

## · 基础研究 ·

# 静磁场不同处理时间对体外培养成骨细胞增殖与分化的影响

王嘉琪, 葛宝丰, 马晓妮, 周建, 郭晓宇, 陈克明  
(兰州军区兰州总医院骨科研究所, 甘肃 兰州 730050)

**【摘要】** 目的: 研究静磁场不同处理时间对体外培养成骨细胞增殖与分化成熟的影响。方法: 原代培养大鼠颅骨成骨细胞, 传代后随机分为 9 组, 用磁场强度为 3.9 mT 的静磁场, 分别处理 0(对照组)、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 h。倒置相差显微镜下观察细胞形态; 48 h 后检测细胞增殖情况; 第 3、6、9、12 天测定碱性磷酸酶活性和钙盐沉积量; 第 8 天进行碱性磷酸酶染色; 第 10 天进行茜素红钙化结节染色; 在 SMFs(static magnetic fields) 处理 0、24、48、72 h 后, Real-time PCR 检测骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein-2, BMP-2), Runx-2, 骨保护素 (osteoprotegerin, Opg) 的 mRNA 表达水平变化。结果: 与对照组相比, 磁场组均促进细胞增殖 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ), 也能明显促进其分化成熟, 表现为提高细胞的 ALP 活性, 促进钙盐沉积量, 提高 BMP-2、Runx-2 和 Opg 的 mRNA 表达。结论: 磁感应强度为 3.9 mT 的静磁场处理体外培养成骨细胞 2.5 h 时, 其对成骨细胞的增殖与分化效果最为明显。

**【关键词】** 成骨细胞; 电磁场; 细胞增殖; 细胞分化

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2012.11.013

**Effects of static magnetic field at different times on the proliferation and differentiation of osteoblasts in vitro** WANG Jia-qi, GE Bao-feng, MA Xiao-ni, ZHOU Jian, GUO Xiao-yu, CHEN Ke-ming. Institute of Orthopaedics, Lanzhou General Hospital of PLA, Lanzhou 730050, Gansu, China

**ABSTRACT** **Objective:** To investigate the effect of exposure to static magnetic fields (SMFs) of 3.9 mT on proliferation and differentiation of osteoblasts in vitro. **Methods:** The newborn rat calvarial osteoblasts were isolated by enzyme digestion and randomly divided into 9 groups after one passage. The intensity of the SMFs was 3.9 mT. The cells were exposed in the SMFs for 0 (control group), 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3, 3.5 and 4.0 h groups respectively. They were observed under the contrast phase microscope each day. After 48 h, cell proliferation was assayed by MTT method. The alkaline phosphatase (Alkaline Phosphatase, ALP) activities and calcium content were measured after 3, 6, 9, and 12 days exposed with SMFs. The ALP positive colonies were histochemically stained after 8 days and the calcified nodules were stained by Alizarin Bordeaux after 10 days; BMP-2, Runx-2 and Opg mRNA expression were measured after SMFs treatment in 0, 24, 48 and 72 h. **Results:** Contrast with control group, all SMFs groups enhanced cell proliferation ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ), and they promoted maturation and mineralization of the osteoblasts. The results showed that SMFs improved the ALP activity, promoted calcium content, boost BMP-2, Runx-2 and Opg mRNA expression. **Conclusion:** The cells exposed to the SMFs of 3.9 mT at 2.5 h apparently promote proliferation and differentiation of osteoblasts in vitro.

**KEYWORDS** Osteoblasts; Electromagnetic fields; Cell proliferation; Cell differentiation

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2012, 25(11): 931-936 www.zggszz.com

骨折是临床上的常见病, 而骨不连、延迟愈合则是临床上疑难病症, 传统的手术治疗给患者带来很多痛苦。电磁场 (electromagnetic fields, EMFs) 作为一种非侵入疗法, 可用于促进脊椎关节愈合和治疗严重的多处长骨骨折<sup>[1-2]</sup>。大量实验研究表明低强度电磁场影响体外培养细胞的增殖与分化<sup>[3-4]</sup>, 但磁场参数的选择制约了此类产品的使用。关于静磁场最佳

照射时间的研究, 国内报道较少。本研究以原代培养的大鼠颅骨成骨细胞为研究对象, 探讨静磁场的不同处理时间对体外培养成骨细胞 (rats osteoblasts, ROB) 增殖与分化的影响, 为临床应用提供依据。

## 1 材料与方 法

**1.1 静磁场发生仪** 实验所用静磁场 (static magnetic fields, SMFs) 发生仪由本实验组与兰州理工大学共同研制, 线圈内径 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, 经信号放大器放大后传入磁场线圈, 基本原理如图 1<sup>[5]</sup>。经中国人民解放军兰州军区医学计量测试研究站测

基金项目: 甘肃省科技重大专项资助项目 (编号: 09ZKDA025)

Fund programs: Supported by Gansu Province Sci. & Tech. Foundation (No. 092NKDA025)

