

## 50Hz 1.8mT 电磁场对成骨细胞增殖与分化成熟影响的波形比较研究\*

周 建<sup>1)</sup> 马慧萍<sup>2)</sup> 陈克明<sup>1)\*\*</sup> 葛宝丰<sup>1)</sup> 程国政<sup>1)</sup> 王嘉琪<sup>1)</sup> 韦 哲<sup>3)</sup>

(<sup>1)</sup> 兰州军区兰州总医院骨科研究所, 兰州 730050; (<sup>2)</sup> 兰州军区兰州总医院药材科, 兰州 730050;

(<sup>3)</sup> 兰州军区兰州总医院医学工程科, 兰州 730050)

**摘要** 在 50 Hz 1.8 mT 的 4 种不同波形电磁场(electromagnetic fields, EMFs)中筛选促进体外培养大鼠成骨细胞(rat osteoblasts, ROB)增殖与分化成熟的最佳波形。体外分离培养大鼠颅骨成骨细胞, 传代后随机分为 5 组, 分别用频率 50 Hz, EMFs 强度为 0 mT(对照组)和 1.8 mT 的正弦波、三角波、方波和锯齿波处理 ROB, 30 min/(次·天)。在磁场处理后 4~8 天细胞呈现特征样分布。方波促进成骨细胞增殖, 正弦波抑制成骨细胞增殖。三角波和正弦波增加 ALP 活性, 其中 ALP 染色、茜素红钙化结节染色和胶原 I (collagen- I)免疫组织化学检测结果与 ALP 活性一致。在 EMFs 处理后的 24 h、96 h 和 72 h 后 EMFs 分别提高 *Runx-2*、*Opg* 和 *Igf* 基因表达水平, 其中尤以正弦波和三角波作用最为显著。上述结果表明: 50 Hz 1.8 mT 方波促进成骨细胞增殖, 正弦波抑制成骨细胞增殖。50 Hz 1.8 mT EMFs 能促进体外培养成骨细胞分化成熟, 其中尤以正弦波和三角波促进成骨细胞分化成熟作用最为显著。

**关键词** 成骨细胞, 正弦波, 三角波, 锯齿波, 方波

**学科分类号** R 244, R 318

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2011.00148

大量实验研究表明低频率低强度电磁场影响体外培养细胞的增殖与分化<sup>[1-2]</sup>。但研究发现, 磁场与体外培养细胞之间存在非线性“效应窗口”, 非线性效应窗口与磁场的频率、强度以及细胞在磁场中处理时间、细胞的代数和种类等有关<sup>[3-4]</sup>。目前有关电磁场影响体外培养成骨细胞增殖与分化的波形比较研究尚不多见, 因此实验通过观察 50 Hz 1.8 mT 的 4 种不同波形电磁场对体外培养成骨细胞增殖与分化的影响, 期望找到电磁场波形与体外培养成骨细胞之间波形效应窗口。实验研究发现, 正弦波、三角波、方波和锯齿波与体外培养成骨细胞之间存在波形效应窗口, 正弦波抑制成骨细胞增殖, 方波促进成骨细胞增殖, 三角波显著促进成骨细胞的分化成熟, 正弦波次之。

### 1 材料与方法

#### 1.1 正弦交变磁场发生仪

实验所用磁场发生仪由兰州军区兰州总医院与

兰州理工大学共同研制, 线圈内径为 180 mm, 频率、磁感应强度均精确可调。磁感应信号经计算机控制程序产生, 经过信号放大器放大后传入磁场线圈, 基本原理示于图 1。经中国人民解放军兰州军区医学计量测试研究站测定表明, 磁场发生仪运行期间磁场环境均匀稳定, 报告编号: 医计磁字 ccqd-2008-01。仪器经紫外线照射消毒后放入细胞培养箱内, 由导线与外部控制装置相连。实验期间培养箱内温度, 控制在(37 ± 0.2)℃。

#### 1.2 材料

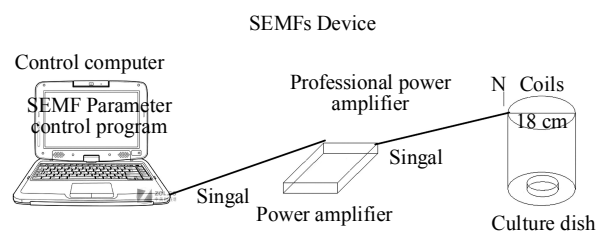
出生 48 h 以内的 SPF 级 SD 大鼠(甘肃省中医院动物实验中心, 合格证号 SCXK(甘)2004-0006-152); 胎牛血清(FBS, 兰州民海生物公司);  $\alpha$ -MEM 培养基、II 型胶原酶(Gibco 公司,

\* 甘肃省科技重大专项资助项目(09ZKDA025)。

\*\* 通讯联系人。

Tel: 0931- 8994327, E-mail: chkeming@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-04-06, 接受日期: 2011-06-17



**Fig. 1 Schematic diagram of the electromagnetic fields (EMFs) device**

The EMFs device was studied by Lanzhou University of Technology. The coils is placed in a 5%CO<sub>2</sub>, 37°C and 100% humidity incubator. The device consisted of three parts: coils, control computer and amplifier. The ROB cells were seeded on the 35 mm culture dish which was placed on the bottom of the EMFs coils.

