

· 基础研究 ·

## 静磁场连续曝磁对牙髓干细胞增殖和分化的影响

夏 阳<sup>1,2\*</sup>, 陈慧敏<sup>2</sup>, 胡姝颖<sup>2</sup>, 孙剑飞<sup>1</sup>, 郭 宇<sup>2</sup>, 贾 璐<sup>2</sup>

<sup>1</sup>东南大学江苏省生物材料与器件重点实验室, 江苏 南京 210009; <sup>2</sup>南京医科大学口腔疾病研究江苏省重点实验室, 江苏 南京 210029

[摘 要] 目的: 研究静磁场连续曝磁对牙髓干细胞增殖和分化的影响。方法: 搭建静磁场下细胞培养装置, 磁通强度(35±5)mT, 以常规培养的细胞为对照组。用扫描电镜检测磁场下与常规培养细胞的形态, 以CCK-8检测细胞的增殖情况, 同时检测细胞的碱性磷酸酶活性, 并进行茜素红染色以说明矿化物形成情况。结果: 扫描电镜显示, 磁性培养的细胞与常规培养的细胞在形态上没有显著差异; 磁场下与常规培养下的细胞增殖情况也没有差异; 但是磁场下细胞的碱性磷酸酶活性显著增高( $P < 0.05$ ), 且矿化物的形成也显著增多( $P < 0.05$ )。结论: 静磁场连续曝磁对牙髓干细胞的形态和增殖没有影响, 但促进了其成骨方向的分化。

[关键词] 静磁场; 牙髓干细胞; 增殖; 分化

[中图分类号] R783.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2020)02-191-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20200208

## Effects of continuous exposure to static magnetic field on the proliferation and differentiation of dental pulp stem cells

XIA Yang<sup>1,2\*</sup>, CHEN Huiming<sup>2</sup>, HU Shuying<sup>2</sup>, SUN Jianfei<sup>1</sup>, GUO Yu<sup>2</sup>, JIA Lu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Jiangsu Key Laboratory for Biomaterials and Devices, Southeast University, Nanjing 210009; <sup>2</sup>Jiangsu Key Laboratory of Oral Disease, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to observe the effects of continuous exposure to static magnetic field (SMF) on the proliferation and differentiation of dental pulp stem cells (DPSCs). **Methods:** The magnetic cell culture set was used with the flux intensity about (35 ± 5) mT. The normal cultured cells were used as control. The morphology of the cells was detected by scanning electron microscopy (SEM). The cell proliferation was detected by CCK-8, and the alkaline phosphatase activity (ALP) was also measured. Alizarin red staining (ARS) was used to detect the mineral synthesis. **Results:** There were no significant differences in SEM images and cell proliferation between magnetic cultured cells and normal cultured cells, but the ALP activity of magnetic cultured cells was significantly increased ( $P < 0.05$ ), and the mineralization formation of cells under magnetic culture was significantly more than that of normal cultured cells ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Continuous exposure to SMF neither changed the cell morphology nor the cell proliferation, but significantly promoted the differentiation of DPSCs.

[Key words] static magnetic field; dental pulp stem cells; proliferation; differentiation

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(02): 191-194]

[基金项目] 国家自然科学基金(81771044); 中国博士后基金(2015M571647); 江苏省博士后基金(1402044B); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(2018-87); 江苏省青年医学人才(QNRC2016853); 东南大学南京医科大学合作研究项目(2242018K3DN16)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: xiayang@njmu.edu.cn

牙髓干细胞(dental pulp stem cell, DPSC)具有来源丰富、采集方便、免疫原性低、无伦理争议等优点。该类细胞具有高度增殖能力、多向分化潜能及自我更新的生物学特性, 可以向成牙本质细胞、成骨细胞、脂肪细胞、神经细胞等方向分化。因此, DPSC在再生医学和组织工程修复中有着广泛的应

