论著

文章编号:1000-5404(2009)09-0772-04

脉冲电磁场诱导小鼠胚胎干细胞向成骨细胞分化

曹炜鹏[1],周 强[1],徐海伟[2],吴雪晖[1],刘 涌[1],宋 磊[1],唐 军[2],杨 丽[2] (第三军医大学:[1]西南医院骨科,全军矫形外科中心,[2]基础医学部生理学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038)

摘 要:目的 观察脉冲电磁场对小鼠胚胎干细胞向成骨细胞分化的影响。**方法** 将小鼠4 d龄胚胎干细胞(embryonic stem cells,ESCs)衍生的胚胎体单细胞按$5\times10^4 ml^{-1}$接种到细胞培养板,在DMEM基础培养液中使胚胎体单细胞贴壁培养。于第14~21天时,分别给予脉冲电磁场、化学诱导剂以及联合刺激。采用茜素红染色、骨钙素免疫组织化学染色、成骨分化关键因子Osterix和Cbfa-1/Runx-2的相对定量RT-PCR检测等方法观测成骨分化情况。**结果** 茜素红染色和RT-PCR结果均显示:脉冲电磁场组、化学诱导组以及联合培养组的成骨诱导效果均比空白对照组显著增加,其中又以联合培养组成骨诱导效果最明显。骨钙素免疫组化染色也显示:联合培养组中骨钙素分泌最多。**结论** 脉冲电磁场可以促进小鼠胚胎干细胞向成骨细胞分化,而且脉冲电磁场和常规化学诱导剂联合应用会产生协同效应,其成骨诱导效果优于两者单独应用。

关键词: 脉冲电磁场;胚胎干细胞;成骨细胞;定向诱导;骨组织工程

中图法分类号: R322.71; R329.21; R339.57 **文献标识码**: A

Pulsed electromagnetic fields induce osteoblast differentiation from mouse embryonic stem cells *in vitro*

CAO Wei-peng[1], ZHOU Qiang[1], XU Hai-wei[2], WU Xue-hui[1], LIU Yong[1], SONG Lei[1], TANG Jun[2], YANG Li[2] ([1]Department of Orthopedics, Southwest Hospital, [2]Department of Physiology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of pulsed electromagnetic fields (PEMFs) on the osteoblast differentiation of mouse embryonic stem cells. Methods The cells isolated from 4-day embryoid bodies (EBs) derived from mouse embryonic stem cells (mESCs) were inoculated into each well of cell culture plate at 5×10^4/ml in DMEM and then cultured. During the period from 14 to 21 d after the EBs-derived single cells attachment, the cells was divided into 4 groups: control (group A), PEMFs (group B, 50 Hz, 1.1 mT, twice per day, 30 min per time, in an interval of 12 h), chemical inductor (group C, 50 μg/ml Vitamin C, 10 mmol/L β-glycerophosphate and 1 μmol/L dexamethasone in the culture medium), B + C (group D). Histochemical staining for Alizarin Red, immunocytochemical staining for osteoclacin expression and PCR for Osterix and Cbfa-1/Runx-2 were applied to measure the osteoblast differentiation. Results Alizarin Red staining revealed that compared with group A, the surface area of bone nodule colonies of group B, C and D were increased respectively by 123%, 229% and 262% ($P<0.01$). The surface area of bone nodule colonies of group D was raised by 62% compared with that of group B ($P<0.01$) and by 10% with that of group C ($P<0.05$). Immunocytochemical staining for osteoclacin revealed that the expression of osteoclacin were the most in group D. PCR revealed that the expression of Osterix and Cbfa-1/Runx-2 of group B, C and D were more than that of group A. Conclusion PEMF accelerates the differentiation of mESCs to osteoblasts. Combining PEMFs and chemical inducers together have synergistic effect.

