

DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20220363

· 论 著 ·

JNK 通路在低频脉冲电磁场促进牙周膜干细胞成骨分化中的作用

王彦萼^{1△}, 汪沛^{2△}, 王蓉¹, 蔚一博¹, 曹志中¹, 陈铁楼^{1*}

1. 海军军医大学(第二军医大学)第一附属医院口腔科, 上海 200433

2. 中国融通医疗健康集团有限公司上海四一一医院口腔科, 上海 200081

[摘要] **目的** 通过 c-Jun 氨基末端激酶 (JNK) 特异性抑制剂 SP600125 干预 JNK 信号通路, 探究 JNK 通路是否参与低频脉冲电磁场 (PEMF) 诱导人牙周膜干细胞 (hPDLSC) 的成骨分化。**方法** 用低频 PEMF (15 Hz、0~3 mT、每间隔 12 h 辐照 1 h) 体外辐照 hPDLSC, 第 7 天或第 14 天时通过 qPCR 检测细胞内 Runt 相关转录因子 2 (*Runx2*)、碱性磷酸酶 (*ALP*)、骨桥蛋白 (*OPN*)、骨钙蛋白 (*OCN*) 等成骨相关基因表达水平, 评估低频 PEMF 诱导 hPDLSC 成骨分化的能力并筛选适宜的磁场作用强度; 通过蛋白质印迹法检测低频 PEMF 刺激下细胞内 JNK 和磷酸化 JNK (p-JNK) 蛋白表达水平, qPCR 检测不同浓度 SP600125 干预后细胞内成骨相关基因表达水平的变化, 观察 JNK 通路在 PEMF 促进 hPDLSC 成骨分化过程中是否发挥作用。**结果** hPDLSC 经 15 Hz、2.5 mT 的低频 PEMF 辐照后, *Runx2*、*ALP*、*OPN*、*OCN* 等成骨相关基因表达水平高于其他磁场强度分组 (P 均 < 0.05)。低频 PEMF 刺激下明显促进了细胞内 JNK、p-JNK 蛋白的表达 (P 均 < 0.05); JNK 通路抑制后细胞内成骨相关基因表达水平降低, 且 20、30 $\mu\text{mol/L}$ SP600125 对成骨基因表达的抑制效果较 10 $\mu\text{mol/L}$ SP600125 更明显 (P 均 < 0.05)。**结论** 15 Hz、2.5 mT 的 PEMF 可通过部分激活 JNK 通路诱导 hPDLSC 成骨分化。

[关键词] 低频脉冲电磁场; 牙周膜干细胞; JNK 信号通路; 成骨分化; SP600125

[中图分类号] R 783.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2097-1338(2023)03-0283-09

Role of JNK pathway in osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells stimulated by low-frequency pulsed electromagnetic fields

WANG Yan-en^{1△}, WANG Pei^{2△}, WANG Rong¹, WEI Yi-bo¹, CAO Zhi-zhong¹, CHEN Tie-lou^{1*}

1. Department of Stomatology, The First Affiliated Hospital of Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

2. Department of Stomatology, Shanghai 411 Hospital, China Rongtong Medical Healthcare Group Co.Ltd, Shanghai 200081, China

[Abstract] **Objective** To explore whether c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway is involved in the osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells (hPDLSCs) induced by low-frequency pulsed electromagnetic field (PEMF) via using the specific inhibitor SP600125 to intervene JNK signaling pathway. **Methods** hPDLSCs were exposed to the low-frequency PEMF stimulation (15 Hz, 0-3.0 mT, radiate for 1 h every 12 h) *in vitro* for 7 d or 14 d and the expression levels of osteogenic-related genes Runt-related transcription factor 2 (*Runx2*), alkaline phosphatase (*ALP*), osteopontin (*OPN*) and osteocalcin (*OCN*) were detected by quantitative polymerase chain reaction (qPCR), so as to determine the osteogenic differentiation ability of cells induced by low-frequency PEMF and the appropriate magnetic field intensity. To determine whether JNK pathway plays a role in the osteogenic differentiation of hPDLSCs stimulated by low-frequency PEMF, the expression levels of JNK and phosphorylated-JNK (p-JNK) proteins were detected by Western blotting; and the expression levels of osteogenic genes in cells treated with different concentrations of SP600125 were detected by qPCR. **Results** The expression levels of osteogenic-related

[收稿日期] 2022-04-30 **[接受日期]** 2022-11-21

[基金项目] 上海市卫生和计划生育委员会科研课题(20134418), 解放军总后勤部面上项目(CHJ13J035), 海军军医大学(第二军医大学)第一附属医院青年启动基金(2019QN16), 海军军医大学(第二军医大学)第一附属医院“234 学科攀峰计划”(2020YXK028), 海军军医大学(第二军医大学)第一附属医院教改项目(CHJG2020040)。Supported by Scientific Research Project of Shanghai Municipal Commission of Health and Family Planning (20134418), General Program of Logistics Department of PLA (CHJ13J035), and Youth Initial Fund (2019QN16), the “234 Discipline Peak Climbing Plan” (2020YXK028) and Education Reform Project of The First Affiliated Hospital of Naval Medical University (Second Military Medical University) (CHJG2020040).

[作者简介] 王彦萼, 硕士, 主治医师。E-mail: jiuwehui521@sina.cn; 汪沛, 硕士, 主治医师。E-mail: 554041691@qq.com

[△]共同第一作者 (Co-first authors).

*通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81867179, E-mail: chentielou2010@163.com

genes *Runx2*, *ALP*, *OPN* and *OCN* were higher in hPDLSCs irradiated with low-frequency PEMF at 15 Hz and 2.5 mT than other intensity groups (all $P < 0.05$). Low-frequency PEMF significantly stimulated the expression of JNK and p-JNK proteins in cells (both $P < 0.05$). The expression levels of osteogenic genes in hPDLSCs were decreased after the JNK pathway was inhibited by SP600125, and the inhibitory effects of 20 and 30 $\mu\text{mol/L}$ SP600125 were more obvious than that of 10 $\mu\text{mol/L}$ SP600125 (both $P < 0.05$). **Conclusion** PEMF (15 Hz, 2.5 mT) partially activates JNK pathway to induce hPDLSC osteogenic differentiation.

