

电磁场作用下大鼠骨髓间充质干细胞的成骨分化与增殖

朱波 吴华 黄珊珊 赵东明

【摘要】目的 研究 15 Hz 1 mT 的正弦波电磁场对大鼠骨髓间充质干细胞(MSCs)的细胞外信号调节激酶(ERK)和丝裂原激活的蛋白激酶(MAPK)p38 的激活规律及相互作用特点,探讨 ERK 和 p38 MAPK 信号通路在电磁场促成骨效应中的作用。**方法** 选取第 3 代体外分离培养的大鼠骨髓间充质干细胞,分为对照组、曝磁组、曝磁 + PD98059 组和曝磁 + SB202190 组四个大组。曝磁组细胞置于带有电磁发生器的培养箱中培养,曝磁 + PD98059 组和曝磁 + SB202190 组细胞分别加入 ERK 信号通路阻断剂 PD98059 和 p38 MAPK 信号通路阻断剂 SB202190 后再置入带有电磁发生器的培养箱中培养,对照组细胞正常培养。用免疫印迹(Western blot)法检测 ERK 和 p38 MAPK 的蛋白表达及磷酸化水平变化。按照细胞碱性磷酸酶(ALP)试剂盒说明书操作步骤对各组细胞 ALP 活性进行检测,其活性变化可间接反映细胞的分化成骨活性;用噻唑蓝比色法检测各组细胞的增殖活性变化。**结果** ①电磁场作用下,骨髓间充质干细胞内 p38 MAPK 信号通路可被快速激活,曝磁 15 min 后出现 p38 磷酸化水平升高($P < 0.05$);加用 SB202190 后,再行电磁场刺激,细胞内 p38 磷酸化水平仍然维持在较低水平,与曝磁组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。②与对照组比较,曝磁 5 d 后细胞内 ALP 活性显著升高($P < 0.05$),SB202190 可明显阻断该效应($P < 0.05$)。③与对照组比较,曝磁 3 d 后骨髓间充质干细胞的增殖活性明显升高($P < 0.05$),SB202190 不能阻断该效应(曝磁 + SB202190 组与曝磁组比较, $P > 0.05$)。④SB202190 阻断 p38 MAPK 信号通路并曝磁 5 min 后,ERK MAPK 磷酸化水平明显强化($P < 0.05$);PD98059 阻断 ERK MAPK 信号通路并曝磁 30 min 后,p38 MAPK 磷酸化水平明显强化($P < 0.05$)。**结论** ERK 和 p38 MAPK 信号通路分别参与了电磁场对骨髓间充质干细胞增殖和分化成骨过程的调节,并在电磁场作用下两通路表现出串扰现象。

【关键词】 电磁场; 间质干细胞; 丝裂原激活蛋白激酶类; p38 丝裂原活化蛋白激酶类

Effects of exposure to electromagnetic fields on osteogenic differentiation and proliferation of rats' bone marrow mesenchymal stem cells Zhu Bo*, Wu Hua, Huang Shanshan, Zhao Dongming. * Department of Orthopedics, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430030, China Corresponding author: Zhao Dongming, Email: donnyzhao3@aliyun.com

【Abstract】Objective To study the effects of electromagnetic field (EMF) on the activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways in mesenchymal stem cells (MSCs) and their interaction, and to explore the cellular signal transduction mechanism of the biological effects induced by EMF. **Methods** The 3rd-passage rat bone marrow MSCs were randomly divided into a control group, an EMF group, an EMF + PD98059 group and an EMF + SB202190 group. Cells in the EMF group were cultured in the electromagnetic field, those in the EMF + PD98059 and EMF + SB202190 groups cultured in the electromagnetic field after PD98059 or SB202190 was added, and those in the control group were cultured normally. Different groups of cells were exposed to electromagnetic fields (15 Hz, 1 mT, sine wave form) for different exposure duration. The activated phosphorylated and non-phosphorylated p38MAPK were measured using Western blotting analysis with their specific corresponding antibodies. The alkaline phosphatase (ALP) activity in cells in different groups was detected according to the instructions of ALP kit. MTT assay was applied to investigate the proliferation of cells. **Results** Electromagnetic fields could rapidly induce the activation of p38 MAPK ($P < 0.05$) and the phosphorylation of p38 MAPK elevated after 15 min exposure to EMF. The phosphorylation of p38 MAPK was significantly lower in the EMF + SB202190 group than that of the EMF group. After 5 days of EMF exposure, the ALP activity of cells was signifi-

