

磁场二氧化碳培养箱细胞培养案例分析

周宇益¹, 李晓红², 李荣明¹, 黄文哲¹, 金亚美³, 徐学明³, 杨哪^{3*}

(1. 英都斯特(无锡)感应科技有限公司, 江苏 无锡 214000; 2. 烟台荣昌生物工程有限公司, 山东 烟台 264006; 3. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214000)

摘要: 体外细胞培养, 是生物医学和组织工程领域的重要培养方式。磁场在温度、二氧化碳条件下的生物协同效应, 影响电子云分布改变、分子取向、微弱感应电流、离子代谢和细胞信号通道, 在细胞培养领域具有广阔应用前景。本文应用磁场二氧化碳培养箱对骨髓间充质干细胞进行培养, 对比不同恒稳磁场环境下细胞增殖活力、碱性磷酸酶活性和骨钙素含量等理化特性的变化, 探究恒稳磁场对细胞增殖及分化的影响, 并为今后该设备在体外细胞培养领域中的应用提供技术指导。

关键词: 恒稳磁场;骨髓间充质干细胞;增殖;成骨分化

Case analysis of cell culture in magnetic field carbon dioxide incubator

Zhou Yuyi¹, Li Xiaohong², Li Rongming¹, Huang Wenzhe¹, Jin Yamei³, Xu Xueming³, Yang Na^{3*}

(1. INDUC Scientific Co.,Ltd. Wuxi 214035, China; 2. Remegen Co.,Ltd. Yantai 264006, China; 3. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In vitro cell culture is an important culture method in biomedical and tissue engineering fields. The biological synergistic effect of magnetic field under the conditions of temperature and carbon dioxide affects the distribution change of electron cloud, molecular orientation, weak induced current, ion metabolism and cell signal channel, which has broad application prospects in the field of cell culture. In this paper, bone marrow mesenchymal stem cells were cultured in magnetic field carbon dioxide incubator, and the changes of cell proliferation activity, alkaline phosphatase activity, osteocalcin content and other physical and chemical properties under different stable magnetic fields were compared. The effects of stable magnetic fields on cell proliferation and differentiation were explored, and technical guidance was provided for the future application of this equipment in the field of in vitro cell culture.

Keywords: static magnetic field; bone marrow mesenchymal stem cells; proliferation; osteogenic differentiation

1 仪器设备

磁场二氧化碳培养箱（MFC10）如图 1 所示，包括壳体、样品腔体、磁场发生器、PLC 控制装置、温度传感器、二氧化碳传感器和温度控制装置。磁场二氧化碳培养箱可实现磁场、温度、二氧化碳等参数的实时监测和自动控制。可针对性用于动植物细胞代谢相关的离子通道、细胞培养等。



图 1 磁场冷冻冷藏箱

表 1 磁场冷冻冷藏箱技术参数

指标	仪器性能
磁场类型	恒稳磁场
磁场强度	0~10 mT
温度	RT~60 °C
CO ₂ 浓度	0~20%
腔体容积	50 L
输入电压	220 V

2 预处理流程及分析方法

2.1 骨髓间充质干细胞的分离和培养

参照宋国丽^[1]和王嘉琪^[2]等人的方法，将大鼠浸泡于 75%乙醇中，窒息后处死，在无菌条件下分离小鼠胫骨和股骨，用含有 10%NBS 的 α -MEM 培养基冲洗骨髓腔，收集培养液于 10 mL 离心管，4 °C，3000 r/min 离心 5 min，弃上清后，加入含有 10%NBS 的 α -MEM 培养基制备骨髓细胞悬液，37 °C，5%CO₂ 培养箱中静置培养。48 h 后更换培养基，之后每隔 72 h 更换，待细胞生长融合至 80%以上，利用 0.25%胰蛋白酶消化后传代培养，传代后待单层细胞融合率达到 80%以上时，进行成骨性诱导。

2.2 细胞磁场环境培养

取第一代传代后的细胞 (P1), 以 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 的密度接种于 6 孔板, 每孔 2 mL, 设置对照组和磁场组, 每组 3 个重复孔。磁场组接种于细胞培养板后, 置于 37°C , 5% CO_2 磁场二氧化碳培养箱, 在 1.0、3.0 和 5.0 mT 的低强静磁场环境下, 每天处理 1 h、3 h 和 6 h 后关闭磁场环境继续培养; 对照组在无磁场的相同环境下进行细胞培养。

