

正弦波电磁场激活一氧化氮信号通路 促进大鼠成骨细胞成熟与矿化^{*}

程国政¹⁾ 葛宝丰¹⁾ 陈克明^{1)**} 李志锋¹⁾ 周 建¹⁾ 韦 哲²⁾

(¹⁾ 兰州军区兰州总医院骨科研究所, 兰州 730050; ²⁾ 兰州军区兰州总医院医学工程科, 兰州 730050)

摘要 研究正弦波电磁场(SEMF)促进成骨细胞成熟矿化是否与一氧化氮(NO)信号通路相关。首先检测成骨细胞经正弦电磁场作用 0 h、0.5 h、1 h、1.5 h、2 h、2.5 h、3 h、3.5 h 和 4 h 后一氧化氮合酶(NOS)的活性, 以探明电磁场是否影响 NO 的合成; 其次, 在细胞培养液中加入 NOS 的阻断剂 L-NAME 以阻断 NO 信号通路, 观察电磁场促进骨形成作用是否受到影响。结果发现, 经正弦波电磁场处理后, NOS 活性升高, 在 0.5 h 达到峰值, 与空白对照组差异极显著($P < 0.01$), Osterix 基因的表达量、碱性磷酸酶活性和钙化结节数等均显著高于对照组。L-NAME 组各项指标均低于空白对照组, SEMF+L-NAME 组则略高于空白对照组而低于 SEMF 组。以上结果表明 SEMF 促进成骨细胞成熟矿化过程中 NO 信号通路被激活, 如该通路被抑制, 则 SEMF 的促成骨作用被抵消。

关键词 正弦波电磁场, 成骨细胞, 分化, 成熟

学科分类号 Q64, R244

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00437

骨质疏松是一种在世界范围内越来越严重威胁中老年健康的常见病和多发病, 目前常采用钙剂、维生素 D₃、双磷酸盐和降钙素等联合治疗, 见效慢、费用昂贵。近年来, 愈来愈多的实验和临床研究表明, 低频脉冲电磁场治疗骨质疏松具有快速解除患者疼痛症状和切实提高骨密度等特点^[1-2]。我们在前期研究中发现, 频率为 50Hz 的正弦波电磁场(sinusoidal electromagnetic field, SEMF)可促进骨髓间充质干细胞的成骨性分化^[3]、提高体外培养成骨细胞的功能并预防切除卵巢大鼠发生骨质疏松^[4-5], 说明电磁场防治骨质疏松具有良好的开发应用前景。但其机理如何, 至今尚无明确结论。为此, 我们系统研究了正弦波电磁场促进成骨细胞成熟矿化与一氧化氮(nitric oxide, NO)信号通路的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

SPF 级 Wistar 大鼠由甘肃中医学院动物实验中心提供(动物质量合格证号 SCXK 甘 2004-0006-152)。

无酚红的 α -MEM 培养基和胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)为 Gibco 公司产品; L-nitro-arginine-methylester(L-NAME)、甘油磷酸钠、抗坏血酸和地塞米松均购自 Sigma 公司; 一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)和碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性检测试剂盒为南京建成生物工程研究所产品; 一氧化氮含量检测试剂盒购自 Invitrogen 公司; 西地那非为中国药品生物制品鉴定所提供的标准品, 纯度 > 99%; 基因扩增引物、反转录和 PCR 试剂盒均由大连 TaKaRa 公司提供; NOS 和 β -actin 一抗购自 CST 公司, 二抗购自北京中杉金桥生物公司。荧光定量 PCR 仪为 ABI 7300; 电泳仪、电转移仪和酶标仪均为 Bio-Rad 公司产品。

* 甘肃省科技计划资助项目(092NKDA025)。

** 通讯联系人。

Tel: 0931-8994329, E-mail: chkeming@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-08-23, 接受日期: 2010-11-05

1.2 电磁发生装置

实验所用正弦波电磁场发生仪由兰州军区总医院骨科研究所自行研制, 频率 50Hz, 磁感应强度范围 0~20 mT, 时间范围 0~24 h. 经中国人民解放军兰州军区医学计量测试研究站(授权证书号: [WS]军计机证字第 203 号)测定, 磁场环境稳定. 电磁发生装置放置于细胞培养箱内, 由导线与外部控制器相连. 实验期间, 培养箱内温度始终处于 37℃, 如图 1.



