

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.12.004

1950 MHz 射频电磁场对人脐带间充质干细胞增殖和成骨分化的影响研究*

王甜¹ 郭玲¹ 安广洲¹ 周艳¹ 张俊平¹ 张克英¹ 郭国祯² 丁桂荣^{1Δ}

(1 空军军医大学, 军事预防医学系辐射生物学教研室 陕西 西安 710032;

2 空军军医大学, 军事预防医学系放射医学教研室 陕西 西安 710032)

摘要 目的:间充质干细胞(Mesenchymal stem cells, MSCs)具有广阔的临床应用前景,但由于其体外增殖和定向分化等问题,制约了其进一步应用。本研究拟探讨 1950MHz 射频电磁场(Radio-frequency electromagnetic fields, RF-EMF)对人脐带间充质干细胞(Human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUC-MSCs)增殖和成骨方向分化的影响,以期 MSCs 的体外增殖和定向分化提供一条新途径。**方法:**华通氏胶组织块法分离培养人脐带间充质干细胞,流式细胞仪检测间充质干细胞特异性标志物。选择鉴定后的第 3 至第 6 代(P3-P6)hUC-MSCs 用于实验。将 hUC-MSCs 细胞暴露或假暴露于频率为 1950 MHz,比吸收率(Specific absorption rate, SAR)分别为 0.5, 1.0 和 2.0 W/kg 的 RF-EMF 中,每天暴露 1 h(5 min 开, 10 min 关),连续暴露 7 d。暴露结束后,流式细胞仪检测细胞周期,免疫荧光检测增殖相关蛋白 Ki67 表达,连续 6 天用 CCK-8 方法检测细胞数。在成骨分化研究中,将 P3 代的 hUC-MSCs 随机分为假暴露(sham)组,射频辐射暴露(RF)组,成骨诱导培养基组(Induction medium, OM)和成骨诱导培养基联合射频辐射暴露(OM+RF)组,暴露 SAR 值为 2.0 W/kg,其它参数不变。暴露结束后立即检测细胞的碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, ALP)活性。**结果:**原代培养的细胞具有 MSC 典型外观,且表达 MSCs 特异性表面抗原。与 sham 组相比,不同 SAR 值 RF 暴露后, hUC-MSCs 的增殖能力无明显变化, S 期细胞比例及 Ki67 蛋白水平也无显著改变。此外, hUC-MSCs 经 SAR 值为 2.0 W/kg 的 RF 暴露 7 d,与 sham 组相比其 ALP 活性无显著变化。与 OM 组相比, OM+RF 组的 ALP 活性亦无显著改变。**结论:**华通氏胶组织块法能够培养出纯度较高的间充质干细胞,本实验条件下的 1950 MHz 射频电磁场对 hUC-MSCs 的增殖和成骨分化均无显著影响。

关键词:射频电磁场;间充质干细胞;细胞增殖;成骨分化

中图分类号:R-33;Q64;R331.2 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2018)12-2218-06

Effects of 1950 MHz Radiofrequency Electromagnetic Fields on the Proliferation and Osteogenic Differentiation of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells*

WANG Tian¹, GUO Ling¹, AN Guang-zhou¹, ZHOU Yan¹, ZHANG Jun-ping¹, ZHANG Ke-ying¹, GUO Guo-zhen², DING Gui-rong^{1Δ}

(1 Department of Radiation Biology, Faculty of Preventive Medicine, Air Force Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 Department of Radiation Medicine, Faculty of Preventive Medicine, Air Force Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: Mesenchymal stem cells (MSCs) has wide prospect of clinical application, but its proliferation and directional differentiation in vitro restrict its further application. In the study, we explored the effects of 1950 MHz radiofrequency electromagnetic fields (RF-EMF) on the proliferation and osteogenic differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUC-MSCs), in order to provide a new way for the proliferation and differentiation of MSCs in vitro. **Methods:** The hUC-MSCs were cultured by explant method of Wharton's jelly and the specific markers of mesenchymal stem cells were detected by flow cytometry (FCM). The hUC-MSCs of passage 3 to 6 were assigned and intermittent exposed or sham-exposed to 1950 MHz RF-EMF at specific absorption rates (SARs) of 0.5, 1.0 or 2.0 W/kg for 7 consecutive days (1 h/d), 5 min on and 10 min off. After exposure, cell viability was detected by CCK-8, cell cycle was measured by flow cytometry, and Ki67 protein expression was tested by immunofluorescence. In the study of osteogenic differentiation, the hUC-MSCs of passage 3 were divided into sham group, RF group, induction medium (OM) group and OM+RF group. After the same exposure above, except the SAR is 2.0 W/kg, the alkaline phosphatase (ALP) activity was measured immediately. **Results:** The cells cultured by explant method showed typical appearance of MSCs, and expressed MSCs specific surface antigen positively. Compared with sham-exposed cells, the proliferation capacity of hUC-MSCs did not change significantly after RF-EMF exposure at different SAR values, and the percentage of cells in S phase and the level of Ki67 protein expression also did not change ob-

* 基金项目:国家自然科学基金项目(31770905)

作者简介:王甜(1989-),硕士研究生,主要研究方向:电磁辐射的生物学效应, E-mail: scuwangtian1989@sina.cn

Δ 通讯作者:丁桂荣,博士生导师,教授,主要研究方向:辐射生物学, E-mail: dingzhao@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2017-12-08 接受日期:2018-01-12)

viously. After exposure, the activity of ALP between sham group and RF group, as well as OM and OM+RF group, had no significant differences. **Conclusions:** The hUC-MSCs cells could be cultured by the method of Wharton's jelly explant with high purity. 1950 MHz RF-EMF in the experiment had no significant effects on the proliferation and osteogenic differentiation of hUC-MSCs in vitro.

