

脉冲电磁场对大鼠骨髓间充质干细胞增殖、成骨分化和 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响*

周予婧^{1,2}, 王 朴^{1,2}, 陈红英³, 刘 端^{1,2}, 季侨丹^{1,2}, 阳筱甜^{1,2}, 高 强^{1,2}, 何成奇^{1,2△}

1. 四川大学华西医院 康复医学中心(成都 610041); 2. 康复医学四川省重点实验室(成都 610041);

3. 四川大学华西医院 公共实验技术中心(成都 610041)

【摘要】 目的 探讨脉冲电磁场(pulsed electromagnetic fields, PEMFs)对大鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)增殖、成骨分化以及对 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响。**方法** 将培养的第3代大鼠 BMSCs 分为3组。3个组均以 LG-DMEM 完全培养基培养 1 d,待细胞贴壁后更换新鲜培养基,对照组不做干预处理;PEMFs 组进行 8 Hz、3.8 mT 的 PEMFs 干预,每天 40 min,持续 21 d;成骨诱导基(OM)组加入成骨诱导剂,不予磁场干预。采用 MTT 法测定增殖活性;碱性磷酸酶(ALP)、茜素红 S 染色进行成骨分化鉴定;利用实时荧光定量 PCR(RT-PCR)技术检测 Wnt/ β -catenin 信号通路及成骨分化相关基因的表达。**结果** 相较对照组,成骨诱导剂在干预第 7、14、21 d 可提高 BMSCs 的增殖活性($P<0.05$);PEMFs 促增殖作用不明显。在 BMSCs 分化方面,PEMFs 组及 OM 组 ALP、茜素红 S 染色阳性强度均高于对照组($P<0.05$)。定量 RT-PCR 结果显示,PEMFs 组及 OM 组 *Wnt1*、*Wnt3a*、*LRP5*、 β -catenin、*BMP-2*、*Runx2*、*ALP*、*OC* mRNA 的表达相较于对照组在相应时间点均有所上调($P<0.05$)。PEMFs 组各检测结果较 OM 组低,但趋势基本一致。**结论** PEMFs 在 8 Hz、3.8 mT 条件下可促进 BMSCs 的成骨分化,这可能与激活 Wnt/ β -catenin 信号通路有关。

【关键词】 脉冲电磁场 骨髓间充质干细胞 成骨分化 Wnt/ β -catenin 信号通路

Effect of Pulsed Electromagnetic Fields on Osteogenic Differentiation and Wnt/ β -catenin Signaling Pathway in Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells ZHOU Yu-jing^{1,2}, WANG Pu^{1,2}, CHEN Hong-ying³, LIU Chuan^{1,2}, JI Qiao-dan^{1,2}, YANG Xiao-tian^{1,2}, GAO Qiang^{1,2}, HE Cheng-qi^{1,2△}. 1. Center of Rehabilitation Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Sichuan Province Key Laboratory of Rehabilitation Medicine, Chengdu 610041, China; 3. Core Facility, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: chengqihescu@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of pulsed electromagnetic fields (PEMFs) on osteogenic differentiation and Wnt/ β -catenin signaling pathway in rat bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs). **Methods** Rat BMSCs were isolated and the passage 3 cells were divided into 3 groups. Cells were cultured in LG-DMEM complete medium for 1 d to ensure fully adherent. Then, change the medium. Cells were maintained in complete medium (Control group) or in osteo-induction medium (OM group). The cells in PEMFs group were cultured in complete medium and exposed to 8 Hz, 3.8 mT PEMF stimulation for 40 min/d. The intervention lasted for 21 d. Cell proliferation activity was determined by using MTT. The effects of PEMF on osteogenic differentiation were assessed by ALP and Alizarin Red S staining. Various osteoblast-relevant genes and genes of Wnt/ β -catenin signaling were analyzed by quantitative real-time RT-PCR. **Results** We found that OM could significantly promote the proliferation of BMSC at 7 d, 14 d, 21 d ($P<0.05$), but the effect was not obviously found in PEMFs group. For osteogenic differentiation, the positive rates of ALP or Alizarin Red S staining were detected higher in PEMFs/OM group ($P<0.05$). Quantitative RT-PCR revealed PEMFs or OM could increase mRNA levels of *Wnt1*, *Wnt3a*, *LRP5*, β -catenin, *BMP-2*, *Runx2*, *ALP*, *OC* at special time point ($P<0.05$). Compared to OM group, PEMFs have a lower expression in each detection, but the trends were consistent. **Conclusion** PEMFs (8 Hz, 3.8 mT) could induce the osteogenic differentiation of rat BMSCs via activating Wnt/ β -catenin signaling pathway.