美国); RNAiso Reagent kit、TakaRa Prime Script™ SYBR® Premix Ex Taq™ II PCR 扩增试剂盒 (大连宝生物公司); 地塞米松、磷酸化抗坏血酸、β-磷酸甘油钠、青霉素、链霉素、胰蛋白酶 (Sigma 公司, 美国)、茜素红 (上海生工生物技术公司)、Collagen- I 免疫组织化学试剂盒 (武汉博士德公司)、碱性磷酸酶测定试剂盒 (南京建成公司)。

### 1.3 成骨细胞分离培养

取出生 48 h 以内 SD 大鼠 10 只, 处死后放入 75%乙醇浸泡 10 min, 取颅骨, 去除骨膜、血管及结缔组织, PBS 漂洗。将颅骨剪成约 1 mm<sup>2</sup> 大小的骨片, 加入 0.25%胰蛋白酶 2~3 ml, 37°C 预消化 10 min, 弃消化液后重复 1 次; PBS 漂洗骨片, 换 0.1% II 型胶原酶消化, 37°C 水浴消化 4 次, 第 1 次 10 min 弃消化液, 以后每次 20 min, 收集并合并消化液, 200 目细胞筛过滤, 滤液 1 000 r/min 离心 5 min, 沉淀用 PBS 漂洗后用含有 10%胎牛血清 (FBS) 的 α-MEM 培养液悬浮, 吹打均匀后, 调整细胞浓度至 3×10<sup>4</sup> 个 /ml, 置 37°C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 每 3 天换液一次。待细胞生长融合至 80%以上时, 0.25%胰蛋白酶消化传代。

### 1.4 细胞分组与磁场处理

将第一代传代细胞 (P<sub>1</sub>) 调整浓度 3×10<sup>4</sup> 个 /ml 接种于 35 mm 培养皿, 随机分为 5 组, 依次置于 50 Hz, 0 mT (对照组) 和 1.8 mT (正弦波形、三角波、锯齿波和方波组) 磁场中, 30 min/(次·天)。

### 1.5 增殖分析

P<sub>1</sub> 代细胞接种 12 h 后采用磁场处理, 其中对照不用任何磁场处理。72 h 后换含 0.5% MTT 的无

血清培养基继续培养 4 h, 弃培养液, 加入 DMSO 摇床震荡 10 min, 待紫色结晶沉淀彻底溶解后于 570 nm 波长测定 A 值。

### 1.6 成骨细胞成熟分化分析

将 P<sub>1</sub> 代细胞接种于 35 mm 培养皿, 每 3 天换液一次, 待细胞 70%~80%融合成片时加入成骨性诱导剂 (50 mg/L 磷酸化抗坏血酸、10 mmol/L β-甘油磷酸钠和 1×10<sup>-8</sup> mol/L 地塞米松), 开始磁场处理。

**1.6.1 碱性磷酸酶 (ALP) 活性测定。** 第 3、6、9 和 12 天分别测定各组 ALP 活性, ALP 活性测定按试剂盒说明书操作, 每组分别按缓冲液: 基质液=1:1 加入充分摇匀; 然后 37°C 水浴 15 min, 加入 3 倍于基质液显色液, 充分混匀显色后, 测定 507 nm 处 A 值, 换算成金氏单位。

**1.6.2 钙化结节染色。** 磁场处理第 10 天, 弃培养液, PBS 漂洗 2 遍, 加入 10%福尔马林固定 10 min, 弃固定液, 加入 pH 8.9、0.1%的茜素红染色液, 37°C 水浴 1 h, 流水冲洗, 换固定液照相记录结果。照片使用 IPP (Image-Pro Plus 6.0) 软件扫描钙化结节染色区域的面积。钙化结节染色面积计算公式: 培养皿的面积×(钙化结节染色区域扫描面积 / 照片中培养皿的扫描面积), 进行数据分析。

**1.6.3 胶原 I (Collagen- I) 免疫组织化学检测。** 传代细胞进行爬片培养, 将传代细胞接种到放置有预先处理好无菌载玻片的 35 mm 培养皿中。待细胞 70%~80%覆盖载玻片后, 加入成骨性诱导培养液, 开始磁场处理。在磁场处理 7 天后, 弃培养液, PBS (无菌) 漂洗 2 遍, 10%福尔马林固定 2 min, PBS 漂洗 2 遍, 0.1% TritonX-100 处理 10 min, PBS 漂洗 3 次, 后续步骤严格按照操作说明进行。

