

· 基础研究 ·

脉冲电磁场对去势大鼠骨髓源细胞体外培养破骨细胞变化的影响

白孟海¹,葛宝丰¹,韦哲¹,白洁²,程自峰¹

(1.兰州军区兰州总医院骨科研究所,甘肃 兰州 730050;2.兰州军区兰州总医院安宁分院)

【摘要】 目的:观察脉冲电磁场对去势大鼠骨髓源性破骨细胞样细胞(OLC)形成变化及凋亡的影响。方法:30 只健康 3 月龄雌性 Wistar 大鼠,随机分为 A 组(双侧卵巢切除+磁场治疗组,18 只)、B 组(双侧卵巢切除组,6 只)和 C 组(伪去势组,6 只)。A 组又随机均分 3 组:A1、A2、A3 组,电磁场频率分别为 1.5、2、75 Hz。术后单纯喂养 3 个月对各组大鼠骨髓细胞进行培养,培养 2 d 后,A1、A2、A3 组置脉冲电磁场治疗,1 次/d,每次 30 min,共治疗 2 周。之后各组培养细胞作瑞氏-吉姆萨、抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)和 Hoechst 33258 染色,观察破骨细胞变化并计数。结果:大鼠骨髓体外培养细胞 TRAP 染色结果显示,C 组的破骨细胞形成数量最少,其次为 A2、A3、A1、B 组。B 组的破骨细胞形成数量与 C 组和 A2 组比较显著增多($P<0.01$),B 组的破骨细胞形成数量与 A1、A3 组比较明显增多($P<0.05$)。Hoechst 33258 染色结果显示,C 组破骨样细胞凋亡出现数量较多,C、A2 组凋亡数明显多于 B 组($P<0.05$)。结论:脉冲电磁场能使大鼠骨髓体外培养破骨细胞形成数量减少、凋亡数增加,频率为 2 Hz 的效果最佳,表明脉冲电磁场可能将是骨质疏松症治疗的新方法。

【关键词】 卵巢切除; 大鼠; 脉冲电磁场; 破骨细胞; 细胞凋亡

Effect of pulsed electromagnetic field on the changes of osteoclasts in ovariectomized rats bone marrow culture in vitro BAI Meng-hai*, GE Bao-feng, WEI Zhe, BAI Jie, CHENG Zi-feng. *Institute of Orthopaedics, Lanzhou General Hospital of Lanzhou Military Area, Lanzhou 730050, Gansu, China

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of pulsed electromagnetic fields (PEMs) on inducing osteoclastic like cell (OLC) formation changes and apoptosis in ovariectomized (OVX) rats bone marrow culture in vitro. **Methods:** Thirty healthy three-month-old female Wistar rats were either sham-operated(Sham) or ovariectomized(OVX)and randomly divided into three groups: group A (OVX+PEMs, 18 rats), group B (OVX, 6 rats) and group C (Sham, 6 rats); group A was again randomly divided into three groups: A1, A2, A3. The frequencies adopted were 1.5, 2, 75 Hz and 30 minutes for once a day. All rats were fed with normal diet for 3 months, then the bone marrow of all rats were cultured, 2 days later, group A cells (including group A1, A2, A3) were collected and exposed to different frequencies PEMs for 2 weeks (30 min/day). In order to observe the changes of osteoclasts and count their numbers, cells were taken for Wright Giemsa staining, tartrate-resistance acid phosphatase (TRAP) staining and Hoechst 33258 staining. **Results:** TRAP staining results indicated the number of OLC in group C was the least, then was group A2, A3, A1, B. The number of OLC in group B was remarkably increased ($P<0.01$; vs group C, A2). The number of OLC in group B was significantly increased ($P<0.05$; vs group A1, A3). Hoechst 33258 staining results indicated the number of apoptosis of OLC in group C was more than other groups, which of group C, A2 was significantly increased ($P<0.05$; vs group B). **Conclusion:** PEMs had decreased the formation of OLC and increased the number of apoptosis of OLC in ovariectomized (OVX) rats bone marrow culture in vitro, the effects of 2 Hz was the best. PEMs would be a new way of osteoporosis therapy.