[**Key words**] low-frequency pulsed electromagnetic fields; periodontal ligament stem cells; JNK signaling pathway; osteogenic differentiation; SP600125

[Acad J Naval Med Univ, 2023, 44(3): 283-291]

牙槽骨吸收是牙周炎常见的并发症,会导致牙齿松动脱落并影响义齿修复效果,传统的牙槽手术因为创伤大且预后效果不佳,患者接受程度普遍不高^[1]。以人牙周膜干细胞(human periodontal ligament stem cell, hPDLSC)作为种子细胞的组织工程技术,为牙槽骨再生提供了新的治疗思路,具有较大的临床应用潜力^[2]。

生物电磁场作为一种经济、安全、有效的物理辅助疗法,能显著促进骨组织的愈合。研究表明脉冲电磁场(pulsed electromagnetic field, PEMF)可以促进干细胞的增殖和成骨分化,从而促进骨组织的产生和骨折愈合^[3-4]。尽管PEMF应用于临床已有相当长时间,但是关于PEMF诱导成骨的具体生理机制尚不明确。研究表明PEMF刺激可能通过激活 Ca^{2+} 离子通道、cAMP、骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)等信号通路刺激成骨细胞的成熟和矿化^[5-7]。新近研究发现PEMF和MAPK信号通路可能存在密切关系^[5,8-9]。JNK通路属于MAPK通路家族,主要被细胞因子、紫外辐照、 γ 射线、氧化损伤、电离辐射等激活,参与细胞增殖、分化、衰亡、应激等细胞行为^[10]。有研究证实JNK通路除了参与细胞应激、凋亡等生物学行为外,在成骨分化方面也发挥重要作用^[11-12]。在电磁场刺激诱导成骨分化的过程中干细胞的JNK通路是否被激活,目前尚缺乏相关研究。

本研究选择hPDLSC作为种子细胞,建立低频PEMF促进hPDLSC成骨分化体外模型,通过检测该过程中Runt相关转录因子2(Runt-related transcription factor 2, *Runx2*)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、骨桥蛋白(osteopontin, OPN)、骨钙蛋白(osteocalcin, OCN)等成骨相关基因的表达和ALP活性,筛选适宜的PEMF磁场强度参数;再通过检测JNK和磷酸化JNK(phosphorylated-JNK, p-JNK)蛋白的表达情况

判断JNK通路是否参与PEMF促进hPDLSC成骨分化,以及选择JNK特异性抑制剂SP600125^[13]干预JNK信号通路,探究JNK通路在PEMF促进hPDLSC成骨分化中的作用。

1 材料和方法

1.1 主要实验仪器与试剂 CO_2 培养箱、超速离心机、荧光定量PCR仪(美国ThermoFisher公司),倒置荧光显微镜(日本Olympus公司),流式细胞仪、磁珠分选架、CD146免疫磁珠(德国Miltenyi Biotec公司),FBS(美国Gibco公司),PBS、DMSO(美国Corning公司),成骨诱导液(美国Hyclone公司),SP600125、青霉素-链霉素双抗(美国Sigma公司),反转录试剂盒(日本TaKaRa公司),山羊抗鼠二抗、蛋白分子量标记和蛋白质印迹法相关试剂、多聚甲醛、ALP活性检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司),鼠抗人角蛋白抗体、鼠抗人波形蛋白抗体、JNK抗体和p-JNK抗体(英国Abcam公司),基因引物序列由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成。

1.2 hPDLSC体外培养 本研究经海军军医大学(第二军医大学)第一附属医院医学伦理委员会审批。在口腔正畸治疗患者(年龄为11~13岁)监护人签署知情同意后,收集因正畸治疗拔除的健康前磨牙,刮取牙根中1/3牙周膜组织,用含体积分数1%双抗的PBS反复冲洗,小心转移牙周膜组织至培养皿中,去除杂质后置于 CO_2 培养箱孵育。待组织块呈现半干涸状态时加入完全培养基,根据细胞生长情况每3~5 d换液,当细胞汇合至70%~80%时传代。取第3代牙周膜细胞,调整细胞密度,在避光条件下,每 10^7 个细胞加20 μL CD146免疫磁珠和20 μL 分选用封闭液等试剂,充分吹打均匀后4 $^\circ\text{C}$ 避光孵育20 min;将细胞悬液转移至分选柱内,推动活塞于分选柱下方收集未接

合 CD146 免疫磁珠的细胞悬液; 取下分选柱并远离磁场, 推动活塞收集经过分选的细胞, 清洗后转移至培养皿。

1.3 hPDLSC 表面标志物鉴定 取第3代经分选后的细胞, 调整细胞密度; 在避光条件下用封闭液 (含 2% FBS 的 PBS) 封闭 30 min, 离心获得细胞沉淀。添加别藻蓝蛋白 (allophycocyanin, APC) 标记的 CD146 流式抗体和 FITC 标记的 STRO1 流式抗体, 避光孵育 20 min, 清洗细胞并重悬。将细胞悬液置于流式细胞仪检测, 以空白组中无 APC、FITC 通道区作标记, 检测该区域 CD146 和 STRO1 双阳性的细胞比例。

1.4 hPDLSC 组织来源鉴定 取第3代经分选后的细胞爬至玻片上生长, 待细胞汇合至 70% 左右时, 使用 4% 多聚甲醛溶液固定细胞 30 min。加入破膜

工作液孵育 10 min, 再分别添加鼠抗人波形蛋白抗体和鼠抗人角蛋白抗体孵育过夜, 然后加入山羊抗鼠二抗孵育 50 min。添加 DAPI 染色细胞核, 避光孵育 10 min 后封片, 在荧光显微镜下观察并采集图像。

1.5 PEMF 辐照 hPDLSC PEMF 细胞干预系统由空军军医大学军事生物医学工程系提供技术支持 (ZL02224739.4)^[14], 整个系统包括 PEMF 发生器、赫姆霍兹线圈、示波器、CO₂ 培养箱、连接线路等。实验时将严格消毒后的赫姆霍兹线圈置于 CO₂ 培养箱中, 将培养皿置于线圈中, 通过赫姆霍兹线圈产生脉冲频率 15 Hz、脉冲宽度 0.2 ms、脉冲间隔 0.02 ms、脉冲群宽度 5 ms、脉冲群间隔 60 ms、磁场强度为 0~3.0 mT 的均匀磁场, 对细胞进行辐照干预 (图 1)。