用前景<sup>[1]</sup>,探索其体外增殖和定向分化的条件是目前的研究热点之一。

磁场作为一种外加物理因子,对组成机体的各种类型细胞具有丰富的生物学效应<sup>[2]</sup>。近年来,磁场已被证实能广泛影响机体骨代谢,并越来越多地作为一种无创性生物物理手段运用在骨质疏松症的治疗中<sup>[3]</sup>。电磁场、脉冲磁场都被报道可以促进成骨类细胞的生长<sup>[4-5]</sup>,但静磁场对DPSC的作用国内未见有研究报道。

本实验通过搭建静磁场细胞培养装置,建立了静磁场下DPSC培养的实验模型,排除体内复杂生物环境因素的影响,研究静磁场刺激对DPSC增殖和分化的影响,为今后临床应用静磁场治疗骨缺损、促进骨修复提供理论基础和实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人DPSC美国马里兰大学牙学院Pro Xu Hockin惠赠)。DMEM培养基、胎牛血清、PBS(1×)、0.25%胰酶(GBICO公司,美国),CCK-8(Enzo Biochem公司,美国),碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)试剂盒(Wako Pure Chemical公司,日本),ALP染色试剂盒(Kit 86C, Sigma公司,美国),蛋白定量试剂盒Pierce BCA Protein Assay Kit(Thermo Fisher Scientific公司,美国)。扫描电镜(JSM-840, JEOL公司,日本),酶标仪(Max M5, Spectra公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 静磁场装置和磁通密度检测

采用钕铁硼( $\text{Nd}_2\text{Fe}_{14}\text{B}$ )永磁体阵列产生静磁场,本实验中使用的磁场培养装置如图1所示。将HT20特斯拉计(上海亨通磁电科技有限公司)探头平行于磁铁表面,测量每个磁场中间位置的磁场强度,为 $(35 \pm 5)\text{mT}$ 。

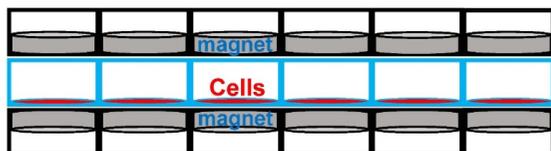


图1 细胞静磁场加载装置结构示意图

Figure 1 The schematic illustration of cell culture setting under static magnetic field

#### 1.2.2 实验分组

细胞增殖实验用完全培养基,细胞分化实验用骨向诱导培养基。分为以下两组:①TCPS NC组:细胞接种于孔板底,于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$ 、 $100\%$ 湿度孵箱中

培养;②TCPS Mag组:细胞接种于孔板底,持续暴露于如图1的静磁场细胞培养装置中,于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$ 、 $100\%$ 湿度孵箱中培养。

#### 1.2.3 细胞形态观察

将细胞于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$ 、 $100\%$ 湿度孵箱中培养4 d后,用PBS漂洗,再用1%的戊二醛固定,酒精梯度脱水,干燥并喷金,然后在扫描电镜下观察细胞形态。

#### 1.2.4 细胞增殖检测

细胞培养条件同前所述。在培养的1、4、7、14 d,每孔加入含10% CCK-8的培养基,在培养箱内孵育2 h后,从各孔中吸取液体加入96孔板中,于酶标仪上波长 $450\text{ nm}$ 测试吸光度值。

#### 1.2.5 ALP活性检测

细胞培养7 d后进行ALP染色。吸弃培养基,细胞用试剂盒提供的固定液固定1 min后加染液染色20 min,然后在显微镜下拍照。在细胞培养的4、7、14 d进行ALP活性检测。从孵箱中取出96孔板,用PBS漂洗3遍,每孔加入 $50\text{ }\mu\text{L}$  0.25% TritonX-100,置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵箱2 h后加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 反应底物,再置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵箱2 h,用酶标仪于波长 $405\text{ nm}$ 测吸光度。将测得的吸光度值除以蛋白定量检测值后进行统计分析,以排除不同细胞数对ALP值的影响。

