

文章编号:1000-5404(2014)12-1255-05

论著

恒磁场对培养的骨髓间充质干细胞成骨分化的影响及机制

郭志良¹,滕海军¹,王亮¹,张大海¹,李鑫²,成敏² (261021 山东潍坊,解放军第89医院骨科¹; 261053 山东潍坊,潍坊医学院医学研究实验中心²)

[摘要] **目的** 观察不同强度的恒磁场作用不同时间对体外培养的大鼠骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs) 向成骨细胞分化的影响及机制。**方法** 密度梯度离心法分离大鼠骨髓单核细胞进行体外培养。以3~4代的MSCs为靶细胞,对其进行诱导分化和施以恒磁场处理。磁场暴露强度分别为0、0.5、1.5、2、3 mT。以IFCC推荐法检测碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性表达;茜素红染色观察钙结节的数量和大小;放免法检测骨钙素(osteocalcin, OCN)和I型胶原的分泌;Western blot分析MAPK P38信号分子的磷酸化,并探讨其特异性阻断剂对恒磁场调控MSCs成骨分化的影响。**结果** ①恒磁场明显促进I型胶原和ALP的活性表达,增加OCN的分泌及钙结节的形成,其中1.5~2 mT磁场强度促MSCs成骨分化作用最为明显;②恒磁场促进磷酸化MAPK P38的表达;③加入P38信号通路SB253580明显抑制恒磁场的促成骨效应。**结论** 磁场促进MSCs成骨分化,其机制与P38信号分子的激活有关。

[关键词] 恒磁场;骨髓间充质干细胞;成骨分化;信号通路

[中图分类号] R322.71;R329.21;R339.5

[文献标志码] A

Effects of static magnetic field on osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells

Guo Zhiliang¹, Teng Haijun¹, Wang Liang¹, Zhang Dahai¹, Li Xin², Cheng Min² (¹Department of Orthopaedics, No. 89 Hospital of PLA, Weifang, Shandong Province, 261021; ²Experimental Center of Medica Research, Weifang Medical College, Weifang, Shandong Province, 261053, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the effects of the static magnetic field (SMF) on bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) osteogenic differentiation and explore the possible mechanism. **Methods** Density gradient centrifugation-isolated rat bone marrow mononuclear cells were cultured *in vitro*. MSCs of the 3rd and 4th passages were chosen as target cells. After osteogenic induction, the MSCs were exposed to SMF at 0, 0.5, 1.5, 2 or 3 mT. The activity of alkaline phosphatase (ALP) was assayed with IFCC. The calcium nodes of MSCs were stained by alizarin red. The concentrations of osteocalcin (OCN) and type I collagen were measured by radioimmunoassay. Western blotting was used to detect the phosphorylation of MAPK P38. Specific P38 inhibitor SB253580 was added into the culture media of MSCs to investigate the role of P38 in this process. **Results** SMF, especially at 1.5 and 2 mT, increased the activity of ALP, the number of calcium nodes and the concentrations of OCN and type I collagen in MSCs. SMF activated MAPK P38 signaling molecule. Blocking the P38 signal pathway by SB253580 partially reversed the effects of SMF on osteogenic differentiation of MSCs. **Conclusion** SMF promotes the osteogenic differentiation of MSCs and the P38 MAPK pathway is involved in this process.

[Key words] static magnetic field; bone marrow mesenchymal stem cells; osteogenesis; P38 signaling pathway

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30900290, 31270993), the Program for New Century Excellent Talents of Ministry of Education (NCET-10-0922) and the Science and Technology Development Plan of Weifang City (20120182). Corresponding author: Guo Zhiliang, E-mail: drzlguo@163.com

[基金项目] 国家自然科学基金(30900290, 31270993);教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-10-0922);潍坊市科技发展计划(20120182)

[通信作者] 郭志良, E-mail: drzlguo@163.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140303.1010.002.html>(2014-03-03)

