条件下的螺线管中,不加PEMF处理。分别于PEMF处理后1 d、4 d、7 d,每孔中加入20 μ L的5 mg/mL MTT溶液,37℃培养4 h。吸净96孔培养板中培养基,每孔加入二甲基亚砷150 μ L,振荡10 min,使用酶联免疫仪测量570 nm波长时的光密度(OD)值。

1.6 PEMF对BMSCs分化的影响

用胰蛋白酶消化第3代的BMSCs,用含10%胎牛血清的 α -DMEM培养基稀释成 5×10^4 个/mL的细胞悬液,以每孔200 μ L接种于96孔培养板。接种24 h后,将培养板置于螺线管中心位置连续作用14 d,每天处理1 h,对照组细胞置于同等条件下的螺线管中,不加PEMF处理。分别于PEMF处理后4 d、7 d、14 d,吸净96孔培养板中培养基,PBS冲洗3次,每孔内加入1 mL/L Triton X-100溶液50 μ L,4℃过夜。每孔加入ALP底物100 μ L,37℃继续孵育40 min,每孔再加入5 g/L氢氧化钠溶液50 μ L,使用酶联免疫仪测量410 nm波长时的OD值。

1.7 羟基磷灰石/聚己内酯(Hydroxyapatite/Poly Caprolactone, HA/PCL)支架材料的制备

根据我们前期研究确定的HA与PCL的比例,采用双层盐析法制备支架材料^[10]。室温下将10 g PCL溶于100 mL的二氯甲烷中,待其完全溶解后,将3 g HA纳米颗粒加入到PCL溶液中并将溶液置于磁力搅拌仪上搅拌24 h。量取8 mL的混合溶液浇铸于已经覆盖一层氯化钠颗粒的培养皿中并快速转动培养皿,待溶液均匀分布在培养皿底部,将培养皿置于通风橱中2 min~3 min,再次加入250 nm~400 nm的氯化钠颗粒并按压。在自然条件下干燥24 h,将制得的材料浸泡于去离子水中置于磁力搅拌仪上搅拌过夜。真空干燥24 h后,将支架材料切割成大小为1 cm \times 1 cm并用Co⁶⁰消毒。

1.8 PEMF对HA/PCL支架材料中BMSCs活性的影响

PEMF对HA/PCL支架材料中BMSCs活性的作用通过MTS和Live/Dead染色两种方法进行检测。将支架材料置于24孔培养板中,加入含10%胎牛血清的 α -DMEM培养基中37℃过夜孵育,弃培养液,将1 mL的细胞浓度为 1×10^5 个/mL的细胞悬液接种于支架材料中,每隔2 d换液。接种24 h后,将培养板置于螺线管中心位置连续作用14 d,每天处理1 h,对照组细胞置于同等条件下的螺线管中,不加PEMF处理。分别于PEMF处理后1 d、7 d、14 d,吸净培养板中培养基,给每孔加入含有100 μ L MTS的 α -DMEM培养基1 mL,在37℃孵育4 h。然后振荡15 min,每孔取200 μ L培养液加入96孔培养板中,使用酶联免疫仪测量490 nm波长时的OD值。

将PEMF处理7 d的HA/PCL支架材料用PBS冲洗3次,按照Live/Dead试剂盒说明书进行染色,用激光共聚焦显微镜在494 nm和528 nm观察、拍照。

1.9 PEMF对HA/PCL支架材料中BMSCs细胞骨架的影响

将PEMF处理7 d的HA/PCL支架材料用PBS冲洗3次,用4%多聚甲醛于4℃过夜固定,再用PBS冲洗。然后加入罗丹明标记的鬼笔环肽溶液,在37℃湿盒内闭光孵30 min,PBS洗掉多余荧光抗体,用DAPI复染。封片置于激光扫描共聚焦显微镜下观察、拍照。

1.10 数据处理与统计分析

实验数据以均数±标准差表示,采用组间对照 t 检验进行统计学分析。

2 结果

从图1可以看出,BMSCs的OD值随着培养时间的延长而增加,频率为15 Hz、磁感应强度为1 mT的PEMF可以显著地促进BMSCs的增殖($P<0.05$),特别是PEMF连续处理7 d对BMSCs增殖作用最为显著($P<0.01$)。