I 型胶原抗体按 1:200 稀释, 4°C 湿盒内密闭过夜, DAB 显色后苏木素衬染, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 树脂胶封片<sup>[5]</sup>。

**1.6.4 ALP 染色。** P<sub>1</sub> 代细胞磁场暴露处理至第 8 天时进行偶氮偶合染色。方法参考文献[6], 待出现紫色斑点后停止染色, 观察照相。照片使用 IPP (Image-Pro Plus 6.0) 软件扫描 ALP 染色区域的面积。ALP 染色面积计算公式: 培养皿的面积×(ALP 染色区域扫描面积 / 照片中培养皿的扫描面积), 进行数据分析。

### 1.6.5 基因表达水平分析。

a. 总 RNA 提取。P<sub>1</sub> 代细胞在第一次磁场处理后第 24 h、72 h 和 96 h 后弃培养液, 加入

无酶 PBS 漂洗 2 次, 加入 1 ml RNAiso Reagent Kit 裂解细胞, 收集裂解液后加入 200  $\mu$ l 氯仿, 4℃ 13 500 r/min 离心 15 min, 取上清液加入等体积的异丙醇冰上静置 15 min, 4℃ 13 500 r/min 离心 15 min 弃上清液, 75%乙醇重悬浮沉淀, 4℃ 13 500 r/min 离心 5 min, 弃上清后 -70℃ 保存, 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性, 在 260 nm、280 nm、320 nm、230 nm 测定 A 值, 调整总 RNA 的浓度。

b. 逆转录. 使用 TakaRa Prime Script™ reagent Kit (TakaRa Code: DRR037A) 反转录试剂盒, 合成反转录出第一条 cDNA 链. 反应体系: 5×Prime Script™ Buffer 4  $\mu$ l, Prime Script™ RT Enzyme Mix I 1.0  $\mu$ l, Oligo dT Primer (50  $\mu$ mol/L) 1.0  $\mu$ l, Random 6 Primer (100  $\mu$ mol/L) 1.0  $\mu$ l, 总 RNA 10  $\mu$ l (1 000 ng) 补水 (不含 RNase) 至 20  $\mu$ l. 37℃ 反应 15 min, 85℃ 5 s, -20℃ 保存。

c. 引物设计. 根据实验要求, 在 GenBank 查询所需要基因目的序列 mRNA 序列, 引物均由宝生物(大连)公司根据序列设计并合成. *Runx-2*: NM\_053470.1 上游引物 5' GCACCCAGCCCATA-ATAGA 3' 和下游引物 5' TTGGAGCAAGGAGAA-CCC 3', 产物长度 165 bp; *Igf*: NM\_001082477.2 上游引物 5' TTCA GTTCGTGTGTGGACCAAG 3' 和下游引物 5' GATCACAGCTCCGGAAGCAA 3', 产物长度 120 bp; *Opg*: NM\_057149.1 上游引物 5' GCAGCATCGCTCTGTTCCTGTA 3', 下游引物 5' GCATGAGTCAGGTAGTG CTTCT GTG 3', 产物长度 164 bp; *Gapdh*: NM\_017008.3 上游引物 5' GGCACAGTCAAGGCTG AGAATG 3', 下游引物 5' ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA 3', 产物长度 143 bp。

d. PCR 检测. 按照 Applied Biosystems 公司 7300 仪器操作说明进行实验. 其中 PCR 反应体系 20  $\mu$ l, 包括 SYBR® Premix Ex Taq™ II (2×) 10  $\mu$ l, PCR 上游引物 (10  $\mu$ mol/L) 0.8  $\mu$ l, 下游引物 (10  $\mu$ mol/L) 0.8  $\mu$ l, ROX 参比荧光染料或荧光染料 II (50×) 0.4  $\mu$ l, cDNA 模板 2  $\mu$ l (50  $\mu$ g/L), 补水 (不含 RNase) 至 20  $\mu$ l. PCR 反应条件: 两步法反应条件 95℃ 预变性 30 s; 94℃ 变性 5 s, 退火 31 s, 40 个循环。

Real-time RT-PCR 数据分析处理采用  $\Delta\Delta Ct$  处理数据, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  表示数据的结果, 方法见参考文献[7]。

## 1.7 统计学处理

所有统计分析均采用 SPSS13.0 统计软件完成, 结果均以  $\bar{x} \pm s$  表示. 首先用方差分析检验各组间是否有显著性差异, 当存在显著性差异时, 再用多参数  $t$  检验验证各均数间是否有显著性差异. 以  $P < 0.05$  为显著差异,  $P < 0.01$  为极显著差异。

