

·论著·

50 Hz 1 mT 脉冲电磁场对脐带间充质干细胞免疫调节能力的影响及其安全性评价

曹芳 张焕婷 刘强 杜利清 曹晓沧

300052, 天津医科大学总医院消化内科(曹芳、张焕婷、曹晓沧); 300192 天津, 北京协和医学院中国医学科学院放射医学研究所, 天津市放射医学与分子核医学重点实验室(刘强、杜利清)

通信作者: 曹晓沧, Email: doccaoxc@163.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2017.02.007

【摘要】目的 探讨 50 Hz 1 mT 脉冲电磁场(PEMF)对脐带间充质干细胞(MSC)免疫调节能力的影响及其安全性。**方法** 采用 50 Hz 1 mT PEMF 辐照脐带 MSC, MTT 法检测辐照后细胞活性的变化;实时荧光定量 PCR 法检测脐带 MSC 的环氧合酶 2(COX2)、IL-10、吲哚胺-2,3-双加氧酶(IDO)、肝细胞生长因子(HGF)和转化生长因子 β (TGF- β)等基因 mRNA 表达水平的改变;流式细胞仪检测 PEMF 对脐带 MSC 活性氧(ROS)水平、细胞凋亡和细胞周期的影响;单细胞凝胶电泳分析脐带 MSC DNA 损伤的情况。采用 SPSS19.0 软件,对各组间数据进行独立样本 *t* 检验分析。**结果** 50 Hz 1 mT PEMF 辐照可增强脐带 MSC 的细胞活性,其中每天辐照 4 h 组变化最为明显,差异有统计学意义($t=3.505$, $P<0.05$)。PEMF 辐照可促进 COX2、HGF、IDO 和 TGF- β 等免疫调节因子 mRNA 的表达,但变化不明显,差异无统计学意义($t=0.982\sim2.376$, 均 $P>0.05$),对于干扰素 γ (IFN- γ)激活的 MSC,PEMF 辐照可显著上调 COX2、HGF、IDO 和 TGF- β 的 mRNA 表达水平,差异有统计学意义($t=2.436\sim3.747$, 均 $P<0.05$)。50 Hz 1 mT PEMF 辐照对脐带 MSC 的 ROS 水平、DNA 损伤及细胞凋亡率、细胞周期无显著影响。**结论** 对于 IFN- γ 激活的 MSC,50 Hz 1 mT PEMF 可显著上调 COX2、HGF、IDO 和 TGF- β 的 mRNA 表达水平,从而增强脐带 MSC 的免疫调节能力。50 Hz 1 mT PEMF 对脐带 MSC 的 ROS 水平、细胞凋亡及 DNA 损伤无明显影响,此参数下的 PEMF 辐照对脐带 MSC 是安全的。

【关键词】 间质干细胞;辐射;脉冲电磁场;免疫调节

基金项目: 国家自然科学基金(31670859);协和青年基金和中央高校基本科研业务费专项资金(3332016100);中国医学科学院 & 北京协和医学院中央级公益性科研院所基本科研业务费(2016ZX310198, 2016RC310019);中国医学科学院放射医学研究所创新团队基金(1605)

Effect and safety evaluation of 50-Hz 1-mT pulsed electromagnetic field on the immunomodulation of human umbilical cord mesenchymal stem cells Cao Fang, Zhang Huanting, Du Liqing, Liu Qiang, Cao Xiaocang

Department of Gastroenterology and Hepatology, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China(Cao F, Zhang HT, Cao XC); Tianjin Key Laboratory of Radiation Medicine and Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China(Liu Q, Du LQ)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of 50-Hz, 1-mT pulsed electromagnetic field (PEMF) on the immunomodulation of human umbilical cord mesenchymal stem cells(MSCs) and to evaluate the safety of PEMF as a therapeutic strategy. **Methods** Changes in cell viability was observed via MTT. Real-time PCR was used to detect the expression levels of cyclooxygenase 2(COX2), indoleamine 2,3-dioxygenase(IDO), IL-10, hepatocyte growth factor(HGF), and transforming growth factor- β (TGF- β) in MSCs. To explore the safety of PEMF, a flow cytometry experiment was conducted to observe apoptosis and reactive oxygen species(ROS) level. DNA damage was detected via comet assay. Data were statistically analyzed via *t*-test with SPSS 19.0. $P<0.05$ was considered statistically significant. **Results** Cell viability increased, with the most obvious increase in 4 h/d($t=3.505$, $P<0.05$). In interferon- γ (INF- γ)-activated

MSC, the expression levels of immunomodulation factors improved after PEMF irradiation($t=2.436-3.747$, all $P<0.05$). Furthermore, PEMF did not induce cell apoptosis, ROS generation, and DNA damage.

Conclusion 50-Hz, 1-mT PEMF improves MSC immunomodulation and may not cause radiation injury.

【Key words】 Mesenchymal stem cell; Radiation; Pulsed electromagnetic field; Immunomodulation

Fund programs: National Natural Science Foundation of China(31670859); PUMC Youth Fund and the Fundamental Research Funds for the Central Universities(3332016100); Fundamental Research Funds for CAMS & PUMC(2016ZX310198, 2016RC310019); Research Funds for the Innovation Team of IRM-CAMS(1650)

