

微电场对人脐带间充质干细胞增殖和成骨分化的影响

刘中¹, 李克威¹, 王敏², 刘文惠², 张蕾蕾², 郭松¹, 钱晖², 付强¹<https://doi.org/10.12307/2024.161>

投稿日期: 2023-03-27

采用日期: 2023-05-22

修回日期: 2023-06-28

在线日期: 2023-07-12

中图分类号:

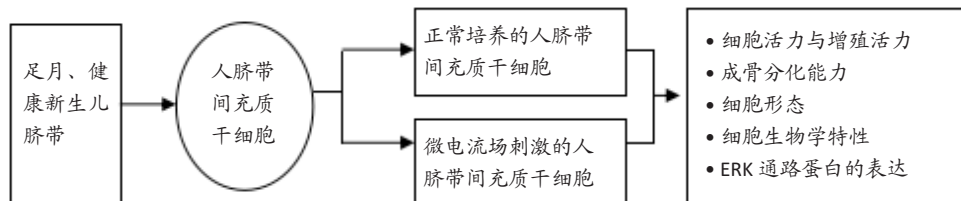
R459.9; R319; R329.2

文章编号:

2095-4344(2024)13-01983-06

文献标识码: A

文章快速阅读: 微电场促进人脐带间充质干细胞的增殖和成骨分化



文题释义:

人脐带间充质干细胞: 是从新生儿脐带中提取出来的干细胞, 具有较强的增殖能力、分化能力、自我更新能力以及合成并分泌一系列营养因子和细胞因子的能力, 具有供给丰富、收集过程无创, 低免疫原性、易于体外扩增、无伦理限制等诸多优势, 成为组织工程研究和再生医学的最佳来源干细胞之一。

微电场: 通过一种体外电刺激细胞装置, 调节刺激参数, 连接电源后可在细胞中形成一种微电场, 对细胞进行均匀而稳定的电刺激。

摘要

背景: 电刺激是一种可用于诱导细胞增殖、分化、凋亡等各种细胞活动的物理方法, 诱导干细胞成骨分化将有利于骨的再生。

目的: 观察微电场是否可以促进人脐带间充质干细胞的增殖与成骨分化。

方法: 从人新鲜脐带组织获取脐带间充质干细胞, 待细胞培养传代至第3代接种于6孔板内, 24 h后分别给予0, 50, 100 mV/mm微电场刺激, 刺激频率为每天1 h, 连续刺激3 d, 然后用显微镜观察细胞生长情况与形态变化, CCK-8和EdU染色法检测细胞的增殖情况, 茜素红染色检测细胞的成骨分化能力, Western blot检测ERK通路蛋白的表达水平。

结果与结论: ①50, 100 mV/mm组人脐带间充质干细胞的吸光度值和增殖细胞数目显著高于未刺激组($P < 0.05$); ②微电场刺激前后人脐带间充质干细胞均能诱导分化为骨细胞, 但50, 100 mV/mm组的成骨分化速度比未刺激组快; ③50, 100 mV/mm组的p-ERK1/2蛋白表达高于未刺激组, 且100 mV/mm组与未刺激组比较差异有显著性意义($P < 0.05$); ④微电场促进人脐带间充质干细胞增殖的机制可能是通过促进ERK的磷酸化实现的。

关键词: 微电场; 细胞增殖; 人脐带间充质干细胞; 细胞分化

Effects of micro-electric field on proliferation and osteogenic differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells

Liu Zhong¹, Li Kewei¹, Wang Min², Liu Wenhui², Zhang Leilei², Guo Song¹, Qian Hui², Fu Qiang¹¹Department of Orthopedics, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200080, China; ²School of Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, Jiangsu Province, China

Liu Zhong, Master candidate, Department of Orthopedics, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200080, China

Li Kewei, Master candidate, Department of Orthopedics, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200080, China
Liu Zhong and Li Kewei contributed equally to this article.**Corresponding author:** Fu Qiang, Chief physician, Associate professor, Doctoral supervisor, Department of Orthopedics, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200080, China**Co-corresponding author:** Qian Hui, Professor, Doctoral supervisor, School of Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, Jiangsu Province, China

Abstract

BACKGROUND: Electrical stimulation is a physical method that can be used to induce various cellular activities such as cell proliferation, differentiation, and apoptosis. The induction of osteogenic differentiation of stem cells will be beneficial in the field of bone regeneration.

¹上海交通大学医学院附属第一人民医院骨科, 上海市 200080; ²江苏大学医学院, 江苏省镇江市 212013

第一作者: 刘中, 男, 汉族, 上海交通大学医学院在读硕士, 主要从事干细胞及外泌体与脊髓损伤的基础研究。

共同第一作者: 李克威, 男, 汉族, 上海交通大学医学院在读硕士, 主要从事干细胞及外泌体与脊髓损伤的基础研究。

通讯作者: 付强, 主任医师, 副教授, 博士生导师, 上海交通大学医学院附属第一人民医院骨科, 上海市 200080

共同通讯作者: 钱晖, 教授, 博士生导师, 江苏大学医学院, 江苏省镇江市 212013

<https://orcid.org/0009-0005-2367-7465> (刘中); <https://orcid.org/0009-0005-3840-1621> (付强)

基金资助: 国家自然科学基金面上项目(81971154), 项目负责人: 付强

引用本文: 刘中, 李克威, 王敏, 刘文惠, 张蕾蕾, 郭松, 钱晖, 付强. 微电场对人脐带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, 2024, 28(13):1983-1988.



