

极低频电磁场照射后细胞间的通讯

张建保 张晓军

(西安交通大学教育部生物信息工程重点实验室, 生物医学工程研究所, 西安 710049; 第四军医大学物理教研室, 西安 710032.
E-mail: zhangjb@mail.xjtu.edu.cn)

摘要 低频脉冲电磁场能够影响成骨细胞的增殖, 但其机理还有待研究. 使用 15 Hz, 4 mT 矩形电磁场照射新生鼠颅骨细胞, MTT 方法测量细胞的增殖率, 通过电磁屏蔽与光隔离方法研究细胞间的通讯. 结果表明, 电磁场照射后的细胞能够辐射一种光信号, 受电磁场照射的成骨细胞可以通过这种光辐射的通讯方式促进未受电磁场照射的正常成骨细胞的增殖($P < 0.05$).

关键词 电磁场 成骨细胞 增殖 通讯

低频脉冲电磁场(PEMF)对骨不连病人的治疗及骨愈合等疾病有显著的促进作用^[1,2], 特别是由于近年来环境中低频电磁场污染的增加, 低频电磁场生物效应已经成为了社会广泛关注的热点问题, 并引发了电磁场生物效应机理研究的热潮^[3-5]. 从电磁场作用后细胞的响应来看, 电磁场可以通过细胞外或细胞内钙离子途径直接影响成骨细胞的生长与分化^[6-8], 电磁场也可能通过对DNA的直接作用影响细胞的转录功能^[9]. 从电磁场特征来看, 目前能够肯定的是电磁场的生物效应存在强度与频率窗口^[10]. 电磁场生物效应机理的研究已经有很多年的历史, 但仍然没有取得突破性的进展, 还存在很多问题, 表明电磁场生物效应的复杂性, 也提示我们应当更深入地研究其机理效应. 本文研究了电磁场刺激后细胞间的通讯问题.

1 材料与方法

() 试剂. 本研究使用试剂包括 DMEM 培养液(GIBCO 公司), 新生牛血清(杭州四季青生物制品公司), MTT(Sigma 公司).

() 电磁场的产生. 电磁场发生仪自行研制, 能够在多层线圈绕制的螺线管内产生频率、强度可调的矩形、正弦、三角等多种波形的低频电磁波. 为了保证螺线管中电磁场比较均匀, 螺线管的直径与长度分别设计为 5 和 25 cm, 螺线管中磁感应强度按理论公式计算: $B = \mu_0 n I$ (μ_0 为真空磁导率, 其值为 $4\pi \times 10^{-7}$ H/m, n 为线圈单位长度的匝数, I 为通过线圈的电流强度), 电流使用示波器及 A622 探头测量获得(Tektronix, USA). 本研究所用矩形波电磁场参数为: 频率 15 Hz, 峰值强度 4 mT, 占空比 15%.

() 细胞培养. 无菌条件下, 取出生 24 h 内的 SD 大鼠颅盖骨(购于第四军医大学实验动物中心), 胰蛋白酶(1.25 g/L)消化 20 min; 用 10%血清的 DMEM 培养基冲洗两遍, 接种于培养瓶中, 待细胞长满培养瓶壁时传代培养. 第 3 代细胞用含 10%血清的 DMEM 培养基稀释成 5×10^4 /mL 细胞的悬液, 以每孔 200 μ L 接种于由 96 孔培养板加工而成的小孔中继续培养 24 h, 而后进行分组实验. 实验分对照组与电磁照射组, 实验时对照组与电磁照射组分别置于两个完全一样的螺线管中, 对照组不加电磁场放置 30 min, 电磁照射组加磁场照射 30 min, 磁场方向与培养皿底部垂直, 而后继续培养 24 h, 照射两次后用 MTT 法检测成骨细胞的增殖率. 为保证数据的准确性, 每个实验至少重复 2 次.

() 成骨细胞增殖检测. 96 孔培养板的每孔内加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 20 μ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h, 吸尽培养基并于每孔加入二甲基亚砷 150 μ L, 振荡 10 min, 用酶标仪(TECAN, 澳大利亚)测量 570 nm 波长时的光密度(A)值.

() 数据处理. 统计分析使用了 Sigma Plot 软件中的 t 检验, 数据表示为 $X \pm SD$.