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)是一类具有自我更新和多向分化能力的纤维细胞样成体干细胞,最初是由Friedenstein等^[1]在骨髓中发现的。目前,在骨髓外其他多种组织中也发现MSC,例如脐带、脂肪组织、胎盘等^[2],其中脐带来源的MSC具有增殖能力更强的特点,且其取材无创,细胞提取效率更高。大量研究证实,MSC通过分泌IL-10、转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)、吲哚胺-2,3-双加氧酶(indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO)和肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)等细胞调节因子或与免疫细胞直接接触调节机体固有免疫和适应性免疫能力^[3]。与免疫抑制药物相比,MSC的免疫调节能力使其成为一种不良反应小的生物免疫抑制剂,可以用于炎症性肠病、系统性红斑狼疮和全身性硬化症等自身免疫疾病的治疗^[4]。然而,MSC的免疫抑制功能需要大量细胞才能达到治疗作用,而回输大剂量的MSC可能会诱发急性肺栓塞、肝栓塞、肾栓塞、发热和皮疹等不良反应^[5]。因此,提高单个MSC的免疫调节能力对于提高细胞治疗效力、减少不良反应、降低治疗成本等临床应用具有重要意义。

电磁场作为一种理疗手段,具有镇痛、抗炎和促进血管新生等功效。大量临床试验和动物实验证实,电磁场辐射可改善非愈合性溃疡、陈旧性骨折和慢性炎症性疾病的预后,作为一种无创、安全、有效的治疗手段,电磁场已成功应用于多种临床疾病的治疗^[6],并且美国食品药品监督管理局已批准电磁场用于骨折等骨相关疾病的治疗^[7]。研究证实,频率低于100 Hz、磁通量小于3 mT的低频脉冲电磁场(pulsed electromagnetic field, PEMF)的治疗作用更为有效^[8]。近年来,已有学者开始探讨PEMF对MSC生物学效应的影响,但这些研究主

要集中在细胞增殖和分化能力方面,而PEMF对脐带MSC免疫调节能力的影响的研究尚未涉及。本研究中笔者探讨了PEMF对脐带来源MSC的免疫调节能力、DNA损伤及细胞凋亡等方面的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

DMEM/F-12培养基、RPMI 1640培养基、胎牛血清购自美国Gibco公司;MTT、活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒、细胞周期试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;干扰素 γ (interferon- γ , IFN- γ)购自美国Peprotech公司;脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)购自美国Sigma公司;PCR引物由上海生工生物工程股份有限公司合成;Trizol试剂购自美国Invitrogen公司;cDNA反转录试剂盒购自日本Takara公司;Eva Green荧光染料购自加拿大ABM公司;Annexin V-FITC/PI(其中,FITC为异硫氰酸荧光素;PI为碘化丙啶)细胞凋亡双染试剂盒购自美国BD公司。

1.2 细胞培养

脐带MSC、THP-1源性巨噬细胞由国家工程研究中心赠送。MSC用含10%胎牛血清的DMEM/F-12培养基培养,THP-1用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基培养,两种细胞均培养于37℃、5% CO₂细胞培养箱中。取第2~5代处于对数生长期的脐带MSC用于实验。

1.3 PEMF辐照

PEMF发生装置由天津大学材料学院与中国医学科学院放射医学研究所合作研制,磁场强度、频率及脉冲宽度均可调节,此装置采用双电源控制可使磁场强度更为均匀、稳定。参考文献报道,调节装置参数使PEMF的磁场稳定在50 Hz、1 mT,脉冲宽度设置为50%^[8,14]。将对数生长期脐带MSC置

于磁场强度区域内, 25℃环境中密闭培养。

1.4 MTT 实验

取对数生长期 MSC, 调整浓度至 4×10^4 个/mL, 以每孔 100 μ L 接种于 96 孔板, 每组设 12 个复孔。过夜后, 将 96 孔板密封并置于室温、50 Hz 1 mT PEMF 中每天分别辐照 3、4、5 h, 连续处理 3 d。PEMF 辐照后继续培养 24 h, 每孔加入 10 μ L 5×10^3 mg/L MTT, 37℃孵育 4 h, 吸弃培养液, 每孔加入 150 μ L 二甲基亚砷, 置摇床震荡 10 min 后, 于酶标仪 490 nm 波长下检测各孔光吸收值。对照组的处理除了不接受磁场辐照外, 其他均与实验组相同。

1.5 实时荧光定量 PCR 法检测

实验共分 4 组, 分别是空白对照组、PEMF 辐照组、IFN- γ 组以及 IFN- γ +PEMF 组。取对数生长期 MSC, 调整细胞浓度至 5×10^4 个/mL, 以每孔 2 mL 接种于六孔板。培养过夜后, 取 5 μ L 20 ng/ μ L IFN- γ 分别加入 IFN- γ 组和 IFN- γ +PEMF 组, 使其终浓度为 50 ng/mL。PEMF 辐照组和 IFN- γ +PEMF 组连续接受 PEMF 辐照 3 d, 每天 4 h。收集处理好的细胞, 用 Trizol 试剂提取总 RNA, 按照 cDNA 反转录试剂盒说明书操作反转录 mRNA 为 cDNA, 再用 Eva Green 荧光染料配置 20 μ L PCR 反应体系, 于实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Bio-rad 公司, Bio-rad CFX96 型) 上测定 MSC 细胞内环氧合酶 2 (cyclooxygenase 2, COX2)、IL-10、HGF、TGF- β 和 IDO 等基因的相对表达情况, 结果用荧光强度相对值表示, 每组设 3 个平行孔。

收集上述 IFN- γ 组和 IFN- γ +PEMF 组 MSC 的上清。取对数生长期 THP-1 细胞, 分别用含 50 ng/mL IFN- γ 的 DEMF/F-12 完全培养基、IFN- γ 组上清、IFN- γ +PEMF 组上清重悬细胞, 调整细胞浓度至 5×10^5 个/mL, 以每孔 2 mL 接种于六孔板, 并在各孔中加入 200 μ L 1 ng/ μ L LPS, 使其终浓度为 100 ng/mL。在 37℃、5%CO₂ 环境中培养 24 h 后, 收集 THP-1 细胞, 采用实时荧光定量 PCR 法检测 IL-1 β 和核因子 κ B (nuclear factor kappa B, NF- κ B) 基因相对表达情况, 结果用荧光强度相对值表示。

