

DOI:10.3969/j.issn.1005-202X.2024.01.014

医学生物物理

## Ca<sup>2+</sup>在电磁场调控成骨细胞增殖与分化中的作用

张广伟<sup>1</sup>, 梁卓文<sup>2</sup>, 杨治<sup>3</sup>

1. 陕西中医药大学第二临床医学院, 陕西 咸阳 712046; 2. 空军军医大学西京医院骨科, 陕西 西安 710032; 3. 红会医院关节病医院关节翻修病区, 陕西 西安 710054

**【摘要】目的:**从定性和定量的角度探究电磁场(EMF)对成骨细胞内Ca<sup>2+</sup>变化的影响,并试图阐明Ca<sup>2+</sup>在电磁场调控成骨细胞增殖与分化中的作用。**方法:**搭建频率为38.7 Hz,强度为1.5 mT的正弦EMF发生平台,将MC3T3-E1成骨细胞随机分为对照组和实验(EMF)组。EMF组施加EMF干预,每天干预8 h。利用CCK8检测成骨细胞增殖,ALP染色检测成骨细胞分化,Ca<sup>2+</sup>荧光探针和流式细胞仪检测成骨细胞内Ca<sup>2+</sup>浓度。**结果:**CCK8细胞增殖结果显示,EMF干预48、72、96及120 h,可显著促进成骨细胞增殖。ALP染色结果显示EMF干预14 d后,EMF组ALP表达显著高于对照组。Ca<sup>2+</sup>荧光探针及流式细胞仪检测Ca<sup>2+</sup>浓度结果显示EMF干预可促进成骨细胞内Ca<sup>2+</sup>的增多。**结论:**EMF上调成骨细胞内Ca<sup>2+</sup>信号可能与EMF促成骨细胞增殖和分化密切相关,但是哪些与Ca<sup>2+</sup>相关的生物信号通路参与了EMF促成骨细胞增殖和分化效应,有待进一步研究。

**【关键词】**电磁场;成骨细胞;钙离子;细胞增殖;细胞分化

**【中图分类号】**R318

**【文献标志码】**A

**【文章编号】**1005-202X(2024)01-0095-06

### Role of Ca<sup>2+</sup> in electromagnetic field regulation on osteoblast proliferation and differentiation

ZHANG Guangwei<sup>1</sup>, LIANG Zhuowen<sup>2</sup>, YANG Zhi<sup>3</sup>

1. The Second Clinical Medical College of Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China; 2. Department of Orthopedics, Xijing Hospital, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China; 3. Joint Revision Unit, Arthritis Hospital, Honghui Hospital, Xi'an 710054, China

**Abstract: Objective** To explore the effects of electromagnetic field (EMF) on the change of Ca<sup>2+</sup> in osteoblast from the qualitative and quantitative perspectives, and try to identify the role of Ca<sup>2+</sup> in EMF regulation on osteoblast proliferation and differentiation. **Methods** A platform was established for generating sine EMF with a frequency of 38.7 Hz and a strength of 1.5 mT. The MC3T3-E1 osteoblasts were randomly divided into control group and experimental group (EMF intervention for 8 h per day). CCK8 was used to detect osteoblast proliferation, ALP staining to detect osteoblast differentiation, and Ca<sup>2+</sup> fluorescence probes and flow cytometer to detect the Ca<sup>2+</sup> concentration in osteoblasts. **Results** CCK8 result showed that EMF intervention for 48, 72, 96 and 120 h could significantly promote osteoblast proliferation. After 14 days of EMF intervention, the positive expression of ALP was significantly higher in EMF group than in control group. Ca<sup>2+</sup> fluorescent staining and flow cytometry results revealed that EMF intervention could increase the Ca<sup>2+</sup> in osteoblasts. **Conclusion** The EMF-induced upregulation of Ca<sup>2+</sup> signal in osteoblasts may be closely related to the promotions of osteoblast proliferation and differentiation by EMF, but which Ca<sup>2+</sup>-related biosignaling pathways are involved in the EMF promoting osteoblast proliferation and differentiation remains to be further investigated.

