

电磁场暴露海马神经元自由基和胞内 Ca^{2+} 的变化 *

苏海峰 包家立 ** 李 鹏

(浙江大学医学院浙江省生物电磁学重点实验室, 杭州 310058)

摘要 电磁场对健康影响的研究包括流行病学调查、人体与动物、细胞、生化与分子生物、生物物理等 5 个层次, 电磁生物效应最初是通过物理作用产生化学反应, 继而产生后续生物反应。自由基、电磁能量和生物钙是分属于化学、物理学和生物学的 3 个概念, 研究它们之间的关系对于认识电磁生物效应的原初作用具有意义。选择海马神经元, 观察在 0.1mT、0.5mT 和 1.0 mT 电磁场暴露 48 h, 海马神经元 ROS 水平和胞内 Ca^{2+} 浓度的变化。实验结果表明: 暴露于 0.1mT, 0.5mT 和 1.0mT 电磁场海马神经元的 ROS 水平和 Ca^{2+} 浓度都比对照组有显著性提高($P < 0.01$)。暴露于 0.1mT 和 0.5 mT 电磁场的 ROS 水平和暴露于 0.1mT 电磁场的 Ca^{2+} 浓度与自由基清除剂+电磁场(Trolox+EMF)组比较没有差异($P > 0.05$), 暴露于 1.0mT 电磁场的 ROS 水平和暴露于 0.5mT 和 1.0mT 电磁场的 Ca^{2+} 浓度比 Trolox+EMF 组有显著性提高($P < 0.01$)。表明电磁场可以促进细胞自由基的产生, 并且 ROS 水平与胞内 Ca^{2+} 浓度有正相关性。

关键词 电磁场, 自由基, Ca^{2+} , ROS, 神经元

学科分类号 Q64

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00557

随着信息化和电气化的发展, 无线通讯(如手机、无线网络)、家用电器(如微波炉、电磁灶)、电力线等使用愈来愈多, 这些科技进步在给人们带来利益的同时, 也引起人们对电磁场对人体健康影响的关注, 这种关注主要集中在射频电磁波和工频电磁场的健康危险。目前, 电磁场对健康影响主要在流行病学调查、人体、动物、细胞、分子等各种水平上展开研究。然而, 近年来对生物物理机制研究正受到重视。2007 年, 世界卫生组织(WHO)在电磁场研究议程中认为, 低水平电磁场在健康效应中, 生物物理作用必定通过一些机制发生生物变化, 从而决定人体暴露产生的健康影响, 当前需要从生物物理机制上加以研究^[1]。2007 年世界卫生组织(WHO)关于极低频电磁场环境健康标准 238^[2]和 2009 年国际非电离辐射防护委员会(ICNIRP)关于高频电磁场生物效应与健康推论报告中都对生物物理机制进行了总结^[3]。

自由基是含有不成对电子的原子团, 具有抢夺其他物质电子的能力, 因此它有很强的氧化性, 可损害生物机体的组织和细胞, 进而引起疾病与衰老。自由基产生的本质是分子基团中的电子逃离原来的轨道, 这种逃离可以从外界获取或释放能量中

产生。电磁场是一种具有能量的外界物理因素, 一些实验研究证明了电磁场对自由基产生有作用^[4-6]。本文选择对电磁场具有较敏感神经症状^[7-8]的神经元为对象, 研究电磁场对自由基产生和胞内 Ca^{2+} 的影响, 以对电磁场生物原初效应的生物物理机制进行初步探索。

1 材料与方法

1.1 海马神经元原代培养

超净台内使用 1 ml 0.1 g/L 的多聚赖氨酸(Poly-L-lysine, 美国 Sigma 公司)包被培养皿 30 min, 吸弃, 过夜晾干备用; 75%酒精消毒清洁级健康新生 24 h 以内的 Sprague-Dawley(SD)大鼠(浙江大学实验动物中心), 雌雄不限, 体重 5~7 g, 断头处死, 取大脑海马组织, 剥除脑膜和血管, 放入冰浴中的解剖液(葡萄糖 / 蔗糖溶液, HEPES 缓冲液, D_1 盐溶液, 无菌水, pH 值 7.2~7.4, 4℃ 保存)内, 将海

