

· 基础研究 ·

工频磁场对不同细胞密度人骨肉瘤细胞 MG-63 体外增殖的影响

赵文春 吴华 马伟明 郝海虎 张海军 胡安

【摘要】目的 研究工频磁场对不同细胞密度人骨肉瘤细胞 MG-63 体外增殖的影响,为揭示磁场所致生物学效应的作用机制提供实验依据。**方法** 在某一细胞密度下(0.90×10^4 个/ml),用不同磁感应强度(1 mT、2 mT、3 mT、4 mT)的工频磁场对 MG-63 细胞进行体外辐射,然后改变细胞密度进行重复实验(细胞接种密度分别为 0.95×10^4 个/ml、 1.00×10^4 个/ml、 1.10×10^4 个/ml 和 1.50×10^4 个/ml)。完成磁场辐射处理后,采用四唑盐比色法(MTT 法)检测细胞增殖水平。**结果** 磁场对 MG-63 细胞的增殖有明显的诱导效应,不同细胞密度所对应的磁效应明显不同,其中 2 mT 磁刺激组的增殖诱导效应最显著。**结论** 工频磁场对 MG-63 细胞体外增殖的影响不仅与磁场强度有关,也与细胞密度密切相关。

【关键词】 工频磁场; 人骨肉瘤细胞 MG-63; 增殖; 细胞密度

The effect of exposure to 50 Hz magnetic fields on the proliferation of different cell densities of human MG-63 osteosarcoma cell line in vitro ZHAO Wen-chun*, WU Hua, MA Wei-ming, HAO Hai-hu, ZHANG Hai-jun, HU An. * Power and Electronics Research Institute, Naval University of Engineering, Wuhan 430033, China

【Abstract】Objective To study the effects of 50 Hz magnetic fields on the in vitro proliferation of human osteosarcoma cell line MG-63 with different cell densities. **Methods** Four different magnetic intensities (1 mT, 2 mT, 3 mT, 4 mT) were used to stimulate the cells, and the experiment was repeated with different cell densities. The method of MTT was employed to evaluate the level of proliferation. **Results** Fifty Hz magnetic fields significantly affected the level of proliferation of human osteosarcoma cell line MG-63, and the 2 mT intensity exerted the greatest influence on it. The effects of the magnetic field differed with different cell densities. **Conclusion** The effect of 50 Hz magnetic fields on the in vitro proliferation of human osteosarcoma cell line MG-63 was not only related to the magnetic intensity, but also the cell density.

【Key words】 Fifty Hz magnetic fields; Human osteosarcoma cell line MG-63; Proliferation; Cell density

20 世纪 70 年代以来,脉冲电磁场作为一种非侵入性方法治疗骨折延期愈合及骨不连,因其具有显著的疗效而在矫形外科领域日益受到重视^[1]。但对于磁效应的机制,现仍不明确。机制研究的前提是明确相应的磁效应特征和磁效应窗口参数。人骨肉瘤细胞 MG-63 具有成骨细胞特性,能在体外稳定地增殖并较好地表达成骨细胞特征蛋白,而且 MG-63 细胞具有成熟的细胞系,无需原代培养,故能节省实验时间,提高实验效率。为此,我们利用工频磁场刺激 MG-63 细胞,研究其体外增殖,以探索电磁参数及相关因子对 MG-63 细胞体外增殖的影响,期望为细胞磁效应机制的论证提供实验依据,并最终为电磁场促进骨折愈合的临床应用提供理论依据。

材料与方法

一、实验仪器与试剂

实验试剂均为美国 Sigma 公司产品,包括 RPMI1640 培养基、优质小牛血清、胰酶、四甲基偶氮唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)和二甲基亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO)。检测仪器包括日本产 Olympus 倒置相差显微镜,华东电子管厂产 DG3022A 型酶联免疫检测仪,磁场发生器由海军工程大学电力电子技术研究所设计与制造。

二、细胞培养

人骨肉瘤细胞 MG-63 购自武汉大学中国经典培养物保藏中心,接种于 50 ml 含 10% 小牛血清的培养瓶中,置于条件为 37℃、5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养,当细胞铺满瓶底约 80% 时开始传代与接种。

三、工频磁场的产生

我们将市电变压后通过 Helmholtz 线圈产生工频磁场。Helmholtz 线圈能在其中部产生 4 阶均匀度的

基金项目:国家自然科学基金项目(50477043)