实时荧光定量 PCR 反应中所用引物见表 1。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Primers for real-time PCR

基因	上游引物序列	下游引物序列
COX2	5'TCCTTGCTGTTCCACCCATG3'	5'CATCATCAGACCAGGCACCAG3'
HGF	5'AGCAAGAAAACAATGCCTCTG3'	5'TGCGTCCTTTACCAATGATG3'
IL-10	5'GCCTTGCTCTGAGATGATCCAGTT3'	5'TCACATGCGCCTTGATGTCT3'
IDO	5'TTCAGTGCTTTGACGTCCTG3'	5'TGGAGGAAGTGAAGCAGCAT3'
TGF- β	5'CAAGGGCTACCATGCCAACT3'	5'AGGGCCAGGACCTTGCTG3'
IL-1 β	5'TGGCAATGAGGATGACTTGT3'	5'TGGTGTGCGGAGATTCTGA3'
NF- κ B	5'GGAGCACAGATACCAACAAGA3'	5'CGGCAGTCCTTTCTACAAAG3'
GAPDH	5'ACTTCAACAGCGACACCCACT3'	5'GCCAAATTCGTTGTCATACCAG3'

注: 表中, COX2: 环氧合酶 2; HGF: 肝细胞生长因子; IDO: 吡啶胺-2,3-双加氧酶; TGF- β : 转化生长因子 β ; NF- κ B: 核因子 κ B; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

1.6 流式细胞术检测

1.6.1 ROS

取对数生长期脐带 MSC, 以 1×10^5 的接种量接种于 T25 培养瓶中。培养过夜后, 将培养瓶密封并置于 PEMF 中每天辐照 4 h, 连续处理 3 d。收集细胞于 1.5 mL 离心管中, 无血清培养液清洗 2 遍后, 离心 (1000 \times g, 3 min) 并弃上清。按照 1:1000 比例用无血清培养液稀释 2', 7'-二氢二氯荧光黄双乙酸钠 (2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA), 使其终浓度为 10 μ mol/L, 每个样本中加入 1 mL DCFH-DA 使细胞悬浮, 于 37℃细胞培养箱内孵育 20 min, 并每隔 3~5 min 震荡混匀一次, 用无血清细胞培养液洗涤细胞 3 次, 以除去未进入细胞内的 DCFH-DA。染色结束后, 用流式细胞仪 (迈瑞公司, Bricyte E6 型) 检测细胞荧光强度。对照组的处理除了不接受磁场辐照外, 其他均与实验组相同。

1.6.2 细胞凋亡

取对数生长期脐带 MSC, 以 1×10^5 的接种量接种于六孔板中。培养过夜后, 将六孔板密封并置于 50 Hz 1 mT PEMF 中每天辐照 4 h, 连续处理 3 d。收集细胞, 并用预冷的 PBS 清洗 2 次, 离心 (1000 \times g, 5 min) 并弃上清。加入 300 μ L Binding Buffer 使细胞重悬, 然后加入 5 μ L 的 Annexin V-FITC 混匀后, 避光, 室温孵育 15 min, 上机前 5 min 再加入 5 μ L 的 PI 染色。染色结束后用流式细胞仪检测不同处理组细胞凋亡比例。

1.6.3 细胞周期

先将脐带 MSC 用血清饥饿法进行同步培养, 然后以 1×10^5 的接种量接种于 T25 培养瓶中。预培

养过夜后,将培养瓶密封并置于 50 Hz 1 mT PEMF 中每天辐照 4 h,分别连续处理 3 d 和 5 d。收集细胞于 1.5 mL 离心管中,并用 PBS 清洗 2 遍。70% 预冷乙醇固定 24 h 后,用 PBS 清洗 2 遍。离心 (1000×g, 3 min) 并弃上清,加入 0.5 mL 染色缓冲液、25 μ L PI 染色液、10 μ L RNase A 使细胞悬浮,37℃避光孵育 30 min 后,用流式细胞仪检测细胞周期。对照组的处理除了不接受磁场辐照外,其他均与实验组相同。

1.7 单细胞凝胶电泳实验

取对数生长期脐带 MSC,以 1×10^5 的接种量接种于六孔板中。培养过夜后,将六孔板密封并置于 50 Hz 1 mT PEMF 中每天辐照 4 h,连续处理 3 d。取 300 μ L 7.5% 正常熔点琼脂糖凝胶均匀铺于自制微电泳槽内,取 30 μ L 5×10^5 个/mL 细胞悬液与 70 μ L 7.5% 低熔点凝胶混匀后铺于第一层凝胶上面。微电泳槽置于碱性裂解液中于 4℃ 裂解 2.5 h,用双蒸水漂洗掉多余的盐分,于 4℃ 电泳液中解旋 20 min,然后在 30 V、40 mA 电泳条件下电泳 20 min。将微电泳槽置于 4℃ 中和液中中和 20 min。用 2 μ g/mL 溴化乙锭染色 10 s,超纯水漂洗后于荧光显微镜绿色激发光下观察并随机拍照,用 CASP 软件分析彗星尾长、尾距及尾部 DNA 百分含量。

1.8 统计学方法

采用 SPSS19.0 软件对数据进行统计学分析,原始数据均服从正态分布和方差齐性,组间比较采用独立样本 *t* 检验,数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 50 Hz 1 mT PEMF 辐照不同时间对脐带 MSC 活性的影响

