

不同作用时间下正弦波电磁场对大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化的效应

宋明宇 杨勇 虞冀哲 易智谦 徐西强 尚林 刘阳 吴华

【摘要】目的 探究 15 Hz 正弦波电磁场体外诱导大鼠骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 成骨方向分化的最佳时间窗。**方法** 体外分离培养 SD 大鼠 BMSCs, 将长势良好的第三代细胞, 按照 1×10^5 个/孔接种细胞于 3.5 cm 细胞培养皿中, 接种后第 2 天将所有培养皿编号。按随机数字表法随机分为对照组和暴磁组, 再按暴磁总天数分为 A 组 (7 d)、B 组 (14 d)、C 组 (28 d), A 组包括 A₀ 组 (对照组)、A₁ 组 (暴磁每日 1 h)、A₂ 组 (暴磁每日 4 h)、A₃ 组 (暴磁每日 8 h); B 组包括 B₀ 组 (对照组)、B₁ 组 (暴磁每日 1 h)、B₂ 组 (暴磁每日 4 h)、B₃ 组 (暴磁每日 8 h); C 组包括 C₀ 组 (对照组)、C₁ 组 (暴磁每日 1 h)、C₂ 组 (暴磁每日 4 h)、C₃ 组 (暴磁每日 8 h)。每批次细胞取自同一只老鼠, 暴磁组置于 15 Hz 1 mT 正弦波电磁场中暴磁。用荧光定量 PCR 方法检测各组 Runt 相关转录因子 2 (RUNX2)、骨唾液酸蛋白 (BSP)、骨桥蛋白 (OPN) 基因表达量的变化; 用茜素红染色方法比较各组钙结节分布; 用蛋白印迹法 (Western blot) 检测比较各组 RUNX2 蛋白量的变化。**结果** 15 Hz 正弦波电磁场刺激 7 d 可以体外诱导大鼠 BMSCs 向成骨方向分化, 以 A₂ 组的效应最为明显, 并且以早期成骨指标 RUNX2 的效应最为突出; 磁场刺激 14 d 后, 则以 B₁ 组效用明显, 并且以晚期成骨指标 OPN 的效应明显。Western Blot 比较各组 RUNX2 蛋白量的变化, 趋势相近。电磁场刺激 14 d 和 28 d 后, 以 B₁ 组和 C₁ 组的钙结节量最多。**结论** 15 Hz 正弦波电磁场诱导 BMSCs 成骨分化有明显的时间窗口效应; 随着暴磁天数的增加, 每天短时间 (1 h) 暴磁即可达到较好的诱导效果。

【关键词】 电磁场; 骨髓间充质干细胞; 成骨分化

Effects of sinusoidal electromagnetic fields on the osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells SONG Ming-yu, YANG Yong, YU Ji-zhe, YI Zhi-qian, XU Xi-qiang, SHANG Lin, LIU Yang, WU Hua. Department of Orthopedics, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Corresponding author: WU Hua, Email: wuhua360@yahoo.com.cn

【Abstract】Objective To explore in vitro the best time window for using sinusoidal electromagnetic fields to promote the osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs). **Methods** BMSCs were isolated and cultured from 4-week-old Sprague-Dawley rats (male and female, 80-120 g). The BMSCs (from passage 3) were exposed 0, 1, 4 or 8 h/d for 7 d, 14, or 28 d, respectively, to 15 Hz sinusoidal electromagnetic fields with a maximum amplitude of 1mT. Those exposed 0 h/d served as the control. The relative expressions of runt related gene-2 (RUNX2), bone sialoprotein (BSP) and osteopontin (OPN) were determined using real-time, quantitative reverse transcription-polymerase chain reactions (RT-PCRs). The level of RUNX2 protein was determined by Western blotting after 14 d. Alizarin red staining was used to compare calcium distribution in each group. **Results** Obvious promotion of differentiation to osteoblasts was observed after 7 days of exposure to the 15 Hz sinusoidal electromagnetic fields, most obviously manifested by an outstanding increase of the early osteogenic index RUNX2 in those exposed 4 h/d. After 14 days of intervention, the 1 h/d exposure showed to be most effective, especially in inducing the changes of the late osteogenic index OPN. The trends of changes in RUNX2 protein were similar in all groups. After stimulating 1 h/d for 14 and 28 days, calcium deposition increased to the greatest extent. **Conclusions** Exposure to sinusoidal electromagnetic fields induces osteogenic differentiation to osteoblasts in rat BMSCs in vitro. There is an apparent window effect. The best results are observed with more days of exposure and shorter exposure time (1 h) every day.

