文章编号:1000-5404(2008)05-0421-03

论著

电磁场促进骨髓间充质干细胞体外诱导分化时细胞增殖

朱淑霞[1],李永华[1],宋治远[1],罗向东[2],仝识非[1] (第三军医大学西南医院:[1]心血管内科,重庆市介入心脏病学研究所;[2]全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400083)

摘 要:**目的** 观察脉冲电磁场(pulsed electromagnetic fields, PEMF)对5-氮胞苷(5-aza)诱导大鼠骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)向心肌样细胞分化时细胞增殖的影响。**方法** 50 Hz 脉冲低频电磁场刺激 5-aza 诱导后 7 d 后的 MSCs,根据不同的感应强度分为 A、B、C 组,每组根据作用时间的不同分为 4 个亚组;设未暴露 PEMFs 的细胞为对照组。用 MTT 法测定细胞增殖变化,用流式细胞技术检测细胞周期。**结果** 0.5 mT 和 1 mT 的感应强度下 20 ~ 30 min 细胞比对照组有显著性增殖,5 mT 作用 30 ~ 60 min 以及 1 mT 作用 60 min 与对照组相比较呈显著性抑制。流式检测细胞周期显示 0.5 mT 和 1 mT 在 20 ~ 30 min 内可以引起细胞 $S+G_2$% 增高,各感应强度下作用 60 min 以及 5 mT 感应强度下作用 20 min 以上均引起 $S+G_2$% 的下降。**结论** 50 Hz 脉冲低频电磁场 0.5 mT 和 1 mT 的感应强度下,作用 20 ~ 30 min 可通过引起诱导后的 MSCs 周期中 $S+G_2$% 增高而促进它的增殖。

关键词:脉冲电磁场;骨髓间充质干细胞;增殖
中图法分类号:R329.2;R329.28;R454.1 **文献标识码**:A

Pulsed electromagnetic fields improve proliferation of rat marrow mesenchymal stem cells induced by 5-azacytidine

ZHU Shu-xia[1], LI Yong-hua[1], SONG Zhi-yuan[1], LUO Xiang-dong[2], TONG Shi-fei[1] ([1]Department of Cardiology, [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of pulsed electromagnetic fields on the proliferation of rat marrow mesenchymal stem cells induced by 5-azacytidine. Methods Rat marrow mesenchymal stem cells induced for 7 d with 5-azacytidine were exposed or unexposed to 50 Hz pulsed electromagnetic fields and then randomly divided into A, B, C groups and 1, 2, 3, 4 subgroups according to different inductance intensity and different exposed time. Unexposed under pulsed electromagnetic fields was control groups . Proliferation capacity of rat marrow mesenchymal stem cells induced was examined by MTT method. Cell cycle was detected by flow cytometry. Results Under 0.5 mT and 1 mT inductance intensity for 20 – 30 min rat marrow mesenchymal stem cells induced by 5-azacytidine were proliferated significantly in comparison with control groups, while restrained significantly proliferation cell under 0.5 mT and 1 mT inductance intensity for 30 – 60 min compared with control groups. Cell cycle at $S+G_2$ was increased under 0.5 mT and 1 mT inductance intensity for 20 – 30 min and decreased under 3 kinds inductance intensity for 60 min and 5 mT over 30 min versus control groups. Conclusion 50 Hz pulsed electromagnetic field at 0.5 mT and 1 mT inductance intensity for 20 – 30 min can promote the proliferation of mesenchymal stem cells by increasing cells at S and G_2 stage.

Key words: pulsed electromagnetic field; mesenchymal stem cells; proliferation

近年研究表明,骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)被认为是组织工程中最理想的种子细胞,具有多向分化潜能,其在体外可诱导分化为心肌样细胞已被众多的实验所证实[1-4],但仍存在诱导分化的心肌样细胞比率低、诱导条件不成熟等问题。已有报道电磁场可以引起干细胞细胞增殖及细胞周期的改变,并促进干细胞分化[5],但目前国内外尚少见脉

基金项目:国家自然科学基金(30370585)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30370585)
作者简介:朱淑霞,女,河北石家庄市人,硕士研究生,主治医师,主要从事间充质干细胞向心肌细胞方向诱导分化方面的研究,发表论文 5 篇。电话:(023)68754470
通信作者:宋治远,电话:(023)68765168
收稿日期:2007-11-30 修回日期:2008-01-04