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2015.010.002

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(81301083);基金面上项目(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(朱波、吴华、赵东明),神经内科(黄珊珊)

通信作者:赵东明, Email: donnyzhao3@aliyun.com

cantly improved, and the effect could be inhibited by SB202190. The bone marrow mesenchymal stem cells proliferation increased significantly after being exposed to EMF for 3 days, and it could not be blocked by SB202190. Phosphorylation of ERK and MAPK increased significantly when the p38 MAPK pathway was blocked by SB202190 and exposed to EMF for 5 minutes, and it also increased significantly when the ERK MAPK pathway was blocked by PD98059 and received 30 minutes of EMF exposure. **Conclusion** EMF can quickly activate ERK and p38 MAPK pathways to induce cell proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. Moreover, in EMF there is a mutual interference between ERK and p38 MAPK pathways.

【Key words】 Electromagnetic fields; Mesenchymal stem cells; Mitogen-activated protein kinases; p38 Mitogen-activated protein kinases

虽然电磁场已被证实具有促进骨折愈合的作用^[1-2],但其作用机制目前仍不清楚。以骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)为研究对象,研究电磁场对该细胞的增殖和分化的影响及其机制,可为电磁场应用于骨组织工程打下坚实的理论基础。骨髓间充质干细胞是骨组织工程研究中常用的一种“种子”细胞,一定参数的电磁场可增强骨髓 MSCs 增殖活性并诱导分化成骨^[3-4],但其作用机制尚需要进一步阐明。细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)和丝裂原激活的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK) p38 是 MAPK 家族的重要成员,可因多种刺激因素而激活,诱导细胞增殖、分化和凋亡等生物学行为^[5-7]。Wang 等^[8]研究发现,50 Hz 的电磁场可激活人巩膜成纤维细胞中 p38 信号通路。本课题组前期研究^[9]表明,15 Hz 的电磁场可激活 ERK MAPK 信号通路,并主要通过该通路促进骨髓间充质干细胞的增殖。本研究在前期研究^[9]的基础上,通过观察 15 Hz 1 mT 的电磁场作用下 p38 MAPK 磷酸化水平的变化,结合应用 ERK 和 p38 MAPK 阻断剂,检测细胞内 ERK 和 p38 MAPK 磷酸化水平的变化和骨髓间充质干细胞的碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性(分化成骨)与增殖活性的变化,旨在探讨 ERK 和 p38 MAPK 通路之间的相互影响及其在电磁场促进成骨效应中的作用。

材料与方法

一、主要试剂及实验仪器

主要试剂:达尔伯改良伊格尔培养基(Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM)-F12 和胎牛血清(美国 Hyclone 公司),胰蛋白酶(Amersco 公司),ERK 信号通路阻断剂 PD98059 和 p38 MAPK 信号通路阻断剂 SB202190(Biosource 公司),噻唑蓝试剂和二甲亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO)(Sigma 公司),ALP 检测试剂盒和考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒(南京建成生物工程研究所),小鼠抗磷酸化 ERK(phospho-ERK, pERK)、磷酸化 p38(phospho-p38, pp38)、 γ -微管蛋白(tubulin),兔抗 ERK、p38 等抗体(Santa Cruz 公司),

产辣根过氧化物酶标记的羊抗兔/小鼠/IgG(Jackson 免疫研究实验室)。

主要实验仪器:电磁场发生器(由海军工程大学设计制造 Helmholtz 线圈式磁场发生器,本实验采用的电磁场为频率 15 Hz、强度 1 mT 的正弦波电磁场,将电磁场发生器置入 5% CO₂, 37 °C, 饱和湿度的细胞培养箱中),酶联免疫检测仪(DG3022A, 华东电子管厂),垂直电泳仪、脱色摇床和转膜仪(美国 Bio-Rad 公司),倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司)。

二、实验动物及分组

选取 5 周龄清洁级 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 18 只,体重约 100 ~ 120 g,雌雄不限,购自华中科技大学同济医学院实验动物中心。

根据不同实验目的采用不同的分组方式,每部分实验各组细胞的样本量均设为 6 次,每个实验均设正常培养的细胞作为对照组,分组信息如下:

1. 观察电磁场刺激对细胞内 p38 MAPK 通路影响的实验分组:对照组和曝磁组,曝磁组根据曝磁时间又分为 5、15、30、60 和 120 min 组。

2. 观察 p38 通路阻断剂 SB202190 的阻断效果的实验分组:根据本研究中各时间点电磁场对细胞内 p38 MAPK 信号通路影响的实验结果(图 1 和图 2),选取 p38 对电磁场刺激较敏感的时间 30 min 为实验时间点,分为对照组、30 min 曝磁组(用 30 min 组表示)、30 min 曝磁 + SB202190 组(用 30 min + SB202190 组表示)。

3. 观察电磁场作用下两通路相互作用的实验分组:检测 ERK 的磷酸化变化,选择 ERK 对电磁刺激较敏感的时间 5 min^[9]为实验时间点,分为对照组、5 min 曝磁组(用 5 min 组表示)、5 min 曝磁 + PD98059 组(用 5 min + PD98059 组表示)、5 min 曝磁 + SB202190 组(用 5 min + SB202190 组表示);检测 p38 的磷酸化变化,分为对照组、30 min 曝磁组(用 30 min 组表示)、30 min 曝磁 + SB202190 组(用 30 min + SB202190 组表示)、30 min 曝磁 + PD98059 组(用 30 min + PD98059 组表示)。

4. 检测细胞增殖活性及 ALP 活性的实验分组:分为对照组、曝磁组、曝磁 + SB202190 组。

三、实验方法

1. 体外分离和培养大鼠骨髓间充质干细胞:将大鼠颈椎脱臼处死后,取双侧股骨骨髓细胞,选用贴壁筛选法培养纯化骨髓间充质干细胞,具体方法参见前期实验成果报道^[9]。

2. 细胞内蛋白及磷酸化水平的检测:用免疫印迹(Western blot)法^[10]检测细胞内蛋白及磷酸化水平。每次实验取培养的第 3 代细胞,将细胞浓度调整至 $1 \times 10^8/L$ 后,根据不同的分组均匀随机地种植于直径 9 cm 的培养皿中,每个培养皿 8 ml,培养 24 h 后进行分组处理。对照组细胞置于普通培养箱中培养,需要电磁刺激的细胞组置于安装电磁场发生器的培养箱中培养,最后同时收集细胞,行 pERK、ERK、pp38 和 p38 的 Western blot 检测,Western blot 方法参见前期实验报道^[9]。实验中所用小鼠抗 pERK 和 pp38 抗体浓度 1:500,兔抗 ERK 和 p38 浓度 1:500。

同样的方法,对各分组细胞 PD98059 (浓度 20 $\mu\text{mol}/l$) 或 SB202190 (浓度 20 $\mu\text{mol}/l$) 作用细胞后,选取 5 min (ERK) 或 30 min (p38) 时间点,对照组、曝磁组、曝磁 + PD98059 组和曝磁 + SB202190 组细胞分别提取蛋白行 Western blot 法检测 ERK、p38 蛋白表达量及其磷酸化水平 (pERK 和 pp38)。

3. 细胞增殖活性变化的检测:用噻唑蓝法检测细胞增殖活性变化。取第 3 代细胞,将细胞调整至 2×10^3 个/孔的密度接种于 96 孔细胞培养板,对照组及曝磁组每孔各加入含 10% 胎牛血清的 DMEM-F12 培养基 200 μl ,曝磁 + PD98059 组每孔加入含 10% 胎牛血清及含浓度为 20 $\mu\text{mol}/L$ PD98059 的 DMEM-F12 培养基 200 μl ;曝磁 + SB202190 组每孔加入含 10% 胎牛血清及含浓度为 20 $\mu\text{mol}/l$ SB202190 的 DMEM-F12 培养基 200 μl 。各组细胞均培养 3 d,其中曝磁组、曝磁 + PD98059 组及曝磁 + SB202190 组细胞每次曝磁 30 min,每日 2 次,共 3 d。处理结束后,用噻唑蓝法检测各组细胞的增殖活性,细胞增殖活性以于酶标仪下检测 490 nm 波长下的光密度 (optical density, OD) 值表示^[10]。

