

# 白细胞介素-1 $\beta$ 和电磁场对大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化的影响

韦盛 杨勇 赵东明 刘朝旭 吴华

**【摘要】** 目的 研究白细胞介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )和低频电磁场对大鼠骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)成骨分化的影响。方法 取第三代大鼠BMSCs置于6孔板培养并随机分为4组:对照组、IL-1 $\beta$ 组、电磁场组和IL-1 $\beta$ +电磁场组。IL-1 $\beta$ 组和IL-1 $\beta$ +电磁场组在每次换新鲜培养基时加入1 ng/ml IL-1 $\beta$ ,电磁场组和IL-1 $\beta$ +电磁场组每天给予15 Hz/1 mT的低频正弦波电磁场刺激4 h。培养3 d后提取RNA和蛋白质,用实时定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、骨桥蛋白(osteopontin, OPN)及Runt相关转录因子2(runt-related transcription factor 2, Runx2)的mRNA表达。Western blotting检测Runx2和OPN的蛋白表达。培养7 d后检测ALP、OPN及Runx2的mRNA表达。另取两组细胞,分别加入1 ng/ml的IL-1 $\beta$ ,1 ng/ml的IL-1 $\beta$ +抑制剂SB203580后,给予15 Hz/1 mT的低频正弦波电磁场刺激并分别于0、5、15、30、60及120 min提取蛋白质,用Western blotting检测磷酸化p38的蛋白表达。结果 培养3 d后,IL-1 $\beta$ 组、电磁场组和IL-1 $\beta$ +电磁场组中ALP、OPN的mRNA的表达量与对照组相比均有明显增高,差异均有统计学意义( $P$ 均 $<0.05$ )。与对照组相比,电磁场组和IL-1 $\beta$ +电磁场组中Runx2的mRNA的表达量明显升高,差异均有统计学意义( $P$ 均 $<0.05$ )。与对照组相比,IL-1 $\beta$ 组、电磁场组和IL-1 $\beta$ +电磁场组中OPN、Runx2蛋白的表达量均明显增高。培养7 d后,与对照组相比,IL-1 $\beta$ 组和IL-1 $\beta$ +电磁场组中ALP的mRNA表达均降低,在电磁场组则升高( $P$  $<0.05$ );IL-1 $\beta$ 组、电磁场组和IL-1 $\beta$ +电磁场组中OPN的mRNA表达与对照组相比均增高( $P$ 均 $<0.05$ );Runx2的基因的表达量在IL-1 $\beta$ 组及IL-1 $\beta$ +电磁场组较对照组均降低,差异均有统计学意义( $P$ 均 $<0.05$ )。磷酸化的p38在第30、60、120 min时的蛋白质表达较0 min时升高( $P$  $<0.05$ ),使用p38抑制剂SB203580后磷酸化的p38表达无明显变化。结论 IL-1 $\beta$ 和电磁场可以在早期促进大鼠BMSCs的ALP、OPN、Runx2的表达,IL-1 $\beta$ 和电磁场可以激活磷酸化的p38。

**【关键词】** 白细胞介素-1 $\beta$ ;电磁场;骨髓间充质干细胞;成骨分化

**Effects of interleukin-1 $\beta$  on osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells under electromagnetic fields stimulation.** WEI Sheng, YANG Yong, ZHAO Dong-ming, LIU Chao-xu, WU Hua. Department of Orthopaedics, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Corresponding author: WU Hua, E-mail: wuhua360@aliyun.com; LIU Chao-xu, E-mail: liu.chaoxu@tjh.tjmu.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To study the effects of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and low frequency electromagnetic fields on the osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells *in vitro*. **Methods** The rat bone mesenchymal stem cells (BMSCs) of third passage were cultured in the six-well plate and randomly divided into four groups: the control group, the IL-1 $\beta$  group, the electromagnetic fields stimulation (EMF) group, and the IL-1 $\beta$ +EMF group. 1 ng/ml of IL-1 $\beta$  was added into the IL-1 $\beta$  group and the IL-1 $\beta$ +EMF group when each replacement of the fresh culture medium. The EMF group and the IL-1 $\beta$ +EMF group were treated with the low frequency sinusoidal EMF for 4 h per day. Cells were harvested on the 3rd and 7th day. Real-time PCR was used to detect the mRNA expression of alkaline phosphatase (ALP), osteopontin (OPN), and runt-related transcription factor 2 (Runx2). The expression of OPN and Runx2 proteins was detected by Western blotting.