## 2 结 果

### 2.1 细胞形态观察

图 2 示细胞形态学观察结果. 细胞接种培养至 12 h 左右贴壁, 呈三角形、纺锤形或多角形等形态, 24 h 后细胞数量明显增加, 体积增大(图 2a), 3~5 天开始融合为单层, 经磁场暴露处理 4~8 天呈特征性旋涡样分布, 其中正弦波处理组特征样较为典型(图 2b), 对照组无此现象, 但不同波形磁场处理组之间无显著的差异. 经过磁场处理 8 天后 ALP 染色, 三角波(图 2c)和正弦波 ALP 活性显著高于对照组(图 2d). 经过磁场处理后的第 10 天茜素红钙化结节染色鉴定, 三角波(图 2f)和正弦波钙化面积大于未经磁场处理对照组(图 2e)的面积, 其余各组同对照组无明显区别。

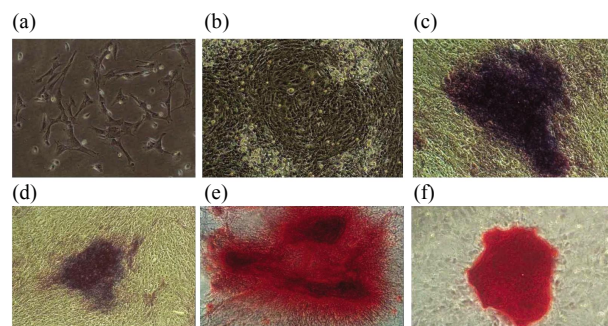
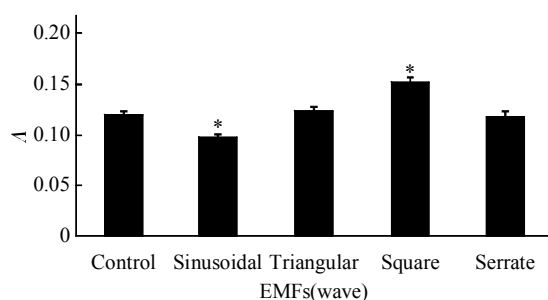


Fig. 2 The osteoblast morphology was observed under different treatment and at different time point(100×)

The osteoblast morphology photographed under contrast phase microscope. (a) The osteoblast after being seeded 24 h, in which cell morphology of triangle and fusiform appears. (b) The osteoblast after being treated with Sinusoidal wave for 7 days, showing a vortex-like distribution. (c~d) shows ALP activity. (c) is triangular wave treated group. The osteoblast was treated with EMFs for 8 days and ALP was stained. ALP activity significantly higher than that in control group. (d) Control group. (e~f) is Calcified tubercle stained with alizarin red. (e) is triangular wave treated group. The osteoblast was treated with EMFs for 10 days and stained with the alizarin red. Calcified tubercle area in EMFs group was significantly larger than that in control group. (e) Control group.

## 2.2 增殖分析

图3示不同波形的电磁场对成骨细胞增殖的影响。三角波和锯齿波与对照组比较均无明显差异；正弦波抑制成骨细胞增殖( $P < 0.05$ )，方波促进成骨细胞的增殖( $P < 0.05$ )。

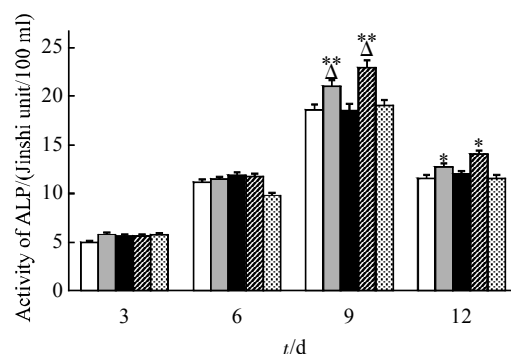


**Fig. 3 The osteoblast proliferation assayed by MTT**

The proliferation of osteoblast was assayed by the MTT. The result showed that sinusoidal wave significantly inhibited osteoblast proliferation, whereas square wave enhanced the osteoblast proliferation.  $*P < 0.05$  vs control group.

## 2.3 ALP 活性

如图4所示，ALP活性从第3天起逐渐升高，第9天达到最高，第9~12天逐渐降低。其中锯齿波和方波组ALP活性与对照组比较均无明显差异；正弦波和三角波组在第9天时ALP活性极显著高于对照组( $P < 0.01$ )及其他各波形组( $P < 0.05$ )。第12天三角波和正弦波组的ALP显著高于对照组( $P < 0.05$ )。

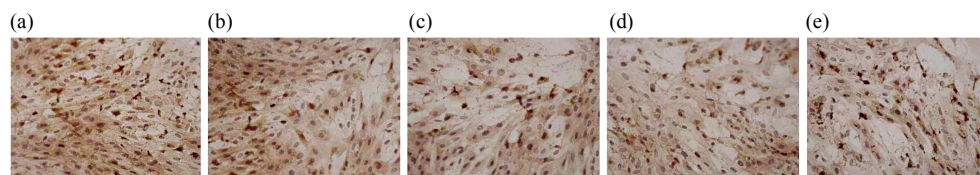


**Fig. 4 The ALP activity measured by ALP reagents**

ALP activity was measured by the ALP reagents after osteoblast was treated with EMFs for 3 days, 6 days, 9 days and 12 days. The result showed that triangular and sinusoidal wave significantly increased ALP activity. The data were represented as  $\bar{x} \pm s$  ( $n=3$ ).  $**P < 0.01$  vs Control group;  $*P < 0.05$  vs Control group;  $\Delta P < 0.05$  vs others EMFs group. □: Control; ■: Sinusoidal wave; ■: Square wave; ▨: Triangular wave; ▩: Serrate wave.

