

· 论 著 ·

静磁场作用下骨骼肌细胞形态学变化的研究*

王丽艳¹, 许艳华^{2△}, 林 珠³

(1. 广东省佛山市第二人民医院口腔科 528000; 2. 昆明医学院口腔医院正畸科 630031;

3. 第四军医大学口腔医学院正畸科, 西安 710002)

摘要:目的 研究静磁场对大鼠面颌骨骼肌细胞生长形态的影响以及细胞数量的变化。方法 将传代培养的 SD 大鼠面颌骨骼肌细胞分别加磁, 强度为 180、280、360 mT, 作用时间为 12、36、60 h, 照相记录观察细胞形态的变化。结果 180 mT 和 280 mT 磁场强度对细胞有明显的促增值作用, 细胞形态正常; 360 mT 的磁场强度在 36 h 之内对细胞的增值作用较明显, 作用至 60 h 时, 部分细胞发生坏死, 细胞形态由梭形变成无规则的悬浮细胞。结论 静磁场对大鼠面颌骨骼肌细胞具有明显的促进增值作用, 且细胞的损伤程度与磁场强度和作用时间成正相关关系。

关键词:静磁场; 骨骼肌细胞; 形态学; 细胞培养技术

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.04.003

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)04-0320-02

Study of morphological changes in rats maxillofacial skeletal muscle cells after exposed in static magnetic fields*

Wang Liyan¹, Xu Yanhua^{2△}, Lin Zhu³

(1. Department of Stomatology, Second People's Hospital of Foshan, Guangzhou 528000, China; 2. Department of Orthodontics, School of Stomatology, Kunming Medical College, Kunming 630031, China; 3. Department of Orthodontics, School of Stomatology, Forth Military Medical University, Xian 710002, China)

Abstract: Objective To observe the morphological and numerary changes of skeletal muscle cells after exposed different density SMF (static magnetic fields). **Methods** The cultured skeletal muscle cells were exposed in the static magnetic fields for 12, 36, 60 h respectively. The skeletal muscle cell morphological changes were observed by taking photo. **Results** In 180mT group and 280mT group, cells significantly increased; In 360 mT group, cells grown a good condition before 36 h, but in 60 h, cells apoptosis was obviously observed. **Conclusion** Static magnetic fields intensity can promote cell proliferation in certain range, but high-intensity magnetic field (> 360 mT) maybe is harmful to tissue health.

Key words: static magnetic fields; skeletal muscle cells; morphological; cell culture techniques

细胞形态的变化和功能活动是密切相关的, 也是所有研究的基础。增殖是生物最根本的生命活动, 是个体生长和生命延续的基本保证。在正常情况下, 细胞遵循一定的细胞周期进行增殖。外界环境条件的刺激会引起细胞周期的变化, 从而使细胞增殖行为发生改变, 甚至凋亡^[1]。

骨骼肌细胞是功能运动的基础, 在正畸临床功能矫治中尤为重要。关于磁场对细胞的增殖情况研究很多, 结果也不完全相同, 但是磁场对骨骼肌细胞影响的研究却少见报道, 尤其是通过磁场强度计算确定大小的磁力对骨骼肌细胞的影响方面的研究国内外少见报道。

本研究通过不同强度的静磁场照射大鼠面颌骨骼肌细胞后, 显微镜下观察细胞形态上的变化, 探索静磁场对骨骼肌细胞的影响, 为口腔正畸临床磁力功能矫治提供生物安全依据。

1 材料与方 法

1.1 细胞选择 新生 2~3 d 龄 SD 大鼠的颌面部咬肌中分离骨骼肌组织进行原代培养。当原代培养的 SD 大鼠面颌肌细胞生长形成单层, 铺满培养瓶 80% 以上时, 超静工作台无菌条件下传代。选第 4 代传代培养的 SD 大鼠面颌骨骼肌细胞按 1×10^4 /mL 的密度传代至 25 mL 的培养瓶中, 共 4 瓶, 其中 1 瓶设为对照组, 其余 3 瓶设为实验组。放入 37 °C、5% 的 CO₂

含量、饱和湿度的恒温培养箱中培养 12 h、全部贴壁生长后, 加磁照相观察。

1.2 方 法

1.2.1 细胞分组 对照组: 细胞正常放入恒温培养箱中培养, 不加磁, 分别于 12、36、60 h 照相比较。磁场作用组: 细胞加磁强度分别为 180、280、360 mT, 每组分别于 12、36、60 h 照相观察。

1.2.2 磁场作用的肌细胞培养系统的建立 磁性材料为第 3 代高能稀土永磁体钕铁硼 (NdFeB) N33, 将 2 块钕铁硼磁块的 N 极与 S 极对置, 分别固定于特制的木箱相对的内侧面, 培养瓶位于磁极中间, 使磁力线垂直通过培养瓶, 通过设计不同高度的箱调整 2 块钕铁硼永磁体之间的间隙大小来获得不同的磁场强度, 磁块的大小为 10 mm × 50 mm × 100 mm, 与培养瓶的大小基本一致, 以保证培养板上的细胞均匀受到磁场的作用, 见图 1。