DOI:10.3969/j.issn.1674-8573.2019.04.015

基金项目:国家自然科学基金(51537004)

作者单位:华中科技大学同济医学院附属同济医院骨科,武汉 430030

通信作者:吴华, E-mail: wuhua360@aliyun.com;刘朝旭, E-mail: liu.chaoxu@tjh.tjmu.edu.cn

Two groups of cells were selected, one group was treated with 1 ng/ml IL-1 $\beta$ , and the other with 1 ng/ml IL-1 $\beta$  and SB203580, then 15 Hz/1mT the low frequency sinusoidal EMF was given and the proteins were extracted separately at 0, 5, 15, 30, 60 and 120 min. Western blotting was used to detect the phosphorylated p38 protein expression. **Results** After 3 days of culture, the mRNA expression levels of ALP and OPN significantly increased in IL-1 $\beta$  group, EMF group and IL-1 $\beta$ +EMF group as compared with those in the control group (all  $P < 0.05$ ). The mRNA expression of Runx2 was significantly increased in EMF group and IL-1 $\beta$ +EMF group as compared with the control group ( $P < 0.05$ ). The protein expression of OPN and Runx2 were increased in IL-1 $\beta$  group, EMF group and IL-1 $\beta$ +EMF group as compare with the control group (all  $P < 0.05$ ). After 7 days of culture, the mRNA expression of ALP was significantly decreased in IL-1 $\beta$  group and IL-1 $\beta$ +EMF group, but increased in EMF group ( $P < 0.05$ ). The mRNA expression levels of OPN increased in IL-1 $\beta$  group, EMF group and IL-1 $\beta$ +EMF group as compared with the control group ( $P < 0.05$ ). The mRNA expression levels of Runx2 were decreased in IL-1 $\beta$  group and IL-1 $\beta$ +EMF group as compared with the control group ( $P < 0.05$ ). The expression of phosphorylated p38 protein was increased at 30, 60, and 120 min after treatment with IL-1 $\beta$  stimulation+EMF as compared with that at 0 min. There was no significant difference in the expression of phosphorylated p38 protein after treatment with SB203580. **Conclusion** IL-1 $\beta$  and EMF increased the expression of ALP, OPN, and Runx2 in rat BMSCs in the early stage. Phosphorylated p38 proteins could be activated by IL-1 $\beta$  and EMF.

**【Key words】** Interleukin - 1 $\beta$ ; Electromagnetic fields; Bone mesenchymal stem cells; Osteogenic differentiation

骨折后骨骼修复愈合是一个很复杂的过程,包括早期的炎症反应期、修复期和骨痂形成期。早期的炎症反应从血管损伤出血形成血肿开始,局部聚集大量炎症细胞和成纤维细胞。血肿中富含可向多系分化的间充质前体细胞。巨噬细胞产生大量细胞因子和生长因子,促进细胞汇聚到损伤部位而促进细胞的分化、胶原合成和血管生成,其中包括肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF- $\alpha$ ),白细胞介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )及其他炎症因子。由巨噬细胞生成的IL-1 $\beta$ 可促进IL-6、前列腺素和其他继发性的促炎症信号因子的释放,同时促进新鲜的血管生成和软骨形成。IL-1 $\beta$ 可以通过多种信号通路途径参与多种细胞的损伤、炎症反应、免疫调节等活动,是炎症反应中极为重要的一个因素<sup>[1]</sup>。