OBJECTIVE: To observe whether micro-current field can promote the proliferation and osteogenic differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells.

METHODS: The fresh human umbilical cord tissue was cut to obtain umbilical cord mesenchymal stem cells, which were inoculated into a 6-well plate after cell culture and passage to the third generation. After 24 hours, the cells were cultured under a stimulation of 0, 50, and 100 mV/mm micro-electric field, at a frequency of 1 hour per day for 3 continuous days. The growth and morphological changes of human umbilical cord mesenchymal stem cells were observed by a microscope. The cell proliferation was detected by CCK-8 assay and EdU staining. Alizarin red staining was used to detect the osteogenic differentiation ability of cells. Western blot assay was used to determine the expression of ERK signal pathway proteins.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) The optical density value and the number of proliferating cells in 50 and 100 mV/mm groups were significantly higher than those of the unstimulated group ($P < 0.05$). (2) Human umbilical cord mesenchymal stem cells could be induced to differentiate into osteocytes before and after micro-electric field stimulation, but the differentiation rate of 50 and 100 mV/mm groups was faster than that of unstimulated groups. (3) The protein expression of p-ERK1/2 in the 50 and 100 mV/mm groups was higher than that in the unstimulated group, and significant difference was detected between the 100 mV/mm group and the unstimulated group ($P < 0.05$). (4) Micro-electric field can promote the proliferation of human umbilical cord mesenchymal stem cells, and the mechanism may be achieved by promoting the phosphorylation of ERK.

Key words: micro-electric field; cell proliferation; human umbilical cord mesenchymal stem cell; cell differentiation

Funding: National Natural Science Foundation of China, No. 81971154 (to FQ)

How to cite this article: LIU Z, LI KW, WANG M, LIU WH, ZHANG LL, GUO S, QIAN H, FU Q. Effects of micro-electric field on proliferation and osteogenic differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2024;28(13):1983-1988.

0 引言 Introduction

人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hucMSCs)是一种从脐带组织中分离提取出来的干细胞,具有较强的增殖能力、分化能力和自我更新潜力^[1],近年越来越受到研究者们的关注。hucMSCs具有来源广泛、脐带收集过程中无痛无害、高细胞活力、低免疫原性、加速损伤组织修复过程的高旁分泌潜力以及没有伦理问题等优势,此外,由于其独特的基因表达谱,几乎不具有致瘤性^[2]。随着再生医学的不断发展,hucMSCs在组织损伤修复和组织工程领域应用具有光明的前景。

诱导 hucMSCs 成骨分化,将有利于骨的再生研究,对骨质疏松症和骨缺损等骨科疾病的治疗具有至关重要的意义。目前的研究中,促使干细胞向骨组织分化的方法主要为化学诱导法,但其存在细胞毒性大、诱导效率低、价格昂贵和难以大量生产等缺点,严重阻碍了干细胞的临床应用^[3]。因此,在体外培养 hucMSCs 的过程中,促进 hucMSCs 分化及提高其增殖能力,是目前亟待解决的难题。电刺激是已知的一种用于诱导细胞增殖、分化、凋亡等各种细胞活动的物理方法^[4],因为具备损伤小、便于实施、刺激参数易于控制、不牵涉机体免疫反应等特点,对于疾病的预防、延缓疾病进展和治疗均具有安全、方便和经济等优势^[5]。已有研究证实,电刺激可以影响成纤维细胞和软骨细胞的凋亡和增殖能力^[6-7]。目前关于微电场是否可以促进 hucMSCs 增殖与成骨分化,尚未有文献报道。ERK 信号通路是近年来研究细胞增殖方面较为热门的通路之一,抑制该信号通路能显著抑制电刺激诱导的细胞增殖^[8]。因此,该研究通过设置不同的微电场刺激参数,旨在探究微电场对 hucMSCs 增殖和成骨分化的影响,同时探究微电场诱导的 hucMSCs 增殖与 ERK 信号通路的关系。

1 材料和方法 Materials and methods

- 1.1 设计 从脐带组织分离培养出原代 hucMSCs,建立微电场刺激 hucMSCs 模型。多组间数据的比较采用方差分析。
- 1.2 时间及地点 实验于 2022 年 7-12 月在江苏省检验医学重点实验室完成。

1.3 材料

- 1.3.1 细胞 实验所用 hucMSCs 从新生儿脐带组织分离培养得到,实验方案得到江苏大学伦理委员会批准(伦理批件号 2020161)。
- 1.3.2 实验试剂和仪器 α -MEM 培养基(美国 Meilunbio 公司);青-链霉素(中国雷根公司);CCK-8 试剂(中国 Biosharp 公司);胎牛血清(美国 Gibco 公司);OriCell® 人间充质干细胞表面标记检测试剂盒、成骨诱导培养基、成脂诱导培养基(美国赛业生物公司);细胞培养箱(美国赛默飞公司);EdU 试剂盒(中国碧云天公司);多功能酶标仪(美国 Biotek 公司);流式细胞仪(美国 BD 公司)。

