文章编号:1000-5404(2010)23-2515-04

论著

不同强度静磁场对成骨细胞细胞内钙离子浓度的影响

王胜国[1],周 力[2],陈扬熙[2],王艳民[2],任晓华[3] (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院口腔科[1];610041 成都,四川大学华西口腔医院口腔正畸科[2];610072 成都,四川省人民医院口腔科[3])

【摘要】 目的 对成骨细胞静磁场加载过程中细胞内的钙离子浓度进行动态定量检测,探讨成骨细胞静磁场加载过程中细胞内钙离子浓度的变化规律。方法 采用静磁场加载装置,对体外培养的成骨细胞分别在8、50 mT和160 mT的磁场强度下给予24、48 h和72 h的静磁场加载;0 mT作为对照组,不进行静磁场加载,只受地磁场的影响。应用邻甲酚酞络合铜(OCPC)微板法测量加载后细胞内钙离子浓度。结果 原代培养的细胞经鉴定具有成骨细胞的生物学特征,为成骨细胞。与0 mT组相比,8、50 mT和160 mT的静磁场加载后24、48、72 h成骨细胞内的钙离子浓度均降低($P<0.05$)。与0 mT组比较,8 mT组在24、48、72 h细胞内钙离子浓度降低率分别为27.48%、24.41%和10.46%,50 mT组降低率分别为19.03%、18.04%和15.54%,160 mT组降低率分别为8.58%、13.10%和19.03%。结论 一定强度的静磁场加载能够降低成骨细胞内的钙离子浓度。

【关键词】 成骨细胞;静磁场;钙离子
【中图法分类号】 R322.71;R329.26;R339.5 【文献标志码】 A

Effect of static magnetic field at different strengths on Ca^{2+} concentration in rat primarily cultured osteoblasts

Wang Shengguo[1], Zhou Li[2], Chen Yangxi[2], Wang Yanmin[2], Ren Xiaohua[3] ([1]Department of Stomatology, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010; [2]Department of Orthodontics, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu, Sichuan Province, 610041; [3]Department of Stomatology, People's Hospital of Sichuan Province, Chengdu, Sichuan Province, 610072, China)

【Abstract】 Objective To investigate the Ca^{2+} concentration in osteoblasts and to study its changing rule during static magnetic field loading. Methods Osteoblasts primarily cultured form 1-day rat skull were cultured under 0, 8, 50 and 160 mT of static magnetic field for 24, 48 and 72 h, respectively. The cells cultured under 0 mT used as control. Osteoblasts were identified with alkaline phosphatase (ALP) and Von Kossa stainings. Ca^{2+} concentrations were measured with the OCPC micro-plating method and analyzed by variance. Results The culuted cells showed the biological features of osteoblasts and positive to ALP and Von Kossa stainings. Compared with the cells under 0 mT field, the Ca^{2+} concentration of 8 mT group was decreased by 27.48%, 24.41% and 10.46% respectively at 24, 48 and 72 h, that of 50 mT group was by 19.03%, 18.04% and 15.54%, and that of 160 mT group was by 8.58%, 13.10% and 19.03% respectively for different time points. Significant reduce was found in the Ca^{2+} concentration after static magnetic field exposure compared with that of normal control ($P<0.05$). Conclusion The static magnetic field at a certain strength can decrease the Ca^{2+} concentration in osteoblasts.

【Key words】 osteoblast; static magnetic field; Ca^{2+}

Corresponding author: Wang Shengguo, Tel: 86-23-63693436, E-mail: wangshengguo76@163.com

成骨细胞是骨组织形成、改建和损伤后修复的重要功能细胞,也是正畸牙移动的主要效应细胞,其增殖和分化受细胞因子和激素等细胞外因素的调节。研究表明,一定强度的静磁场可以促进成骨细胞的增殖,促进BMP-2、Ⅰ型胶原、TGF-β1等细胞因子的分泌,增加磷酸二酯酶基因及碱性磷酸酶的表达[1-7];作为正畸矫治的重要力源,静磁场广泛应用于埋伏牙的牵引助萌、推磨牙向远中、开合矫治及功能矫治中[8-11],但是关于静磁场对成骨细胞功能活性影响的机制尚不清楚。