2 结果

电磁屏蔽实验分为 5 组. 其中有 3 个对照组, 分别称为对照组、电磁场屏蔽对照组(ESC)、无电磁场屏蔽对照组(ENSC). 另 2 个为电磁场照射组, 分别为电磁屏蔽的电磁场照射组(ESS)和无电磁屏蔽的电磁场照射组(ESNS). 对照组与电磁照射组的实验方法同上, 但电磁照射结束后, ESC 组与 ESS 组分别用 200 目铜网制成的长方体箱包裹, 贴在一起共同放入

培养箱培养, ESNS 组与 ENSC 组直接贴在一起放入 200 目铜网制作的长方体箱中共同培养, 对照组置于铜网中单独培养, 结果见图 1. 可以看出, 其他 4 组与对照组差异显著($P < 0.05$, $n = 8$), 但 4 组之间无显著差异($P > 0.05$, $n = 8$).

光隔离实验也分为 5 组. 其中 3 个对照组分别为对照组、光未隔离对照组(LNIC)、光隔离对照组(LIC), 2 个电磁照射组分别为光隔离的电磁场照射组(ELI)与光未隔离的电磁场照射组(ELNI). 电磁照射的实验方法同上, 但电磁照射结束后, LIC 与 ELI 组用黑色玻璃片隔离后贴在一起共同放入培养箱培养, LNIC 组与 ELNI 组用透明玻璃片隔离后贴在一起放入细胞培养箱培养, 对照组单独培养, 结果见图 2.

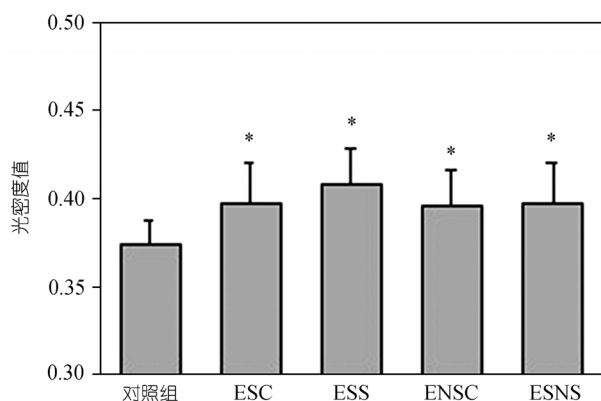


图1 电磁屏蔽对成骨细胞增殖的影响

ESC, 电磁屏蔽对照组; ENSC, 无电磁屏蔽的对照组; ESS, 电磁屏蔽的电磁场照射组; ESNS, 无电磁屏蔽的电磁场照射组. *, $P < 0.05$, 与对照组比较

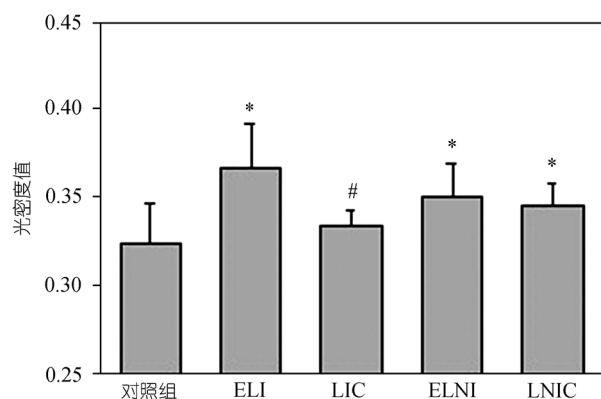


图2 光隔离对成骨细胞增殖的影响

ELI, 光隔离的电磁场照射组; LIC, 光隔离对照组; ELNI, 光未隔离的电磁场照射组; LNIC, 光未隔离的对照组. *, $P < 0.05$, 与对照组比较; #, $P < 0.05$, 与 ELI 组比较

可以看出, ELI, ELNI, LNIC 组与对照组差异显著($P < 0.05$, $n = 8$), LIC 组与对照组无显著差异($P > 0.05$, $n = 8$), 但与 ELI 组显著差异($P < 0.05$, $n = 8$).

