论著

文章编号:1000-5404(2011)12-1220-04

静磁场对成骨细胞增殖活性和细胞表面超微结构的影响

王胜国[1],周 力[2],王艳民[2],陈扬熙[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学院口腔正畸科[2];610072 成都,四川省人民医院口腔科[3])

【摘要】 **目的** 观察不同强度和作用时间的静磁场对体外培养成骨细胞的增殖活性及其表面超微结构的影响,探索静磁场加载对成骨细胞增殖等功能活性影响的机制。**方法** 将体外培养成骨细胞分别于静磁场加载装置0、8、50、160 mT磁场强度下给予24、48、72 h的静磁场加载。应用MTT法检测成骨细胞的增殖活性;应用倒置相差显微镜和扫描电镜观察细胞形态及其表面超微结构的变化。**结果** 与不给予静磁场加载对照组比较,培养成骨细胞分别于8、50、160 mT静磁场加载24、48、72 h后,其增殖活性出现不同程度的增加;其细胞形态、数量及分布上无差异;而随加载时间延长,细胞表面变得凹凸不平,微绒毛增多增粗增大,可见融合成囊泡及大囊泡,且8 mT和50 mT静磁场的作用明显。**结论** 8、50、160 mT静磁场随加载时间延长,体外培养成骨细胞增殖活性出现不同程度增加,细胞表面超微结构出现不同程度改建。

【关键词】 静磁场;成骨细胞;增殖活性;超微结构

【中图法分类号】 R339.5;R322.71;R329.2 【文献标志码】 A

Effect of static magnetic field on proliferation and surface ultra-structure of osteoblasts *in vitro*

Wang Shengguo[1], Zhou Li[2], Wang Yanmin[2], Chen Yangxi[2], Ren Xiaohua[3] ([1]Department of Stomatology, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010; [2]Department of Orthodontics, West China College 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 observe the effect of different magnitude and action time of static magnetic field on proliferation and surface ultra-structure in cultured osteoblasts. Methods Cultured osteoblasts were loaded onto the static magnetic field at the magnitudes of 0, 8, 50 or 160 for 24, 48 or 72 h. Proliferation of osteoblasts was detected by MTT assay. Changes in morphology and surface ultra-structure of osteoblasts were observed under an inverted phase contrast microscope and a scanning electronic microscope, respectively. Results The proliferation of osteoblasts cultured under static magnetic field at the magnitudes of 8, 50 and 160 for 24, 48 and 72 h increased differently. No difference was observed in morphology, accounts and distribution of osteoblasts. However, the surface of osteoblasts became uneven or irregular, and the number of microvilli increased and became thicker and larger with fused vesiculation and blebs when the static magnetic field loading time was prolonged. Furthermore, the effect of static magnetic field at the magnitudes of 8 and 50 mT was significant on the surface ultra-structure of osteoblasts. Conclusion The proliferation of *in vitro* osteoblasts increases, and the surface ultra-structure of osteoblasts is differently rebuilt when the static magnetic field loading time is prolonged at the magnitudes of 8, 50 and 160 mT.

【**Key words**】 static magnetic field; osteoblast; proliferation; cell surface ultra structure

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2010BB5382). Corresponding author: Wang Shengguo, Tel: 86-23-63693436, E-mail: wangshengguo76@163.com

【基金项目】 重庆市自然科学基金(CSTC2010BB5382)

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

稀土永磁体静磁场具有加速正畸牙移动和组织改建效应,并在口腔临床得到广泛应用[1-3]。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。一定强度静磁场可以促进成骨细胞细胞因子的分泌和碱性磷酸酶的表达[4-6]。但是在促进成骨细胞增殖方面,不同的研究结果不尽相同,甚至完全相反[7-8]。细胞的形态与功能相辅相成,其形态的变化是功能改变的基础,并影响细胞功能的完成。研究[9-10]显示,静磁场加载可以引起许多细胞的形态变化及其表面超微结构改建,而静磁场对成骨细胞的形态及其表面超微结构的影响有待进一步探索。本研究应用自行研制的静磁场加载装置,观察不同强度静磁场对成骨细胞增殖活性的影响;并用倒置相差显微镜和电子扫描电镜观察不同强度和作用时间的静磁场对体外培养成骨细胞的形态和表面超微结构的影响,以探讨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[11]。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的影响。

1.2 成骨细胞体外培养与鉴定

1.2.1 成骨细胞培养 出生 1 d 的 SD 大鼠 75% 酒精浸泡窒息后断头,无菌条件下取头盖骨,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。