冲电磁场（pulsed electromagnetic fields，PEMF）对MSCs体外诱导分化为心肌样细胞影响的研究报道，本研究旨在探讨PEMF对MSCs体外诱导分化心肌样细胞时细胞增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与设备

DMEM/HamF12 1∶1培养基（HyClone公司）、胎牛血清FBS（HyClone公司）、amphotericin B（Sigma公司）、Percoll分离液（Prarmia公司）、5-氮胞甘（5-aza，Sigma公司）、可调试脉冲电磁场刺激仪（由解放军后勤工程学院陈俊斌教授研制、第三军医大学西南医院骨科许建中教授提供）。

1.2 MSCs的分离、培养及纯化

取2月龄Wistar大鼠（体质量100～120 g，购自第三军医大学实验动物中心），以1%戊巴比妥钠过量麻醉致死，75%乙醇浸泡10 min，无菌条件下取出胫骨、股骨，剪除两端骨骺，PBS冲洗胫骨、股骨骨髓腔，200目滤网过滤骨髓液，1 000 r/min离心5 min，取沉淀加入DMEM/F12重悬，轻轻叠加到密度为1.073 g/ml Percoll分离液上，2 500 r/min离心25 min，收集单核细胞层，DMEM/F12洗涤2次，加入含10%胎牛血清的DMEM/F12重悬细胞沉淀，以（1～6）×10^6的细胞数接种至培养瓶，在37 ℃、饱和湿度、5% CO_2孵箱内培养，细胞融合80%时，0.25%胰酶和0.01% EDTA消化后以1∶2传代，相差显微镜下观察。

1.3 MSCs的体外诱导分化

取第3代MSCs以每孔1×10^6个细胞接种于25 cm^2的培养瓶，第3天加入10 μmol/L的5-aza孵育24 h后用PBS洗涤2次，并更换10% FBS的DMEM/HamF12培养基继续培养7 d，0.25%胰酶和0.01% EDTA消化分别种植于96孔板和6孔板。

1.4 不同频率PEMF刺激MSCs

取5-aza诱导后7 d的MSC以5×10^3 ml^{-1}的细胞数接种13块96孔板，每板种10孔，每孔200 μl，根据不同的场强0.5、1、5 mT分为A、B、C组，每组按每天不同的作用时间10、20、30、60 min又分为1、2、3、4亚组，设无磁场作用组为对照组（0 mT，0 min）。将刺激组置于PEMFs的HelmhIz线圈中，两线圈呈对偶式，间距10 cm，经霍尔效应测磁仪测得场强均匀性及稳定性良好。通过引线将线圈置于培养箱中，按各组不同要求设定场强及频率，进行不同时间的刺激，作用4 d后进行细胞活性及细胞周期检测。

1.5 MTT法检测细胞活性

PEMF刺激4 d后，取出各组96孔板，每孔加10 μl MTT溶液避光孵育4 h；吸弃上清液，每孔加DMSO（二甲基亚枫）150 μl，振荡20 min使结晶充分溶解。在550型酶联免疫检测仪上（490 nm）测各孔的光吸收值[D(490)]。

1.6 流式细胞仪检测细胞周期

PEMF作用2周后，取出各组96孔板，用0.25%胰酶+0.02% EDTA充分消化，吹打成单一细胞悬液，1 000 r/min离心，70%酒精固定后送检流式。经荧光染料染色后，流式细胞仪488 nm波长检测，获得DNA含量分布组分图细胞凋亡比例。以增殖指数（proliferation index，PI）分析PEMFs对MSCs分裂增殖水平的影响。

1.7 统计学分析

应用SPSS 11.0统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 PEMF刺激对MSCs生长状态的影响

原代细胞呈纺锤形以克隆集落方式迅速生长，传代后以分布均匀方式生长。10 μmol/L的5-aza诱导24 h后细胞数量和生长特性未见明显改变，3 d后可见细胞变得细长、有序，胞质颜色变深。诱导后2周可见MSC细胞逐渐变成长梭状，排列具有方向性。0.5 mT作用30 min组比无磁场暴露对照组，细胞密度增大，5 mT作用30 min组与对照组相比增殖减慢。