Ca^{2+}在细胞中起着广泛的信使作用,对细胞内的众多生理过程起着引发和调节作用,细胞内钙离子浓度的变化能产生复杂多样的生理反应。目前研究大多认为静磁场通过钙离子和钙离子信号通道产生生物学效应[12-15],然而关于不同强度静磁场加载对成骨细胞内钙离子浓度影响的研究较少。本研究以原代培养的成骨细胞为研究对象,比较了不同强度的静磁场对成

【通信作者】 王胜国,电话:(023)63693436,E-mail:wangshengguo76@163.com

骨细胞内 Ca^{2+} 浓度的影响，初步探讨了静磁场对成骨细胞功能活性影响的机制。

1 材料与方法

1.1 永磁体加载装置

本实验所用的静磁场加载装置由作者和西南应用磁学研究所共同研制。该装置由磁极和磁轭两部分组成，上下磁极间为直径 40 mm 的圆柱状静磁场均匀区，如图 1、2 所示，而实验所用的细胞培养皿直径为 35 mm，从而保证成骨细胞静磁场加载强度的一致性。本实验设计制作了 8、50 mT 和 160 mT 3 个不同强度的静磁场加载装置，以期比较不同强度静磁场加载对成骨细胞内钙离子浓度的影响。

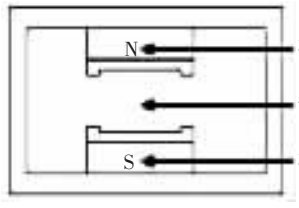


图 1 细胞静磁场加载装置结构示意图

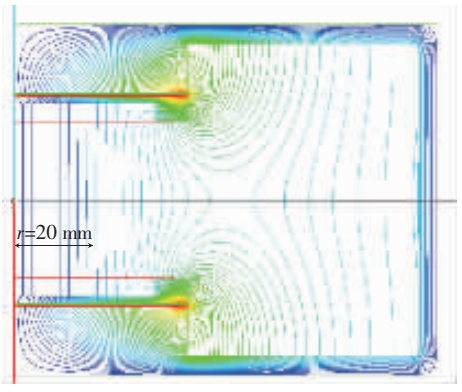


图 2 半截面磁通密度分布情况

1.2 大鼠颅骨成骨细胞体外培养的建立

出生 1 d 的 SD 大鼠 75% 酒精浸泡室息后断头，无菌条件下取出头盖骨，去除头盖骨上的骨膜、血管等软组织，经 3×10^5 U/L 的青霉素和 3×10^5 U/L 链霉素及 20% 的 DMEM 培养基浸泡后于青霉素小瓶中用眼科剪将其剪碎成 1 mm × 1 mm 大小的颅骨碎块，然后将颅骨碎块贴附在中号培养瓶壁，加入 5 ml 20% 的 DMEM 培养基后倒置于 CO_2 恒温培养箱中，5 h 后翻转培养瓶。每 7 天换液，待细胞长满瓶底后传代、备用。

1.3 成骨细胞的鉴定

1.3.1 碱性磷酸酶染色鉴定　将原代培养的第 3 代成骨细胞接种在盖玻片上，待细胞长至汇合后取出盖玻片，以常规钙钴法进行 ALP 染色。

1.3.2 细胞钙结节染色　将第 3 代成骨细胞接种在盖玻片上，每 3 ~ 5 天更换培养基，连续培养 28 d 后出现钙化结节，然后应用 0.1% 茜素红进行染色。

1.4 成骨细胞内钙离子浓度的检测

1.4.1 样本准备　将第 3 ~ 4 代成骨细胞以 2×10^5 接种于直径为 35 mm 细胞培养皿中，饱和湿度、5% CO_2、37 ℃ 细胞培养箱中孵育 24 h 后进行静磁场加载。设置磁场强度分别为 0、8、50 mT 和 160 mT；时间分别为 24、48 h 和 72 h。分别在实验结束后收集细胞，实验重复 3 次，其中 0 mT 表示无外加静磁场加入，只受地磁场的影响。