#### 1.2.6 茜素红(Alizarin red staining, ARS)染色

细胞培养21 d后,进行钙结节茜素红染色和定量检测。用PBS清洗细胞后,使用1%福尔马林固定30 min,接着用2%茜素红染色45 min,然后再用PBS清洗,最后拍照。使用10%的氯化十六烷基吡啶溶液溶解矿化物,并在 $550\text{ nm}$ 下检测吸光度值。用实验组吸光度值除以对照组吸光度值得到实验组钙化物形成量的相对增加倍数。

### 1.3 统计学方法

所有定量数据均采用统计分析软件SPSS13.0进行独立样本 $t$ 检验,结果以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )的形式表示, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

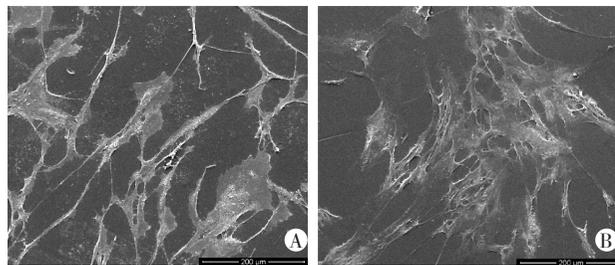
### 2.1 磁性培养对细胞形态的影响

用扫描电镜检测细胞常规培养和磁性培养4 d后的细胞形态,发现细胞已经完全铺展,呈现出典型的长梭形,常规培养组与磁性培养组的细胞形貌无显著差异(图2)。

### 2.2 磁性培养对细胞增殖的影响

在检测的4个时间点,细胞增殖情况在TPSC

NC组与TPSC Mag组之间均没有显著差异( $P > 0.05$ ,图3)。



A: 常规培养下的细胞形态; B: 磁性培养下的细胞形态。

图2 常规培养和磁性培养4 d后的细胞形态( $\times 500$ )

Figure 2 Cell morphology of 4 days after normal culture and magnetic culture( $\times 500$ )

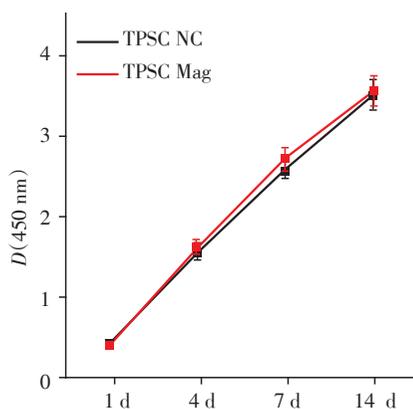


图3 细胞增殖情况的CCK-8检测

Figure 3 Cell proliferation results detected by CCK-8 test

### 2.3 磁性培养对细胞碱性磷酸酶活性的影响

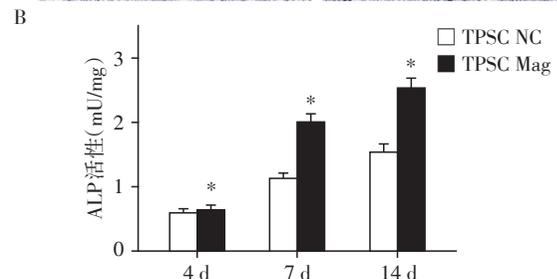
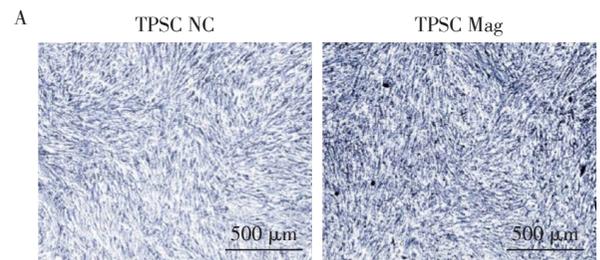
骨向诱导7 d后进行两组细胞的ALP染色,结果显示TPSC Mag组细胞的ALP染色比TPSC NC组染色显著加深(图4A)。同样,定量检测结果显示在7 d和14 d时TPSC Mag组的ALP与TPSC NC组相比有了显著提高( $P < 0.01$ ,图4B)。