4. 细胞内 ALP 活性的检测:取第 3 代细胞,将细胞调整至 1×10^5 /孔的密度接种于一次性 6 孔培养板,第 2 天开始电磁刺激,曝磁组、曝磁 + PD98059 组及曝磁 + SB202190 组细胞每日曝磁 8 h,共 5 d,对照组细胞普通条件下培养 5 d,电磁刺激完成后收集细胞,各孔细胞加入聚乙二醇辛基苯基醚 (Triton X-100),置入 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中过夜,细胞裂解液用考马斯亮蓝测定各孔培养细胞蛋白质含量^[11-12],调整蛋白浓度后按 ALP 试剂盒说明书进行操作,计算 ALP 活性水平 (单位以 U/g 蛋白来表示)。

四、统计学方法

对实验数据使用 SPSS 13.0 版统计软件进行统计

学分析处理,实验数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,组间以 t 检验进行处理, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

结 果

一、电磁场对细胞内 p38 MAPK 信号通路的影响

电磁场可快速激活 p38 MAPK 通路,引起磷酸化水平升高 (图 1)。细胞曝磁后 15 min 开始出现 p38 MAPK 磷酸化水平的明显升高;曝磁 30 min 时,pp38 继续升高并可持续 2 h 以上,与对照组相比,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),且电磁刺激 1 h 后开始逐渐出现 p38 蛋白的表达量的升高 ($P < 0.05$)。详见图 2。

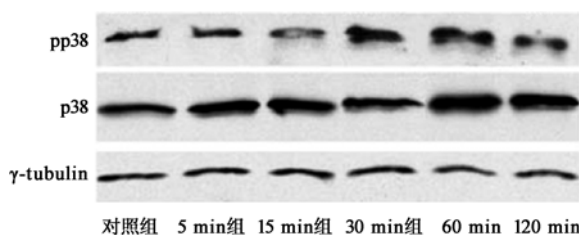
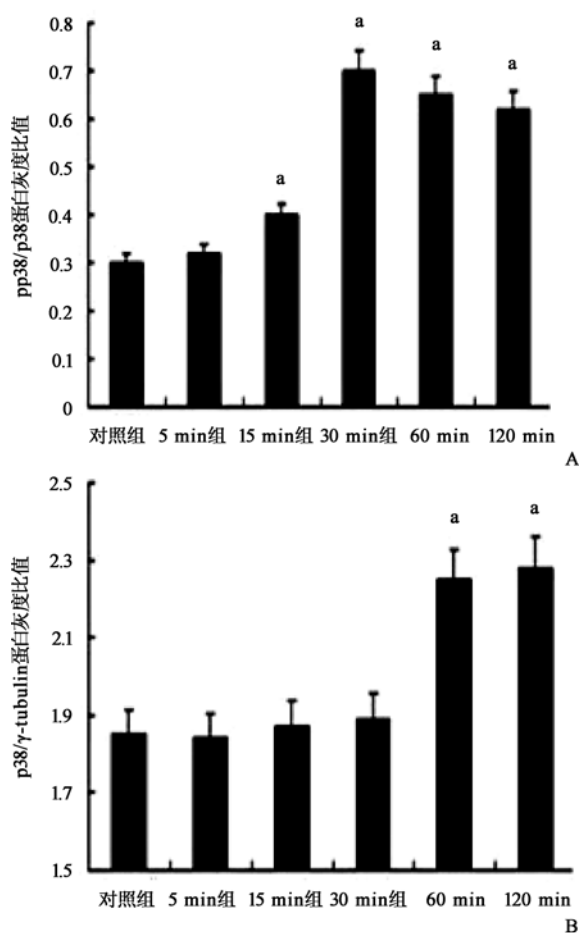


图 1 各组细胞内 p38 及 pp38 的 Western blot 检测图



注:图 A 为 pp38 相对于 p38 的灰度比值,与对照组比较,^a $P < 0.05$;图 B 为 p38 相对于蛋白内参 γ -tubulin 的灰度比值,与对照组比较,^a $P < 0.05$

图 2 各组 Western blot 相对灰度值比较

二、加用 SB202190 对细胞内 p38 磷酸化水平的影响

电磁场刺激 30 min 时,细胞内 p38 磷酸化水平显著升高,与对照组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);加用 SB202190 后,再行电磁场刺激,细胞内 p38 磷酸化水平仍然维持在较低水平,与 30 min 曝磁组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),详见图 3 和图 4。

