·论著·

恒定磁场对骨组织中细胞影响的研究

张小云 张宇

摘要：目的 阐明恒定磁场对成骨细胞和破骨细胞的生长和功能的影响和对骨髓基质细胞向成骨细胞方向分化的作用，从而在细胞水平较全面的解释磁场治疗骨质疏松的机理。**方法** 利用体外原代培养的成骨细胞、破骨细胞和骨髓基质细胞，分别外加0.38 T、0.48 T恒定磁场处理后，观察恒定磁场对这三种细胞生长、分化和功能的影响。**结果** 恒定磁场处理可促进骨髓基质细胞向成骨细胞方向分化，促进成骨细胞的增殖、分化及功能的表达，并且抑制破骨细胞的生长、分化和功能。**结论** 恒定磁场促进骨组织的成骨作用，抑制骨分解，是其治疗骨质疏松良好效果的部分机制。

关键词：恒定磁场；骨髓基质细胞；成骨细胞；破骨细胞；骨质疏松

Effect of permanent-magnetic field on cells in bone *ZHANG Xiaoyun, ZHANG Yu. College of Biotechnology, Microorganism and Gene Engineering Vital Laboratory of Shenzhen University, Shenzhen* 518060, China

Abstract: Objective To investigate the effect of permanent-magnetic field on the growth and function in osteoblast and osteoclast and its effect on bone marrow stromal cells differentiation into osteoblast in order to clarify the therapeutic mechanism of osteoporosis. **Methods** After exposure to 0.38 T and 0.48 T permanent-magnetic field on primary *in vitro* cultured osteoblast, osteoclast and bone marrow stromal cells, the effects of growth, differentiation and functions were observed. **Results** The differentiation of bone marrow stromal cells into osteoblast was promoted by the permanent-magnetic field exposure, and the proliferation, differentiation and function of the osteoblast was also improved, but the growth, differentiation and function of the osteoclast was suppressed. **Conclusions** Permanent-magnetic field could accelerate bone formation and inhibit bone absorption, thus being the partial mechanism for osteoporosis management.

Key words: Permanent-magnet field; Necrosis, femoral head; Marrow stromal cells; Osteoblast; Osteoclast; Osteoporosis

利用磁石来治疗骨折等骨科疾病在我国古代就有记载，磁石始载于《神农本草经》，其味咸，性寒。归肝、心、肾经。具有平肝潜阳、镇惊安神、聪耳明目、强筋补骨的功效。其能流传近千年至今正说明有它存在的道理。由于体外培养的纯破骨细胞体系培养困难，目前国内外研究磁场对骨组织中细胞影响的情况，多集中在对成骨细胞的方面[1]，但骨组织中的成骨细胞和破骨细胞是骨代谢中最重要的两个因素，研究磁场对破骨细胞的作用也相当重要[2]。成骨细胞来源于骨髓的基质细胞，所以磁场对骨髓基质细胞向成骨细胞方向分化的影响也是一个重要的因素[3]。本文正是要磁场对骨髓基质细胞的分化、对成骨细胞和破骨细胞的生长和功能的影响，比较系统的揭示恒定磁场对骨组织中细胞体系的影响。

1 材料和方法

1.1 实验材料与试剂

出生3 d和4～6周内的SPF级KM小鼠（广州中医药大学提供）；牛股骨，在－70℃低温冰箱中保存；新生日本大耳白兔（购自深圳卫武生物制品厂）；α-MEM培养基（Gibco）；胎牛血清、1α-25二羟基维生素D3、胰蛋白酶、苏木素、伊红、抗酒石酸酸性磷酸酯酶TRAP试剂盒和N-2-羟基哌嗪-N-2-乙磺酸（HEPES）均购自Sigma。MTT、茜素红、维生素C、β-甘油磷酸钠、胎牛血清、胰蛋白酶、Ⅱ型胶原酶（Sigma）、碱性磷酸酶（ALP）试剂盒、细胞碱性磷酸酶（CAKP）染液（南京建成生物工程研究所）及Brandford蛋白浓度测定试剂盒（碧云天生物技术公司）。

作者单位：518060 深圳市南山区深圳大学深圳市微生物基因工程重点实验室

通讯作者：张小云，Email：zxy@szu.edu.cn

二氧化碳培养箱(Heraeus, BB 16/BB 5060);倒置相差显微镜(OLYMPUS, BH-2);扫描电子显微镜(S 250 Mk3);LEICA Q 550 IW 图像分析系统(德国,LEICA 公司);酶标仪(BioRad Model 3550,USA)。