探究不同辐照时间对脐带 MSC 活性的影响,可为后续实验选取合适的处理时间。由图 1 可见,与对照组相比,PEMF 辐照后脐带 MSC 活性增强,其中辐照 4 h 对细胞活性的促进作用最为明显,差异有统计学意义($t=3.505$, $P < 0.05$)。对照组细胞密封后置于培养箱外室温环境,3 h 组与 4 h 组细胞活性无明显变化,5 h 组细胞活性受到抑制;PEMF 辐照组细胞 4 h 组的细胞活性较 3 h 组升高,差异有统计学意义($t=3.325$, $P < 0.05$),而连续辐照 5 h 后细胞活性显著降低。

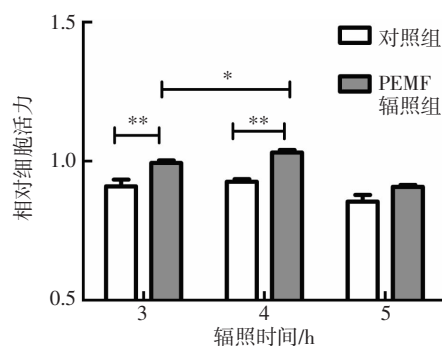


图1 50 Hz 1 mT PEMF 辐照不同时间对脐带 MSC 活性的影响($n=3$) 图中,* : PEMF 辐照组细胞 4 h 组与 3 h 组相比, $t=3.325$, $P < 0.05$; **: 与对照组相比, $t=2.662 \sim 3.505$, 均 $P < 0.01$; PEMF: 脉冲电磁场; MSC: 间充质干细胞。

Fig.1 Effect of 50-Hz, 1-mT PEMF on the viability of MSC

2.2 50 Hz 1 mT PEMF 对脐带 MSC 免疫相关因子 mRNA 表达水平的影响

探究 50 Hz 1 mT PEMF 辐照对脐带 MSC 自身免疫调节因子 mRNA 表达水平的影响,为 PEMF 增强脐带 MSC 免疫调节能力的后续研究和临床应用提供理论依据。由图 2 可见,PEMF 辐照可促进 COX2、HGF、IL-10、IDO 和 TGF- β 等免疫调节因子 mRNA 的表达,但差异无统计学意义($t=0.982 \sim 2.376$, $P > 0.05$);对于 IFN- γ 激活的脐带 MSC,PEMF 辐照可显著上调 COX2、HGF、IDO 和 TGF- β 等免疫调节因子 mRNA 表达水平,差异有统计学意义($t=2.436 \sim 3.747$, 均 $P < 0.05$)。上述结果表明,PEMF 辐照可促进 MSC 自身免疫调节因子表达,为进一步验证 PEMF 是否能增强 MSC 的抗炎能力,选择 THP-1 细胞进行验证。由图 3 可见,IFN- γ 激活的 MSC 经 PEMF 辐照后,其上清液可显著抑制炎性细胞 NF- κ B 炎性通路的激活,差异有统计学意义($t=3.804$, $P < 0.05$),而对炎性因子 IL-1 β 的抑制作用不明显。

2.3 50 Hz 1 mT PEMF 对脐带 MSC ROS 水平的影响

探究 50 Hz 1 mT PEMF 对脐带 MSC ROS 水平的影响,从而为 PEMF 临床应用的安全性提供理论依据。由图 4 可见,经 PEMF 辐照后,脐带 MSC ROS 水平没有显著变化,差异无统计学意义($t=0.241$, $P > 0.05$)。

2.4 50 Hz 1 mT PEMF 对脐带 MSC DNA 断裂的影响

探究 50 Hz 1 mT PEMF 对脐带 MSC DNA 的影响,为 PEMF 的安全性提供初步评估。单细胞凝胶电泳实验结果如图 5 所示,PEMF 辐照组细胞未出

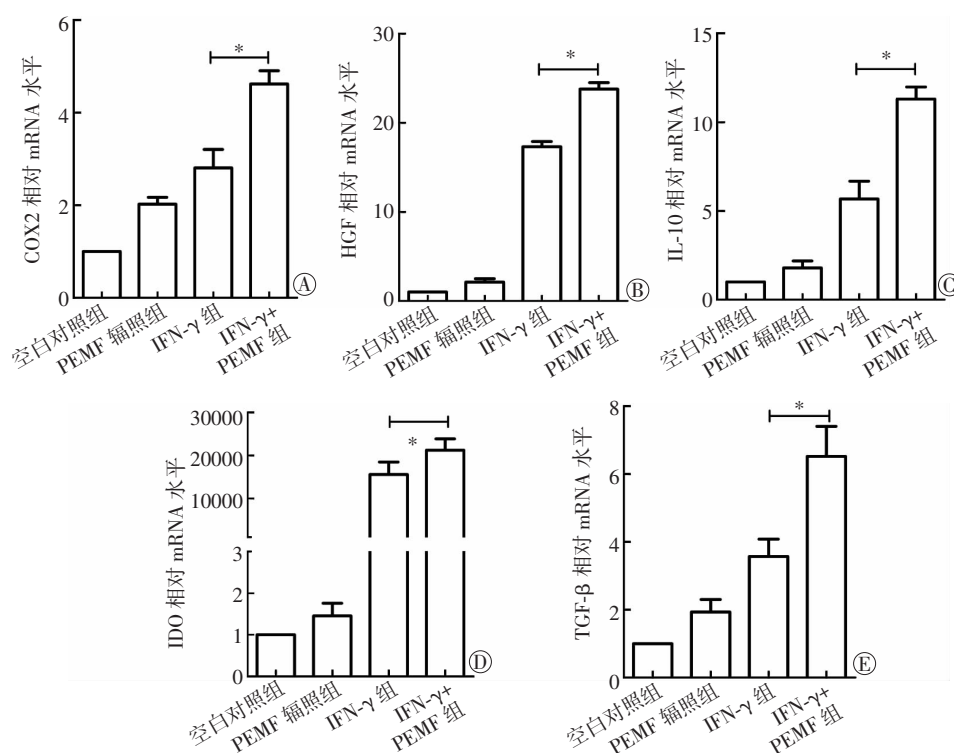


图2 50 Hz 1 mT PEMF 对脐带 MSC 免疫相关因子 mRNA 表达水平的影响($n=3$) 图中, *: IFN- γ 组与 IFN- γ +PEMF 组相比, $t=2.436\sim3.747$, 均 $P<0.05$; PEMF: 脉冲电磁场; MSC: 间充质干细胞; IFN- γ : 干扰素 γ ; COX2: 环氧合酶 2; HGF: 肝细胞生长因子; IDO: 吲哚胺-2,3-双加氧酶; TGF- β : 转化生长因子 β 。