**Keywords:** electromagnetic field; osteoblast; calcium ion; cell proliferation; cell differentiation

### 前言

**【收稿日期】**2023-09-08

**【基金项目】**国家自然科学基金(51907197)

**【作者简介】**张广伟, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向: 关节修复, E-mail: zgw803@qq.com

**【通信作者】**杨治, 博士, 主任医师, 研究方向: 股骨头坏死, E-mail: 382913402@qq.com

电磁场(Electromagnetic Fields, EMF)作为一种非侵入性物理因子,自Bassett等<sup>[1]</sup>首次报道EMF可加速骨折愈合以来,EMF成为研究热点,近年来EMF的积极生物效应在伤口修复<sup>[2-3]</sup>、骨愈合<sup>[4-5]</sup>和神经再生<sup>[6-7]</sup>中得到证实。然而关于其机理却尚未阐明。

Ca<sup>2+</sup>作为细胞内重要的第二信使,参与了许多生理功能的调节。诸多研究报道了EMF干预可改变细胞内游离的Ca<sup>2+</sup>稳态。Bertagna等<sup>[8]</sup>报道了EMF可促进人

胚胎肾细胞 HEK293 细胞  $\text{Ca}^{2+}$  内流。Golbach 等<sup>[9]</sup> 研究认为低频 EFM 会影响体外培养细胞的  $\text{Ca}^{2+}$  稳态。Wei 等<sup>[10]</sup> 发现 EMF 通过激活 HSP70 热休克蛋白来改善  $\text{Ca}^{2+}$  的稳态,从而保护心脏,减轻缺氧心肌细胞的损伤。Liburdy 等<sup>[11]</sup> 也曾报道 60 Hz EMF 可以增加胸腺淋巴细胞中丝裂原激活信号转导过程中的  $\text{Ca}^{2+}$  内流。Lindstrom 等<sup>[12]</sup> 发现静止的 Jurkat E6.1 细胞暴露于 50 Hz 的 EMF 下,诱导  $\text{Ca}^{2+}$  振荡上调,认为其作用机制是存在靶蛋白可以上调细胞内  $\text{Ca}^{2+}$ ,并促进细胞增殖。

虽然诸多文献报道了 EMF 与细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  稳态的相关性,但是这些研究侧重于神经内分泌系统和免疫系统的细胞,而对于 EMF 是否影响成骨细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  稳态的研究较少。因而,本研究拟通过  $\text{Ca}^{2+}$  荧光探针、成像型流式细胞技术,从定性和定量的角度探究 EMF 对成骨细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  变化的影响。并试图探明  $\text{Ca}^{2+}$  在 EMF 调控成骨细胞增殖与分化中的作用。

1 材料和方法

1.1 细胞、试剂及设备

小鼠成骨细胞系 MC3T3-E1 (中乔新舟, 中国),

MEM- $\alpha$  培养基 (Gbico, USA), 胎牛血清 (中乔新舟, 中国), 青霉素链霉素混合液 (Gbico, USA), 碱性磷酸酶 (ALP) 染色试剂盒 (Beyotime, 中国), 4% 多聚甲醛固定液 (Beyotime, 中国), 0.25% 胰蛋白酶 (Gbico, USA), CCK8 (Cell Counting Kit-8) 细胞增殖检测试剂盒 (Boster, 中国), 磷酸盐缓冲液 (PBS, Boster, 中国), Fluo-3/AM 钙离子荧光探针试剂盒 (Solarbio, 中国), 二氧化碳培养箱 (Thermo fisher, USA), 成像型流式细胞仪 (Luminex, USA), 荧光显微镜 (Zessi, USA), 酶标仪 Gen5 (BioTek, USA)。

1.2 EMF 发生装置

EMF 发生装置由 3 部分组成 (图 1a): 波形发生器 (鼎阳 SDG2082X, 中国), 高性能功率放大器 (Aigtek-ATA309, 中国), 亥姆霍兹线圈 (上海天端磁电-HLY10-20, 中国)。电磁场的信号发生器生成幅度为 3 Vp-p, 频率为 38.7 Hz 的正弦波 (图 1b), 通过功率放大器驱动放置于二氧化碳培养箱内的半径为 100 mm 的亥姆霍兹线圈 (匝数为 153), 产生强度为 1.4 mT (有效值) 的电磁场 (图 1c)。EMF 发生装置效果图如图 1d 所示。实物图如图 1e 所示。