【Key words】 Electromagnetic fields; Bone marrow mesenchymal stem cells; Osteogenic differentiation

电磁场治疗骨折不愈合、骨质疏松等疾病已获得

大量动物实验和临床试验证实^[1-4]。电磁场的治疗效应具有无创、操作简便、并发症少、适应范围广等优点, 目前应用日趋广泛, 但其具体作用机制尚不明确。电磁场可能通过产生局部电流加速骨基质的形成^[5], 增加局部血流, 加强物质交换^[6], 上调成骨相关基因的

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2012.06.006

基金项目: 国家自然科学基金项目 (51077065)

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

通信作者: 吴华, Email: wuhua360@yahoo.com.cn

表达^[7]而促进骨折愈合。骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)是一种具有自我复制多向分化功能的成体干细胞^[8]。作为成骨细胞的前体细胞,促进其增殖分化对骨折愈合和骨质疏松的治疗有重要意义。Yang 等^[9]证明 15 Hz 正弦波电磁场具有促进骨髓 MSC 成骨分化和抑制其成脂分化的作用。为了获取电磁场最好的临床治疗效应,本研究比较了电磁场诱导骨髓 MSC 成骨分化不同时间后、不同阶段成骨指标和细胞外钙质沉积的变化,这对进一步研究电磁场的作用机制和指导临床治疗有重要意义。

材料与方法

一、实验材料

1. 实验动物:清洁级 SD 大鼠,9 只,由同济医学院实验动物中心提供,雌雄不拘,体重 80~100 g。

2. 电磁场发生器:由海军工程大学研制,采用直径 30 cm 的 Helmholtz 线圈,可产生 0~75 Hz 连续可调且磁感应强度为 1 mT 的正弦波电磁场,磁场的频率及强度均由示波器检测。在线圈中央 7 cm 的球形区,电磁场的一致性超过 90%。

3. 试剂:DMEM F12 培养基(Hyclone 公司),胎牛血清(Gibco 公司),胰蛋白酶(Amersco 公司),青链霉素混合液(Solarbio 公司),Trizol 试剂盒(英俊公司),逆转录试剂盒(Toyobo 公司),SYBO Green 荧光定量试剂盒(Toyobo 公司),茜素红(北京华迈科生物技术有限责任公司),兔抗大鼠 RUNX2 抗体(Novus),羊抗兔 HRP 标记二抗(武汉博士德),RIPA 细胞裂解液(上海碧云天生物技术公司),凝胶制备试剂盒(武汉博士德),ECL 发光液(Thermo 公司)。

4. 仪器:高速离心机(香港力康公司),荧光定量 PCR 仪(Bio-rad IQ5),普通 PCR 仪(Eppendorf 公司),分光光度计(Eppendorf 公司),相差倒置显微镜(Nikon 公司)。

5. 引物:引物由 Invitrogen 公司合成,引物序列:① GAPDH,上游序列为 5-GACAACCTTGGCATCGTGGA-3,下游序列为 5-ATGCAGGGATGATGTTCTGG-3;② RUNX2,上游序列为 5-CAAGTGGCCAGTTCAACGA-3,下游序列为 5-TGTGAAGACCGTTATGGTCAAAGTG-3;③ 骨唾液酸蛋白,上游序列为 5-AGAAAGAGCAG-CACGGTTGAG-3,下游序列为 5-TCATAGCCATGCCCTTGTAAG-3;④ 骨桥蛋白,上游序列为 5-CAAG-GACCAACTACAACCA-3,下游序列为 5-GGAGACAG-GAGGCAAGG-3。