同时电磁场刺激既可以促进骨折愈合,也能加速软组织损伤的恢复,具体的作用效果跟电磁场的波形、场强、频率、刺激持续时间及其他外界干预条件,如:培养基类型等,都有密切关系<sup>[2]</sup>。骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)具有多系分化的能力,在特定的电磁场刺激和外界干预作用下BMSCs可以向成骨、成软骨或成脂肪分化<sup>[3]</sup>。

电磁场刺激能阻碍IL-1 $\beta$ 对间充质干细胞软骨生成的抑制作用<sup>[4]</sup>,但对于间充质干细胞在电磁场和IL-1 $\beta$ 影响下的成骨分化作用仍需进一步研究。IL-1 $\beta$ 能单独激活对成骨分化有重要作用的p38、ERK1/2和JNK1/2信号通路,它也可以和TNF- $\alpha$ 一起激活p38和ERK1/2而降低BMP-2诱发的Runt相关

转录因子2(runt-related transcription factor 2, Runx2)表达<sup>[5]</sup>。

本研究旨在探讨IL-1 $\beta$ 和电磁场对大鼠BMSCs的成骨分化的作用,为电磁场在促进骨折恢复的临床应用提供更多理论依据。

## 材料与方法

### 一、主要试剂和仪器

DMEM-F12培养基、胎牛血清、胰蛋白酶、成骨诱导培养基(Gibco,美国);Trizol试剂盒、逆转录试剂盒(Invitrogen,美国);IL-1 $\beta$ (Peprotech,美国);RIPA裂解液(博士德,中国);Runx2、骨桥蛋白(osteopontin, OPN)、GAPDH和p38磷酸化抗体(Abcam,英国);电磁场仪器由中国海军工程大学制造提供。本实验使用的电磁场类型为正弦交变电磁场,磁场参数:磁感应强度1 mT,频率50 Hz,每天刺激时间为4 h;5%二氧化碳培养箱(Thermo Forma,美国);台式水平离心机(Heal Force,中国);实时定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪,Gel Doc<sup>TM</sup>XR+凝胶成像系统(BIO-RAD,美国);酶标仪(Bio Tek,美国)。

### 二、大鼠间充质干细胞的获取及培养

取100 g左右的雄性大鼠(由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供)断颈法处死后获得其股骨和胫骨,用注射器吸取培养基冲洗出骨髓后吹打成细胞悬液种植到25 cm<sup>2</sup>无菌培养瓶,细胞长至90%左右铺满瓶底时用0.25%胰酶消化细胞并按1:2比例传代。第三代细胞按约1 $\times$ 10<sup>5</sup>个/ml的密度种

植到6孔板,随机分为4组:对照组、IL-1 $\beta$ 组、电磁场组和IL-1 $\beta$ +电磁场组。IL-1 $\beta$ 组及IL-1 $\beta$ +电磁场组每次换新鲜培养基时每孔加入1 ng/ml的IL-1 $\beta$ ,电磁场组和IL-1 $\beta$ +电磁场组每天用电磁场刺激4 h。隔天更换新鲜成骨诱导培养基。另外取3块未分组的6孔板培养细胞隔天换液待细胞长至90%左右铺满瓶底时提取蛋白质。

### 三、荧光定量PCR检测基因的表达

用成骨诱导培养基培养3 d后,每孔加入1 ml Trizol 提取总RNA,按照逆转录试剂盒说明书操作,将mRNA 逆转录成cDNA,应用SYBR Green 荧光染料技术行荧光定量PCR,检测碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、OPN、Runx2的基因表达。相关指标的引物设计见表1。反应条件:95  $^{\circ}$ C变性5 s, 55  $^{\circ}$ C退火15 s, 72  $^{\circ}$ C延伸10 s,一共40个循环。用同样方法分析经过7 d培养刺激后ALP、OPN、Runx2的mRNA 基因表达。用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行相对定量计算。