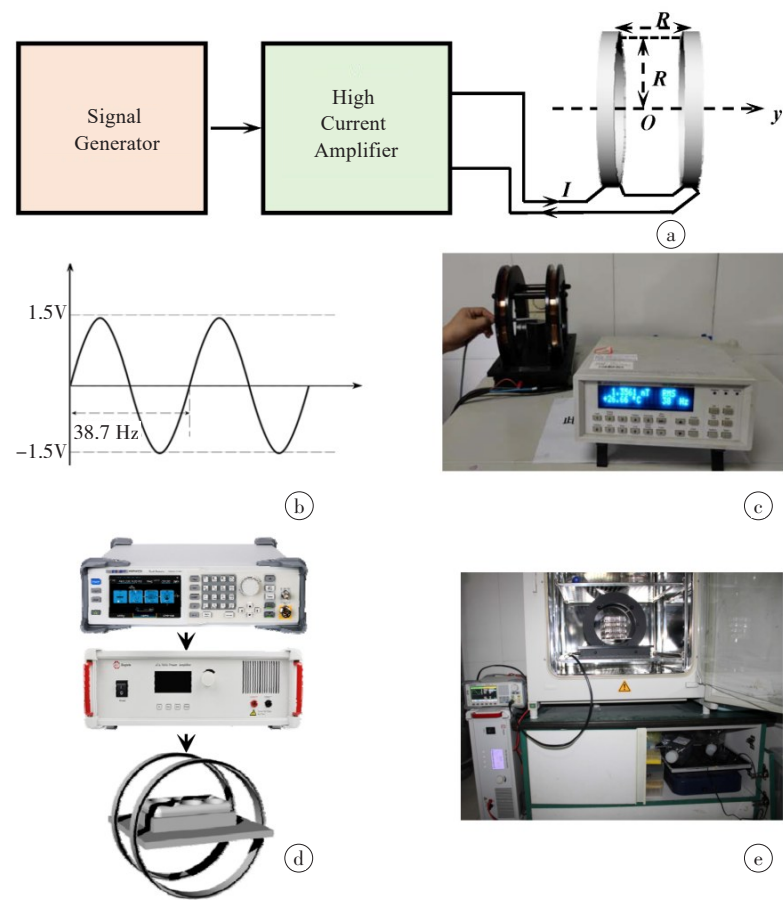


图1 EMF 发生装置

Figure 1 EMF generator

a: EMF 系统的原理框图, 该设备由 3 个主要部分组成: 信号发生器、高性能功放和亥姆霍兹线圈; b: 信号发生器开路电压信号; c: EMF 强度测量结果; d: EMF 发生装置效果图; e: EMF 发生装置实物图

1.3 分组设计

将接种的细胞随机分为对照组和实验(EMF)组。EMF组施加 38.7 Hz, 场强 1.4 mT 的正弦 EMF 干预, 每天干预 8 h。对照组在同等条件下未施加 EMF 干预。

1.4 细胞增殖检测

CCK8 检测细胞增殖。将细胞数以 5×10<sup>3</sup> 个/μL 的密度种植在 96 孔板。两组细胞分别在培养 24、48、72、96、120 h 后, 弃去培养基, 用 PBS 洗涤两次, 加入含有 10% CCK8 的无血清培养基放入 37 °C 的 CO<sub>2</sub> 孵箱进行孵育 2 h 后, 用酶标仪测量各孔光密度(OD)值。

1.5 细胞分化检测

ALP 染色检测成骨细胞的分化成熟, 成骨细胞接种于 6 孔板, 待细胞贴壁后 EMF 分别干预 7 和 14 d, 弃培养基, PBS 洗涤两次, 每孔加入 300 μL 的 4% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗涤 3 次, 加入配制好的 ALP 染色工作液, 室温避光孵育 30 min, PBS 适当洗涤, 保留适当 PBS 溶液, 放置显微镜下观察拍照。

