文章编号:1000-5404(2010)09-0947-04

论著

# 脉冲电磁场对脱钙骨基质诱导人骨髓干细胞成骨分化的影响

王志平,柳 峰,赵建华 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所骨科)

**[摘要]** **目的** 观察脉冲电磁场(pulsed electromagnetic fields, PEMF)对脱钙骨基质(demineralized bone matrix, DBM)诱导人骨髓间充质干细胞(human mesenchymal stem cells, hMSCs)成骨分化的影响,探讨可能的发生机制。**方法** 提取1例健康14周岁男性骨髓间充质干细胞,培养至第3代,以$1\times10^4$/孔接种至8块24孔板,以$1\times10^5$/孔接种至2块6孔板,各分成4组:细胞对照组(C组)、细胞+材料组(CD组)、细胞+脉冲电磁场组(CP组)和细胞+材料+脉冲电磁场组(CDP组)。CD组和CDP组加入一块5 mm×5 mm×3 mm大小的DBM,CP组和CDP组给予PEMF(频率15 Hz,场强5 Gs)照射;各组分别于种植后第1、7、14、21天进行碱性磷酸酶(ALP)活性、骨钙素(OC)浓度等指标检测,在第21天进行钙结节茜素红染色,光镜观察。**结果** CD组、CP组和CDP组ALP活性及OC浓度在种植7 d后均明显升高($P<0.01$);在14 d时CD组和CDP组ALP活性达到最高值,第7、14天时CDP组ALP活性较CD组、CP组均显著升高($P<0.01$),仅在第14天时CD组ALP活性较CP组显著升高($P<0.01$);CDP组OC值在7、14、21 d时均较CD组、CP组显著升高($P<0.01$),仅在第21天时CD组OC浓度较CP组显著升高($P<0.01$);21 d时形态学观察显示钙结节数量CDP组明显多于CD组和CP组($P<0.01$),CD组明显多于CP组($P<0.01$)。**结论** PEMF与DBM联合对hMSCs的成骨诱导要强于PEMF或DBM的单独作用,且随着磁场应用时间的延长更加明显。另外PEMF对DBM诱导hMSCs成骨分化具有明显的协同效应,可能是通过PEMF增强hMSCs对BMPs等成骨活性因子的反应性来实现的。

**[关键词]** 脉冲电磁场;脱钙骨基质;人骨髓干细胞;成骨分化
**[中图法分类号]** R322.71; R329.21; R339.57 **[文献标志码]** A

# Effects of pulsed electromagnetic fields on osteogenic differentiation in demineralized bone matrix-induced human marrow stromal cells *in vitro*

Wang Zhiping, Liu Feng, Zhao Jianhua (Department of Orthopaedics, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effects of pulsed electromagnetic fields (PEMF) on osteogenic differentiation in demineralized bone matrix (DBM)-induced human marrow stromal cells (hMSCs). **Methods** hMSCs were obtained from iliac crest marrow aspirates of a healthy boy aged 14. Then $1\times10^4$ hMSCs per well were plated in 8 24-well tissue culture plates, and $1\times10^5$ hMSCs per well in 2 6-well plates after they were expanded until passage 2. Those 24-well plates and 6-well plates were divided into 4 groups, cell control group (C group), cell-material group (CD group), cell-PEMF group (CP group) and cell-material-PEMF group (CDP group). CD group and CDP group were added with one DBM (size of 5 mm×5 mm×3 mm), CP and CDP groups were exposed to the PEMF (frequency of 15 Hz, intensity of 5 Gs), and hMSCs were cultivated in subculture medium with full media exchange in every 3 d. Alkaline phosphatase (ALP) activity and osteocalcin (OC) level were performed at 1, 7, 14 and 21 d, and alizarin red staining and counting of calcium nodules were performed at 21 d. **Results** Significant differences in ALP activity and OC level were observed between cell control group and the other 3 groups in 7 d after treatment ($P<0.01$). ALP activity of CD group was increased significantly than that of CP group only at 14 d ($P<0.01$), so did the OC level and calcium nodules only at 21 d ($P<0.01$). Compared with CD group and CP group, ALP activity in CDP group was increased significantly at 7 and 14 d ($P<0.01$), OC level in CDP group was increased significantly at 14 and 21 d ($P<0.01$), and the number of calcium nodules in CDP group was increased significantly at 21 d ($P<0.01$). **Conclusion** PEMF alone or together with DBM increases the expression of all osteoblast markers and the amount of mineralized matrix during the differentiation phase, but a combined treatment of DBM and