通讯作者: 陈克明 E-mail: chkeming@yahoo.com.cn

定,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±0.2)℃。

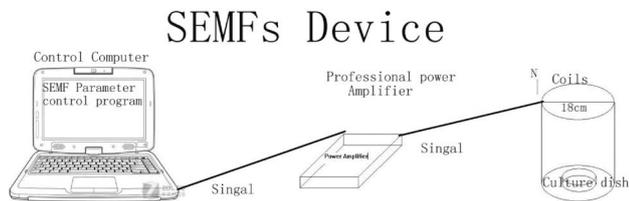


图1 磁场发生仪原理示意图

Fig.1 Schematic of static electromagnetic fields device

**1.2 实验材料** 出生 48 h 以内的 SPF 级 SD 大鼠,由甘肃省中医学动物实验中心提供,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,美国);地塞米松、磷酸化抗坏血酸、 $\beta$ -磷酸甘油钠、胰蛋白酶(Sigma 公司,美国);噻唑蓝(MTT);SYBR<sup>®</sup> Premix Ex TaqTM II;ROX reference Dye;PCR Forward Primer;PCR Reverse Primer(大连宝生物公司)。钙盐沉积量检测试剂盒(BioVision, USA);碱性磷酸酶试剂盒(南京建成生物工程研究所);茜素红(AMRESCO, 美国)。

**1.3 实验方法**

**1.3.1 成骨细胞分离培养** 出生 48 h 内的 SPF 级 SD 大鼠,75%乙醇浸泡窒息后断头。无菌条件下取出头盖骨,置入盛有培养基的无菌培养皿中。去除骨膜、血管及结缔组织,PBS 漂洗 2 次,加入 0.25%胰酶于 37℃下消化 15 min。吸除消化液,再加入 0.1% II 型胶原酶 37℃下消化 4 次,每次 20 min。收集并合并消化液,200 目细胞筛过滤,过筛后的消化液用 1 000 r/min 离心 10 min。弃上清液,沉淀用 PBS 漂洗后用含 10%胎牛血清(FBS)的 MEM 培养基悬浮,吹打均匀后,调整细胞浓度至 3×10<sup>4</sup> cell/ml。37℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,每 3 d 换液 1 次。待细胞生长融合至 80%以上时,0.25%胰蛋白酶消化传代,传代后待单层细胞融合率达到 80%以上时,进行成骨性诱导。

**1.3.2 成骨细胞的鉴定** 将传代后的成骨细胞接种在 35 mm 的培养皿中,分别进行碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)染色和钙化结节染色。碱性磷酸酶染色:磁场暴露处理至第 12 天时进行偶氮偶合染色,方法同参考文献[6],待出现紫色斑点后停止染色,观察并照相记录结果。钙化结节染色:磁场处理第 10 天,弃培养液,PBS 冲洗 2 次,加入 10%甲醛固定 10 min。弃固定液,加入 pH8.9、0.1%的茜素红染色液,37℃水浴 1 h,流水冲洗,换固定液照相记

录结果[6]。

**1.3.3 细胞分组与磁场处理** 将第 1 代传代细胞(P1)随机分为 9 组,每组 3 个重复,用磁场强度为 3.9 mT 的静磁场,分别处理 0(对照组)、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 h。磁场中使用电子温度计实时监测电磁场线圈中的温度,使其始终保持在(37.0±0.2)℃,排除热效应对培养细胞的影响。

**1.4 检测指标及方法**

**1.4.1 细胞增殖分析** P1 代细胞以 3×10<sup>4</sup> cell/ml 接种 60 mm 培养皿,24 h 后每组分别用静磁场处理,对照组不用磁场处理。48 h 后弃培养液,换含 10% 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,于酶标仪上测定 490 nm 处的吸光度(OD)值。

**1.4.2 成骨性分化分析**

(1)ALP 活性测定。将 P1 代细胞以 3×10<sup>4</sup> cell/ml 接种于 60 mm 培养皿,每 3 d 换液 1 次,待细胞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  $\beta$ -甘油磷酸钠和 1×10<sup>-8</sup> mol/L 的地塞米松),并开始磁场暴露处理。第 3、6、9、12 天采用金氏法测定各组 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℃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,酶活力以金氏单位/100 ml 表示[7]。

(2)钙盐沉积量测定。在培养皿中分别于成骨性诱导培养 3、6、9、12 d 进行钙含量测定。具体方法:弃培养液并 PBS 冲洗,每皿加 1 mol/L 的 HCl 2 ml 并超声波破碎,在摇床上摇动 24 h 后 1 000 r/min 离心 10 min 并收集上清液。标准曲线制备及样品的测定方法按说明书操作(Biovision 公司,美国),于酶标仪上测定 507 nm 处 A 值,并通过标准曲线计算样品中钙沉积量。

(3)Real Time PCR 分析。在 SMFs 处理 0、24、48、72 h 后,Real-time PCR 检测骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein-2, BMP-2),Runx-2,骨保护素(osteoprotegerin, Opg)的 mRNA 表达水平变化。