2.3 MTT 法检测细胞增殖活性

取第一代传代后的细胞 (P1), 以 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 的密度接种于 6 孔板, 每孔 2 mL, 每组 3 个重复孔, 接种 12 h 后, 进行磁场环境和对照培养, 继续培养 48 和 72 h 后, 弃培养液, 加入 $400\ \mu\text{L}$, 0.5%MTT 的无血清培养基, 37°C 下孵育 4 h, 弃去培养液, 每孔加入 2 mL 二甲亚砜, 振荡 10 min, 待紫色结晶彻底溶解后, 于 570 nm 处测定吸光值。

2.4 细胞成骨性分析

取第一代传代后的细胞 (P1), 以 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 的密度接种于 6 孔板, 每孔 2 mL, 每组 3 个重复孔, 每 3 天换一次培养液, 当细胞融合 80% 加入 1 mL 成骨性诱导剂 ($1 \times 10^{-7}\ \text{mol/L}$ 地塞米松、10 mmol/L β -甘油磷酸钠和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗坏血酸), 分别在磁场环境和对照环境下进行成骨诱导培养。

2.5 ALP 活性检测

细胞成骨诱导培养 3、6、9 和 12 天时分别测定各组细胞 ALP 活性, 6 孔板弃培养液, 每孔加入基质液和缓冲液各 0.4 mL 充分摇匀, 于 37°C 孵育 30 min, 加入 1.2 mL 的显色液摇匀后显色, 于 507 nm 处测定吸光值, 换算成金氏单位 U/100 mL。

2.6 骨钙素含量测定

在磁场环境下培养 3、6、9 和 12 天时分别测定各组细胞骨钙素含量, 弃培养液, PBS 漂洗后加入 2 mL, 1 mol/L 的 HCl, 振荡 24 h 后 3000 r/min 离心 5 min 后取上清液, 每孔加入显色剂 1 mL 充分摇匀, 37°C 孵育 30 min, 于 450 nm 处测定吸光值, 计算其骨钙素含量。

2.7 数据分析

使用 ORIGIN8.5 制图, SPSS22.0 进行数据分析。每个样品重复检测 3 次, 取平均值。

3 磁场二氧化碳培养案例分析

3.1 低强静磁场对大鼠 BMSCs 增殖活力的影响

低强静磁场环境下培养 BMSCs, 细胞增殖活力显著高于对照组。从表 2 中可以发现, 磁场环境下, 细胞增殖活力与磁场强度呈正相关。与对照相比, 5 mT 磁场环境下每天间歇

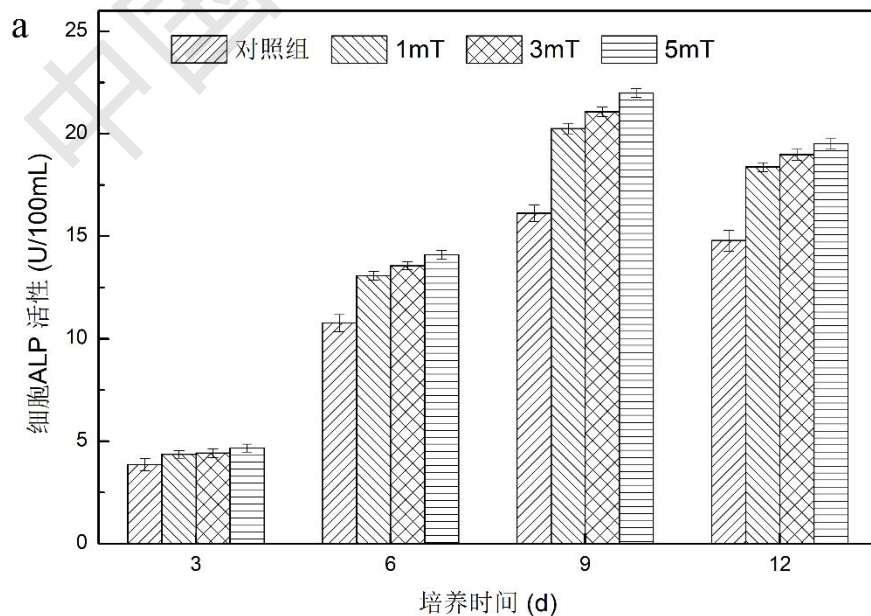
处理 3 h, 72 h 后 BMSCs 增殖活力提高 55.2%, 而每天间歇处理 6 h, 72 h 后 BMSCs 增殖活力增加 48.3%, 细胞增殖活力略有下降。低强磁场对细胞增殖具有促进作用^[3], 细胞活性增强。

表 2 不同磁场环境下培养对 BMSCs 增殖活力的影响 (OD)