Key words: pulsed electromagnetic fields; embryonic stem cells; osteoblast; directed differentiation; bone tissue engineering

基金项目:国家高技术研究发展计划(863计划)(2006AA02Z4E3)

Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program, 2006AA02Z4E3)

作者简介:曹炜鹏,男,山西省晋城市人,硕士研究生,主要从事骨组织工程方面的研究。E-mail:caoweipeng06@yahoo.com.cn

通信作者:周 强,电话:(023)68765283, E-mail: zqtlh@mail.tmmu.com.cn

收稿日期:2008-11-27;**修回日期**:2009-02-12

骨组织工程的关键是成骨细胞成骨以修补骨缺损,其前提是找到良好的种子细胞。胚胎干细胞(embryonic stem cells,ESCs)来源于哺乳动物的囊胚内细胞团和原始生殖细胞,具有自我复制、自我更新和发育全能性,有希望成为组织工程的"万能"种子细胞[1-3]。脉冲电磁场(pulsed electromagnetic fields,PEMFs)作为一种非侵入性方法治疗骨延期愈合及骨不连在矫形外科领域日益倍受重视,很多学者从组织形态、细胞分子及临床观察等不同角度、不同层次阐述了脉冲电磁场对骨折愈合的影响[4,5]。近年有实验研究表明,特定场强和频率的 PEMFs 能明显促进骨髓 MSCs 的成骨分化[6]。本实验利用 PEMFs 刺激诱导 ESCs 分化为成骨细胞,旨在为骨组织工程提供新的研究思路。

1　材料与方法

1.1　实验材料

1.1.1　细胞　　C57BL/6X129 小鼠胚胎干细胞,购自广州赛业生物科技有限公司。

1.1.2　试剂与仪器　　高糖 DMEM(HyClone),胎牛血清(Gibco),维生素 C(Sigma),β-甘油磷酸(Sigma),地塞米松(Sigma),C57BL/6X129 mESCs 完全培养基(广州赛业)。脉冲电磁场发生器(中国医学科学院生物工程研究所研制),CO_2 培养箱(Heraeus 公司),超净工作台(Healforce 公司),倒置显微镜(OLYMPUS 公司),细胞培养板(Costar 公司)。

1.2　实验方法

1.2.1　mESCs 的培养　　本实验所用 mES 细胞购自广州赛业生物科技有限公司。37 ℃快速复苏 mES 细胞后,接种于 γ 射线照射处理过的小鼠胚胎成纤维细胞上。以 DMEM 为基础培养基,其中加入 10% 的胎牛血清、谷氨酰胺、非必需氨基酸、β-巯基乙醇、白血病抑制因子、青霉素、链霉素。隔日换液、每 2 天传代。

1.2.2　胚胎体(embryoid bodies,EBs)的形成　　mESCs 用 0.25% 胰蛋白酶/EDTA 消化,吹打成单细胞悬液,按(2 ~ 2.5)$\times 10^4$ 个/培养皿的细胞密度置于细菌培养皿(直径 10 cm),培养液为含 15% FCS、100 μmol/L β-巯基乙醇的 DMEM 培养基,于 37 ℃、5% CO_2 培养箱培养 4 d。

1.2.3　mESCs 的分化诱导　　EBs 培养第 5 天,收集 EBs 于离心管中,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 EBs 培养液,轻微吹散后将细胞按 $5 \times 10^4 ml^{-1}$ 的密度接种于经明胶(0.1%)预处理过的细胞培养板中,培养液仍为含 15% FCS、100 μmol/L β-巯基乙醇的 DMEM 培养基。共培养 21 d。

1.2.4　实验分组设计　　实验分为 A、B、C、D 4 组。A 组为完全培养基组(不施加 PEMFs 和诱导培养基刺激);B 组为 PEMFs 刺激组(50 Hz、1.1 mT、在 mESCs 分化诱导第 14 ~ 21 天施加、2 次/d、30 min/次、间隔 12 h);C 组为诱导培养基组(在 mESCs 分化诱导第 14 ~ 21 天加入完全培养基,成分为 50 μg/ml 维生素 C + 10 mmol/L β-磷酸甘油 + 1 μmol/L 地塞米松);D 组为诱导培养基联合 PEMFs 刺激组(联合培养组,在 mESCs 分化诱导第 14 ~ 21 天施加)。