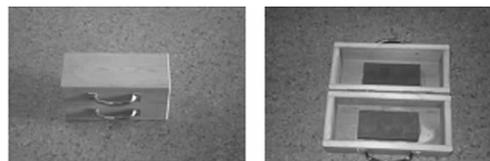


图 1 骨骼肌细胞的加磁设计

1.2.3 磁场强度的计算^[2]

$$F_{repel} = F_{attract} = \frac{1.5}{1+aLg} \times \left(\frac{Bg}{4865}\right)^2 \times Ag$$

a:修正系数,通常取 a=3~5,间隙大时取大值,间隙小时取小值。Lg:两块钕铁硼永磁体之间的间隙值。Bg:永磁体的磁化强度;Ag:永磁体的磁极面积;F:500g 力值(4.9N)。

该公式适用于永磁体结合面之间并非零间隙状态时的情况,考虑了永磁体内磁阻和外部空间漏磁因素的影响,通过公式可以计算出培养皿中的肌细胞所受的磁力值。

根据正畸临床常用的 500 g 力为计算标准^[3],通过以上公式计算得出,磁块的充磁强度为 282 mT,也根据这个计算结果,设磁场的主要研究值为 280 mT,同时分别各设大于 360 mT 和小于 180 mT 的磁场强度值各一个。

2 结 果

在倒置显微镜下观察,未加磁细胞生长情况良好,细胞随着时间的推移,数量也渐渐增加,到第 5 天,已长满瓶底,但即使不传代培养,细胞也不见变性、坏死,直至 12 d 以后,甚至 15 d,才见细胞出现纤维化(封 2 图 2)。加磁 180 mT 组的细胞在 12 h 生长情况和未加磁组在细胞数量上没有明显区别,加磁至 36 h 细胞密度明显增加,占据瓶底的 70%,60 h 已经达到生长高峰,长满瓶底,但未见有细胞变性坏死(封 2 图 3)。加磁 280 mT 组细胞在 12 h 较对照组数量上略有增加,但不明显,加磁 36 h 细胞数量增加明显,已基本长满瓶底,加磁至 60 h 时细胞大部分状态良好,但少数细胞出现变性,有个别坏死细胞出现(封 2 图 4)。加磁 360 mT 组细胞在 12 h 细胞数量与对照组相比有所增加,36 h 时细胞数量增加非常明显,达到高峰,几乎长满瓶底,细胞状态良好,但加磁至 60 h 时可见细胞大部分坏死,从贴壁生长的梭形细胞变成悬浮于培养基中的失去骨骼肌细胞形态的坏死细胞(封 2 图 5)。

细胞加磁后与未加磁细胞相比,细胞数目增加明显:对照组细胞 36 h 和 60 h 时间组增长比率分别是 17% 和 44%;在 12 h 时间组各磁场强度组细胞增长的比率分别为 11%、73% 和 86%;在 36 h 时间组各磁场强度组细胞增长的比率分别为 81%、105% 和 115%;在 60 h 时间组各磁场强度组细胞增长的比率分别为 80%、108% 和 116%,见表 1。

表 1 静磁场作用前后细胞数量变化的比较

时间	对照组	180 mT 组	280 mT 组	360 mT 组
12 h	2.75 × 10 ⁴	3.04 × 10 ⁴	4.77 × 10 ⁴	5.12 × 10 ⁴
36 h	3.24 × 10 ⁴	5.88 × 10 ⁴	6.65 × 10 ⁴	6.98 × 10 ⁴
60 h	3.96 × 10 ⁴	7.11 × 10 ⁴	8.23 × 10 ⁴	8.54 × 10 ⁴

在骨骼肌细胞形态方面,12 h 和 36 h 组细胞均以梭形或纺锤形为主,少数细胞呈多角形,有突起;排列出现方向性,呈长轴平行排列,细胞和细胞之间出现细胞融合现象。60 h 加磁 180 mT 细胞形态依然以梭形为主,未见坏死细胞;60 h 加磁 280 mT 细胞形态大部分正常形态,少见坏死细胞;60 h 加磁 360 mT 细胞全部坏死为不规则状,已由贴壁细胞变为悬浮细胞。