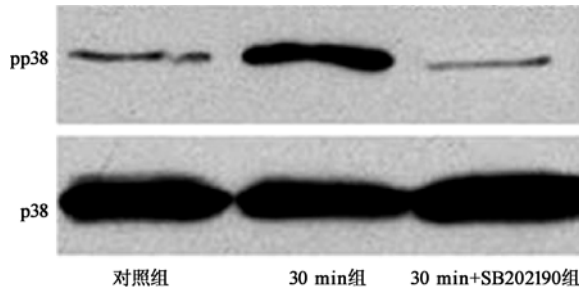
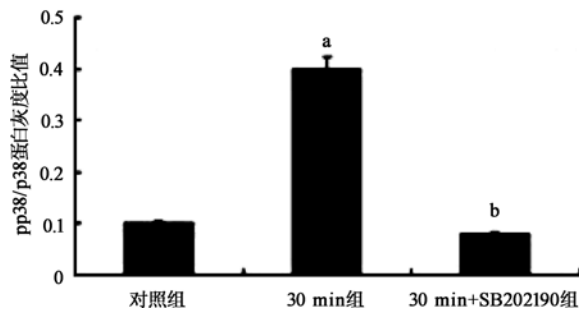


图 3 对照组和 30 min 组及其加用 SB202190 组的 Western blot 检测图



注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与 30 min 组比较,^b $P < 0.05$

图 4 对照组和 30 min 组及其加用 SB202190 组的 pp38/p38 相对灰度值比较

三、电磁场作用下两种信号通路的相互作用

与对照组比较,5 min 组和 5 min + SB202190 组 pERK 表达水平明显升高 ($P < 0.05$);与 5 min 组比较,5 min + PD98059 组 pERK 表达水平明显降低 ($P < 0.05$),5 min + SB202190 组 pERK 表达水平明显升高 ($P < 0.05$) (图 5,图 6)。与对照组比较,30 min 组和 30 min + PD98059 组 pp38 表达水平明显升高 ($P < 0.05$);与 30 min 组比较,30 min + SB202190 组 pp38 表达水平明显降低 ($P < 0.05$),30 min + PD98059 组 pp38 表达水平明显升高 ($P < 0.05$) (图 7,图 8)。

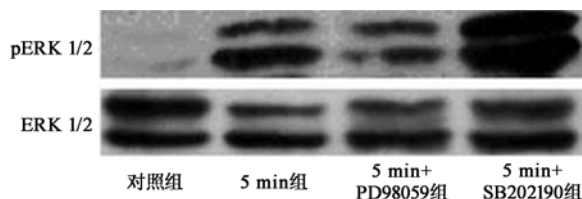
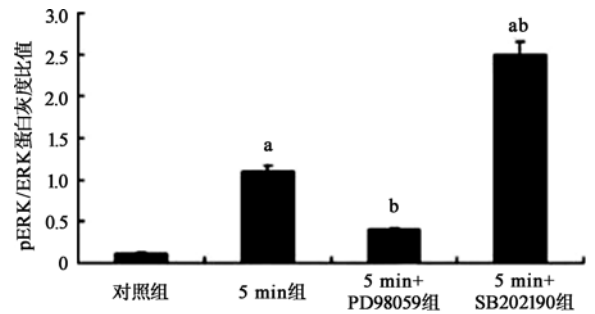


图 5 各组细胞内 ERK 磷酸化水平的 Western blot 检测图



注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与 5 min 组比较,^b $P < 0.05$

图 6 各组 pERK/ERK 的 Western blot 灰度值比较

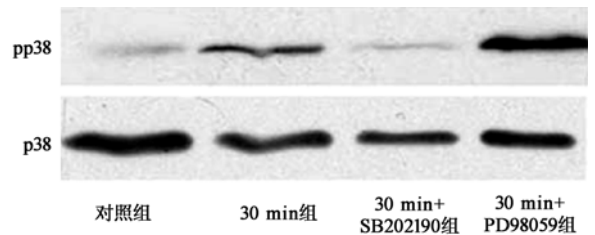
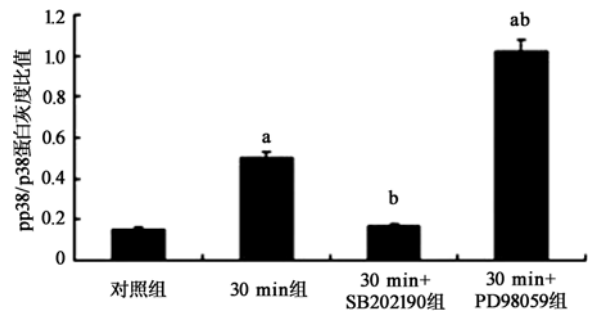