二、方法

1. 骨髓 MSC 分离培养:按照华中科技大学实验动物使用委员会的准则,将 4 周龄清洁级 SD 大鼠颈椎

脱臼处死,于 75% 的酒精中浸泡 15 min,在超净工作台上分离双下肢股骨、胫骨。去除骨骼周围肌肉组织,剪去包括骺板在内的两骺端。用含 10% 胎牛血清和青-链霉素双抗的 DMEM F12 培养基冲洗骨髓腔。将所得的细胞悬液吹打混匀,计数、离心、调整细胞浓度为 5×10^6 /ml,接种到 2 支 50 ml 无菌细胞培养瓶中,置于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度的细胞培养箱中培养。2 d 后首次换液,以后每 3 日换液 1 次,约 10 d 后细胞铺满 80%~90% 瓶底,用胰酶消化后按照 1:2 传代培养,并于相差倒置显微镜下观察细胞生长状态。

2. 接种、分组、电磁场刺激:用生长状态良好的第 3 代细胞,按照 1×10^5 个/孔接种细胞于 3.5 cm 细胞培养皿中。接种后第 2 天将所有培养皿编号,按随机数字表法分为对照组和暴磁组,再按暴磁总天数分为 A 组(7 d)、B 组(14 d)、C 组(28 d)。A 组包括 A₀ 组(对照组)、A₁ 组(暴磁每日 1 h)、A₂ 组(暴磁每日 4 h)、A₃ 组(暴磁每日 8 h);B 组包括 B₀ 组(对照组)、B₁ 组(暴磁每日 1 h)、B₂ 组(暴磁每日 4 h)、B₃ 组(暴磁每日 8 h);C 组包括 C₀ 组(对照组)、C₁ 组(暴磁每日 1 h)、C₂ 组(暴磁每日 4 h)、C₃ 组(暴磁每日 8 h)。每批次细胞取自同 1 只老鼠。

将细胞置于 15 Hz 1mT 正弦波电磁场中暴磁相应时间(暴磁组)或者于相同条件培养箱中培养(对照组),隔天换液 1 次。9 只大鼠分 9 批次提取细胞,其中有 3 批次 A 组和 B 组分别用于提取细胞总 RNA,有 1 批次 B 组用于提取细胞总蛋白,有 1 批次 B 组和 C 组分别用于茜素红染色钙结节。

3. 细胞总 RNA 提取、逆转录和荧光定量 PCR:① 在磁场刺激 7d 和 14 d 结束 12 h 后,用 Trizol 试剂盒(Invitrogen 公司)一步法提取各组细胞总 RNA(具体步骤按 Trizol 试剂盒操作说明书进行),用蛋白核酸检测仪(Eppendorf 公司)检测 RNA 的浓度及纯度。② 用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA:取 1 μg 总 RNA,加入随机引物,用无 RNA 酶超纯水补足为 12 μl,于 PCR 仪上 65 °C,5 min,立刻取出置于冰上,加入 5 × 缓冲液(Buffer) 4 μl,dNTP 2 μl,RNA 酶抑制剂 1 μl,逆转录酶 1 μl,共 20 μl 体系,瞬时离心后于 PCR 仪上 30 °C 10 min;42 °C 20 min;99 °C 5 min;4 °C 5 min,瞬时离心。于 -20 °C 冰箱中保存备用。③ 荧光定量 PCR 反应:于八联管中加入 1 μl 引物,1 μl cDNA,10 μl 2 × SYBO Green 混合体系,用超纯水补足至 20 μl,每个样品设 3 个副孔,瞬时离心;置于荧光定量 PCR 仪上(Bio-rad IQ5),95 °C 预变性 1 min,95 °C 变性 15 s,58 °C 退火、延伸、检测荧光,机器预设溶解曲线程序。将所得数据用 SPSS 13.0 版统计软件进行统计分析,用 Sigma Plot 软件作柱状图。