【Key words】 Pulsed electromagnetic fields Bonemarrow mesenchymal stem cells Osteogenic differentiation Wnt/ β -catenin signaling pathway

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是一种常见的严重影响老年人健康的骨科疾病,成骨细胞为主的骨形成和破骨细胞为主的骨吸收动态平衡的破坏,与

* 国家自然科学基金(No. 81171865, No. 81401858)资助

△ 通讯作者, E-mail: chengqihescu@163.com

疾病发生发展密切相关。近年来,OP 治疗的研究热点逐渐从抑制骨吸收过程转移到促进骨形成过程^[1]。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)是一种具有多向分化潜能的干细胞,在适当条件下可分化为成骨细胞,其成骨分化过程与生物体骨形成密切相关^[2]。脉冲电磁场(pulsed electromagnetic fields, PEMFs)作为一项无创、简便、副作用小的方法广泛应用于临床防治 OP 等骨病^[3,4]。有研究发现 PEMFs 可促进 BMSCs 增殖与成骨分化,但其生物学效应与 PEMFs 参数有关,且作用机制尚不清楚^[5-9]。

Wnt/ β -catenin 信号通路在不同物种中广泛存在,在骨组织的发育及骨代谢平衡中,特别是在干细胞向成骨细胞分化及成熟机制中扮演着非常重要的角色^[10,11]。课题组前期动物研究发现雌性去势大鼠经 8 Hz、3.8 mT 的 PEMFs 刺激后,骨密度提高,胫、股骨的骨髓中 β -catenin mRNA 表达有所增强,提示 Wnt/ β -catenin 信号通路可能与 PEMFs 治疗 OP 的有效性相关^[12]。但目前尚缺乏有关 PEMFs 作用于 BMSCs 时对 Wnt/ β -catenin 信号通路影响的研究。因此,本实验旨在研究 PEMFs 在 8 Hz、3.8 mT 条件下对大鼠 BMSCs 增殖、成骨分化的影响,同时通过对 Wnt/ β -catenin 信号传导通路关键因子 mRNA 的检测,探寻 PEMFs 作用于 BMSCs 的潜在机制,为临床防治 OP 提供依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物、主要仪器和试剂

1.1.1 实验动物 雌性清洁级 2 周龄 SD 大鼠(体质量 30~35 g),由四川大学实验动物中心提供。

1.1.2 主要仪器和试剂 CO₂ 恒温细胞培养箱(Sanyo 公司),倒置相差显微镜(Olympus 公司),离心机、酶标仪和紫外分光光度计(Thermo 公司),iQ5 实时荧光定量 PCR 扩增仪(Bio-Rad 公司),移液器(Gilson 公司);LG-DMEM 培养基、0.25%胰蛋白酶、青霉素+链霉素液体双抗(Hyclone 公司),胎牛血清(FBS, Gibco 公司),地塞米松、 β 甘油磷酸钠、抗坏血酸及碱性磷酸酶(ALP)染色试剂盒(Sigma 公司),噻唑蓝(MTT)及二甲基亚砷(DMSO, Amresco 分装),茜素红 S(Solarbio 公司),Trizol 抽提试剂盒(Invitrogen 公司),逆转录聚合酶链反应试剂盒(TaKaRa 公司),SYBR Green 实时荧光定量 PCR 试剂盒(德国 DBI 公司)。LG-

DMEM 完全培养基;LG-DMEM 培养基+10% FBS+1%液体双抗。成骨诱导培养基(osteogenic induction medium, OM):由在 LG-DMEM 完全培养基上加入成骨诱导剂构成,具体为 LG-DMEM 培养基+10% FBS+1%液体双抗+ 10^{-8} mol/L 地塞米松+10 mmol/L β 甘油磷酸钠+50 μ mol/L 抗坏血酸。

1.2 大鼠 BMSCs 分离与培养

根据文献^[2,13-16],采用颈椎脱臼法处死 2 周龄大鼠,75%酒精浸泡 10 min。无菌条件下切开皮肤,分离股骨和胫骨,剔除软组织,从骨髓处剪除骨头两端,用大号针头在两端骨髓面各钻取一个小孔,换取干净针头,用注射器吸取 10 mL LG-DMEM 完全培养基反复冲洗骨髓腔,收集细胞于 50 mL 离心管中,细胞筛网过滤后,行台盼蓝染色测定细胞活力均在 98%以上。调整细胞浓度为 2×10^6 /cm² 接种于直径 100 mm 培养皿中,置于 37 °C、5%CO₂ 细胞培养箱中培养。培养 3 h 后首次轻柔换液,以后每 8 h 轻柔换液 1 次,72 h 后每周换液 2 次,待细胞融合达 70%~80%时按 1:2 传代培养,每周换液 2 次。

1.3 磁场干预装置

本实验采用的磁场干预装置 PEMFs 发生器由四川大学物理学院研制,主要包括脉冲发生器、步进电机驱动器和亥姆霍兹线圈 3 个部分。该线圈中间区域较大范围内磁场均匀稳定,将 PEMFs 组细胞置于线圈中心区域进行干预。基于本课题组前期研究结果,本实验 PEMFs 刺激参数设置为脉冲频率为 8 Hz、磁场强度为 3.8 mT^[3,4,12,17,18]。