2.2 PEMF刺激对MSCs增殖的影响

PEMF作用4 d对诱导后MSCs增殖影响的结果显示，在0.5 mT和1 mT的感应强度下20～30 min对细胞增殖与未暴露PEMFs对照组有显著性差异（$P<0.05$），在5 mT作用30 min和60 min以及1 mT作用60 min条件下与未暴露PEMFs的对照组相比较呈显著性抑制（$P<0.05$），见表1。

表1 不同电磁场强度作用不同时间对诱导后MSCs增殖的影响[D(490)，$n=10$，$\bar{x}\pm s$]

电磁场强度	0 min	10 min	20 min	30 min	60 min
0 mT	0.262±0.013	–	–	–	–
0.5 mT	–	0.266±0.019	0.280±0.019[a]	0.322±0.016[b]	0.253±0.023
1 mT	–	0.273±0.019	0.287±0.033[a]	0.293±0.026[a]	0.236±0.018[a]
5 mT	–	0.262±0.019	0.258±0.017	0.240±0.017[a]	0.218±0.011[b]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与0 mT比较

2.3 PEMF对MSCs细胞周期的影响

通过流式细胞技术检测PEMF作用14 d后，5-aza诱导的MSCs细胞周期变化详见表2。不同3个磁场感应强度作用10 min与对照组比较，$S+G_2$%无明显差异；作用60 min时各组的$S+G_2$%均较对照组明显下降；5 mT作用20、30、60 min时$S+G_2$%也均较对照组明显下降；0.5 mT作用30 min、1 mT作用20 min时$S+G_2$%较对照组明显增高（$P<0.05$）。

表2 不同电磁场强度和作用时间对诱导后MSCs的细胞周期的影响（$n=10$，%）]

电磁场强度与作用时间	G_1	$S+G_2$	电磁场强度与作用时间	G_1	$S+G_2$
0 mT 0 min	74.81	25.19	1 mT 30 min	73.27	26.73
0.5 mT 10 min	74.42	24.68	1 mT 60 min	77.34	22.66[a]
0.5 mT 20 min	73.11	26.89	5 mT 10 min	75.72	25.58
0.5 mT 30 min	70.71	29.29[a]	5 mT 20 min	77.71	22.29[a]
0.5 mT 60 min	76.47	23.53[a]	5 mT 30 min	79.43	20.57[b]
1 mT 10 min	74.03	25.97	5 mT 60 min	80.09	19.91[b]
1 mT 20 min	70.38	29.62[a]			

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与0 mT 0 min比较

3 讨论

电磁场因增加肿瘤的危险度而引起公众的广泛关注。普遍认为电磁场的作用存在‘窗效应’现象，即只有在一定相对狭窄的强度（或频率）范围内，电磁场才

具有生物学效应。

细胞增殖是生物最根本的生命活动，是个体生长和生命延续的基本保证，电磁场在有效窗口范围内的刺激可以引起细胞的增殖和抑制，胡涛等[6]研究了低频电磁场对人脐静脉内皮细胞（endothelial cell，EC）增殖的影响，结果显示磁场作用时间 < 20 min 时对 EC 的增殖具有促进作用，但随磁场作用时间的延长，磁场对 EC 增殖的促进作用减弱，变为抑制作用。任凯等[7]在研究 50 Hz 工频电磁场对小鼠骨髓间充质干细胞的增殖影响发现频率 50 Hz、强度 2 mT 的正弦波电磁场能抑制体外培养的小鼠 MSCs 的增殖。在正常情况下，细胞遵循着一定的细胞周期，通过自我复制进行增殖，磁场对细胞周期的影响主要表现在对细胞的 S、G_2 期进程起促进或阻断作用，S 期或 G_2M+S 期的百分比作为增殖指数。赵敏等[5]发现在频率 12 Hz、场强1.1 mT的 PEMFs 刺激 8 h/d，细胞增殖能力提高，细胞周期发生了改变，实验组的 S 期比例较对照组增高近 135.4%。本实验旨在探索 PEMFs 干预 5-aza 诱导 MSCs 过程对细胞增殖、周期的影响。