组别	48 h	72 h
对照组	0.458 ± 0.018	0.576 ± 0.021
1 h 组-1 mT	0.582 ± 0.017	0.732 ± 0.021
1 h 组-3 mT	0.617 ± 0.014	0.773 ± 0.020
1 h 组-5 mT	0.635 ± 0.021	0.801 ± 0.014
3 h 组-1 mT	0.598 ± 0.010	0.767 ± 0.015
3 h 组-3 mT	0.658 ± 0.011	0.829 ± 0.025
3 h 组-5 mT	0.771 ± 0.024	0.874 ± 0.026
6 h 组-1 mT	0.596 ± 0.013	0.754 ± 0.019
6 h 组-3 mT	0.642 ± 0.023	0.797 ± 0.016
6 h 组-5 mT	0.679 ± 0.019	0.833 ± 0.023

3.2 低强静磁场对大鼠 BMSCs 种 ALP 活性的影响

BMSCs 可分泌类骨质和 ALP 等促钙化物质, ALP 活性的高表达是成骨细胞分化的重要标志^[4]。磁场环境下培养 BMSCs, 细胞的 ALP 显著提高。从图 2 中可以发现, 细胞成骨诱导培养过程中, 各组 ALP 活性呈现先增加后下降的趋势。相同磁场环境下, 磁场环境下每天处理 3 h, 细胞 ALP 活性高于每天处理 1 h 和 6 h。细胞 ALP 活性随磁场强度的增加而增大, 5 mT 的低强静磁场对细胞 ALP 活性具有促进作用。与对照相比, 5 mT 磁场环境下每天处理 3 h, 培养 9 天时细胞 ALP 活性增加 55.6%。磁场环境下, ALP 等促钙化物质表达增加, 有利于诱导细胞成骨分化。