* 国家自然科学基金资助项目(50377039)。

** 通讯联系人。

Tel: 0571-88208171, E-mail: baojl@zju.edu.cn

收稿日期: 2009-09-22, 接受日期: 2010-01-05

马组织切碎后, 转移至 3 ml 0.25% 胰酶溶液 (Trypsin, 美国 Amresco 公司) 中, 37℃ 消化 20 min; 吸管吸弃胰酶, 用 3 ml 37℃ 温浴的种植液[高糖 DMEM (美国 Invitrogen 公司), PBS (pH 7.4), 马血清(horse serum, HS, 奥地利 PAA 公司), 0.2 mol/L L- 谷氨酰胺(L-glutamine, 奥地利 PAA 公司), 抗生素(青霉素和链霉素, 奥地利 PAA 公司)]中和胰酶, 洗组织 2 遍; 加入 3 ml 种植液, 先后用粗口和细口吸管轻轻吹打后离心 1 min, 制成单细胞悬液, 重复 2 次; 计数后将细胞悬液用种植液稀释, 按 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 密度接种培养皿, 2 ml/皿; 4 h 后全量换成用 Neurobasal 使用液[Neuronbasal 培养基(美国 Invitrogen 公司), 0.2 mol/L L- 谷氨酰胺, 抗生素, B₂₇ supplement]半量换液, 第 3 天用 Neurobasal 使用液半量换液, 加上 2 μl 10 $\mu\text{mol/L}$ 阿糖胞苷(Ara-c, 美国 Sigma 公司), 再隔 3 天用 Neurobasal 使用液半量换液。

1.2 海马神经元纯度鉴定

取出培养 7 天的海马神经元, 吸弃培养液, 用预温(37℃) 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 洗 2 遍, 4% 多聚甲醛固定 30 min, 再用 PBS 轻洗 2 遍, 用 0.1% Triton X-100 的 PBS 液中孵育 10 min 破膜, PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 滴加正常山羊血清 37℃, 封闭 1 h, 滴加一抗 MAP2(兔源, 阴性对照用 PBS 代替一抗), 4℃ 冰箱孵育过夜, PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 滴加二抗(羊抗兔) 1:200, 室温 90 min, PBS 洗 3 次, 每次 5 min. 用激光共聚焦显微镜(德国 Leica)观察。

1.3 50Hz 电磁场暴露

电磁场暴露系统是瑞士联邦工业大学 IT'IS 基金会生产的 sXcELF 系统. 该系统有两组 Helmholtz 线圈组, 其中一组为实验线圈, 另一组为假暴露线圈, 它们各包括了两对 Helmholtz 线圈, 实验线圈由异名端串联连接, 而假暴露线圈由同名端串联连接. 这两组线圈均置于同一台 CO₂ 孵育箱内, 并分别通过双向继电器与同样的电流源连接, 电流源的频率由函数发生器控制, 频率范围 3~1 250Hz, 动态范围 0.04~3.6mT, 磁场不均匀度 $\pm 4\%$, 寄生电场 $< 1 \text{ V/m}$. 数据采集器用于采集线圈冷却风扇电流、线圈电流、两对 Helmholtz 线圈之间的电压降、孵育箱气流温度等^[9]数据。

将用于电磁场暴露实验组和清除剂+电磁场组的神经元放置在实验线圈内, 用于对照组的神经元放置在假暴露线圈内. 频率为 50 Hz 工频, 暴露磁

感应强度分别为 0.1mT、0.5mT 和 1.0mT 三种, 暴露时间 48 h, CO₂ 孵育箱内温度为 37℃.

1.4 神经元内活性氧自由基(ROS)检测

用无血清培养液按 1:1 000 稀释 DCFH-DA (2,7- 二氢二氯荧光黄双乙酸钠, 碧云天生物技术研究), 终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$, 作为 ROS 检测探针. 去除培养皿中的细胞培养液, 加入 1 ml DCFH-DA. 在 37℃ 的 CO₂ 孵育箱内孵育 20 min. 每隔 3~5 min 摇匀, 使 DCFH-DA 和细胞充分接触. 用无血清培养液洗涤细胞 3 次, 充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA. 活性氧阳性对照(碧云天生物技术研究)按 1:1 000 比例, 并加入 1 ml 使用. 用荧光酶标仪(Infinite M200, 美国 TECAN 公司)检测, 激发波长 488 nm, 发射波长 525 nm, 狭缝宽度 10 nm.