1.4 实验分组及干预

取第 3 代 BMSCs 接种于多个培养皿中,分为 3 组,分别为成骨诱导基(OM)组、PEMFs 组、对照组。3 个组均以 LG-DMEM 完全培养基培养 1 d,待细胞贴壁后更换新鲜培养基后,进行分组干预。对照组:仅用 LG-DMEM 完全培养基培养,不做干预处理;PEMFs 组:在 LG-DMEM 完全培养基培养基础上,予以 8 Hz、3.8 mT PEMFs 干预,每天 40 min,持续 21 d。OM 组:加入 OM 培养,不予磁场干预。干预过程中,根据具体检测方法在不同时间点收取样品。

1.5 检测指标

1.5.1 细胞形态学观察 倒置显微镜下逐日观察细胞形态及生长情况。

1.5.2 细胞增殖活性检测 采用 MTT 法对细胞

增殖活性进行检测。将 BMSCs 按 1 000/孔接种于 96 孔板,加入 200 μ L 培养基。细胞贴壁后 1 d 进行干预,于培养第 1、3、7、14、21 d 取样,每组每个时间点选取 3 个复孔,每孔加入 MTT 溶液(5 mg/mL) 20 μ L,继续孵育 4 h,终止培养,吸弃孔内培养上清液,每孔加 150 μ L DMSO,振荡 10 min,使结晶物充分溶解,于酶标仪上测定 490 nm 时的光密度值(OD 值)。以对照组第 1 d OD 值为基准,将所有 OD 值转化为细胞存活率作图。

1.5.3 ALP 活性检测 将 BMSCs 按 $5\times 10^3/\text{cm}^2$ 密度接种于直径 35 mm 培养皿,于第 7、14、21 d 各组分别取样。根据 ALP 染色试剂盒(偶氮偶联法)说明进行染色,吸弃各皿培养基,PBS 漂洗 3 次,4%(体积分数)多聚甲醛 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 15 min,漂洗 3 次,加入现配孵育液避光孵育 30 min,漂洗 3 次,苏木素复染 3 min,漂洗 6 min,干燥,甘油明胶封片,在 100 倍镜下观察,随机选取 5 个视野拍照。用 ImageJ 图像分析软件对染色图片进行分析,计算各视野阳性表达区域的平均光密度(mean optical density, MOD)值。

1.5.4 矿化结节检测 将 BMSCs 按上述接种密度于直径 35 mm 培养皿,于第 21 d 取样,吸弃培养基,PBS 漂洗 3 次,4%(体积分数)多聚甲醛 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 15 min,漂洗 3 次,加入 1%(质量分数)现配茜素红 S(Tris. HCl 缓冲液配制,pH 8.3),放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱内染色 30 min,镜下观察染色,漂洗,干燥,甘油明胶封片后,于 40 倍镜下随机选取 5 个视野拍照。用 ImageJ 图像分析软件计算各视野 MOD 值。

1.5.5 Wnt/ β -catenin 信号通路及成骨分化相关基因表达的 Real time PCR (RT-PCR) 检测 将 BMSCs 按上述密度接种,于第 3、7、14、21 d 每组分别取样,参照 Trizol 试剂说明抽提细胞总 RNA,用琼脂凝胶电泳对 RNA 质量鉴定,采用紫外分光光度计测定总 RNA 浓度,取 1 μ g 总 RNA 按逆转录试剂盒说明逆转为 cDNA。使用 Primer Premier 5.0 软件设计合成 Wnt/ β -catenin 信号通路及成骨分化标志物相关目的基因引物,包括 *Wnt1*、*Wnt3a*、*LRP5*、 β -catenin、*BMP-2*、*Runx2*、*ALP*、*OC*(附表)。引物由上海生工公司合成。根据 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 试剂盒说明进行 PCR 反应。PCR 反应体系为 20 μ L,反应条件为:①预变性:95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min;②95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,共 40 个循环。以 β -actin 为内参,目的基因相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法转换后进行分析。

1.6 统计学方法

本研究数据为定量资料,检验后呈正态分布,各项检测指标均以 $\bar{x}\pm s$ 表示。多组间差异用单因素方差分析,两两比较用 Dunnett-*t* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