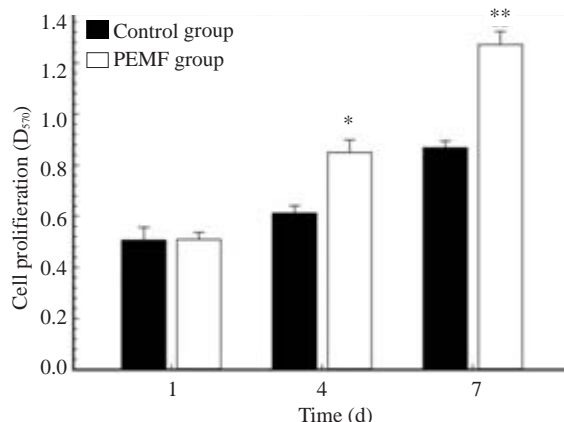


图1 PEMF对BMSCs增殖的影响($n=8$)

Fig.1 Effects of PEMF on proliferation of BMSCs ($n=8$)

Note: Compared with control group, * $P<0.05$ and ** $P<0.01$.

PEMF处理4 d、7 d对BMSCs的ALP活性没有显著的影响,但PEMF连续处理14 d时可以显著地促进BMSCs的ALP活性($P<0.05$),如图2所示。

图3显示接种于HA/PCL支架材料的BMSCs已经长入到支架材料的孔隙结构内部,PEMF处理使得BMSCs在材料中保持很高的活性(绿色表示活细胞),只有极少数量的细胞死亡(红色表示死亡的细胞)(图3b)。但是对照组中的BMSCs在HA/PCL支架材料中死亡的细胞数量要多于PEMF处理组中死亡的细胞数量(图3a)。

PEMF显著地促进接种于HA/PCL支架材料中BMSCs的活性,PEMF连续作用7 d、14 d,材料中BMSCs的增殖率分别高达37.5%、25.5%($P<0.01$),如表1所示。接种于HA/PCL支架材料中的BMSCs经PEMF处理后继续保持其长梭形形态,如图4所示。

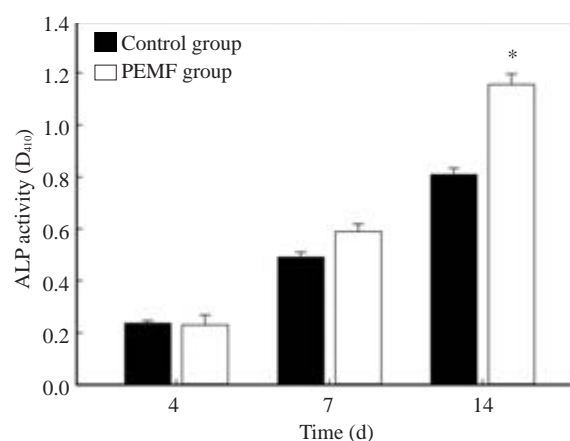
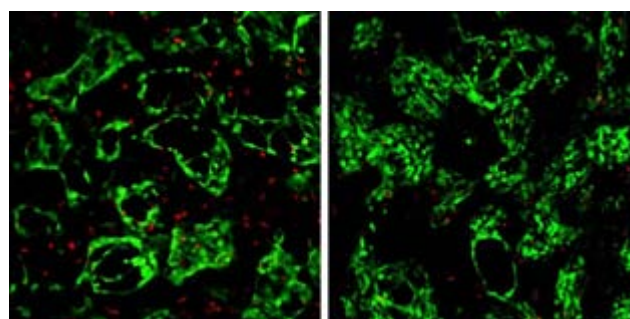


图2 PEMF对BMSCs分化的影响($n=8$)

Fig.2 Effects of PEMF on differentiation of BMSCs ($n=8$)

Note: Compared with control group, * $P<0.05$.