骨髓间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 是一种具有多向分化潜能的细胞, 在体外培养, 扩增、诱导后有很强的成骨能力, 且取材容易、增殖能力强, 逐渐成为骨组织工程中首选的种子细胞^[1-2], 为骨缺损、骨不连的治疗开辟了一条崭新的道路。

以往研究显示磁场可诱导新的骨组织的生成, 从而起到治疗骨折延迟愈合、骨不连接和骨质疏松等相关骨病的作用^[3], 其机制除了磁场促进成骨细胞的生物功能外^[4-5], 还可能与磁场促进骨髓 MSCs 成骨性分化有关^[6]。文献^[7-8]证实磁场对 MSCs 的增殖、分化, 合成及分泌细胞外基质等均起到一定的调控作用。然而系统地研究磁场对 MSCs 成骨分化影响的较少, 而且现有的研究存在一定的分歧^[9]。本实验旨在探讨恒磁场对体外培养 MSCs 成骨性分化的影响, 并对其可能的机制进行初步探讨, 以期为临床应用恒磁场治疗骨缺损、骨吸收等骨性疾病提供理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

普通清洁级健康 2 月龄 Sprague-Dauley 大鼠, 体质量 200 g 左右, 雌雄不拘, 由解放军第 89 医院动物中心提供。

实验仪器: 包括稀土钕铁硼磁钢制成的恒磁体, 其表面磁场强度分别为 0.5、1.5、2 mT 及 3 mT, 另设一不充磁的钕铁硼永磁体作为实验对照组, 其磁场强度为 0 mT。CO₂ 细胞孵箱 (Heraeus), 倒置相差显微镜 (Olympus), Bio-ELx-800 型酶标仪 (Bio-Rad), γ 计数仪 (Wallac), 垂直电泳 (Bio-rad)。

实验试剂: 包括 DMEM 培养基 (LG, Gibco), ALP 活性定量测定试剂盒 (柏定生物工程), I 型前胶原 C 端前肽 (carboxy-terminal propeptide of type I procollagen, PICP) 试剂盒, 骨钙素 (boneY-carboxyglutamic acid, BGP) 放射免疫药盒, 多克隆 P38 或 p-P38 抗体 (Cell Signaling), HRP 标记的二抗 (Cell Signaling), ECL 显色试剂 (Santa Cruz)。

1.2 大鼠 MSCs 培养及鉴定

大鼠脱颈处死, 分离双侧股骨, 提取骨髓, 制成细胞悬液。将细胞悬液置于等体积淋巴细胞分离液上, 离心 (2 000 r/min, 30 min) 后收集交界层细胞, 接种 (5×10^6 细胞数/mL) 于培养瓶中, 第 7 天换液。第 14 天以 0.25% 胰蛋白酶消化传代。取生长良好的第 3 代 MSCs 制成细胞悬液, 流式细胞术检测 CD29、CD90、CD34 及 CD45 等细胞标记; 透射电镜观察细胞超微结构; 加入成骨诱导液 (a-MEM 培养液, 10% 胎牛血清, 100 U/mL 青霉素, 100 μ g/mL 链霉素, 地塞米松 10^{-8} mol/L, b-甘油磷酸钠 10^{-2} mol/L, 抗坏血酸 50 μ g/mL) 21 d 后行茜素红染色, 观察钙结节形成情况; 加入成脂诱导液 (DMEM 培养液, 10% 胎牛血清, 100 U/mL 青霉素, 100 mg/mL 链霉素, 胰岛素 5 mg/mL, 地塞米松 10^{-6} mol/L, 吡啶沙星 6×10^{-7} mol/L, 异丁基甲基黄嘌呤 10^{-4} mol/L) 5 d 后, 行油红 O 染色, 观察细胞内脂滴的形成情况。

1.3 实验分组及磁场处理

实验分为 5 组: 对照组 (0 mT)、0.5、1.5、2 mT 组及 3 mT 组。取生长良好的第 3 或 4 代 1 mL MSCs 接种 (1×10^5 细胞数/mL) 于 6 孔板, 加入成骨诱导液。置于不同强度的磁场中, 6 h/d。