1.5 神经元内钙测定

培养的海马神经元用 PBS 漂洗 2~3 次, 洗掉细胞表面的残渣, 每细胞培养皿中加入 1 ml 荧光负载液[5 $\mu\text{mol/L}$ Fluo-3/Am(美国 Invitrogen 公司), 0.1% Pluronic F-127(美国 Invitrogen 公司)], 37℃ 负载 30 min, 再次用 PBS 洗涤 2~3 次, 充分洗掉没有进入细胞内的荧光探针, 加入 1 ml Neurobasal 使用液. 将负载好的细胞放在激光共聚焦显微镜(德国 Leica)载物台上, 扫描条件为: 激发波长 488 nm, 物镜 $\times 20$, 扫描速度为快速扫描, 扫描密度为 512×512 , 扫描模式为时间序列扫描, 扫描时间间隔为 $t_s = 2\text{s}$. 系统参数保持不变。

1.6 实验设计

实验分电磁场假暴露对照组(control)、暴露实验组(EMF)、自由基清除剂+电磁场组(Trolox+EMF)和阳性对照组(H₂O₂). 假暴露对照组和暴露实验组同时放置在 sXcELF 系统内的假暴露线圈和实验线圈内, 暴露时间 48 h. 暴露实验组又分 0.1mT、0.5mT 和 1mT 三种暴露磁感应强度组. Trolox+EMF 是在细胞培养皿中加 2 μl 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 Trolox (瑞士 ALEXIS 公司), 再置于 sXcELF 系统的实验线圈, 暴露 48 h. 阳性对照组是细胞皿不放置在 sXcELF 系统中, 而另加 2 μl 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 H₂O₂(国药集团化学试剂有限公司), 并且仅用于 ROS 检测的对照. 每组有 3 个重复数。

每组在同一个暴露磁感应强度组的实验中, ROS 检测分 2~8 皿细胞, 钙测定分 2~3 皿细胞, 并且钙测定每皿选取 3 个视野拍照, 每个视野圈定 5~6 个细胞用软件分析细胞内钙荧光。

1.7 数据统计

实验数据用 student-*t* 检验在 Excel 中进行统计.

2 结 果

2.1 海马神经元形态与纯度鉴定

刚种植的海马神经元小而圆, 用种植液培养 4 h 可以贴壁, 各树突轴突有触角生长. 用 neurobasal 培养液培养到第 3 天时, 细胞突触明显增多、延长, 并且开始连接, 胞体逐渐丰满. 第 7 天细胞交织成网, 轴突树突明显, 胞体较多呈锥形、间或圆形、有折光性、立体感强. 细胞密度为 1×10⁶. 经细胞免疫组化鉴定, 纯度达 90%以上.

2.2 电磁场对 ROS 的影响

实验结果表明, 暴露于 0.1mT, 0.5mT 和 1.0mT 电磁场 48 h 后海马神经元的 ROS 水平都比对照组有显著性提高($P < 0.01$). 暴露于 0.1mT 和 0.5 mT 电磁场的 ROS 水平与 Trolox+EMF 组比较没有差异($P > 0.05$), 但 1.0mT 电磁场比 Trolox+EMF 组有显著性提高($P < 0.01$), 见表 1.

Table 1 DCF fluorescent intensity indicating ROS formation in the neurons following 48 h exposure to EMF

Group	0.1mT	0.5mT	1.0mT
	$\bar{X} \pm \sigma(n=16)$	$\bar{X} \pm \sigma(n=18)$	$\bar{X} \pm \sigma(n=10)$
Control	161.2±15.2	186.1±40.5	132.6±19.6
EMF	189.2±17.5	292.7±59.0	333.8±20.5
Trolox+EMF	162.5±4.9	257.7±74.2	253.4±16.7
H ₂ O ₂	445.1±40.7	525.0±9.9	493.0±35.8