4. 提取细胞蛋白、蛋白印迹法检测:①在磁场刺激 14 d 结束 12 h 后,吸掉培养皿中培养基,用冰 PBS 洗 3 遍,控干,每孔加入 RIPA 细胞裂解液 100 μ l 于冰上用细胞刮刀每孔刮 5 min,收集裂解液于 1.5 ml 离心管中,离心半径 10 cm,12 000 r/min,4 $^{\circ}$ C,离心 15 min,吸取上清,即为蛋白质溶液。用 BCA 法测蛋白浓度,调整浓度后加入 5 \times 蛋白上样缓冲液 (Loading Buffer),99 $^{\circ}$ C 变性 5 min,于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。②取 30 μ g 蛋白于 12% 的 SDS-PAGE 胶中电泳,浓缩胶,恒压 75 V,50 min,分离胶恒压 120 V,1.5 h;恒流 200 mA 2 h 将蛋白转至孔径为 0.45 μ m 的 PVDF 膜上,用 5% 脱脂奶粉 (TBST 配置) 封闭 1 h;4 $^{\circ}$ C 条件下孵育一抗过夜。用 TBST 洗膜 (每次洗 15 min,共洗 3 次)后,37 $^{\circ}$ C 孵育二抗 1 h,再用 TBST 洗膜 (每次洗 15 min,共洗 3 次)后,暗室中曝光。

5. 茜素红染色钙结节:在磁场刺激 14 和 28 d 结束 12 h 后,吸掉培养基,用 PBS 洗 3 遍,控干,加入 95% 乙醇固定 15 min,双蒸水洗 1 遍,用 4% 茜素红 pH8.3 (0.1 M Tris-HCL 配置) 染色 30 min,双蒸水洗 2 遍,随机选取 10 个 40 倍视野照相,所得图片用图像分析软件进行分析。

三、统计学分析

采用 SPSS 13.0 版统计软件进行统计分析,各组中 RUNX2、骨唾液酸蛋白、骨桥蛋白和相对钙结节量实验组与对照组比较及实验组之间的比较均行单因素方差分析, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

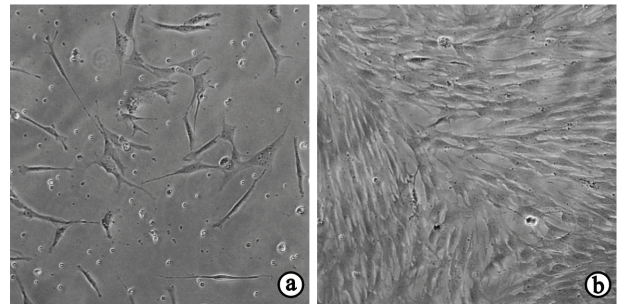
结 果

一、MSC 体外分离培养

MSC 贴壁生长,细胞形状呈长梭形、多角形,长满后细胞呈旋涡状排列 (图 1)。

二、15 Hz 和 1 mT 正弦波电磁场刺激骨髓 MSC 不同时间后成骨指标基因表达量的变化

RUNX2 是成骨分化的关键转录因子,是成骨分化



注:a 示原代细胞 30% 铺满,可见长梭形、多角形 MSC;b 示细胞 90% 铺满,可见细胞呈旋涡状排列

图 1 显微镜下 MSC 形态图 ($\times 100$)

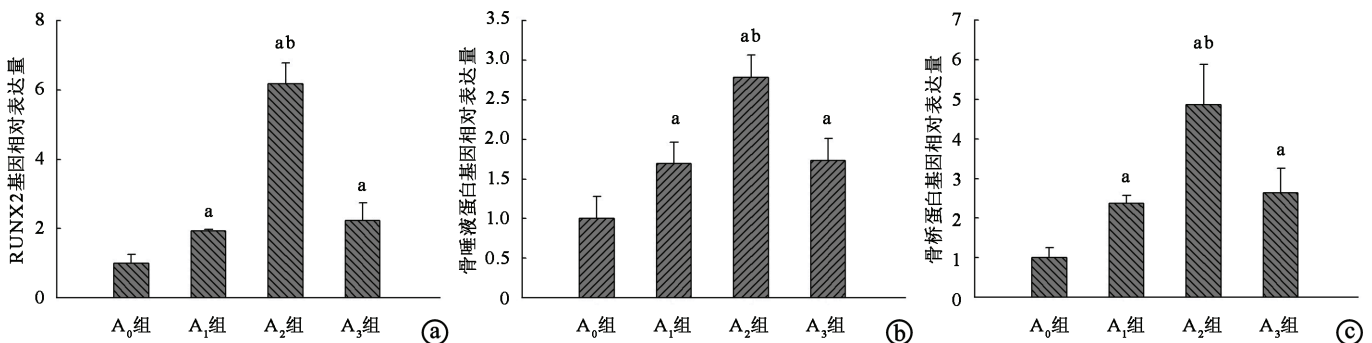
的早期指标。骨唾液酸蛋白和骨桥蛋白都是磷酸化蛋白,它们与矿化组织的胞外基质合成有关,分别为 MSC 成骨分化过程中的中晚期指标。本研究 MSC 暴磁每日 0、1、4 和 8 h 共 7 d 后,比较 3 个基因相对表达量的变化,发现暴磁组 3 个基因的表达均高于 A_0 组,且以 A_2 组的基因相对表达量最高,并且这个趋势以早期成骨指标 RUNX2 最为明显 (图 2);而当暴磁总天数达到 14 d 后,却发现 3 个基因的相对表达量以 B_1 组为高,并且此趋势以晚期成骨指标骨桥蛋白较为明显 (图 3)。