Fig. 1 The apparatus designed for treatment of cells by sinusoidal electromagnetic fields

The apparatus was composed of solenoids and controller. The solenoids were 12 cm diam $\times$ 25 cm long hollow cylinders and placed in a CO₂ incubator. The culture dishes were placed in the solenoids (as shown in Figure 1) and exposed to SEMF during culture period. The culture in the same condition but without exposure to SEMF was used as control. The direction of magnetic field was parallel to the surface of culture dishes. The waveform was routinely checked with a probe and oscilloscope.

1.3 成骨细胞培养

成骨细胞的培养方法同以前报道^[6]. 无菌条件下, 取出生 24 h 内的大鼠颅骨, 剔除骨膜及软组织, 将骨片剪成 1 mm $\times$ 1 mm 大小, 用 0.25% 胰蛋白酶于 37℃ 水浴 10 min $\times$ 2 次, 弃消化液. 0.1% II 型胶原酶于 37℃ 水浴连续消化 5 次, 每次 20 min, 收集消化液, 1 000 r/min $\times$ 10 min, 弃上清, 用含 10% 胎牛血清的 α -MEM 培养液悬浮细胞沉淀. 以 2×10^4 个/ml 的浓度接种于大培养皿(直径 100 mm)中, 37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养, 每 3 天换液 1 次, 待细胞长至 80% 时传代.

1.4 分组与干预

P1 代成骨细胞按 2×10^4 /ml 的浓度接种于 30 只中培养皿(直径 60 mm), 每组 6 只, 共 5 组, 分别标记为: 空白对照组(Control)、阳性对照组(Sildenafil, Sild)、电磁场干预组(SEMF)、L-NAME

组和 L-NAME 联合电磁场干预组(SEMF+L-NAME). 待细胞铺满皿底后换成骨性诱导培养液(含 10 mmol/L β -甘油磷酸钠、 1×10^{-7} mol/L 地塞米松、50 mg/L 抗坏血酸), 换液后 6 h 给 L-NAME 组和 SEMF+L-NAME 组加入终浓度为 100 μ mol/L 的 L-NAME, 11.5 h 后给 Sild 组加入终浓度为 10 μ mol/L 西地那非, 12 h 后将 SEMF 组、SEMF+L-NAME 组和 Sild 组放置于频率为 50Hz, 磁感应强度为 1.8mT 的磁场环境中, 每隔 30 min 测量 NOS 活性一次, 直到其活性接近恒定为止. 研究 NO 信号通路与成骨关系时, 选用在此区间内 NOS 活性最高时的作用时间进行干预.

1.5 NOS 活性检测

分别于电磁场干预 0 h、0.5 h、1 h、2 h、3 h 和 4 h 后将 Control 组、SEMF 组和 Sild 组的培养液吸出, PBS 洗 2 遍, 按一氧化氮合酶(NOS)试剂盒操作说明的步骤加入 410 μ l 基质液, 37℃ 水浴 15 min, 加入 2 100 μ l 显色液, 紫外分光光度计测定吸光度值, 换算出 NOS 酶活性, 每皿细胞每分钟生成 1 nmol NO 为一个酶活力单位.

1.6 NO 含量检测

于电磁场干预 0.5 h 后每组取培养液 500 μ l, 按 Griess Reagent Kit 操作步骤配制反应体系并加样至 96 孔板, 室温静置 30 min, 570 nm 处测其吸光度值. 以亚硝酸盐的浓度代表 NO 水平, 单位为 μ mol/L.

1.7 ALP 活性检测

SEMF 每天干预 30 min, 于第 6 天、9 天将各组培养液吸出, PBS 洗 2 遍, 按碱性磷酸酶试剂盒操作说明加入基质液 1 和基质液 2 各 250 μ l, 37℃ 水浴 15 min, 加入 750 μ l 显色液, 紫外分光光度计测定吸光度值, 最后换算成金氏单位.

1.8 碱性磷酸酶阳性克隆(CFU-F_{ALP})染色

SEMF 每天干预 30 min, 第 12 天采用偶氮偶合法进行碱性磷酸酶组织化学染色. PBS 漂洗 2 次, 10% 甲醛固定 30 s, 加入染色液(20 ml pH 8.9 的 Michaelis 氏巴比妥-HCl 缓冲液中含 α -萘基磷酸钠和固蓝 B 盐各 20 mg). 当出现蓝褐色斑点时即弃基质液, PBS 漂洗, 计 CFU-F_{ALP} 数目并照相记录.