从暴露实验组 EMF 中可以看到: 随着电磁场暴露的磁感应强度(*B*)升高, 海马神经元的 ROS 水平也升高, 如图 1 所示, 并且 0.1mT 与 0.5mT 电磁场的 ROS 水平有较大差异($P < 0.01$), 而 0.5mT

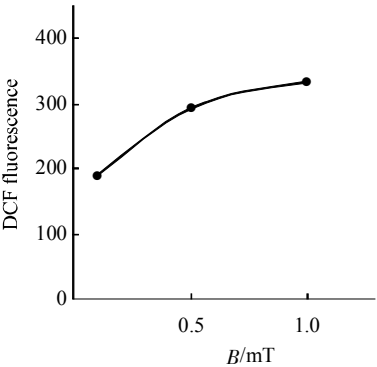


Fig. 1 Positive correlation between ROS level and magnetic flux density *B* in the neurons

与 1.0mT 的 ROS 水平差异不大($P > 0.05$). 虽然海马神经元的 ROS 水平与电磁场暴露的磁感应强度有随增依赖性, 但在本实验最强的磁感应强度 1.0mT 下, 海马神经元 ROS 水平也远低于 H₂O₂ 所产生的 ROS ($P < 0.01$).

2.3 电磁场对神经元胞内钙的影响

实验结果表明, 暴露于 0.1mT、0.5mT 和 1.0mT 电磁场 48 h 后海马神经元胞内 Ca²⁺ 浓度都比对照组有显著性提高($P < 0.01$). 暴露于 0.1mT 电磁场 EMF 组的胞内 Ca²⁺ 浓度与 Trolox+EMF 组比较没有差异($P > 0.05$), 但 0.5mT 和 1.0mT 电磁场 EMF 组比 Trolox+EMF 组都有显著性提高($P < 0.01$), 见表 2.

Table 2 Fluo-3 fluorescent intensity indicating [Ca²⁺]_i concentration in the neurons following 48 h exposure to EMF

Group	0.1mT	0.5mT	1.0mT
	$\bar{X} \pm \sigma(n=104)$	$\bar{X} \pm \sigma(n=78)$	$\bar{X} \pm \sigma(n=98)$
Control	59.8±27.2	138.5±70.9	46.3±20.3
EMF	102.8±38.4	196.2±57.2	135.5±59.6
Trolox+EMF	100.9±35.6	164.9±54.6	92.3±44.6

从表 2 结果中可以看到: 0.1mT、0.5mT 和 1.0 mT 电磁场暴露 48 h, 海马神经元胞内 Ca²⁺ 浓度交叉比较均有显著性差异($P < 0.01$), 并且随着电磁场磁感应强度增加, 其 Ca²⁺ 浓度在 0.5mT 时出现最大. 可以看出较高强度电磁场暴露才能影响细胞内钙的改变.

3 讨 论

生物大分子在化学结构上是有机化合物, 有机化合物在发生化学反应时, 总是伴随着一部分共价键的断裂和新的共价键生成. 共价键的断裂有均裂和异裂两种方式, 其中均裂是共用电子均等地分配给成键的两个原子的过程, $A:B \rightarrow A\cdot + \cdot B$, 自由基是均裂后带有一个未成对电子的原子或基团, 是一种活泼的中间体, 以均裂方式断键的反应称为自由基反应. 过去, 人们只是推测自由基反应是低强度电磁场产生生物效应的可能途径^[10], 但近年来愈来愈多的研究表明, 低强度电磁场产生生物效应是有自由基反应介入的^[4-6, 11-14].