**[通信作者]** 赵建华,电话:(023)68757931, E-mail: zhaojianhua1964@yahoo.com

PEMF is more effective than themselves alone. Also this effect was synergic on osteoblastic differentiation, suggesting that PEMF enhances the responsiveness of hMSCs to oteogenic factors such as BMPs.

[**Key words**] pulsed electromagnetic fields; demineralized bone matrix; human marrow stromal cells; osteoblastic differentiation

Corresponding author: Zhao Jianhua, Tel: 86-23-68757931, E-mail: zhaojianhua1964@yahoo.com

近年由于交通事故、骨肿瘤等原因导致的骨缺损和骨不连呈明显增多趋势,大量患者需要骨组织重建,而治疗此类疾病的主要选择仍然是组织工程骨移植,目前倾向于干细胞体外与组织工程材料的复合培养,但效果始终不佳。脉冲电磁场(pulsed electromagnetic fields, PEMF)已被广泛运用于临床上多种骨骼相关疾病的治疗,包括骨折延迟愈合、骨不连、新鲜骨折、先天性假关节等[1],而目前 PEMF 对细胞材料联合培养的影响尚不清楚,人骨髓间充质干细胞(human mesenchymal stem cells, hMSCs)在 PEMF 作用下的成骨分化机制也不清楚。本研究观察 PEMF 对脱钙骨基质(demineralized bone matrix, DBM)诱导 hMSCs 在体外培养时成骨分化的影响,探讨 PEMF 影响组织工程材料中 hMSCs 成骨分化的可能机制,为临床应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 骨髓干细胞的分离与扩增

骨髓的抽取通过常规的外科操作来完成,在 1 例 14 周岁男性(为本科临床诊断为青少年特发性脊柱侧弯的患者,已获得患者知情同意)髂后上棘抽取 10 ml 骨髓,采用密度梯度法分离,最后有核细胞按 $1\times10^5/cm^2$ 的密度接种在培养瓶中,在增湿、37 ℃、5% $CO_2$ 的孵箱中,用传代培养基(包含 DMEM-LG 培养基 +10% FCS +100 U/ml 青霉素 +100 μg/ml 链霉素)培养至融合,骨髓干细胞因在组织培养瓶中的粘附和分化特性而被选择下来。随后骨髓干细胞用 0.05% 胰酶(含 0.53 mmol/L EDTA)消化,调整细胞浓度为 $1\times10^5/cm^2$,按第 1 代细胞的标准接种培养至融合,培养基每周更换 2 次。骨髓干细胞在被胰酶消化成为第 3 代细胞后,即可加入 DBM 支架材料复合培养。

### 1.2 支架的制备与选择

人松质骨来自 1 例 46 周岁男性(为本科临床诊断为股骨颈骨折行全髋关节置换术的患者,已获得患者知情同意)的股骨头。样本首先被去掉结缔组织,然后切成 5 mm × 5 mm × 3 mm 的方形储存在 -20 ℃,以保持其骨诱导活性。支架用改良 Urist 法[2] 来制作,并在第三军医大学辐照中心用 30 kGy 的 $^{60}Co$ 照射消毒,储存在 4 ℃冰箱中,使用前 PBS 和培养基各漂洗 2 h。

### 1.3 脉冲电磁场系统

整个系统由信号发生器(江苏扬中科泰电子仪器有限公司,CA1640P-02 型)和亥姆霍兹线圈两部分组成。信号发生器输出波形为脉冲方波,频率 15 Hz,脉冲时间 8 ms;2 个亥姆霍兹线圈半径为 10 cm,直径 0.67 mm 漆包铜线缠绕,成对偶式,轴线中点附近场强经高斯计检测为 5 Gs,通过引线置于浮箱中。