### 2.4 磁性培养对细胞矿化物形成的影响

骨向诱导21 d后,检测两组中细胞的矿化结节形成量。ARS染色结果显示与TPSC NC组相比,磁性培养组内细胞的染色更深、矿化结节更厚(图5A)。定量检测结果显示TPSC Mag组的矿化结节形成量与TPSC NC组相比有了显著提高( $P < 0.01$ ,图5B)。

## 3 讨论

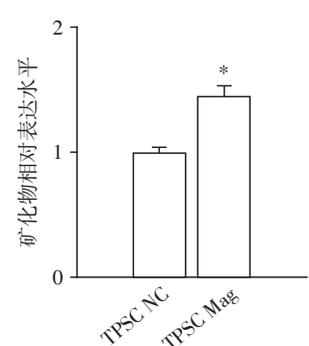
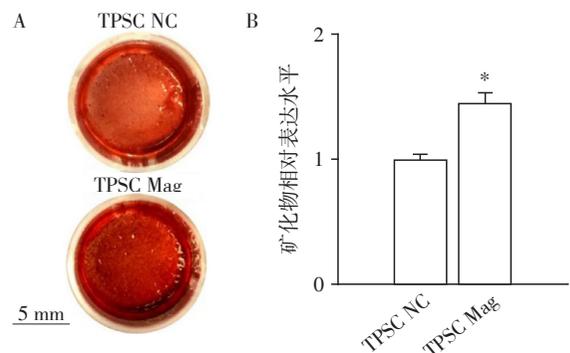
TPCS作为一种有潜力的组织工程骨修复种子细胞,目前尚存在分化方向不固定、分化效率偏低的问题<sup>[6-7]</sup>。因此,找到合适的诱导条件促进其向成



A: 7 d时细胞的ALP染色结果; B: 在4 d、7 d、14 d时的ALP定量检测结果。与TPSC NC组比较,  $P < 0.05$ 。

图4 碱性磷酸酶活性检测结果

Figure 4 Alkaline phosphatase activity results detected



A: 细胞培养21 d后茜素红染色结果; B: 矿化物定量检测。与TPSC NC组比较,  $P < 0.05$ 。

图5 茜素红染色检测矿化物形成

Figure 5 Mineral synthesis detected by Alizarin red staining(ARS)

骨方向分化、最终获得良好的骨修复效果,是目前亟待解决的重要问题。

静磁场作为一种物理干预因子,能从多方面调控成骨细胞活动,从而促进骨组织形成。已有文献报道,静磁场对成骨细胞、骨髓基质干细胞等成骨类细胞都可以发挥正向促进作用<sup>[8]</sup>。其可以促进骨髓基质干细胞向成骨细胞分化;可以影响成骨细胞骨架的改建和重组从而调控成骨;可以调节细胞因子,如促进细胞BMP-2的分泌,抑制TGF- $\beta 1$ 的表达;并且可以促进细胞早期合成细胞外基质。此外,还可以对破骨细胞产生负向抑制作用<sup>[9]</sup>。

目前国内尚无静磁场对TPSC成骨方向分化作用的报道。本研究搭建了一个简单的静磁场下细

胞培养的装置,检测其对TPSC增殖和骨向分化的作用效果。静磁场是一种稳恒磁场,其磁场的强度和方向保持恒定不变,作用的主要参数是磁场的强度和作用时间。仇丽鸿等<sup>[10]</sup>报道不同强度(42、62、83、108 mT)静磁场作用于大鼠成骨细胞24、48、72 h后,各组出现不同程度的细胞增殖加快和ALP活性增高。也有研究认为,静磁场对成骨细胞增殖无明显的促进和抑制作用<sup>[11]</sup>。本研究中采用连续曝磁,因此选用的静磁场强度更低一些,为(35±5) mT。结果发现在检测周期,即细胞接种后1~14 d,静磁场对细胞增殖没有产生显著影响,即既没有促进也没有抑制。在本研究中,通过扫描电镜检测了连续曝磁4 d后牙髓干细胞的形态,与常规培养的细胞相比,并没有检测到细胞形态上的变化。可能是扫描电镜无法检测到细胞微结构上的变化。因此,在进一步的实验中考虑进行透射电子显微镜检测。