3 讨论

电磁场生物效应是近年来的研究热点, 螺线管中交变磁场可以引起成骨细胞增殖^[11], 4 mT, 15 Hz 低频矩形电磁场能够使细胞增殖率显著增加^[12], 本研究表明, 不但磁场照射后的成骨细胞增殖率可以显著增加, 而且与电磁场照射后的细胞相互接近共同培养的对照组细胞的增殖率也显著增高(图 1 和 2), 提示受磁场照射与未受磁场照射的细胞间存在影响细胞增殖的信号通讯. 细胞分裂过程中能够产生一种特殊的物理信号, 通过这种物理信号能够影响其他细胞的分裂^[13]. 从物理学的角度分析, 细胞间的影响可能表现为电磁波通讯, 为此我们使用电磁屏蔽与光隔离的方法进行了研究. 图 1 表明, 电磁屏蔽没有影响细胞间的这种通讯, 因为无论是加了电磁屏蔽的细胞, 还是没有被屏蔽的细胞, 只要将他们相互贴近一起培养, 电磁照射组与对照组细胞的增殖率就没有差异, 但却都显著高于对照组($P < 0.05$), 该结果提示, 细胞被磁照射后能够产生使正常细胞增殖的信号, 而且这种信号不能被铜网产生的电磁屏蔽阻断. 图 2 说明, 这种影响细胞增殖的通讯信号可能是一种光信号, 因为正常细胞与受电磁刺激的细胞间的通讯作用可以被黑色玻璃片阻断($P < 0.05$), 但不受透明玻璃片影响($P < 0.05$). 总之, 本研究结果表明, 成骨细胞被电磁照射后可能辐射一种光信号, 通过这种信号可以刺激其他未受电磁照射的细胞, 并使其增殖率增加.

成骨细胞的增殖与细胞因子及细胞内的钙离子密切相关^[3,14], 光辐射可以影响细胞内的钙过程^[15], 这为本课题的后续深入研究提供了思路.

致谢 本工作为国家自然科学基金(批准号: 60171030, 10672132)资助项目.

参 考 文 献

- Inoue N, Ohnishi I, Chen D, et al. Effect of pulsed electromagnetic fields on late-phase osteotomy gap healing in a canine tibial model. *J Orthop Res*, 2002, 20: 1106—1114[DOI]
- Funk R H, Monsees T K. Effects of electromagnetic fields on cells: Physiological and therapeutical approaches and molecular mechanisms of interaction. A review. *Cells Tissues Organs*, 2006, 182(2): 59—78[DOI]

- 3 Panagopoulos D J, Karabarbounis A, Margaritis L H. Mechanism for action of electromagnetic fields on cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 298: 95—102[DOI]
- 4 Repacholi M H, Greenebaum B. Interaction of static and extremely low frequency electric and magnetic fields with living system: Health effects and research needs. *Bioelectromagnetics*, 1999, 20: 133—160[DOI]
- 5 Goodman R, Blank M. Insights into electromagnetic interaction mechanisms. *J Cell Physiol*, 2002, 192: 16—22[DOI]
- 6 Zhuang H M, Wang W, Seldes R M, et al. Electrical stimulation induces the level of TGF-beta1 mRNA in osteoblastic cells by a mechanism involving Calcium/Calmodulin pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 237: 225—229[DOI]
- 7 Khatib L, Golan D E, Cho M. Physiologic electrical stimulation provokes intracellular calcium increase mediated by phospholipase C activation in human osteoblasts. *FASEB J*, 2004, 18: 1903—1905
- 8 Brighton C T, Wang W, Seldes R, et al. Signal transduction in electrically stimulated bone cells. *J Bone Joint Surgery*, 2001, 83: 1514—1523
- 9 Blank M, Goodman R. Initial interactions in electromagnetic field-induced biosynthesis. *J Cell Physiol*, 2004, 199: 359—363[DOI]
- 10 Fitzsmmons R J, Farley J R, Adey W R, et al. Frequency dependence of increased cell proliferation, *in vitro*, in exposures to a low-amplitude, low-frequency electric field: Evidence for dependence on increased mitogen activity released into culture medium. *J Cell Physiol*, 1989, 139(3): 586—591[DOI]
- 11 Chang W H, Chen L, Sun J, et al. Effect of pulse-burst electromagnetic field stimulation on osteoblast cell activities. *Bioelectromagnetics*, 2004, 25: 457—465[DOI]
- 12 张晓军, 张建保, 文俊, 等. 极低频电磁场对成骨细胞增殖与分化的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2006, 28(2): 79—81
- 13 Shen X, Mei W, Xu X. Activation of neutrophils by a chemically separated but optically coupled neutrophil population undergoing respiratory burst. *Experientia*, 1994, 50: 963—968[DOI]
- 14 柏金根, 杨健, 朱敦皖, 等. 生长因子及其与体内微环境的多重相互作用. *科学通报*, 2006, 51(5): 506—513
- 15 Lavi R, Shainberg A, Friedmann H, et al. Low energy visible light induces reactive oxygen species generation and stimulates an increase of intracellular calcium concentration in cardiac cells. *J Biol Chem*, 2003, 278: 40917—40922[DOI]

(2006-09-07 收稿, 2006-11-14 接受)