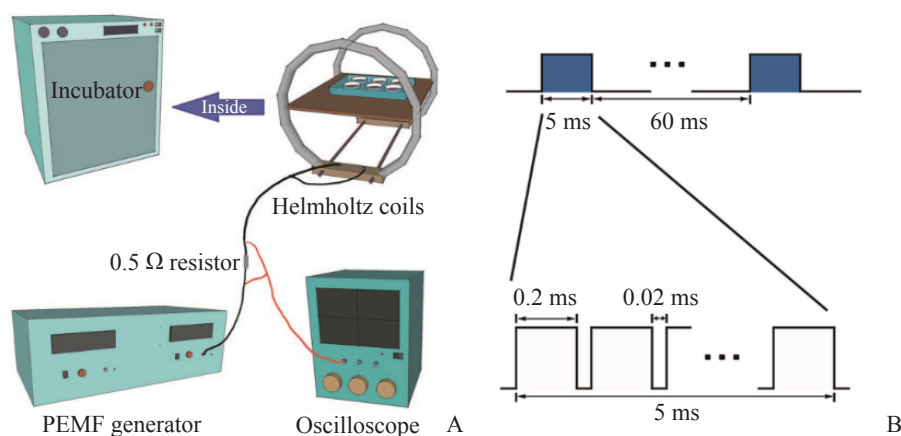


图 1 PEMF 发生器体外辐照细胞示意图

Fig 1 Schematic diagram of PEMF exposure of cells *in vitro*

A: PEMF exposure system comprises a pulsed signal generator and Helmholtz coil pair assembly with two-coil array. An oscilloscope was used to monitor waveform and amplitude of current. B: PEMF generator produced an open-circuit PEMF waveform (burst width 5 ms, pulse width 0.2 ms, pulse wait 0.02 ms, burst wait 60 ms, pulse rise 0.3 ms, pulse fall 2.0 ms). PEMF: Pulsed electromagnetic field.

1.6 筛选适宜场强的 PEMF 实验分组 取第3代 hPDLSC 添加成骨培养液培养, 自第1天起每间隔 12 h 辐照细胞 1 h, 设置对照组、0.5 mT PEMF 干预组、1.0 mT PEMF 干预组、1.5 mT PEMF 干预组、2.0 mT PEMF 干预组、2.5 mT PEMF 干预组、3.0 mT PEMF 干预组, 分别给予 15 Hz 频率的 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mT PEMF 进行干预。

1.7 JNK 通路在 PEMF 促进 hPDLSC 成骨分化中作用的实验分组 辐照条件为 15 Hz 频率 2.5 mT PEMF 自第1天起每间隔 12 h 辐照细胞 1 h, 使用 DMSO 稀释 SP600125, 设置以下分组: 对照组 (含 DMSO 无 PEMF 辐照), 2.5 mT PEMF 干预组

(含 DMSO 以 2.5 mT PEMF 辐照), 10 μmol/L SP600125 组 (添加 10 μmol/L SP600125 以 2.5 mT PEMF 辐照), 20 μmol/L SP600125 组 (添加 20 μmol/L SP600125 以 2.5 mT PEMF 辐照), 30 μmol/L SP600125 组 (添加 30 μmol/L SP600125 以 2.5 mT PEMF 辐照)。

1.8 ALP 活性检测 按照说明书要求先绘制 ALP 活性标准曲线。收集细胞并添加 0.2% Triton X-100 裂解细胞, 添加 ALP 检测试剂, 待反应完成后通过酶标仪在 405 nm 处检测光密度 (*D*) 值, 根据标准曲线计算 ALP 活性。

1.9 成骨相关基因表达检测 使用 0.2% Triton X-100

裂解收集的细胞,提取总RNA并测定浓度和纯度,通过试剂盒反转录为cDNA,反应条件为37℃ 15 min、85℃ 5 s。通过qPCR检测ALP、Runx2、

OPN、OCN基因表达,引物序列见表1,反应条件为95℃ 5 s、60℃ 15 s、72℃ 15 s,共45个循环。结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行定量。

表1 基因引物序列

Tab 1 Sequences of gene primers

Gene	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')
β -actin	GCCAACACAGTGCTGTCT	AGGAGCAATGATCTTGATCTT
ALP	GTTGCCAAGCTGGGAAGAACAC	CCCACCCCGCTATTCCAAAC
Runx2	TAGATGGACCTCGGGAACC	GGGTGGTAGAGTGGATGGAC
OPN	GGCAGCGAGGTAGTGAAGAG	CTGGAGAGGAGCAGAACTGG
OCN	GCCGAGGTGATAGTGTGGTT	CTGGACTGCTTGTGGCTGT

ALP: Alkaline phosphatase; Runx2: Runt-related transcription factor 2; OPN: Osteopontin; OCN: Osteocalcin.

1.10 蛋白表达检测 收集细胞加入RIPA裂解液,冰上裂解30 min,离心收集上清液。按说明书要求配制BCA工作液并测定蛋白浓度。分别配制分离胶和浓缩胶,进行凝胶电泳。转膜封闭后加入一抗和内参(GAPDH)抗体,4℃孵育过夜,清洗膜,孵育二抗1 h后清洗,发光剂显色,胶片曝光并采集图像,使用ImageJ软件分析蛋白条带。

1.11 统计学处理 应用SPSS 19.0软件进行统计学分析,应用GraphPad Prism 8.0软件绘图。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用Tukey's检验。检验水准(α)为0.05。

2 结果

2.1 hPDLSC鉴定结果 经CD146免疫磁珠分选获得的细胞形态学呈锥形、椭圆形、三角形或不规则形,细胞小且胞质内细胞器较少,细胞核呈卵圆形且占细胞内体积的比例较大(图2A),经流式细胞术鉴定STRO1和CD146双阳性细胞的比例约为55.3%(图2B)。免疫荧光染色结果显示角蛋白是阴性表达且波形蛋白呈阳性表达(图2C),说明分选获得的细胞为中胚层来源间充质细胞,且无外胚层来源细胞污染。