1.9 Osterix 基因表达检测

SEMF 干预 30 min 后 12 h 提取细胞总 RNA, 测定 260 nm、280 nm、320 nm 处吸光度值, 计算浓度, 并用 2% 琼脂糖电泳检测其完整性. 调整总

RNA 的浓度至 50 mg/L, 使用 TaKaRa 公司提供的 Prime Script™ RT reagent Kit 配制 20 μ l 反应体系, 进行逆转录. 使用 SYBR Premix Ex Taq™ Real-time PCR 试剂盒配制 20 μ l PCR 反应体系, 反应条件为: 95℃ 预变性 30 s, 95℃ 变性 5 s, 60℃ 退火 31 s, 共进行 40 个循环. 内参照基因 GAPDH 上游引物: 5' GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG 3', 下游引物: 5' ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA 3', 扩增长度为 143 bp; OSX 基因上游引物: 5' GCCTACTTACCCGTCTGACTTT 3', 下游引物: 5' GCCCACTATTGCCAACTGC 3', 扩增长度为 131 bp. 以高浓度 RNA 逆转录得到的 cDNA 为标准品, 经等比稀释后, 进行 PCR 反应, 制备标准曲线. 经内参校正, 求得目的基因的相对表达量.

1.10 NOS 蛋白表达水平的检测

于电磁场干预 30 min 后 24 h 将培养液吸出, 用 4℃ 预冷的 PBS 漂洗 2 遍后, 加入 800 μ l 的细胞裂解液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0、150 mmol/L NaCl、100 mg/L PMSF、1 mg/L 抑蛋白酶肽、1% Tween-20、0.5% 去氧胆酸钠、1% SDS), 于冰上静置 30 min, 使细胞充分裂解. 4℃、12 000 r/min 离心 15 min, 取上清, 用 BCA 法进行总蛋白质浓度的测定. 95℃ 变性 4 min, 各组取 10 μ g 蛋白质样品, 经 15% SDS-PAGE 分离后, 将蛋白质转移至 PVDF 膜上, 2% 脱脂奶粉室温下摇床振荡封闭 2 h, 加入 β -actin 和 I 型胶原的一抗(均为 1:1 000 稀释), 4℃ 过夜. 次日加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:3 000 稀释), 37℃ 孵育 2 h. 每进行下一步实验前 PVDF 膜均用 4℃ 预冷的 PBST 摇床漂洗 3 次, 每次 10 min. 用增强化学发光法检测目的蛋白, X 光片曝光后, 用 Image-Pro plus6.0 软件扫描测定条带灰度值.

1.11 钙化结节染色

SEMF 每天干预 30 min, 第 14 天将培养液吸出, PBS 洗 2 遍, 10% 甲醛固定 5 min, 蒸馏水漂洗 3 次. 加入 0.1% 茜素红-Tris-HCl 染色液(pH 8.3), 37℃ 水浴 60 min, 蒸馏水漂洗, 干燥后计数.

1.12 统计学处理

检测结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS16.0 for Windows 统计软件处理, 多组均数比较采用单因素方差分析(ONE-WAY ANOVA)方法, 组间两两比较选用 LSD 法, $P < 0.05$ 表示有显著性差异, $P < 0.01$ 表示有极显著性差异.

2 结 果

2.1 SEMF 对 NO 信号通路的影响

2.1.1 对 NOS 活性的影响. 电磁场干预 0~4 h, Control 组 NOS 活性几乎没有变化, SEMF 组则明显上升, 在 0.5 h 时显著高于对照组($P < 0.01$), 随后开始下降, 但始终高于对照组, Sild 组 NOS 活性也明显升高且持续至 3 h($P < 0.01$), 此后开始下降, 4 h 时与 SEMF 组水平相当, 见图 2.

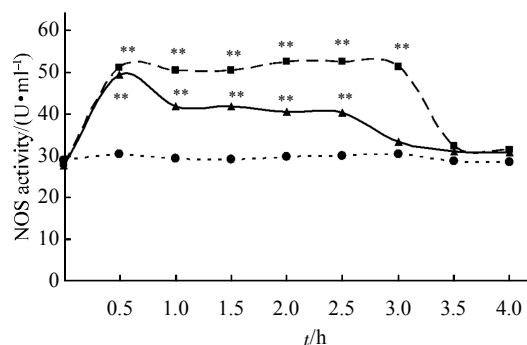


Fig. 2 NOS activity in rat calvarial osteoblasts treated by sinusoidal electromagnetic fields after different time

NO is generated by the nitric oxide synthase enzymes (NOS) from molecular oxygen and the terminal guanidino nitrogen of the amino acid L-arginine, yielding L-citrulline as a coproduct. To measure the amount of NOS enzyme, the chromatic compound of NO to nucleophilic substance is measured using an *in vitro* assay at 530 nm. SEMF and sildenafil had an effect on NOS activity measured on the 0 h, 0.5 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h after SEMF treatment. ** $P < 0.01$ versus Control. ●—●: Control; ▲—▲: SEMF; ■—■: Sild.