Fig.2 Effect of 50-Hz, 1-mT PEMF on the expression levels of immunomodulatory factors

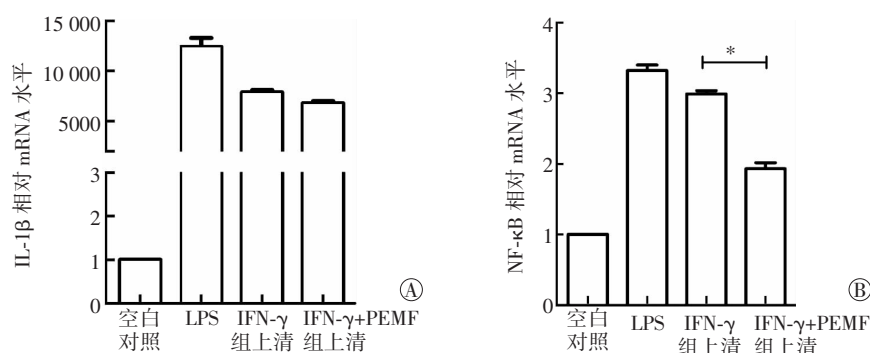


图3 50 Hz 1 mT PEMF 辐照提高脐带 MSC 抑制 THP-1 细胞炎症因子表达的能力($n=3$) 图中, *: IFN- γ 组与 IFN- γ +PEMF 组比较, $t=3.804$, $P<0.05$; PEMF: 脉冲电磁场; MSC: 间充质干细胞; LPS: 脂多糖; IFN- γ : 干扰素 γ ; NF- κ B: 核因子 κ B。

Fig.3 50-Hz, 1-mT PEMF inhibits inflammatory factors expression in THP-1 by improving the properties of umbilical cord MSC

现明显拖尾现象。CASP 软件定量分析结果如表 2 所示, PEMF 辐照组的尾部 DNA 含量、尾长和尾距与对照组相比无明显变化, 差异无统计学意义($t=0.386\sim0.632$, 均 $P>0.05$)。

2.5 50 Hz 1 mT PEMF 对脐带 MSC 凋亡的影响

探究 50 Hz 1 mT PEMF 对脐带 MSC 凋亡的影响, 为 PEMF 用于细胞治疗的可行性提供依据。由

图 6 可见, PEMF 辐照对脐带 MSC 凋亡没有明显影响。

2.6 50 Hz 1 mT PEMF 对脐带 MSC 周期的影响

探究经 50 Hz 1 mT PEMF 辐照后脐带 MSC 周期的变化, 明确 PEMF 辐照对脐带 MSC 增殖的影响。从图 7 可以看出, PEMF 连续辐照 3 d 对细胞周期没有明显影响, 连续辐照 5 d 后细胞周期亦无明显变化, 差异无统计学意义($t=0.382\sim0.721$, 均 $P>0.05$)。

3 讨论

电磁场疗法作为一种安全无侵入的理疗手段已广泛应用于骨关节炎、骨折、慢性炎症等疾病的治疗^[9-10]。最近, 有研究报道, 电磁场辐照可显著促进糖尿病患者足部溃疡的愈合^[11]。此外, 经颅电磁场刺激已被应用于脑损伤后康复、失眠及其他精神疾病的治疗中, 我国科学家利用 PEMF 刺激对平均吸毒十多年的海洛因成瘾者进行研究, 成功降低了其机体对药物的

渴求度^[12]。目前电磁场产生生物学效应的作用机制主要通过活化细胞膜相关受体或激活钙离子通道两种途径, 但具体机制还不甚明确。

MSC 是一种具有自我更新和多向分化能力的成体干细胞, 已成功用于再生医学中促进组织修复。此外, 大量研究报道 MSC 通过与免疫细胞直接接触或分泌可溶性免疫调节因子调节机体固有免

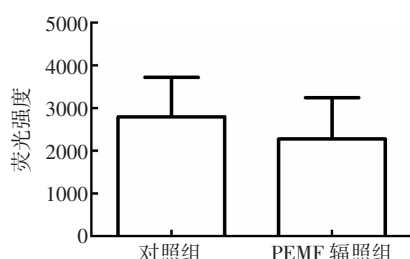


图4 50 Hz 1 mT PEMF 对脐带 MSC 活性氧水平的影响($n=3$)

图中, PEMF: 脉冲电磁场; MSC: 间充质干细胞。

Fig.4 Effect of 50-Hz, 1-mT PEMF on the intracellular reactive oxygen species level of MSC

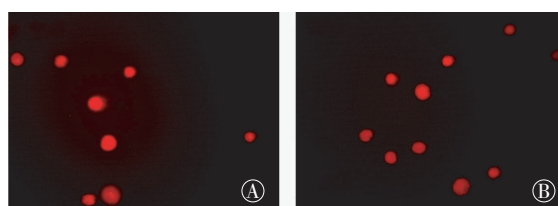


图5 单细胞凝胶电泳后脐带 MSC 显微镜下彗星图像(溴化乙锭染色, $\times 400$) 图中, A: 对照组; B: PEMF 辐照组; PEMF: 脉冲电磁场; MSC: 间充质干细胞。