### 四、Western blotting 分析

用成骨诱导培养基培养3 d后,收获利用RIPA提取的总蛋白,于垂直电泳槽中进行SDS-PAGE电泳。转膜后加OPN一抗、二抗孵育,底物化学发光ECL显色后,Gel Doc<sup>TM</sup>XR+成像系统曝光后进行分析同样方法检测Runx2蛋白的表达情况。另取两组细胞,分别加入1 ng/ml的IL-1 $\beta$ ,1 ng/ml的IL-1 $\beta$ +抑制剂SB203580后,给予15 Hz/1 mT的低频正弦波电磁场刺激并分别于0、5、15、30、60及120 min提取蛋白质,同样方法检测p38的蛋白质表达情况。

### 五、统计方法

每组实验均重复3次,用SPSS 18.0统计学软件(IBM公司,美国)分析数据,结果用平均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,组间比较采用独立样本t检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表1 RT-PCR引物序列	
基因	寡核苷酸
GAPDH	5'-AAGGACCCCTTCATTGACCTC-3'(sense)
	5'-CCTTGACTGTGCCGTTGAACT-3'(antisense)
Runx2	5'-CTACTCTGCCGAGCTACGAAAT-3'(sense)
	5'-TCTGTCTGTGCCTTCTTGGTTC-3'(antisense)
OPN	5'-CAAGGACCAACTACAACCA-3'(sense)
	5'-GGAGACAGGAGGCAAGG-3'(antisense)
ALP	5'-CCTGGACCTCATCAGCATTT-3'(sense)
	5'-AGGGAAGGGTCAGTCAGTT-3'(antisense)

## 结 果

### 一、第3天实时定量PCR检测

实时定量PCR检测各组ALP、OPN、Runx2的表达,以GAPDH为内参,绘制各相关基因相对表达量。各实验组中ALP、OPN基因的表达量均比对照组高,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。Runx2的基因表达水平在电磁场组及IL-1 $\beta$ +电磁场组比对照组高,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图1。

### 二、第7天实时定量PCR检测

实时定量PCR检测各组ALP、OPN、Runx2的表达,以GAPDH为内参,绘制各相关基因相对表达量。ALP基因在IL-1 $\beta$ 组及IL-1 $\beta$ +电磁场组的表达量均比对照组低,在电磁场组的表达水平比对照组高,差异均具有统计学意义( $P$ 均 $< 0.05$ )(见图2)。OPN基因在各组的表达量均高于对照组,差异具有统计学意义( $P$ 均 $< 0.05$ )。Runx2基因在IL-1 $\beta$ 组及IL-1 $\beta$ +电磁场组的表达水平均比对照组低,差异均具有统计学意义( $P$ 均 $< 0.05$ )。