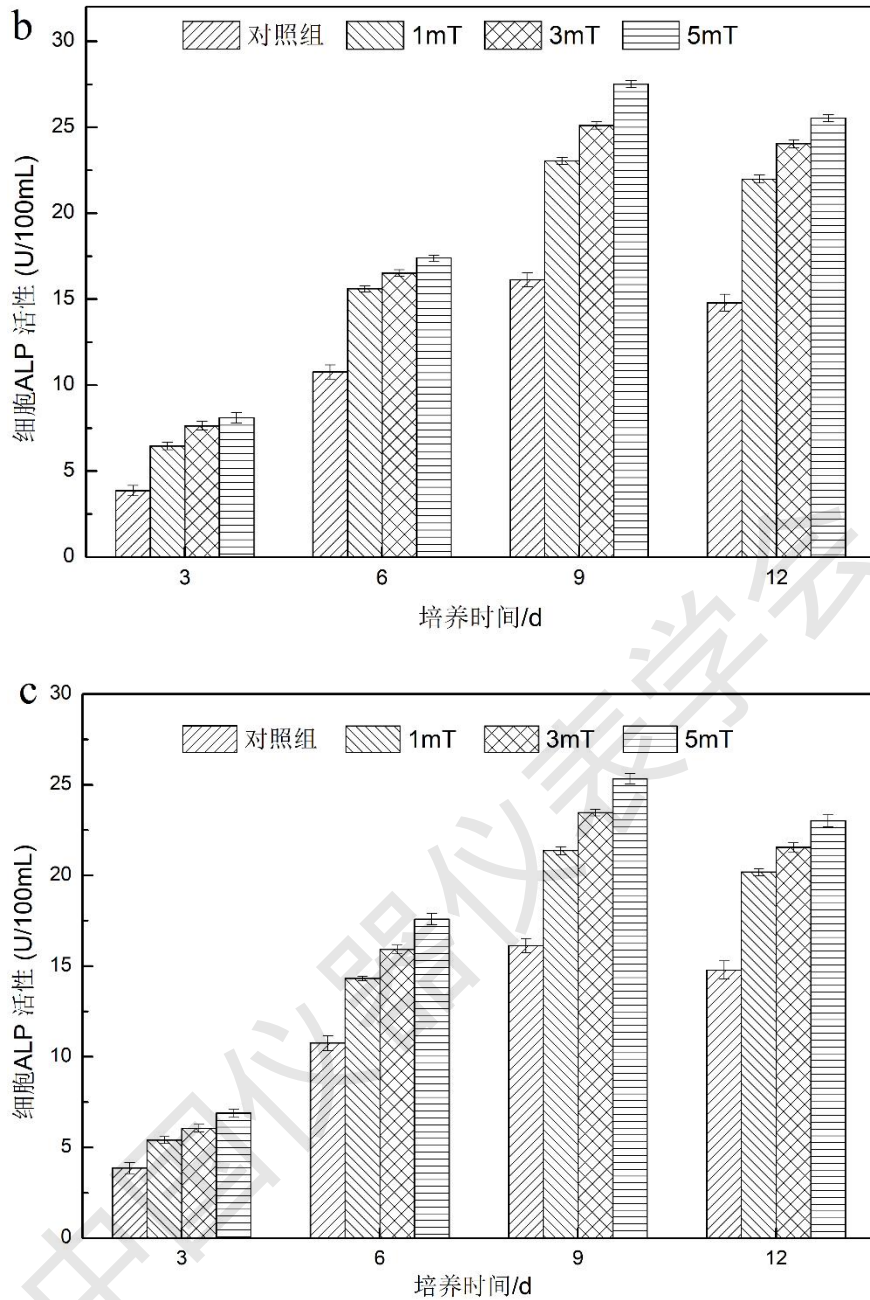


图2 不同磁场环境下骨髓间充质干细胞 ALP 的活性

a: 磁场环境间歇处理 1 h/天; b: 间歇磁场环境间歇处理 3 h/天; c: 磁场环境间歇处理 6 h/天。

3.3 低强静磁场对大鼠 BMSCs 种骨钙素含量的影响

骨钙素是成骨分化过程中的关键蛋白分子，与骨髓间充质干细胞培养期间 ALP 活性变化相似^[5]。从表 3 中可以发现，磁场环境下，细胞成骨培养 6 天后，细胞分泌骨基质，结合钙磷元素发生钙化并沉积，且随着培养时间的延长，骨钙素含量增加，5 mT 磁场环境下每天处理 3 h，骨钙素含量增加 52.8%。培养 9 天后，细胞 ALP 活性下降，骨钙素含量减少。细胞骨钙素呈现明显的磁场强度依赖性，随磁场强度的增加，骨钙素含量升高。磁场环境可显著提高大鼠 BMSCs 中骨钙素含量，细胞成骨分化效果增强。

表 3 不同磁场环境下培养对 BMSCs 细胞骨钙素含量的影响 ($\mu\text{g/L}$)

组别	3 d	6 d	9 d	12 d
对照组	36.223±1.268	64.512±1.594	97.554±2.516	89.741±3.210
1 h 组-1 mT	38.453±1.125	72.154±0.987	113.412±3.512	106.752±2.758
1 h 组-3 mT	40.521±2.013	81.114±1.756	128.754±2.458	115.153±2.013
1 h 组-5 mT	41.945±1.041	85.741±2.784	139.143±3.112	133.415±2.974
3 h 组-1 mT	39.256±1.125	74.279±0.974	121.456±2.101	114.028±1.421
3 h 组-3 mT	43.118±1.985	85.067±1.213	137.841±1.115	124.514±1.005
3 h 组-5 mT	45.778±2.046	94.141±2.103	149.053±1.215	141.017±1.138
6 h 组-1 mT	38.978±1.754	73.047±0.972	118.145±2.874	112.099±0.784
6 h 组-3 mT	42.887±1.104	84.165±1.352	135.064±1.846	121.018±2.017
6 h 组-5 mT	44.157±0.976	91.076±1.114	146.118±1.210	137.549±1.553

4 结论

骨髓间充质干细胞是生物医学和组织工程中重要的种子细胞,其增殖和成骨分化受到人们的广泛关注。以骨髓间充质干细胞为研究对象,在不同恒稳磁场环境下培养,对比磁场组与对照组,磁场环境下间歇处理对其增殖活力、碱性磷酸酶活性和骨钙素含量具有促进作用。恒稳磁场环境为体外细胞培养提供了一种新方法。

参考文献:

- [1] 宋国丽,周翠红,张宇,等. 静磁场对骨髓间充质干细胞增殖及骨向分化的影响[J]. 中国康复理论与实践,2014(4):322-326.
- [2] 王嘉琪,葛宝丰,马晓妮,等.静磁场不同处理时间对体外培养成骨细胞增殖与分化的影响[J].中国骨伤,2012,25(11):931-936.
- [3] Van Huizen A, Morton J M , Kinsey L J , et al. Weak magnetic fields alter stem cell-mediated growth[J]. Science Advances, 2019, 5(1):eaau7201.
- [4] Bloise N,Petecchia L,Ceccarelli G, et al. The effect of pulsed electromagnetic field exposure on osteoinduction of human mesenchymal stem cells cultured on nano-TiO₂ surfaces. [J]. PloS one,2018,13(6): e0199046.
- [5] Zhao W , Ma W , Hua W . The effects of magnetic fields on the differentiation and intracellular free calcium of bone marrow mesenchymal stem cells[C]// Automation Congress. IEEE, 2008.