### 1.4 细胞材料的培养

取 8 块 24 孔板,分成 4 组:细胞对照组(C 组)、细胞 + 材料组(CD 组)、细胞 + 脉冲电磁场组(CP 组)、细胞 + 材料 + 脉冲电磁场组(CDP 组)。各组分别加入 $1\times10^4$ 细胞单纯培养,CD 组和 CDP 组每孔放入一块备好的 DBM 材料;各组给予传代培养基培养(包含 DMEM-LG 培养基 +10% FCS +100 U/ml 青霉素 +100 μg/ml 链霉素),每周换液 2 次;根据沈伟伟等[1] 及 Lohmann 等[3] 分别用 PEMF 刺激 2 h 和 8 h 均能促进成骨细胞的增殖与分化,且 2 h 刺激还能增加重要的骨生成因子 TGF-β1 的量,给予 CP 组和 CDP 组 PEMF 每天 4 h 连续照射。在第 1、7、14、21 天时各组分别取出 8 孔进行碱性磷酸酶(ALP)活性、骨钙素(OC)浓度的检测。另外,取 2 个 6 孔板分为 4 组,每组 3 孔,每孔加入细胞 $1\times10^5$,其余处理同前,在 21 d 时进行钙结节茜素红染色计数。

### 1.5 指标观察及测定

1.5.1 细胞 ALP、OC 含量测定 在第 1、7、14、21 天时各组分别取出 8 孔,样本剪碎后,超声破碎细胞,2 000 r/min 离心 5 min 收集上清,采用 ELISA 方法检测 ALP 活性,放免法检测 OC 浓度。试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司,并按照说明书进行操作。

1.5.2 组织学观察 在第 21 天时各组分别取出 3 孔,进行钙结节茜素红染色,光镜下观察、统计钙结节数量。

### 1.6 统计学处理

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件分析,同一时间点的组间比较采用随机单位组方差分析,同组不同时间点采用重复测量数据方差分析。

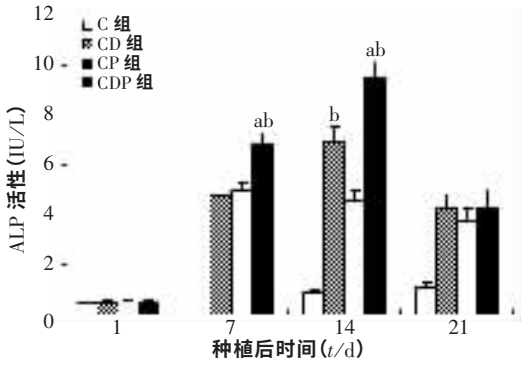
## 2 结果

### 2.1 碱性磷酸酶活性

种植后 1 d 各组间 ALP 活性无明显差异($P>0.05$)。在种植 7 d 后 CD 组、CP 组、CDP 组 ALP 活性均明显升高($P<0.01$),随即 CP 组开始持续下降,而 14 d 时 CD 组和 CDP 组 ALP 活性达到最高值,各组在 21 d 时差异无统计学意义($P>0.05$)。另外,第 7、14 天时 CDP 组 ALP 活性较 CD 组、CP 组均显著升高($P<0.01$),第 14 天时 CD 组 ALP 活性较 CP 组显著升高($P<0.01$)。见图 1。

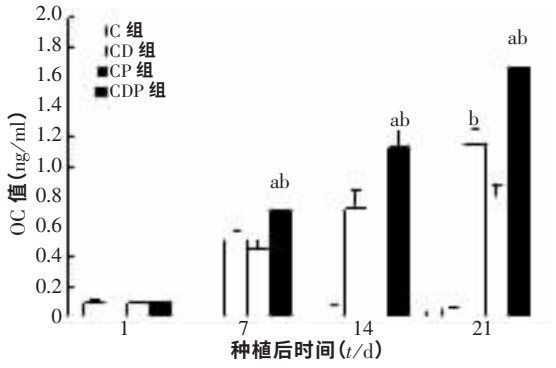
### 2.2 骨钙素浓度

种植 7 d 后各组 OC 值均较 C 组明显升高($P<0.01$),CD 组和 CP 组 OC 值在前 14 d 培养过程中差异均无统计学意义($P>0.05$),第 21 天时 CD 组较 CP 组显著升高($P<0.01$)。另一方面,CDP 组 OC 值在 7、14、21 d 时均较 CD 组、CP 组显著升高($P<0.01$),随刺激时间延长,骨钙素活性增高更加明显。见图 2。