Key words Ovariectomy; Rats; Pulsed electromagnetic fields; Osteoclasts; Apoptosis

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2009, 22(10): 727-729 www.zggszz.com

随着社会老龄化,对骨质疏松症发病机制与防治的研究愈显重要^[1-2]。电磁场作为外界刺激信号能影响骨组织的重要

过程^[3]。本实验对去势大鼠骨髓细胞进行体外培养,经电磁场治疗后对破骨样细胞(osteoclastic like cell, OLC)形成及凋亡进行了研究,为临床骨质疏松症的治疗方法提供了实验依据。

1 材料与方法

1.1 大鼠去卵巢模型的建立与分组 健康 3 月龄雌性 Wis-

通讯作者:白孟海 Tel:0931-8994331 E-mail:Zhao6703@yahoo.com.cn

tar 大鼠 30 只, 体质量 220~240 g, 由本院动物实验科提供, 随机分为 A 组(18 只, 双侧卵巢切除+磁场治疗组)、B 组(6 只, 双侧卵巢切除组)和 C 组(6 只, 伪去势组)。A 组又分为 A1 组(6 只, 频率 1.5 Hz)、A2 组(6 只, 频率 2 Hz)、A3 组(6 只, 频率 75 Hz)。所有大鼠均予 3% 戊巴比妥钠溶液按 0.1 ml/100 g 体重腹腔麻醉。A、B 组手术腹侧入路行双侧卵巢切除, 止血缝合, C 组采用腹侧入路仅切除少许皮下组织即关闭切口, 各组大鼠均在同等条件下饲养 3 个月后处死行骨髓细胞培养。

1.2 主要试剂 培养基 a-MEM (美国 Gibco); 胎牛血清 (FCS, 兰州民海); 抗酒石酸酸性磷酸酶试剂盒 (TRAP, Sigma); a-MEM (含 10% FCS, 100 U/ml 青霉素, 100 mg/L 链霉素); Hoechst 33258 荧光素 (Sigma)。

1.3 细胞培养 参考夏文芳等^[4]方法进行破骨细胞诱导, 主要步骤包括: 无菌操作下完整取下股骨, 剪断两侧骨骺端, 用 5 ml a-MEM 反复冲洗骨髓腔 3 次, 收集骨髓细胞悬液, 将细胞调节成浓度为 1×10^7 个/ml, 加入预先配好培养体系, 其内含有 20% FCS、Vit D₃ (10^{-8} M/L, Sigma) 混匀后加入预置盖玻片的 24 孔板内, 置 CO₂ 培养箱内, 在 5% CO₂、37 °C 条件下培养, 3 d 换液 1 次。

1.4 电磁场干预 A1、A2、A3 组于培养后第 2 天置电磁场仪器下进行治疗, 1 次/d, 30 min/次, 共治疗 2 周。电磁场频率分别为 1.5、2、75 Hz。治疗设备由研究所同本院设备科研制^[5]。

1.5 观察项目与方法

1.5.1 破骨细胞形态学观察及细胞计数方法 ①破骨细胞染色和鉴定: 在培养的盖玻片上分别作瑞氏-吉姆萨、TRAP 染色。以 TRAP 染色阳性, 细胞核 ≥ 3 的细胞为破骨细胞标志。②细胞计数方法: 对每个随机视野中的破骨细胞进行计数。每组计数 10 张玻片, 取均值, 结果以细胞数/玻片表示。OLC 凋亡计数方法, TRAP 阳性、染色质浓缩为标志。

1.5.2 OLC 凋亡观察 Hoechst 33258 染色: 按试剂盒说明对培养细胞进行 Hoechst 33258 染色, 观察破骨细胞凋亡情况。

1.6 统计学处理 实验数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 使用 SPSS 11.5 统计软件包处理, 采用单因素方差分析 (ANOVA), 组间两两比较用 LSD 法检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 破骨细胞形态学变化观察 各组破骨细胞形成数量变

化见表 1。去势大鼠骨髓细胞体外培养 2 周后, 经不同频率电磁场治疗, 破骨细胞形成数量各不相同。从实验结果看 C 组的破骨细胞形成数量最少 (图 1), 其次为 A2、A3、A1、B 组 ($C < A2 < A3 < A1 < B$), B 组的破骨细胞形成数量最多 (图 2)。B 组的破骨细胞形成数量与 C 组和 A2 组比较显著增多 ($F = 13.65, P < 0.01$), B 组的破骨细胞形成数量与 A1、A3 组比较明显增多 ($F = 13.65, P < 0.05$)。C 组与 A1、A2、A3 组比较差异无统计学意义。

表 1 不同频率电磁场治疗对去势大鼠骨髓源细胞体外培养破骨细胞形成数及凋亡变化的影响 ($n=8, \bar{x} \pm s, \text{个/玻片}$)

Tab.1 The effect of different frequencies PEMs on the number of OLC formation and apoptosis in OVX rats bone marrow culture in vitro ($n=8, \bar{x} \pm s, \text{piece/glass slide}$)

组别	OLC 形成数	OLC 凋亡数
A1	12.16 \pm 2.13	5.01 \pm 2.11
A2	8.21 \pm 1.00	6.12 \pm 1.31
A3	11.20 \pm 3.21	5.14 \pm 1.22
B	14.21 \pm 1.23* Δ	4.41 \pm 1.21 \diamond
C	7.10 \pm 1.13	6.18 \pm 2.15