附表 基因列表及引物序列

Table List of genes and primer sequences		
Gene	Primer sequence (5'-3')	Amplicon (bp)
β -actin	Forward:GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTAGC	155
	Reverse:GGCCGGACTCATCGTACTCCTGCTT	
<i>Wnt1</i>	Forward:AGAAACCGCCGCTGGAAC	105
	Reverse:GGAGGTGATTGCGAAGATAAACG	
<i>Wnt3a</i>	Forward:GAGTCTCGTGGCTGGGTGGA	108
	Reverse:GGGCTCGCAGAAGTTAGG	
<i>LRP5</i>	Forward:GACATTTACTGGCCCAATTGG	131
	Reverse:CTGCCCTCCACCACTTCT	
β -catenin	Forward:GGAAAGCAAGCTCATCATTCT	171
	Reverse:AGTGCCTGCATCCCACCA	
<i>BMP-2</i>	Forward:CGTCCCTACTGATGAGTTTCT	129
	Reverse:GCTGTGGCAGGCTTTAT	
<i>Runx2</i>	Forward:AGTAGCAAACCGAAACAC	174
	Reverse:GAAATAGGCATCAGACAAA	
<i>ALP</i>	Forward:AACGTGGCCAAGAATCATCA	127
	Reverse:TGTCCATCTCCAGCCGTGTC	
<i>OC</i>	Forward:GGGCAGTAAGGTGGTGAATAGA	171
	Reverse:CCATAGATGCGCTTGTAGGC	

2 结果

2.1 细胞形态学观察

第 3 代 BMSCs 呈纺锤形或长梭形,对照组细胞形态随着培养时间延长变化不明显,存在细胞间接触抑制,无细胞团块形成。OM 组细胞随着时间延长,细胞形态逐渐从均一的长梭形变为不规则形,并可形成细胞团块聚集生长,不出现接触抑制,呈复层生长,堆积成细胞结节。PEMFs 组与 OM 组细胞形态趋势一致,但时间相对滞后。

2.2 细胞增殖活性检测

MTT 结果显示,3 组细胞的变化趋势类似(图 1),培养前 3 d 细胞增殖无明显变化,第 3~7 d 细胞大量增殖,于第 14 d 达到高峰,之后相对稳定。与对照组相比,PEMFs 组细胞活力在第 7、14、21 d 时

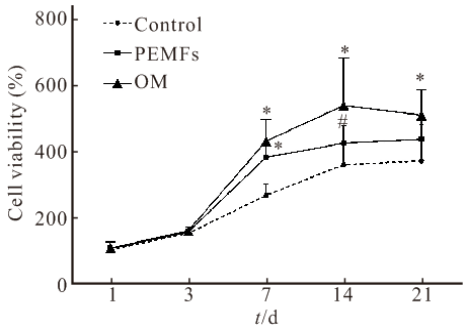


图 1 MTT 法测定的各组细胞增殖活性

Fig 1 MTT assay for cell proliferation activity of rat BMSCs on different conditions

* $P<0.05$, vs. control group; # $P<0.05$, vs. OM group

略高,但检验后显示仅第 7 d 的差异具有统计学意义($P<0.05$);而 OM 组细胞活力在第 7、14、21 d 时高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。在干预第 14 d 可见 PEMFs 组细胞活力低于 OM 组,差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.3 ALP 活性检测

见图 2,图 3。ALP 染色定位于胞浆,呈红色。对照组在干预第 7、14 d 未见明显阳性染色细胞,干预第 21 d 可见少许胞浆内红色的阳性细胞;OM 组干预第 7 d 时染色为弱阳性,14 d 时染色最深,为强阳性,21 d 时稍有减弱;PEMFs 组染色趋势与 OM 组基本一致,但阳性强度较 OM 组弱。组间比较发

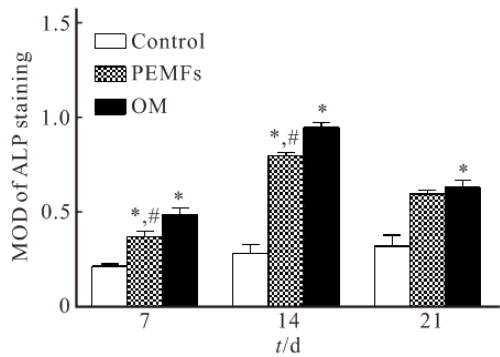


图 2 ALP 染色半定量分析结果

Fig 2 Semi-quantitative analysis of ALP staining of rat BMSCs in different groups at different time point