## 2.4 Collagen- I 免疫组织化学分析

图5所示为磁场处理7天后进行免疫组织化学检测所得胶原I (collagen- I)形成情况，图5a~e依次为三角波、正弦波、锯齿波、方波和对照组collagen- I的检测结果。其中三角波和正弦波组collagen- I的阳性克隆明显多于方波、锯齿波和对照组。方波和锯齿波同对照组之间无明显的差异。



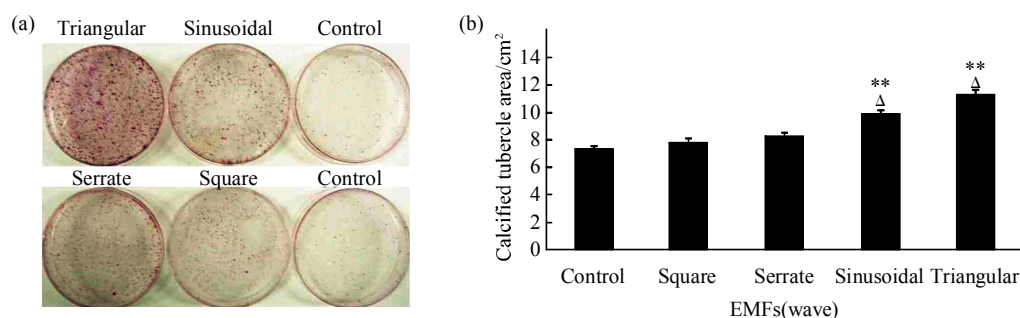
**Fig. 5 The collagen- I was tested by immunohistochemistry after 7 days EMFs treatment (200×)**

The collagen- I was measured by immunohistochemistry after 7 days EMFs treatment (30 min/d) of osteoblast. (a) Triangular wave. (b) Sinusoidal wave. (c) Serrate wave. (d) Square wave. (e) Control. The results showed that the positive clones in triangular wave and sinusoidal wave treated groups were significantly more than those in control and other EMFs groups.

## 2.5 钙化结节染色结果

磁场处理10天后钙化结节染色(图6)，与对照组比较，三角波、正弦波组的钙化节数均极显

著多于对照组( $P < 0.01$ )，并显著多于其他各波形组( $P < 0.05$ )。

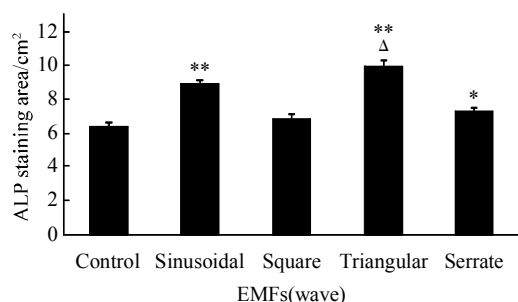


**Fig. 6 Calcified nodules stained by alizarin red**

(a) The calcified tubercles in osteoblast stained by alizarin red after 10 days of EMFs treatment (30 min/d). (b) Calcified tubercle area was described by Image-Pro Plus 6.0. The result showed that the calcified tubercle area in triangular wave and sinusoidal wave groups is significantly higher than that in the control and other EMFs groups. The data were represented as  $\bar{x} \pm s$  ( $n=3$ ). \*\* $P < 0.01$  vs Control group;  $\Delta P < 0.05$  vs EMFs group.

## 2.6 ALP 染色

图 7 为 EMFs 处理 8 天后各组 ALP 活性染色面积。与对照组相比, 三角波、正弦波组 ALP 活性均显著高于对照组, 尤以三角波组明显高于其他组, 锯齿波也能促进 ALP 活性但较三角波和正弦波较弱。



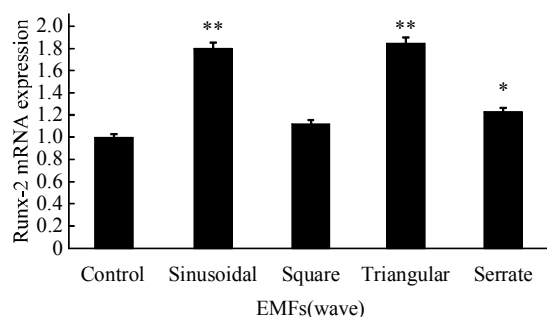
**Fig. 7 ALP activity in osteoblast under different treatment**

Activity of ALP was detected after osteoblast was treated with EMFs for 8 days(30 min/d). The results showed that the ALP activity in triangular wave and sinusoidal wave groups is significantly higher than that in the control and other EMFs groups. The data were represented as  $\bar{x} \pm s$  ( $n = 3$ ). \*\* $P < 0.01$  vs Control group; \* $P < 0.05$  vs Control group;  $\Delta P < 0.05$  vs other EMFs groups.