Key words: Radiofrequency electromagnetic fields; Mesenchymal stem cells; Cell proliferation; Osteogenic differentiation

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q64; R331.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)12-2218-06

前言

间充质干细胞(Mesenchymal Stem Cells, MSCs)来源于发育早期的外胚层和中胚层,是一类具有自我复制和多向分化潜能的细胞,它们能够不断自我更新,并在特定条件下分化成为一种或多种构成人体组织或器官的细胞。MSCs在组织工程上已经得到广泛应用,在骨质疏松、神经退行性疾病和心肌梗塞等疾病治疗中也有较多探索。虽然MSCs具有良好的临床应用前景,但是,由于它的体外大量增殖、定向分化和体内定向移动等问题,制约了其进一步应用,如何解决这些问题成为这个领域的研究热点与难点。据报道,特定参数的电磁辐射暴露可对MSCs的增殖和分化产生影响,Jansen等^[1]将人BMSCs在0.1 mT、15 Hz的脉冲电磁场(pulse electromagnetic field, PEMFs)持续暴露,发现9 d后,细胞数目不再发生变化,而暴露14 d后,细胞数又开始增加,BMSCs成骨相关基因表达显著上调,但效果还比较有限。

射频电磁场(Radiofrequency electromagnetic field, RF-EMF)是指频率在100 kHz~300 GHz的电磁场,生活环境中的RF-EMF主要来源于手机、基站等通信设备。近年来,关于RF-EMF对动物及离体细胞的生物学效应研究较多,但主要关注的是体细胞。据报道,RF-EMF可诱导脑胶质细胞活化,促炎因子分泌增加^[2],神经轴突生长受损等^[3]。此外,研究还发现,将人胶质瘤细胞U87暴露于手机频段RF-EMF后,细胞凋亡明显增加^[4]。关于RF-EMF对干细胞的影响研究仅见零星报道。如He等发现^[5],功率密度为120 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$,频率为900 MHz的射频电磁场暴露可诱导骨髓间充质干细胞(Bone marrow mesenchymal stem cell, BMSCs)PARP-1 (poly (ADP-ribose) polymerase-1)的表达显著增加,PARP-1是参与DNA损伤修复和细胞凋亡的关键基因之一,提示RF-EMF对BMSCs的生物学特性具有一定影响,BMSCs是来源于中胚层的多能干细胞,生理情况下支持骨髓造血功能^[6]。关于RF-EMF对人脐带间充质干细胞(Human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUC-MSCs)的生物学特性影响,目前尚未见报道。此外,在电磁场对MSCs的体外成骨分化效应研究中,现有文献主要集中在低频磁场,未见关于RF-EMF对hUC-MSCs成骨分化的效应研究。

MSCs在多种组织中存在,不同来源的MSCs有着相似的特性,hUC-MSCs是指存在于新生儿脐带组织中的一种多功能干细胞,它能分化成许多种组织细胞,具有广阔的临床应用前景,但由于其体外增殖和定向分化等问题,制约了其进一步应用。本研究拟探讨人们生活中最常见的1950MHz射频电磁辐射(Radio-frequency electromagnetic fields, RF-EMF),探讨其对脐带间充质干细胞(Human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUC-MSCs)增殖和成骨方向分化的影响,以期对MSCs

的体外增殖和定向分化提供一条新途径。

1 材料方法

1.1 主要仪器和试剂

CO₂培养箱(HERA cell 240i,美国Thermo公司),倒置荧光显微镜(德国Leica公司),酶标仪(美国Bio-rad公司),DMEM/F12培养基(Hyclone公司),胎牛血清(fetal bovine serum, FBS,杭州四季青公司),胰蛋白酶(Amerso公司),青霉素+链霉素液体双抗(Solarbio公司),地塞米松、 β -甘油磷酸钠、抗坏血酸(美国Sigma公司),茜红素(Amerso公司),CCK-8增殖检测试剂盒(七海公司),碱性磷酸酶(ALP)活性检测试剂盒(南京建成公司),BCA蛋白浓度检测试剂盒(碧云天公司),Ki67抗体(兔单克隆抗体,abcam公司,ab16667),Cy3-IgG(山羊抗兔,abcam公司,ab6939)。完全培养基:DMEM/F12、10% FBS、100 U/mL青链霉素;成骨诱导培养基(Osteogenic induction medium, OM):DMEM/F12、10% FBS、100 U/mL青链霉素、50 mg/L抗坏血酸、10 mmol/L β -甘油磷酸钠和 1×10^{-8} mol/L地塞米松。