* $P<0.05$, vs. control group; # $P<0.05$, vs. OM group

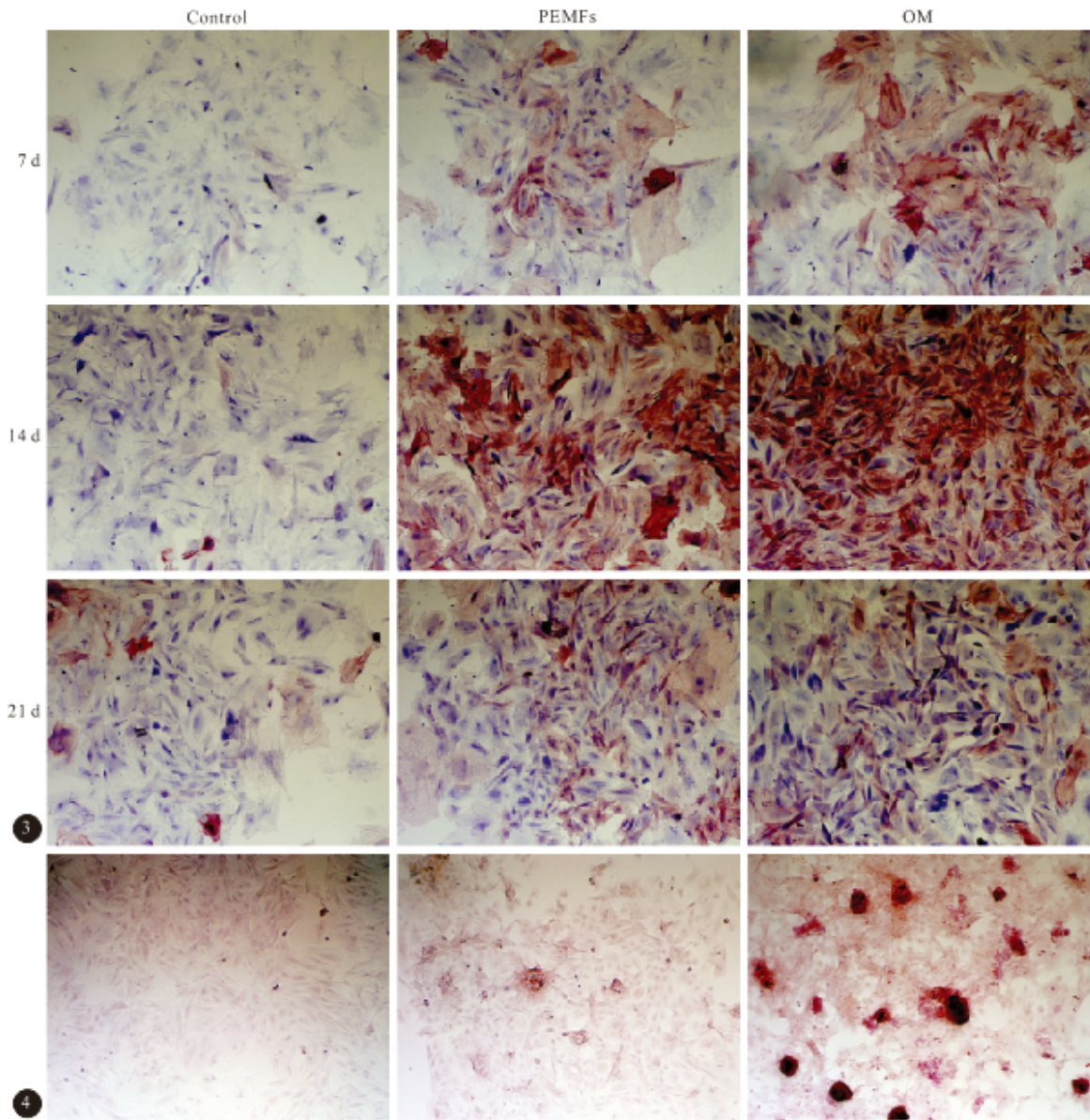


图 3 ALP 染色结果。×100

图 4 茜素红 S 染色结果。×40

Fig 3 Images of ALP staining of rat BMSCs in different groups at different time point. ×100

Fig 4 Images of Alizarin Red S staining of rat BMSCs in different groups at 21 d. ×40

现,PEMFs 组 MOD 值在干预第 7、14 d 均高于对照组($P<0.05$)并低于 OM 组($P<0.05$);在第 7、14、21 d,OM 组 MOD 值高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.4 矿化结节染色结果

干预 21 d,OM 组可见多个散在不透光红色矿化结节;PEMFs 组偶见矿化结节,对照组未见矿化结节(图 4)。OM 组 MOD 值为 0.73 ± 0.13 ,PEMFs 组为 0.43 ± 0.02 ,对照组为 0.18 ± 0.01 。PEMFs 组 MOD 值与 OM 组、对照组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。

2.5 Wnt/ β -catenin 信号通路相关基因表达

RT-PCR 检测结果显示(图 5),相比于对照组,PEMFs 组 *Wnt1* mRNA 表达水平随干预时间延长而逐渐升高,在干预第 14、21 d 时差异具有统计学意义($P<0.05$);*Wnt3a* mRNA 相对表达量在第 3 d 时较高($P<0.05$),第 14 d 时最低,随后表达量上调,在 21 d 时达到最高($P<0.05$);*LRP5* mRNA