1.4 实验方法

- 1.4.1 hucMSCs 的分离与培养 经产妇知情同意,在剖宫产手术过程中收集新鲜的脐带组织样本,在 2 h 内无菌移送至实验室,然后于超净工作台中剔除脐带内动静脉,将脐带剪成 0.2 cm³ 左右的米粒大小,将这些组织小块均匀贴于小培养皿,加适量含体积分数 15% 胎牛血清的 α -MEM 培养基,放入培养箱中开始培养,3 d 更换一次新鲜的培养基,9-12 d 后用显微镜观察组织小块周围有无梭形类细胞爬出。待细胞增殖成漩涡状,细胞生长融合率达到 90%,轻柔剔去组织块,用胰酶消化至培养瓶中培养,获取第 1 代 hucMSCs,继续培养扩增。第 3-6 代细胞用于后续实验。

人脐带间充质干细胞的培养及鉴定	
细胞来源:	新生儿脐带组织
原代细胞培养方法:	组织块“剪贴换传”分离培养法
细胞培养基:	α -MEM 培养基
添加材料:	体积分数 15% 胎牛血清、1% 青-链霉素
原代培养时间:	每 3 d 换液 1 次,9-12 d 后可传代
细胞传代:	细胞生长密度达到 90% 时传代
细胞鉴定:	茜素红和油红 O 染色,鉴定其可被诱导为成骨细胞和脂肪细胞;流式细胞术表明其阳性表达 CD29 (99.38%)、CD105 (98.34%)、CD73 (99.24%),阴性表达 CD14 (0.87%)、CD11b (0.83%)、CD45(0.49%)
伦理学批准:	该实验获得江苏大学伦理委员会的批准(2020161)

1.4.2 流式细胞术检测 hucMSCs 表面抗原分子 将微电场刺激前及刺激后的第 3 代 hucMSCs 用胰酶消化, 制成细胞悬液, 随后用以下抗体孵育细胞 30 min: 纯化的抗人 CD105、CD29、CD73、CD14、CD11b 和 CD45 抗体, 然后用缓冲液洗涤细胞 2 次, 各加入二抗, 4 °C 孵育 30 min, 最后缓冲液洗涤细胞 2 次, 缓冲液重悬细胞后, 在 1 h 内尽快上机检测。

1.4.3 成骨诱导及茜素红染色鉴定 选取对数生长期的第 3 代 hucMSCs, 用胰酶进行消化, 接种于 0.1% 明胶提前包被的 6 孔板中, 每孔 18×10^4 个细胞, 置于细胞培养箱中培养。待 hucMSCs 生长密度达到 50%–70% 时, 加入成骨诱导分化培养基。成骨诱导分化 3 周后, 弃去板中培养基, PBS 洗 3 遍, 40 g/L 多聚甲醛室温固定细胞 40 min, 加入茜素红 S 染液, 室温条件下染色 5 min, PBS 洗 2 遍, 于显微镜下观察染色情况并拍照。

1.4.4 成脂诱导及油红 O 染色鉴定 选取对数生长期的第 3 代 hucMSCs, 用胰酶进行消化, 接种于 6 孔板中, 每孔 18×10^4 个细胞, 每孔加入 2 mL 含体积分数 10% 胎牛血清的 α -MEM 完全培养基, 置于细胞培养箱中培养, 直至细胞生长密度达到 100% 时, 加入成脂诱导培养基。诱导三四周后, 弃去板中培养基, PBS 洗 3 遍, 40 g/L 多聚甲醛室温固定细胞 40 min, 加入油红 O 染料工作液, 室温条件下染色 40 min, PBS 洗涤 3 遍, 于显微镜下观察染色情况并拍照。

1.4.5 微电场刺激装置 作者设计制作了一种体外电刺激 hucMSCs 装置, 该装置主要由 6 孔细胞培养板改装设计而成。通过在培养板开设有多个培养孔, 下层盖板设置于培养孔上方, 每个培养孔内部设有一对刺激电极, 刺激电极的正极和负极均为 L 型铂金电极。L 型铂金电极的垂直段向上与电路单元连接, L 型铂金电极的平行段放置于培养孔底部。各对刺激电极的正极并联连接, 各对刺激电极间的负极并联连接, 可使得每对刺激电极间形成闭合稳定的回路, 即整个电路分成了多个闭合电路, 从而实现电刺激干细胞培养装置内部电流及电场强度恒定。所述电路单元与外接电源连接, 刺激参数大小通过外接电源来调节。该设备使用前需要消毒, 先用体积分数 75% 乙醇浸泡 4 h, 用 PBS 冲洗后, 于紫外灯照射下过夜灭菌。

1.4.6 hucMSCs 分组与处理 细胞随机分为 3 组: 0, 50, 100 mV/mm 组。50, 100 mV/mm 组分别给予 50, 100 mV/mm 微电场刺激, 刺激频率为每天 1 h, 间隔 24 h 刺激 1 次, 连续 3 d。0 mV/mm 组插入电极, 但不通电。