三、蛋白印迹法测 RUNX2 蛋白量的变化

在电磁场刺激 14 d 结束后,提取各个作用时间组的细胞总蛋白,用 Western Blot 方法检测 RUNX2 蛋白量的变化趋势,发现磁场刺激 14 d 后,除去内参影响,磁场刺激组的 RUNX2 蛋白量均高于 B_0 组,并且以 B_1 组为多 (图 4)。

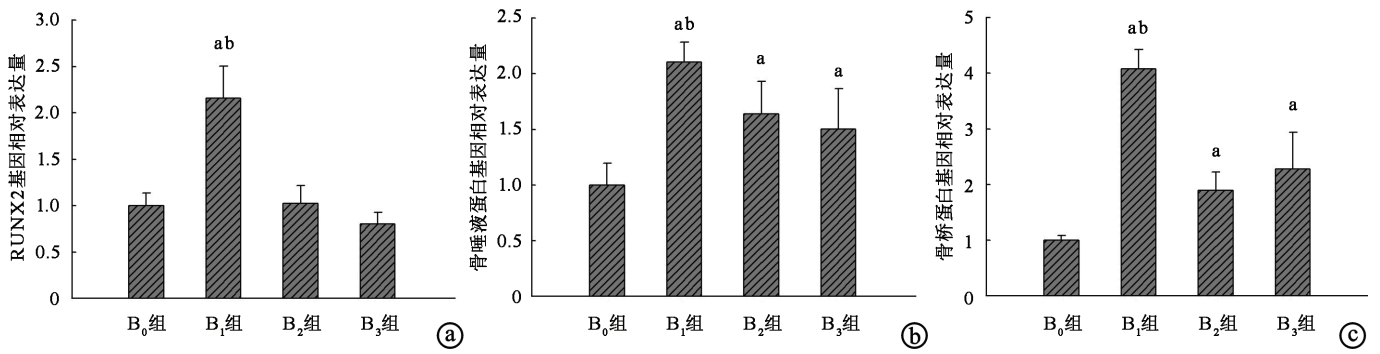
四、茜素红染色钙结节

电磁场刺激结束后,茜素红染色,随机选取 10 个 40 倍镜视野拍照,将图片用图像分析软件进行分析。磁场刺激 14 d 后,胞外基质钙结节量明显多于 B_0 组,而且以 B_1 组的钙结节量为多;磁场刺激 28 d 后,未暴磁组也有少量钙结节,但是明显少于暴磁组;暴磁组之间比较,仍然以 C_1 组的钙结节量最多,而 C_2 组与 C_3 组的钙结节量相近,多于 C_0 组 (图 5)。用图像分析软件



注:a 为 RUNX2 基因相对表达;b 为骨唾液酸蛋白基因相对表达;c 为骨桥蛋白基因相对表达。与 A_0 组比较, $^a P < 0.05$;与其它实验组间比较, $^b P < 0.05$

图 2 15 Hz 1 mT 电磁场刺激 7 d 每日暴磁不同时间后对大鼠骨髓 MSC 成骨分化的影响示意图



注: a 为 RUNX2 基因相对表达; b 为骨唾液蛋白基因相对表达; c 为骨桥蛋白基因相对表达。与 B₀ 组比较, ^a*P* < 0.05; 与其它实验组间比较, ^b*P* < 0.05