Total RNA 提取:各组细胞在第 1 次磁场处理后的第 0、24、48、72 h 后弃培养液,加入无酶 PBS 漂洗 2 次,再加入 1 ml RNAiso Reagent Kit 裂解细胞,收集裂解液后加入 200  $\mu$ l 氯仿 4℃ 12 000 r/min 离心 15 min。取上清液加入等体积的异丙醇于冰上静置 15 min,4℃ 12 000 r/min 离心 15 min 弃上清液。75%乙醇重悬浮沉淀 4℃ 12 000 r/min 离心 5 min,弃上清后-80℃保存。琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完

整性,测定 A230、A260、A280、A320 的吸光值,调整 Total RNA 的浓度。

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 1 条 cDNA 链。反应体系:5×Prime Script™ Buffer 4 μl,Prime Script™ RT Enzyme Mix I 1.0 μl, Oligo dT Primer (50 μM) 1.0 μl,Random 6 Primer (100 μM)1.0 μl,Total RNA 10 μl(1 000 ng)补 RNase Free 水至 20 μl。37 °C 反应 15 min,85 °C 5 s,-20 °C 保存。

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。GAPDH: NM\_017008.3 Forward 5' -GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG -3',Reverse 5' -ATGCTGCTGAA-GACGCCAGTA -3' 产物长度 143 bp。BMP-2: NM\_017178 Forward5' -ACCGTGCTCAGCTTCCAT-CA-3',Reverse 5' - TTCCTGCATTTGTTCCCGAAA -3' 产物长度 156 bp。Runx-2:NM\_053470.1 Forward 5' -GCACCCAGCCCATAATAGA -3',Reverse 5' - TTGGAGCAAGGAGAACCC -3' 产物长度 165 bp。Opg:NM\_057149.1 Forward 5' -GCAGCATCGCTCT-GTTCCTGTA -3',Reverse 5' -GCATGAGTCAGGTA GTGCTTCTGTG-3' 产物长度 164 bp(见表 1)。

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 μl,包括 SYBR® Premix Ex Taq™ II (2×)10 μl,PCR Forward Primer (10 μM)0.8 μl Reverse Primer (10 μM) 0.8 μl,ROX reference Dye or Dye II (50×) 0.4 μl,cDNA 模板 2 μl(50 ng/μl),补 RNase Free 水至 20 μl。PCR 反应条件:两步法反应条件 95 °C 预变性 30 s;94 °C 变性 5 s,60 °C 退火 31 s,40 个循环,每个循环的延伸末收集荧光信号。随后缓慢升温,95 °C 15 s,60 °C 1 min,95 °C 15 s,温度变化速度为 0.1 °C/s,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水平。

1.5 统计学处理 所有统计分析均采用 SPSS 18.0 统计软件完成,结果均以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。采用 *F* 检验比较各组间检测数据的差异,用 LSD 分析进行两两比较,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 成骨细胞鉴定 培养之初细胞呈三角形、纺锤形或多角形,48 h 后数量明显增加,体积增大,3~4 d 细胞有克隆形态(图 2a)。细胞培养 10 d 后茜素红染色鉴定呈阳性(图 2b),细胞培养 8 d 后 ALP 组织化学染色鉴定呈阳性(图 2c)。

2.2 静磁场对细胞增殖的影响 结果见表 2,与对照组比较,2.0、2.5、3.0 h 组均能促进细胞增殖,其他各组与对照组比较差异均无统计学意义。

2.3 对成骨性分化的影响

表 1 荧光定量 PCR 引物序列

Tab.1 Primer sequence of Real time PCR

| 项目     | 基因编号        | 引物序列                                       | 产物长度(bp) |
|--------|-------------|--------------------------------------------|----------|
| BMP-2  | NM_017178   | Forward5'-ACCGTGCTCAGCTTCCATCA-3'          | 156      |
|        |             | Reverse 5'- TTCCTGCATTTGTTCCCGAAA -3'      |          |
| Runx-2 | NM_053470.1 | Forward5'-GCACCCAGCCCATAATAGA-3'           | 165      |
|        |             | Reverse5'-TTGGAGCAAGGAGAACCC -3'           |          |
| Opg    | NM_057149.1 | Forward5'-GCAGCATCGCTCTGTTCCTGTA-3'        | 164      |
|        |             | Reverse 5'-GCATGAGTCAGGTAGTG CTTCT GTG -3' |          |
| GAPDH  | NM_017008.3 | Forward 5'-GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG-3'       | 143      |
|        |             | Reverse 5'-ATGCTGCTGAAGACGCCAGTA-3'        |          |