1.4 I 型胶原、ALP 及 OCN 的检测

分别在磁场处理后第 1、2、3、4 天和第 6 天, 将上清液冻干处理成为干粉状, 采用同位素标记方法测定 I 型前胶原 C 端前肽 (carboxy-terminal propeptide of type I procollagen, PICP) 评估 I 型胶原分泌量。与此同时收集细胞, 反复冻融 3 次, 按操作说明书检测 ALP 的表达活性; 分别在第 3、6、9、12 天和第 24 天收集上清液, 按操作说明书, 采用同位素标记方法检测 OCN 分泌量。

1.5 钙结节染色

磁场处理后第 21 天, 以 PBS 冲洗细胞, 10% 甲醛溶液固定 (10 min) 后, 加入茜素红染液, 10 min 后以 PBS 清洗 3 次, 观察钙结节形成情况。

1.6 Western blot 检测

将经 1.5 mT 磁场强度处理不同时间的 MSCs 按比例加入蛋白裂解液制成样品, BCA 法测定蛋白含量。在样品中加入 SDS 上样缓冲液, 煮沸 5 min, 6 000 r/min 离心 3 min, 取上清上样。12% (w/v) SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳; 转膜后, 5% 脱脂奶粉室温下封闭 1 h, 加入一抗 (P38 或 p P38, 1:1 000 稀释), 4 $^{\circ}$ C 过夜, HRP 标记的二抗 (1:10 000 稀释) 室温下摇育 1 h, ECL 显示蛋白条带。

1.7 数据处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 SPSS 10.0 软件行单因素方差分析 (ANOVA)。

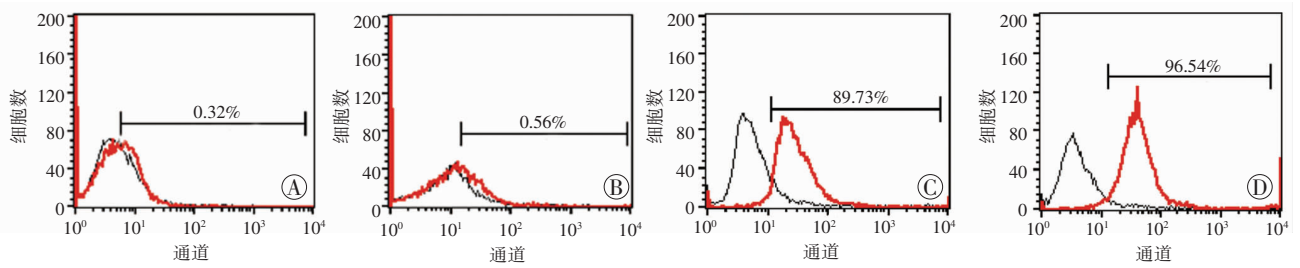
2 结果

2.1 大鼠骨髓 MSCs 鉴定

流式细胞术检测显示 CD34、CD45 的阳性表达率分别为 0.32% 及 0.56%, 而 CD90、CD29 的阳性表达率分别为 89.73% 及 96.54% (图 1), 提示获得的细胞为有别于骨髓造血干细胞的骨髓 MSCs; 透射电镜显示细胞胞体较大, 表面有微绒毛突起, 大核, 呈不规则形, 常染色质含量较多, 分布均匀细密, 细胞质较少, 符合核大浆少的干细胞超微结构特点 (图 2A); 经成骨诱导 21 d 后, 可观察到钙结节形成 (图 2B); 成脂诱导 5 d 后, 油红 O 染色, 可见到染成红色的脂滴 (图 2C)。