图 3 15 Hz 1 mT 电磁场刺激 14 d 每日暴磁不同时间后对大鼠骨髓 MSC 成骨分化的影响示意图

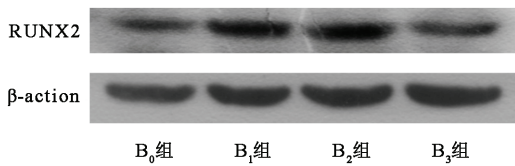


图 4 磁场刺激 14 d 后每日暴磁不同时间后各组 RUNX2 蛋白表达量的变化

分析随机选取的图片中钙结节的面积,估算胞外基质中钙质沉积量,其相对钙结节半定量分析结果见图 6。

讨 论

由于电磁场在骨科疾病治疗中的良好效果及其无创性和不良反应小等优点,近年来一直得到人们的关注。刘朝旭等^[10]证实 15 Hz 和 1 mT 的电磁场对去卵

巢小鼠骨质疏松有明显的防治作用,同样参数的电磁场对大鼠胫腓骨骨折愈合有显著的促进作用^[11]。但是,电磁场治疗效应的具体作用机制、电磁场治疗的最佳组合参数,至今尚未研究清楚。在电磁场影响体外细胞的研究中,由于电磁场的组合参数、作用时间、细胞的种类及生长状态的不同,导致了研究结果之间的差异,如特定参数的电磁场可以抑制成骨细胞增殖,促进其碱性磷酸酶的分泌,促进成骨分化^[12];然而 Chang 等^[13]证实,脉冲电磁场明显促进小鼠成骨细胞增殖,并未改变碱性磷酸酶染色结果和细胞外矿物质沉积。电磁场治疗骨科疾病有明显的窗口效应,但是至今仍未找到其最佳窗口,不同作用时间下电磁场诱导骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 成骨方向分化的研究亦鲜见报道。

