

· 基础研究 ·

极低频电磁场对成骨细胞增殖与分化的影响

张晓军 张建保 文峻 屈学民

【摘要】目的 研究极低频电磁场(ELFEMF)的生物学效应,探讨 ELFEMF 特征参数对新生大鼠成骨细胞的影响。**方法** 采用不同强度、频率和占空比的 ELFEMF 作用于大鼠颅骨成骨细胞,检测成骨细胞的增殖与分化指标。**结果** ELFEMF 生物效应存在强度、频率、占空比窗口,频率为 15 Hz、磁感应强度为 5 mT、占空比为 15% 的 ELFEMF 可以显著提高成骨细胞的增殖率、降低其分化能力。**结论** ELFEMF 对成骨细胞的影响依赖于电磁场的特征参数,对成骨细胞的增殖与分化而言,磁感应强度 5 mT、频率 15 Hz、占空比 15% 可能为一组合适的参数。

【关键词】 电磁场; 成骨细胞; 增殖; 分化

The effects of extremely low frequency rectangular pulsed electromagnetic fields on rat osteoblast ZHANG Xiao-jun*, ZHANG Jian-bao, WEN Jun, QU Xue-min. * Department of Physics, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

【Abstract】 Objective To investigate of the biological effects of the extremely low frequency electromagnetic fields (ELFEMF), and to explore the effect of rectangular ELFEMF performance parameters on rat fetal skull osteoblast. **Methods** Different amplitude, frequency and duty cycle of rectangular ELFEMF were used on rat fetal skull osteoblast and the proliferation and differentiation of osteoblast were examined. **Results** There existed action windows of amplitude and frequency with regard to the biological effect of rectangular ELFEMF. The 15 Hz, 5 mT and 15% duty cycle could significantly promote the proliferation and decrease differentiation of the cells. **Conclusion** The proliferation and differentiation of osteoblast could be affected by rectangular ELFEMF characterized by its amplitude, frequency and duty cycle. This study indicated that rectangular ELFEMF of 15 Hz, 5 mT and 15% duty cycle was suitable for the proliferation and differentiation of osteoblast in vitro.

【Key words】 Electromagnetic fields; Osteoblast; Proliferation; Differentiation

自从 1977 年 Bassett 等^[1]提出采用极低频电磁场(extremely low frequency electromagnetic fields, ELF-EMF)治疗骨不连,并在临床上取得满意的效果以来,ELFEMF 对骨组织的作用一直受到相关学者的重视^[2-4]。为了阐明其治疗机理并提高疗效,很多学者研究了 ELFEMF 对成骨细胞增殖与分化的影响^[5]。为了探讨 ELFEMF 生物效应的机理,寻找影响成骨细胞生理功能的合适电磁场参数,我们研制了一种能产生不同刺激波形,且频率、强度等特性参数均可调的电磁刺激仪,并应用该仪器来研究 ELFEMF 的特征参数对新生大鼠颅骨成骨细胞增殖与分化的影响。

材料与方法

一、主要试剂与仪器

主要试剂:美国 Gibco 公司产 DMEM 培养基、美国 Sigma 公司产 MTT、杭州四季青生物制品公司提供的

新生牛血清、北京中生北控生物科技股份有限公司提供的碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)试剂盒、华美生物工程公司提供的 Triton X-100。主要仪器:国营华东电子管厂生产的酶联免疫检测仪、自行研制的极低频电磁场刺激仪。

二、方法

(一)成骨细胞的培养

无菌条件下,取出生 24 h 内的 Sprague-Dawley 大鼠颅盖骨(购于第四军医大学实验动物中心),放入 PBS 溶液中,剔除骨表面被膜及软组织后将骨剪成小块,以 1.25 g/L 胰蛋白酶消化 20 min,然后用含 10% 血清的 DMEM 培养基冲洗 2 遍,剪成 1 mm × 1 mm × 1 mm 的小骨片,接种于培养瓶中。待细胞长满培养瓶壁时传代培养,传至第 2 代时用差速粘附法^[6]除去成纤维细胞。

(二)ELFEMF 的产生

采用我们自行研制的极低频电磁场刺激仪,可产生 ELFEMF。电磁场刺激仪由两部分组成,一部分是波形发生装置,可产生频率为 0 ~ 150 Hz(连续可调)、输出电流为 0 ~ 10 A(连续可调)的矩形波;另一部分

基金项目:国家自然科学基金资助课题(No. 60171030)