1.6 Ca<sup>2+</sup> 荧光探针检测

成骨细胞接种于 6 孔板, EMF 干预 3 d 后, PBS 洗涤, 加入现配的浓度为 0.5 nmol/L, 比例 1:1 的 Fluo-3AM 和 Pluronocs F-127 混合工作液 150 μL, 37 °C 的条件下孵育 20 min 后, 加入 5 倍体积的含 1% 胎牛血清的 4-羟乙基哌秦乙硫磺酸(HEPES)再次孵育 40 min (37 °C), 用 HEPES 洗涤后, 再次孵育 10 min, 加入 4', 6-二脒基-2 苯基吲哚(DAPI)复染 1 min, 吸弃 DAPI 染色液, 加入 PBS 适当洗涤, 保留适量 PBS, 在荧光显微镜下进行观察拍照。

1.7 流式细胞仪检测 Ca<sup>2+</sup> 浓度

6 孔板培养成骨细胞, EMF 干预 3 d 后, 0.25% 胰酶消化分离细胞, 细胞悬液离心 1 000 r/min, 5 min, 弃上清, 加 PBS 重悬, 离心后弃上清液, 重复 3 次。配制 Fluo-3/AM 荧光探针工作液, 6 孔培养板每孔加入 500 μL 的工作液, 37 °C 孵育 20 min, 加入 5 倍体积的含有 1% 胎牛血清(FBS)的 HBSS 液(2.5 mL), 继续孵育 40 min, 用 HEPES 液洗涤细胞 3 次, 再次用 HEPES 液重悬细胞制成 1×10<sup>5</sup> 的溶液。使用成像型流式细胞仪检测两组成骨细胞内 Ca<sup>2+</sup> 单色荧光强度, IDESA 6.2 分析软件分析两组细胞 Ca<sup>2+</sup> 荧光强度。

1.8 统计学分析

计量数据用均值±标准差表示, 采用 Graphpad Prism 9 对数据进行非配对 *t* 检验, *P*<0.05 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CCK8 细胞增殖检测

两组细胞 OD 值随干预时间的变化如图 2 所示。干预 24 h 后, EMF 组 OD 值与对照组无统计学差异。

干预 48、72、96 及 120 h 后, EMF 组 OD 值高于对照组 (*P*<0.05)。表明 EMF 干预在 48、72、96 及 120 h, 可显著促进成骨细胞增殖。

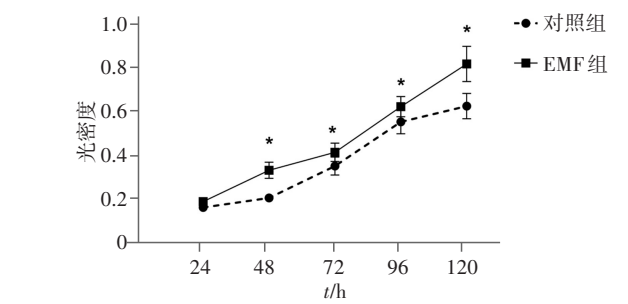


图2 对照组及 EMF 组光密度值随干预时间的变化(\**P*<0.05)  
Figure 2 Variation of optical density (OD) with intervention time in control and EMF groups (\**P*<0.05)

2.2 ALP 细胞分化检测

两组细胞干预 7 和 14 d 后 ALP 染色结果如图 3 所示。蓝紫色表明 ALP 表达阳性。EMF 干预 7 d 后, EMF 组 ALP 表达稍高于对照组。EMF 干预 14 d 后, EMF 组 ALP 表达显著高于对照组。ALP 染色结果表明, EMF 可促进成骨细胞分化。

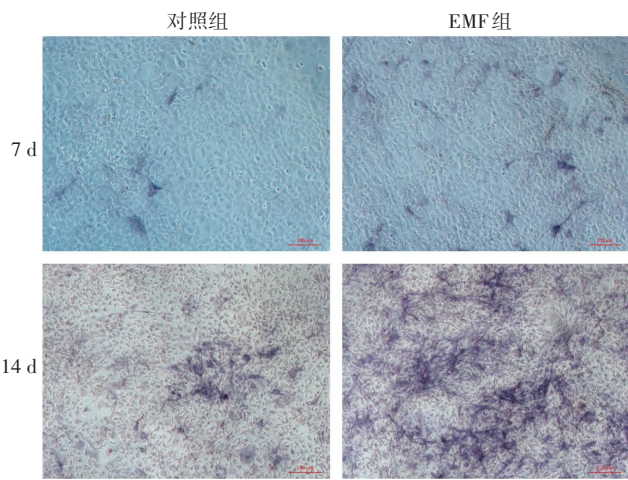


图3 对照组及 EMF 组细胞在干预 7 和 14 d 后 ALP 染色结果(比例尺: 100 μm)  
Figure 3 Results of ALP staining in control and EMF groups after 7 and 14 days of intervention (scale bar: 100 μm)