Fig.5 Fluorescence microscopy images of umbilical cord MSC in single cell gel electrophoresis assay($\times 400$)

疫或适应性免疫能力, 从而促进慢性炎症性疾病(如克罗恩病、系统性红斑狼疮等)的有效缓解^[3]。

近来, 有研究着眼于探讨电磁场辐照对 MSC 生物学效应的影响。大量研究结果表明, 电磁场辐照能够促进 MSC 向骨细胞、软骨细胞及神经细胞等方向分化^[6, 13-14], 为电磁场疗法在再生医学方面的应用提供了理论依据。MSC 分泌多种免疫调节因子, 具有强大的免疫调节能力, 体外实验证实其免疫抑制能力呈数量依赖性^[15], 而回输大剂量的 MSC 可能会诱发急性肺栓塞、肝栓塞、肾栓塞、发热和皮疹等严重不良反应。因此, 提高单个 MSC 的免疫抑制能力对于提高细胞治疗效力、减少不良反应、降低治疗成本等临床应用具有重要意义。本研究发现, 对于 IFN- γ 激活的脐带 MSC, PEMF 辐照可显著上调 COX2、HGF、IDO 和 TGF- β 等免疫调节因子 mRNA 表达水平; IFN- γ 激活的脐带 MSC 经 PEMF 辐照后的上清液可显著抑制炎性细胞 NF- κ B 炎性通路的激活。

电磁场的窗效应是指只有特定频率与特定强度组合的电磁波才能产生相应的生物学效应。目前, 在科学研究和临床应用中所采用的电磁场参数仍没有统一规定, 并且关于电磁场生物学效应的大量前期研究结论不一。有研究证实, 频率低于 100 Hz、磁通量小于 3 mT 的低频

PEMF 的生物学效应更为显著^[8]。也有学者认为最有效的电磁场频率范围应接近机体正常功能活动频

表2 单细胞凝胶电泳分析 50 Hz 1 mT PEMF 辐照对 MSC DNA 损伤的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 2 Effect of PEMF on DNA damage by comet assay($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	计数细胞数/个	尾部 DNA 含量/%	尾长/ μ m	尾距/ μ m
对照组	150	0.89 \pm 0.035	3.67 \pm 0.49	0.0436 \pm 0.004
PEMF 辐照组	150	0.66 \pm 0.014 ^a	3.27 \pm 0.59 ^a	0.2367 \pm 0.005 ^a

注: 表中, ^a: 与对照组比较, $t=0.386\sim 0.632$, 均 $P>0.05$; PEMF: 脉冲电磁场; MSC: 间充质干细胞。

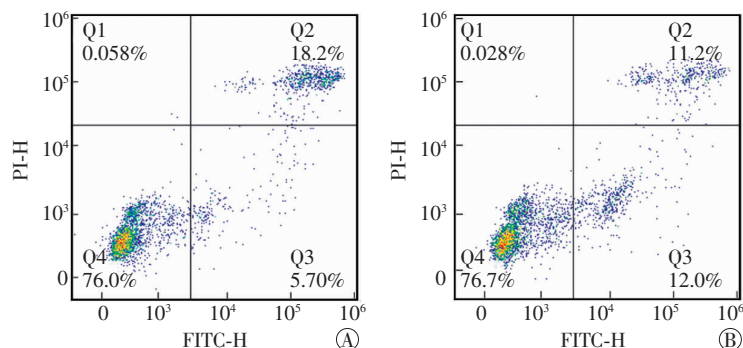


图6 50 Hz 1 mT PEMF 对脐带 MSC 凋亡的影响 图中, A: 对照组; B: PEMF 辐照组; FITC: 异硫氰酸荧光素; PI: 碘化丙啶; PEMF: 脉冲电磁场; MSC: 间充质干细胞。

Fig.6 Effect of 50-Hz, 1-mT PEMF on the apoptosis of umbilical cord MSC

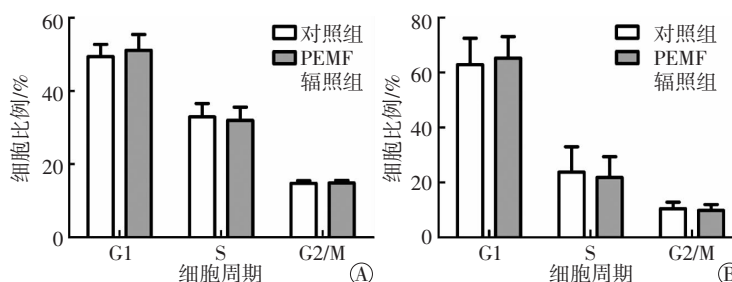


图7 50 Hz 1 mT PEMF 辐照 3 d、5 d 对脐带 MSC 周期的影响($n=3$) 图中, A: 辐照 3 d; B: 辐照 5 d; PEMF: 脉冲电磁场; MSC: 间充质干细胞。

Fig.7 Effect of 50-Hz, 1-mT PEMF on the cell cycle of umbilical cord MSC after 3 or 5 days of radiation

率,并且许多研究报道已证实50 Hz 1 mT PEMF 的有效性^[3]。因此,本研究参考上述文献报道采用了50 Hz 1 mT PEMF,研究结果表明,脐带 MSC 接受不同时间电磁场辐照后细胞活性均有所升高,其中每天辐照4 h 组变化最为明显。