作者单位:710032 西安,第四军医大学生物医学工程系物理学教研室(张晓军、文峻、屈学民);西安交通大学生物医学工程研究所(张建保)
通讯作者:张建保

为密绕的螺线管,其内径为 5 cm、长度为 50 cm,可以保证螺线管中心附近轴线上的磁场基本均匀。根据磁感应强度 $B = \mu_0 \cdot n \cdot I$ (μ_0 为真空中的磁导率, n 为匝数, I 为电流强度) 进行计算,螺线管内相应的磁感应强度为 0 ~ 50 mT。

(三) 细胞分组及处理

取第 4 代成骨细胞,用胰蛋白酶消化,以含 10% 血清的 DMEM 培养基稀释成浓度为 5×10^4 个/ml 的细胞悬液,以每孔 200 μ l 接种于特制的 96 孔培养板(可裁开使用)。将细胞分为不同磁感应强度组、不同频率组和不同占空比组,每组又分为 5 ~ 6 个亚组。不同磁感应强度组细胞的作用参数为:频率 15 Hz, 占空比 15%, 磁感应强度分别为 0 mT、0.5 mT、1 mT、5 mT、10 mT 和 20 mT; 不同频率组细胞的作用参数为:磁感应强度 5 mT, 占空比 15%, 频率分别为 0 Hz、15 Hz、50 Hz、72 Hz 和 140 Hz; 不同占空比组的作用参数为:磁感应强度 5 mT, 频率为 15 Hz, 占空比分别为 0%、15%、38%、50%、62% 和 85%。每亚组取 8 个平行孔,并有相应的对照。

各组细胞于培养第 2 天,分别置于螺线管中心位置,选择相应的参数进行电磁场刺激,每次作用 30 min,每日 1 次,连续刺激 2 d。

三、观测指标

1. 成骨细胞增殖检测:采用 MTT 法^[7],细胞培养第 4 天,于特制的 96 孔培养板中加入 5 mg/ml 的 MTT 溶液,每孔 20 μ l,37℃ 下作用 4 h。吸尽 DMEM 培养基后,每孔加入二甲基亚砷 150 μ l,振荡 10 min,采用酶联免疫检测仪(波长为 490 nm)检测光密度(OD)值。

2. 成骨细胞 ALP 活性检测^[8]:细胞培养第 4 天,吸尽培养板内的 DMEM 培养基,PBS 冲洗 3 次,每孔内加入 3 ml/L 的 Triton X-100 溶液 50 μ l,4℃ 过夜后每孔加入 ALP 底物 100 μ l,37℃ 下继续孵育 40 min,每孔再加入 5 g/L 氢氧化钠溶液 50 μ l,用酶联免疫检测仪(波长为 410 nm)检测光密度(OD)值。

四、统计学分析

实验数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用 t 检验进行统计学分析。

结 果

一、成骨细胞增殖检测结果

不同强度、频率以及占空比的 ELFEMF 刺激下细胞增殖的变化见表 1 ~ 3。在频率为 15 Hz、占空比为 15% 的 ELFEMF 作用下,当强度较高(20 mT)或较低(0.5 mT)时,均不能引起细胞增殖的改变,但适中强度(1, 5, 10 mT)的作用则可使细胞的增殖能力显著增加。在强度为 5 mT、占空比为 15% 的 ELFEMF 作用下,频率

为 15 Hz 或 72 Hz 时,可显著促进细胞的增殖。在 15 Hz、5 mT 的 ELFEMF 作用下,占空比为 15% 或 50% 时,对成骨细胞增殖的促进作用最为明显。

二、成骨细胞 ALP 活性检测结果

不同强度、频率以及占空比的 ELFEMF 作用下,表示细胞分化程度的 ALP 活性变化见表 1 ~ 3。在频率为 15 Hz、占空比为 15% 的 ELFEMF 作用下,磁感应强度为 1, 5 或 10 mT 时,可使细胞的分化能力减弱。在强度为 5 mT、占空比为 15% 的 ELFEMF 作用下,频率为 15 Hz 或 72 Hz 时可显著抑制细胞的分化。在 15 Hz、5 mT 的 ELFEMF 作用下,除占空比为 62% 外,其余所选占空比对成骨细胞的分化均有抑制作用,且占空比为 15% 和 50% 时对成骨细胞的作用最明显。

表 1 频率为 15 Hz、占空比为 15% 时不同磁感应强度对成骨细胞增殖与分化的影响(OD 值, $\bar{x} \pm s$)