1.2.2 培养细胞鉴定 碱性磷酸酶染色鉴定:将第 3 代培养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,倒置相差显微镜观察、照相[12]。

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[13]。

1.3 静磁场加载

将第 3~4 代成骨细胞接种于直径为 35 mm 的细胞培养皿中,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。磁场强度分别为 0、8、50、160 mT;作用时间分别为 24、48、72 h,共 12 组,每组 3 个样本,每个时间点采用的细胞样本相同。

1.4 成骨细胞增殖活性检测

细胞加载结束后,用加样枪小心的吸出原培养基,加入 600 μl 新鲜的培养基和60 μl MTT 溶液,置于 37 ℃、5% CO_2 饱和湿度的孵箱内孵育 4 h。用加样枪小心的吸出培养皿内的液体,加入 700 μl DMSO 液,置于 37 ℃、5% CO_2 饱和湿度的孵箱内孵育 0.5 h。用 200 μl 加样枪反复吹打,混匀培养皿内的液体,以 200 μl /孔转移到 96 孔板中。然后应用 HTS7000Plus 多孔板(荧光/紫外/可见光)高效分析仪检测其光密度值[*D*(570)]。

1.5 培养细胞形态变化和表面超微结构观察

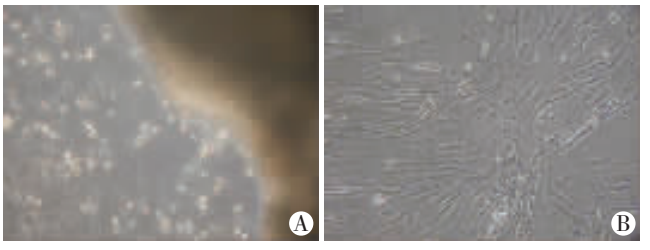
1.5.1 倒置显微镜观察 分别将上述不同场强静磁场加载 24、48、72 h 的样本逐一取出,倒置相差显微镜下观察成骨细胞的数量、分布及形态学变化,并照相记录。

1.5.2 扫描电镜观察 分别将各组别细胞培养皿从加载装置中取出,PBS 冲洗 3 次,2.5% 戊二醛过夜固定。细胞酒精梯度脱水,乙酸异戊酯置换 30 min,临界点干燥和导电处理,安装样品,观察细胞表面超微结构。

2 结果

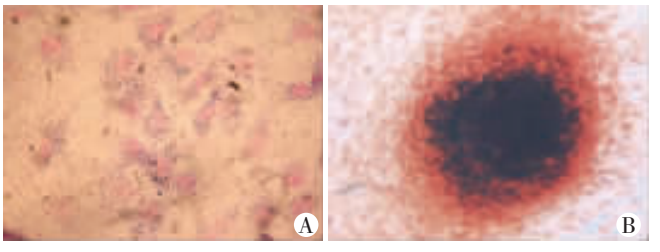
2.1 成骨细胞培养及鉴定

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 1);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(图 2)。



A:原代培养的成骨细胞;B:传代培养的成骨细胞

图 1 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 2 成骨细胞鉴定 (倒置相差显微镜×40)

2.2 MTT 法检测成骨细胞增殖活性

随着静磁场加载时间的延长,与对照组(0 mT 组)相比,8 mT 和 160 mT 组成骨细胞的增殖活性由最初的降低转化为后来的增加;而 50 mT 组成骨细胞则一直呈现促增殖效应(表 1)。

表1　不同磁场强度加载后成骨细胞增殖活性的变化
[D(570), $n=3$, $\bar{x}\pm s$]

磁场强度(mT)	24 h	48 h	72 h
0	0.90±0.012	0.89±0.008	0.74±0.009
8	0.84±0.013[a]	0.92±0.018[a]	0.85±0.010[a]
50	0.93±0.026	1.12±0.027[a]	1.08±0.040[a]
160	0.74±0.007[a]	0.73±0.004[a]	0.95±0.005[a]

a：$P<0.05$，与对照组(0 mT)比较

2.3　静磁场对体外培养成骨细胞形态变化的影响

8、50 mT和160 mT静磁场加载24、48 h和72 h后，倒置相差显微镜下成骨细胞贴壁良好，细胞呈梭形或三角形，呈典型的成骨细胞样。与对照组(0 mT)相比，倒置相差显微镜下没有观察到成骨细胞在形态、数量和分布上的异常(图3)。