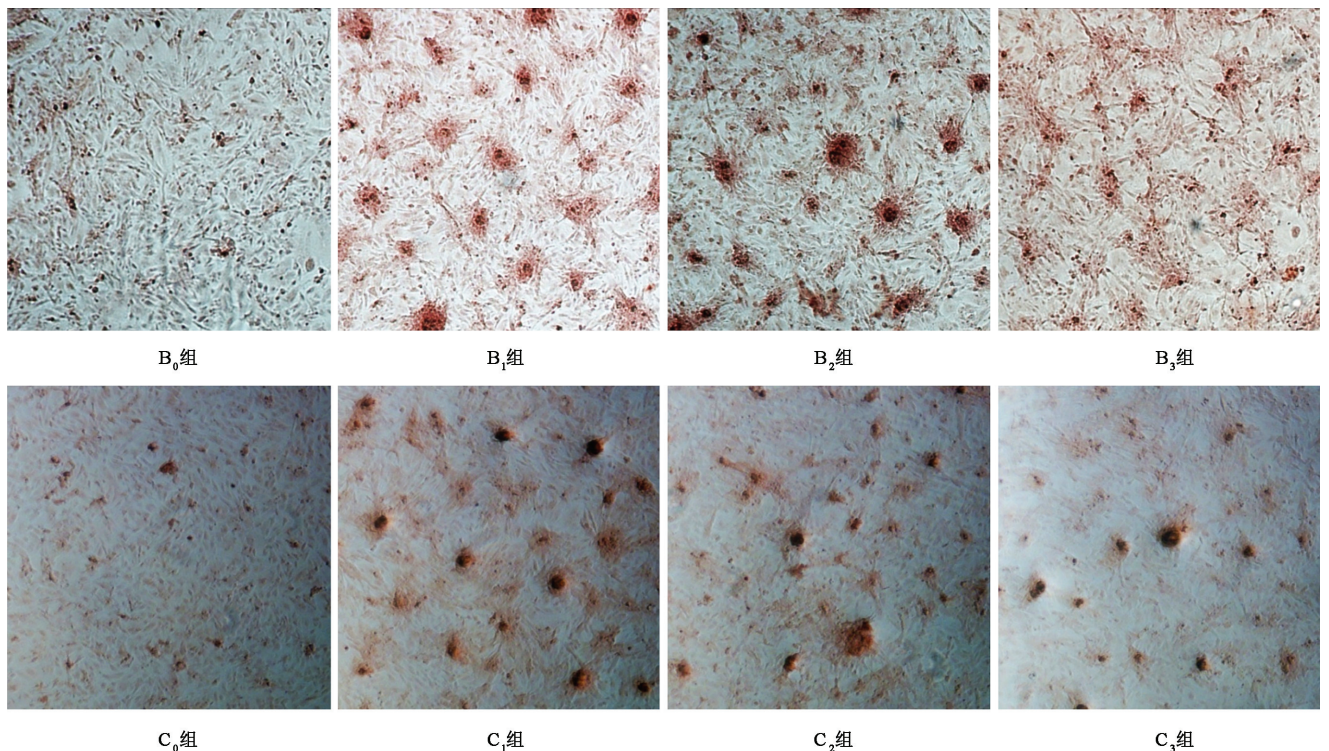


图 5 相差倒置显微镜下每日暴磁不同时间亚组总暴磁 14 d 和 28 d 后 MSC 钙结节量的形态图(茜素红染色, ×40)

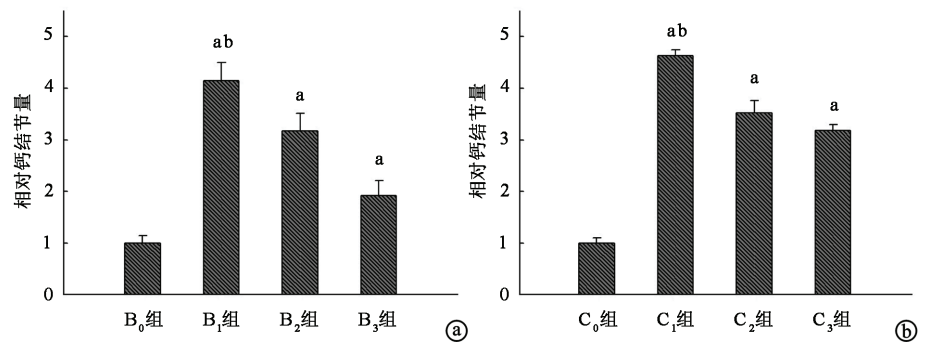
BMSCs 是骨髓中的一种成体非造血干细胞,它在骨髓中的含量很少(每 10 000 个有核细胞中仅有 1 个),具有多向分化的潜能,在体外培养时具有向成骨、成脂、成软骨方向分化的能力^[14]。骨组织的重建需要成骨细胞的增殖和分化。BMSCs 作为成骨细胞的前体细胞,促进其增殖及向成骨方向分化,对于骨质重建具有重要意义。

RUNX2 是成骨方向分化过程中的早期重要的转录因子,它可以调控骨唾液酸蛋白(bone sialoprotein, BSP)和骨钙素(osteocalcin, OCN)的表达^[15],对成骨细胞形成是必不可少的。RUNX2 的高表达可以明显促进成骨分化,可作为成骨方向分化的早期标志。BSP 是细胞外基质中的一种酸性糖蛋白,它参与骨质代谢过程,可以抑制 BMSCs 增殖,促进其向成骨细胞方向分化^[16]。骨桥蛋白(osteopontin, OPN)为在类骨质中由基质细胞产生的骨特异的、含唾液酸的蛋白质,在骨基质的矿化和吸收过程中有重要作用,OPN 的高表达,表明细胞已进入成熟成骨细胞分化过程。