Lee 等[8]认为最有效的电磁场频率范围应接近机体正常功能活动频率，故我们选用 50 Hz 的 PEMFs 来干预体外诱导分化。实验中我们采用 MTT 法检测细胞增殖情况，用流式细胞仪检测细胞周期，一般把 S 期或者 GM + S 期的百分比作为增殖指数，来表征细胞的增殖情况和合成速度的，S 期细胞百分比升高，表明细胞的 DNA 合成适度增高，细胞增殖加速。在对 PEMFs 干预 5-aza 诱导后的 MSCs 作用研究中，我们发现4 d 后 MTT 实验结果显示，0.5 和 1 mT 的感应强度下 20～30 min 对细胞增殖与未暴露 PEMFs 对照组有显著性差异，在 5 mT 作用 30 min 和 60 min 以及 1 mT 作用 60 min 条件下与未暴露 PEMFs 对照组相比较呈显著性抑制。14 d 时流式检测细胞周期提示在各感应强度下作用 60 min 以及 5 mT 感应强度下作用 20 min 以上均引起 $S+G_2\%$ 的下降，0.5 mT 和 1 mT 在 20～30 min内可以引起细胞 $S+G_2\%$ 增高。本实验结果显示，在 PEMF 的干预下，5-aza 诱导中 MSCs 的增殖趋势和周期中 $S+G_2\%$ 增多基本相符合，进一步证实了 50 Hz的脉冲电磁场干预间充质干细胞向心肌的分化过程中，在有效‘窗’内引起的细胞增殖是通过改变细胞周期中 $S+G_2\%$ 而实现的。

PEMFs 引起细胞生物学效应已被大量的实验所证实，但其作用机制尚不明确。到目前为止研究认为 EMFs 对细胞膜受体、结构及其成分和细胞间的缝隙连接有影响，还可以改变热休克蛋白、钙电流、cAMP、鸟氨酸脱氢酶而影响其生物学效应。另外有学者认为电磁场可以通过直接和间接作用引起基因表达的变化。Blank 等[9]认为电磁场激活转录是通过对 DNA 上电子的影响，造成维系两个 DNA 之间的 H-铰链的不稳定。这个机制和以前已经证实的电磁反应元件的低电子亲和性相符合。

参考文献：

[1] 朱淑霞，宋治远，罗向东，等. 体外诱导大鼠骨髓间充质干细胞分化为心肌样细胞的研究[J]. 第三军医大学学报，2005，27(15)：1555－1557.

[2] 农耀明，宋治远，陈鹏慧，等. 大鼠骨髓间充质干细胞诱导分化为心肌样细胞内向钠电流的研究[J]. 第三军医大学学报，2006，28(5)：435－437.

[3] 尹戴佳佳，农耀明，宋治远. 大鼠骨髓间充质干细胞体外诱导分化的心肌样细胞内 Ca^{2+} 和 CaMK Ⅱ 的变化[J]. 第三军医大学学报，2006，28(9)：926－928.

[4] 汪　萍，呼　莹，姜学英，等. 造血干细胞联合骨髓间充质干细胞移植实验效果观察[J]. 郑州大学学报 医学版，2006，41(5)：873－875.

[5] 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，2004，12(6)：439－443.

[6] 胡　涛，吕安林，贾国良，等. 低频电磁场对人脐静脉内皮细胞增殖的影响[J]. 中华理疗杂志，2001，24(6)：328－330.

[7] 任　凯，吴　华，赵文春，等. 工频电磁场对体外培养的小鼠骨髓间充质干细胞增殖与分化的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志，2004，26(7)：385－387.

[8] Lee J H，McLeod K J. Morphologic responses of osteoblast-like cells in monolayer culture to ELF electromagnetic fields[J]. Bioelectromagnetics，2000，21(2)：129－136.

[9] Blank M，Goodman R. Initial interactions in electromagnetic field-induced biosynthesis[J]. J Cell Physiol，2004，199(3)：359－363.

（编辑　邓强庭）

血压计量单位恢复 mmHg 表示法

根据国家质量技术监督局和卫生部联合发出的质技监局量函[1998]《关于血压计量单位使用规定的补充通知》的精神，血压计量单位恢复使用毫米汞柱（mmHg），但首次使用时应注明 mmHg 与千帕[斯卡]（kPa）的换算系数（1 mmHg = 0.133 kPa）。

本刊编辑部