2.4　静磁场对体外培养成骨细胞表面超微结构的影响

0 mT组成骨细胞细胞表面较光滑，仅见微小的绒毛，而暴露于静磁场24、48 h和72 h后，成骨细胞表面变得凹凸不平，微绒毛增多、增粗、增大，并且融合成为囊泡。随着静磁场加载时间的增加，细胞表面凹凸感增加，微绒毛呈层状、囊泡样结构增加，相互融合成较大的囊泡。与160 mT的静磁场相比，8 mT和50 mT的静磁场对成骨细胞细胞表面超微结构的影响更为显著(图4)。



A 0 mT；B 8 mT；C 50 mT；D 160 mT

图3　倒置相差显微镜观察静磁场加载后的成骨细胞（×200）

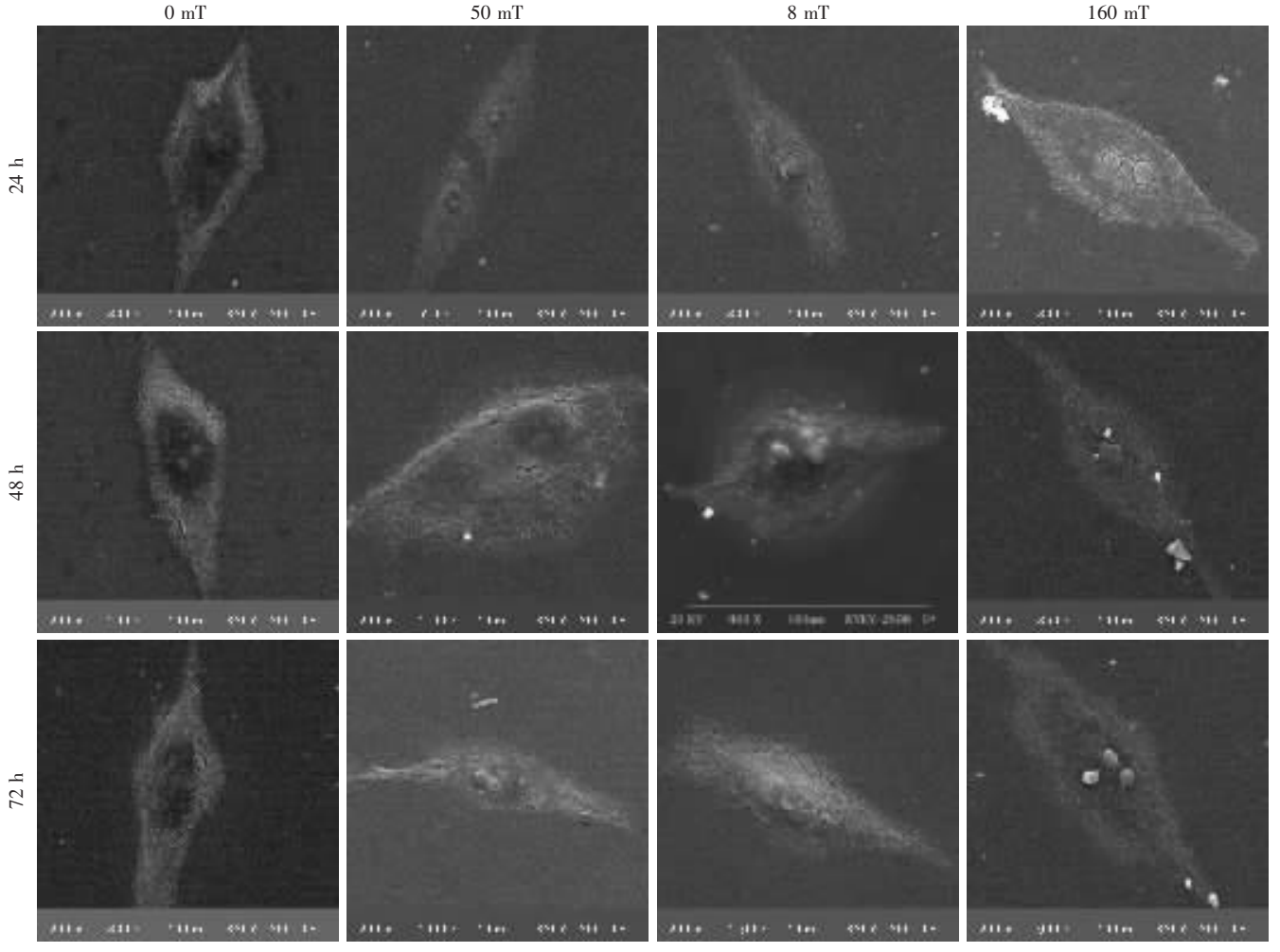


图4　扫描电镜下观察静磁场不同磁场强度作用不同时间对体外培养成骨细胞表面超微结构的影响

3 讨论

3.1 不同强度静磁场对成骨细胞增殖活性的影响

本研究通过静磁场加载装置对成骨细胞加载,结果发现,不同强度的静磁场对成骨细胞的促增殖效应不同。随着静磁场加载时间的延长,与对照组(0 mT)相比,8 mT 和 160 mT 成骨细胞的增殖活性由最初的降低转化为后来的增加;而 50 mT 成骨细胞则一直呈现促增殖效应;但是在 24 h 时没有统计学意义。Yamamoto 等[7]报道采用 160 mT 的静磁场照射成骨细胞,发现静磁场加载可以促进成骨细胞的增殖;但 Kotani 等[8]的研究显示静磁场对成骨细胞无促增殖效应。这可能与不同研究者选用的静磁场强度不同及细胞来源不同有关。本研究成骨细胞在静磁场加载最初 24 h 无明显促增殖效应,这可能与成骨细胞对外界环境改变-静磁场加载存在一个适应过程有关。本实验所选用的不同强度静磁场对成骨细胞增殖活性影响不同提示我们静磁场加载可能具有"窗口效应",即静磁场强度与成骨细胞的增殖活性不是线性关系,一定强度范围内的静磁场的促增殖效应更好。

3.2 不同强度静磁场对成骨细胞表面超微结构的影响

细胞的形态与功能相辅相成,其形态的变化是功能改变的基础,并影响细胞功能的完成;而静磁场加载可以引起诸多细胞形态和细胞表面超微结构的改建[9-10]。本研究采用静磁场加载装置,对体外培养的成骨细胞进行不同强度、不同时间的静磁场加载,利用倒置相差显微镜和扫描电镜,进行了静磁场加载下成骨细胞细胞形态和细胞表面超微结构改建的研究。结果显示,虽然倒置相差显微镜下未发现静磁场加载对成骨细胞形态有影响,但是扫描电镜显示静磁场加载后成骨细胞细胞表面超微结构发生了改建,静磁场加载后成骨细胞细胞表面变得凹凸不平,微绒毛增大,囊泡样结构增多;静磁场加载有强度依赖性和时间依赖性,加载时间愈长,细胞表面超微结构的改建愈明显,不同强度的静磁场加载对成骨细胞表面超微结构的改建不同,与 160 mT 的静磁场相比,8、50 mT 的静磁场加载后成骨细胞表面超微结构的改建更明显。我们前期研究[11]显示静磁场加载可以降低成骨细胞内的钙离子浓度,推断静磁场通过作用于成骨细胞细胞膜,造成细胞表面超微结构的改建,导致钙离子通道活性改变,从而引起成骨细胞功能活性的改建。

本研究表明:一定强度的静磁场加载可以促进成骨细胞的增殖活性;静磁场加载虽然对体外培养成骨细胞的形态变化无显著影响,但对成骨细胞的表面超微结构具有改建作用;静磁场可能通过作用于细胞膜表面的超微结构,改变细胞膜上的离子通道活性,从而引起成骨细胞功能活性的改建。关于静磁场加载对成骨细胞功能活性影响的详细机制,尚需进一步的研究。