1.2 射频电磁场暴露装置

射频电磁场暴露系统(sXc-1950 MHz)如之前研究所描述^[7],系统由培养箱中2个波导腔及外部控制装置组成,每个波导腔可放置6个细胞培养皿(直径35 mm)。由计算机对整个细胞暴露系统进行比吸收率($0 \sim 4.0 \text{ W/Kg}$)定量和全反馈控制。整个暴露过程中,35 mm培养皿中的细胞置于 $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$ 、5% CO₂的波导腔中,假暴露和暴露培养的温差不超过 0.1°C 。使用美国Narda 7620型微波辐射测试仪和惠普8592C型频谱分析仪定期测试暴露参数。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 课题已通过西京伦理委员会的审批(附件1)。从医院收集足月健康婴儿的脐带组织,放于装有PBS(含100 U/mL的青链霉素)的无菌瓶中,带回实验室进行处理。超净台内取出脐带,在10 cm培养皿中用PBS洗两遍,除去残留凝血。将脐带剪成2~4 cm的小段,从静脉剪开,剥除静脉壁、两根动脉,然后慢慢剥离华通氏胶。将其剪成 2 mm^3 大小,转移到 25 cm^2 培养瓶中,均匀平铺,加少量完全培养基保持湿润。24 h后补充足够的培养基,第5天半量换液,之后每3天换液一次,并观察细胞生长情况。第14天进行细胞传代。

1.3.2 细胞鉴定 采用流式细胞仪对MSC表面特异性抗原进行检测。取第3代细胞(P3) 5×10^6 个,洗涤后分别加入PE-CD105、FITC-CD90、PE-CD166、FITC-IgG和PE-IgG, 4°C 孵育30 min后用流式细胞仪检测。

1.3.3 分组及处理 增殖实验:采用P3-P6代细胞,调整细胞密度为 $1 \times 10^4/\text{mL}$,接种于35 mm的培养皿,每皿3 mL,分为

假暴露组和暴露组 (SAR 值 0.5、1.0 和 2.0 W/kg), RF-EMF 频率为 1950 MHz, GSM-Talk 信号模式, 每天暴露 1 h (5 min 开, 10 min 关, 循环进行), 连续暴露 7 d, 第 3 d 细胞换液 1 次。

成骨分化实验: 将 P3 代细胞以每孔 5×10^4 个细胞接种于 35 mm 皿, 分为四组, sham 组, RF 组, OM 组和 OM+RF 组, 每组 3 个皿, 每皿 3 mL 培养基, 细胞长至密度为 70% 时, OM 和 OM+RF 组换成骨诱导培养基, 然后四组一起暴露于 1950 MHz 射频电磁场, GSM-Talk 信号, SAR 值为 2.0 W/kg, 每天 1 h (5 min 开, 10 min 关), 连续 7 天, 中间换液一次。

1.3.4 CCK-8 增殖检测 暴露结束后, 每个皿中的细胞分别用 0.125 % 胰酶消化收集, 离心后, 用完全培养基重悬细胞, 调整细胞密度为 1×10^4 mL, 接种 96 孔板, 每孔 200 μ L, 假暴露组和暴露组分别有 6 个样本, 每个样本 3 个复孔。暴露结束后连续 6 d 用 CCK-8 检测细胞的增殖变化。具体方法是: 吸弃孔中旧的培养基, 每孔各加 10% 的 CCK-8 溶液 (按照 1:9 的比例将 CCK-8 加到完全培养基中), 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h, 使用酶标仪在 450 nm 波长下检测各孔吸光度。

1.3.5 流式细胞仪检测细胞周期 暴露结束后, 消化收集细胞, 离心后弃上清, 用预冷的 PBS 洗两遍, 弃上清, 每管加预冷的 70 % 乙醇吹打均匀, 封口膜封口, 4 $^{\circ}$ C 过夜。检测前, 离心, 弃上清, 用 PBS 洗两遍。400 μ L RNase 悬浮细胞, 37 $^{\circ}$ C 放置 30 min, 再各加 100 μ L 碘化丙啶 (propidium iodide, PI), 混匀, 室温避光 30 min, 过 200 目尼龙网, 上机测定细胞各周期 DNA 含量。

1.3.6 免疫荧光 暴露结束后, 消化收集细胞, 用 12 孔板爬片。孔中放无菌玻片, 4×10^4 孔接种细胞。长至细胞密度为 60% 左右时, 取出玻片, PBS 轻轻漂洗两遍。4% 多聚甲醛固定

20 min, PBS 洗 3 次, 每次 3 min。0.1% Triton X-100 室温通透 20 min。PBS 洗 3 次, 每次 3 min。山羊血清室温封闭 1 h。吸走血清, 加 Ki67 一抗 (1:200, PBS 稀释)。4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。PBS 洗 3 次, 每次 5 min。加二抗 Cy3-IgG (1:400, PBS 稀释), 室温孵育 2 h。PBS 洗 3 次, 每次 5 min。加 DAPI 复染 5 min。PBS 洗 3 次, 每次 3 min。漂洗结束后立即用 75% 甘油封片, 荧光显微镜拍片。