图 7 各组细胞内 p38 磷酸化水平的 Western blot 检测图



注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与 30 min 组比较,^b $P < 0.05$

图 8 各组 pp38/p38 的 Western blot 灰度值比较

四、各组细胞增殖活性及 ALP 活性比较

曝磁组和曝磁 + SB202190 组细胞在 490 nm 波长下的 OD 值较对照组明显升高 ($P < 0.05$);曝磁 + SB202190 组的 OD 值较曝磁组有轻度升高 ($P > 0.05$);详见表 1。

曝磁组细胞 ALP 活性较对照组明显升高 ($P < 0.05$);曝磁 + SB202190 组的 ALP 活性均明显低于曝磁组和对照组,且差异有统计学意义 ($P < 0.05$);详见表 1。

表 1 各组细胞在 490 nm 波长下的 OD 值及 ALP 检测比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量(n)	OD 值	ALP 活性 (U/g 蛋白)
对照组	6	0.48 ± 0.02	22.05 ± 3.08
曝磁组	6	0.53 ± 0.03 ^a	27.12 ± 3.25 ^a
曝磁 + SB202190 组	6	0.54 ± 0.02 ^a	6.05 ± 1.58 ^{ab}

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与曝磁组比较,^b $P < 0.05$

讨 论

一定参数的电磁场可促进体外培养的骨髓间充质干细胞增殖,并可诱导该细胞向成骨细胞分化^[13-15],但其作用机制的研究目前尚未见报道。ERK 和 p38 信号通路是 MAPK 信号通路亚家族中的重要组成部分。当细胞应激或刺激因子与细胞表面受体结合而激活 p38 信号通路时,可按顺序依次激活 MAPK 级联反应中特异的 3 种蛋白激酶,即 MAPK 激酶激酶(MAP kinase kinase kinase, MKKK)、MAPK 激酶(MAP kinase kinase, MKK)和 MAPK。本课题组前期研究了电磁刺激后骨髓间充质干细胞内 ERK MAPK 活性的变化,并检测阻断该通路后电磁场对骨髓间充质干细胞的细胞增殖及分化成骨活性影响。有报道一定参数的电磁场可激活细胞的 ERK 和 p38 信号通路,引起生物学效应^[8,16]。

很多体内体外实验研究表明,诸多因素可通过激活 p38 通路,对进成骨细胞或成骨样细胞的增殖和分化成骨产生影响^[17-19]。骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)、骨形态发生蛋白-4(bone morphogenetic protein-4, BMP-4)和转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)在分化成骨过程中发挥着非常重要的作用,用 BMP-2 和 TGF- β 分别对成骨细胞进行刺激,均可引起 ERK 和 p38 磷酸化水平升高^[20];分别用 ERK 通路和 p38 通路阻断剂干预 BMP-4 刺激的成骨细胞,发现 ERK 通路阻断剂可增强 BMP-4 对骨钙素促生成作用,而 p38 通路阻断剂却可明显降低其作用^[21]。Suzuki 等^[17]研究认为,ERK 通路在成骨细胞的增殖方面起重要作用,而 p38 通路则在成骨细胞分化方面作用明显。

本研究结果显示,15 Hz 1 mT 的正弦波电磁场刺激后,大鼠骨髓间充质干细胞内 p38 MAPK 通路被明显激活。ALP 的表达及其活性代表着细胞向成骨细胞分化的开始,其活性与成骨细胞的分化成熟程度呈正相关^[22],故本实验选择检测细胞内 ALP 的活性作为观察骨髓 MSCs 成骨分化的指标。

本研究中,曝磁组细胞 ALP 活性较对照组明显升高($P < 0.05$);曝磁 + SB202190 组的 ALP 活性均明显低于曝磁组和对照组($P < 0.05$),说明电磁场刺激后,细胞内 ALP 的活性显著增强;阻断 p38 MAPK 通路后,几乎完全阻断了电磁场对 ALP 活性的促进作用,且 ALP 活性处于非常低的水平,提示 p38 MAPK 通路的激活在电磁场促成骨效应中起重要作用。本研究结果(见表 1)显示,电磁场刺激后,骨髓间充质干细胞的增殖活性显著增高;SB202190 阻断 p38 通路后,曝磁 + SB202190 组细胞的增殖活性较单纯曝磁组有轻度