1.3　观察指标

1.3.1　组织化学检测　　茜素红染色。细胞诱导第 21 天,吸去培养液,用 PBS 洗 3 次,加入 4% 多聚甲醛固定 20 min,再用 PBS 洗 3 次,加入配制好的 1% 茜素红染液染色 20 min,吸去染液,蒸馏水洗数次后,倒置显微镜下观察,并用图像分析软件计算出每个培养皿中钙结节的总面积。

1.3.2　免疫细胞化学检测　　用免疫荧光二步法行骨钙素(osteocalcin,OC)染色。将细胞放入 4% 多聚甲醛溶液中固定 20 min,PBS 洗 3 次,再放入 0.3% Triton X-100 溶液中孵育 30 min,PBS 洗 3 次后,加封闭血清孵育 30 min,添加羊抗小鼠骨钙素多克隆抗体(Biogenesis 公司,1∶100),37 ℃孵育 2 h,转入 4 ℃过夜。PBS 漂洗 3 次后,添加 FITC-兔抗羊 IgG(Sigma 公司,1∶300),37 ℃孵育 1 h。荧光显微镜下观察、照相。

1.3.3　RT-PCR 检测　　按照试剂盒的说明抽取 RNA,测定 RNA 的浓度,用逆转录试剂盒制备 cDNA,采用染料掺入法进行定量 PCR 检测。所用的引物序列:GAPDH 上游引物:5′-ACCCATCACCATCTTCCAGGAG-3′,下游引物:5′-GAAGGGGCGGAGATGATGAC-3′,扩增长度 159 bp;Osterix 上游引物:5′-TGCCCCCTGGTGTTCTTCATTA-3′,下游引物:5′-GGCGCATAGGGGTTAAGTACTCAA-3′,扩增长度 175 bp;Cbfa-1/Runx-2 上游引物:5′-GCCCAGGCGTATTTCAGATGAT-3′,下游引物:5′-CTGGCGGGGTGTAGGTAAAGG-3′,扩增长度 205 bp。PCR 反应条件:94 ℃预变性 5 min,94 ℃变性 30 s,61 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,45 个循环。采用 2-ddCT 法[7]进行数据分析。

1.4　统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 13.0 统计软件行方差分析。

2　结果

2.1　钙结节形成结果

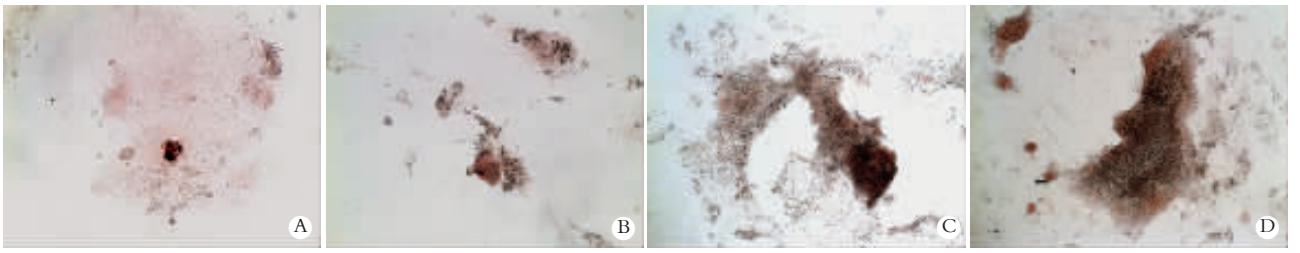
在诱导第 21 天分别对完全培养基组、PEMFs 刺激组、诱导培养基组和诱导培养基联合 PEMFs 刺激组的细胞行茜素红染色,可见钙结节成橘红色,大小、形态各不相同,中间有黑色颗粒,由中间向周围颜色逐渐变浅。用图像分析软件测量钙结节的面积,结果显示,PEMFs 刺激组、诱导培养基组、联合培养组中钙结节面积分别比完全培养基组升高了 123%、229%、262%,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。其中,联合培养组与 PEMFs 刺激组相比,钙结节面积升高了 62%($P < 0.01$)。联合培养组与诱导培养基组相比,钙结节面积升高了 10%($P < 0.05$,图 1、2)。