### 三、Western blotting 检测

Western blotting 检测结果显示,经过3 d培养后,各实验组中OPN的蛋白表达均比对照组高(见

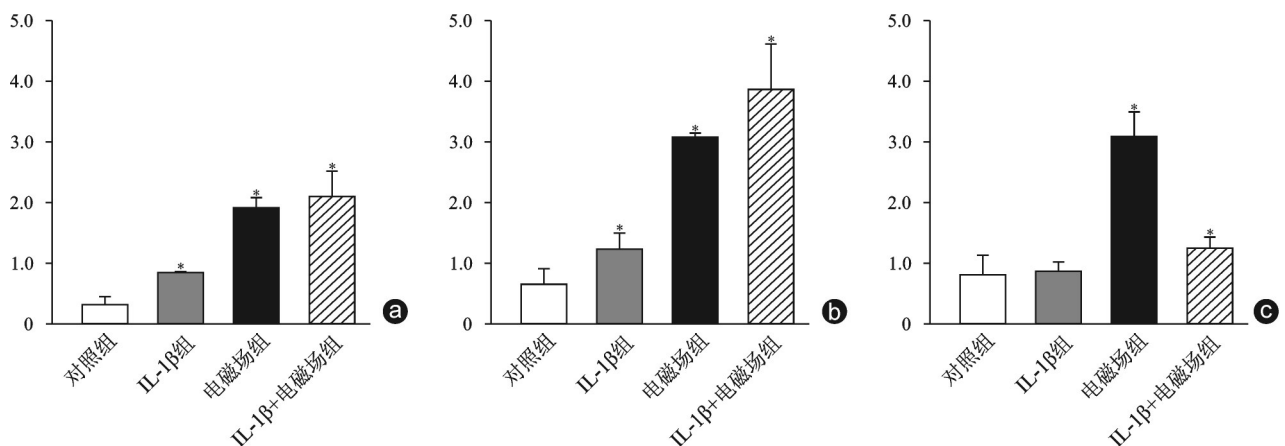


图1 第3天ALP(a)、OPN(b)、Runx2(c)的mRNA表达水平 与对照组比较,\* $P < 0.05$

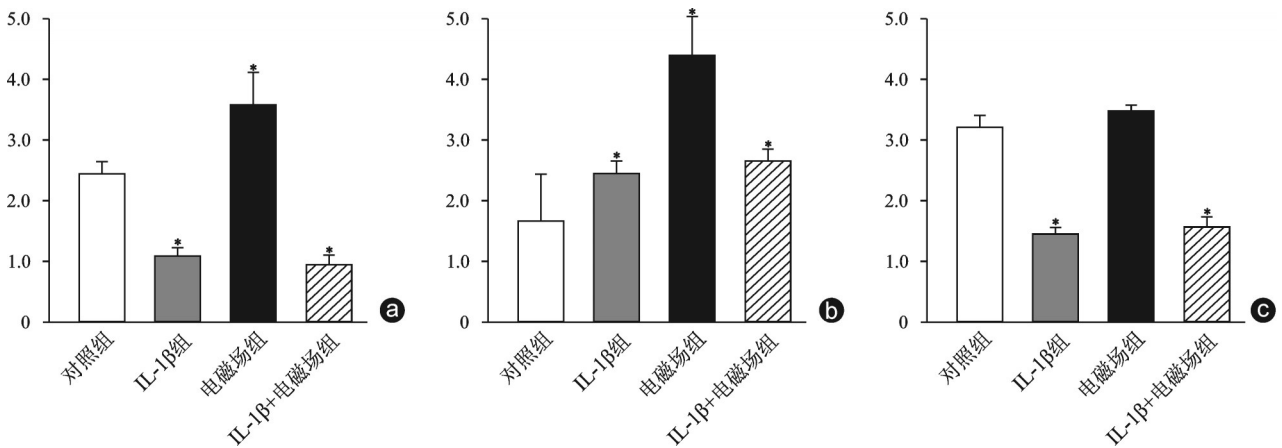


图2 第7天ALP(a)、OPN(b)、Runx2(c)的mRNA表达水平 与对照组比较,\*P<0.05

图3 a)。其中IL-1β+电磁场组的OPN蛋白表达水平最高,提示IL-1β可以协同电磁场促进OPN的表达。各实验组中Runx2的蛋白表达均比对照组高(见图3 b),IL-1β和电磁场均促进Runx2蛋白表达。检测磷酸化的p38蛋白表达情况,发现在IL-1β和电磁场作用30、60、120 min后磷酸化的p38的表达均比0 min时高(见图4),而在加入p38抑制剂SB203580后,磷酸化的p38表达无明显变化。