2.1.2 对 NO 含量的影响. 由图 3 可见, 电磁场干预 0.5 h 后 SEMF 组的 NO 含量显著高于 Control 组, 差异具有统计学意义($P < 0.05$); 阳性对照组(Sild 组)的 NO 含量又高于 SEMF 组, 与空白对照组的差异具有显著统计学意义($P < 0.01$).

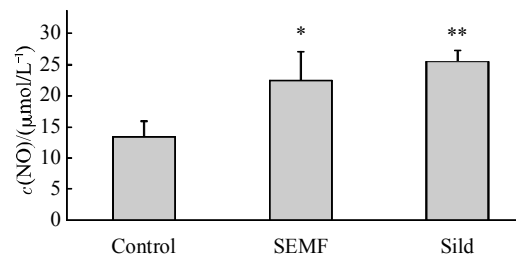


Fig. 3 NO production stimulated by exposure to sinusoidal electromagnetic fields for 0.5 h

NO production was assessed indirectly by measuring accumulation of NO₃ and NO₂ in the culture media. After 0.5 h of exposure to SEMF, 500 μ l culture media were collected and the NO content was measured by Griess reaction. The data is expressed as percent of corresponding controls ($n=3$). * $P < 0.05$ versus Control, ** $P < 0.01$ versus Control.

2.2 SEMF 对 L-NAME 阻断 NO 产生的影响

2.2.1 对 NOS 蛋白表达的影响. nNOS(neuronal NOS)在成骨细胞中表达量很低, 各组间无明显差别; eNOS 为高表达, 经电磁场干预后表达量进一步增加; iNOS 的表达量原本较低, 经电磁场干预

后大量表达. 加入 L-NAME 后, SEMF+L-NAME 组的 eNOS 和 iNOS 的表达量均明显下降, 但仍高于 Control 组和 L-NAME 组, 差异具有统计学意义, 见图 4.

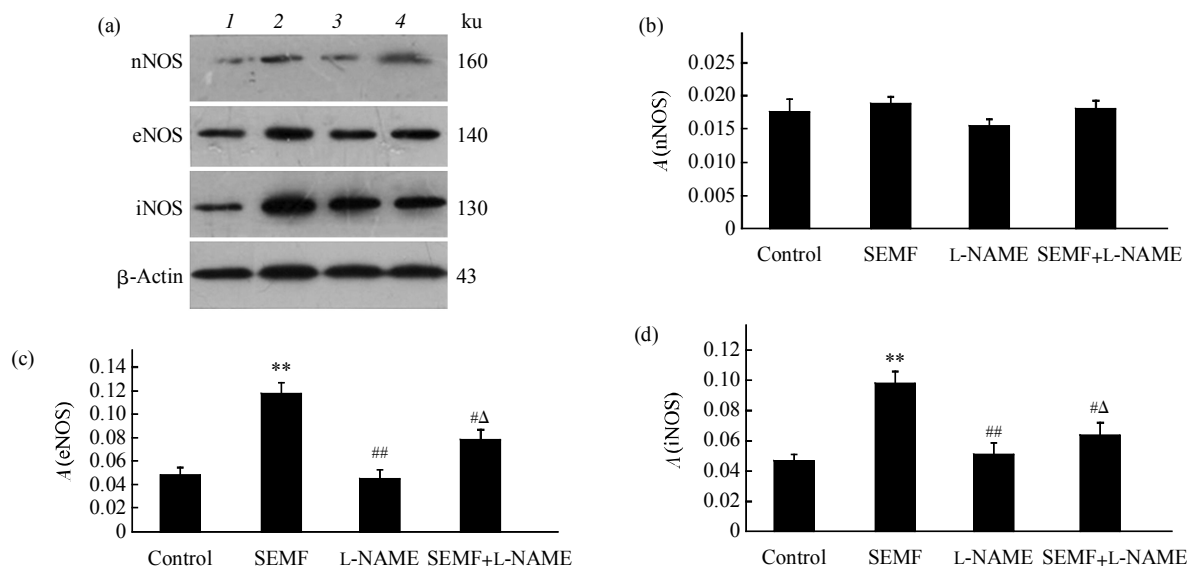


Fig. 4 Expression level of NOS in rat calvarial osteoblasts treated by SEMF or L-NAME after 0.5 h