实验中采用的恒定磁体为稀土钕铁硼磁钢制成,为立方形 15 cm×15 cm×6 cm,其表面磁场强度分别为 0.38 T 和 0.48 T,培养细胞时培养板可以直接置于磁体上方一同放入培养箱中。

1.2 实验方法

1.2.1 骨髓基质细胞体外分化培养:4~6 周的 SPF 级 KM 小鼠(广州中医药大学提供),无菌条件下取小鼠双侧股骨、胫骨,在 D-Hank's 平衡盐溶液中去净附着在骨表面的软组织及软骨骺,并剪去两端骨骺,以 DMEM 完全培养液用 10 ml 注射器冲洗髓腔,收集细胞,调整细胞密度(1×10^7)接种于培养板中,5% CO_2、37℃的孵育箱内培养,第 3 天轻轻吸出悬浮细胞,更换培养液。

磁场对骨髓基质细胞成骨分化的影响,如上所述分离得到骨髓基质细胞,接种于 48 孔培养板,5% CO_2、37℃的孵育箱内培养,3 d 后吸出悬浮细胞,加入成骨细胞诱导剂并与放于培养箱中的磁体上,每 3 天换液 1 次,培养 10 d,采用反复冻融法对细胞进行裂解,并按照碱性磷酸酶试剂盒操作步骤对细胞裂解液进行碱性磷酸酶的测定[4]。

1.2.2 成骨细胞的体外培养:将新生小鼠断颈处死,无菌条件下,取颅盖骨置于 D-Hank's 液内,清除血管及黏附的结缔组织,然后剪成小块(1 mm×1 mm)。将骨片移入 0.25%胰蛋白酶溶液内,37℃预消化 20 min,离心弃去上清以清除纤维组织。再加入 0.1% Ⅱ型胶原酶,消化 2 次,每次在 37℃振荡消化 60 min。消化液于 4℃、离心 10 min (1000 r/min),所得沉淀物即为成骨细胞。经 D-Hank's 液清洗后,加 α-MEM 全培养液(含 15%胎牛血清、青霉素 100 U/ml、链霉素 100 μg/ml 和 2.5×10^{-2} mol/L HEPES 缓冲溶液)吹打,制成细胞悬液,接种培养瓶培养。第 2 天换液,以后每 3 d 换液 1 次,取第 2 代细胞进行实验。

观察磁场对成骨细胞增殖的影响实验中,细胞以 3×10^4 个/ml 的悬液,接种于 96 孔培养板中,每孔 90 μl,于 37℃,5% CO_2 的培养箱中过夜。然后放入磁场中,培养 44 h 后,加入 5 mg/ml 的四甲基偶氮唑盐(MTT)10 μl,继续培养 4 h。取出培养板,弃去上清加入 100 μl 二甲基亚砜(DMSO),用酶标仪测定 570 nm 处的吸光度 A 值。与空白对照比较计算出增殖率[5]。

磁场对成骨细胞分化影响的实验中,将 3×10^4 个/ml 的细胞悬液接种于 48 孔培养板中,每孔 500 μl,于 37℃,5% CO_2 的培养箱中过夜。放入磁场中,培养 48 h 后,弃去上清液,用 D-hank's 洗 2 次,采用反复冻融法对细胞进行裂解,按照碱性磷酸酶试剂盒及 Brandford 蛋白浓度测定试剂盒操作步骤对细胞裂解液进行碱性磷酸酶和总蛋白的测定[6]。

在矿化结节形成测定中,细胞以 3×10^4 个/ml 密度接种于 48 孔培养板中,每孔 500 μl,于 37℃,5% CO_2 的培养箱中过夜,加入矿化诱导剂并放入磁场中,每 3 d 换液 1 次,于第 8 天用茜素红染色,在 40 倍光学显微镜下作矿化结节计数,结果与对照组比较[7]。

1.2.3 破骨细胞的分离及实验方法:将新生兔断颈处死,无菌条件下取四肢长骨,在 D-Hank 平衡盐溶液中去净附着在骨表面的软组织及软骨骺,然后在 α-MEM 全培养液(含 15%胎牛血清、青霉素 100 U/ml、链霉素 100 μg/ml 的 2.5×10^{-2} mol/L HEPES 缓冲溶液)内,将骨干纵向剖开,轻刮骨髓腔表面至颜色变白,用尖吸管吸取培养液反复冲洗髓腔面,去掉骨片,保留悬液,待用。