磁感应强度 (mT)	检测指标	
	成骨细胞增殖情况	成骨细胞 ALP 活性
0	0.392 $\pm$ 0.017	0.138 $\pm$ 0.010
0.5	0.386 $\pm$ 0.064	0.132 $\pm$ 0.017
1	0.400 $\pm$ 0.018 *	0.115 $\pm$ 0.015 #
5	0.417 $\pm$ 0.029 #	0.123 $\pm$ 0.018 *
10	0.439 $\pm$ 0.024 #	0.121 $\pm$ 0.017 *
20	0.402 $\pm$ 0.037	0.129 $\pm$ 0.008

注:与磁场强度为 0 mT 的细胞比较, * $P < 0.05$, # $P < 0.01$

表 2 磁感应强度为 5 mT、占空比为 15% 时不同频率对成骨细胞增殖与分化的影响(OD 值, $\bar{x} \pm s$)

频率(Hz)	检测指标	
	成骨细胞增殖情况	成骨细胞 ALP 活性
0	0.231 $\pm$ 0.014	0.222 $\pm$ 0.013
15	0.250 $\pm$ 0.016 *	0.185 $\pm$ 0.019 #
50	0.218 $\pm$ 0.028	0.218 $\pm$ 0.016
72	0.285 $\pm$ 0.011 #	0.208 $\pm$ 0.011 *
140	0.246 $\pm$ 0.012 *	0.203 $\pm$ 0.016

注:与频率为 0 Hz 的细胞比较, * $P < 0.05$, # $P < 0.01$

表 3 磁感应强度为 5 mT、频率为 15 Hz 时不同占空比对成骨细胞增殖与分化的影响(OD 值, $\bar{x} \pm s$)

占空比(%)	检测指标	
	成骨细胞增殖情况	成骨细胞 ALP 活性
0	0.395 $\pm$ 0.028	0.172 $\pm$ 0.008
15	0.479 $\pm$ 0.021 *	0.140 $\pm$ 0.014 *
38	0.408 $\pm$ 0.037	0.149 $\pm$ 0.009 *
50	0.428 $\pm$ 0.032 #	0.136 $\pm$ 0.023 *
62	0.398 $\pm$ 0.042	0.185 $\pm$ 0.017
85	0.427 $\pm$ 0.033 #	0.162 $\pm$ 0.010 #

注:与占空比为 0% 的细胞比较, # $P < 0.05$, * $P < 0.01$

讨 论

我们通过培养大鼠颅盖骨成骨细胞,用 MTT 法检测细胞的增殖情况,来探讨不同强度、频率和占空比对成骨细胞增殖作用的影响。结果显示占空比为 15% 时,磁感应强度为 5 mT,频率为 15 Hz、72 Hz 以及频率为 15 Hz,强度介于 1 ~ 10 mT 的 ELFEMF 能显著提高

成骨细胞的增殖率,此外占空比也对成骨细胞的增殖有明显影响,其中以 15% 和 50% 的占空比对成骨细胞的影响最为显著。

ALP 是成骨细胞分化的早期指标,在细胞中的表达可反映细胞的分化程度和功能状态。因此,观察成骨细胞中的 ALP 活性,可间接地了解电磁场对成骨过程的影响。本研究结果表明,在频率为 15 Hz、占空比为 15% 的 ELFEMF 作用下,磁感应强度为 1 mT、5 mT、10 mT 可使细胞的分化能力减弱;磁感应强度为 5 mT,频率为 15 Hz、72 Hz 以及占空比为 15% 与 50% 的 ELFEMF 均能显著抑制成骨细胞的分化能力。

本实验结果与许多学者研究的结论相似,但也有不同之处。Diniz 等^[9]使用 7 mT、15 Hz 的脉冲电磁场作用于 MC3T3-E1 细胞后,发现 ELFEMF 可以刺激成骨细胞增殖、分化和矿化,但其效应依赖于细胞的成熟程度。Chang 等^[10]应用强度较低(0.1 mT)的电磁场作用于骨细胞后发现,电磁场作用能使新生大鼠颅盖骨细胞在早期阶段发生显著增殖,矿化不变,ALP 活性减弱;同时还发现电磁场刺激可使骨保护素(osteoprotegerin) mRNA 表达上调,破骨细胞分化因子 mRNA 表达下调。而 Lohman 等^[11]采用 1.8 mT、15 Hz 电磁场作用于 MG63 细胞后,发现 ELFEMF 可抑制成骨细胞的增殖、促进 ALP 活性。这些研究结果之间的差异可能是由于所选择的细胞系、培养条件、电磁场作用时间不同而引起;另一方面,可能与所用的 ELFEMF 特征参数有关。本研究结果表明,ELFEMF 对成骨细胞的作用存在强度窗(1~10 mT)、频率窗(15 Hz、72 Hz 左右)与占空比窗(15%、50%、85% 左右)。即电磁场对成骨细胞的作