a: Control group

b: PEMF group

图3 PEMF对支架材料中BMSCs活性的影响

Fig.3 Effects of PEMF on cell viability of BMSCs in scaffolds

3 讨论

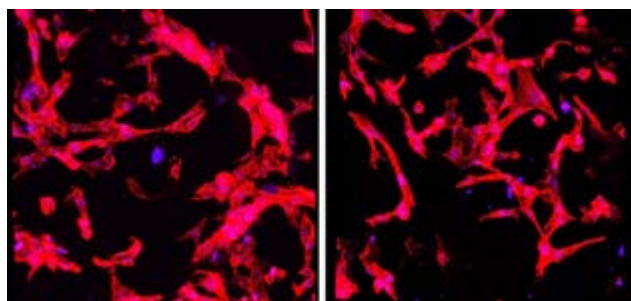
骨组织工程是近年来的研究热点,某些研究已经应用到临床治疗中,展现出良好的应用前景。但是组织工程骨规模化应用于临床仍需要解决如何快速、有效地扩增足够数量的种子细胞以及种子细胞在骨支架材料中的活性问题。本研究应用频率为15 Hz、磁感应强度为1 mT的PEMF对大鼠BMSCs增殖、ALP活性以及对接种于HA/PCL骨支架材料中的BMSCs活性和细胞增殖的影响。

结果表明,频率为15 Hz、磁感应强度为1 mT的PEMF能显著促进BMSCs增殖和ALP活性。Song等^[11]发现兔BMSCs在15 Hz、1 mT正弦PEMF处理4 d出现增殖率提高,并持续到第14天;电磁处理5 d,每天处理1 h、4 h、8 h均可以促进细胞ALP活性的增加。这种PEMF促进作用具有时间依赖性关系,而且可能是通过激活ERK信号通路促进BMSCs向成骨分化。Kai-vosoja等^[7]亦发现15 Hz、0.1 mT的PEMF促进人BMSCs增殖及促进Runx2、ALP、骨钙素的表达水平上调。赵敏等^[12]发现频率为12 Hz、磁感应强度为1.1 mT的

表1 PEMF对HA/PCL支架材料中的BMSCs增殖的影响($n=6, \bar{x} \pm s$)
Tab.1 Effects of PEMF on proliferation of BMSCs in HA/PCL scaffolds ($n=6, \text{Mean} \pm \text{SD}$)

Group	Time		
	1 d	7 d	14 d
Control	0.496 0 \pm 0.037 0	0.885 5 \pm 0.035 0	1.426 2 \pm 0.023 5
PEMF	0.510 4 \pm 0.043 6	1.217 4 \pm 0.032 3**	1.789 8 \pm 0.069 5**

Note: Compared with control group, ** $P < 0.01$.



a: Control group

b: PEMF group

图4 PEMF对支架材料中BMSCs细胞骨架的影响

Fig.4 Effects of PEMF on cell morphology of BMSCs in scaffolds

PEMF具有刺激人BMSCs增殖作用。但是周予婧等^[13]研究结果显示8 Hz、3.8 mT的PEMF每天作用40 min,持续21 d对大鼠BMSCs增殖作用不明显,仅第7天差异具有统计学意义;在7 d~14 d能明显提高ALP活性,第21天时形成明显的矿化结节。PEMF对BMSCs作用的差异性可能是由于PEMF波形、频率、磁感应强度、作用时间等造成,我们前期的研究结果显示矩形PEMF显著地促进成骨细胞增殖、抑制ALP活性,而正弦PEMF显著地抑制成骨细胞增殖、促进ALP活性,三角形PEMF对成骨细胞增殖与ALP活性均无影响^[9]。这种差异性也可能是细胞来源、接种密度以及培养环境的不统一造成的。

与对照组相比,PEMF有助接种于HA/PCL骨支架材料中BMSCs继续保持活性和其长梭形形态,作用7 d、14 d显著提高BMSCs的增殖率($P < 0.01$)。Veronesi等^[14]也证实将体外未扩增的兔BMSCs接种于支架材料上修复4 mm \times 4 mm的骨软骨缺损,用频率75 Hz、磁感应强度1.5 mT的PEMF处理的骨软骨缺损修复效果要优于未进行PEMF处理的。这提示PEMF作用能够保持BMSCs在支架材料上的活性来促进骨组织的形成。