有实验证明,正弦波电磁场可以促进 BMSCs 成骨方向分化,抑制其成脂分化^[9]。Zhou 等^[17]证实 50 Hz 正弦波电磁场可以抑制成骨细胞增殖促进其分化和矿化,且在磁场强度为 1.8 mT 和 3.6 mT 时促进成骨细胞分化、矿化的效应最为明显。本研究通过比较相同参数电磁场作用于 BMSCs 不同时间后,不同阶段成骨指标(RUNX2、BSP、OPN)及细胞外基质中钙质沉积的变化趋势,探究电磁场促进骨髓 MSC 成骨分化的最佳时间窗。研究发现,电磁场可以诱导 BMSCs 向成骨方向分化,且随着电磁场刺激时间的延长,每日暴磁较短的时间(1 h)就可以得到较明显的诱导成骨效应。这对于以后进一步研究电磁场治疗骨折、骨质疏松等疾病的具体作用机制,指导电磁场的临床应用具有重要价值。本实验只在细胞水平进行了研究,至于电磁场对活体动物及患者的最佳时间窗口仍需进一步研究。

参 考 文 献

[1] Andrew C, Bassett L, Pawluk RJ, et al. Augmentation of bone repair by inductively coupled electromagnetic fields. *Science*, 1974, 184: 575-577.
 [2] De Haas WG, Watson J, Morrison DM. Non-invasive treatment of ununited fractures of the tibia using electrical stimulation. *J Bone Joint Surg Br*, 1980, 62-B:465-470.
 [3] Brighton CT, Katz MJ, Goll SR, et al. Prevention and treatment of sciatic denervation disuse osteoporosis in the rat tibia with capacitive coupled electrical stimulation. *Bone*, 1985, 6:87-97.



注:a为磁刺激 14 d;b为磁刺激 28 d。与对照组组内比较,^a*P*<0.05;与其它实验组间比较,^b*P*<0.05

图 6 磁场刺激 14 d 和 28 d 各组相对钙结节半定量分析示意图

[4] Grace KL, Revell WJ, Brookes M. The effects of pulsed electromagneticism on fresh fracture healing: Osteochondral repair in the rat femoral groove. *Orthopedics*, 1998, 21:297-302.
 [5] Friedenberg ZB, Brighton CT. Bioelectric potentials in bone. *J Bone Joint Surg*, 1966, 48:915-923.
 [6] Yen-Patton GP, Patton WF, Beer DM, et al. Endothelial cell response to pulsed electromagnetic field: stimulation of growth rate and angiogenesis in vitro. *J Cell Physiol*, 1988, 134:37-46.
 [7] 葛保健,方真华,赵文春,等.工频电磁场对小鼠骨髓间充质干细胞 BMP-2 和 TGF-β1 mRNA 表达的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2004, 26:262-265.
 [8] Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell*, 2008, 2:313-319.
 [9] Yang Y, Tao C, Zhao D, et al. EMF acts on rat bone marrow mesenchymal stem cells to promote differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. *Bioelectromagnetics*, 2010, 31:277-285.
 [10] 刘朝旭,虞冀哲,杨勇,等.电磁场防治去卵巢小鼠骨质疏松的实验研究. *中华物理医学与康复杂志*, 2010, 32:258-261.
 [11] 刘朝旭,吴华,杨勇,等.脉冲电磁场对大鼠胫腓骨折愈合的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2010, 32:173-177.
 [12] McLeod KJ, Donahue HJ, Levin PE, et al. Electric fields modulate bone cell function in a density-dependent manner. *J Bone Miner Res*, 1993, 8:977-984.
 [13] Chang WH, Chen LT, Sun JS, et al. Effect of pulse-burst electromagnetic field stimulation on osteoblast cell activities. *Bioelectromagnetics*, 2004, 25:457-465.
 [14] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999, 284:143-147.
 [15] Javed A, Barnes GL, Jasanya BO, et al. Runt homology domain transcription factors (Runx, Cbfa, and AML) mediate repression of the bone sialoprotein promoter: evidence for promoter context-dependent activity of Cbfa proteins. *Mol Cell Biol*, 2001, 21:2891-2905.
 [16] Xia B, Wang J, Guo L, et al. Effect of bone sialoprotein on proliferation and osteodifferentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Biologicals*, 2011, 39:217-223.
 [17] Zhou J, Ming LG, Ge BF, et al. Effects of 50 Hz sinusoidal electromagnetic fields of different intensities on proliferation, differentiation and mineralization potentials of rat osteoblasts. *Bone*, 2011, 49:753-761.

(修回日期:2011-06-01)
(本文编辑:汪 玲)