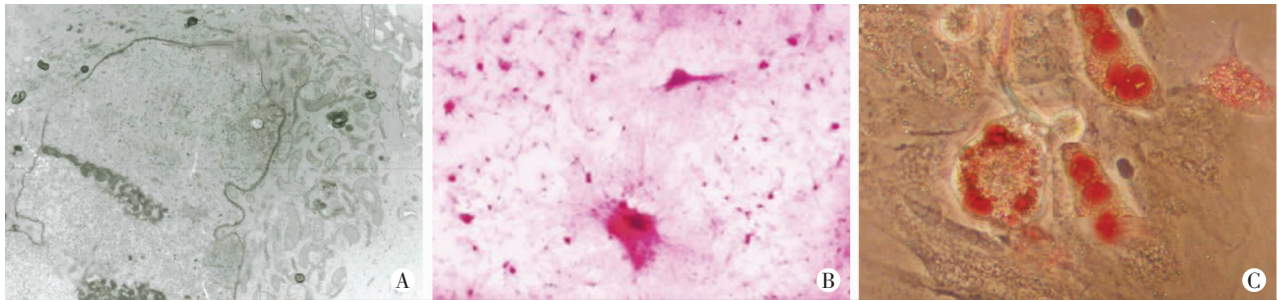
2.2 恒磁场对 MSCs 骨分化能力的影响

采用同位素标记方法检测 PICP, 用以评估 I 型胶原分泌量, 结果显示: 恒磁场作用 1、2、3、4 d 及 6 d 均不同程度地促进了 I 型胶原的分泌, 且 3 d 时的促进作用最为明显 (图 3); 恒磁场作用组活性 ALP 分泌量在第 3 天后均显著高于对照组 (图 4), 磁场组之间比较, 1.5、2 mT 组略高于 3 mT 组。在恒磁场作用第 3、6、9、12 天和 24 d 收集上清液, 检测 OCN 分泌量。钙结节形成实验结果显示: 恒磁场作用促进钙盐沉积 (图 5)。结果显示恒磁场可显著增加 OCN 分泌量 (图 6)。



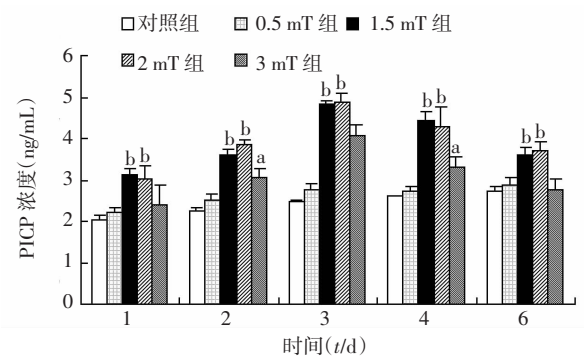
A~D: CD34、CD45、CD90及CD29的表达

图1 流式细胞术检测大鼠骨髓MSCs中CD34、CD45、CD90、CD29阳性表达率



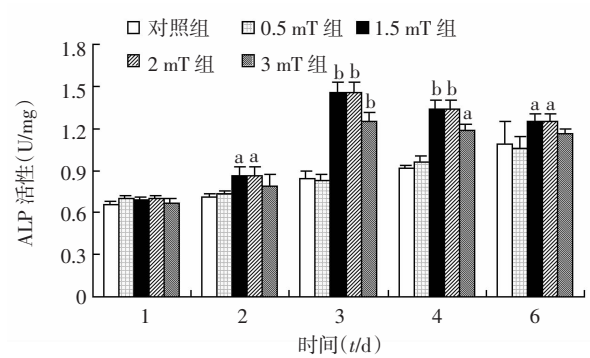
A: 透射电镜观察MSCs (×6400); B: 成骨诱导21 d (茜素红 ×40); C: 成脂诱导5 d (油红O ×40)