电磁场暴露使自由基产生的机理还不清楚, 有人怀疑低强度电磁场是否可以使共价键断裂. 如 Valberg 等^[15]用辐射能 $E=h\nu$ 估算了极低频电磁场能

量,认为极低频电磁场能量低于化学键结合能8个数量级,不能使化学键断裂,并提出电磁生物效应因果链的概念^[15-16],认为电磁场“转换”是生物效应的第一步. Repacholi等^[17]认为电磁生物效应是从最初物理的原初作用开始,经过一系列物理、化学、生物化学、细胞、组织、器官等的节联反应,最终导致对健康影响的终点效应. 这个节联反应从电磁场与生物分子或结构的相互作用开始,使生物分子的大小、形状、荷电、化学状态、能量等方面发生变化. 然后,这种变化在生物系统中被敏感和放大,使生物体产生最终响应,能量转换包含生物分子或结构发生效应的能量传递. 能量传递是自由基产生及其后续生物效应的重要问题^[18]. 我们认为电磁场能量对生物作用有辐射能和场能两种. 辐射能以光电效应规律激发物质电子,这种作用是直接作用,极低频电磁场的辐射能不能使化学键断裂. 但是许多实验研究表明,电磁场确实可以使自由基增加,且有相应的生物效应,因此,需要对电磁场场能机理进行深入研究.

我们的实验结果显示,0.1mT、0.5mT和1.0mT电磁场暴露海马神经元均可以使ROS水平比对照组有显著性提高,而与Trolox+EMF组比较在0.1mT和0.5mT电磁场的ROS水平没有显著性差异,在1.0mT有显著性提高. 表明低强度电磁场暴露对自由基产生有一点增加,但增加不多. 随着暴露强度增加,自由基水平也随之增加,如在1.0mT电磁场暴露,EMF组的ROS水平明显比Trolox+EMF组高,表明电磁场引起的一部分自由基已被清除剂所清除. Loreto等^[19]研究也表明1mT电磁场比0.1mT电磁场暴露皮层神经元能更多地产生ROS. 我们认为电磁场场能可以用电场能量 $\bar{\omega}_e = \frac{1}{2}$

ϵE^2 密度和磁场能量密度 $\bar{\omega}_m = \frac{1}{2\mu} B^2$ 表示,当磁感应

强度 B 增加,磁场能量密度也增加,相应的自由基生产也增加. 在极低频条件下,生物物质的电磁特性是由介电系数 ϵ 和磁导率 μ 描述. 当生物物质暴露在电磁场中,物质的电子结构由于能量传递的因素发生了改变,能量传递是自由基产生的物理基础. 目前评价电磁生物效应的电磁参数是电场强度 E 或磁感应强度 B ,没有考虑生物体的电磁特性 ϵ 和 μ . 尽管实验可以保持 E 和 B 的一致,但很难保持每一个生物个体 ϵ 和 μ 的一致性. 这样,每一个生物个体所获得的电磁能量是不一样的,所获得的生物效应也就不一致了. 因此,我们认为用电磁场

能量密度作为评价健康危害的电磁参数既考虑了 E 和 B ,又考虑了 ϵ 和 μ ,把生物体本身的电磁特性也考虑在了评价因素中.

许多研究表明电磁场对胞内 Ca^{2+} 浓度增高有促进作用,如电磁脉冲^[19]. 电磁场对电压门控钙通道有正相关性^[20]. 我们的实验结果显示,在0.1mT、0.5mT和1.0mT三种电磁场暴露中,EMF组的ROS水平和胞内 Ca^{2+} 浓度均比Trolox+EMF组要高,如图2表明了ROS水平愈高,胞内 Ca^{2+} 浓度