Three isoforms of NOS were detected, which are neuronal form (nNOS or NOS1), endothelial form (eNOS or NOS3) and inducible form (iNOS or NOS2) respectively. nNOS was expressed slightly and no significant difference existed among groups. eNOS and iNOS were expressed at significantly higher level in SEMF group than in Control and L-NAME group. Their expressions were decreased obviously in SEMF+L-NAME group, but still higher than that in the control and L-NAME group. (a) Western blots. 1: Control; 2: SEMF; 3: L-NAME; 4: SEMF+L-NAME. (b) Relative optical density of nNOS. (c) Relative optical density of eNOS. (d) Relative optical density of iNOS. ** $P < 0.01$ vs Control; # $P < 0.05$ vs SEMF; ## $P < 0.01$ vs SEMF; $\Delta P < 0.05$ vs L-NAME.

2.2.2 对 NO 含量的影响. SEMF 干预 0.5 h 后, NO 分泌量显著高于 Control 组和 L-NAME 组, L-NAME 组和 Control 组无明显差别. SEMF + L-NAME 组的分泌量低于 SEMF 组, 但仍显著高于 Control 组和 L-NAME 组($P < 0.05$), 见图 5.

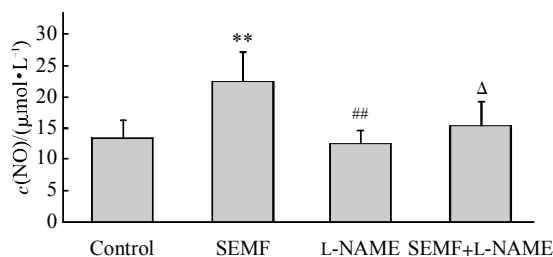


Fig. 5 NO production in rat calvarial osteoblasts after exposure to SEMF for 0.5 h

NO production was measured by Griess reaction after the osteoblasts were exposed to SEMF for 30 min. L-NAME were supplemented into media prior to the exposure to SEMF. The data is expressed as percent of corresponding controls ($n=3$). ** $P < 0.01$ vs Control, ## $P < 0.01$ vs SEMF, $\Delta P < 0.05$ vs L-NAME.

2.3 NO 信号通路与成骨性分化的相关性

2.3.1 成骨特异性基因 Osterix 的表达. SEMF 干预 30 min, 12 h 后检测: SEMF 组 Osterix 基因表达量显著高于 Control 组($P < 0.01$), L-NAME 组则显著低于 Control 组($P < 0.05$), SEMF+L-NAME 组低于 SEMF 组, 但高于 L-NAME 组($P < 0.05$), 见图 6.

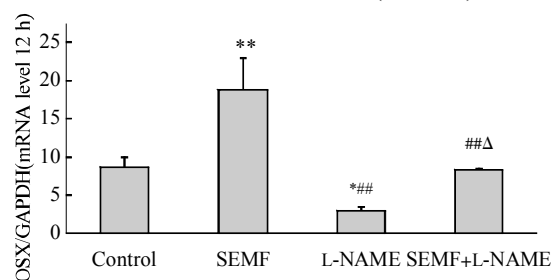


Fig. 6 The gene expression level of OSX in rat calvarial osteoblasts after exposed to SEMF for 12 h

The gene expression level of Osterix was examined by Real time RT-PCR. Results shown are representative of the average of three independent trials. * $P < 0.05$ vs Control, ** $P < 0.01$ vs Control, ## $P < 0.01$ vs SEMF, $\Delta P < 0.05$ vs L-NAME.

2.3.2 ALP 活性的变化. 6 天和 9 天时 SEMF 组 ALP 活性是 Control 组的 2 倍, L-NAME 组低于 Control 组, 但无统计学意义, SEMF+L-NAME 组略高于 L-NAME 组和 Control 组, 但均无统计学意义, 见图 7.

2.3.3 CFU-F_{ALP} 数量. 如图 8 所示, SEMF 组碱性磷酸酶阳性克隆 (CFU-F_{ALP}) 数明显多于 Control 组, L-NAME 组少于 Control 组, SEMF+L-NAME 组较 L-NAME 组增多, 与 Control 组数量相当.

2.3.4 钙化结节数量. 由图 9 可见, SEMF 组的钙化结节数明显多于 Control 组; L-NAME 组与 Ccontrol 组接近, SEMF+L-NAME 组比 L-NAME 组和 Control 组多, 但比 SEMF 组少.