图2 透射电镜观察大鼠骨髓MSCs变化



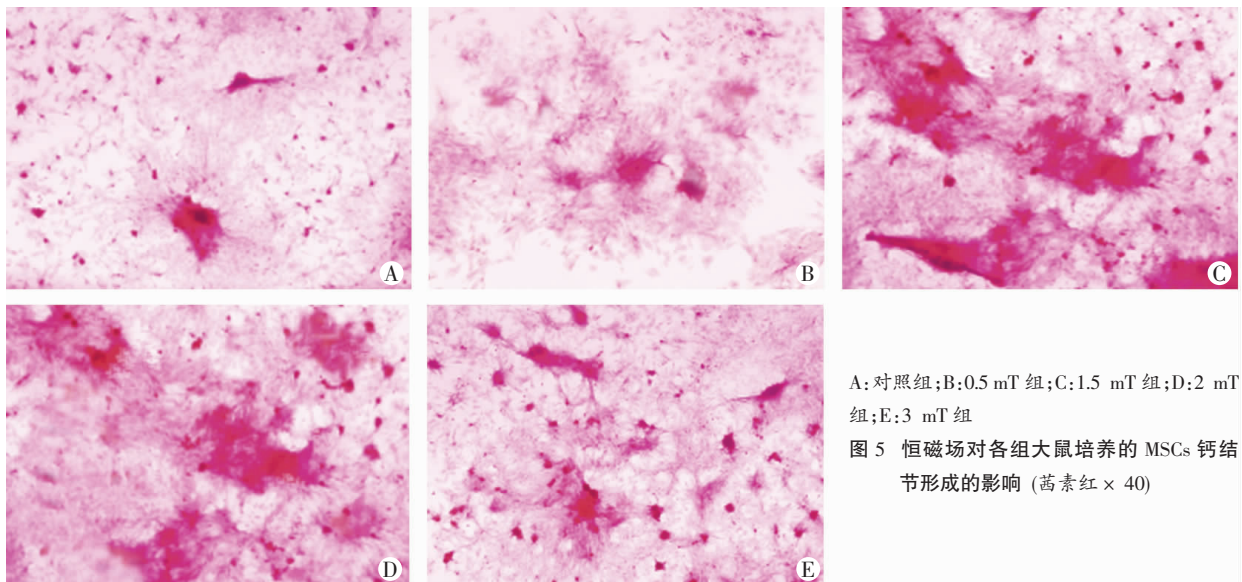
a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与对照组比较

图3 恒磁场作用不同时间对培养的MSCs分泌PICP的影响



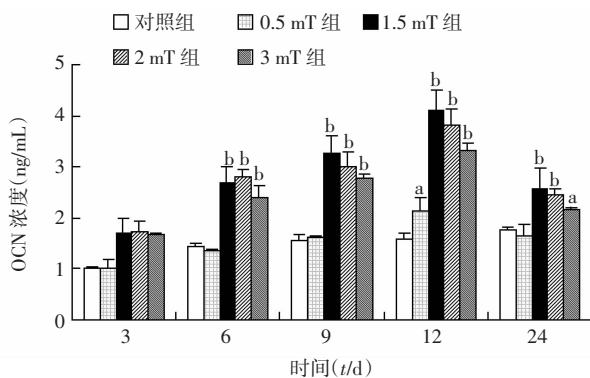
a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与对照组比较

图4 恒磁场作用不同时间对培养的MSCs ALP活性的影响



A: 对照组; B: 0.5 mT组; C: 1.5 mT组; D: 2 mT组; E: 3 mT组

图5 恒磁场对各组大鼠培养的MSCs钙结节形成的影响 (茜素红 ×40)