注: 与 C、A2 组比较, * $F=13.65, P < 0.01$; $\diamond F=3.23, P < 0.05$ 。与 A1、A3 组比较, $\Delta F=13.65, P < 0.05$

Note: Compared with group C, A2, * $F=13.65, P < 0.01$; $\diamond F=3.23, P < 0.05$. Compared with group A1, A3, $\Delta F=13.65, P < 0.05$

2.2 OLC 凋亡改变 体外培养 C、A1、A2、A3 组与 B 组比较有凋亡 OLC 出现, 细胞核或胞质内可见浓染致密的荧光 (图 3)。C 组破骨样细胞凋亡出现数量较多, C、A2 组凋亡数明显多于 B 组 ($F=3.27, P < 0.05$)。

3 讨论

众所周知, 包括电磁场在内的外界刺激信号能影响骨组织的重组过程。早在 20 世纪 50-60 年代人们就发现干燥的骨是具有压电效应的物质^[6]。在此基础上, Basselt 为首的研究者们将外生的电磁场引入诸如非愈合性骨折的治疗实验并获得成功^[7]。而现今对电磁场治疗骨质疏松的前瞻性研究中, 不同的研究者在电磁场对骨质疏松是否具有正效应上持不同观点^[8], 但有研究证实电磁场能影响体外骨细胞特性和促进细

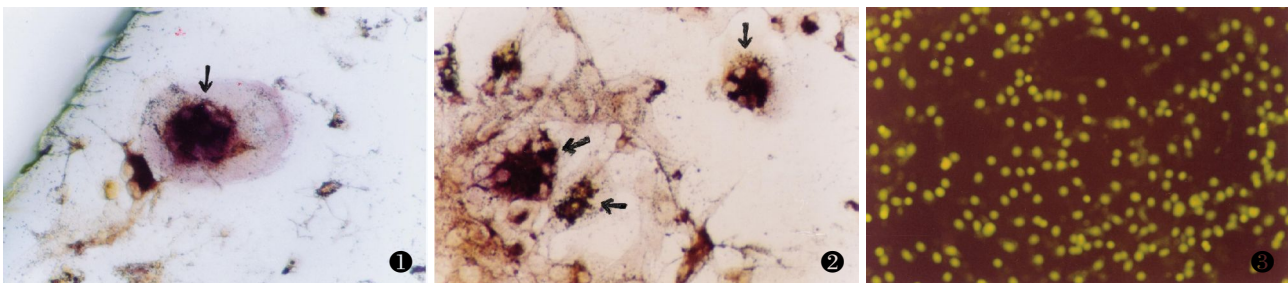


图 1 C 组, 诱导培养出的破骨细胞 TRAP 染色, 细胞内见多个细胞核, 箭头所示 ($\times 200$) **图 2** B 组, 诱导培养出的破骨细胞 TRAP 染色, 图中见多个破骨细胞, 细胞内见多个细胞核, 箭头所示 ($\times 200$) **图 3** B 组, 细胞核内可见浓染均匀的荧光 (Hoechst 33258 染色 $\times 200$)

Fig.1 Group C, TRAP staining of induced osteoclasts showed multinucleated cells, arrow point at place (TRAP staining $\times 200$) **Fig.2** Group B, TRAP staining of induced osteoclasts, multiosteoclasts in the picture, osteoclasts showed multinucleated cells, arrow point at place (TRAP staining $\times 200$) **Fig.3** Group B, Hoechst 33258 staining of osteoclasts showed the nuclei of osteoclasts were stained uniformly and thickly with fluorescence (Hoechst 33258 staining $\times 200$)

胞外基质的形成^[9]。

3.1 电磁场对大鼠骨髓细胞体外培养破骨细胞形成的影响研究表明,大鼠去势后,早期骨形成与骨吸收均有增强,但骨吸收更为明显,导致的净效应是骨丢失,形态学显示破骨细胞数明显增加^[9-10]。去势大鼠骨髓细胞体外培养结果表明破骨细胞数量明显增多。这种变化表明,由于去势大鼠雌激素水平降低,破骨细胞凋亡降低,生命周期延长,骨吸收增加,导致骨量丢失加速。这是去势大鼠骨量丢失所致骨质疏松的一个重要原因。经电磁场治疗后破骨细胞形成数量明显减少。实验结果显示磁场治疗 A1、A2、A3 组较对照 B 组明显减少,其中 A2 组较 B 组显著减少($P<0.01$),治疗组 A 组的各组与正常组 C 组比较破骨细胞形成数量虽说不同,但无统计学意义。治疗各组间比较,A2 组破骨细胞数量形成最少,提示虽说电磁场可抑制大鼠体外骨髓细胞破骨细胞形成数量,但在体外培养细胞中电磁场 2 Hz 频率效果最佳。