表达水平随时间延长逐渐升高,14 d 时达到高峰($P<0.05$),21 d 时表达量略微下调($P>0.05$); β -catenin mRNA 表达趋势与 *LRP5* 类似,在第 7、14 d 时差异有统计学意义($P<0.05$);同样的基因表达趋势在 OM 组也可被发现,但 OM 组整体表达量略高于 PEMFs 组。相比于 OM 组,PEMFs 组 *Wnt1* 在第 14、21 d,*Wnt3a* 在第 14、21 d 及 *LRP5* 第 21 d 的表达量组间差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.6 成骨分化相关基因表达

BMSCs 成骨分化过程中的标志物 *BMP-2*、*Runx2*、*ALP*、*OC* 的检测结果如图 5 所示。与对照组相比,PEMFs 组 *BMP-2* mRNA 表达量随干预时间延长逐渐上调,第 7、14 d 时表达量高,14 d 时差异有统计学意义($P<0.05$),21 d 时表达量下调($P>0.05$);*Runx2*、*ALP* mRNA 表达趋势与 *BMP-2* 类似,先逐步升高后降低,其表达量分别在第 7 d、第 14 d 时达到最高值($P<0.05$);*OC* mRNA

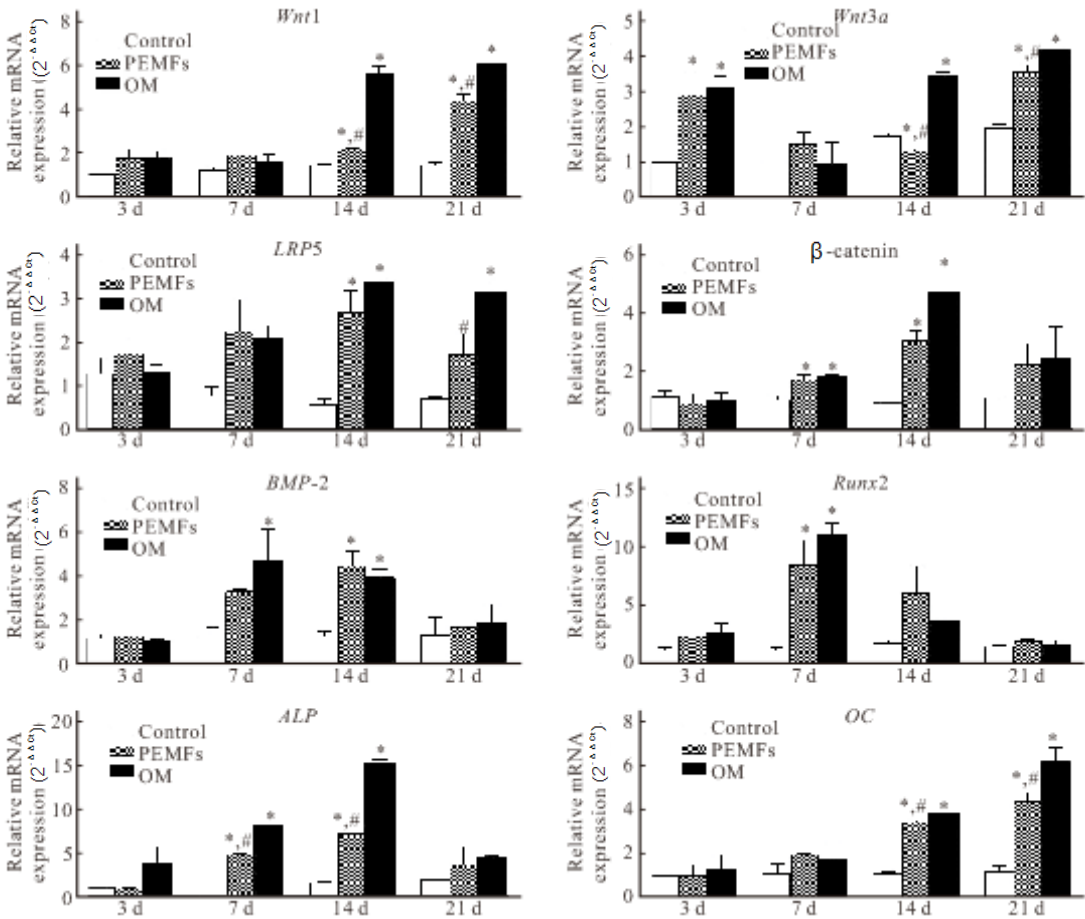


图 5 *Wnt1*、*Wnt3a*、*LRP5*、 β -catenin、*BMP-2*、*Runx2*、*ALP*、*OC* mRNA 相对表达量

Fig 5 Relative mRNA levels of *Wnt1*, *Wnt3a*, *LRP5*, β -catenin, *BMP-2*, *Runx2*, *ALP*, *OC* in different groups at different time point