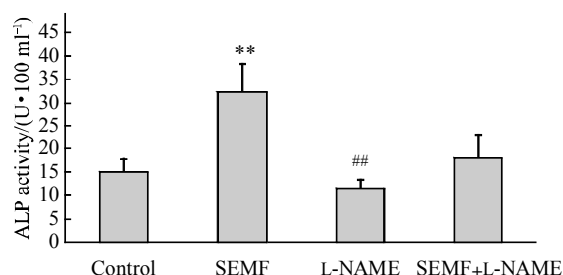


Fig. 7 The intracellular alkaline phosphatase activity of rat calvarial osteoblasts after 6 days of osteogenic induction and exposure to SEMF 0.5 h/d

Alkaline phosphatase (ALP) activity in SEMF group was significantly higher than that of the control. It is obviously lower in L-NAME group than that in Control, but improved to a higher level in SEMF+L-NAME group. The higher activity of ALP indicates the more active osteogenic differentiation. ** $P < 0.01$ vs Control; ## $P < 0.01$ vs SEMF.

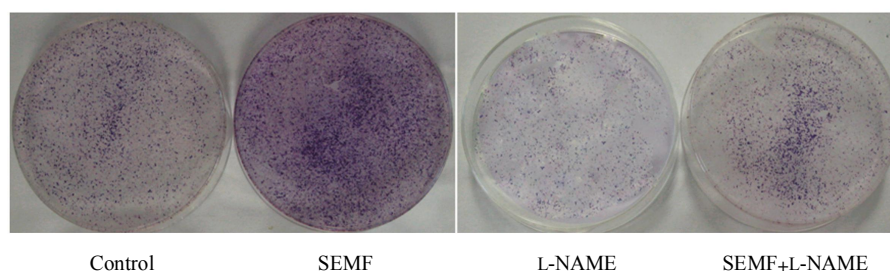


Fig. 8 Staining result of colony forming unit-Fibroblast_{ALP} after 12 days of osteogenic induction culture

On day 12, the medium was removed, and the cells were washed with PBS and fixed with 10% formaldehyde, rinsed in double distilled water, and added staining solution (20 ml pH 8.9 barbital-HCl buffer, 20 mg α -naphthyl phosphate, 20 mg Solid blue B). Staining results were photographed. The more CFU-F_{ALP} indicates the more active osteogenic differentiation.

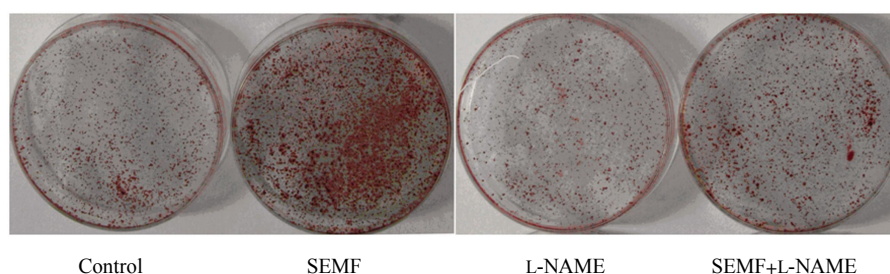


Fig. 9 Mineralized nodules stained by alizarin after 14 days of osteogenic induction

Mineral matrix deposition was stained by Alizarin Red. A red dot represents a calcified nodule unit. The more red dots indicates the more active osteogenic differentiation.

3 讨 论

1996 年, Bawin 等^[7]首次报道了电磁场对 NO 信号途径的影响, 发现 NO 的生理性抑制作用可以抵消 1 Hz 电磁场对海马区慢节律的影响, 此后很

多学者证实电磁场可以通过激活 NO 信号途径而发挥其生物学效应^[8-11]. 关于 NO 信号通路在骨质疏松发病过程中的作用近年来也有研究报道, 硝酸甘油、硝普钠、泼尼松龙等 NO 供体药物在体内可产生略高于正常浓度的 NO 而防治骨质疏松已被大量

临床病例所证实^[12-15]。基于以上缘由,我们推测电磁场促进成骨细胞分化成熟的作用应与 NO 信号通路有关。为证明这一推断,我们采用了在前期研究中筛选得到的最佳参数组合,即频率为 50Hz、磁感应强度为 1.8mT 的正弦波电磁场^[3-5]。

NO 是由一氧化氮合酶催化 L-精氨酸脱胍基而产生的一种自由基性质的气体分子,由于没有专门的储存及释放调节机制,靶细胞上 NO 的多少与 NO 的合成直接有关,一氧化氮合成酶(NOS)活性的高低直接影响了 NO 的分泌。为此,本实验首先研究了电磁场是否可以影响 NOS 的活性。电磁场干预后不同时间点成骨细胞内 NOS 活性的检测结果表明,电磁场可以提高 NOS 活性,且在 0.5 h 达到最高,尽管随后迅速下降,但直至 4 h 仍高于空白对照组水平。其提高 NOS 酶活性的峰值水平和时间与阳性对照药西地那非相同,只是后者持续时间更长。