1.3.7 碱性磷酸酶 (ALP) 活性检测 暴露结束后, 弃上清, PBS 洗两遍。每皿加 200 μ L 2% Triton X-100, 用细胞刮刮取细胞到 EP 管中。冰上裂解 40 min, 期间震荡两次。12000 rpm, 10 min, 4 $^{\circ}$ C 离心。吸取上清至另一 EP 管中, 按照试剂盒操作步骤检测培养液中 ALP 活性, 用 BCA 法检测蛋白浓度。

1.4 统计学分析

应用统计学软件 SPSS 13.0 对实验结果进行分析, 数据以均数 $\pm$ 标准差表示。均数比较用方差分析和 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞培养和鉴定结果

华通氏胶组织块在培养 4 d 后, 周围有少量细胞散落分布, 第 7 d 时已形成群落, 14 d 左右细胞的融合度可达 90% 以上, 可以传代。传代后的细胞形态稳定, 具有间充质干细胞的典型外观, 呈梭型生长, 单核, 呈放射或旋涡状排列 (图 1A、B)。该细胞的生长曲线如图 1C 所示, 细胞的倍增时间为 32 h。流式细胞仪检测结果显示, 该细胞高表达 CD90、CD105 和 CD166, 阳性细胞率均在 96% 以上。这三种抗原是间充质干细胞的特异性表面抗原^[8], 证明此种方法分离培养出的细胞为 hUC-MSCs (图 1D-F)。

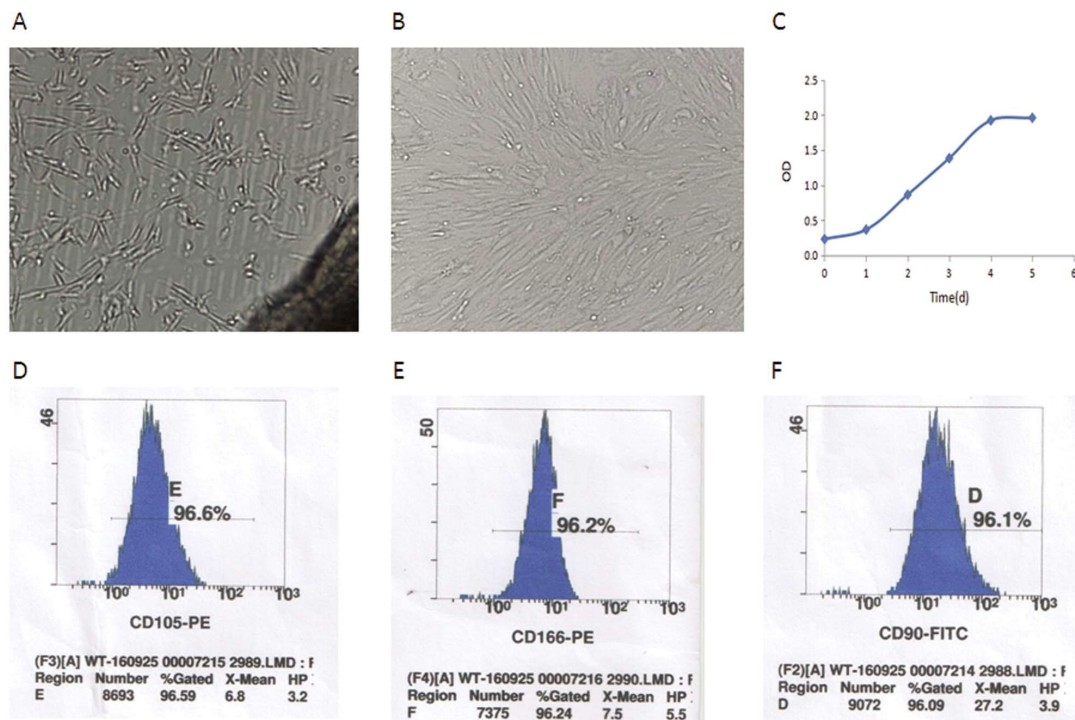


图 1 hUC-MSCs 的培养和鉴定结果 A: 原代培养 7 d 时细胞 ($\times 40$); B: P1 代细胞形态 ($\times 40$); C: 生长曲线; D: CD105 流式结果图;

E: CD166 流式结果图, F: CD90 流式结果图

Fig.1 Culture and identification of hUC-MSCs A: 7 d of primary culture, B: Passage 1, C: Growth curve, D: CD105 of FCM, E: CD166 of FCM,

F: CD90 of FCM

2.2 1950 Hz RF-EMF 对 hUC-MSCs 增殖的影响

hUC-MSCs 暴露于 1950 MHz RF-EMF 中, SAR 值分别为 0.5、1.0 和 2.0 W/kg, 每天暴露 1 h (5 min 开, 10 min 关, 循环进行), 连续暴露 7 d, 结束后, 立即用流式细胞仪和免疫荧光法分别检测细胞周期和增殖相关蛋白 Ki67 的表达, 并且用 CCK-8 法连续 6 d 检测不同 SAR 值组的细胞活力, 以观察 1950 MHz RF-EMF 对 hUC-MSCs 增殖的影响。