作者单位:430033 武汉,海军工程大学电力电子技术研究所(赵文春、马伟明、胡安);华中科技大学同济医学院附属同济医院骨科(吴华、郝海虎、张海军)

均匀磁场。本研究采用的 Helmholtz 线圈由一对同向串联且对称平行的圆环状铜线绕组构成,两绕组匝数均为 262 匝,两圆环间的距离等于圆环半径,其值为 10 cm。Helmholtz 线圈两绕组中心对称点的磁感应强度为 B_0 , $B_0 = \frac{N \cdot \mu_0 \cdot I \cdot R^2}{(R^2 + d^2)^{3/2}}$, 式中 N 为单个绕组匝数,

μ_0 为真空磁导率, I 为通过两绕组的电流强度, R 为绕组半径, $d = R/2$, 为两平行绕组中心对称点到单个绕组中心点的距离。将 $R = 10 \text{ cm}$, $N = 262$ 代入该式可得 $B_0 = 2.356 I (\text{mT})$ 。通过理论分析、计算以及霍尔效应测磁仪测量, 磁场发生器磁感应强度均匀性和稳定性良好。

四、磁刺激方法

每次实验取 2 瓶培养好的细胞, 消化混匀后, 调整细胞密度为所需值, 以 $200 \mu\text{l}$ /孔接种于 5 块 96 孔培养板中, 并依次将其分为 1 个对照组和 4 个磁刺激组。接种后 36 h, 待细胞贴壁完全、处于对数生长期时, 将磁刺激组细胞置于 Helmholtz 线圈中心给予磁场辐射。选择工频磁场, 作用方向与培养板各孔底平行, 每次辐射时间为 30 min, 每天 2 次, 中间间隔 11.5 h, 持续 3 d。4 个磁刺激组的磁感应强度分别设定为 1 mT、2 mT、3 mT 和 4 mT (有效值)。磁场辐射时, Helmholtz 线圈置于条件为 37°C 、5% CO_2 、饱和湿度的培养箱中, 对照组置于另一个条件相同的培养箱中, 但不予以磁场辐射。实验共进行 6 次, 前 2 次为重复性实验, 细胞接种密度均设定为 0.90×10^4 个/ml; 第 3 ~ 6 次实验的细胞接种密度分别为 0.95×10^4 个/ml、 1.00×10^4 个/ml、 1.10×10^4 个/ml 和 1.50×10^4 个/ml。

五、检测方法

在整个实验过程中用倒置相差显微镜跟踪观察细胞形态与生长状况。完成磁场辐射处理后, 采用四唑盐比色法 (MTT 法) 检测细胞增殖水平。先于每孔加入 5 mg/ml 的 MTT 溶液 $20 \mu\text{l}$, 37°C 避光培养 4 h 后, 小心吸取上清; 然后于每孔加入 DMSO $150 \mu\text{l}$, 充分振荡 10 min 使紫色结晶物溶解; 最后在酶标仪上检测 490 nm 波长处每孔的吸光度 (OD_{490}) 值。

六、统计学分析

所有数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 应用 SPSS 13.0 版统计软件, 采用单因素方差分析进行统计学分析。

结 果

一、MG-63 形态学观察

倒置相差显微镜下观察到: 接种于 96 孔板的细胞约 6 h 开始贴壁, 伸展成饱满梭形, 约 24 h 完全贴壁。磁刺激期间可见各孔细胞形态、长势均良好。

二、磁场辐射对 MG-63 细胞体外增殖的影响

6 次增殖实验的结果数据见表 1。为了进行更直观的比较, 我们对结果数据进行了相应的处理并绘制图 1 和图 2。图 1 表示磁刺激组与对照组比较所得的相对值, 反映各磁刺激组促进或抑制增殖的程度; 图 2 表示各组实际吸光度值 (对应细胞密度)。