由于体内存在氧和其他易与 NO 发生反应的化合物,NO 在细胞外极不稳定,半衰期只有 5 s 左右,所以 NO 的浓度很难直接测定。我们通过 Griess 反应测定了 NO 氧化后产生的硝酸根和亚硝酸根浓度,发现电磁场可以在 0.5 h 内影响 NO 的合成($P < 0.01$),此效应与西地那非类似。

碱性磷酸酶在成骨过程中为羟基磷灰石的沉积提供必要的磷酸,胶原为细胞外基质成熟和矿化结节生成提供框架结构,两者均为成骨性分化的早期标志物。此外,成骨过程还必须要有转录因子 Osterix 的参与^[16]。L-NAME 是 NOS 的特异性阻断剂,我们通过向培养液中加入 L-NAME 以阻断 NO 的合成,进而检测阻断前后成骨性分化指标,以此探究正弦电磁场是否经 NO 信号途径影响成骨过程。结果表明,L-NAME 阻断后 NOS 活性和 NO 合成量均显著下降,接近空白对照组水平。成骨性分化基因 OSX 的表达、碱性磷酸酶活性以及钙化结节数在正弦电磁场干预后均明显高于对照组,但经 L-NAME 阻断后显著下降,与空白对照组水平相当或略低,表明 NO 信号途径参与了电磁场促进成骨过程。实验中还发现,SEMF+L-NAME 组各项成骨性分化指标均较 SEMF 组低,但较 L-NAME 组高。此现象究竟是 SEMF 部分抵消了 L-NAME 的阻断效应,还是由于 SEMF 通过其他信号通路所致,尚不明确。

0~100 Hz 电磁场的生物效应主要是非热效应^[17]。本研究选用的电磁场频率为 50 Hz,在实验

过程中我们实时监测了培养箱内温度,未发现温度升高迹象,表明结果与热效应无关。总之,我们发现正弦波电磁场可以通过提高 NOS 活性而增加 NO 含量,从而促进成骨细胞的成熟与矿化。但 NO 信号途径是否为主要途径,该磁场是否还可以通过其他信号途径来影响成骨过程以达到防治骨质疏松的目的,则尚待深入研究。

参 考 文 献

- [1] Shen W W, Zhao J H. Pulsed electromagnetic fields stimulation affects BMD and local factor production of rats with disuse osteoporosis. *Bioelectromagnetics*, 2010, **31**(2): 113-119
- [2] Huang L Q, He H C, He C Q, *et al.* Clinical update of pulsed electromagnetic fields on osteoporosis. *Chin Med J*, 2008, **121**(20): 2095-2099
- [3] 程国政,李志锋,周建,等.不同强度低频正弦交变电磁场对大鼠骨髓间充质干细胞成骨性分化的影响. *中国骨质疏松杂志*, 2010, **16**(8): 558-562
Cheng G Z, Li Z F, Zhou J, *et al.* *Chin J Osteoporosis*, 2010, **16**(8): 558-562
- [4] 周建,葛宝丰,陈克明,等.不同强度正弦交变电磁场对体外培养成骨细胞增殖与分化的影响. *中国骨质疏松杂志*, 2010, **16**(7): 1-4
Zhou J, Ge B F, Chen K M, *et al.* *Chin J Osteoporosis*, 2010, **16**(7): 1-4
- [5] 李志锋,程国政,翟远坤,等.低强度脉冲电磁场对去卵巢大鼠不同部位骨密度的影响. *中国骨质疏松杂志*, 2009, **15**(12): 882-884
Li Z F, Cheng G Z, Zhai Y K, *et al.* *Chin J Osteoporosis*, 2009, **15**(12): 882-884
- [6] 程国政,李志锋,翟远坤,等.淫羊藿苷含药血清对体外培养大鼠颅骨成骨细胞增殖与分化的影响. *中国骨质疏松杂志*, 2009, **15**(8): 23-26
Cheng G Z, Li Z F, Zhai Y K, *et al.* *Chin J Osteoporosis*, 2009, **15**(8): 23-26
- [7] Bawin S M, Satmary W M, Jones R A, *et al.* Extremely-low-frequency magnetic fields disrupt rhythmic slow activity in rat hippocampal slices. *Bioelectromagnetics*, 1996, **17**(5): 388-395
- [8] Kirichuk V F, Ivanov A N, Antipova O N, *et al.* Electromagnetic radiation of the terahertz range at the nitric oxide frequency in correction and prophylaxis of functional activity disorders in thrombocytes of white rats under long-term stress. *Tsitologiya*, 2007, **49**(6): 484-490
- [9] Sirmatel O, Sert C, Tümer C, *et al.* Change of nitric oxide concentration in men exposed to a 1.5 T constant magnetic field. *Bioelectromagnetics*, 2007, **28**(2): 152-154
- [10] Jeong J H, Kum C, Choi H J, *et al.* Extremely low frequency magnetic field induces hyperalgesia in mice modulated by nitric oxide synthesis. *Life Sciences*, 2006, **78**(13): 1407-1412
- [11] Reale M, De Lutiis M A, Patruno A, *et al.* Modulation of MCP-1 and iNOS by 50-Hz sinusoidal electromagnetic field. *Biology and*