升高,但组间差异无统计学意义($P > 0.05$),提示 p38 MAPK 信号通路在电磁场促增殖效应中的作用不显著,说明 p38 MAPK 通路的激活在电磁场引起的增殖效应中没有明显的直接作用。

根据前期研究^[9]结果,用 ERK MAPK 阻断剂干预电磁场刺激的骨髓间充质干细胞,电磁场的促增殖效应几乎完全被抑制,而 ALP 的活性却有轻度升高,提示电磁场作用下,ERK MAPK 通路和 p38 MAPK 通路被激活后,分别在细胞增殖和分化成骨方面发挥着重要作用。

通常情况下,一种细胞如处于活跃增殖期,其分化的活性就会受到抑制;而当其进入分化期时,增殖活性相对降低。从本实验结果及前期研究结果分析,电磁场快速激活 ERK 和 p38 信号通路,而 ERK 和 p38 信号通路则分别在 MSCs 增殖和分化成骨(ALP 活性)中起重要作用。电磁场作用下,用 PD98059 阻断 ERK 通路后,出现 p38 的磷酸化水平较单纯电磁刺激组明显升高;用 SB202190 阻断 p38 通路后,也出现 ERK 的磷酸化水平较单纯电磁刺激组显著升高。即 2 种 MAPK 通路之间存在复杂的相互调节的机制。

综上所述,电磁场(15 Hz 1 mT 正弦波电磁场)可通过活化 ERK 和 p38 MAPK 信号通路来促进骨髓间充质干细胞的增殖和分化成骨;而电磁场作用下两通路之间的串扰,共同参与调节着细胞的增殖和分化成骨的过程。

参 考 文 献

- [1] Martinez-Rondanelli A, Martinez JP, Moncada ME, et al. Electromagnetic stimulation as coadjuvant in the healing of diaphyseal femoral fractures: a randomized controlled trial [J]. *Colomb Med*, 2014, 45 (2): 67-71.
- [2] Muttini A, Abate M, Bernabò N, et al. Effect of electric current stimulation in combination with external fixator on bone healing in a sheep fracture model [J]. *Vet Ital*, 2014, 50 (4): 249-257.
- [3] 方真华, 吴华, 马伟明, 等. 50Hz 电磁场对小鼠骨髓间充质干细胞增殖的影响 [J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2004, 26 (1): 1-4.
- [4] 赵敏, 许建中, 周强, 等. 脉冲电磁场诱导人骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的研究 [J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2005, 27 (1): 5-8.
- [5] Manning G, Whyte DB, Martinez R, et al. The protein kinase complement of the human genome [J]. *Science*, 2002, 298 (5600): 1912-1934.
- [6] Zhang Y, Wang Y, Yang K, et al. BMP4 increases the expression of TRPC and basal $[Ca^{2+}]_i$ via the p38MAPK and ERK1/2 pathways independent of BMPRII in PSMCs [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (12): e112695.
- [7] Zhao H, Liu X, Zou H, et al. Osteoprotegerin induces podosome disassembly in osteoclasts through calcium, ERK, and p38 MAPK signaling pathways [J]. *Cytokine*, 2015, 71 (2): 199-206.
- [8] Wang J, Cui JF, Zhu H. Suppression of type I collagen in human