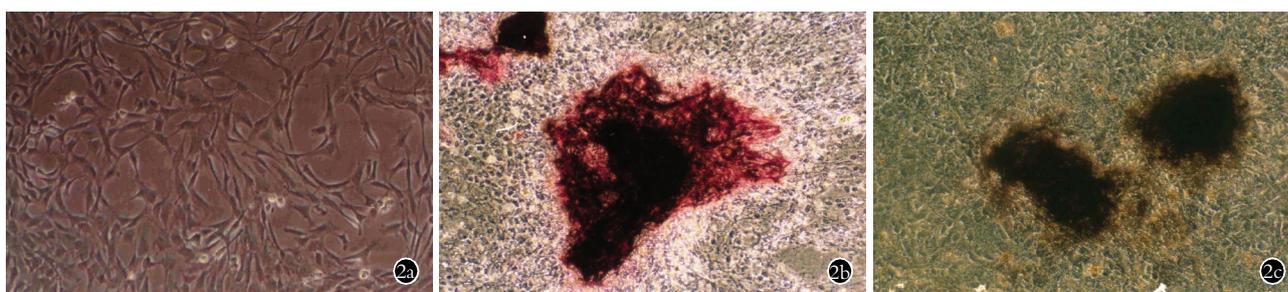


图 2 细胞形态观察 2a. 原代细胞接种培养 3 d 后贴壁细胞 (100×) 2b. 磁场处理 10 d 后钙化节结染色阳性 (100×) 2c. 磁场处理 8 d 后 ALP 染色阳性(100×)

Fig.2 Morphology of osteoblast 2a. Cells after cultured for 3 days of the osteoblast (100×) 2b. Calcified nodulus stained by alizarin Bordeaux after SMFs treatment for 10 days(100×) 2c. ALP stained after SMFs treatment for 8 days(100×)

表 2 静磁场处理 48 h 后 MTT 法测得各组 OD 值

( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab.2 MTT test results after 48 h of SMFs treatment

( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

| 组别      | OD570        | 与对照组比较 P 值 |
|---------|--------------|------------|
| 对照组     | 2.369±0.0640 | -          |
| 0.5 h 组 | 2.367±0.1111 | 0.9789     |
| 1.0 h 组 | 2.304±0.0461 | 0.3536     |
| 1.5 h 组 | 2.287±0.1974 | 0.4902     |
| 2.0 h 组 | 2.432±0.0519 | 0.0221     |
| 2.5 h 组 | 2.591±0.0419 | 0.0084     |
| 3.0 h 组 | 2.463±0.0960 | 0.0387     |
| 3.5 h 组 | 2.333±0.3581 | 0.8675     |
| 4.0 h 组 | 2.507±0.1268 | 0.0740     |

2.3.1 对 ALP 活性的影响 结果见表 3。各组 ALP 活性从第 3 天至第 9 天呈升高趋势,第 12 天略有下降。磁场处理第 6 天时,0.5、2.0、2.5、3.0 h 组 ALP 活性均高于对照组,且 2.5 h 组 ALP 活性高于 1.0、1.5、3.5、4.0 h 组。磁场处理第 9 天时,2.0、2.5、3.5 h 组 ALP 活性均高于对照组,且 2.5 h 组 ALP 活性高于其它各组。磁场处理第 12 天时,1.0、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 h 组 ALP 活性均高于对照组,且 2.5 h 组 ALP 活性高于 0.5、1.5 h 组。

2.3.2 对钙盐沉积量的影响 结果见表 3。在诱导

6 d 以后细胞分泌骨基质并结合钙磷元素,开始矿化并沉积钙盐,并且随时间增长钙盐含量逐渐上升,12 d 达到最高。磁场处理第 6 天时,除 0.5、4.0 h 组外,其他各组钙含量均高于对照组,且 2.5 h 组钙含量高于 0.5、1.0、1.5、3.5、4.0 h 组。磁场处理第 9 天时,1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 h 组钙含量均高于对照组,且 2.5 h 组钙含量高于其他各组。磁场处理第 12 天时,2.0 h 和 2.5 h 组钙含量均高于对照组,且 2.5 h 组钙含量高于 2.0 h 组。

2.3.3 Real time PCR 实验结果

(1)静磁场对大鼠成骨细胞 BMP-2 mRNA 表达量的影响。结果见表 4。磁场处理成骨细胞 0 h 后,磁场处理组同对照组比较,各组差异均无统计学意义。磁场处理 24 h 后同对照组比较,1.5、2.0、2.5、3.5 h 组显著促进 BMP-2 mRNA 的表达,且 2.5 h 组高于 0.5、1.5 h 组。磁场处理 48 h 后磁场处理组同对照组比较,0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h 组显著促进 BMP-2 mRNA 的表达,且 2.5 h 组高于 0.5、1.0、1.5、2.0、3.0 h 组。磁场处理细胞 72 h 磁场处理组同对照组比较,2.5 h 组显著促进 BMP-2 mRNA 的表达,且 2.5 h 组高于其他各组。

(2)静磁场对大鼠成骨细胞 Runx-2 mRNA 表达的影响。结果见表 5。数据处理方法采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  表示。磁场处理成骨细胞 0 h 后,磁场处理组同对照比较,