CCK-8 法结果显示(图 2), 与 sham 组相比, 不同 SAR 值组的细胞活力没有显著差异。

流式细胞仪细胞周期检测结果显示(图 3), 与 sham 组比较, 不同 SAR 值组的 S 期细胞比例均无明显变化。

Ki67 免疫荧光结果显示(图 4), 与 sham 组比较, 不同 SAR 值组的 Ki67 蛋白表达均无显著差异。

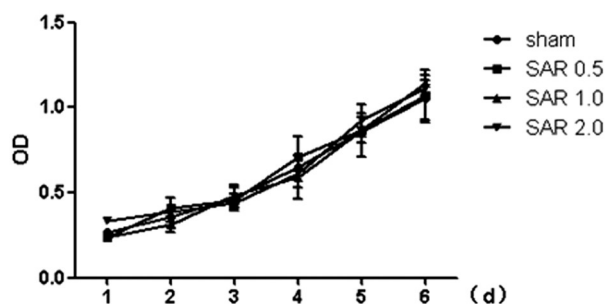


图 2 不同 SAR 值 1950 MHz RF-EMF 暴露后 hUC-MSCs 的增殖曲线
Fig. 2 Proliferation curves of hUC-MSCs after exposed to 1950 MHz RF-EMF at different SAR values

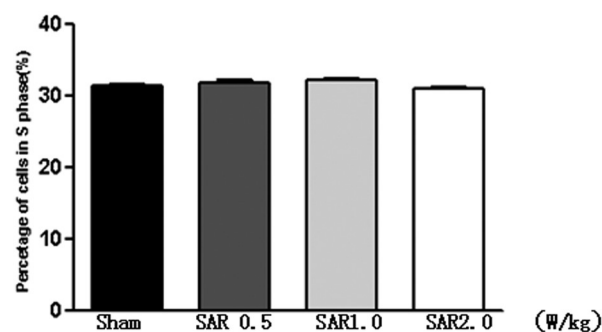


图 3 不同 SAR 值 1950 MHz RF-EMF 暴露后 S 期 hUC-MSCs 细胞所占比例

与 sham 组比较, 不同 SAR 值组的 S 期细胞比例无明显变化。
 $n=5$, $P>0.05$ vs sham (ANOVA)

Fig.3 The percentage of cells in S phase after exposed to 1950 MHz RF-EMF at different SAR values

The percentage of cells in S phase did not change obviously compared with sham group. $n=5$, $P>0.05$ vs sham (ANOVA)

2.3 1950 MHz RF-EMF 对 hUC-MSCs 成骨分化的影响

ALP 是成骨分化的早期标志物, 在 MSCs 开始成骨分化时高表达, 如图 5 所示, 培养在诱导培养基中的细胞, 7d 后显示很高的 ALP 活性, 在接受每天 1 h, 连续 7 d RF-EMF 暴露 (SAR 2.0 W/kg, 5 min 开, 10 min 关) 后, 与 sham 组相比, RF 组 ALP 活性无显著变化, 提示 RF-EMF 对 hUC-MSCs 的没有向成骨方向分化的诱导效应, 同时, 与 OM 组相比, OM+RF 组 ALP 活性也没有显著差异, 提示 RF-EMF 对成骨诱导剂的诱导效应无显著影响。