取无菌 24 孔培养板,每块加入 1 ml α-MEM 全培养液和一个处理过的骨片或盖玻片,置二氧化碳孵育箱中 1 h,再加入上述分离的破骨细胞悬液,每孔 1 ml,在 5% CO_2、37℃条件下共同培养约 16 h 后,冲掉未附着于骨片或盖玻片的细胞。分别置于 0.38 T、0.48 T 磁场中,然后继续培养至第 7 天。同时用未置于磁场中的实验组做对照。

将新鲜牛股骨用金钢砂片及粗细金钢砂石制备成 6 mm×6 mm,10 μm 厚的骨磨片。超声波清洗器清洗,置入含 1000 U/ml 青霉素和 1 mg/ml 链霉素的 D-Hank 液中浸泡,换液 3 次,每次 20 min,制成骨片备用。

光相差显微镜观察与吸收陷窝的计数中,在不同培养时间,利用 Olympus 倒置光相差显微镜观察培养于盖玻片上破骨细胞的形态及运动情况,并于不同时间取出,进行 HE 染色,Giemsa 染色及 TRAP 染色。观察骨片是否形成吸收陷窝及陷窝的变化,计数每个骨片上形成的吸收陷窝数,同时摄片供图像分析。

图像分析系统计算吸收陷窝的表面积时,将与破骨细胞共培养的骨片摄影(×100),利用 LEICA Q 550 IW 图像分析系统计算每张底片上吸收陷窝的

表面积。

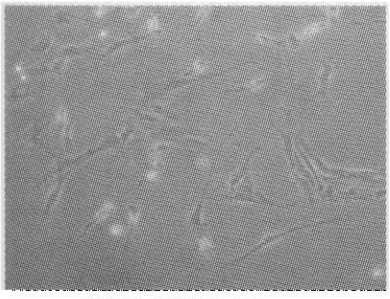
骨吸收陷窝的扫描电镜观察，利用培养期（1周）结束时，骨片浸于0.25 mol/L氨水内超声处理10 min，以除去生长在其表面的细胞，3%戊二醛和1%锇酸固定，酒精系列脱水，二氧化碳临界干燥，喷金，扫描电镜观察吸收陷窝的形态改变[8]。

1.2.4 统计学处理：结果数据用（$\bar{x} \pm s$）表示，采用SPSS 11.0软件进行统计分析，采用 t 检验。

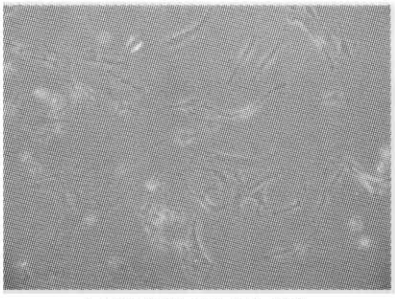
2 结果

骨髓细胞培养到第10天，测定细胞内碱性磷酸酶（ALP）活性，0.38T磁场组略有升高（1206.22 ± 395.74）但较对照组（1110.02 ± 138.86）没有统计学差异（以无磁场为对照组，$P > 0.05$），0.48 T磁场组（1407.12 ± 211.55）则有显著性差异（以无磁场为对照组，$P < 0.01$）。说明0.38 T磁场对骨髓基质细胞向成骨细胞分化影响不大，而0.48 T磁场可以促进骨髓基质细胞的向成骨细胞分化。

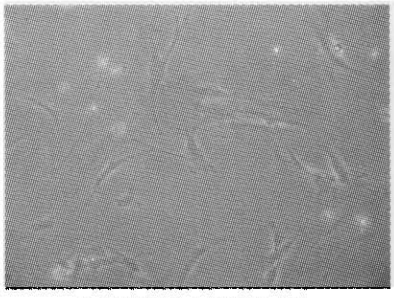
正常成骨细胞形态不规则，多呈三角形，多角形，有较多突起，单核呈卵圆形，胞质丰富，碱性磷酸酶阳性者可见胞浆中出现红至红棕色颗粒。磁场处理后，显微镜下观察，成骨细胞呈三角形、多角形和纺锤形。在有磁场存在的情况下成骨细胞的形态并没有受到影响（图1）。