2.3 Ca<sup>2+</sup> 荧光探针检测

两组细胞干预 3 d 后, Ca<sup>2+</sup> 荧光染色结果如图 4 所示。绿色荧光指示细胞质内游离的 Ca<sup>2+</sup>。蓝色荧光指示 DAPI 复染的细胞核。染色结果显示 EMF 组 Ca<sup>2+</sup> 绿色荧光强于对照组。表明 EMF 干预可促进成骨细胞内游离 Ca<sup>2+</sup> 增多。



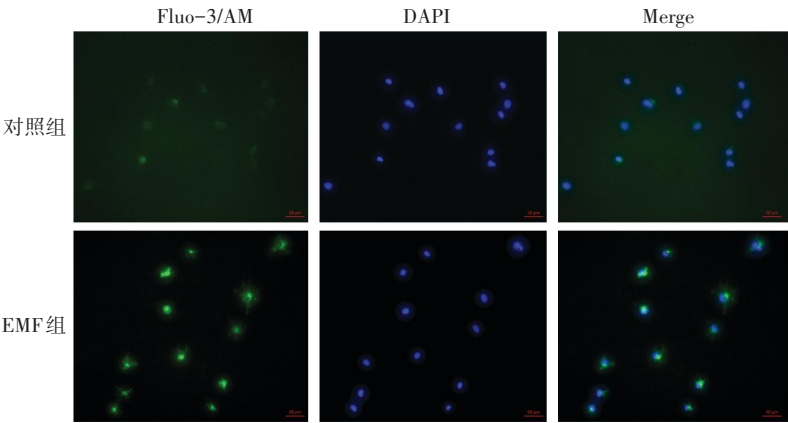


图4 对照组及EMF组细胞在干预3 d后Ca<sup>2+</sup>荧光染色结果(比例尺:50 μm)

Figure 4 Results of Ca<sup>2+</sup> fluorescence staining in control and EMF groups after 3 days of intervention (scale bar: 50 μm)

Fluo-3/AM:Ca<sup>2+</sup>荧光染色图,DAPI:细胞核染色图,Merge:Ca<sup>2+</sup>荧光染色和细胞核染色合成图

2.4 流式细胞仪检测Ca<sup>2+</sup>浓度

两组细胞干预3 d后,经流式细胞仪采集3 000个单细胞荧光强度,得到的Ca<sup>2+</sup>荧光强度图和Ca<sup>2+</sup>荧光强度统计结果如图5所示。形态学结果显示,EMF组Ca<sup>2+</sup>荧光强度高于对照组(图5a)。经统计学分析两组细胞Ca<sup>2+</sup>荧光强度,结果显示EMF组Ca<sup>2+</sup>荧光强度显著高于对照组( $P<0.05$ )。表明EMF干预可促进成骨细胞内游离Ca<sup>2+</sup>的增多。

3 讨论

本研究选择频率为38.7 Hz的正弦EMF,根据离子回旋共振方程 $f_c = qB/2\pi m$ ( $f_c$ 是离子回旋频率, $q$ 是离子电荷, $B$ 是地磁场强度, $m$ 是离子质量), $B$ 为30~70 μT,可计算出Ca<sup>2+</sup>的共振频率是38.7 Hz<sup>[13-15]</sup>。本研究发现利用该参数的正弦EMF可促进成骨细胞的增殖和分化,这与Galli等<sup>[16]</sup>报道的正弦EMF可促进成骨细胞的增殖和分化结果相一致。