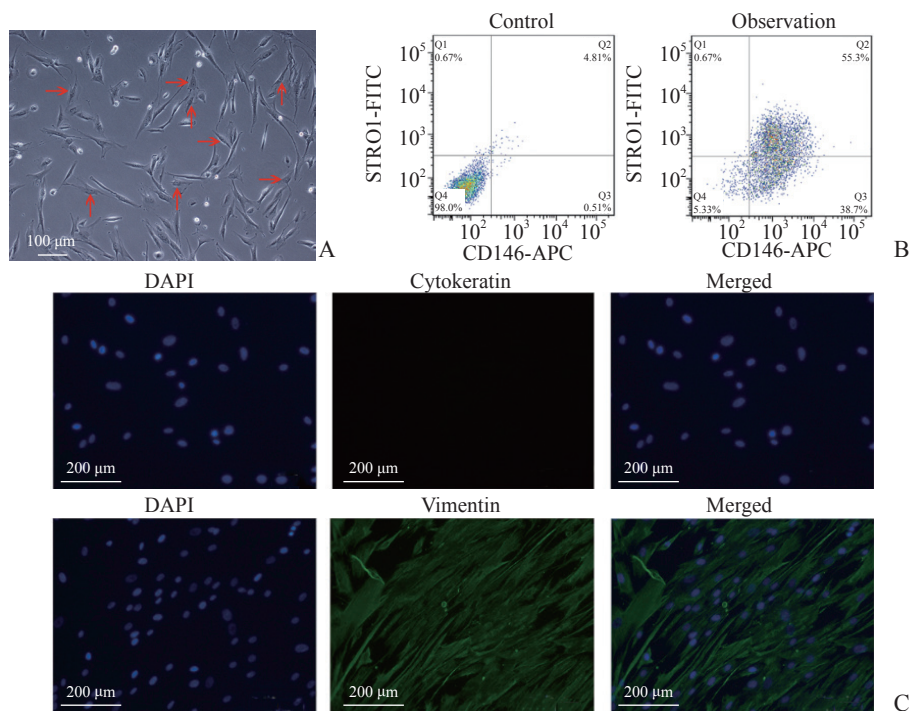


图2 hPDLSC鉴定

Fig 2 Identification of hPDLSCs

A: Isolated CD146⁺ hPDLSCs were round, fusiform, and small (arrows). The cells had less cytoplasm and a large nucleus. B: Flow cytometry showed that the double-positive rate of CD146 and STRO1 in cells obtained by immunomagnetic beads was 55.3%. C: Immunofluorescence staining showed that isolated hPDLSCs were vimentin-positive, but were cytokeratin-negative. hPDLSC: Human periodontal ligament stem cell; APC: Allophycocyanin; FITC: Fluoresceine isothiocyanate; DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole.

2.2 PEMF 对 hPDLSC 成骨分化的影响 实验第 7 天, ALP 活性检测结果显示, 与对照组相比, 1.5、2.0、2.5、3.0 mT 磁场强度的 PEMF 均促进了 ALP 蛋白活性表达 (P 均 < 0.05); 其中 2.5 mT PEMF 干预组 ALP 活性高于其他分组 (P 均 < 0.05 , 图 3A)。第 7 天基因检测结果显示, 与对照组相比, 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mT 磁场强度的 PEMF 均上调了 *ALP* 基因表达 (P 均 < 0.05), 其中 2.5 mT PEMF 干预组 *ALP* 基因表达水平高于其他分组 (P 均 < 0.05 , 图 3B); 与对照组相比, 1.5、2.0、2.5、3.0 mT 磁场强度的 PEMF 上调了 *Runx2* 基因表达

(P 均 < 0.05), 其中 2.5 mT 组 *Runx2* 基因表达水平高于其他分组 (P 均 < 0.05 , 图 3C)。第 14 天基因检测结果显示, 与对照组相比, 1.5、2.0、2.5、3.0 mT 磁场强度的 PEMF 上调了 *OPN* 基因表达 (P 均 < 0.05), 其中 2.5 mT PEMF 干预组 *OPN* 基因表达水平高于其他分组 (P 均 < 0.05 , 图 3D); 与对照组相比, 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mT 磁场强度的 PEMF 上调了 *OCN* 基因表达 (P 均 < 0.05), 其中 2.5 mT PEMF 干预组 *OCN* 基因表达水平高于其他分组 (P 均 < 0.05 , 图 3E)。

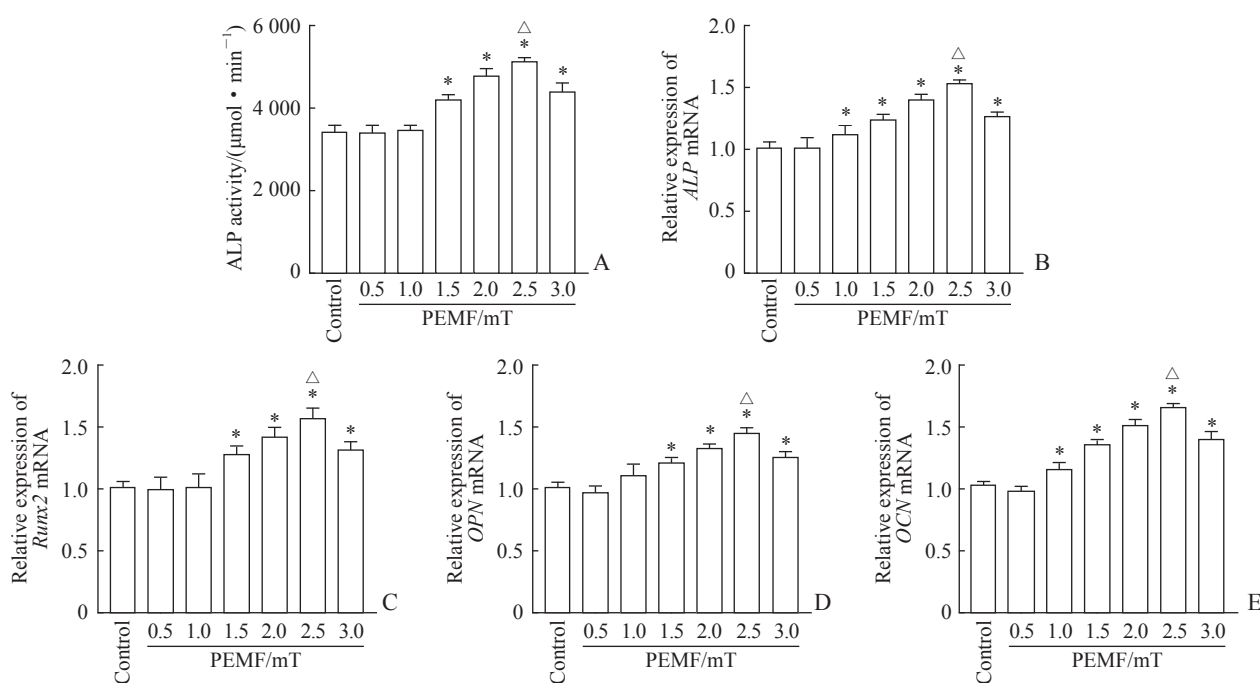


图 3 不同磁场强度的 PEMF 刺激对 hPDLSC 内 ALP 活性及成骨相关基因表达的影响

Fig 3 Effect of PEMF stimulation of different intensities on expression of osteogenesis-related genes in hPDLSCs

A: ALP activity in hPDLSCs exposed to PEMF stimulation of different intensities was measured via a quantitative kit on day 7; B, C: mRNA expression of *ALP* (B) and *Runx2* (C) in hPDLSCs exposed to PEMF stimulation of different intensities was detected by qPCR on day 7; D, E: mRNA expression of *OPN* (D) and *OCN* (E) in hPDLSCs exposed to PEMF stimulation of different intensities detected by qPCR on day 14. * $P < 0.05$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ vs other intensity groups. $n = 4$, $\bar{x} \pm s$. PEMF: Pulsed electromagnetic field; hPDLSC: Human periodontal ligament stem cell; ALP: Alkaline phosphatase; Runx2: Runt-related transcription factor 2; OPN: Osteopontin; OCN: Osteoclastin; qPCR: Quantitative polymerase chain reaction.