无磁场成骨细胞形态



0.38 T磁场成骨细胞形态



0.48 T磁场成骨细胞形态

图1 磁场下成骨细胞的形态

从表1中，可见磁场可促进体外培养的原代成骨细胞增殖和成骨细胞分化（以无磁场为对照组，$P < 0.01$）。茜素红染色后矿化结节形成红色结节，肉眼可见盖玻片上均匀分布红色小颗粒，镜下结节多数呈圆形，其中有的内有黑色不透光颗粒堆积，统计其矿化结节数。由表1可知磁场可促进成骨细胞的矿化（以无磁场为对照组，$P < 0.01$）。

表1 磁场对成骨细胞增殖率、成骨细胞分化、矿化结节数的影响

项目	无磁场	0.38 T磁场	0.48 T磁场
成骨细胞 A 值	0.168 ± 0.008	0.203 ± 0.006#	0.211 ± 0.012#
增殖率（%）	0	17.34#	20.54#
ALP活性（U/g prot）	621.20 ± 90.09	768.96 ± 120.29	926.87 ± 146.82#
矿化结节数（个）	10	19*	35#

注：与无磁场对照组比较* $P < 0.05$，# $P < 0.01$

在0.38 T和0.48 T强度的磁场下培养破骨细胞，在连续培养时不能继续生长，外形变不规则，细胞脱壁，胞质空泡化，核固缩，细胞凋亡。也很快凋亡（在0.38 T时要3 d，0.48 T磁场强度下仅2 d多的时间，而正常对照组成骨细胞凋亡要4 d以上的时间）。培养过程中破骨细胞不能形成典型的皱折缘，故吸收骨片能力显著减弱（图2，3）。

磁场对成熟破骨细胞骨吸收陷窝数和吸收陷窝表面积的影响：与对照组比较，陷窝个数在对照组为44.55 ± 6.78，0.48 T组14 ± 4.22，0.38 T组15.55 ± 3.53，$P < 0.01$。陷窝面积在对照组为252700.00 ± 53750.17 mm^2，0.48 T组79800.00 ± 4154.97 mm^2，0.38 T组86961.44 ± 4291.54 mm^2，$P < 0.01$。说明无论0.48 T磁场还是0.38 T磁场均能减少吸收陷窝数目和吸收陷窝的表面积，而且0.48 T磁场的抑制程度要大于0.38 T磁场。

3 讨论

骨质疏松和骨质疏松性骨折作为老年性疾病之一，已成为世界关注的严重社会问题。目前，用于预防和治疗骨质疏松的药物，包括各种钙剂、雌激素和双膦酸盐类都存在不同程度的缺陷，补钙剂虽能补钙，但不能促进骨胶原的合成，而雌激素和双膦酸盐类均有较大的副作用[9]。因此，寻找一种能减少对药物的依赖而且对人体危害少的治疗方法成了研究的热点。本实验的结果表明，磁场促进骨髓基质细胞向成骨细胞方向分化，引起成骨细胞的增殖、细胞碱性磷酸酶的活性增强。可见，磁场是治疗骨质疏松症的有效方法之一，磁场的作用避免了药物直接

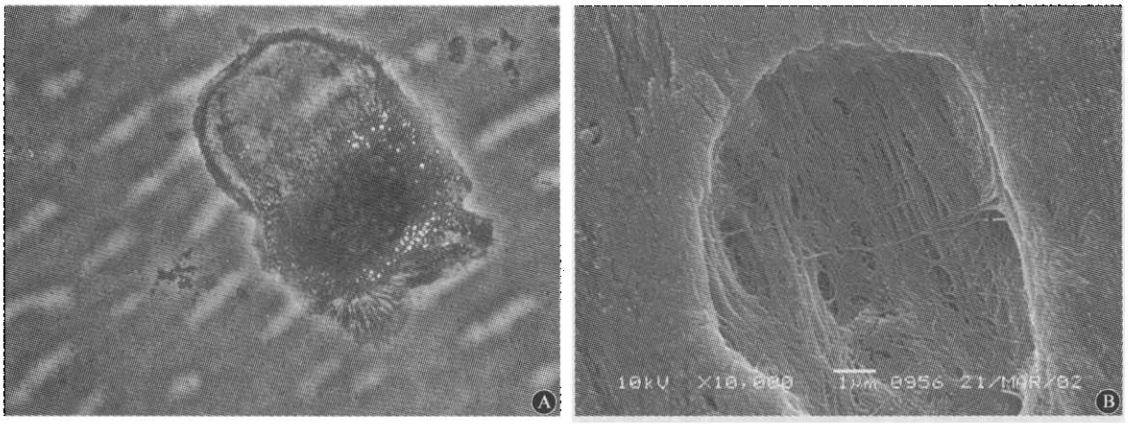


图2 A为非磁场下体外培养的兔破骨细胞,3 d后的细胞有多个核,TRAP染色阳性,有典型的皱折缘;B为破骨细胞吸收骨片后,扫描电镜下所见在光滑的骨片表面形成的小坑