细胞加载结束后，将细胞培养皿从加载装置中取出，弃培养基。PBS 冲洗 3 次，加入胰酶 0.5 ml，37 ℃、5% CO_2、饱和湿度消化 5 min，待成骨细胞从培养皿消化下来后，加入含 10% 小牛血清的培养基 2.5 ml 终止消化，转移到离心管 1 200 r/min 离心 8 min，弃离心管内培养基，加入 PBS，1 200 r/min 离心 8 min，弃离心管管内液体，倒置离心管 10 min 以控干离心管内液体，加入 120 μl PBS，混匀后转移至 EP 管 - 20 ℃ 冻存，待检。

1.4.2 Ca^{2+} 浓度检测　细胞样本反复冻融 3 次后超声冻融 40 min。将工作台及 HTS7000Plus 温度设置为 37 ℃，编制 Ca^{2+} 及 G250 蛋白检测程序并设计盘图。稀释蛋白标准曲线。配置 Ca^{2+} 及 G250 蛋白检测工作液。按照盘图设计加样并检测出样品的 Ca^{2+} 及 G250 蛋白含量，并换算出 Ca^{2+}/G250。

1.5 统计学分析

应用 SPSS 13.0 统计软件进行处理，计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，不同组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 原代培养成骨细胞及鉴定

分离的成骨细胞在培养 24 h 后，细胞贴附于培养瓶底，细胞形态多样化，呈梭形、三角形、多角形等（图 3）；原代培养的成骨细胞碱性磷酸酶染色阳性、钙结节染色阳性，具有成骨细胞的生物学特征，证明培养的细胞是成骨细胞（图 4）。

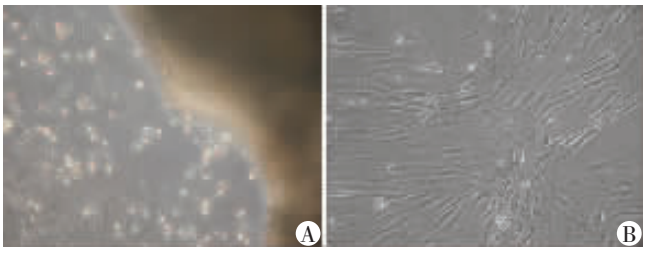
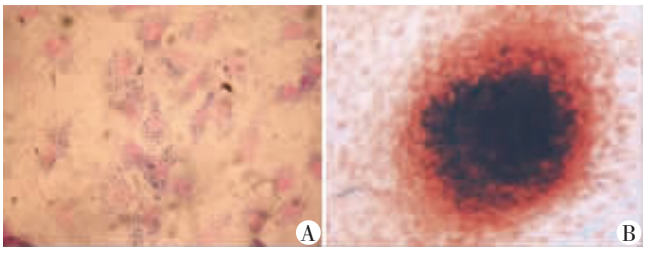


图 3 原代培养（A）和传代培养（B）的成骨细胞倒置显微镜观察 （×40）



A：碱性磷酸酶染色阳性；B：钙结节染色阳性

图 4 原代培养的成骨细胞染色鉴定（倒置显微镜 ×40）

2.2 微量蛋白定量标准曲线

方框所形成的曲线为理论的标准曲线，方框内或附近的线为实际稀释测定结果。应用考马斯亮蓝微板法测得的蛋白标准曲线与理论标准曲线相符（图 5），保证了细胞微量蛋白结果的准确性，从而使得 Ca^{2+} 检测结果真实、可靠。

2.3 成骨细胞内钙离子浓度测量结果

8、50、160 mT 的磁场强度下给予 24、48、72 h 静磁场加载后，成骨细胞内 Ca^{2+} 浓度经单因素方差分析，与对照组（0 mT）相比差别均有统计学意义（$P<0.05$，表 1）。与不加载静磁场

0 mT 组相比,8 mT 组在 24、48 h 和 72 h 的细胞内钙离子浓度降低率分别为 27.48%、24.41% 和 10.46%,50 mT 组在 24、48 h 和 72 h 的细胞内的钙离子浓度降低率分别为 19.03%、18.04% 和 15.54%,160 mT 组细胞内的钙离子浓度降低率在 24、48 h 和 72 h 分别为 8.58%、13.10% 和 19.03%。