2.3 PEMF 辐照后 hPDLSC 内 JNK 蛋白磷酸化水平改变及 SP600125 的抑制作用 实验第 7 天, 蛋白质印迹法检测结果显示 15 Hz、2.5 mT PEMF 明显促进了 hPDLSC 内 JNK、p-JNK 蛋白的表达, 与对照组相比差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。与 2.5 mT PEMF 干预组相比, 添加不同浓度 SP600125 后, hPDLSC 内 JNK 蛋白表达变化不明显 (P 均 > 0.05), 而 p-JNK 蛋白表达水平明显

下降 (P 均 < 0.05)。见图 4。

2.4 SP600125 抑制剂对 PEMF 促 hPDLSC 成骨分化能力的影响 实验第 7 天, ALP 活性检测结果显示, 经不同浓度 SP600125 作用后 15 Hz、2.5 mT PEMF 刺激下 hPDLSC 的 ALP 活性水平均高于对照组 (P 均 < 0.05), 均较单纯 2.5 mT PEMF 干预组下降 (P 均 < 0.05), 且 20 $\mu\text{mol/L}$ SP600125 组和 30 $\mu\text{mol/L}$ SP600125 组 ALP 活性水平低于 10

μmol/L SP600125 组 (P 均 < 0.05), 但 20 μmol/L SP600125 组与 30 μmol/L SP600125 组之间 ALP 活性水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 5A)。第 7 天 qPCR 检测结果显示, 不同浓度 SP600125 作用后 15 Hz、2.5 mT PEMF 刺激下 hPDLSC 成骨分化早期相关基因 *ALP*、*Runx2* 的表达水平均高于对照组 (P 均 < 0.05), 但均低于单纯 2.5 mT PEMF 干预组 (P 均 < 0.05), 且 20 μmol/L SP600125 组和 30 μmol/L SP600125 组 *ALP*、*Runx2* 基因表达水平均低于 10 μmol/L SP600125 组 (P 均 < 0.05), 但 20 μmol/L SP600125 组与 30 μmol/L SP600125 组之

间的差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 5B、5C)。第 14 天 qPCR 检测结果显示, 不同浓度 SP600125 作用后 15 Hz、2.5 mT PEMF 刺激下 hPDLSC 成骨分化中晚期相关基因 *OPN*、*OCN* 的表达水平均高于对照组 (P 均 < 0.05), 但均低于单纯 2.5 mT PEMF 干预组 (P 均 < 0.05), 且 20 μmol/L SP600125 组和 30 μmol/L SP600125 组 *OPN*、*OCN* 基因表达水平均低于 10 μmol/L SP600125 组 (P 均 < 0.05), 但 20 μmol/L SP600125 组与 30 μmol/L SP600125 组之间的差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 5D、5E)。

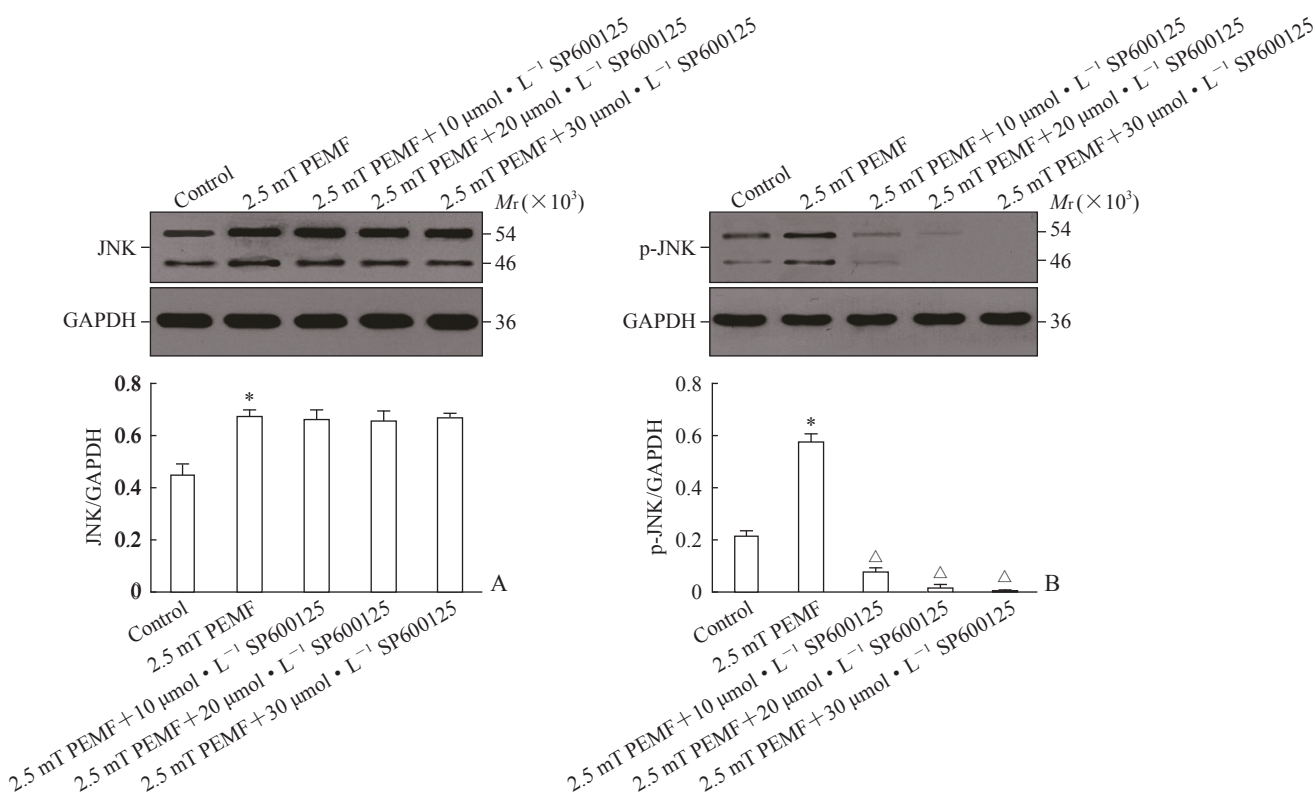


图 4 不同浓度 SP600125 对 PEMF 刺激下 hPDLSC 内 JNK (A)、p-JNK (B) 蛋白表达的影响

Fig 4 Effects of SP600125 on protein expression of JNK (A) and p-JNK (B) in hPDLSCs stimulated by PEMF