此外,本研究利用Ca<sup>2+</sup>荧光探针、成像型流式细胞技术,从定性和定量的两个角度均发现EMF(38.7 Hz,1.5 mT)可促进成骨细胞内游离Ca<sup>2+</sup>的增多这一实验现象。Zhang等<sup>[17]</sup>通过对成骨细胞实时加载EMF(50 Hz,0.8 mT)用荧光显微镜进行检测,通过对图像的光密度分析后,观察到实时加载EMF的成骨细胞内Ca<sup>2+</sup>明显上调,该研究结果与本文研究结果一致。此外,Chen等<sup>[18]</sup>报道了16 Hz脉冲电磁场可促进人源间充质基质细胞(SCP-1)Ca<sup>2+</sup>内流,Spadaro等<sup>[19]</sup>也发现脉冲电磁场(PEMF)可上调细胞内Ca<sup>2+</sup>浓度。Tong等<sup>[20]</sup>在研究中也报道了PEMF通过增强细胞内钙瞬变来影响成骨细胞的增殖和分

化。Raouf等<sup>[21]</sup>报道在磁性纳米材料和EMF的干预下钙通道基因的mRNA表达增高,同时也从侧面验证了细胞内钙离子增多的现象。上述研究结果表明EMF促进成骨细胞增殖和分化与EMF上调细胞内Ca<sup>2+</sup>密切相关。但是哪些Ca<sup>2+</sup>相关的生物信号通路参与了EMF促成骨细胞增殖和分化效应,尚有待进一步研究。

细胞内游离的Ca<sup>2+</sup>作为第二信使,是细胞功能和存活的基础,它与多条信号通路密切相关,部分研究者从信号通路方面对EMF的生物效应机理进行解释。例如非经典Wnt/Ca<sup>2+</sup>通路中的非经典Wnt配体(Wnt-5a)可通过激活NLK,形成复合抑制体,通过组蛋白H3-K9的甲基化使PPAR-γ的功能失活,起到促成骨作用<sup>[22-23]</sup>,Wnt/Ca<sup>2+</sup>信号通路被认为是发育过程中的一个重要介质。此外,Ras信号通路作为Ca<sup>2+</sup>依赖的信号通路,在成骨细胞增殖和分化中发挥作用<sup>[24-25]</sup>。Ca<sup>2+</sup>与这些通路相互交织,共同维持了细胞生存和功能,对Ca<sup>2+</sup>相关信号通路的深入研究能更好地探明EMF生物效应机理。

4 结论

本研究搭建了频率为38.7 Hz,强度为1.5 mT的正弦EMF发生平台,利用该参数EMF干预MC3T3-E1成骨细胞,发现这一参数的EMF可促进成骨细胞的增殖和分化,同时也发现了EMF干预可促进成骨细胞内游离Ca<sup>2+</sup>的增多。结果表明,EMF上调成骨细胞内Ca<sup>2+</sup>信号可能与EMF促成骨细胞增殖和分化密切相关,但是哪些Ca<sup>2+</sup>相关的生物信号通路参与了EMF促成骨细胞增殖和分化效应,尚有待进一步研究。