## 2.7 基因表达分析

图 8 所示为正弦波、三角波、方波和锯齿波 4 种不同波形的 EMFs 对大鼠成骨细胞 *Runx-2* mRNA 表达量的影响, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法处理数据。在第一次

EMFs 处理成骨细胞 24 h 后, 三角波和正弦波组同对照组比较能极显著促进 *Runx-2* mRNA 的表达 ( $P < 0.01$ ), 锯齿波能显著促进 *Runx-2* mRNA 的表达 ( $P < 0.05$ )。



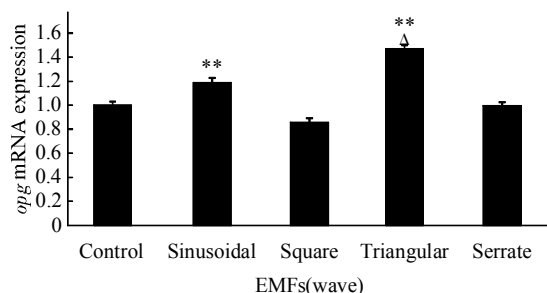
**Fig. 8 The *Runx-2* mRNA expression was tested by the real-time RT-PCR**

The *Runx-2* mRNA expression was tested by the real-time RT-PCR 24 h after osteoblast was treated with EMFs (30 min/d). The results showed that *Runx-2* mRNA expression in the triangular wave and sinusoidal wave groups is significantly higher than that in the control and other EMFs groups. The data were represented as  $\bar{x} \pm s$  ( $n=3$ ). \*\* $P < 0.01$  vs Control group; \* $P < 0.05$  vs Control group.

图 9 所示为正弦波、三角波、方波和锯齿波 4 种不同波形的 EMFs 对大鼠成骨细胞 *Opg* mRNA 表达量的影响, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法处理数据。在第一次 EMFs 处理成骨细胞 96 h 后, 三角波和正弦波组同



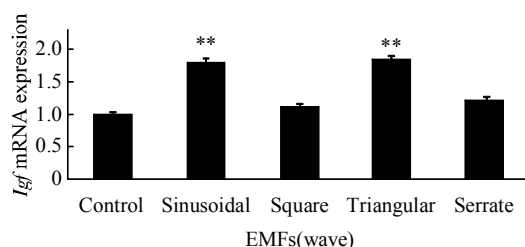
对照组比较能极显著促进 *Opg* mRNA 的表达 ( $P < 0.01$ ), 三角波同其他组比较能显著促进 *Opg* mRNA 的表达 ( $P < 0.05$ ).



**Fig. 9 The effect of EMFs on the *Opg* mRNA expression in osteoblast**

The *Opg* mRNA expression was tested by the real-time RT-PCR 96 h after osteoblast was treated with EMFs (30 min/d). The results showed that the *Opg* mRNA expression in triangular wave and sinusoidal wave groups is significantly higher than that in the control and other EMFs groups. The data were represented as  $\bar{x} \pm s$  ( $n=3$ ). \*\* $P < 0.01$  vs Control group; \* $P < 0.01$  vs others EMFs group.

图 10 所示为正弦波、三角波、方波和锯齿波 4 种不同波形的 EMFs 对大鼠成骨细胞 *Igf* mRNA 表达量的影响, 采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法处理数据. 在第一次 EMFs 处理成骨细胞 72 h 后, 三角波和正弦波组同对照组比较能极显著促进 *Igf* mRNA 的表达 ( $P < 0.01$ ).



**Fig. 10 The effect of EMFs on the *Igf* mRNA expression in osteoblast**

The *Igf* mRNA expression was tested by the real-time RT-PCR 72 h after osteoblast that was treated with EMFs (30 min/d). The results showed that the *Igf* mRNA expression in triangular wave and sinusoidal wave groups is significantly higher than that in the control and other EMFs groups. The data were represented as  $\bar{x} \pm s$  ( $n=3$ ). \*\* $P < 0.01$  vs Control group.

### 3 讨 论

文献报道电磁场对体外培养成骨细胞成熟分化有促进作用, 但存在非线性“效应窗口”<sup>[3-4]</sup>. 文献报道 1.8 mT 为 50 Hz 的正弦交变电磁场的一个“效应窗口”<sup>[8]</sup>. 实验比较研究了频率为 50 Hz、强度为 1.8 mT 的正弦波、三角波、方波和锯齿波对体外培养成骨细胞成熟分化的波形“效应窗口”.