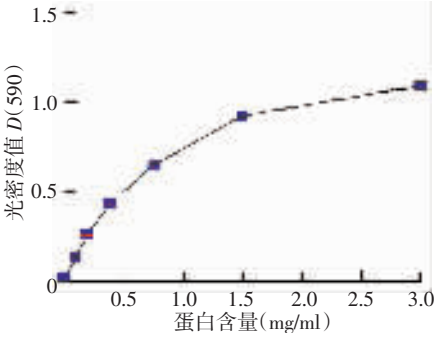


图 5　微量蛋白定量标准曲线

表 1　不同时间各磁场强度下成骨细胞内 Ca^{2+} 浓度比较($\bar{x} \pm s$)

时间(h)	磁场强度(mT)	Ca^{2+} 浓度(U/mg)
24	0	0.380 8 ± 0.013 6
	8	0.276 2 ± 0.013 7[a]
	50	0.308 3 ± 0.009 7[a]
	160	0.348 1 ± 0.015 0[a]
48	0	0.227 5 ± 0.012 5
	8	0.172 0 ± 0.014 4[a]
	50	0.185 5 ± 0.015 8[a]
	160	0.197 7 ± 0.009 3[a]
72	0	0.196 9 ± 0.007 5
	8	0.176 3 ± 0.008 1[a]
	50	0.166 3 ± 0.010 8[a]
	160	0.159 4 ± 0.008 7[a]

a:$P < 0.05$,与对照组(0 mT)比较

3　讨论

本研究采用的静磁场加载强度为 8、50 mT 和 160 mT。Yamamoto 等[4] 应用静磁场进行的实验研究显示,160 mT 的静磁场可以促进成骨细胞的碱性磷酸酶活性;仇丽鸿等[2] 的研究显示 40 mT 和 62 mT 的静磁场的促增殖效应更好;王胜国等[3] 的研究表明 8、50 mT 和 160 mT 的静磁场加载可以促进成骨细胞碱性磷酸酶活性的表达。同时,8、50 mT 和 160 mT 可以初步模拟正畸用永磁体应用时牙根尖区、牙根中间区及牙槽嵴顶的静磁场强度,故选用 8、50 mT 和 160 mT 作为实验研究的静磁场加载强度[16]。

研究表明,脉冲电磁场具有促成骨效应并已经广泛的应用于骨不连、骨移植、骨切开术、骨坏死和骨质疏松症等的治疗中。由于体积小、简便易用,稀土永磁体作为一种力源,在正畸临床得到了较为广泛的应用[7-11]。研究表明,不但应用静磁场磁力正畸可以加速正畸牙移动和组织改建[17],而且在一定的静磁场中应用机械力进行正畸矫治也有类似作用[18]。一定强度的静磁场可以促进成骨细胞的增殖,促进 BMP-2、Ⅰ型胶原、TGF-β1 等细胞因子的分泌,增加磷酸二酯酶基因及碱性磷酸酶的表达[1-7]。作者前期的研究亦显示,8、50 mT 和 160 mT 的静磁场加载 24、48 h 和 72 h 后,8、50 mT 和 160 mT 的静磁场在各加载时段均可以促进成骨细胞碱性磷酸酶活性的表达[3]。

Ca^{2+} 作为第二信使,对细胞内的众多生理过程起着引发和调控作用;而静磁场加载可以导致诸多细胞细胞内钙离子浓度的改变。在 6 mT 的静磁场和凋亡因子的共同作用下,淋巴细胞、鼠胸腺细胞和 3DO 等细胞的有丝分裂和凋亡增加,同时伴有细胞内的钙离子浓度增高[19]。Morris 等[20] 研究发现一定强度静磁场照射能够降低大鼠的水肿反应,其机制与 L 型钙离子通道有关。Yang 等[21] 研究显示静磁场能够促进 MG63 的碱性磷酸酶活性和磷酸二酯酶表达,但在静磁场和钙调蛋白拮抗剂共同作用时,静磁场诱导的细胞反应明显抑制,提示其机制与钙离子通道密切相关。