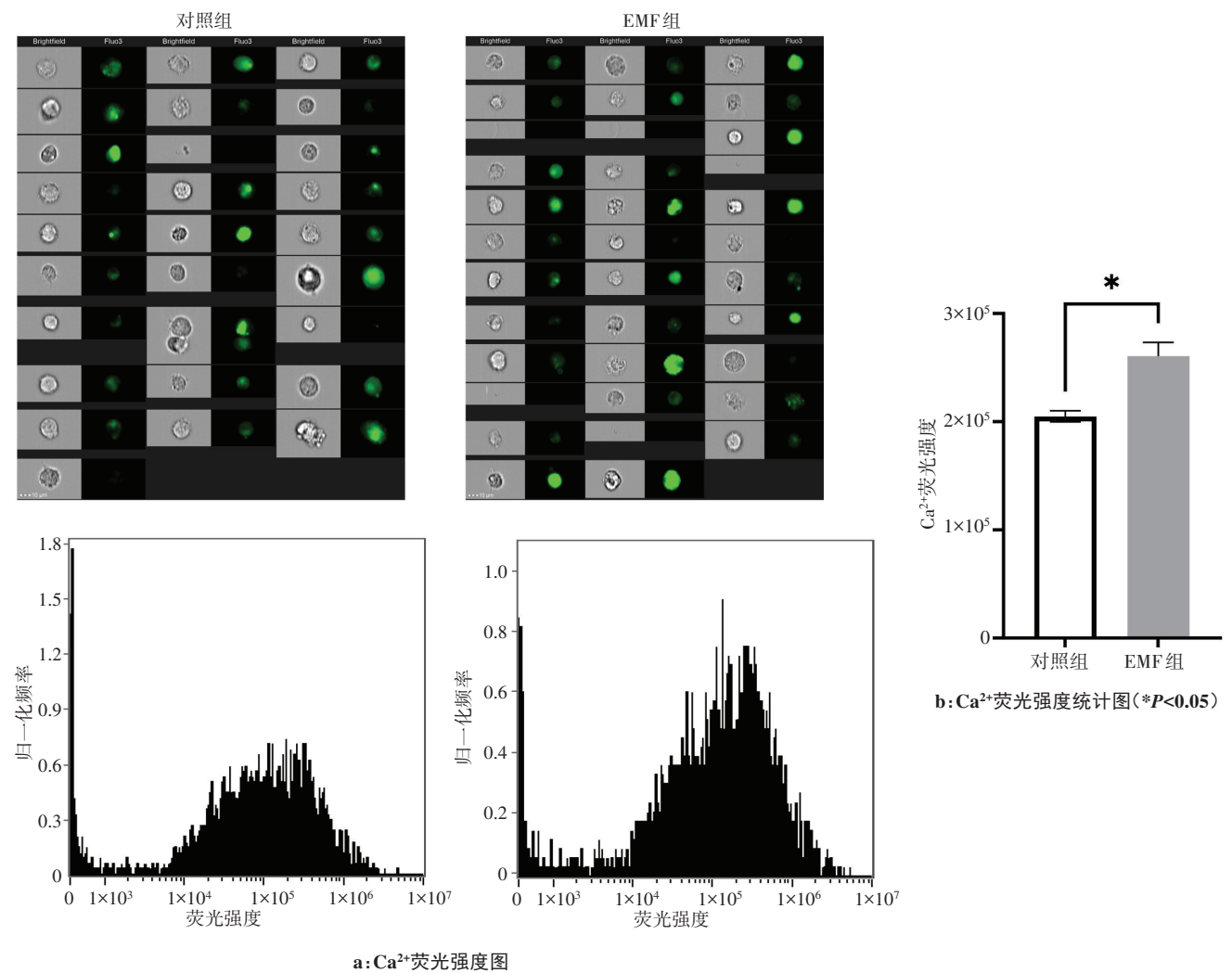


图5 对照组及EMF组流式细胞仪检测  $\text{Ca}^{2+}$ 浓度结果  
Figure 5 Results of  $\text{Ca}^{2+}$  concentration detected by flow cytometer in control and EMF groups

【参考文献】

[1] Bassett CA, Pawluk RJ, Pilla AA. Augmentation of bone repair by inductively coupled electromagnetic fields[J]. Science, 1974, 184 (4136): 575-577.

[2] Zanotti F, Trentini M, Zanolla I, et al. Playing with biophysics: how a symphony of different electromagnetic fields acts to reduce the inflammation in diabetic derived cells[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(2): 1754.

[3] Patruno A, Ferrone A, Costantini E, et al. Extremely low-frequency electromagnetic fields accelerates wound healing modulating MMP-9 and inflammatory cytokines[J]. Cell Prolif, 2018, 51(2): e12432.

[4] Zhao HQ, Liu CX, Liu Y, et al. Harnessing electromagnetic fields to assist bone tissue engineering[J]. Stem Cell Res Ther, 2023, 14(1): 7.

[5] Wang W, Li WK, Song MY, et al. Effects of electromagnetic fields on the metabolism of lubricin of rat chondrocytes[J]. Connect Tissue Res, 2016, 57(2): 152-160.

[6] Hosseini E, Kianifard D. Effect of prenatal stress and extremely low-frequency electromagnetic fields on anxiety-like behavior in female rats: with an emphasis on prefrontal cortex and hippocampus[J]. Brain Behav, 2023, 13(4): e2949.

[7] Cho H, Seo YK, Yoon HH, et al. Neural stimulation on human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by extremely low frequency electromagnetic fields[J]. Biotechnol Prog, 2012, 28(5): 1329-1335.