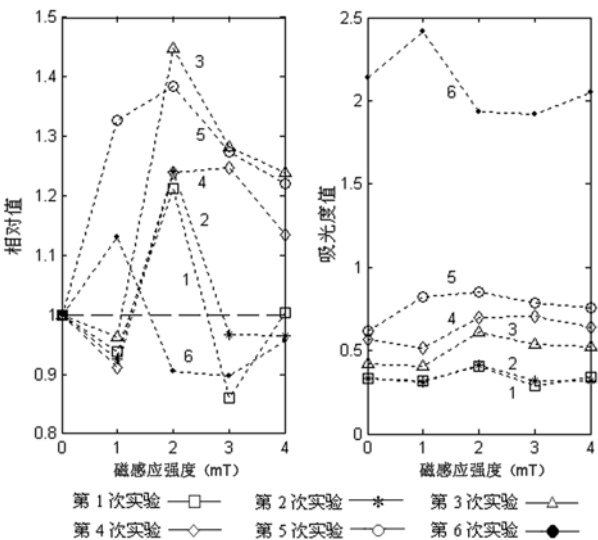


图 1 不同细胞密度下磁刺激组与对照组的吸光度比值比较 图 2 不同细胞密度下吸光度值比较

图 1 显示: 在 1 mT 磁场辐射下, 细胞接种密度较低的前 4 次实验均呈现出较弱的抑制效应, 而细胞接种密度相对较高的第 5、6 次实验呈现出较强的促增殖效应; 磁感应强度为 2 mT 时, 前 5 次实验均呈现出较强的促增殖效应, 而细胞接种密度最高的第 6 次实验却呈现抑制效应; 磁感应强度为 3 mT 时, 第

表 1 不同细胞接种密度下不同强度工频磁场影响 MG-63 细胞增殖结果 (OD_{490} 值, $\bar{x} \pm s$)

组 别	细胞密度 (10^4 个/孔)					
	0.90	0.90	0.95	1.00	1.10	1.50
对照组	0.335 $\pm$ 0.142	0.331 $\pm$ 0.093	0.420 $\pm$ 0.114	0.564 $\pm$ 0.111	0.617 $\pm$ 0.100	2.139 $\pm$ 0.417
磁刺激组						
1 mT	0.315 $\pm$ 0.076 ^a	0.307 $\pm$ 0.070 ^a	0.404 $\pm$ 0.104	0.515 $\pm$ 0.075 ^a	0.819 $\pm$ 0.179 ^b	2.418 $\pm$ 0.386 ^a
2 mT	0.407 $\pm$ 0.142 ^a	0.412 $\pm$ 0.159 ^a	0.608 $\pm$ 0.127 ^b	0.700 $\pm$ 0.160 ^b	0.854 $\pm$ 0.143 ^b	1.935 $\pm$ 0.425 ^a
3 mT	0.288 $\pm$ 0.102 ^a	0.320 $\pm$ 0.053	0.539 $\pm$ 0.091 ^b	0.704 $\pm$ 0.144 ^b	0.786 $\pm$ 0.139 ^b	1.921 $\pm$ 0.390 ^a
4 mT	0.337 $\pm$ 0.110	0.320 $\pm$ 0.057	0.521 $\pm$ 0.130 ^b	0.640 $\pm$ 0.188 ^a	0.753 $\pm$ 0.122 ^b	2.048 $\pm$ 0.438

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$

3,4,5 次实验呈现促增殖效应,而细胞接种密度最低与最高的第 1,6 次实验呈现出较弱的抑制效应;磁感应强度为 4 mT 时,第 3,4,5 次实验呈现促增殖效应,另外 3 次实验与对照组比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

图 2 显示:除了细胞接种密度相同的第 1,2 次实验外,其它各次实验对应各磁场强度窗口的增殖变化趋势并不相同。细胞接种密度越接近,其对应于各个磁场强度窗口的磁效应变化趋势也越相似,细胞接种密度相同的第 1,2 次实验的变化趋势基本吻合;细胞接种密度变化较大的第 6 次实验的变化趋势与前 5 次实验相比,有较明显的不同。

讨 论

骨折、骨折延期愈合及骨不连的临床治疗甚为棘手,传统植骨所用的自体骨或同种异体骨均是没有生命力的死骨,需要依赖人体对植入“死骨”的改造,因此成功率并不令人满意。骨髓间充质干细胞 (mesenchymal stem cell, MSC) 具有自我更新和多向分化的潜能,国内外一些学者试图利用 MSC 的这一特性建立骨组织的体外定向分化模型,为人体提供无排斥反应的自体资源。但目前骨外科领域的研究显示,利用自体 MSC 来修复肌肉骨骼系统的缺损,其在促生长因子的可控性及有效性等技术性能的把握上仍不理想^[2]。