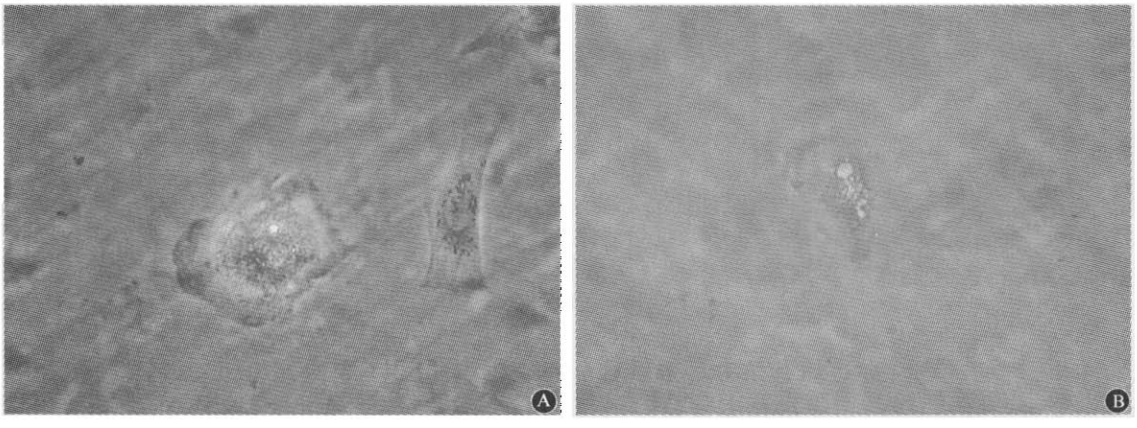


图3 A、B分别为强度0.38 T、0.48 T磁场下体外培养的兔破骨细胞,3 d后均发生细胞变形、空泡化、裙边和伪足消失,但在0.48 T磁场下培养的兔破骨细胞凋亡更加完全;在磁场下破骨细胞已凋亡,不能对骨片进行吸收

作用于体内,而达到治疗的效果。

实验中我们不仅可以看到磁场可以促进骨髓基质细胞向成骨细胞方向分化,而且已经分化的成骨细胞在磁场中,会促进其增殖,但不影响成骨细胞的形态,0.38 T与0.48 T的磁场效果均非常显著,但0.48 T磁场更佳。同样这两种磁场都可以促进体外培养的成骨细胞分化成熟,而且促进体外培养的成骨细胞进行钙化,矿化结节的形成代表了成骨细胞分化成熟、行使成骨功能的阶段,是成骨功能的形态表现。本实验茜素红染色结果显示,磁场的矿化结节数多于无磁场的结节数。由于磁场能促进成骨细胞矿化、促进骨钙化,对于骨折的愈合很有帮助。

同样在磁场下,骨髓基质细胞会向成骨细胞方向分化,成骨细胞的增殖和成熟受到促进作用,而破骨细胞的生长和破骨功能却受到抑制,这是否存在矛盾呢?本文认为关键在于不同的细胞有其特殊的生理结构和状态,故对磁场有不同的反应性。磁场促进成骨细胞增殖、分化已经有许多实验证明,其原因解释为磁场促进了成骨细胞内一些酶的活性和mRNA转录[10]。而对于破骨细胞,强恒磁场能够解聚细胞中的微管系统,在80年代笔者在研究磁场对细胞生长影响时已发现,在1.4 T的磁场能解聚原生动物麦粒赭虫细胞内的微管,而0.6 T的磁场就可解聚小鸡脑内的微管[11]。近期亦有研究证明磁场可以影响达细胞骨架波形蛋白表达,从而影响细胞骨架结构[12]。破骨细胞在自然生长中依靠其皱折缘与骨组织结合,其主要成分是微管、微丝组成的细胞骨架,而微丝的主要成分是肌动蛋白,破骨细胞通过与骨表面相连的足体内的肌动蛋白穿越细胞膜通过黏合蛋白与骨表面黏附,然后细胞极化通过皱折缘把富含H^+和大量溶酶体小泡定向运输到骨组织表面进行骨的吸收[2]。当破骨细胞处于磁场下,磁场解聚微管、微丝,从而抑制了皱折缘的形成,并破坏破骨细胞的极化,丧失了定向分泌富含H^+和