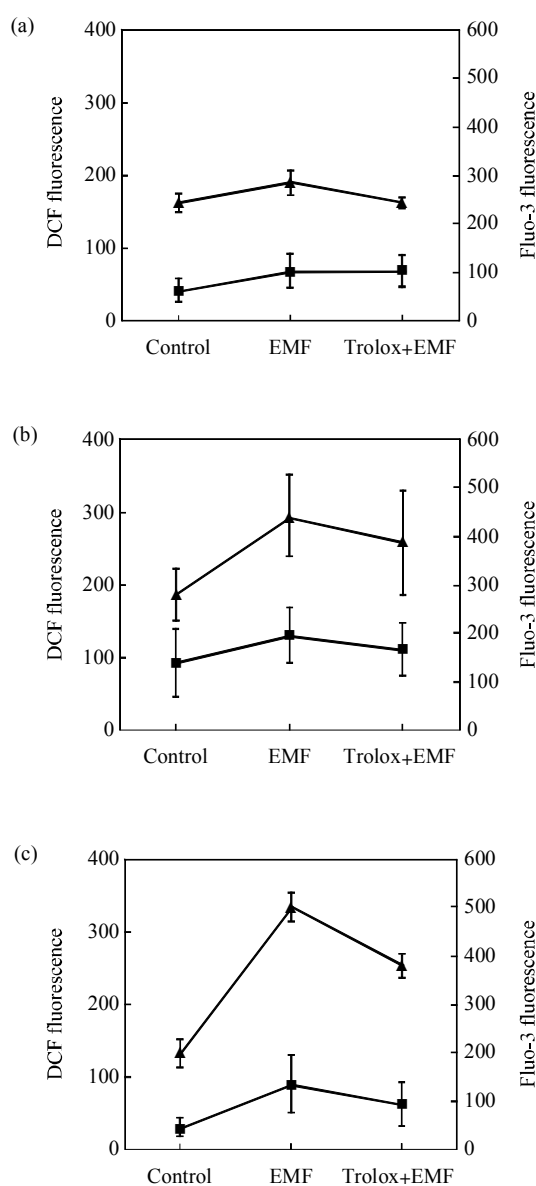


Fig. 2 ROS formation and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ concentration in rat-hippocampal neurons following 48 h exposure to 0.1mT(a), 0.5mT(b) and 1.0mT(c) power-frequency electromagnetic field

Data are reported as fluorescence intensity for ROS and calcium ion.

▲—▲: ROS; ■—■: Ca^{2+} .

也愈高, 细胞内的 ROS 水平与胞内 Ca^{2+} 浓度存在一定的正相关性。

4 结 论

电磁场可以导致细胞自由基水平提高, 使胞内 Ca^{2+} 浓度增加, 从而导致产生后续的生物效应是电磁生物效应原初作用的一种途径。自由基是一种化学概念, 能量是物理概念, 钙是生命的一种重要物质, 阐述这三者之间的关系, 对认识电磁场生物效应的原初作用是具有重要意义的。