[8] Bertagna F, Lewis R, Silva S, et al. Thapsigargin blocks electromagnetic field-elicited intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  increase in HEK 293 cells[J]. Physiol Rep, 2022, 10(9): e15189.

[9] Golbach LA, Portelli LA, Savelkoul HF, et al. Calcium homeostasis and low-frequency magnetic and electric field exposure: a systematic review and meta-analysis of in vitro studies[J]. Environ Int, 2016, 92-93: 695-706.

[10] Wei JH, Tong J, Yu LY, et al. EMF protects cardiomyocytes against hypoxia-induced injury via heat shock protein 70 activation[J]. Chem Biol Interact, 2016, 248: 8-17.

[11] Liburdy RP. Calcium signaling in lymphocytes and ELF fields. Evidence for an electric field metric and a site of interaction involving the calcium ion channel[J]. FEBS Lett, 1992, 301(1): 53-59.

[12] Lindstrom E, Lindstrom P, Berglund A, et al. Intracellular calcium oscillations in a T-cell line after exposure to extremely-low-frequency magnetic fields with variable frequencies and flux densities[J]. Bioelectromagnetics, 1995, 16(1): 41-47.

[13] 雷涛. 不同频段电磁场对卵巢摘除小鼠骨质疏松影响的体内外实验研究[D]. 西安: 中国人民解放军空军军医大学, 2018.

Lei T. *In vitro* and *in vivo* studies on the effects of electromagnetic fields with different frequency spectrum bands on ovariectomized osteoporosis in mice[D]. Xi'an: The Air Force Military Medical University, 2018.

[14] Durney CH, Rushforth CK, Anderson AA. Resonant ac-dc magnetic fields: calculated response[J]. Bioelectromagnetics, 1988, 9(4): 315-336.

[15] Liboff AR. Geomagnetic cyclotron resonance in living cells[J]. J Biol Phys, 1985, 13(4): 99-102.

[16] Galli C, Colangelo M, Pedrazzi G, et al. The Response of osteoblasts and bone to sinusoidal electromagnetic fields: insights from the

- Literature[J]. *Calcif Tissue Int*, 2019, 105(2): 127-147.
- [17] Zhang X, Liu XL, Pan LT, et al. Magnetic fields at extremely low-frequency (50 Hz, 0.8 mT) can induce the uptake of intracellular calcium levels in osteoblasts[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 396(3): 662-666.
- [18] Chen Y, Braun BJ, Menger MM, et al. Intermittent exposure to a 16 Hz extremely low frequency pulsed electromagnetic field promotes osteogenesis *in vitro* through activating Piezo 1-Induced  $\text{Ca}^{2+}$  influx in osteoprogenitor cells[J]. *J Funct Biomater*, 2023, 14(3): 165.
- [19] Spadaro JA, Bergstrom WH. *In vivo* and *in vitro* effects of a pulsed electromagnetic field on net calcium flux in rat calvarial bone[J]. *Calcif Tissue Int*, 2002, 70(6): 496-502.
- [20] Tong J, Sun LJ, Zhu B, et al. Pulsed electromagnetic fields promote the proliferation and differentiation of osteoblasts by reinforcing intracellular calcium transients[J]. *Bioelectromagnetics*, 2017, 38(7): 541-549.
- [21] Raouf A, Seth A. Discovery of osteoblast-associated genes using cDNA microarrays[J]. *Bone*, 2002, 30(3): 463-471.
- [22] Zhou S, Greenberger JS, Epperly MW, et al. Age-related intrinsic changes in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts[J]. *Aging Cell*, 2008, 7(3): 335-343.
- [23] Di Bartolomeo L, Vaccaro F, Irrera N, et al. Wnt signaling pathways: from inflammation to non-melanoma skin cancers[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(2): 1575.
- [24] Keiper M, Stope MB, Szatkowski D, et al. Epac- and  $\text{Ca}^{2+}$ -controlled activation of Ras and extracellular signal-regulated kinases by Gs-coupled receptors[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(45): 46497-46508.
- [25] Xu H, Wang WT, Liu X, et al. Targeting strategies for bone diseases: signaling pathways and clinical studies[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 202.

(编辑:薛泽玲)