MSC 通过分泌 IL-10、前列腺素 E2(prostaglandin E2, PGE2)、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、IDO、HGF 和人类白细胞抗原 G5(human leucocyte antigen-G5, HLA-G5)等细胞因子调节免疫细胞功能进而改变组织的炎性环境^[16]。除拮抗免疫细胞促炎作用外, MSC 通过分泌 IDO、iNOS 和 HLA-G5 抑制效应 T 细胞增殖;分泌 PGE2、IL-10、HGF、TGF- β 1 等抑制树突状细胞成熟;分泌 PGE2、HLA-G5、TGF- β 1 和 IDO 抑制自然杀伤细胞介导的细胞毒作用并抑制自然杀伤细胞的增殖^[18-21]。此外, MSC 分泌的 HLA-G5 和 PGE2 可促进调节性 T 细胞增殖^[22-23]。近来,有文献报道 MSC 分泌的 PGE2 和 TGF- β 1 可抑制肥大细胞活化^[24-25]。本研究结果表明,对于静止状态的脐带 MSC, PEMF 辐照对 COX2、HGF、IDO 和 TGF- β 等免疫调节因子 mRNA 的表达没有明显影响;而对于炎性因子激活的脐带 MSC, PEMF 辐照可显著上调上述免疫调节因子 mRNA 的表达。有文献报道,对于静止状态的 MSC,其上清液没有明显免疫抑制作用,而对于与淋巴细胞共培养的 MSC,其上清液有明显的免疫调节作用,并提出 MSC 免疫调节因子的表达需要炎性细胞介导的观点^[8]。综合本研究结果,文献中所提及的 MSC 免疫调节因子表达需要炎性细胞介导可能是与炎性细胞所分泌的 IFN- γ 等炎性因子有关。IFN- γ 激活的 MSC 经 PEMF 辐照后的上清液可显著抑制炎性细胞 NF- κ B 炎性通路的激活,进一步证明了 PEMF 可增强脐带 MSC 的抗炎能力。

有学者发现,电磁场辐照与白血病、乳腺癌等恶性肿瘤的高发病率有关^[25],并提出其致癌作用可能与 ROS 生成导致 DNA 断裂有关^[17]。本研究旨在探索提高脐带 MSC 免疫调节能力的方法,前提需保证安全性、可行性,为此我们检测了 PEMF 对 MSC ROS 水平、DNA 损伤及细胞凋亡的影响。研究结果表明,50 Hz 1 mT PEMF 对脐带 MSC ROS 水平、DNA 损伤及细胞凋亡无明显影响。50 Hz 1 mT PEMF 能量相对较低,且本研究并未采用全天连续

电磁场辐照的方法,这可能是与前期文献报道结果不一致的原因所在。

电磁场辐照促进骨折、溃疡、手术伤口愈合,与其促进细胞增殖作用有关,且多项研究表明其促进细胞增殖的机制可能与 MAPK/ERK 信号通路有关^[27]。但本研究结果显示,PEMF 对脐带 MSC 周期没有显著影响,间接表明 50 Hz 1 mT PEMF 对脐带 MSC 没有明显的促进增殖的作用。研究结果的不同说明磁场辐照对不同组织来源的细胞可能产生不同的生物学效应,因此在磁场的应用中还要考虑到细胞、组织的种类和特征。

本研究结果初步验证了 50 Hz 1 mT PEMF 辐照可增强脐带 MSC 的免疫调节能力,并且对细胞 ROS 水平、细胞凋亡率及 DNA 损伤无明显影响,为其临床应用的安全性评价提供了理论依据。本研究仅探究了脐带 MSC 免疫调节因子在 mRNA 水平的变化,后续研究还需探讨其免疫调节因子在分泌水平的变化,以及通过体内实验验证 PEMF 对脐带 MSC 免疫调节能力的影响;在安全性方面,本研究仅验证了 PEMF 单独辐照 MSC 时并未引起细胞损害,但未对 INF- γ +PEMF 组的安全性进行评价。此外,目前认为电磁场产生生物学效应的作用机制主要是通过活化细胞膜相关受体或激活钙离子通道两种途径,具体机制还不甚明确,后续研究还需对其作用机制进行进一步探讨。

利益冲突 本研究由署名作者按以下贡献声明独立开展,不涉及任何利益冲突。

作者贡献声明 曹芳负责实验设计、现场实验、数据分析及论文撰写;张焕婷负责现场实验;刘强负责命题的提出、实验设计和论文审阅;杜利清负责实验设计;曹晓沧负责命题的提出和论文审阅。

参 考 文 献

- [1] Friedenstien AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs[J]. Exp Hematol, 1976, 4(5): 267-274.
- [2] Chamberlain G, Fox J, Ashton B, et al. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing[J]. Stem Cells, 2007, 25(11): 2739-2749. DOI: 10.1634/stemcells.2007-0197.
- [3] Munir H, McGettrick HM. Mesenchymal stem cell therapy for autoimmune disease: risks and rewards[J]. Stem Cells Dev, 2015, 24(18): 2091-2100. DOI: 10.1089/scd.2015.0008.
- [4] Cras A, Farge D, Carmoi T, et al. Update on mesenchymal stem cell-based therapy in lupus and scleroderma[J/OL]. Arthritis Res