表 3 不同静磁场处理时间各组细胞 ALP 活性和钙含量比较( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab.3 ALP activity and calcium content at different treatment times of SMFs( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

| 组别      | ALP 活性(金氏单位/100 ml) |                                    |                                     |                                   | 钙含量( $\mu\text{g}/\text{孔}$ ) |                                    |                                     |                                   |
|---------|---------------------|------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|
|         | 3 d                 | 6 d                                | 9 d                                 | 12 d                              | 3 d                           | 6 d                                | 9 d                                 | 12 d                              |
| 对照组     | 5.252 0±<br>0.177 9 | 14.118 7±<br>0.677 6               | 20.044 9±<br>0.520 6                | 13.452 0±<br>1.149 1              | 0.115 2±<br>0.005 6           | 0.262 0±<br>0.012 9                | 0.374 7±<br>0.009 5                 | 0.541 0±<br>0.028 8               |
| 0.5 h 组 | 5.240 8±<br>1.153 6 | 15.907 4±<br>1.058 2 <sup>△</sup>  | 20.381 9±<br>1.156 4 <sup>**</sup>  | 14.907 4±<br>0.676 8 <sup>*</sup> | 0.119 6±<br>0.009 8           | 0.272 2±<br>0.005 6 <sup>**</sup>  | 0.378 0±<br>0.006 1 <sup>**</sup>   | 0.574 7±<br>0.010 0 <sup>**</sup> |
| 1.0 h 组 | 5.237 5±<br>1.459 6 | 15.237 4±<br>1.459 6 <sup>*</sup>  | 21.028 4±<br>0.491 2 <sup>*</sup>   | 15.237 5±<br>1.459 6 <sup>△</sup> | 0.119 1±<br>0.009 1           | 0.297 4±<br>0.002 6 <sup>△**</sup> | 0.395 8±<br>0.007 9 <sup>*</sup>    | 0.584 1±<br>0.019 6               |
| 1.5 h 组 | 5.268 1±<br>1.126 2 | 14.934 7±<br>1.513 6 <sup>**</sup> | 20.028 9±<br>0.582 3 <sup>**</sup>  | 14.934 7±<br>1.513 6 <sup>*</sup> | 0.123 5±<br>0.006 1           | 0.332 2±<br>0.018 5 <sup>△</sup>   | 0.452 3±<br>0.035 9 <sup>△</sup>    | 0.580 9±<br>0.015 1               |
| 2.0 h 组 | 5.499 4±<br>0.949 9 | 15.832 8±<br>0.550 4 <sup>△</sup>  | 23.210 3±<br>0.562 1 <sup>△△*</sup> | 17.166 2±<br>0.608 7 <sup>△</sup> | 0.139 4±0<br>.004 9           | 0.358 6±<br>0.007 8 <sup>△</sup>   | 0.502 3±<br>0.021 2 <sup>△*</sup>   | 0.599 6±<br>0.010 6 <sup>△*</sup> |
| 2.5 h 组 | 5.767 6±<br>1.215 6 | 17.434 3±<br>1.099 9 <sup>△△</sup> | 26.816 4±<br>0.761 1 <sup>△△</sup>  | 18.434 3±<br>1.006 5 <sup>△</sup> | 0.135 5±<br>0.002 8           | 0.381 6±<br>0.005 7 <sup>△△</sup>  | 0.577 4±<br>0.006 3 <sup>△△</sup>   | 0.668 6±<br>0.022 5 <sup>△</sup>  |
| 3.0 h 组 | 5.719 4±<br>0.562 1 | 16.386 1±<br>0.949 6 <sup>△</sup>  | 22.866 3±<br>1.627 4 <sup>*</sup>   | 16.480 1±<br>0.949 6 <sup>△</sup> | 0.139 3±<br>0.008 1           | 0.366 7±<br>0.009 9 <sup>△</sup>   | 0.461 0±<br>0.025 9 <sup>△*</sup>   | 0.581 7±<br>0.016 9               |
| 3.5 h 组 | 5.799 8±<br>0.492 0 | 15.699 8±<br>0.320 3 <sup>*</sup>  | 22.896 0±<br>0.6523 <sup>△*</sup>   | 16.133 2±<br>0.491 4 <sup>△</sup> | 0.131 2±<br>0.006 4           | 0.328 8±<br>0.005 6 <sup>△*</sup>  | 0.431 3±<br>0.005 2 <sup>△△**</sup> | 0.568 7±<br>0.018 6 <sup>*</sup>  |
| 4.0 h 组 | 5.433 4±<br>0.951 8 | 15.633 4±<br>0.667 4 <sup>*</sup>  | 22.192 3±<br>1.648 2 <sup>*</sup>   | 16.766 8±<br>1.539 1 <sup>△</sup> | 0.130 8±<br>0.005 8           | 0.288 5±<br>0.016 1 <sup>*</sup>   | 0.380 5±<br>0.013 6 <sup>**</sup>   | 0.561 6±<br>0.040 3               |
| F 值     | 0.179               | 2.577                              | 14.180                              | 5.294                             | 5.355                         | 48.521                             | 47.730                              | 7.696                             |