1.4.7 CCK-8 法检测细胞活力 第 3–6 代 hucMSCs 接种于电刺激装置 6 孔板中, 每孔 20×10^4 个细胞, 培养 24 h 后施加 0, 50, 100 mV/mm 微电场刺激, 连续电刺激 3 d, 刺激完成后, 加入胰酶将刺激后的 hucMSCs 消化下来, 细胞计数, 接种于 96 孔板中, 每孔 3 000 个细胞, 置入培养箱中继续培养 24 h; 次日, 加入 CCK-8 溶液, 置入培养箱内孵育 2–4 h, 利用酶标仪检测波长 450 nm 处吸光度值。

1.4.8 EdU 染色法检测细胞增殖情况 取第 3–6 代 hucMSCs, 接种于电刺激装置 6 孔板中, 每孔 20×10^4 个细胞, 培养 24 h 后开始施加 0, 50, 100 mV/mm 微电场刺激, 连续电刺激 3 d。刺激完成后, 用 EdU 染色试剂盒中 10 μ mol/L EdU 标记 hucMSCs, 置入培养箱中孵育 2 h, 每孔加 2 mL 40 g/L 多聚甲醛室温固定 15 min, 加入 TritonX-100 破膜 30 min, 加入 Click 反应液, 室温条件下避光孵育 30 min, 加入 DAPI 进行染核 15 min, 最后将 6 孔板置于显微镜下观察并拍照。

1.4.9 茜素红染色法检测微电场刺激后 hucMSCs 成骨分化能力 取第 3–6 代 hucMSCs, 接种于电刺激装置 6 孔板中, 每孔 20×10^4 个细胞, 培养 24 h 后, 将 6 孔板孔内完全培养基吸出, 加入成骨诱导分化完全培养基, 开始不同强度微电场刺激, 刺激频率为每天 1 h, 连续 3 d。刺激完成后, 弃去板中培养基, PBS 洗 3 遍, 加入 40 g/L 多聚甲醛室温固定细胞 40 min, 最后加入茜素红 S 染液, 室温条件下染色 5 min, PBS 洗 2 遍, 于显微镜下观察染色情况并拍照。

1.4.10 Western blot 检测 ERK 蛋白表达 第 3–6 代 hucMSCs 接种于电刺激装置 6 孔板中, 每孔 20×10^4 个细胞, 培养 24 h 后施加 0, 50, 100 mV/mm 微电场刺激, 连续电刺激 3 d, 刺激结束后, 加入细胞裂解液, 涡旋振荡仪器上进行充分裂解, 随后 4 °C, 13 000 $\times$ g 离心 15 min, 吸取上清液转移至新的 EP 管中, 最后加入 1/3 体积的 loading buffer 试剂, 振荡混匀, 沸水浴煮 10 min, 得到蛋白样品, 然后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 350 mA 恒流电流模式转膜 2 h, 将 PVDF 膜置于 5% 脱脂牛奶中, 摇床上室温封闭 2 h, 按照分子质量进行裁膜, 4 °C 孵育一抗过夜, 一抗分别为 ERK (1 : 1 000)、p-ERK (1 : 1 000)、 β -actin (1 : 1 000), 次日回收一抗, TBST 洗涤 3 次, 然后在室温下与二抗 (1 : 2 000) 孵育 1 h, 最后用曝光仪检测目的蛋白表达情况。

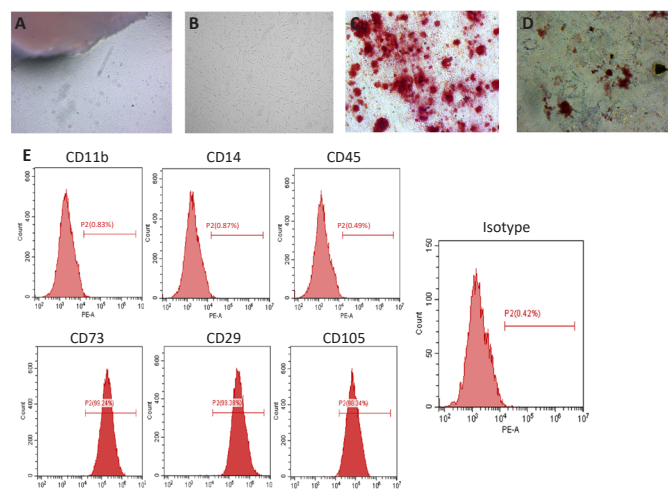
1.5 主要观察指标 ① hucMSCs 的鉴定结果; ②微电场刺激对 hucMSCs 活力与增殖的影响; ③微电场刺激对 hucMSCs 成骨分化的影响。