a:$P<0.01$,与 CD 组比较;b:$P<0.01$,与 CP 组比较

**图 1　各组种植后不同时间点 ALP 活性的比较**




a:$P<0.01$,与 CD 组比较;b:$P<0.01$,与 CP 组比较

**图 2　各组种植后不同时间点 OC 浓度的比较**

### 2.3　形态学观察

在 21 d 时钙结节茜素红染色结果见图 3。视野内形成的钙结节数目为 C 组 0 个,CD 组(13.50 ± 1.93)个,CP 组(9.88 ± 1.55)个,CDP 组(19.13 ± 3.27)个,钙结节数量 CDP 组明显多于另外 3 组($P<0.01$),CD 组多于 CP 组($P<0.01$)。

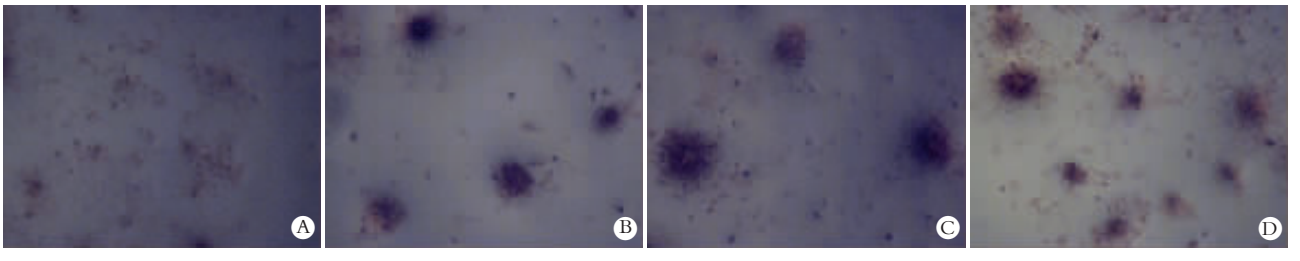
## 3　讨论

由于环境的严重污染和交通事故的发生,骨科临床中骨缺损和骨不连呈明显增多趋势。目前治疗此类疾病的主要方法是组织工程骨移植,而临床常用的修复材料则是同种异体脱钙骨,其不仅作为骨组织工程种子细胞的三维载体,而且其基质中结合的骨形态发生蛋白等因子在募集和促进骨髓前体细胞向成骨细胞转化的过程中发挥了极为重要的作用[4]。

PEMF 是近年发展起来的治疗骨折和骨不连等骨科病症重要的物理手段之一,实验表明,低能量、低频率的电磁场(磁场的感应电流密度一般在 10 ~ 100 mA/$m^2$,频率小于 1 kHz)对前成骨细胞具有明显的诱导作用[3]。近来,组织工程应用偏向于通过某种改变来增强骨源生物材料的骨诱导性,广泛采用的方法是在种植前将骨原细胞与支架结合,以降低自体前成骨细胞在缺损部位迁移和扩展的需要,因此在此基础上本实验引入 PEMF,希望更能提高骨形成和骨整合的效率[5]。

碱性磷酸酶(ALP)是成骨细胞的早期标志酶,在成骨过程中水解磷酸酯,为羟基磷灰石的沉积提供必要的磷酸,有利于成骨,表明成骨分化的开始[6]。在实验的第 7、14 天,均观察到 CDP 组 ALP 活性较 CD 组和 CP 组明显升高,各组均较 C 组明显升高,说明除 C 组外各组均能诱导 hMSCs 成骨分化,其中 PEMF 和 DBM 对 hMSCs 的联合刺激较 PEMF 和 DBM 单独作用要强,PEMF 更能加强 DBM 对 hMSCs 的这种促分化作用,钙结节染色形态学观察也证明了这一点,即 PEMF 对 DBM 的诱导作用有协同效应。其机制可能为,脱钙骨通过其本身的可溶与非溶性骨形态发生蛋白促进前成骨细胞成骨分化时 DNA 的合成来发挥其成骨诱导活性[4],而实验中外源性的电磁场对体外种植细胞的成骨分化有特殊的敏感性,能够强化和加速骨髓干细胞的成骨分化,从而协同并加强 DBM 的成骨诱导活性[7]。