* $P < 0.05$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ vs 2.5 mT PEMF group. $n = 4$, $\bar{x} \pm s$. PEMF: Pulsed electromagnetic field; hPDLSC: Human periodontal ligament stem cell; JNK: c-Jun N-terminal kinase; p-JNK: Phosphorylated-JNK; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

3 讨论

牙周膜干细胞是牙周韧带组织中具有成骨样、成脂肪样、成软骨样等多向分化潜能的细胞, 是口腔生物工程和牙周组织再生领域较为理想的种子细胞^[2]。干细胞的成骨分化会受到生物、物理、化学等诸多因素的影响, 越来越多的文献证实了低频电磁场可以促进干细胞成骨分化。PEMF 作为一种生物物理刺激能够在组织中诱导生物电流而发挥作

用, 另外其物理特性具有“窗口效应”, 不同频率、波形、强度的电磁场对特定的细胞产生不同的生物效应^[3-4,15], 目前认为有效的电磁场频率应接近正常机体活动频率^[4,16]。本研究发现 15 Hz 的 PEMF 在 1.0~2.5 mT 磁场强度区间, 随着磁场强度的增强, hPDLSC 内成骨标志物 ALP 活性及 *ALP*、*Runx2*、*OPN*、*OCN* 等基因表达增强, 然而强度高于 2.5 mT 以后, 成骨分化相关基因表达明显减弱, 提示磁场强度窗口可能在 2.5 mT 附近。

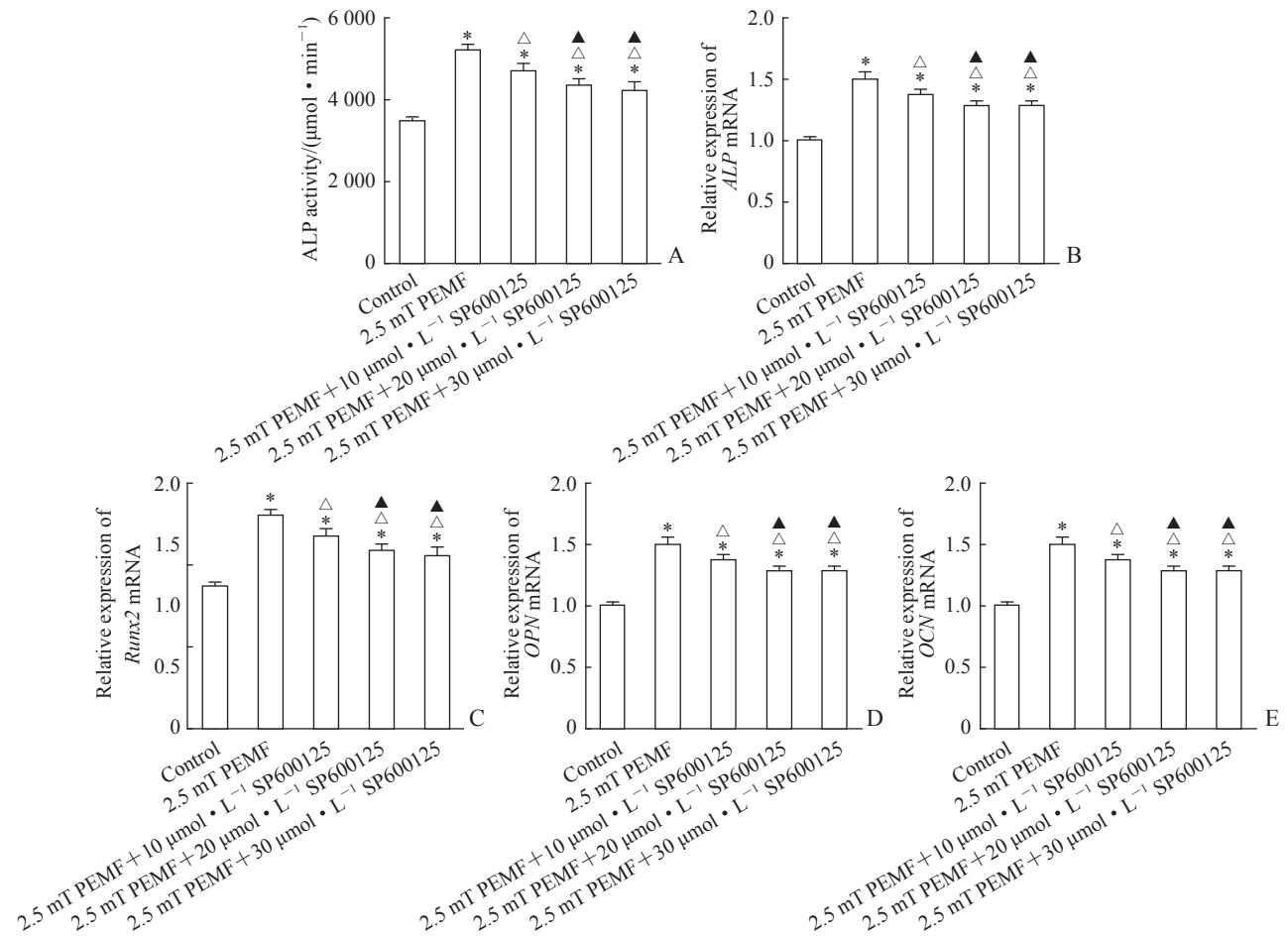


图5 SP600125对PEFM促hPDLSC成骨分化能力的影响

Fig 5 Effect of SP600125 on osteogenic differentiation ability in hPDLSCs stimulated by PEFM

A: The ALP activity in hPDLSCs stimulated by PEFM was assessed by a quantitative assay after treatment with SP600125 of different concentrations on day 7; B, C: The *ALP* (B) and *Runx2* (C) mRNA expression in hPDLSC stimulated by PEFM was assessed by qPCR after treatment with SP600125 on day 7; D, E: The *OPN* (D) and *OCN* (E) mRNA expression was assessed by qPCR after treatment with SP600125 of different concentrations on day 14. * $P < 0.05$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ vs 2.5 mT PEFM group; $\blacktriangle P < 0.05$ vs 2.5 mT PEFM + 10 $\mu\text{mol/L}$ SP600125 group. $n = 4$, $\bar{x} \pm s$. PEFM: Pulsed electromagnetic field; hPDLSC: Human periodontal ligament stem cell; ALP: Alkaline phosphatase; Runx2: Runt-related transcription factor 2; qPCR: Quantitative polymerase chain reaction; OPN: Osteopontin; OCN: Osteoclastin.