2.2　骨钙素染色结果

培养第 21 天行骨钙素免疫组织化学染色结果显示,PEMFs 刺激组、诱导培养基组、联合培养组中可见阳性绿色荧光颗粒,而完全培养基组为阴性。其中又以联合培养组中骨钙素分泌最多(图 3)。

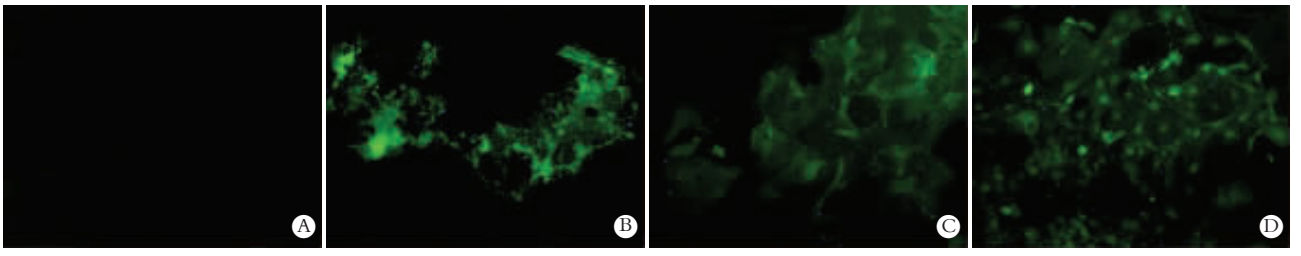
2.3　RT-PCR 检测结果

RT-PCR 观察转录因子 Osterix 和 Cbfa-1/Runx-2 的表达情况(图 4):PEMFs 刺激组、诱导培养基组、联合培养组中 Osterix 的表达水平分别是完全培养基组的 1.3($P < 0.05$)、2.2($P < 0.01$)、4.1($P < 0.01$)倍。其中联合培养组中 Osterix 的表达最高,与 PEMFs 刺激组和诱导培养基组相比差异具有统计学意义($P < 0.01$)。



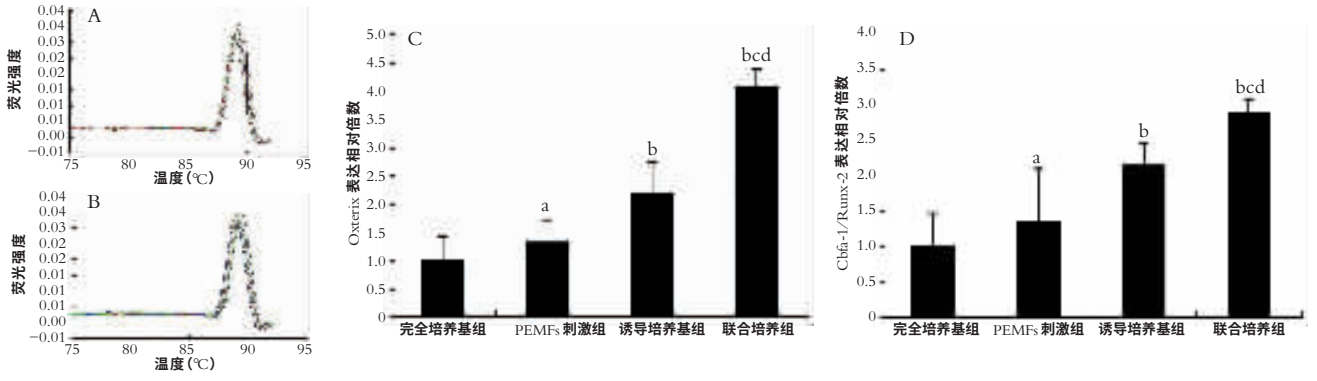
A:完全培养基组;B:PEMFs 刺激组;C:诱导培养基组;D:诱导培养基联合 PEMFs 刺激组

图1　各实验组茜素红染色结果　(×100)