* $P<0.05$, vs. control group; # $P<0.05$, vs. OM group

表达量自第3 d至21 d表达量逐渐升高,在第14、21 d时差异有统计学意义($P<0.05$)。OM组各目的基因表达趋势与PEMFs组大体类似。但PEMFs组ALP表达量较OM组在第7、14 d低($P<0.05$),OC表达量在第14、21 d时也低于OM组($P<0.05$)。

3 讨论

本实验采用8 Hz、3.8 mT的PEMFs刺激大鼠BMSCs,旨在研究该参数下PEMFs对BMSCs增殖、成骨分化以及对Wnt/ β -catenin信号通路的影响。

本研究结果发现PEMFs组细胞增殖活性在7~21 d具有与OM组类似的趋势,但仅第7 d差异具有统计学意义,故尚不能认为PEMFs可促进大鼠BMSCs增殖。然而,Song等^[7]发现大鼠BMSCs在15 Hz、1 mT正弦电磁场辐照第4 d出现增殖加快,并持续到14 d。出现不一致的原因可能与PEMFs波形、参数等有关。近年一项研究证实,场强为1 mT,频率为10 Hz或30 Hz的正弦PEMFs可显著促进大鼠BMSCs增殖^[8]。同时,我们发现以往研究在探讨PEMFs能否促进人MSCs增殖这一问题同样存在争议^[5,6,9]。有学者提出各研究间PEMFs参数、细胞接种密度、细胞培养环境的不统一可能是造成研究结果不一致的原因^[19]。

本研究通过ALP染色、茜素红S染色检测发现,8 Hz、3.8 mT的PEMFs对大鼠BMSCs具有与OM类似的成骨效应,在7~14 d明显提高ALP活性,21 d时形成明显的矿化结节。同时,RT-PCR结果显示,PEMFs(8 Hz、3.8 mT)可上调成骨生长因子BMP-2、Runx2、ALP、OC的基因水平。相关研究表明,BMP-2是TGF- β 家族一员,可独立刺激BMSCs向成骨细胞分化^[20]。Runx2控制着多个成骨特异性基因,在成骨分化中起到关键作用,可作为成骨分化过程的早期标志物^[21]。ALP能将有机磷酸水解为无机磷酸,启动矿化,其普遍被认为是早中期成骨分化的标志物^[22]。在成骨分化末期,细胞成熟矿化成骨组织,OC表达量升高^[23]。以往研究发现,PEMFs能够促进BMSCs成骨分化,提高相关细胞因子的表达。Song等^[7]的研究中,大鼠BMSCs经PEMFs干预后,Runx2基因水平在7 d时升高,14 d时稍微降低。Kaivosoja等^[6]在研究15 Hz、1 G的PEMFs对人BMSCs的作用时发现Runx2、ALP、OC的表达水平有所上调,并具有时

间依赖性。本研究所使用的参数虽与已有文献不一致,但表现出一致的结果,即PEMFs在8 Hz、3.8 mT条件下可促进BMSCs成骨,该作用体现在分化的整个阶段。

本研究对Wnt/ β -catenin信号通路相关基因分析发现,该通路关键因子Wnt1、Wnt3a、LRP5、 β -catenin mRNA表达量在PEMFs刺激BMSCs过程中有所上调。Wnt1表达量在干预第14、21 d时最为明显;Wnt3a表达量在21 d时达到最高;LRP5表达水平在14 d时达到高峰随后有所下调; β -catenin表达量在第7、14 d时较高。对比成骨标志物基因表达趋势所示时间阶段,我们发现PEMFs组Wnt/ β -catenin信号通路相关基因主要在分化中晚期出现高表达,由此我们推测PEMFs可能通过激活Wnt/ β -catenin信号通路,上调下游成骨相关靶基因的表达,从而促进BMSCs的成骨分化,该作用在成骨中晚期更为明显。

本研究创新点主要体现在:①首次探讨了PEMFs在介导BMSCs成骨分化过程中对Wnt/ β -catenin信号通路的影响;②证实8 Hz、3.8 mT的PEMFs可介导BMSCs的成骨分化。由此本课题组从临床、动物、细胞多个层面为PEMFs在该参数下治疗OP的有效性提供了依据,对PEMFs的临床应用具有指导意义。本研究存在的局限性主要为:①仅探讨了PEMFs对经典Wnt/ β -catenin信号通路的影响,提示其可能通过激活该通路促进成骨分化,未对其分子机制进行深入研究;②未探讨PEMFs对非经典Wnt信号通路及其他骨相关信号通路的影响。

综上所述,本研究在印证以往研究的基础上探讨了PEMFs(8 Hz、3.8 mT)对BMSCs增殖、成骨分化以及对Wnt/ β -catenin信号通路的影响。我们谨慎地提出本研究的结论:PEMFs(8 Hz、3.8 mT)可促进BMSCs的成骨分化,这可能与激活Wnt/ β -catenin信号通路有关,该作用在成骨中晚期更为明显。这为PEMFs临床治疗OP奠定了研究基础和理论依据。未来还需要更多的研究对该分子机制进行深入探讨。