注:与对照组比较,△△P<0.01,△P<0.05。与 2.5 h 组比较,\*P<0.05,\*\*P<0.01。下同

Note:Compared with control group,△△P<0.01,△P<0.05. Compared with 2.5 h group,\*P<0.05,\*\*P<0.01. Follows the same

表 4 静磁场对 BMP-2 mRNA 表达水平的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab.4 Effects on the BMP-2 mRNA expression at different treatment times( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

| 组别      | BMP-2 mRNA      |                                |                                 |                                |
|---------|-----------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
|         | 0 h             | 24 h                           | 48 h                            | 72 h                           |
| 对照组     | 1.000 0±0.000 0 | 1.508 0±0.065 8                | 1.491 5±0.006 1                 | 1.372 1±0.020 3                |
| 0.5 h 组 | 0.889 9±0.042 9 | 1.626 6±0.080 6**              | 1.584 1±0.017 0 <sup>△</sup> ** | 1.476 0±0.093 7*               |
| 1.0 h 组 | 0.912 6±0.029 5 | 1.809 9±0.118 3                | 1.593 2±0.054 1 <sup>△</sup> ** | 1.485 8±0.053 4*               |
| 1.5 h 组 | 0.989 3±0.097 1 | 1.956 3±0.118 9 <sup>△</sup> * | 1.624 7±0.043 5 <sup>△</sup> ** | 1.458 6±0.087 4**              |
| 2.0 h 组 | 1.005 3±0.094 9 | 1.931 2±0.094 8 <sup>△</sup>   | 1.814 2±0.058 6 <sup>△</sup> *  | 1.634 9±0.096 9                |
| 2.5 h 组 | 0.923 6±0.223 2 | 2.362 0±0.116 5 <sup>△</sup> △ | 2.214 7±0.051 9 <sup>△</sup> △  | 1.936 5±0.035 4 <sup>△</sup> △ |
| 3.0 h 组 | 0.998 3±0.094 1 | 1.89 16±0.126 7                | 1.679 8±0.059 0 <sup>△</sup> ** | 1.594 1±0.091 2*               |
| 3.5 h 组 | 0.991 3±0.149 8 | 2.013 3±0.130 1 <sup>△</sup>   | 1.759 6±0.224 9                 | 1.563 3±0.074 2*               |
| 4.0 h 组 | 0.852 5±0.059 4 | 1.947 2±0.200 9                | 1.727 3±0.195 9                 | 1.628 2±0.106 5*               |
| F 值     | 0.520           | 11.733                         | 11.477                          | 12.779                         |

表 5 静磁场对 Runx-2 mRNA 表达水平的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab.5 Effects on the Opg mRNA expression at different treatment times( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

| 组别      | Runx-2 mRNA                  |                                 |                                |                                 |
|---------|------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
|         | 0 h                          | 24 h                            | 48 h                           | 72 h                            |
| 对照组     | 1.000 0±0.000 0              | 1.272 2±0.023 6                 | 1.411 7±0.069 2                | 1.333 9±0.053 3                 |
| 0.5 h 组 | 0.973 0±0.048 3              | 1.334 5±0.087 7*                | 1.655 6±0.109 5**              | 0.915 2±0.057 6 <sup>△</sup> ** |
| 1.0 h 组 | 1.134 8±0.135 2              | 1.375 8±0.009 5 <sup>△</sup> ** | 1.693 4±0.016 1 <sup>△</sup> * | 0.986 9±0.077 1 <sup>△</sup> ** |
| 1.5 h 组 | 1.331 6±0.059 1 <sup>△</sup> | 1.394 2±0.030 0*                | 1.847 5±0.051 6 <sup>△</sup>   | 1.080 9±0.160 4                 |
| 2.0 h 组 | 1.074 9±0.113 1              | 1.526 4±0.015 4 <sup>△</sup> △  | 1.893 6±0.083 3 <sup>△</sup>   | 1.041 2±0.104 5 <sup>△</sup>    |
| 2.5 h 组 | 1.273 6±0.095 0 <sup>△</sup> | 1.582 3±0.017 5 <sup>△</sup> △  | 2.145 5±0.119 7 <sup>△</sup> △ | 1.312 1±0.055 4                 |
| 3.0 h 组 | 1.198 6±0.173 5              | 1.526 0±0.019 9 <sup>△</sup> △  | 1.797 0±0.049 4 <sup>△</sup>   | 1.223 9±0.173 1                 |
| 3.5 h 组 | 1.044 5±0.062 6              | 1.477 1±0.020 8 <sup>△</sup> *  | 1.782 7±0.101 8                | 1.171 2±0.133 1                 |
| 4.0 h 组 | 1.065 1±0.148 1              | 1.359 3±0.029 2*                | 1.757 2±0.186 0                | 1.125 2±0.159 1                 |
| F 值     | 4.985                        | 28.087                          | 11.853                         | 4.384                           |