A:完全培养基组;B:PEMFs 刺激组;C:诱导培养基组;D:诱导培养基联合 PEMFs 刺激组

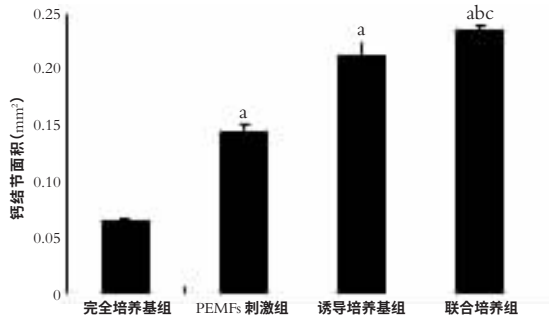
图3　培养第 21 天骨钙素免疫组化染色结果　(免疫荧光二步法×100)



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与完全培养基组比较;c:$P<0.01$,与 PEMFs 刺激组比较;d:$P<0.01$,与诱导培养基组比较

A:Osterix 熔解曲线图;B:Cbfa-1/Runx-2 熔解曲线图;C: Osterix 表达结果;D:Cbfa-1/Runx-2 表达结果

图4　各实验组中转录因子 Osterix 和 Cbfa-1/Runx-2 的表达情况



a:$P<0.01$,b:$P<0.01$,与 PEMFs 刺激组比较;c:$P<0.05$,与诱导培养基组比较

图2　各实验组钙结节面积比较结果

PEMFs 刺激组、诱导培养基组、联合培养组中 Cbfa-1/Runx-2 的表达水平分别是对照组的 1.4($P<0.05$)、2.1($P<0.01$)、2.9($P<0.01$)倍。其中联合培养组中 Cbfa-1/Runx-2 的表达最高,与 PEMFs 刺激组和诱导培养基组相比差异具有统计学意义($P<0.01$)。

3　讨论

ESCs 作为最有希望成为骨组织工程的种子细胞,其向成骨细胞定向诱导分化的数量和功能状态是影响组织工程骨成骨效果的主要因素之一。目前诱导 ESCs 分化为成骨细胞的方法主要是添加化学诱导剂,然而这种诱导方法的成骨细胞分化率较低,难以满足组织工程对种子细胞巨大数量的要求。

PEMFs 作为一种安全、简便、有效的治疗手段已广泛用于临床治疗骨折后骨不连或延迟愈合及假关节等,而且低频、低场强的 PEMFs 不会导致基因突变及染色体畸变。因此将 PEMFs 应用于骨组织工程有重

要意义。我们前期的研究表明,特定场强和频率的 PEMFs 能促进骨髓 MSCs 向成骨细胞分化[6,8]。考虑 ESCs 和 MSCs 在很多方面都有相似性,特别是对相同的成骨诱导剂具有基本相同的反应,所以我们推测脉冲电磁场对 ESCs 向成骨细胞的分化也起作用。

本实验中,我们在 mESCs 分化的第 14 ~ 21 天施加 PEMFs 刺激,频率为 50 Hz,场强为 1.1 mT,2 次/d,30 min/次,间隔 12 h,可以明显促进 mESCs 向成骨细胞分化。显微镜下观察到分化初期 EB 细胞团逐渐向外扩散生长,变为多角形或鳞形,随时间的推移汇合成铺路石状,在分化第 14 天开始施加 PEMFs 刺激后,分化速度加快,出现重叠生长、基质堆积,进而出现矿盐沉积并融合成圆形或卵圆形的钙化结节。钙结节经茜素红染色后呈橘红色,形态大小不一,中间有黑色颗粒,由中间向周围颜色逐渐变浅。与完全培养基组相比,PEMFs 刺激组中钙结节的面积升高了 123% ($P < 0.01$),说明单纯施加 PEMFs 刺激可以促进 mESCs 向成骨细胞的分化。

骨钙素是目前公认的由成骨细胞产生的骨特异性蛋白,又称为骨玻璃蛋白,与成骨细胞的数目、矿物质的沉积呈正相关,可以反映骨形成的活性,在成骨细胞分化的晚期特异性表达[9]。本实验中,PEMFs 刺激组中骨钙素免疫组织化学染色呈阳性,而完全培养基组为阴性,证明了 mESCs 经 PEMFs 刺激后具有成骨活性,即有相当一部分 mESCs 已经诱导为成骨细胞。