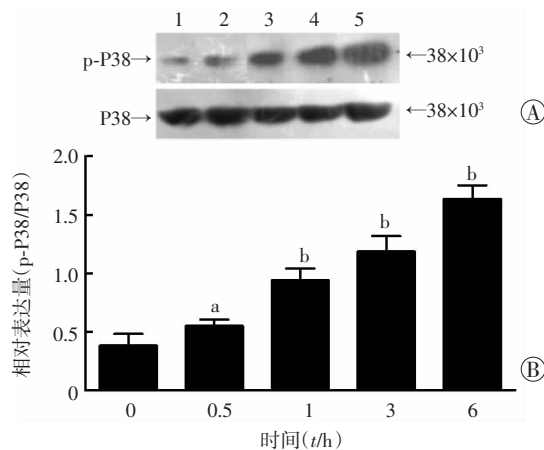


a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与对照组比较

图6 恒磁场作用不同时间对培养的MSCs分泌OCN的影响

2.3 恒磁场对P38分子磷酸化的影响

恒磁场(1.5 mT)可激活大鼠MSCs P38蛋白,提高其磷酸化水平。作用0.5 h时P38蛋白磷酸化水平开始上调,随作用时间的延长逐渐增加。而相应的总P38在各时间段无明显差异(图7)。

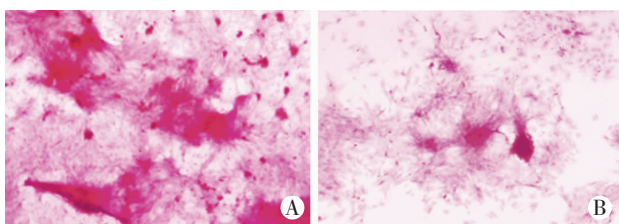


1-5: 分别代表恒磁场(1.5 mT)作用时间为0、0.5、1、3、6 h;
A: Western blot 检测结果; B: 半定量分析结果 a: $P < 0.05$,
b: $P < 0.01$, 与恒磁场(1.5 mT)作用时间为0 h的对照组比较

图7 Western blot 检测恒磁场对培养的MSCs P38蛋白磷酸化的影响

2.4 P38分子在恒磁场促MSCs成骨分化中的作用

恒磁场(SMF, 1.5 mT)显著上调MSCs I型胶原的分泌, ALP的活性表达, 增加OCN的浓度及钙结节的形成, 促进MSCs成骨分化, P38信号通路SB253580则明显抑制恒磁场促MSCs成骨分化效应。见图8, 表1。



A: SMF(1.5 mT); B: SMF(1.5 mT) + SB253580

图8 P38分子抑制剂SB253580对恒磁场诱导的MSCs成骨分化效应(茜素红 $\times 40$)

表1 SB253580对SMF诱导的MSCs PICP、ALP及OCN分泌的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	PICP(ng/mL)	ALP(U/mg)	OCN(ng/mL)
SMF(1.5 mT)组	4.73 \pm 0.76	1.45 \pm 0.13	3.75 \pm 0.31
SMF(1.5 mT) + SB253580组	3.28 \pm 0.68 ^b	1.01 \pm 0.17 ^a	2.77 \pm 0.26 ^b

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与SMF(1.5 mT)组比较

3 讨论

以MSCs为种子细胞的骨组织工程学为骨缺损、骨不连的治疗开辟了一条崭新的道路。但影响MSCs成骨分化的及其成骨能力的因素众多。体外细胞培养实验证实,电磁场能促进MSCs成骨性分化^[10],周建等^[11]研究进一步发现电磁场与MSCs成骨分化之间存在一个非线性“效应窗口”,即只有一定强度的电磁场才可有效促进MSCs的功能活性。本实验结果与之一致,1.5、3 mT强度的恒磁场均不同程度地促进了MSCs的成骨分化,而0.5 mT强度的恒磁场,在作用时间较短时没有表现出明显的促MSCs成骨效应。

MSCs在向成骨细胞系分化的过程中可合成、分泌多种成骨特异性的标志蛋白及特定的细胞外基质^[12]。ALP是MSCs成骨性分化的一个早期标志性指标。研究发现,在成骨过程中,ALP具有多种功效:ALP可启动钙化,促进成骨;解除焦磷酸盐对骨盐形成的抑制作用;水解磷脂酶,为轻磷灰石的沉积提供必需的磷酸。因此,ALP表达及活性的升高往往提示MSCs正向成骨分化或是成骨活性增强^[13]。I型胶原是细胞外基质最基本成分之一,是MSCs成骨分化的又一早期特征,与骨形成活性密切相关^[13]。在本实验中,我们用ALP及I型胶原的表达量来衡量MSCs向成骨细胞分化的早期阶段,结果表明:恒磁场明显促进ALP的表达及I型胶原的分泌,其中1.5 mT磁场强度促进作用更为明显。提示恒磁场,特别是一定强度的恒磁场在MSCs成骨分化的早期起着一定的调控作用。