用与磁场自身的参数有关,而磁感应强度为 5 mT、频率为 15 Hz、占空比为 15% 的参数组合对促进成骨细胞的增殖与分化而言可能是一种合适的选择。

参 考 文 献

- 1 Bassett CA, Pilla AA, Pawluk RJ. A non-operative salvage of surgically-resistant pseudarthrosis and non-unions by pulsing electromagnetic fields. A preliminary report. Clin Orthop Relat Res, 1977, 124:128-143.
- 2 郑磊. 电磁方法促进骨愈合的机制探讨——骨生长因子. 国外医学生物医学工程分册, 1999, 22:153-158.
- 3 童珊, 黄华, 陈槐卿. 电磁场细胞生物效应研究进展. 国外医学生物医学工程分册, 2004, 27:257-259.
- 4 宋晋刚, 徐建中, 周强, 等. 不同频率脉冲电磁场诱导人骨髓间充质干细胞成骨分化的研究. 中华物理医学与康复杂志, 2005, 27:134-137.
- 5 汤青, 赵南明. 低频、低压交变电场对成骨细胞增殖的影响. 生物物理学报, 1998, 14:331-336.
- 6 宋今丹, 章静波, 张世馥, 等. 组织和细胞培养技术. 北京:人民卫生出版社, 2002. 97.
- 7 朱文菁, 金慰芳, 张丽丽, 等. MTT 法分析培养成骨细胞的存活和增殖能力. 上海医科大学学报, 1995, 22:254-257.
- 8 毛勇, 张玉梅, 段小红. 视醛酸对髁突软骨细胞和成骨细胞碱性磷酸酶活性的影响. 口腔医学纵横杂志, 2001, 17:181-182.
- 9 Diniz P, Shomura K, Soejima K, et al. Effects of pulsed electromagnetic field stimulation on bone tissue like formation are dependent on the maturation stages of the osteoblasts. Bioelectromagnetics, 2002, 23:398-405.
- 10 Chang WH, Chen LT, Sun JS, et al. Effect of pulse burst electromagnetic fields stimulation on osteoblast cell activities. Bioelectromagnetics, 2004, 25:457-465.
- 11 Lohmann CH, Schwartz Z, Liu Y, et al. Pulsed electromagnetic field stimulation of MG63 osteoblast-like cells affects differentiation and local factor production. J Orthop Res, 2000, 18:637-646.

(修回日期:2005-11-15)

(本文编辑:吴倩)

· 短篇论著 ·

高压氧促进脑复苏的临床疗效观察

何志红 苏现辉 狄小平 韩振萍

随着近年来医院急救网络的日益完善,急救人员水平的不断加强,心肺复苏(cardiopulmonary cerebral resuscitation, CPR)操作的成功率越来越高;然而当心脏发生骤停后,所引发的脑组织急性缺血必然会导致脑缺氧性损伤,致使神经组织发生病变,引起患者死亡或遗留功能障碍或变为植物状态。因此,脑功能复苏是决定心肺复苏最终成败的关键环节之一^[1]。我院于 1999 年 4 月至 2004 年 10 月间采用心肺复苏术及高压氧联合治疗心脏骤停患者 20 例,并与单纯采用心肺复苏术治疗的患者进行疗效对比,结果表明前者疗效显著优于后者。现将有关结果报道如下。

一、资料与方法

选取 1999 年 4 月至 2004 年 10 月间来我院救治的心脏骤停患者 20 例作为治疗组,其中男 12 例,女 8 例;成人 15 例,儿童 5 例;年龄 8~81 岁,平均(65±7.8)岁;自主心跳停止时间 2~15 min;心脏骤停原因包括心源性疾病(心肌炎、冠心病或阿-斯综合征等)10 例,麻醉及手术意外 2 例,电击伤 3 例,窒息溺水 2 例,中毒及其它 3 例。另回顾性将 1995 年 4 月至 2004 年 10 月间的 20 例心脏骤停患者作为对照组,其中男 11 例,女 9 例;成人 16 例,儿童 4 例;年龄 7~82 岁,平均(63±8.2)岁;自主心跳停止时间 1~15 min;心脏骤停原因包括心源性疾病(心肌炎、冠心病或阿-斯综合征等)9 例,麻醉及手术意外 3 例,电击伤 4 例,窒息溺水 2 例,中毒及其它 2 例。2 组患者临床资料经统计学比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

作者单位:050011 石家庄,石家庄市第一医院急诊科(何志红),神经外科(苏现辉),康复科(狄小平、韩振萍)