骨钙素(OC)是成骨细胞特异性合成并分泌的一种非胶原蛋白,在钙离子存在条件下,与羟磷灰石结合并稳定其构象,被认为是向成骨细胞分化最特征性的标志物[8]。实验中 CDP 组 OC 值在 7、14、21 d 时均较 CD 组、CP 组显著升高($P<0.01$),随刺激时间延长,骨钙素活性增高更加明显,说明除 C 组外的各组均出现明显的钙盐沉积,但显然在 21 d 培养过程中,PEMF 和 DBM 联合对骨髓干细胞的成骨刺激较 PEMF 和 DBM 单独作用要强而持久,也说明 PEMF 对 DBM 的成骨诱导具有明显的协同效应。




A:C 组;B:CD 组;C:CP 组;D:CDP 组

**图 3　各组在种植后 21 d 时钙结节茜素红染色形态学观察**　(×40)

实验中 PEMF 和 DBM 一样,单独作用均能促进 hMSCs 的成骨分化,且有接近的效果。几十年的研究表明 DBM 因其富含 BMPs 能够促进成骨,那么 PEMF 单独影响 hMSCs 成骨分化的可能机制又是什么呢?有研究证实,PEMF 能够作用于细胞膜上的受体,产生压电效应,提高细胞质内的游离钙离子浓度,从而激活并放大 cAMP-蛋白激酶介导的信号转导,影响细胞核内生物学效应,从而促进细胞成骨分化[9,10];也有研究报道 PEMF 作用 hMSCs 后,能够增加如 BMP、PDGF、IGF、TGF-β 等骨生长因子的表达,从而进一步促进 hMSCs 的成骨分化[11,12],说明 PEMF 可能通过多种途径影响 hMSCs,增加 BMPs 等骨生长因子表达,最终通过与 DBM 类似的途径促进成骨分化。

PEMF 对骨细胞和骨组织的作用研究表明,电磁场可促进成骨细胞分泌 IGF-Ⅱ、BMP-2、TGF-β 和细胞外基质,而细胞外基质具有压电效应,对细胞内外的电磁信号转换起关键作用[7]。另外经 BMP-2 作用的 hMSCs 暴露在 PEMF 中能显著提高 hMSCs 的成骨指标水平,提示 PEMF 能够加强 hMSCs 对 BMP-2 的反应性[13],或认为 BMP-2 和 PEMF 的联合刺激对成骨细胞的增殖和分化有明显的叠加效应[14]。本实验中所用生物材料 DBM 本身所具有的成骨诱导活性正是基于其富含 BMPs,因此 PEMF 对 DBM 成骨诱导的协同效应有可能是通过 DBM 释放的 BMP-2 等成骨活性因子介导并实现的[15],而 BMPs 再通过 IGF-Ⅱ、TGF-β 等介导来调节早期 Runx2/Cbfa1、ALP 等成骨基因的表达及 ALP 的活性[16]。因此,应用 PEMF 模拟骨电环境对骨组织工程化培养具有重要意义。

总之,PEMF 与 DBM 联合对 hMSCs 的成骨诱导要强于 PEMF 或 DBM 的单独作用,且随着磁场应用时间的延长更加明显。另外 PEMF 对 DBM 诱导 hMSCs 成骨分化具有明显的协同效应,外源性的电磁场可以应用于骨组织工程。而且 PEMF 对 DBM 成骨诱导的协同效应可能是通过 DBM 释放的 BMP-2 等成骨活性因子介导并实现的。同时也应该看到,PEMF 加强 DBM 成骨诱导的具体机制仍不清楚,这个假设和发现需要将来的工作及体内实验来证实。PEMF 频率、强度、时间等参数的最优选择也未确定,因此将 PEMF 真正广泛应用于临床骨组织工程干预治疗仍需进一步的研究。

**参考文献:**


[1] 沈伟伟, 赵建华. 脉冲电磁场对废用性骨质疏松大鼠骨密度和血清转化生长因子 β1 的影响[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(10): 935-937.