参 考 文 献

- 1 Cairoli E, Zhukouskaya VV, Eller-Vainicher C, et al. Perspectives on osteoporosis therapies. J Endocrinol Invest, 2015;38(3):303-311.
- 2 Gneccchi M, Melo LG. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells: isolation, expansion, characterization, viral

- transduction, and production of conditioned medium. *Methods Mol Biol*, 2009; 482: 281-294. doi: 10. 1007/978-1-59745-060-7_18.
- 3 Liu HF, Yang L, He HC, *et al.* Pulsed electromagnetic fields on postmenopausal osteoporosis in Southwest China: a randomized, active-controlled clinical trial. *Bioelectromagnetics*, 2013; 34(4): 323-332.
- 4 Liu H, Yang L, He H, *et al.* The hemorheological safety of pulsed electromagnetic fields in postmenopausal women with osteoporosis in southwest China: a randomized, placebo controlled clinical trial. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2013; 55(3): 285-295.
- 5 Jansen JH, van der Jagt OP, Punt BJ, *et al.* Stimulation of osteogenic differentiation in human osteoprogenitor cells by pulsed electromagnetic fields: an *in vitro* study. *BMC Musculoskelet Disord*, 2010; 11: 188. doi: 10. 1186/1471-2474-11-188.
- 6 Kaivosoja E, Sariola V, Chen Y, *et al.* The effect of pulsed electromagnetic fields and dehydroepiandrosterone on viability and osteo-induction of human mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med*, 2015; 9(1): 31-40.
- 7 Song MY, Yu JZ, Zhao DM, *et al.* The time-dependent manner of sinusoidal electromagnetic fields on rat bone marrow mesenchymal stem cells proliferation, differentiation, and mineralization. *Cell Biochem Biophys*, 2014; 69(1): 47-54.
- 8 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. *Bioelectromagnetics*, 2013; 34(6): 453-464.
- 9 Sun LY, Hsieh DK, Yu TC, *et al.* Effect of pulsed electromagnetic field on the proliferation and differentiation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Bioelectromagnetics*, 2009; 30(4): 251-260.
- 10 Wang Y, Li YP, Paulson C, *et al.* Wnt and the Wnt signaling pathway in bone development and disease. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2014; 19: 379-407.
- 11 Gregory CA, Gunn WG, Reyes E, *et al.* How Wnt signaling affects bone repair by mesenchymal stem cells from the bone marrow. *Ann N Y Acad Sci*, 2005; 1049: 97-106.
- 12 Zhou J, He H, Yang L, *et al.* Effects of pulsed electromagnetic fields on bone mass and Wnt/ β -catenin signaling pathway in ovariectomized rats. *Arch Med Res*, 2012; 43(4): 274-282.
- 13 Grassel S, Stockl S, Jenei-Lanzl Z. Isolation, culture, and osteogenic/chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Methods Mol Biol*, 2012; 879: 203-267. doi: 10. 1007/978-1-61779-815-3_14.
- 14 Nardi NB, Camassola M. Isolation and culture of rodent bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells. *Methods Mol Biol*, 2011; 698: 151-160. doi: 10. 1007/978-1-60761-999-4_12.
- 15 Zhu H, Guo ZK, Jiang XX, *et al.* A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse compact bone. *Nat Protoc*, 2010; 5(3): 550-560.
- 16 Soleimani M, Nadri S. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. *Nat Protoc*, 2009; 4(1): 102-106.
- 17 何成奇, 肖登, 王维等. 不同强度脉冲电磁场对去势大鼠股骨骨钙含量的影响. *中国康复医学杂志*, 2007; 22(3): 215-217.
- 18 何成奇, 王维, 肖登等. 不同频率脉冲电磁场对去势大鼠血清雌二醇及股骨骨钙含量的影响. *中国康复医学杂志*, 2007; 22(4): 303-305.
- 19 Tepper OM, Callaghan MJ, Chang EI, *et al.* Electromagnetic fields increase *in vitro* and *in vivo* angiogenesis through endothelial release of FGF-2. *FASEB J*, 2004; 18(11): 1231-1233.
- 20 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 Orthop Res*, 2007; 25(9): 1213-1220.
- 21 Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, *et al.* *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*, 1997; 89(5): 747-754.
- 22 Orimo H, Shimada T. The role of tissue-nonspecific alkaline phosphatase in the phosphate-induced activation of alkaline phosphatase and mineralization in SaOS-2 human osteoblast-like cells. *Mol Cell Biochem*, 2008; 315(1-2): 51-60.
- 23 Stein GS, Lian JB, Stein JL, *et al.* Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation. *Physiol Rev*, 1996; 76(2): 593-629.

(2014-12-17 收稿, 2015-03-20 修回)

编辑 吕熙