为了揭示电磁场诱导成骨的生物理化机制,研究者们做了大量的体外实验。Sollazzo 等^[3]研究了低能量低频脉冲磁场对人的成骨细胞及骨肉瘤细胞 MG-63 增殖的影响,发现血清浓度在其中起了一定作用。Fitzsimmons 等^[4]给体外培养的鸡颅骨细胞施加电容耦合式正弦电场,测得频率为 16 Hz 的电场促进细胞生长的作用最显著;并且发现将被辐射的实验组培养基换给未经辐射的实验组后,后者的细胞生长也显著增快,因此他们认为电场作用可刺激有丝分裂素释放,进而提高细胞增殖水平。Guzelsu 等^[5]利用自行研制的磁场发生器研究了低频电磁场对细胞环腺苷磷酸酶 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 活性及 DNA 合成等的影响,认为电磁场首先激活骨细胞内的 cAMP 系统,然后依次活化各种酶系统,再由各种酶系统激活骨细胞,产生特殊的生理作用,因此可认为电磁刺激具有类似内分泌激素的作用,对骨细胞提供一种细胞外信息。此外,Liboff 等^[6]认为,电磁场首先作用于细胞膜,然后通过酶的级联反应将信息传

给第二信使,进而达到细胞核,引起 DNA 变化。

从本实验结果,我们可以得出:(1)在细胞接种密度相同的情况下,磁效应的变化趋势基本吻合,说明本实验具有较好的可重复性。(2)不同强度的磁场辐射,既可能引起促增殖效应,也可能引起抑制效应,而且磁效应与磁场强度之间具有非线性关系,即存在窗口效应。(3)在相同强度磁场窗口下,细胞接种密度不同,磁效应可能产生不同的效果。当细胞密度相近时,磁效应的变化趋势基本相同;密度越接近,磁效应变化趋势越相似;当细胞密度相差较大时,甚至会出现相反的结果。这充分说明磁效应不仅取决于磁场窗口,也与细胞密度有关。(4)MG-63 细胞在密度为 $(0.90 \sim 1.10) \times 10^4$ 个/孔时,在断续刺激模式(每天刺激 2 次,每次 30 min,中间间隔 11.5 h,持续 3 d)下,磁感应强度有效值为 2 mT 的磁场窗口的促增殖效果较好。

目前,电磁诱导成骨的机制研究仍在广泛而深入地进行,且不断有新的报道出现,但一些研究只能从某个侧面说明电磁场作用下细胞局部行为的变化,并不能从本质上对机制作出解释。本研究探讨了工频磁场对 MG-63 细胞体外增殖的影响,对于不同频率、不同波形电磁场的磁效应将作为今后进一步深入研究的任务。

参 考 文 献

- [1] Bassett CAL, Pilla AA, Pawluk T. A non-operative salvage of surgically-resistant pseudarthrosis and non-unions by pulsing electromagnetic fields. A preliminary report. Clin Orthop, 1977, 124:128-142.
- [2] Im GI, Kim DY, Shin JH, et al. Repair of cartilage defect in the rabbit with cultured mesenchymal stem cells from bone marrow. J Bone Joint Surg Br, 2001, 83:289-294.
- [3] Sollazzo V, Traina GC, DeMattei M, et al. Responses of human Mg-63 osteosarcoma cell line and human osteoblast-like cells to pulsed electromagnetic fields. Bioelectromagnetics, 1997, 18:541-547.
- [4] Fitzsimmons RJ, Farley JR, Adey WR, et al. Frequency dependence of increased cell proliferation, in vitro, in exposure to a low-amplitude, low-frequency electric field; evidence for dependency on increased mitogen activity released into culture medium. J Cell Physiol, 1989, 139:586-591.
- [5] Guzelsu N, Salkind AJ, Shen X, et al. Effect of electromagnetic stimulation with different waveforms on cultured chick tendou fibroblasts. Bioelectromagnetics, 1994, 15:115-131.
- [6] Liboff AR, Mcleod BR. Kinetics of channelized membrane ions in magnetic fields. Bioelectromagnetics, 1988, 9:39-51.

(修回日期:2006-10-20)

(本文编辑:吴 倩)