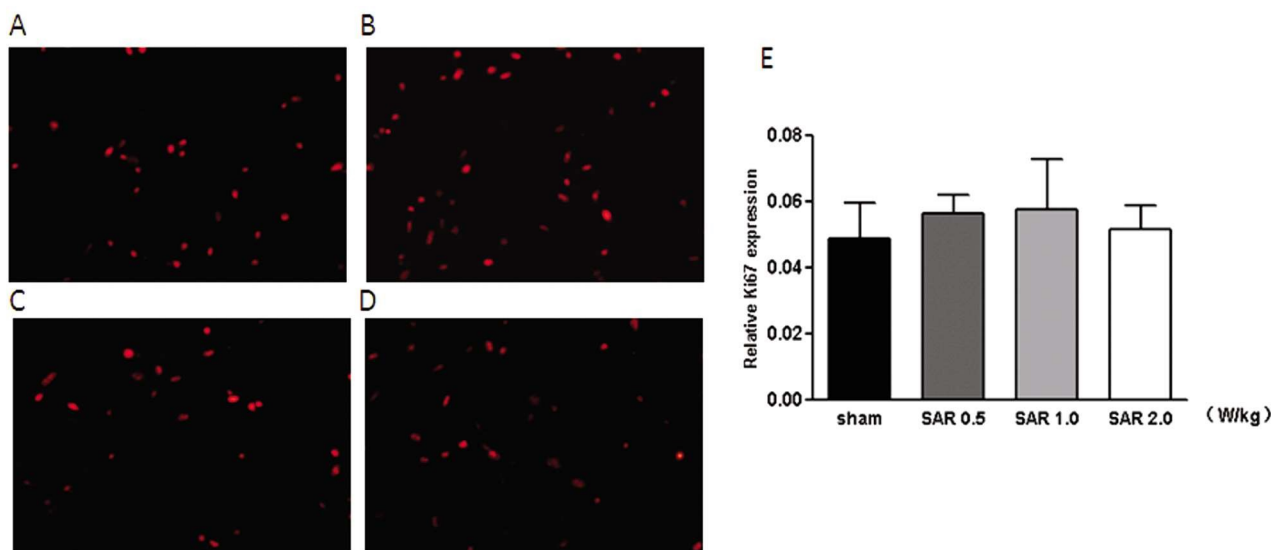


图 4 不同 SAR 值 1950 MHz RF-EMF 暴露后 hUC-MSCs Ki67 蛋白表达 ($\times 200$)

A: sham 组; B: SAR 值 0.5 组; C: SAR 值 1.0 组; D: SAR 值 2.0 组; E: Ki67 蛋白相对表达量。与 sham 组比较, 不同 SAR 值组的 Ki67 蛋白表达均无显著差异。 $n=10$, $P>0.05$ vs sham (ANOVA)。

Fig. 4 The Ki67 protein expression of hUC-MSCs after exposed to 1950 MHz RF-EMF at different SAR values. ($\times 200$)

A: sham; B: SAR value 0.5; C: SAR value 1.0; D: SAR value 2.0; E: Relative Ki67 expression. The level of Ki67 protein expression did not change significantly compared with sham group. $n=10$, $P>0.05$ vs sham (ANOVA).

3 讨论

MSCs 是具有自我复制和多向分化潜能的细胞, 来源于发育早期的外胚层和中胚层。1987 年, Friedenstein 等首先从骨髓中分离培养出 BMSCs^[9,10], 近年来, 逐渐在脂肪、脐带、骨髓等多

种组织中发现 MSCs 的存在, 并且成功建立体外培养方法, 在体外培养条件下, 不同来源的 MSCs 有着相似的特性^[11], 都贴壁生长, 成纤维样、漩涡状排列, 表达特异性抗原, 在特定条件下, 可以向成骨细胞、软骨细胞、神经细胞和心肌细胞等方向分化。脐带来源的 MSCs 由于取材容易而被广泛应用^[12],

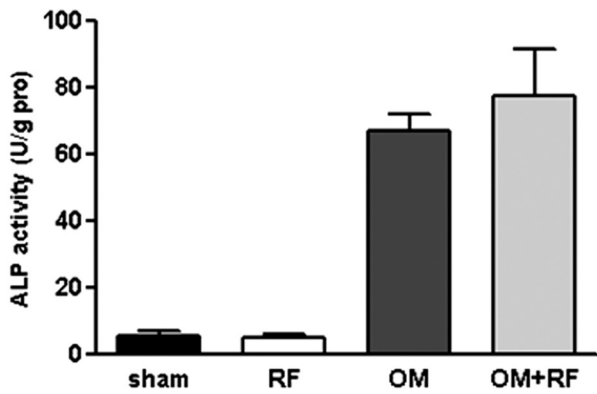


图5 1950 MHz RF-EMF 辐照 hUC-MSCs 7 d 后不同组的 ALP 活性 RF 组与 sham 组相比, $P>0.05$ ($N=6$, t 检验); OM+RF 组与 OM 组相比, $P>0.05$ ($n=6$, t 检验)

Fig.5 The ALP activity of hUC-MSCs belong to different group after exposed to 1950 MHz RF-EMF for 7 d The RF group compared with the sham group, $P>0.05$ ($N=6$, t test); The OM+RF group compared with the OM group, $P>0.05$ ($n=6$, t test)

hUC-MSCs 的分离培养目前多采用华通氏胶组织块法,华通氏胶是除去外膜、剔除两条动脉和一条静脉后,构成脐带的凝胶状物质,富含成纤维细胞,用华通氏胶培养出的细胞,经几次传代后, MSCs 细胞占 95% 以上。本研究采用华通氏胶组织块法成功培养出了 hUC-MSCs,传至第 3 代时, MSCs 的特性性表面抗原 CD90、CD105 和 CD166 阳性率都达到 96% 以上,表明本实验条件下,可成功培养出符合实验要求的 hUC-MSCs。

电磁辐射对 MSCs 的增殖影响与其物理参数密切相关,参数不同,效应亦有差异。Liu 等报道,1 mT, 10~50 Hz 的正弦电磁场 (Sinusoidal electromagnetic field, SEMFs) 暴露,可以促进 BMSCs 的增殖^[13]。该结果与 Song 等的报道结果一致^[14],但是,如果将 BMSCs 暴露于 380 MHz 的高频脉冲电磁场,结果显示,电磁辐射不仅不能促进细胞增殖,反而导致细胞凋亡明显增加^[15],同样,用 900 MHz RF-EMF 暴露 ADSCs,也发现暴露后细胞活力减弱,增殖受到抑制^[16]。本研究结果显示, hUC-MSCs 经 1950 MHz RF-EMF 每天暴露 1 h,连续暴露 7 d 后,无论是细胞增殖曲线、细胞周期分布,还是增殖相关蛋白 Ki67 的水平与对照组相比均无明显变化,提示,本条件下的电磁辐射对 hUC-MSCs 增殖无明显影响。