- Ther, 2015, 17: 301[2017-01-09]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4631077>. DOI: 10.1186/s13075-015-0819-7.
- [5] Furlani D, Ugurlucan M, Ong L, et al. Is the intravascular administration of mesenchymal stem cells safe? Mesenchymal stem cells and intravital microscopy[J]. *Microvasc Res*, 2009, 77(3): 370-376. DOI: 10.1016/j.mvr.2009.02.001.
- [6] Ferroni L, Tocco I, De Pieri A, et al. Pulsed magnetic therapy increases osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells only if they are pre-committed[J/OL]. *Life Sci*, 2016, 152: 44-51 [2017-01-09]. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320516301709>. DOI: 10.1016/j.lfs.2016.03.020.
- [7] Boyette MY, Herrera-Soto JA. Treatment of delayed and nonunited fractures and osteotomies with pulsed electromagnetic field in children and adolescents[J/OL]. *Orthopedics*, 2012, 35(7): e1051-e1055[2017-01-09]. <http://m2.wyanokedn.com/868f60c9e861-91479086696703af8552.pdf>. DOI: 10.3928/01477447-20120621-20.
- [8] Saliev T, Mustapova Z, Kulsharova G, et al. Therapeutic potential of electromagnetic fields for tissue engineering and wound healing[J]. *Cell Prolif*, 2014, 47(6): 485-493. DOI: 10.1111/cpr.12142.
- [9] Fu YC, Lin CC, Chang JK, et al. A novel single pulsed electromagnetic field stimulates osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells and bone repair[J/OL]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e91581[2017-01-09]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0091581>. DOI: 10.1371/journal.pone.0091581.
- [10] Negm A, Lorbergs A, Macintyre NJ. Efficacy of low frequency pulsed subsensory threshold electrical stimulation vs placebo on pain and physical function in People with knee osteoarthritis: systematic review with meta-analysis[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2013, 21(9): 1281-1289. DOI: 10.1016/j.joca.2013.06.015.
- [11] Abbruzzese L, Iacopi E, Coppelli A, et al. Safety and effectiveness of therapeutic magnetic resonance in the management of postsurgical lesion of the diabetic foot[J]. *Int J Low Extrem Wounds*, 2015, 14(1): 4-10. DOI: 10.1177/1534734614568374.
- [12] Shen Y, Cao X, Tan T, et al. 10-Hz repetitive transcranial magnetic stimulation of the left dorsolateral prefrontal cortex reduces heroin cue craving in long-term addicts[J/OL]. *Biol Psychiatry*, 2016, 80(3): e13-e14[2017-01-09]. [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006-3223\(16\)00093-7](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006-3223(16)00093-7). DOI: 10.1016/j.biopsych.2016.02.006.
- [13] Wang J, Tang N, Xiao Q, et al. Pulsed electromagnetic field May accelerate in vitro endochondral ossification[J]. *Bioelectromagnetics*, 2015, 36(1): 35-44. DOI: 10.1002/bem.21882.
- [14] Kim HJ, Jung J, Park JH, et al. Extremely low-frequency electromagnetic fields induce neural differentiation in bone marrow derived mesenchymal stem cells[J]. *Exp Biol Med*, 2013, 238(8): 923-931. DOI: 10.1177/1535370213497173.
- [15] Shu J, He X, Zhang L, et al. Human amnion mesenchymal cells inhibit lipopolysaccharide-induced TNF- α and IL-1 β production in THP-1 cells[J/OL]. *Biol Res*, 2015, 48: 69[2017-01-09]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4690291>. DOI: 10.1186/s40659-015-0062-3.
- [16] Wolf FI, Torsello A, Tedesco B, et al. 50-Hz extremely low frequency electromagnetic fields enhance cell proliferation and DNA damage: possible involvement of a redox mechanism[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1743(1-2): 120-129. DOI: 10.1016/j.bbamer.2004.09.005.
- [17] Yagi H, Soto-Gutierrez A, Parekkadan B, et al. Mesenchymal stem cells: Mechanisms of immunomodulation and homing[J]. *Cell Transplant*, 2010, 19(6): 667-679. DOI: 10.3727/096368910X508762.
- [18] Spaggiari GM, Abdelrazik H, Becchetti F, et al. MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2[J]. *Blood*, 2009, 113(26): 6576-6583. DOI: 10.1182/blood-2009-02-203943.
- [19] Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, et al. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2, 3-dioxygenase and prostaglandin E2[J]. *Blood*, 2008, 111(3): 1327-1333. DOI: 10.1182/blood-2007-02-074997.
- [20] Meisel R, Brockers S, Heseler K, et al. Human but not murine multipotent mesenchymal stromal cells exhibit broad-spectrum antimicrobial effector function mediated by indoleamine 2, 3-dioxygenase[J]. *Leukemia*, 2011, 25(4): 648-654. DOI: 10.1038/leu.2010.310.
- [21] Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells[J]. *Blood*, 2007, 110(10): 3499-3506. DOI: 10.1182/blood-2007-02-069716.
- [22] Hsu WT, Lin CH, Chiang BL, et al. Prostaglandin E2 potentiates mesenchymal stem cell-induced IL-10⁺IFN- γ ⁺CD4⁺ regulatory T cells to control transplant arteriosclerosis[J]. *J Immunol*, 2013, 190(5): 2372-2380. DOI: 10.4049/jimmunol.1202996.
- [23] Selmani Z, Naji A, Zidi I, et al. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells[J]. *Stem Cells*, 2008, 26(1): 212-222. DOI: 10.1634/stemcells.2007-0554.
- [24] Brown JM, Nemeth K, Kushnir-Sukhov NM, et al. Bone marrow stromal cells inhibit mast cell function via a COX2-dependent mechanism[J]. *Clin Exp Allergy*, 2011, 41(4): 526-534. DOI: 10.1111/j.1365-2222.2010.03685.x.
- [25] Kim HS, Yun JW, Shin TH, et al. Human umbilical cord blood mesenchymal stem cell-derived PGE2 and TGF- β 1 alleviate atopic dermatitis by reducing mast cell degranulation[J]. *Stem Cells*, 2015, 33(4): 1254-1266. DOI: 10.1002/stem.1913.
- [26] Jian W, Wei Z, Zhiqiang C, et al. X-ray-induced apoptosis of BEL-7402 cell line enhanced by extremely low frequency electromagnetic field in vitro[J]. *Bioelectromagnetics*, 2009, 30(2): 163-165. DOI: 10.1002/bem.20461.
- [27] 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[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2014, 69(1): 47-54. DOI: 10.1007/s12013-013-9764-8.