- Chemistry /Official J Nitric Oxide, 2006, **15**(1): 50–57
- [12] Wimalawansa S J. Rationale for using nitric oxide donor therapy for prevention of bone loss and treatment of osteoporosis in humans. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2007, **1117**: 283–297
- [13] Liu S Z, Yan H, Hou W K, *et al.* Relationships between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and osteoporosis in postmenopausal women. *J Zhejiang University Science B*, 2009, **10**(8): 609–618
- [14] Wimalawansa S J. Nitric oxide: novel therapy for osteoporosis. *Expert Opinion Pharmacotherapy*, 2008, **9**(17): 3025–3044
- [15] Firat S C, Cetin Z, Samanci N, *et al.* Evaluation of eNOS gene polymorphisms in relation to BMD in postmenopausal women. *Maturitas*, 2009, **63**(4): 352–356
- [16] Caetano L J, Canhao H, Fonseca J E, *et al.* Osteoblasts and bone formation. *Acta Reumatol Port*, 2007, **32**(2): 103–109
- [17] 习 岗, 杨运经. 电磁场对生物体系的非热效应及其作用机理. *大学物理*, 2008, **27**(11): 50–52
- Xi G, Yang Y J. *College Physics*, 2008, **27**(11): 50–52

Sinusoidal Electromagnetic Fields Enhance Rat Osteoblast Differentiation and Mineralization by Activating Nitric Oxide Signaling Pathway*

CHENG Guo-Zheng¹⁾, GE Bao-Feng¹⁾, CHEN Ke-Ming^{1)**}, LI Zhi-Feng¹⁾, ZHOU Jian¹⁾, WEI Zhe²⁾

¹⁾ Institute of Orthopaedics, Lanzhou General Hospital, Lanzhou 730050, China;

²⁾ Department of Medical Engineering, Lanzhou General Hospital, Lanzhou 730050, China)

Abstract It was investigated whether the effects of sinusoidal electromagnetic field (SEMF) stimulation on the differentiation and mineralization of osteoblast are mediated by the nitric oxide (NO) signal pathway. It was first investigated whether SEMF had an effect on nitric oxide synthase (NOS) activity measured on the 0 h, 0.5 h, 1 h, 1.5 h, 2 h, 2.5 h, 3 h, 3.5 h, 4 h after SEMF treatment. Secondly, the NOS inhibitor, L-nitro-arginine-methylester (L-NAME) was added to the culture medium to observe whether it inhibit the maturation and mineralization of osteoblast stimulated by SEMF, which evaluated by measuring alkaline phosphatase (ALP) activity, CFU-F_{ALP}, osterix gene expression and mineralized bone modulus. After treatment of SEMF, the NOS activity in SEMF group increased in comparison with the normal control group ($P < 0.01$), reaching the highest level after 0.5 h. The gene expression of Osterix, ALPase activity and mineralized bone modulus in the SEMF group were also increased significantly. However, these effects were partially blocked in the L-NAME group. Surprisingly, all the osteogenic markers in the SEMF+L-NAME group were slightly higher than those of the control group, but lower than those of the SEMF group. In conclusion, The NO signal pathway was activated by SEMF treatment. The stimulatory effects of SEMF on the differentiation and mineralization of osteoblast were attenuated when NO signal pathway was blocked.

Key words sinusoidal electromagnetic fields, osteoblast, differentiation, mineralization

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00437

*This work was supported by a grant from The Natural Science Foundation of Gansu Province (092NKDA025).

**Corresponding author.

Tel: 86-931-8994329, E-mail: chkeming@yahoo.com.cn

Received: August 23, 2010 Accepted: November 5, 2010