Cbfa-1/Runx-2 和 Osterix 是成骨分化过程中的两个关键转录因子。前者通过结合于骨钙素启动子而发挥作用,在成骨细胞功能和分化过程中起着中枢性的调节功能,可以启动一系列成骨细胞功能相关分子表达[10,11];后者是一种含锌指结构的转录因子,位于 Cbfa-1/Runx-2 的下游,与 Cbfa-1/Runx-2 一起共同决定成骨细胞分化[12]。它们都是 BMP-2 介导的成骨分化的信号转导通路中的两个关键因子[13]。本实验中,PEMFs 刺激组 Cbfa-1/Runx-2 和 Osterix 的表达都有所增高,分别是完全培养基组的 1.4 和 1.3 倍,所以我们推测 PEMFs 促进 ESCs 向成骨细胞分化的机制可能与 BMP-2 信号转导通路有关,这些有待于在今后的实验中深入探讨。

此外,我们还观察了 PEMFs 和化学诱导培养基联合刺激对 mESCs 向成骨细胞分化的影响。茜素红染色显示,联合培养组钙结节的面积比 PEMFs 刺激组增加了 62% ($P < 0.01$),比诱导培养基组增加了 10% ($P < 0.05$)。骨钙素免疫组织化学染色结果也表明联合培养组中的骨钙素分泌最旺盛。说明脉冲电磁场和常规化学诱导剂联合应用时会产生协同效应。本实验为体外诱导 ESCs 向成骨细胞分化提供了一条新的策略。

参考文献:

[1] Bielby R C, Boccaccini A R, Polak J M, *et al*. In vitro differentiation and in vivo mineralization of osteogenic cells derived from human embryonic stem cells[J]. Tissue Eng, 2004, 10(9 - 10): 1518 - 1525.

[2] Hwang Y S, Randle W L, Bielby R C, *et al*. Enhanced derivation of osteogenic cells from murine embryonic stem cells after treatment with HepG2-conditioned medium and modulation of the embryoid body formation period: application to skeletal tissue engineering[J]. Tissue Eng, 2006, 12(6): 1381 - 1392.

[3] Bielby R C, Pryce R S, Hench L L, *et al*. Enhanced derivation of osteogenic cells from murine embryonic stem cells after treatment with ionic dissolution products of 58S bioactive sol-gel glass[J]. Tissue Eng, 2005, 11(3 - 4): 479 - 488.

[4] Midura R J, Ibiwoye M O, Powell K A, *et al*. Pulsed electromagnetic field treatments enhance the healing of fibular osteotomies[J]. J Orthop Res, 2005, 23(5): 1035 - 1046.

[5] Li J K, Lin J C, Liu H C, *et al*. Cytokine release from osteoblasts in response to different intensities of pulsed electromagnetic field stimulation[J]. Electromagn Biol Med, 2007, 26(3): 153 - 165.

[6] 宋晋刚, 许建中, 周　强, 等. 不同频率脉冲电磁场诱导人骨髓间充质干细胞成骨分化的研究[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2005, 27(3): 134 - 137.

[7] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402 - 408.

[8] 李永华,朱淑霞,宋治远,等. 脉冲电磁场对大鼠骨髓间充质干细胞体外诱导分化影响的研究[J]. 重庆医学,2008,37(4):376 - 377, 381.

[9] Makita N, Suzuki M, Asami S, *et al*. Two of four alternatively spliced isoforms of RUNX2 control osteocalcin gene expression in human osteoblast cells[J]. Gene, 2008, 413(1 - 2): 8 - 17.

[10] Komori T, Yagi H, Nomura S, *et al*. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts[J]. Cell, 1997, 89(5): 755 - 764.

[11] Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, *et al*. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation[J]. Cell, 1997, 89(5): 747 - 754.

[12] Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, *et al*. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation[J]. Cell, 2002, 108(1): 17 - 29.

[13] Ryoo H M, Lee M H, Kim Y J. Critical molecular switches involved in BMP-2-induced osteogenic differentiation of mesenchymal cells[J]. Gene, 2006, 366(1): 51 - 57.

(编辑　吴培红)