大量溶酶体小泡的能力,破坏破骨细胞极性,使之丧失吸收骨的功能。本实验观察到的是破骨细胞在磁场下培养1 d就能见到具有皱折缘的细胞越来越少,之后细胞不断固缩,直至凋亡。德国的Grimaldi等[13]在其对磁场下淋巴母细胞表面微绒毛的研究中,发现磁场下可使主要成分是肌动蛋白的微绒毛消失,他解释为磁场下细胞局部钙离子浓度增加使肌动蛋白解体。我们的观点是磁场破坏破骨细胞的极性,干扰其中溶酶体定向输运,影响其中微管蛋白排列,解聚微管和微丝结构,这也解释了破骨细胞在磁场下不能形成主要成分是微管和微丝皱折缘的主要原因。

在进行兔破骨细胞体外培养和吸收骨片功能的实验中,可见正常环境下对骨片进行吸收,形成许多小坑的破骨细胞。但经磁场处理后,培养细胞裙边消失,细胞变形并迅速凋亡,因此丧失吸收骨组织的能力,故骨片上吸收小坑显著减少,而且相对强的磁场作用更佳。综上所述,磁场促进骨髓基质细胞向成骨方向分化,促进成骨细胞可以促其增殖和成熟,抑制破骨细胞增殖和功能。但骨代谢中成骨和破骨作用是一个动态平衡的过程,骨质在不断的形成和破坏中完成自己的新陈代谢。所以在磁疗中,无论是对骨质疏松还是骨折愈合,曝磁时间和磁场强度均十分重要,只有找到合适的窗口期,科学合理的使用磁疗,才会达到良好的治疗效果,这正是磁疗的关键所在。

【参考文献】

[1] Qiu LH, Tang XN, Zhong M, et al. Effect of static magnetic field on proliferation and cell cycle of osteoblast cell. Shanghai Kou Qiang Yi Xue, 2004, 13: 469-470.

[2] 郭世绂,罗行正,邱贵兴,主编.骨质疏松基础与临床.天津:天津科学技术出版社,2001.

[3] Erices AA, Allers CI, Conget PA, et al. Human cord blood-derived mesenchymal stem cells home and survive in the marrow of immunodeficient mice after systemic infusion. Cell Transplant, 2003, 12: 555-561.

[4] Gruber R, Kandler B, Holzmann P, et al. Bone marrow stromal cells can provide a local environment that favors migration and formation of tubular structures of endothelial cells. Tissue Eng, 2005, 11(5-6): 896-903.

[5] Zhou HD, Huang QX, Xie H, et al. Proliferation, differentiation, and gene expression profile of osteoblast of patient with spondyloepiphyseal dysplasia tarda with progressive arthropathy. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2005, 85: 1310-1314.

[6] Zhu M, Zhang P, Zhang X, et al. Impacts of osteoclast-like cells cultured on bone wafer and their sub-cellular structures on osteoblast. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2005, 85: 738-742.

[7] Rajamannan NM, Nealis TB, Subramaniam M, et al. Calcified rheumatic valve neoangiogenesis is associated with vascular endothelial growth factor expression and osteoblast-like bone formation. Circulation, 2005, 111: 3296-3301.

[8] 张金超,许善锦,王夔,等. 稀土离子对体外兔成熟破骨细胞骨吸收功能的影响. 科学通报,2003,48:1767-1771.

[9] 黄力,李琳. 原发性骨质疏松症的中西医治疗研究进展. 中国骨质疏松杂志,2005,11(1):112-129.

[10] Zhou J, Li C, Yao G, et al. Gene expression of cytokine receptors in HL60 cells exposed to a 50 Hz magnetic field. Bioelectromagnetics, 2002, 23: 339-346.

[11] 张小云,刘栋,张晓鄂.磁场对细胞生长分裂的影响及其机制的探讨. 中国科学B辑,1989,2:164-168.

[12] 李汉,曾群力,翁瑜,等. 极低频磁场对人乳腺癌细胞蛋白质表达谱的影响. 中国科学C辑 生命科学,2005,35:50-58.

[13] Grimaldi S, Girasole M, Cricenti A. Lymphoblastoid cells exposed to low-frequency magnetic fields: study by atomic force microscopy. Methods Mol Biol, 2004, 242: 323-339.

(收稿日期:2005-08-26)