碱性磷酸酶活性是检测成骨细胞早期分化的标志性指标, 有研究者发现电磁场能增加 ALP 活性<sup>[6]</sup>. 实验研究发现, 正弦波、三角波和锯齿波能促进成骨细胞碱性磷酸酶的活性, 尤以三角波和正弦波组促进 ALP 活性作用极显著. 钙盐是骨形成主要成分, 因此钙盐的沉积量也就成了衡量成骨细胞分化成熟的重要指标. 文献报道, 电磁场能改变  $\text{Ca}^{2+}$  流动<sup>[9]</sup>, 实验对成骨细胞的形态进行观察, 发现电磁场处理组细胞钙盐沉积呈现一定规律样分布, 尤以正弦波的作用最为典型, 这可能同当前提出的钙离子回旋振荡理论相互一致, 50 Hz 1.8 mT 的正弦波、三角波、锯齿波和方波促进体外培养成骨细胞钙盐的沉积, 尤以正弦波和三角波作用最为明显. Collagen- I 是骨骼形成必不可少的成分, 实验研究 4 种不同波形电磁场对成骨细胞 Collagen- I 的影响, Collagen- I 免疫组化结果表明, 正弦波和三角波极显著增加 Collagen- I 阳性克隆. 实验从细胞形态学水平探究了成骨细胞与电磁场的波形“效应窗口”.

电磁场具有促进成骨细胞成熟矿化的作用, 同时研究发现电磁场能促进体外培养成骨细胞基因的表达<sup>[10]</sup>. *Runx-2* 被认为是调控成骨细胞分化的最主要的转录因子<sup>[11]</sup>, 因此实验研究 50 Hz 1.8 mT 的 4 种不同波形电磁场对体外培养成骨细胞 *Runx-2* 基因表达量变化的影响, 发现正弦波和三角波电磁场能极显著促进 *Runx-2* mRNA 表达量. *Opg* 是影响骨代谢的重要因子<sup>[12]</sup>, 实验观察了不同波形电磁场对成骨细胞 *Opg* 表达的影响, 正弦波和三角波提高 *Opg* mRNA 表达量. 胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factor-1, IGF, *Igf-1*) 是骨中含量最丰富的细胞因子, 它通过自分泌与旁分泌的方式刺激成骨细胞增殖和骨基质的合成<sup>[13]</sup>. 实验研究了不同波形电磁场对体外培养成骨细胞 *Igf* mRNA 表达量变化的影响, 磁场能促进 *Igf* mRNA 表达, 特别是正弦波和三角波. 实验从分子水平确证了电磁场促进体外培养成骨细胞波形“效应窗口”, 即

正弦波和三角波能显著促进成骨细胞成熟分化。

实验从细胞形态学水平和基因水平两方面确证了电磁场对体外培养成骨细胞波形的“效应窗口”，发现了不同波形 50 Hz 1.8 mT EMFs 处理体外培养成骨细胞时，正弦波和三角波磁波为其最佳波形“效应窗口”。但也有文献报道<sup>[14]</sup>采用 15 Hz 5 mT 的矩形、三角形和正弦 3 种不同波形电磁场对体外培养成骨细胞的实验研究，其增殖结果与本实验结果一致，而在 EMFs 促成骨细胞分化研究中，本实验所采用的磁场频率、强度和处理时间，发现了一个与三角波电磁场组合能极显著促进成骨细胞成熟分化的“效应窗口”。因此实验进一步验证磁场与体外培养细胞之间的非线性“效应窗口”。将以此实验结果为基础，进一步从频率、时间“效应窗口”研究电磁场对成骨细胞分化成熟的“效应窗口”，对效应机理机制作进一步研究，有望为骨质疏松症磁场治疗提供细胞水平实验依据。