本研究以原代培养的成骨细胞为研究对象,应用与西南应用磁学研究所联合研制的静磁场加载装置加载,研究了不同强度静磁场加载对成骨细胞细胞内 Ca^{2+} 浓度的影响。结果显示:本实验所选用的 8、50 mT 和 160 mT 的静磁场加载 24、48 h 和 72 h 后,成骨细胞内的钙离子浓度降低。8 mT 和 50 mT 静磁场加载组随加载时间的延长,成骨细胞内钙离子浓度降低率减小;而 160 mT 组随加载时间的延长,成骨细胞内钙离子浓度降低率增加。静磁场可能通过作用于细胞膜上的钙离子通道作用于成骨细胞,通过调节细胞内的钙离子浓度将静磁场信号传递到细胞内,从而调节成骨细胞的功能活性;8 mT 和 50 mT 静磁场加载组随加载时间的延长,成骨细胞内钙离子降低率减小,提示 8 mT 和 50 mT 的静磁场对成骨细胞的影响是可控的,成骨细胞可能通过负反馈调节防止细胞内钙离子浓度的过度降低;160 mT 组随加载时间的延长,成骨细胞内钙离子浓度降低率增加,说明随着加载时间的延长,成骨细胞内钙离子浓度降低更加明显,可能因为 160 mT 的静磁场在观察期间内尚未完全激发钙离子的负反馈调节机制或者 160 mT 的静磁场过强,已经超过其负反馈调节能力。关于静磁场怎样调节成骨细胞内的钙离子浓度,尚需进一步的研究。

参考文献:

[1] 仇丽鸿,钟鸣,汤旭娜,等. 静磁场对成骨细胞骨形成蛋白 2 和Ⅰ型胶原的影响[J]. 上海口腔医学,2007,16(1):33-35.
[2] 仇丽鸿,包扬,钟鸣,等. 静磁场对大鼠成骨细胞增殖分化功能的影响[J]. 实用口腔医学杂志,2005,21(5):606-609.
[3] 王胜国,蒲高成,高志. 不同强度静磁场对成骨细胞碱性磷酸酶活性的影响[J]. 四川卫生生殖学院学报,2009,(1):29-32.
[4] 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.

[5] Huang H M, Lee S Y, Yao W C, *et al*. Static magnetic fields up-regulate osteoblast maturity by affecting local differentiation factors[J]. Clin Orthop Related Res, 2006, 447:201-208.
[6] Yang J C, Lee S Y, Chen C A, *et al*. The role of the calmodulin-dependent pathway in static magnetic field-induced mechanotransduction[J]. Bioelectromagnetics, 2010, 31(4):255-261.
[7] Sakurai T, Terashima S, Miyakoshi J. Enhanced secretion of prostaglandin E2 from osteoblasts by exposure to a strong static magnetic field[J]. Bioelectromagnetics, 2008, 29(4):277-283.
[8] Li L C, Wong R W, King N M. Orthodontic traction of impacted canine using magnet:a case report[J]. Cases J, 2008, 1(1):382.
[9] Li Y, Yang P, Fan X, *et al*. Static magnetic field combined with functional appliances:a new approach to enhance mandibular growth in Class Ⅱ malocclusion[J]. Med Hypotheses, 2009, 72(3):276-279.
[10] Barbre R E, Sinclair P M. A cephalometric evaluation of anterior openbite correction with the magnetic active vertical corrector[J]. Angle Orthod, 1991, 61(2):93-102.
[11] Bondemark L, Kurol J. Distalization of maxillary first and second molars simultaneously with repelling magnets[J]. Eur J Orthod, 1992, 14(4):264-272.
[12] Yeh S R, Yang J W, Lee Y T, *et al*. Static magnetic field expose enhances neurotransmission in crayfish nervous system[J]. Int J Radiat Biol, 2008, 84(7):561-567.
[13] Chionna A, Tenuzzo B, Panzarini E, *et al*. Time dependent modifications of Hep G2 cells during exposure to static magnetic fields[J]. Bioelectromagnetics, 2005, 26(4):275-286.
[14] Tenuzzo B, Vergallo C, Dini L. Effect of 6mT static magnetic field on the bcl-2, bax, p53 and hsp70 expression in freshly isolated and *in vitro* aged human lymphocytes[J]. Tissue Cell, 2009, 41(3):169-179.
[15] Belton M, Prato F S, Rozanski C, *et al*. Effect of 100 mT homogeneous static magnetic field on $[Ca^{2+}]$c response to ATP in HL-60 cells following GSH depletion[J]. Bioelectromagnetics, 2009, 30(4):322-329.
[16] Bondemark L, Kurol J, Wisten A. Extent and flux density of static magnetic fields generated by orthodontic samarium-cobalt magnets[J]. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 1995, 107(5):488-496.
[17] Zhao N, Xu Y, Chen Y, *et al*. Effects of Class Ⅲ magnetic orthopedic forces on the craniofacial sutures of rhesus monkeys[J]. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 2008, 133(3):401-409.
[18] Sakata M, Yamamoto Y, Imamura N, *et al*. The effects of a static magnetic field on orthodontic tooth movement[J]. J Orthod, 2008, 35(4):249-254.
[19] Tenuzzo B, Chionna A, Panzarini E, *et al*. Biological effects of 6 mT static magnetic fields:a comparative study in different cell types[J]. Bioelectromagnetics, 2006, 27(7):560-577.
[20] Morris C E, Skalak T C. Acute exposure to a moderate strength static magnetic field reduces edema formation in rats[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008, 294(1):H50-H57.
[21] Yang J C, Lee S Y, Chen C A, *et al*. The role of the calmodulin-dependent pathway in static magnetic field-induced mechanotransduction[J]. Bioelectromagnetics, 2010, 31(4):255-261.