1.6 统计学分析 所有实验独立重复 3 次, 用 GraphPad Prism 9.0 软件进行数据分析, 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析或配对 t 检验进行统计学分析。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 hucMSCs 的培养与鉴定结果 原代 hucMSCs 一般会在 10–12 d 从脐带组织小块周围爬出, 可见细胞形态呈长梭形, 贴壁生长, 逐渐呈漩涡状, 见图 1A。当细胞密度达到 90% 时, 胰酶消化至小皿中进行培养扩增, 第 2 代 hucMSCs 形态, 见图 1B。成骨诱导 3 周, 茜素红染色结果呈阳性, 细胞内出现大小不等的红色钙结节, 见图 1C。成脂诱导三四周, 油红 O 染色呈阳性, 细胞内出现大小不等、形态不一的橘红色脂滴, 见图 1D。以上结果提示, hucMSCs 具备多向分化的潜能。利用流式细胞术检测其表面抗原分子, 结果

表明 hucMSCs 高表达抗原 CD73 (99.24%)、CD29 (99.38%)、CD105 (98.34%)，阴性表达抗原 CD14 (0.87%)、CD11b (0.83%)、CD45(0.49%)，见图 1E。以上结果，证明成功提取出原代 hucMSCs。



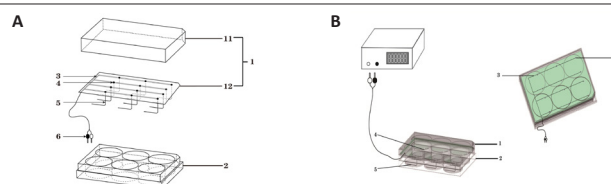
图注：图 A 为倒置显微镜观察组织块周围爬出的 hucMSCs($\times 100$)；B 为第 2 代 hucMSCs 形态特征($\times 40$)；C 为成骨诱导分化 3 周茜素红染色($\times 200$)；D 为成脂诱导分化 4 周油红 O 染色($\times 200$)；E 为流式细胞术检测 hucMSCs 表面标志分子的表达

图 1 | 人脐带间充质干细胞(hucMSCs)的培养与鉴定

Figure 1 | Culture and identification of human umbilical cord mesenchymal stem cells

2.2 体外电刺激模型构建 将刺激电极与实验室常用的细胞培养 6 孔板结合，同时可以将整个刺激装置放入细胞培养箱，不改变细胞的培养条件。电刺激干细胞培养装置见图 2，主要由以下部件组成：6 对 L 型铂金刺激电极，细胞培养 6 孔板底座，设有多个电路单元的盖板，电源连接线。6 孔板的盖子上设置有多个电路单元，每个电路单元连接一对刺激电极的正极和负极，通过各对刺激电极的正极并联连接，各对刺激电极间的负极并联连接，使得整个电路分成了 6 个稳定的闭合电路，从而避免其中任何一个电路的故障，影响其他电路，进而实现电刺激干细胞培养装置的内部电流及电场强度恒定，见图 2A。而且，为了避免电极腐蚀以及发生电化学反应对细胞产生毒性，经过多种电极的尝试，最终选择了铂金作为刺激电极。使用时，用装有电极的盖子盖住培养细胞的 6 孔板，确保电极完全淹没在培养基中，必要时可添加适当培养基，将此装置整体转移到细胞培养箱，并将其电线连接到电源上，在电源输出装置上设置合适的刺激参数，即可对 6 孔细胞培养板中的 hucMSCs 进行稳定的电刺激，见图 2B。

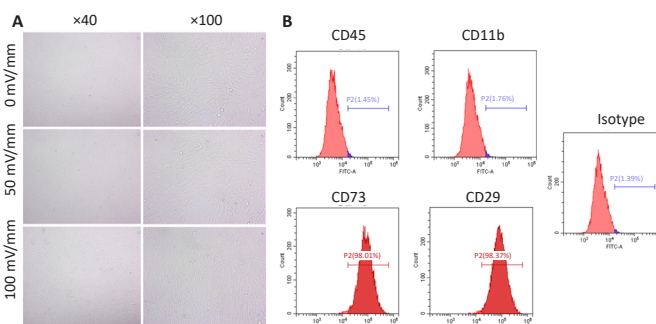
2.3 微电场对 hucMSCs 形态和细胞表面抗原表达的影响 与对照组相比，微电场作用 3 d 后，hucMSCs 的形态无明显变化，均呈梭形，见图 3A。通过流式细胞仪分析微电场作用 3 d 后 hucMSCs 的表面抗原表达：CD73(98.01%)、CD29(98.37%)、CD11b (1.76%)、CD45(1.45%)，见图 3B。以上结果表明，微电场作用后 hucMSCs 仍然具有干细胞的细胞形态和表型特征。



图注：图 A 为电刺激干细胞培养装置的分解示意图；B 为电刺激干细胞培养装置的立体图；符号说明：1 为盖体，12 为电路，11 为上层盖板，2 为培养板，3 为电路单元，4 为指示灯，5 为刺激电极，6 为电源输入接口

图 2 | 电刺激人脐带间充质干细胞培养装置示意图

Figure 2 | Schematic diagram of electric stimulation human umbilical cord mesenchymal stem cell culture device