近年来, MSCs 在疾病治疗方面的应用潜力已经得到认可^[17-19]。据文献报道, MSCs 在治疗成骨不全、骨关节炎、骨质疏松等疾病方面具有较好的疗效^[20],但由于其体外定向分化问题尚未得到有效解决从而限制了其进一步应用。电磁场作为一种新的促进干细胞体外分化的手段^[21,22]开始受到人们关注。Kang 等^[23]报道,1 mT, 7.5 Hz 电磁场暴露可抑制人脂肪来源间充质干细胞 (Adipose-derived stem cells, ADSC) 暴露于向成骨方向分化,而 1 mT, 30/45 Hz 电磁场则可促进其向成骨方向分化。Ongaro 等^[24]发现,1.5 mT, 75 Hz 脉冲电磁场可促进人 BMSCs 和 ADSCs 均向成骨方向分化。周建等^[25]的研究结果也表明,50 Hz, 1.8 mT 正弦电磁场可促进 hUC-MSCs 向成骨方向分化,且暴露时间越长,效果越明显。上述研究表明,低频电磁场可能对 MSCs 的体外成骨分化具有较好的诱导效应。本实验研究结果

显示, hUC-MSCs 接受每天 1 h, 连续 7 d RF-EMF 暴露 (SAR 2.0 W/kg, 5 min 开, 10 min 关) 后,与 sham 组相比, RF 组 ALP 活性无显著变化,提示本实验条件下的 RF-EMF 不能诱导 hUC-MSCs 向成骨方向分化,此外 RF-EMF 对成骨诱导剂的诱导效应无显著影响。截止目前有关高频电磁场对 MSCs 成骨方向影响的研究较少,崔向荣等^[15]将大鼠 BMSCs 暴露于 380 MHz 的电磁场后,发现 BMSCs 的成骨分化并无明显变化,与本研究结果一致,提示,高频电磁场可能对 MSCs 的成骨方向分化无显著影响,今后该领域的研究应关注较低频段的电磁辐射。

参考文献 (References)

- Jansen J H, van der Jagt O P, Punt B J, et al. Stimulation of osteogenic differentiation in human osteoprogenitor cells by pulsed electromagnetic fields: an in vitro study [J]. BMC Musculoskelet Disord, 2010, 11: 188
- Lu Y, He M, Zhang Y, et al. Differential pro-inflammatory responses of astrocytes and microglia involve STAT3 activation in response to 1800 MHz radiofrequency fields[J]. PLoS One, 2014, 9(9): e108318
- Chen C, Ma Q, Liu C, et al. Exposure to 1800 MHz radiofrequency radiation impairs neurite outgrowth of embryonic neural stem cells[J]. Sci Rep, 2014, 4: 5103-5113
- Al-Serori H, Kundi M, Ferk F, et al. Evaluation of the potential of mobile phone specific electromagnetic fields (UMTS) to produce micronuclei in human glioblastoma cell lines[J]. Toxicol In Vitro, 2017, 40: 264-271
- He Q, Sun Y, Zong L, et al. Induction of Poly(ADP-ribose) Polymerase in Mouse Bone Marrow Stromal Cells Exposed to 900 MHz Radiofrequency Fields: Preliminary Observations [J]. Biomed Res Int, 2016, 2016: 4918691
- Abbuehl J P, Tatarova Z, Held W, et al. Long-Term Engraftment of Primary Bone Marrow Stromal Cells Repairs Niche Damage and Improves Hematopoietic Stem Cell Transplantation [J]. Cell Stem Cell, 2017, 21(2): 241-255
- 安广洲, 周艳, 苗霞, 等. 1950MHz 射频电磁场对 SRA01/04 细胞周期和凋亡的影响[J]. 现代生物医学进展, 2014, (01): 82-85
An Guang-zhou, Zhou Yan, Miao Xia, et al. Effects of 1950 MHz Radiofrequency Electromagnetic Fields on Cell Cycle and Apoptosis in SRA01/04 Cells [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2014, (01): 82-85
- 殷海斌, 田新, 杨春会, 等. 间充质干细胞的生物学特性及临床应用[J]. 中国组织工程研究, 2014, (14): 2282-2289
Yin Hai-bin, Tian Xin, Yang Chun-hui, et al. Mesenchymal stem cells: biological characteristics and clinical application. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2014, (14): 2282-2289
- Friedenstein A J, Chailakhyan R K, Gerasimov U V. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers[J]. Cell Tissue Kinet, 1987, 20(3): 263-272
- Owen M, Friedenstein A J. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors[J]. Ciba Found Symp, 1988, 136: 42-60
- Xu L, Liu Y, Sun Y, et al. Tissue source determines the differentiation potentials of mesenchymal stem cells: a comparative study of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue [J]. Stem Cell Res Ther, 2017, 8(1): 275