(收稿:2010-07-06 修回:2010-08-20)
(编辑 吴培红)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2010)23-2518-01

僵人综合征1例

麦麦提江·麦苏木[1],阿依古丽·艾力[2] (843000 新疆 阿克苏,新疆阿克苏职业技术学院医学系[1];843000 新疆 阿克苏,新疆阿克苏地区第一人民医院神经内科[2])

【关键词】 僵人综合征;肌肉;僵直;痛性痉挛;关节
【中图法分类号】 R593.2 【文献标志码】 B

僵人综合征(stiff-person syndrome, SPS)是一种罕见的自身免疫性神经系统疾病,以进行性肌肉强直或僵硬为特征,均明显影响脊柱和下肢[1]。至2005年,国内报道了125例SPS病例,无种族差异证据[1]。现报告我院收治的SPS患者1例。

1 临床资料

患者,男性,35岁,农民,维吾尔族,因"双下肢进行性活动不灵4年、发作性痉挛1年",于2008年9月22日入我院。家属代述于入院前4年露宿街头一夜后出现四肢关节痛性痉挛,此后症状进行性加重,双下肢关节肌肉僵硬逐渐累及腰背部、颈部,腰脊前凸,不能直立,不能屈曲,转颈受限,无晨僵,无腰骶部夜间痛、晨起痛或僵硬,伴阵发性痛性肌痉挛,睡眠后放松,发作频繁,发作时剧烈疼痛、出汗、呼吸急促等,病程中无意识障碍、吞咽困难、震颤、二便失禁等。否认外伤史,无家族中遗传病及类似病例。查体:神志清,言语欠流利,表情呆板,被动体位,查体欠合作。颈部僵硬,呼吸运动正常,双上肢肌力和肌张力均正常,上肢及腹壁反射正常,脊柱及双下肢僵硬,如木板样僵直,活动受限,姿势固定呈强直状,不能翻身、起坐,无肌肉萎缩,肌肉肌压痛不明显,无肌束震颤,双侧病理征(-)。头颅MRI示:双侧额叶脑萎缩。胸段及腰骶部MRI示:未见异常。关节疾病检查:抗"O"276 IU/L偏高,免疫球蛋白IgA 6.40 g/L偏高。三大常规正常,大生化均正常,甲状腺功能检测正常。腰穿脑脊液细胞数正常,蛋白轻度增高0.79 g/L,IgG合成率19.33(正常<5.82),IgG明显升高到8.27 g/L(正常<4.03 g/L),寡克隆带(-)。血清抗谷氨酸脱羧酶(GAD)抗体(+)。肌电图(EMG)示:下肢及腰段棘旁肌群肌静息时可见大量持续正常运

(下转2523页)

【通信作者】 麦麦提江·麦苏木,电话:(0997)2788873,E-mail:mamatjan8220@yahoo.com.cn