[2] 赵廷宝, 范清宇, 张殿忠, 等. 人脱钙骨基质颗粒的制备及应注意的问题[J]. 滨州医学院学报, 2001, 24(1): 6-7.

[3] Lohmann C H, Schwartz Z, Liu Y, *et al*. Pulsed electromagnetic field stimulation of MG63 osteoblast-like cells affects differentiation and local factor production[J]. J Orthop Res, 2000, 18(4): 637-646.

[4] Mauney J R, Jaquiery C, Volloch V, *et al*. *In vitro* and *in vivo* evaluation of differentially demineralized cancellous bone scaffolds combined with human bone marrow stromal cells for tissue engineering[J]. Biomaterials, 2005, 26(16): 3173-3185.

[5] 朱淑霞, 李永华, 宋治远, 等. 电磁场促进骨髓间充质干细胞体外诱导分化时细胞增殖[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(5): 421-423.

[6] Aubin J E, Liu F, Malaval L, *et al*. Osteoblast and chondroblast differentiation[J]. Bone, 1995, 17(2 Suppl): 77S-83S.

[7] Bodamyali T, Bhatt B, Hughes F J, *et al*. Pulsed electromagnetic fields simultaneously induce osteogenesis and upregulate transcription of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in rat osteoblasts *in vitro*[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 250(2): 458-461.

[8] Levy M M, Joyner C J, Virdi A S, *et al*. Osteoprogenitor cells of mature human skeletal muscle tissue: an *in vitro* study[J]. Bone, 2001, 29(4): 317-322.

[9] Lee R C, Canaday D J, Doong H. A review of the biophysical basis for the clinical application of electric fields in soft-tissue repair[J]. J Burn Care Rehabil, 1993, 14(3): 319-325.

[10] Fini M, Cadossi R, Cane V, *et al*. The effect of pulsed electromagnetic fields on the osteointegration of hydroxyapatite implants in cancellous bone: a morphologic and microstructural *in vivo* study[J]. J Orthop Res, 2002, 20(4): 756-763.

[11] Torricelli P, Fini M, Giavaresi G, *et al*. Biomimetic PMMA-based bone substitutes: a comparative *in vitro* evaluation of the effects of pulsed electromagnetic field exposure[J]. J Biomed Mater Res A, 2003, 64(1): 182-188.

[12] Lohmann C H, Schwartz Z, Liu Y, *et al*. Pulsed electromagnetic fields affect phenotype and connexin 43 protein expression in MLO-Y4 osteocyte-like cells and ROS 17/2.8 osteoblast-like cells[J]. J Orthop Res, 2003, 21(2): 326-334.

[13] Schwartz Z, Simon B J, Duran M A, *et al*. Pulsed electromagnetic fields enhance BMP-2 dependent osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells[J]. J Orthop Res, 2008, 26(9): 1250-1255.

[14] Selvamurugan N, Kwok S, Vasilov A, *et al*. Effects of BMP-2 and pulsed electromagnetic field (PEMF) on rat primary osteoblastic cell proliferation and gene expression[J]. J Orthop Res, 2007, 25(9): 1213-1220.

[15] Chen D, Ji X, Harris M A, *et al*. Differential roles for bone morphogenetic protein (BMP) receptor type IB and IA in differentiation and specification of mesenchymal precursor cells to osteoblast and adipocyte lineages[J]. J Cell Biol, 1998, 142(1): 295-305.

[16] Tsai M T, Li W J, Tuan R S, *et al*. Modulation of osteogenesis in human mesenchymal stem cells by specific pulsed electromagnetic field stimulation[J]. J Orthop Res, 2009, 27(9): 1169-1174.


(**收稿**: 2010-03-04;**修回**: 2010-04-06)

(编辑 汪勤俭)