但是本实验中检测到静磁场对TPSC骨向分化有显著促进作用,表现为ALP活性增强和矿化结节形成量的增加。ALP参与骨基质的分泌和成熟阶段的调节,是成骨细胞成熟、分化的早期标志酶,其表达随着细胞分化、功能的活跃而增强,代表着细胞分化的活跃程度<sup>[10]</sup>。矿化结节是成骨细胞分化成熟的标志。细胞在分化过程中会分泌大量钙质<sup>[12]</sup>,其中含大量磷酸钙沉淀。茜素红染色法是成骨细胞矿化结节染色的主要方法,它可将矿化结节染成深红色。

不同曝磁方式及曝磁环境均可影响磁场对细胞的效应。磁场间歇曝磁对细胞的增殖促进效应可能是通过加速细胞周期的进展及降低静息期细胞的比例而实现的<sup>[13]</sup>。连续曝磁的影响因素较间歇曝磁可能要相对简单一些。但是,其生物学效应还是磁场的各个参数与细胞共同作用的结果。因此本实验中静磁场对TPSC作用的确切机制还需要进一步的研究和探索。

#### [参考文献]

- [1] 夏阳,陈慧敏,胡妹颖,等. 联合应用栓和磷酸钙骨泥支架促进牙髓细胞的增殖和成骨的死[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2018,38(5):590-594
- [2] 吴江,胡立江,方志财,等. 应加强静磁场生物医学效应的基础及临床应用研究[J]. 生物医学工程学杂志,2013,30(1):176-190
- [3] JING D, SHEN G, HUANG J, et al. Circadian rhythm affects the preventive role of pulsed electromagnetic fields on ovariectomy - induced osteoporosis in rats [J]. Bone, 2010,46(2):487-495
- [4] WANG Q, WU W, HAN X, et al. Osteogenic differentiation of amniotic epithelial cells: synergism of pulsed electromagnetic field and biochemical stimuli [J]. BMC Musculoskelet Disord, 2014, 15: 271
- [5] KAI VOSOJA 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
- [6] FENG X, HUANG D, LU X, et al. Insulin-like growth factor 1 can promote proliferation and osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells via mTOR pathway [J]. Dev Growth Differ, 2014, 6(9):615-624
- [7] FAREA M, HUSEIN A, HALIM A S, et al. Synergistic effects of chitosan scaffold and TGFβ1 on the proliferation and osteogenic differentiation of dental pulp stem cells derived from human exfoliated deciduous teeth [J]. Arch Oral Biol, 2014, 59(12):1400-1411
- [8] CHUO W Y, MA T, SAITO T, et al. A Preliminary study of the effect of static magnetic field acting on rat bone marrow mesenchymal stem cells during osteogenic differentiation *in vitro* [J]. J Hard Tissue Biology, 2013, 22(2): 227-232
- [9] 周洋,曾融生. 静磁场促进成骨作用机制的研究进展 [J]. 中华口腔医学研究杂志, 2014, 8(5):430-432
- [10] 仇丽鸿,包扬,钟鸣,等. 静磁场对大鼠成骨细胞增殖分化功能的影响 [J]. 实用口腔医学杂志, 2005, 21 (5):606-609
- [11] 赵煜,李冰雁,巢永烈,等. 磁性附着体模拟静磁场对成骨细胞增殖活性和周期分布及凋亡率的影响 [J]. 华西口腔医学杂志, 2007, 25(5):437-440
- [12] 廖乃顺,李钻芳,林如辉,等. 比较3种形态学方法观察成骨细胞矿化结节的应用价值 [J]. 中国组织工程研究, 18(33):5266-5270
- [13] 周翠红,张小云,张宇,等. 不同强度静磁场间歇曝磁对骨髓间充质干细胞增殖及细胞周期的影响 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2014, 20(1):105-109, 114

[收稿日期] 2019-03-17