目前为止关于PEFM促进骨形成的具体机制已做了大量研究,但仍未明确。有研究发现PEFM可能影响细胞内 Ca^{2+} 的移动和细胞膜电位变化进而促进成骨作用^[6,17],还能通过上调与成骨相关的多种生长因子如骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP) 2、TGF- β 、骨保护素、OPN、Runx2、ALP、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP) 1、MMP3、一氧化氮的合成^[9],下调与骨基质吸收相关的细胞因子如前列腺素E2、IL-6的表达分泌,从而促进骨组织的形成^[18]。Wang等^[19]发现PEFM可能通过初级纤毛介导,直接或间接激活可溶性腺苷酸环化酶(soluble adenylyl cyclase, sAC)-cAMP-蛋白激

酶A(protein kinase A, PKA)-cAMP反应元件结合蛋白(cAMP response element-binding protein, CREB)信号通路,增高细胞内cAMP水平,促进PKA和CREB的磷酸化,并诱导磷酸化CREB的核转位,从而促进成骨分化。Cheng等^[20]学者认为PEFM还可以通过一氧化氮-环鸟苷酸-蛋白激酶G途径刺激大鼠成骨细胞促进成骨分化和矿化。PEFM通过激活Wnt/ β -联蛋白信号通路,促进Wnt1、Wnt3a、Wnt10b等蛋白表达,从而促进成骨分化^[14-21]。PEFM还可能通过激活TGF- β /Smad 1/5/8、BMP/Smad 1/5/8信号转导途径,上调转录因子Runx2和Osterix的表达,促进间充质干细胞成骨分化^[7]。

新近研究发现PEMF与MAPK家族成员关系密切,MAPK作为普遍存在于哺乳动物细胞中的一条高度保守的信号通路,在调控细胞增殖、分化及对外界环境的应激反应过程中起着重要作用^[22],其家族成员包括细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinases,ERK)、JNK及p38激酶^[12,22]。Caliogna等^[5]认为MAPK途径在PEMF诱导的成骨分化中起着关键作用。Ehnert等^[23]研究表明低频PEMF通过触发ERK1/2信号通路,可显著提高成骨细胞内线粒体和ALP活性,并促进矿化基质的形成。另一项研究也证实了电磁场可引起PKA途径的激活和ERK1/2磷酸化的增加,ALP活性、Runx2、BMP2和OCN的表达水平升高,诱导骨髓间充质干细胞成骨分化^[24]。Peluso等^[25]发现电磁场能够促进成纤维细胞生长因子激活ERK1/2蛋白的磷酸化,上调ALP基因表达,诱导hPDLSC早期成骨分化。Poh等^[26]研究发现,26 Hz PEMF通过激活ERK1/2信号通路,促进脂肪来源间充质干细胞增殖、防止细胞死亡、协助翻译成骨蛋白等重要作用。Soda等^[27]认为60 Hz、3 mT的PEMF通过激活p38信号通路促进MC3T3-E1细胞成骨分化。Hong等^[28]则发现7.5 Hz的PEMF可以通过p38信号通路促进脂肪来源干细胞向成骨细胞分化,而45 Hz的PEMF则抑制成骨分化。这些研究表明不同参数的PEMF诱导干细胞成骨分化过程中,能否激活MAPK信号通路以及产生的生物效应不尽相同。

JNK通路主要被各种细胞因子(TNF- α 、IL-1等)、应激(紫外线、电离辐射、氧化损伤等)等外界刺激活化,激活的JNK蛋白通过c-Jun促进激活蛋白-1(activator protein -1, AP-1)复合物的形成,调控与JNK相关的基因表达,从而发挥生物学效应^[10]。Wang等^[12]研究发现JNK信号通路参与BMP9诱导的hPDLSC成骨分化,在此过程中p-JNK1/2可能与Smad2/3蛋白发生相互作用。Song等^[29]证实淫羊藿苷导致ERK1/2和JNK蛋白的磷酸化增加,促进了MC3T3-E1细胞成骨分化和基质矿化。本研究中蛋白质印迹法检测结果显示,相比对照组,15 HZ、2.5 mT的PEMF明显促进了hPDLSC内p-JNK蛋白表达,且在SP600125抑制剂作用下,p-JNK蛋白水平降低,同时ALP、OPN、OCN等成骨标志物表达均有不同程度的下降,表明PEMF通过激活JNK通路参与诱导hPDLSC内成骨相关基因的表达;但在添加高浓度SP600125抑制剂,JNK通路近乎被阻断的情况下,PEMF仍能促进PDLSC成骨分化,说明JNK

通路不是唯一路径。现有研究表明JNK主要通过激活c-Jun并提高AP-1的转录活性传递信号,活化的AP-1能调控转录激活因子2(activating transcription factor 2, ATF2)、TNF- α 、IL-、干扰素、环氧合酶-2等表达,但这些底物均与骨生长发育没有直接关联,并且JNK通路的下游也不包含成骨相关转录因子,猜测JNK通路可能通过串话(crosstalk)其他成骨通路参与成骨分化过程。

综上所述,适宜参数的PEMF(15 Hz, 2.5 mT)可以较好地促进hPDLSC成骨分化,并在该条件下JNK通路是其功能机制之一。本实验研究进一步探索了PEMF诱导成骨的功能机制,这将为低频PEMF应用于临床修复牙槽骨的缺损提供理论依据。

[参考文献]

- [1] TELES F, COLLMAN R G, MOMINKHAN D, WANG Y. Viruses, periodontitis, and comorbidities[J]. *Periodontol* 2000, 2022, 89: 190-206.
- [2] TOMOKIYO A, WADA N, MAEDA H. Periodontal ligament stem cells: regenerative potency in periodontium[J]. *Stem Cells Dev*, 2019, 28: 974-985.
- [3] UMIATIN U, HADISOEBROTO DILOGO I, SARI, KUSUMA WIJAYA S. Histological analysis of bone callus in delayed union model fracture healing stimulated with pulsed electromagnetic fields (PEMF) [J/OL]. *Scientifica (Cairo)*, 2021, 2021: 4791172. DOI: 10.1155/2021/4791172.
- [4] WANG T T, WANG P, CAO Z Z, WANG X X, WANG D L, SHEN Y X, et al. Effects of BMP9 and pulsed electromagnetic fields on the proliferation and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells[J]. *Bioelectromagnetics*, 2017, 38: 63-77.
- [5] CALIOGNA L, MEDETTI M, BINA V, BRANCATO A M, CASTELLI A, JANNELLI E, et al. Pulsed electromagnetic fields in bone healing: molecular pathways and clinical applications[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 7403. DOI: 10.3390/ijms22147403.
- [6] PETECCHIA L, SBRANA F, UTZERI R, VERCELLINO M, USAI C, VISAI L, et al. Electromagnetic field promotes osteogenic differentiation of BM-hMSCs through a selective action on Ca²⁺-related mechanisms[J/OL]. *Sci Rep*, 2015, 5: 13856. DOI: 10.1038/srep13856.
- [7] MARTINI F, PELLATI A, MAZZONI E, SALATI S, CARUSO G, CONTARTESE D, et al. Bone morphogenetic protein-2 signaling in the osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells induced by pulsed electromagnetic fields[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 2104. DOI: 10.1038/srep13856.