- scleral fibroblasts treated with extremely low-frequency electromagnetic fields[J]. *Molecular Vision*,2013,19(4):885-893.
- [9] 赵东明,吴华,黄珊珊,等. 电磁场激活细胞外信号调节激酶通路在骨髓间充质干细胞增殖与分化成骨中的作用[J]. *中华物理医学与康复杂志*,2008,30(8):515-518.
- [10] 顾旭东,柏京,张成文,等. 低频电刺激诱导外周血干细胞增殖并向施万细胞分化的实验研究[J]. *中华物理医学与康复杂志*,2013,35(9):673-676.
- [11] Zong S,Zeng G,Zou B, et al. Effects of Polygonatum sibiricum polysaccharide on the osteogenic differentiation of bone mesenchymal stem cells in mice[J]. *Int J Clin Exp Pathol*,2015,8(6):6169-6180.
- [12] Luo G,Gu F,Zhang Y, et al. Icariside II promotes osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells in beagle canine[J]. *Int J Clin Exp Pathol*,2015,8(5):4367-4377.
- [13] 顾文春,马伟明,赵治华,等. 工频磁场刺激小鼠 MSCs 体外增殖与分化的初步研究[J]. *生物医学工程学杂志*,2005,22(3):510-513.
- [14] Fan W,Qian F,Ma Q, et al. 50 Hz electromagnetic field exposure promotes proliferation and cytokine production of bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015,8(5):7394-7404.
- [15] Song M,Zhao D,Wei S, et al. The effect of electromagnetic fields on the proliferation and the osteogenic or adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells modulated by dexamethasone[J]. *Bioelectromagnetics*,2014,35(7):479-490.
- [16] Yong Y,Ming ZD,Feng L, et al. Electromagnetic fields promote osteogenesis of rat mesenchymal stem cells through the PKA and ERK1/2 pathways[J]. *J Tissue Eng Regen Med*,2014 Mar 16. doi: 10.1002/term.1864. [Epub ahead of print]
- [17] Suzuki A,Guicheux J,Palmer G, et al. Evidence for a role of p38 MAP kinase in expression of alkaline phosphatase during osteoblastic cell differentiation[J]. *Bone*,2002,30(1):91-98.
- [18] Xiao G,Jiang D,Thomas P, et al. MAPK pathways activate and phosphorylate the osteoblast-specific transcription factor, Cbfa1[J]. *J Biol Chem*, 2000,275(6):4453-4459.
- [19] Gellea S,Lallemand F,Atfi A, et al. Activation of mitogen-activated protein kinase cascades is involved in regulation of bone morphogenetic protein-2-induced osteoblast differentiation in pluripotent C2C12 cells[J]. *Bone*,2001,28(5):491-498.
- [20] Lai CF,Cheng SL. Signal transductions induced by bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta in normal human osteoblastic cells[J]. *J Biol Chem*,2002,277(18):15514-15522.
- [21] Kozawa O,Hatakeyama D,Uematsu T. Divergent regulation by p42/p44 MAP kinase and p38 MAP kinase of bone morphogenetic protein-4-stimulated osteocalcin synthesis in osteoblasts[J]. *J Cell Biochem*,2002,84(3):583-589.
- [22] Muraglia A,Cancedda R,Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model[J]. *J Cell Sci*,2000,113(Pt7):1161-1166.

(修回日期:2015-09-15)

(本文编辑:汪玲)

· 外刊摘英 ·

Autologous platelet rich gel for refractory cutaneous ulcers

BACKGROUND AND OBJECTIVE Diabetic ulcers are a serious clinical problem and are often difficult to treat. As the microenvironment of these ulcers suggests a deficiency of growth factors, this study explored the effect of autologous platelet rich gel (APG) for the treatment of chronic, refractory cutaneous ulcers in a group of diabetic patients.

METHODS This prospective, randomized, controlled trial included adult diabetic patients with cutaneous ulcers resistant to standard treatments. The participants were randomized to either a treatment group, receiving standard treatment plus topical APG, or a control group receiving standard treatment plus a placebo APG. In the treatment group, the APG was prepared and then mixed with thrombin and calcium gluconate before placement in the wound bed. The dressing in both groups was changed every three days. Both groups were followed for 12 weeks, with outcomes including wound healing grades, time to complete healing and healing velocity.

RESULTS Subjects were 117 patients with an average age of 62.8 years. Intention to treat analysis revealed that the percentages of patients with complete healing, defined as healing grade 1, were 84.8% in the APG group and 69% in the control group. The mean times to healing were 36 days for the APG group and 45 days for the control group. The APG group had faster healing velocities than did the control group ($P=0.02$). No side effects were seen with APG application.

CONCLUSION This prospective, randomized, controlled study of patients with chronic, refractory, diabetic wound ulcers found that a topical application of autologous platelet rich gel can accelerate healing.

【摘自:Li L, Chen D, Wang C, et al. Autologous platelet rich gel for treatment of diabetic, chronic refractory cutaneous ulcers: a prospective, randomized, clinical trial. *Wound Repair Regen*, 2015, 23(4): 495-505.】