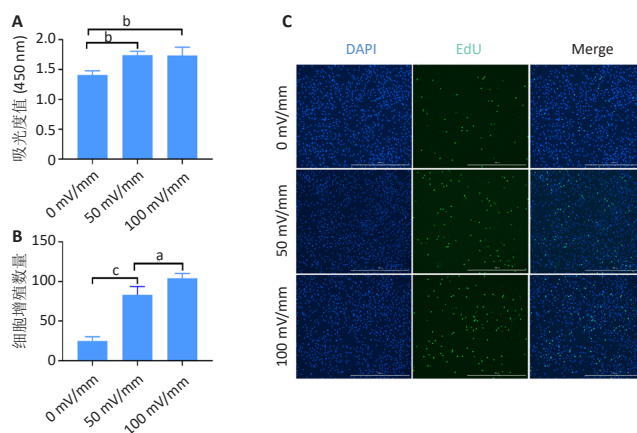


图注：图 A 为微电场作用后的细胞形态；B 为微电场作用后干细胞表面抗原分子的表达

图 3 | 微电场对人脐带间充质干细胞形态和干细胞表面抗原表达的影响

Figure 3 | Effects of micro-electric field on morphology and surface antigen expression of human umbilical cord mesenchymal stem cells

2.4 微电场可提高 hucMSCs 活力及促进增殖 采用 CCK-8 法检测微电场刺激后细胞活力，采用 EdU 染色法检测微电场刺激后对 hucMSCs 增殖的影响。CCK-8 结果显示，微电场刺激 3 d 后，50，100 mV/mm 组细胞的吸光度值显著高于未刺激组，差异有显著性意义 ($P < 0.05$)，见图 4A。EdU 染色结果也同样得到了类似的现象，见图 4B，C；50，100 mV/mm 组增殖的细胞数量显著高于 0 mV/mm 组，且 100 mV/mm 组细胞增殖更显著 ($P < 0.001$)。以上结果表明，微电场可提高 hucMSCs 的活力及促进增殖。



图注：图 A 为不同强度电刺激下细胞的吸光度值；B 为 EdU 染色结果定量分析；C 为 EdU 染色后各组代表图 (标尺=1 000 μm)。* $P < 0.05$ ，^b $P < 0.01$ ，^c $P < 0.001$

图 4 | 微电场对人脐带间充质干细胞活力与增殖的影响

Figure 4 | Effects of micro-electric field on viability and proliferation of human umbilical cord mesenchymal stem cells

2.5 微电场对 hucMSCs 成骨分化能力的影响 为了观察微电场刺激对 hucMSCs 成骨分化的影响,茜素红染色发现 50, 100 mV/mm 组均有圆形钙结节产生,且比 0 mV/mm 组更早出现典型的红色钙结节,见图 5。以上结果提示,微电场可以显著提高 hucMSCs 分化的速度,促进 hucMSCs 成骨分化。

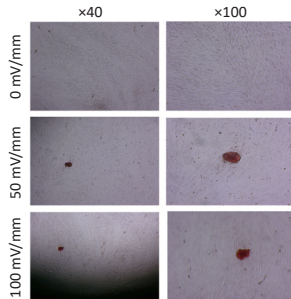
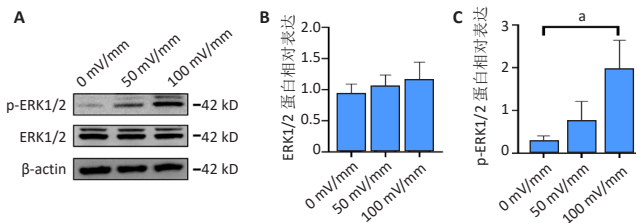


图 5 | 微电场对人脐带间充质干细胞成骨分化的影响 (茜素红染色)
Figure 5 | Effect of micro-electric field on osteogenic differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells (alizarin red staining)

2.6 微电场能够提高 ERK1/2 的磷酸化 Western blot 检测结果表明,各组 ERK1/2 蛋白无明显差异,但 50, 100 mV/mm 组 p-ERK1/2 的相对表达均高于 0 mV/mm,且 100 mV/mm 组与 0 mV/mm 组比较差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。以上结果提示,微电场可能通过促进 ERK1/2 的磷酸化,进而促进 hucMSCs 的增殖,ERK 信号通路在微电场刺激促进细胞增殖方面发挥重要作用,见图 6。



图注:图 A 为 Western blot 检测微电场作用前后 ERK 通路蛋白的表达;B 为 ERK1/2 蛋白表达定量分析结果;C 为 p-ERK1/2 蛋白表达定量分析结果。^a $P < 0.05$

图 6 | 微电场对人脐带间充质干细胞中 ERK 通路蛋白表达的影响
Figure 6 | Effects of micro-electric field on protein expression of ERK pathway in human umbilical cord mesenchymal stem cells