表 6 静磁场对 Opg mRNA 表达水平的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab.6 Effect on the Opg mRNA expression at different treatment times( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

| 组别      | Opg mRNA expression            |                                |                              |                 |
|---------|--------------------------------|--------------------------------|------------------------------|-----------------|
|         | 0 h                            | 24 h                           | 48 h                         | 72 h            |
| 对照组     | 1.000 0±0.000 0                | 1.462 2±0.080 4                | 1.632 2±0.053 3              | 1.532 2±0.049 8 |
| 0.5 h 组 | 1.260 5±0.126 3                | 1.504 1±0.034 5**              | 1.504 1±0.034 5**            | 1.560 8±0.026 3 |
| 1.0 h 组 | 1.338 9±0.161 7                | 1.541 2±0.093 5*               | 1.644 5±0.157 2*             | 1.541 2±0.093 5 |
| 1.5 h 组 | 1.476 7±0.193 5                | 1.721 9±0.080 3 <sup>△</sup> * | 1.841 9±0.139 0              | 1.655 2±0.068 2 |
| 2.0 h 组 | 1.684 7±0.133 4 <sup>△</sup>   | 1.817 6±0.117 9 <sup>△</sup>   | 1.960 9±0.067 4 <sup>△</sup> | 1.684 2±0.114 8 |
| 2.5 h 组 | 1.767 3±0.169 9 <sup>△</sup>   | 2.174 3±0.082 2 <sup>△</sup> △ | 2.274 3±0.075 9 <sup>△</sup> | 1.734 3±0.155 6 |
| 3.0 h 组 | 1.523 3±0.140 0 <sup>△</sup> * | 1.774 2±0.157 6                | 1.774 2±0.157 6              | 1.640 8±0.096 0 |
| 3.5 h 组 | 1.225 2±0.107 0                | 1.490 8±0.147 0**              | 1.661 2±0.180 3              | 1.490 8±0.097 7 |
| 4.0 h 组 | 1.224 3±0.105 7*               | 1.527 5±0.190 4                | 1.667 9±0.179 1              | 1.460 8±0.142 1 |
| F 值     | 9.628                          | 13.831                         | 9.676                        | 2.529           |

1.5 h 组和 2.5 h 组显著促进 Runx-2 mRNA 的表达,其他磁场处理组无明显促进作用。磁场处理 24 h 后同对照组比较,1.0、2.0、2.5、3.0、3.5 h 组显著促进 Runx-2 mRNA 的表达,且 2.5 h 组高于 0.5、1.0、1.5、3.5、4.0 h 组。磁场处理 48 h 后磁场处理组同对照组比较,1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h 组显著促进 Runx-2 mRNA 的表达,且 2.5 h 组高于 0.5、1.0 h 组。磁场处

理 72 h 磁场处理组同对照组比较,0.5、1.0、2.0 h 组低于对照组,其中 2.5 h 组高于 0.5、1.0 h 组 Runx-2 mRNA 的表达水平。

(3) 静磁场对大鼠成骨细胞 Opg mRNA 表达的影响。结果见表 6。磁场处理成骨细胞 0 h 后磁场处理组同对照比较,2.0、2.5、3.0 h 组显著促进 Opg mRNA 的表达,且 2.5 h 组高于 3.0 h 组。磁场处理

24 h 后同对照组比较, 1.5、2.0、2.5 h 组显著促进 Opg mRNA 的表达, 且 2.5 h 组高于 0.5、1.0、1.5 h 组。磁场处理 48 h 后磁场处理组同对照组比较, 2.0、2.5 h 组显著促进 Opg mRNA 的表达。磁场处理 72 h, 磁场处理组各组间差异均无统计学意义。

### 3 讨论

细胞增殖是生物最根本、最基础的生命活动, 外界刺激会影响细胞周期发生变化, 导致增殖受影响, 而成骨细胞的增殖对于骨缺损、骨不连等骨病非常重要。Yamamoto 等<sup>[8]</sup>将鼠颅顶骨成骨细胞置于 0.6 T 静磁场中持续暴露 20 d, 发现静磁场对成骨细胞增殖并无明显影响。但笔者研究发现, 当用静磁场处理成骨细胞 2.0、2.5、3.0 h 时可显著促进细胞增殖。

ALP 在成骨过程中水解磷酸酯, 为羟基磷灰石的沉积提供必要的磷酸, 有利于成骨, 可代表成骨细胞分化的开始<sup>[9]</sup>。杨凌等<sup>[10]</sup>将人牙周膜成纤维细胞在静磁场持续加载下, 发现各磁场剂量组碱性磷酸酶活性增强。这与笔者报道的结果一致。