综上所述,频率为15 Hz、磁感应强度为1 mT的PEMF可以显著地促进骨组织工程的种子细胞——BMSCs的增殖和成骨分化,而且能够保持BMSCs在骨支架材料中的活性。这为解决组织工程骨的种子细胞扩增与活性提供实验观测依据。未来还需要更多对该

分子机制和动物骨缺损修复能力进行深入探讨的研究。

【参考文献】

- [1] 李东亚, 郑欣, 陈一心. 骨组织工程支架材料应用于大段骨缺损的实验研究进展[J]. 创伤外科杂志, 2013, 15(1): 87-90.
Li YD, Zheng X, Cheng YX. Progress in the experimental research of bone tissue-engineering scaffolds for treating large bone defects [J]. Journal of Traumatic Surgery, 2013, 15(1): 87-90.
- [2] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999, 284 (5411): 143-147.
- [3] Bruder SP, Fox BS. Tissue engineering of bone: Cell based strategies[J]. Clin Orthop, 1999, 366(suppl): 68-83.
- [4] 刘纪涛, 陶军. 脉冲电磁场影响骨折愈合的研究进展[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(4): 689-692.
Liu JT, Tao J. Research development of pulsed electromagnetic fields in bone fracture healing[J]. Journal of Clinical Rehabilitative and Tissue Engineering Research, 2010, 14(4): 689-692.
- [5] Sun LY, Hsieh DK, Yu TC, et al. Effect of pulsed electromagnetic field on the proliferation and differentiation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Bioelectromagnetics, 2009, 30(4): 251-260.
- [6] Tepper OM, Callaghan MJ, Chang EI, et al. Electromagnetic fields increase *in vitro* and *in vivo* angiogenesis through endothelial release of FGF-2[J]. Faseb J, 2004, 18(11): 1231-1233.
- [7] Kaivosoja E, Sariola V, Chen Y, et al. The effect of pulsed electromagnetic fields and dehydroepiandrosterone on viability and osteo-induction of human mesenchymal stem cells[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2015, 9(1): 31-40.
- [8] Ross CL, Siriwardane M, Almeida-Porada G, et al. The effect of low-frequency electromagnetic field on human bone marrow stem/progenitor cell differentiation[J]. Stem Cell Res, 2015, 15(1): 96-108.
- [9] Zhang X, Zhang J, Qu X, et al. Effects of different extremely low frequency electromagnetic fields on osteoblasts[J]. Electromagn Biol Med, 2007, 26(3): 167-177.
- [10] Zhang X, Chang W, Lee P, et al. Polymer-ceramic spiral structured scaffolds for bone tissue engineering: Effect of hydroxyapatite composition on human fetal osteoblasts[J]. PLoS One, 2014, 9(1): e85871.
- [11] Song MY, Yu JZ, Zhao DM, et al. The time-dependent manner of sinusoidal electromagnetic fields on rat bone marrow mesenchymal stem cells proliferation, differentiation, and mineralization[J]. Cell Biochem Biophys, 2014, 69(1): 47-54.
- [12] 赵敏, 许建中, 周强, 等. 脉冲电磁场促进人骨髓间充质干细胞成骨的研究[J]. 中国矫形外科杂志, 2004, 6: 439-443.
Zhao M, Xu JZ, Zhou Q, et al. Effect of pulsed electromagnetic fields on accelerating human mesenchymal stem cells osteogenesis [J]. Orthopedic Journal of China, 2004, 6: 439-443.
- [13] 周予婧, 王朴, 陈红英, 等. 脉冲电磁场对大鼠骨髓间充质干细胞增殖、成骨分化和Wnt/ β -catenin信号通路的影响[J]. 四川大学学报(医学版), 2015, 46(3): 347-353.
Zhou YJ, Wang P, Chen HY, et al. Effect of pulsed electromagnetic fields on osteogenic differentiation and Wnt/ β -catenin signaling pathway in rat bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Journal of West China University (Medical Sciences), 2015, 46(3): 347-353.
- [14] Veronesi F, Cadossi M, Giavaresi G, et al. Pulsed electromagnetic fields combined with a collagenous scaffold and bone marrow concentrate enhance osteochondral regeneration: An *in vivo* study [J]. BMC Musculoskelet Disord, 2015, 16(1): 233.