3 讨论 Discussion

hucMSCs 具有较强的增殖能力、分化能力和自我更新潜力,在再生医学领域的临床应用前景非常广阔。诱导 hucMSCs 的成骨分化将有利于骨的再生研究,对骨质疏松症和骨缺损等骨科疾病的治疗具有至关重要的意义。在体外培养 hucMSCs 的过程中,促进 hucMSCs 分化及提高其增殖能力,有利于 hucMSCs 的临床应用和转化。所以,探究微电场刺激对 hucMSCs 增殖及成骨分化的作用,对 hucMSCs 的转化有巨大的研究价值。该研究成功提取培养出原代 hucMSCs,研发生产了一种体外电刺激干细胞装置,进而建立电刺激 hucMSCs 模型,通过设置不同的微电场刺激参数,首次探究了微电场对 hucMSCs 增殖和分化的影响,同时第 1 次明确了微电场诱导的 hucMSCs 增殖与 ERK 信号通路的

关系。

由于微电场具备便于实施、刺激参数易于控制、不牵涉机体免疫反应、损伤小等特点,对于疾病的预防、延缓疾病进展和治疗均有方便、安全和经济等优势。目前研究表明,电活动在细胞生命过程中有着重要角色,它可以调控细胞分化、凋亡、增殖等各种细胞活动^[9-10]。在胚胎发育和创伤修复等许多生物学过程中,内源性电场都起到了不可或缺的作用。大量研究证实,电刺激可以明显促进肌肉、神经、皮肤创面、骨等组织的修复和再生^[11-15]。最近的研究表明,在干细胞成骨分化的早期阶段(前 7 d)应用电刺激足以诱导强烈、持续和持久的促成骨作用^[16-17]。有研究证实纳秒脉冲电场可以调节成肌细胞的增殖和分化^[18]。在该研究中,作者首次发现适宜的微电场刺激能够增加 hucMSCs 的细胞活力,促进 hucMSCs 增殖。研究结果显示,50 mV/mm 和 100 mV/mm 组增殖的细胞数量明显高于对照组,且 100 mV/mm 组 hucMSCs 增殖更明显。成骨诱导分化实验表明,50 mV/mm 和 100 mV/mm 组均有钙结节生成,且比对照组更早出现典型的红色钙结节,表明微电场作用不会改变 hucMSCs 的分化能力,但可以明显提高 hucMSCs 分化的速度,从而促进 hucMSCs 成骨分化。

该研究观察了微电场对 hucMSCs 形态和干细胞表面抗原表达的影响,结果发现,与对照组相比,50, 100 mV/mm 组 hucMSCs 的形态无明显变化,均能表达干细胞表面标志物,而且均能诱导分化成骨细胞。以上结果证明,微电场作用并不会改变 hucMSCs 的生物学特性。有研究报道直流电刺激不会改变脂肪间充质干细胞的干细胞生物学特性^[19-22]。此方面与前人的研究发现一致。

微电场是一种用于诱导各种细胞过程改变的常见物理方法,其诱导的细胞增殖多与某些信号通路的激活有关,如 PI3K 通路、ERK 通路、MAPK 通路等^[23-26]。有研究证实,电场刺激可以促进 ERK 的磷酸化,抑制 ERK 的激活能抑制电场刺激诱导的细胞增殖^[8]。以上研究说明,在电刺激促进细胞增殖中 ERK 通路有着重要作用。该研究验证了微电场刺激后 hucMSCs 中 ERK 通路蛋白的表达情况,结果发现,刺激组和未刺激组的 ERK1/2 蛋白表达无明显差异,但 50, 100 mV/mm 组 p-ERK1/2 的相对表达均高于未刺激组,值得注意的是,100 mV/mm 组与未刺激组比较差异有显著性意义。基于以上结果,微电场通过提高 ERK1/2 的磷酸化进而促进 hucMSCs 的增殖。该研究的不足之处是仅初步检测了 ERK 通路的变化,而未在微电场作用下采用 ERK 通路抑制剂来抑制 ERK 信号再检测细胞增殖变化,且微电场刺激促进 hucMSCs 增殖的具体分子机制还有待进一步的探讨。

综上所述,微电场可以促进 hucMSCs 增殖,其机制可能是通过促进 ERK 磷酸化实现的,且微电场不改变干细胞的生物学特性,可以促进 hucMSCs 成骨分化,给骨质疏松症和骨缺损等骨再生领域提供了新的方向,对临床应用 hucMSCs 诱导分化成骨具有重要意义。

作者贡献: 实验设计由第一作者及通讯作者完成, 实验实施由第一、二作者完成, 论文成稿由第一作者完成, 通讯作者负责论文修改。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范: 该文章撰写遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》; 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次文字和图表查重; 文章经小同行外审专家双盲审稿, 同行评议认为文章符合期刊发表宗旨。