- [8] XU H, ZHANG J, LEI Y, HAN Z, RONG D, YU Q, et al. Low frequency pulsed electromagnetic field promotes C2C12 myoblasts proliferation via activation of MAPK/ERK pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 479: 97-102.
- [9] YUAN J, XIN F, JIANG W X. Underlying signaling pathways and therapeutic applications of pulsed electromagnetic fields in bone repair[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46: 1581-1594.
- [10] WESTON C R, DAVIS R J. The JNK signal transduction pathway[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2007, 19: 142-149.
- [11] ZHENG W W, CHEN Q, ZHANG Y, XIA R, GU X P, HAO Y F, et al. BMP9 promotes osteogenic differentiation of SMSCs by activating the JNK/Smad2/3 signaling pathway[J]. *J Cell Biochem*, 2020, 121: 2851-2863.
- [12] WANG P, WANG Y N, TANG W Z, WANG X X, PANG Y N, YANG S, et al. Bone morphogenetic protein-9 enhances osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells via the JNK pathway[J/OL]. *PLoS One*, 2017, 12: e0169123. DOI: 10.1371/journal.pone.0169123.
- [13] LI G, QI W Q, LI X X, ZHAO J W, LUO M H, CHEN J J. Recent advances in c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitors[J]. *Curr Med Chem*, 2021, 28: 607-627.
- [14] SHAO X, YAN Z D, WANG D, YANG Y Q, DING Y J, LUO E P, et al. Pulsed electromagnetic fields ameliorate skeletal deterioration in bone mass, microarchitecture, and strength by enhancing canonical Wnt signaling-mediated bone formation in rats with spinal cord injury[J]. *J Neurotrauma*, 2021, 38: 765-776.
- [15] DAISH C, BLANCHARD R, FOX K, PIVONKA P, PIROGOVA E. The application of pulsed electromagnetic fields (PEMFs) for bone fracture repair: past and perspective findings[J]. *Ann Biomed Eng*, 2018, 46: 525-542.
- [16] GALLI C, PEDRAZZI G, GUIZZARDI S. The cellular effects of pulsed electromagnetic fields on osteoblasts: a review[J]. *Bioelectromagnetics*, 2019, 40: 211-233.
- [17] TONG J, SUN L J, ZHU B, FAN Y, MA X F, YU L Y, et al. Pulsed electromagnetic fields promote the proliferation and differentiation of osteoblasts by reinforcing intracellular calcium transients[J]. *Bioelectromagnetics*, 2017, 38: 541-549.
- [18] SHEN W W, ZHAO J H. Pulsed electromagnetic fields stimulation affects BMD and local factor production of rats with disuse osteoporosis[J]. *Bioelectromagnetics*, 2010, 31:113-119.
- [19] WANG Y Y, PU X Y, SHI W G, FANG Q Q, CHEN X R, XI H R, et al. Pulsed electromagnetic fields promote bone formation by activating the sAC-cAMP-PKA-CREB signaling pathway[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234: 2807-2821.
- [20] CHENG G, ZHAI Y, CHEN K, ZHOU J, HAN G, ZHU R, et al. Sinusoidal electromagnetic field stimulates rat osteoblast differentiation and maturation via activation of NO-cGMP-PKG pathway[J]. *Nitric Oxide*, 2011, 25: 316-325.
- [21] ZHAI M M, JING D, TONG S C, WU Y, WANG P, ZENG Z B, et al. Pulsed electromagnetic fields promote *in vitro* osteoblastogenesis through a Wnt/ β -catenin signaling-associated mechanism[J]. *Bioelectromagnetics*, 2016, 37: 152-162.
- [22] ZHANG B, XIE Y L, NI Z H, CHEN L. Effects and mechanisms of exogenous electromagnetic field on bone cells: a review[J]. *Bioelectromagnetics*, 2020, 41: 263-278.
- [23] EHNERT S, FALLDORF K, FENTZ A K, ZIEGLER P, SCHRÖTER S, FREUDE T, et al. Primary human osteoblasts with reduced alkaline phosphatase and matrix mineralization baseline capacity are responsive to extremely low frequency pulsed electromagnetic field exposure—clinical implication possible[J]. *Bone Rep*, 2015, 3: 48-56.
- [24] YONG Y, MING Z D, FENG L, CHUN Z W, HUA W. Electromagnetic fields promote osteogenesis of rat mesenchymal stem cells through the PKA and ERK1/2 pathways[J/OL]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2016, 10: E537-E545. DOI: 10.1002/term.1864.
- [25] PELUSO V, RINALDI L, RUSSO T, OLIVIERO O, DI VITO A, GARBI C, et al. Impact of magnetic stimulation on periodontal ligament stem cells[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2021, 23: 188. DOI: 10.3390/ijms23010188.
- [26] POH P S P, SEELIGER C, UNGER M, FALLDORF K, BALMAYOR E R, VAN GRIENSVEN M. Osteogenic effect and cell signaling activation of extremely low-frequency pulsed electromagnetic fields in adipose-derived mesenchymal stromal cells[J/OL]. *Stem Cells Int*, 2018, 2018: 5402853. DOI: 10.1155/2018/5402853.
- [27] SODA A, IKEHARA T, KINOCHI Y, YOSHIZAKI K. Effect of exposure to an extremely low frequency-electromagnetic field on the cellular collagen with respect to signaling pathways in osteoblast-like cells[J]. *J Med Invest*, 2008, 55(3/4): 267-278.
- [28] HONG J M, KANG K S, YI H G, KIM S Y, CHO D W. Electromagnetically controllable osteoclast activity[J]. *Bone*, 2014, 62: 99-107.
- [29] SONG L, ZHAO J, ZHANG X, LI H, ZHOU Y. Icaritin induces osteoblast proliferation, differentiation and mineralization through estrogen receptor-mediated ERK and JNK signal activation[J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 714: 15-22.