OCN是骨基质中含量最多的非胶原蛋白,其主要生理功能是维持骨的正常矿化速率,增加骨盐含量,提高骨强度。文献^[14]报道,MSCs在成骨分化过程中,OCN的表达在ALP表达之后,是骨细胞进入矿化期的指征,因此是MSCs成骨分化末期的标志之一。我们利用放免法检测恒磁场对MSCs分泌OCN的影响,结果显示恒磁场处理组MSCs的OCN分泌量明显高于对照组。除此之外,钙结节形成实验结果显示1.5 mT恒磁场亦显著增加钙盐沉积面积。以上结果提示恒磁场在MSCs向成骨细胞分化的晚期阶段亦起到一定的作用。而成骨细胞分化的晚期阶段直接决定着骨缺损、骨不连的愈后。

虽然体外细胞模型不能完全模拟体内细胞的微环境,但本研究结果亦可提示一定强度范围内的磁场刺激可促进 MSCs 骨向分化,其作用靶点涉及成骨分化的早期及晚期阶段,这为临床应用恒磁场治疗骨缺损、骨吸收等骨性疾病提供了一定的实验依据。既然 1.5 mT 恒磁场能有效地促进 MSCs 骨向分化,故后续研究中,我们采用该强度对 MSCs 骨向分化的信号传导及机制进行进一步研究。

Ishido 等^[15]实验结果证实磁场可增加 MCF-7 细胞内 cAMP 的浓度。Patterson 等^[16]研究显示将小鼠成纤维细胞或前成骨细胞暴露于脉冲电磁场,可有效激活 PI3K/mTOR 信号途径。Yuge 等^[17]研究表明电磁场不影响成骨细胞磷酸化 ERK1/2 和 JNK 的表达,但可导致 MAPK 信号通路中的 P38 信号的激活,可见不同的细胞对不同形式的磁场反应性不同。本研究中采用的磁场为恒磁场,其强度为 1.5 mT,作用的靶细胞是 MSCs。结果显示,恒磁场(1.5mT)可上调 MSCs P38 信号分子的活性,磁场作用 0.5 h 后 MSCs P38 磷酸化水平增高,并随磁场作用时间的延长逐渐增加。该结果提示 P38 很可能参与恒磁场促 MSCs 骨向分化过程。

P38 信号分子是 MAPK 家族中重要的组成成员,往往因应激而被激活。Noth 等^[18]在实验中发现 BMP-2 通过 P38 信号通路诱导成骨细胞成骨素基因的表达及基质的矿化。最近的研究证实,抑制细胞骨架的聚合可有效抑制 MSCs 的成骨分化能力,而 P38 信号分子的激活则是 MSCs 细胞骨架的聚合的必要条件^[19]。以上研究表明,在 MSCs 向成骨细胞分化的过程中, P38 通路可能起着主要的调控作用。本实验结果亦证实, P38 信号通路 SB253580 可明显抑制恒磁场诱导的 MSCs I 型胶原、OCN 的分泌, ALP 的活性表达及钙结节的形成。因此, P38 信号分子是调控恒磁场促进 MSCs 成骨分化的重要信号分子。

参考文献:

[1] 李秀森, 郭子宽, 杨靖清, 等. 骨髓间充质干细胞的生物学特性[J]. 解放军医学杂志, 2000, 25(5): 346-348.
[2] 彭吾训, 王蕾, 邓进, 等. 一种组织工程骨修复兔股骨头坏死模型的效果评价[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(7): 661-664.
[3] Assiotis A, Sachinis N P, Chalidis B E. Pulsed electromagnetic fields for the treatment of tibial delayed unions and nonunions. A prospective clinical study and review of the literature[J]. J Orthop Surg Res, 2012, 7: 24.
[4] Qu C, Qin Q H, Kang Y. A hypothetical mechanism of bone remodeling and modeling under electromagnetic loads[J]. Biomaterials, 2006, 27(21): 4050-4057.