4 参考文献 References

- [1] SHAIKH MS, SHAHZAD Z, TASH EA, et al. Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells: Current Literature and Role in Periodontal Regeneration. *Cells*. 2022;11(7):1168.
- [2] TROYER DL, WEISS ML. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells*. 2008;26:591-599.
- [3] 吕立, 史德志, 陈功, 等. 顺序性化学诱导促大鼠骨髓间充质干细胞向多巴胺能神经元分化 [J]. *南京医科大学学报 (自然科学版)*, 2010,30(5):621-625.
- [4] LOVE MR, PALEE S, CHATTIPAKORN SC, et al. Effects of electrical stimulation on cell proliferation and apoptosis. *J Cell Physiol*. 2018; 233(3):1860-1876.
- [5] ZUO KJ, GORDON T, CHAN KM, et al. Electrical stimulation to enhance peripheral nerve regeneration: Update in molecular investigations and clinical translation. *Exp Neurol*. 2020;332:113397.
- [6] WANG Y, ROUABHIA M, LAVERTU D, et al. Pulsed electrical stimulation modulates fibroblasts' behaviour through the Smad signalling pathway. *J Tissue Eng Regen Med*. 2017;11(4):1110-1121.
- [7] CHAO PH, ROY R, MAUCK RL, et al. Chondrocyte translocation response to direct current electric fields. *J Biomech Eng*. 2000;122(3):261-267.
- [8] LI L, ZHANG YM, QIAO WL, et al. Role of mitogen-activated protein kinases in the regulation of paraventricular nucleus to gastric ischemia-reperfusion injuries. *Chin Med J (Engl)*. 2007;120(12):1082-1087.
- [9] JUNG B, YANG C, LEE SH. Electroceutical and Bioelectric Therapy: Its Advantages and Limitations. *Clin Psychopharmacol Neurosci*. 2023; 21(1):19-31.
- [10] LIN BJ, TSAO SH, CHEN A, et al. Lipid rafts sense and direct electric field-induced migration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(32): 8568-8573.
- [11] ZEIGHAMI A, ALIZADEH F, SAVIZ M. Optimal currents for electrical stimulation of bone fracture repair: A computational analysis including variations in frequency, tissue properties, and fracture morphology. *Bioelectromagnetics*. 2019;40(2):128-135.
- [12] 耿康, 丁晓斌, 田新立, 等. 电刺激糖尿病模型大鼠创面的愈合及血管生成 [J]. *中国组织工程研究*, 2020,24(26):4152-4156.
- [13] ABEDIN-DO A, ZHANG Z, DOUVILLE Y, et al. Electrical stimulation promotes the wound-healing properties of diabetic human skin fibroblasts. *J Tissue Eng Regen Med*. 2022;16(7):643-652.
- [14] LAI BQ, ZENG X, HAN WT, et al. Stem cell-derived neuronal relay strategies and functional electrical stimulation for treatment of spinal cord injury. *Biomaterials*. 2021;279:121211.
- [15] FANG C, SUN J, QIAN J, et al. Oscillating field stimulation promotes neurogenesis of neural stem cells through miR-124/Tal1 axis to repair spinal cord injury in rats. *Neural Regen Res*. 2023;18(4):895-900.
- [16] 崔鑫涛, 张震宇. 影响骨髓间充质干细胞成骨能力的相关物理因素及机制 [J]. *中国组织工程研究*, 2020,24(31):5064-5070.
- [17] EISCHEN-LOGES M, OLIVEIRA KMC, BHAVSAR MB, et al. Pretreating mesenchymal stem cells with electrical stimulation causes sustained long-lasting pro-osteogenic effects. *PeerJ*. 2018;6:e4959.
- [18] VADLAMANI RA, NIE Y, DETWILER DA, et al. Nanosecond pulsed electric field induced proliferation and differentiation of osteoblasts and myoblasts. *J R Soc Interface*. 2019;16(155):20190079.
- [19] NUCCITELLI R, NUCCITELLI P, RAMLATCHAN S, et al. Imaging the electric field associated with mouse and human skin wounds. *Wound Repair Regen*. 2008;16(3):432-441.
- [20] 刘兰, 刘星可, 刘梦婷, 等. 直流电场对人脂肪间充质干细胞增殖和干细胞生物学特性的影响 [J]. *第三军医大学学报*, 2021,43(11): 1010-1017.
- [21] 张培根, 衡孝来, 解迪, 等. 电刺激联合神经营养素 3 可促进脊髓损伤大鼠内源性神经干细胞的增殖和分化 [J]. *中国组织工程研究*, 2020,24(7):1076-1082.
- [22] 柴江涛, 杨亚峰, 马腾, 等. 适宜电刺激促进脂肪干细胞向神经方向分化 [J]. *现代生物医学进展*, 2014,14(19):3626-3630.
- [23] CASARES D, ESCRIBÁ PV, ROSSELLÓ CA. Membrane Lipid Composition: Effect on Membrane and Organelle Structure, Function and Compartmentalization and Therapeutic Avenues. *Int J Mol Sci*. 2019; 20(9):2167.
- [24] TAI G, TAI M, ZHAO M. Electrically stimulated cell migration and its contribution to wound healing. *Burns Trauma*. 2018;6:20.
- [25] GENG K, WANG J, LIU P, et al. Electrical stimulation facilitates the angiogenesis of human umbilical vein endothelial cells through MAPK/ERK signaling pathway by stimulating FGF2 secretion. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2019;317(2):C277-C286.
- [26] WU H, DONG H, TANG Z, et al. Electrical stimulation of piezoelectric BaTiO₃ coated Ti6Al4V scaffolds promotes anti-inflammatory polarization of macrophages and bone repair via MAPK/JNK inhibition and OXPHOS activation. *Biomaterials*. 2023;293:121990.

(责任编辑: MZH, ZN, QY, ZM)