参考文献:

[1] 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.

[2] 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.

[3] Tuncer C, Uner O. Effects of a magnetic appliance in functional Class Ⅲ patients[J]. Angle Orthod, 2005, 75(5): 768-777.

[4] 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]. 四川生殖卫生学院学报, 2009(1): 29-32.

[5] 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.

[6] 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.

[7] 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.

[8] Kotani H, Kawaguchi H, Shimoaka T, *et al*. Strong static magnetic field stimulates bone formation to a definite orientation *in vitro* and *in vivo*[J]. J Bone Miner Res, 2002, 17(10): 1814-1821.

[9] Dini L, Dwikat M, Panzarini E, *et al*. Morphofunctional study of 12-O-tetradecanoyl-13-phorbol acetate (TPA)-induced differentiation of U937 cells under exposure to a 6 mT static magnetic field[J]. Bioelectromagnetics, 2009, 30(5): 352-364.

[10] 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.

[11] 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.

[12] Terao M, Studer M, Gianni M, *et al*. Isolation and characterization of the mouse liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase gene [J]. Biochem J, 1990, 268(3): 641-648.

[13] 刘莉, 常红, 黄国伟, 等. 体外培养大鼠成骨细胞实验模型的建立[J]. 天津医科大学学报, 2004, 10(1): 39-42.

(收稿:2011-01-30 修回:2011-02-28)

(编辑 吴培红)