### 讨论

BMSCs是再生医学和组织工程研究领域常用的细胞类型,关于电磁场或IL-1β对BMSCs影响的研究较为深入。研究证实电磁场可以有效地促进BMSCs的成骨分化和细胞基质的矿化,具体效果与电磁场频率、强度、刺激时间、培养条件等因素密切相关<sup>[6]</sup>。脉冲电磁场在骨生成的早期明显促进ALP的表达,在中期则促进矿化,在后期则提高细胞数量,另外还可以影响Runx2的表达<sup>[7]</sup>。研究表明IL-1β抑制小鼠BMSCs的增殖分化,但可以促进小鼠前成骨细胞的增殖分化<sup>[8]</sup>。IL-1β抑制BMSCs的Runx2和胶原的表达,但可以提高ALP活性<sup>[9]</sup>。BMSCs可以通过激活IL-1β的受体来减缓炎症反应的进程<sup>[10]</sup>,在骨折愈合过程中具有局部及全身的抗炎作用<sup>[11]</sup>。

然而,IL-1β和电磁场对BMSCs的联合作用尚未见报道。

本研究中将BMSCs经过IL-1β和电磁场作用后,使用实时定量PCR方法检测与成骨分化密切相关的指标表达,如ALP、OPN及Runx2,结果显示IL-1β干预3 d后,电磁场组和IL-1β+电磁场组的ALP和OPN的基因表达水平较对照组均有明显的提高,并且电磁场的促进作用比IL-1β更强,而IL-1β+电磁场组两者联合应用后可以发挥协同效应。Runx2基因表达水平在IL-1β组变化不明显,在电磁场组明显升高,在IL-1β+电磁场组轻微增高。Western blotting检测到OPN和Runx2蛋白的表达与其对应基因表达趋势相似。以上结果说明IL-1β和电磁场在促成骨相关基因的表达方面存在一定差异。经过7 d的刺激后,ALP的基因表达水平在IL-1β组和IL-1β+电磁场组均降低,而在电磁场组则仍是表达升高。OPN的基因表达水平在各组均升高,以电磁场组尤为明显。以上结果证明了电磁场可以促进大鼠BMSCs的成骨分化,且效应比浓度为1 ng/ml的IL-1β更明显。IL-1β在第3天促进ALP和OPN的基因表达,在第7天则抑制ALP基因表达,促进OPN的基因表达,检测结果的差异提示IL-1β的作用可能与BMSCs所处的生长阶段有关,可能在不同的细胞周期阶段,