参 考 文 献

- [1] World Health Organization. 2007 WHO research agenda for extremely low frequency fields[R/OL]. Geneva: WHO, 2007. <http://www.who.int/peh-emf/en/>
- [2] World Health Organization. Extremely Low Frequency Fields. Environmental Health Criteria 238[S/OL]. Geneva: WHO, 2007. <http://www.who.int/peh-emf/en/>
- [3] Paolo V, Rudiger M, Gunde Z, *et al.* Exposure to high frequency electromagnetic fields, biological effects and health consequences (100 kHz-300 GHz). Germany:ICNIRP, 2009. <http://www.icnirp.org>
- [4] Di Loreto S, Falone S, Caracciolo V, *et al.* Fifty hertz extremely low-frequency magnetic field exposure elicits redox and trophic response in rat-cortical neurons. J Cell Physiol, 2009, **219** (2): 334-343
- [5] 王长振, 丛建波, 先 宏, 等. 电磁脉冲造成神经细胞氧化损伤效应研究. 中华放射医学与防护杂志, 2003, **23**(5): 361-364
Wang C Z, Cong J B, Xian H, *et al.* Chin J Radiol Med Prot, 2003, **23**(5): 361-364
- [6] Brescia F, Sarti M. Modification to the Lampariello approach to evaluate reactive oxygen species production by flow cytometry. Cytometry A, 2008, **73**(2): 175-179
- [7] Paneth N. Neurobehavioral effects of power-frequency electromagnetic fields, *En viro*. Health Perspec, 1993, **101**(suppl 4): 101-106
- [8] 谢 亮, 姜 槐. 射频电磁场对中枢神经系统的效应及其阈值探讨. 中华预防医学杂志, 2006, **40**(3): 205-208
Xie L, Jiang H. Chin J Prev Med, 2006, **40**(3): 205-208
- [9] Schuderer J, Oesch W, Felber N, *et al.* *In vitro* exposure apparatus for ELF magnetic Fields. Bioelectromagnetics, 2004, **25**: 582-591
- [10] Brocklehurst B, McLauchlan K A. Free radical mechanism for the effects of environmental electromagnetic fields on biological systems. Int J Radiat Biol, 1996, **69**(1): 3-24
- [11] Simko M, Mattsson M O. Extremely low frequency electromagnetic fields as effectors of cellular responses *in vitro*: possible immune cell activation. J Cell Biochem, 2004, **93**: 83-92
- [12] Palumbo R, Capasso D, Brescia F, *et al.* Effects on apoptosis and reactive oxygen species formation by Jurkat cells exposed to 50 Hz electromagnetic fields. Bioelectromagnetics, 2006, **27**: 159-162
- [13] Henbest K B, Kukura P, Rodgers C T, *et al.* Radio frequency magnetic field effects on a radical recombination reaction: A diagnostic test for the radical pair mechanism. J American Chemical Society, 2004, **126**: 8102-8103
- [14] Woodward J R, Foster T J, Jones A R, *et al.* Time-resolved studies of radical pairs. Biochem Society Trans, 2009, **37**(2): 358-362
- [15] Valberg P A, Kavet R, Rafferty C N. Can low-level 50/60 Hz electric and magnetic fields cause biological effects?. Radiat Res, 1997, **148**(1): 2-21
- [16] Valberg P A, van Deventer T E, Repacholi M H. Workgroup report: base stations and wireless networks-radiofrequency (RF) exposures and health consequences. Environ Health Perspect, 2007, **115**(3): 416-424
- [17] Repacholi M H, Greenebaum B. Interaction of static and extremely low frequency electric and magnetic fields with living systems: health effects and research needs. Bioelectromagnetics, 1999, **20**: 133-160
- [18] Pickardl W F, Moros E G. Energy deposition processes in biological tissue: nonthermal biohazards seem unlikely in the ultra-high frequency range. Bioelectromagnetics, 2001, **22**: 97-105
- [19] 许 倩, 刘绍晨, 李玉红, 等. 电磁脉冲对海马神经元的损伤及其对 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响. 中国临床康复, 2006, **10**(42): 214-216
Xu Q, Liu S C, Li Y H, *et al.* Chin J Clinical Rehabilitation, 2006, **10**(42): 214-216
- [20] Grassi C, D'Ascenzo M, Torsello A, *et al.* Effects of 50 Hz electromagnetic fields on voltage-gated Ca^{2+} channels and their role in modulation of neuroendocrine cell proliferation and death. Cell Calcium, 2004, **35**: 307-315

Electromagnetic Fields Exposure Elicits Radical and Ca^{2+} Response in Rat-hippocampal Neurons*

SU Hai-Feng, BAO Jia-Li**, LI Peng

(Bioelectromagnetics Laboratory of Zhejiang Province, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract The investigation of electromagnetic fields (EMF) in human health risk assessment include epidemiology, human and animals, cellular system, biochemistry and molecular biology, and biophysical mechanisms. The causal chain describes a series of sequential steps to lead to disease outcome for EMF to cause biological effect. To complete the first step, or say primary effect, the physical reaction between EMF with bio-molecules must come into being chemical reaction in organism, and then bring biological reaction. To research relationship of radical, energy and cytosolic calcium has significance to know primary effect of EMF. The effect of exposure to 48 h at 0.1mT, 0.5mT and 1.0mT power frequency EMF on rat-hippocampal neurons was investigated by evaluating the reactive oxygen species (ROS) and cytosolic Ca^{2+} concentration. The results show that the reactive oxygen species (ROS) and cytosolic Ca^{2+} concentration at 0.1mT, 0.5mT and 1.0 mT EMF have be all signification increaser ($P < 0.01$) than control (sham exposure), ROS at 0.1mT and 0.5mT and Ca^{2+} at 0.1mT have be no difference ($P > 0.05$) than Trolox + EMF, ROS at 1.0 mT and Ca^{2+} at 0.5mT and 1.0 mT have be signification increaser ($P < 0.01$) than Trolox + EMF. It is known that EMF may enhance ROS formation in neurons, and there is positive correlation between ROS level and cytosolic Ca^{2+} concentration.

Key words electromagnetic fields (EMF), free radical, Ca^{2+} , ROS, neurons

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00557

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China(50377039).

**Corresponding author.

Tel: 86-571-88208171, E-mail: baojl@zju.edu.cn

Received: September 22, 2009 Accepted: January 5, 2010