### 参 考 文 献

- [1] Manni V, Lisi A, Rieti S, *et al.* Low electromagnetic field (50 Hz) induces differentiation on primary human oral keratinocytes (HOK). *Bioelectromagnetics*, 2004, **25**(2): 118-126
- [2] Sul A R, Park S N, Suh H. Effects of sinusoidal electromagnetic field on structure and function of different kinds of cell lines. *Yonsei Med J*, 2006, **47**(6): 852-861
- [3] Ivancsits S, Pilger A, Diem E, *et al.* Cell type-specific genotoxic effects of intermittent extremely low-frequency electromagnetic fields. *Mutat Res*, 2005, **583**(2): 184-188
- [4] Berg H. Problems of weak electromagnetic field effects in cell biology. *Bioelectrochem Bioenerg*, 1999, **48**(2): 355-360
- [5] 熊能保, 王西明. 现代实用组织学与组织化学技术. 武汉: 湖北科学出版社, 2003: 151-153
- Xiong N B, Wang X M. *The Modern Practical Histology and Histochemistry Technology*. Wu Han: Hu Bei Science Press, 2003: 151-153
- [6] Cane V, Botti P, Soana S. Pulsed magnetic fields improve osteoblast activity during the repair of an experimental osseous defect. *J Orthop Res*, 1993, **11**(5): 664-670
- [7] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods*, 2001, **25**(4): 402-408
- [8] Zhou J, Chen K M, Ge B F, *et al.* Effect of sinusoidal electromagnetic field at different intensity on the proliferation and differentiation of osteoblasts *in vitro*. *Chin J Osteoporosis*, 2010, **16**(7): 1-4
- [9] Pessina G P, Aldinucci C, Palmi M, *et al.* Pulsed electromagnetic fields affect the intracellular calcium concentrations in human astrocytoma cells. *Bioelectromagnetics*, 2001, **22**(7): 503-510
- [10] Selvamurugan N, Kwok S, Vasilov A, *et al.* Effects of BMP-2 and pulsed electromagnetic fields (PEMF) on rat primary osteoblastic cell proliferation and gene expression. *J Orthopaedic Research*, 2007, **25**(9): 1213-1220
- [11] 林桂声, 赵承斌. BMP/bFGF 对关节软骨损伤修复的作用. *中国伤残医学*, 2009, **17**(2): 131-133
- Lin J S, Zhao C B. BMP/bFGF effect articular cartilage lesion prosthetic. *China Disabled Medical*, 2009, **17**(2): 131-133
- [12] Tsuda E, Goto M, Mochizuki S, *et al.* Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, **234**(1): 137-142
- [13] 徐 萍, 张克勤. IGF-I 与骨代谢. 国外医学内分泌学分册, 2005, **25**(1): 63-66
- Xu P, Zhang K Q. *Abroad medicine Endocrinology Fascicule*, 2005, **25**(1): 63-66
- [14] 文 峻, 张晓军, 张建保, 等. 三种波形磁场对大鼠成骨细胞增殖与分化的影响. *中国医学物理学杂志*, 2008, **25**(3): 654-656
- Wen J, Zhang X J, Zhang J B, *et al.* *Chin J Medical Physics*, 2008, **25**(3): 654-656

## Effect of Four Different Wave of 1.8mT 50Hz Electromagnetic Fields on Proliferation and Differentiation of Osteoblasts *In vitro*\*

ZHOU Jian<sup>1)</sup>, MA Hui-Ping<sup>2)</sup>, CHEN Ke-Ming<sup>1)\*\*</sup>, GE Bao-Feng<sup>1)</sup>,  
CHENG Guo-Zheng<sup>1)</sup>, WANG Jia-Qi<sup>1)</sup>, WEI Zhe<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> Institute of Orthopaedics, Lanzhou General Hospital of PLA, Lanzhou 730050, China;

<sup>2)</sup> Institute of Pharmacy, Lanzhou General Hospital of PLA, Lanzhou 730050, China;

<sup>3)</sup> Institute of Medical Engineering, Lanzhou General Hospital of PLA, Lanzhou 730050, China)

**Abstract** To investigate the effect of 50 Hz 1.8 mT sinusoidal, triangular, serrate and square wave electromagnetic field (EMFs) on proliferation, differentiation and gene expression of osteoblasts *in vitro*, the newborn rat calvarial osteoblasts were isolated by enzyme digestion and randomly divided into 5 groups after one passage. The EMFs treatment group is exposed to 50 Hz 1.8 mT sinusoidal, triangular, serrate and square wave of EMFs and controls without EMFs treatment. The osteoblasts were exposed to the EMFs for 30 min/(time • day). The cells were observed under the contrast phase microscope each day. The EMFs groups were arranged in spiral appearance after 4~8 days of the EMFs treatment. MTT result showed that sinusoidal wave significantly inhibited osteoblast proliferation, whereas square wave enhanced the osteoblast proliferation. The ALP activity in triangular and sinusoidal wave groups significantly increased ( $P < 0.01$ ) compared with that in control. The number of calcified nodules, ALP stained result and Collagen- I immunohistochemistry tested result are according to the result of ALP activity. There was a common result that sinusoidal and triangular wave significantly increased the *Igf*, *Opg* and *Runx-2* mRNA expression. The four different wave of EMFs at 50 Hz 1.8 mT enhances the osteoblasts maturation, mineralization and *Opg* and *Runx-2* mRNA expression of the osteoblasts, while sinusoidal and triangular have the strongest effect.

**Key words** osteoblasts, sinusoidal wave, triangular wave, serrate wave, square wave

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2011.00148

---

\*This work was supported by a grant from Gansu Provincial Sci. & Tech. Department, China(09ZKDA025).

\*\*Corresponding author.

Tel: 86-931-8994327, E-mail: chkeming@yahoo.com.cn

Received: April 6, 2011 Accepted: June 17, 2011