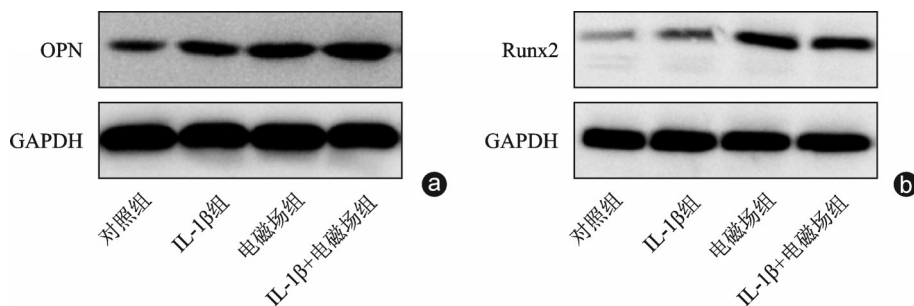


图3 电磁场和IL-1β作用3 d后的OPN(a)和Runx2(b)蛋白的表达

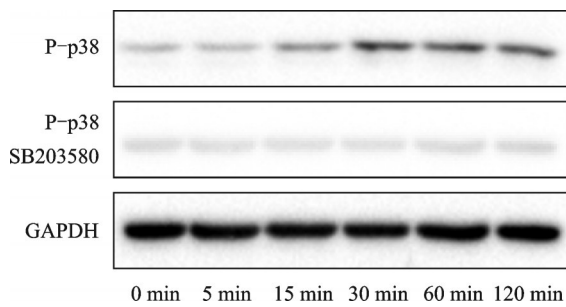


图4 电磁场和IL-1 $\beta$ 作用2 h内的磷酸化p38蛋白的表达

其激活的信号通路和基因不尽相同,因而所起的促成骨分化作用也会有差异。IL-1 $\beta$ +电磁场组在第3天的ALP和OPN基因表达均升高,IL-1 $\beta$ 和电磁场刺激联合作用时的促进作用比单纯应用IL-1 $\beta$ 刺激或电磁场刺激的作用均更强,而在第7天ALP基因表达较对照组和电磁场组都降低,OPN在IL-1 $\beta$ +电磁场组的表达低于单纯电磁场组,这一现象提示在BMSCs生长的前3 d,联合应用IL-1 $\beta$ 和电磁场能够更好地促进其成骨分化。我们认为,早期引入电磁场的干预可以更好地促进成骨。

p38的Western blotting结果提示在IL-1 $\beta$ 和电磁场作用于大鼠BMSCs 30 min后,磷酸化的p38开始升高,提示p38的磷酸化通路被激活。而使用p38通路抑制剂SB203580后,磷酸化的p38表达无明显差异。以上结果说明IL-1 $\beta$ 和电磁场通过激活了p38信号通路,参与了BMSCs成骨分化过程。

综上所述,我们认为IL-1 $\beta$ 在电磁场刺激的协调作用下,可在早期促进ALP和OPN的表达及p38信号通路的激活。然而,本研究尚有诸多不足,我们主要研究了IL-1 $\beta$ 和电磁场对BMSCs早期成骨效应的影响,需要进一步延长培养时间以检测后期成骨作用。另外我们还应该引入实验动物模型来分析IL-

1 $\beta$ 和电磁场对骨折愈合的具体作用,为将来电磁场的临床应用提供更多理论依据。

#### 参 考 文 献

- [1] Bahney CS, Zondervan RL, Allison P, et al. Cellular biology of fracture healing[J]. J Orthop Res, 2019, 37(1): 35-50.
- [2] Daish C, Blanchard R, Duchi S, et al. Design, fabrication and validation of a precursor pulsed electromagnetic field device for bone fracture repair[J]. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc, 2018, 4166-4169.
- [3] Kokabu S, Lowery JW, Jimi E. Cell fate and differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells [J]. Stem Cells Int, 2016, 3753581.
- [4] Ongaro A, Pellati A, Setti S, et al. Electromagnetic fields counteract IL-1beta activity during chondrogenesis of bovine mesenchymal stem cells[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2015, 9(12): E229-E38.
- [5] Huang RL, Yuan Y, Tu J, et al. Opposing TNF-alpha/IL-1beta- and BMP-2-activated MAPK signaling pathways converge on Runx2 to regulate BMP-2-induced osteoblastic differentiation [J]. Cell Death Dis, 2014, 5: e1187.
- [6] Daish C, Blanchard R, Fox K, et al. The application of pulsed electromagnetic fields (PEMFs) for bone fracture repair: past and perspective findings[J]. Ann Biomed Eng, 2018, 46(4): 525-542.
- [7] Ross CL, Siriwardane M, Almeida-Porada G, et al. The effect of low-frequency electromagnetic field on human bone marrow stem/progenitor cell differentiation[J]. Stem Cell Res, 2015, 15(1): 96-108.
- [8] Lange J, Sapozhnikova A, Lu C, et al. Action of IL-1beta during fracture healing[J]. J Orthop Res, 2010, 28(6): 778-784.
- [9] Ding J, Ghali O, Lencel P, et al. TNF-alpha and IL-1beta inhibit RUNX2 and collagen expression but increase alkaline phosphatase activity and mineralization in human mesenchymal stem cells[J]. Life Sci, 2009, 84(15-16): 499-504.
- [10] Prockop DJ, Oh JY. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation[J]. Mol Ther, 2012, 20(1): 14-20.
- [11] Claes L, Recknagel S, Ignatius A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions [J]. Nat Rev Rheumatol, 2012, 8(3): 133-143.

(收稿日期: 2019-03-05)

(本文编辑: 龚哲妮)