钙盐的沉积为衡量体外培养成骨细胞成熟分化的重要指标。实验结果表明当用静磁场处理成骨细胞 2.5 h 时可极显著促进钙盐的沉积。

BMP-2 是成骨细胞分化过程中极为重要的转录因子, 它在 ROB 的分化过程中不但起着关键作用, 而且是调控基因<sup>[11]</sup>。体内和离体实验都证明 BMP-2 有促进成骨细胞分化和诱导体外成骨的能力<sup>[12]</sup>。实验结果表明, 静磁场处理成骨细胞 2.5 h 后, 可显著促进 BMP-2 mRNA 的表达。Opg 被认为是调控成骨细胞分化的最主要的转录因子<sup>[13]</sup>。笔者发现静磁场处理成骨细胞 2.5 h 后, 可显著促进 Opg mRNA 的表达。

实验研究 SMFs 对体外培养成骨细胞增殖与分化及其基因表达水平的影响, 但是 SMFs 对其促成骨细胞分化的分子机制尚不明确, 所以笔者建议在采用静磁场处理体外培养成骨细胞时, 采用静磁场处理 2.5 h 作用效果明显。笔者将以本实验结果为基础, 进一步从电磁场促进成骨细胞分化的分子机制进行研究, 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] Marks RA. Spine fusion for discogenic low back pain: outcomes in patients treated with or without pulsed electromagnetic field stimulation [J]. *Adv Ther*, 2000, 17(2): 57-67.

- [2] Brighton CT, Pollack SR. Treatment of recalcitrant non-union with a capacitively coupled electrical field. A preliminary report [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 1985, 67(4): 577-585.
- [3] Mami V, Lisi A, Rieti S, et al. Low Electromagnetic field (50 Hz) induces differentiation on primary human oral keratinocytes (HOK) [J]. *Bioelectromagnetics*, 2004, 25(2): 118-126.
- [4] Sul AR, Park SN, Suh H. Effects of sinusoidal electromagnetic field on structure and function of different kinds of cell lines [J]. *Yonsei Med J*, 2006, 47(6): 852-861.
- [5] 周建, 陈克明, 葛宝丰, 等. 50 Hz 正弦交变电磁场促进体外培养成骨细胞分化成熟的双“强度窗”效应 [J]. *生物物理学报*, 2011, 6(27): 507-516.
- Zhou J, Chen KM, Ge BF, et al. Double effect intensity of 50 Hz sinusoidal electromagnetic fields at different intensity on differentiation and mRNA expression of osteoblasts in vitro [J]. *Sheng Wu Wu Li Xue Bao*, 2011, 6(27): 507-516. Chinese.
- [6] 王胜国, 周力, 陈扬熙, 等. 不同强度静磁场对成骨细胞细胞内钙离子浓度的影响 [J]. *第三军医大学学报*, 2010, 32(23): 2515-2518.
- Wang SG, Zhou L, Chen YX, et al. Effect of static magnetic field at different strengths on  $Ca^{2+}$  concentration in rat primarily cultured osteoblasts [J]. *Di San Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2010, 32(23): 2515-2518. Chinese.
- [7] Chang WH, Chen LT, Sun JS, et al. Effect of pulse-burst electromagnetic fields stimulation on osteoblast cell activities [J]. *Bioelectromagnetics*, 2004, 25(6): 457-465.
- [8] Yamamoto Y, Ohsaki Y, Goto T, et al. Effects of static magnetic fields on bone formation in rat osteoblast cultures [J]. *J Dent Res*, 2003, 82(12): 962-966.
- [9] Chiu KH, Ou KL, Lee SY, et al. Static magnetic fields promote osteoblast-like cells differentiation via increasing the membrane rigidity [J]. *Ann Biomed Eng*, 2007, 35(11): 1932-1939.
- [10] 杨凌, 巢永烈, 杜莉. 磁性附着体模拟静磁场对人牙周膜成纤维细胞的生物学效应研究 [J]. *华西口腔医学杂志*, 2007, 25(4): 316-319.
- Yang L, Chao YL, Du L. Study of biologic effects of simulating static magnetic field of magnetic attachment on human periodontal ligament fibroblasts [J]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, 2007, 25(4): 316-319. Chinese.
- [11] Saito T, Ogawa M, Hata Y, et al. Acceleration effect of human recombinant bone morphogenetic protein-2 on differentiation of human pulp cells into odontoblasts [J]. *J Endod*, 2004, 30(4): 205-208.
- [12] Chen D, Harris MA, Rossini G, et al. Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) enhances BMP-3, BMP-4, and bone cell differentiation marker gene expression during the induction of mineralized bone matrix formation in cultures of fetal rat calvarial osteoblasts [J]. *Calcif Tissue Int*, 1997, 60(3): 283-290.
- [13] Lin JS, Zhao CB. BMP/ bFGF effect articular cartilage lesion prosthetic [J]. *China Disabled Medical*, 2009, 17(2): 131-133.

(收稿日期: 2012-03-25 本文编辑: 连智华)