3.2 电磁场治疗的可能作用途径 电磁场抑制体外破骨细胞形成的机制尚不清楚,有报道电磁场能影响破骨细胞的活性^[2]。低频低强电磁场能引起细胞内钙浓度的变化^[11-12],从而影响破骨细胞皱褶缘上 Ca^{2+} 浓度具有依赖性的肌动蛋白-凝胶溶素。由于皱褶缘是破骨细胞处于吸收活性所必须的结构,因此皱褶缘结构可受胞内钙浓度调控从而改变破骨细胞的形态。本实验观察到经电磁场治疗的 A1、A2 和 A3 组中的体外大鼠骨髓培养细胞,破骨细胞形成数量较对照 B 组显著减少,证明电磁场能抑制体外培养细胞破骨细胞形成,起到抗骨质疏松的作用。

参考文献

[1] 郭世级. 重视骨质疏松研究, 赶上国际水平. 中华骨科杂志,

1995, 15(5):295.

- [2] 卢建华, 吴承亮, 倪桂宝, 等. 红曲对去卵巢大鼠 BMP-2 表达及成骨细胞增殖影响的实验研究. 中国骨伤, 2005, 18(1):25-27.
- [3] 谭斌瑛, 姜恩永, 孙多春, 等. 电磁技术用于骨质疏松症治疗的动物研究. 中国骨质疏松杂志, 2002, 8(3):216-218.
- [4] 夏文芳, 陈璐璐, 曾天舒. 改良的成年大鼠骨髓源性破骨细胞诱导培养系. 华中科技大学学报(医学版), 2002, 31(5):534-536.
- [5] 韦哲, 程自峰, 白孟海. 骨质疏松治疗系统的研制及临床应用. 中国医疗设备, 2008, 23(30):22-24.
- [6] Bassett CA, Becker RO. Generation of electric potentials by bone in response to mechanical stress. Science, 1962, 137:1063-1064.
- [7] Bassett CA. Beneficial effects of electromagnetic fields. J Cell Biochem, 1993, 51:387-393.
- [8] Takayama K, Nomura H, Tanaka J, et al. Effect of a pulsing electromagnetic field on metabolically derived osteoporosis in rats; a pilot study. ASAIO Trans, 1990, 36(3):M426-428.
- [9] Hartig M, Joos U, Wiesmann HP. Capacitively coupled electric fields accelerate proliferation of osteoblast-like primary cells and increase bone extracellular matrix formation in vitro. Eur Biophys J, 2000, 29(7):499-506.
- [10] 张兆华, 陈志维, 陈逊文, 等. 骨宝液在去卵巢大鼠骨质疏松症中抑制骨转换作用的实验研究. 中国骨伤, 2005, 18(8):473-476.
- [11] Chen L, Zeng T, Xia W, et al. The effect of estrogen on the restoration of bone mass and bone quality in ovariectomized rats. J Tongji Med Univ, 2000, 20, 283-286.
- [12] 陈雅, 王彦, 孙彤, 等. 脉冲电磁场对粒细胞内 Ca^{2+} 浓度影响的动态变化. 中国科学(C辑), 1999, 29(6):644-667.

(收稿日期:2009-04-16 本文编辑:王宏)

《中国矫形外科杂志》征订启事

《中国矫形外科杂志》系经国家科技部和新闻出版署批准登记注册,于1994年创刊的国家级学术性期刊,现为半月刊,由中国人民解放军骨科中心承办,为中国科技核心期刊,被国内外多家权威数据库收录。本刊出版发行两种纸质版本,全年24期,铜版纸年定价360元,胶版纸年定价240元,每期纸质版、光盘版、网络版在全球同步发行,订户可根据自身条件选定。从邮局订阅(本刊代号:24-097)只限铜版本。也可直接汇款到本刊编辑部订阅每种版本,地址:山东省泰安市第88医院骨研所杂志编辑部,邮编:271000,两种版本均可从网上订阅,登陆 www.chinaorthopedic.org 点击期刊征订即可完成网上支付,联系电话(兼传真):0538-6213228 电子信箱:jxwk1994@sina.com

《中华创伤杂志》征订启事

《中华创伤杂志》创刊于1985年9月,是国内惟一能全面、系统地反映我国创伤医学成果和发展动向的高级医学专业学术期刊。本刊以从事创伤医学和相关学科的各级临床医师和研究人员为读者对象,被美国《化学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》等著名检索系统收录。2010年杂志页码为96页;定价:16.00元/册,全年192.00元。国内订阅:全国各地邮局,邮发代号78-83。真诚希望您能赐予本刊高质量的文章,并对杂志提出宝贵的意见,以便使她更贴近您的需要。同时,也希望您随时订阅本刊。编辑部可办理邮购。编辑部地址:重庆市渝中区大坪长江支路10号(400042);电话:(023)68757482,(023)68818654(Fax);E-mail:zhcszz@163.com;网址:<http://zhcs.chinajournal.net.cn>