- [12] Li T, Xia M, Gao Y, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: an overview of their potential in cell-based therapy [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2015, 15(9): 1293-1306
- [13] 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[J]. *Bioelectromagnetics*, 2013, 34(6): 453-464
- [14] Song M Y, Yu J Z, Zhao D M, et al. The time-dependent manner of sinusoidal electromagnetic fields on rat bone marrow mesenchymal stem cells proliferation, differentiation, and mineralization [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2014, 69(1): 47-54
- [15] 崔向荣, 苏伟, 黄钊, 等. 高频脉冲电磁场对骨髓间充质干细胞增殖和成骨分化的影响 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011(10): 1715-1720
- Cui Xiang-rong, Su Wei, Huang Zhao, et al. Effects of high-frequency pulsed electromagnetic fields on the proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*, 2011 (10): 1715-1720
- [16] Shahbazi-Gahrouei D, Hashemi-Beni B, Ahmadi Z. Effects of RF-EMF Exposure from GSM Mobile Phones on Proliferation Rate of Human Adipose-derived Stem Cells: An In-vitro Study [J]. *J Biomed Phys Eng*, 2016, 6(4): 243-252
- [17] Wang H, Strange C, Nietert P J, et al. Autologous Mesenchymal Stem Cell and Islet Cotransplantation: Safety and Efficacy [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2017[Epub ahead of print]
- [18] Chelluboina B, Nalamolu K R, Mendez G G, et al. Mesenchymal Stem Cell Treatment Prevents Post-Stroke Dysregulation of Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 44(4): 1360-1369
- [19] Mohr A, Zwacka R. The future of mesenchymal stem cell-based therapeutic approaches for cancer - From cells to ghosts [J]. *Cancer Lett*, 2017, 414: 239-249
- [20] Saeed H, Ahsan M, Saleem Z, et al. Mesenchymal stem cells (MSCs) as skeletal therapeutics - an update[J]. *J Biomed Sci*, 2016, 23: 41
- [21] 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]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2015, 9(1): 31-40
- [22] Fu Y C, Lin C C, Chang J K, et al. A novel single pulsed electromagnetic field stimulates osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells and bone repair[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e91581
- [23] Kang K S, Hong J M, Kang J A, et al. Regulation of osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells by controlling electromagnetic field conditions[J]. *Exp Mol Med*, 2013, 45: e6
- [24] Ongaro A, Pellati A, Bagheri L, et al. Pulsed electromagnetic fields stimulate osteogenic differentiation in human bone marrow and adipose tissue derived mesenchymal stem cells[Z]. *Bioelectromagnetics*, 2014, 35: 426-436
- [25] 周建, 马小妮, 陈克明, 等. 电磁场不同处理时间对人脐带间充质干细胞增殖与分化的影响[J]. *解放军医药杂志*, 2015, (03): 11-15
- Zhou Jian, Ma Xiao-ni, Chen Ke-ming, et al. Effect of Electromagnetic Field in Different Treatment Time on Proliferation and Differentiation of Human Umbilical Cord of Mesenchyme Stem Cells in Vitro [J]. *Med & Pharm J Chin PLA*, 2015, (03): 11-15

(上接第 2204 页)

- [23] SA Tooze. The role of membrane proteins in mammalian autophagy [J]. *Seminars in cell & developmental biology*, 2010, 21(7): 677-682
- [24] K Wei, P Wang, CY Miao, et al. A Double-Edged Sword with Therapeutic Potential: An Updated Role of Autophagy in Ischemic Cerebral Injury[J]. *CNS neuroscience & therapeutics*, 2012, 18(11): 879-886
- [25] Li L, Khatibi NH, Hu Q, et al. Transmembrane protein 166 regulates autophagic and apoptotic activities following focal cerebral ischemic injury in rats[J]. *Experimental neurology*, 2012, 234(1): 181-190
- [26] Chang Y, Li Y, Hu J, et al. Adenovirus vector-mediated expression of TMEM166 inhibits human cancer cell growth by autophagy and apoptosis in vitro and in vivo[J]. *Cancer Lett*, 2013, 328(1): 126-134
- [27] Li M, Lu G, Hu J, et al. EVA1A/TMEM166 Regulates Embryonic Neurogenesis by Autophagy[J]. *Stem Cell Reports*, 2016, 6(3): 396-410
- [28] Tao M, Shi XY, Yuan CH, et al. Expression profile and potential roles of EVA1A in normal and neoplastic pancreatic tissues[J]. *Asian Pacific journal of cancer prevention*, 2015, 16(1): 373-376
- [29] EC Kim, H Meng, AS Jun, et al. Lithium treatment increases endothelial cell survival and autophagy in a mouse model of Fuchs endothelial corneal dystrophy [J]. *British Journal of Ophthalmology*, 2013, 97(8): 1068-1073
- [30] Li M, Lu G, Hu J, et al. EVA1A/TMEM166 Regulates Embryonic Neurogenesis by Autophagy [J]. *Stem Cell Reports*, 2016, 6 (3): 396-410
- [31] S Zhang, X Lin, G Li, et al. Knockout of Eva1a leads to rapid development of heart failure by impairing autophagy[J]. *Cell Death & Disease*, 2017, 8, e2586