[5] 王胜国, 周力, 王艳民, 等. 静磁场对成骨细胞增殖活性和细胞表面超微结构的影响[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(12): 1220-1223.
[6] Ceccarelli G, Bloise N, Mantelli M, et al. A comparative analysis of the *in vitro* effects of pulsed electromagnetic field treatment on osteogenic differentiation of two different mesenchymal cell lineages[J]. Biores Open Access, 2013, 2(4): 283-294.
[7] Cho H, Choi Y K, Lee D H, et al. Effects of magnetic nanoparticle-incorporated human bone marrow-derived mesenchymal stem cells exposed to pulsed electromagnetic fields on injured rat spinal cord[J]. Biotechnol Appl Biochem, 2013, 60(6): 596-602.
[8] Haddad J B, Obolensky A G, Shinnick P. The biologic effects and the therapeutic mechanism of action of electric and electromagnetic field stimulation on bone and cartilage: new findings and a review of earlier work[J]. J Altern Complement Med, 2007, 13(5): 485-490.
[9] Zhong C, Zhao T F, Xu Z J, et al. Effects of electromagnetic fields on bone regeneration in experimental and clinical studies: a review of the literature[J]. Chin Med J (Engl), 2012, 125(2): 367-372.
[10] Liu C, Yu J, Yang Y, et al. Effect of 1 mT sinusoidal electromagnetic fields on proliferation and osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stromal cells[J]. Bioelectromagnetics, 2013, 34(6): 453-464.
[11] 程国政, 李志锋, 周建, 等. 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[J]. 中国骨质疏松杂志, 2010, 16(8): 558-562.
[12] Wlodarski K H, Wlodarski P K, Galus R. Bioactive composites for bone regeneration. Review[J]. Ortop Traumatol Rehabil, 2008, 10(3): 201-210.
[13] Tsiologiannis E, Polyzois I, Oak-Tang Q, et al. Targeting bone morphogenetic protein antagonists: *in vitro* and *in vivo* evidence of their role in bone metabolism[J]. Expert Opin Ther Targets, 2009, 13(1): 123-137.
[14] Dacic S, Kalajic I, Visnjic D, et al. Col1a1-driven transgenic markers of osteoblast lineage progression[J]. J Bone Miner Res, 2001, 16(7): 1228-1236.
[15] Ishido M, Nitta H, Kabuto M. Magnetic fields (MF) of 50 Hz at 1.2 microT as well as 100 microT cause uncoupling of inhibitory pathways of adenyl cyclase mediated by melatonin 1a receptor in MF-sensitive MCF-7 cells[J]. Carcinogenesis, 2001, 22(7): 1043-1048.
[16] Patterson T E, Sakai Y, Grabiner M D, et al. Exposure of murine cells to pulsed electromagnetic fields rapidly activates the mTOR signaling pathway[J]. Bioelectromagnetics, 2006, 27(7): 535-544.
[17] Yuge L, Okubo A, Miyashita T, et al. Physical stress by magnetic force accelerates differentiation of human osteoblasts[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 311(1): 32-38.
[18] Noth U, Tuli R, Seghatoleslami R, et al. Activation of p38 and Smads mediates BMP-2 effects on human trabecular bone-derived osteoblasts[J]. Exp Cell Res, 2003, 291(1): 201-211.
[19] Sonowal H, Kumar A, Bhattacharyya J, et al. Inhibition of actin polymerization decreases osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells through p38 MAPK pathway[J]. J Biomed Sci, 2013, 20: 71.

(收稿:2013-12-02;修回:2014-01-28)

(编辑 郭建秀)