3 讨 论

3.1 加力装置 永磁体磁场的磁力来自于一块或几块不等的

永磁铁,它不需要额外供能,体积较小,操作简单,在最近国内外关于磁场对生物组织影响的相关研究中,永磁体磁场应用越来越多。

在本研究中,采用 2 块和 25 mL 培养瓶大小基本一致的永磁铁(10 mm × 50 mm × 100 mm),模拟正畸临床磁铁的应用原理^[4],使细胞均匀受磁铁产生的排斥力(排斥力=吸引力),并通过调节加磁装置的高度,调节力的大小。与以往研究中仅仅使实验对象受磁场的照射不同,本研究通过计算公式清楚地计算出磁场作用下,细胞所受磁力的大小。

3.2 细胞的增值变化 在以往的研究中,对于磁场能够促进细胞的增殖还是抑制其生长,实验结果差异较大,说法也各不相同。仇丽鸿等^[5]研究不同磁场强度的静磁场对 Wister 大鼠颅骨成骨细胞的作用,结果出现不同程度的促增殖作用;陈文芳等^[6]对人白血病细胞 K562 经 T 磁场处理后,细胞活力差异无统计学意义;杨凌等^[7]将人牙周膜成纤维细胞持续加载静磁场后,细胞周期无明确的影响。此结果与其他研究结果相一致^[8-9]。

但国外学者 Kotani 等^[10]研究 8T 强静磁场作用于鼠成骨细胞 60 h,结果显示细胞的增殖未受到抑制。Linder 等^[11]曾将人牙周膜成纤维细胞进行体外培养,发现受静磁场刺激之细胞数目明显地低于未暴露于磁场下的控制组。

本研究中经磁场作用的骨骼肌细胞在 180 mT 时促进细胞的生长,且随暴露时间的增加细胞数量增加明显(由 11% 增加到 80%),280 mT 的磁场强度对细胞的增殖作用更加明显,但随作用时间的延长可见大部分细胞生长状态良好,提示在小于 280 mT 强度范围内的静磁场对骨骼肌细胞具有明显的促增殖作用(81%~115%),一定强度范围内的磁场(<280 mT)在临床应用是安全的,其对细胞的作用在细胞可承受的范围内。360 mT 的磁场在 36 h 之内对细胞有非常明显的促进增殖作用(80%~116%),但在 60 h 时细胞大部分死亡。提示大于 360 mT 强度的静磁场照射超过 36 h,对细胞的损害已经超过细胞本身的代偿能力,造成细胞的坏死^[12-13]。因此,强磁场对组织细胞损伤很大,不建议正畸临床应用。

参考文献:

[1] Zhao N, Xu Y, Chen Y, et al. Effects of class III magnetic orthodontic forces on the craniofacial sutures of rhesus monkeys[J]. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 2008, 133(3): 401-409.

[2] 赵凤桐, 王淑文. 永磁体间作用力的计算[J]. 吉林工业大学学报, 1991, 12(1): 9-13.

[3] 傅民魁. 口腔正畸学[M]. 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2007.

[4] 王丽艳, 许艳华, 林珠. 颌间 III 类矫形力对青春期恒河猴颌骨长度变化的影响[J]. 上海口腔医学, 2001, 9(5): 390-393.

[5] 仇丽鸿, 秦科, 钟鸣, 等. 静磁声对牙周炎大鼠牙周膜组织中骨形成蛋白-2 影响的实验研究[J]. 华西口腔医学杂志, 2005, 23(4): 319-321.

[6] 陈文芳, 齐浩, 孙润广. 稳恒磁场对人白(下转第 324 页)

中图像的内部点的配准融合是一个连续的过程,由于受试者为健康志愿者,不同于 HIFU 治疗的患者,故是在清醒状态下进行的图像配准,配准过程中必然受到呼吸的影响,虽然可通过嘱受试者保持正常呼气末屏气来配合实验,由结果可知,一幅图像中的内部点往往不止一个,而不同切面也可以找到不同的内部点,所以由 3 点确定一个平面,加上平面外一点即可确定一个体的数学公式,可以推断出最少只要确定了 4 个内部点,就可以确定配准的肝脏。

本实验采用点法,应用自行开发的融合软件在图像融合装置上实现对 10 名健康志愿者的肝脏内部点的配准,配准精度达到 5 mm 以内,可以满足 HIFU 治疗对精度的要求。

参考文献:

- [1] 李成祥,姚陈果,米彦,等.物理消融肿瘤的研究进展[J].生物医学工程学杂志,2009(5):1137-1140.
- [2] 董宝玮,梁萍.肿瘤热消融治疗:现状和展望[J].中华医学杂志,2006,86(12):793-796.
- [3] 于天骅,刘静.最新低温治疗技术的研究进展及其评价[J].中国医疗器械杂志,2004,28(5):350-355.
- [4] 李就宏,辛育龄,史伟,等.电化学治疗高龄晚期肺癌 80 例临床效果[J].医药产业资讯,2005,3(14):216-217.
- [5] 罗述谦.医学图像配准技术[J].中国图像图形学报,2000,5(7):73-76.
- [6] Zaidi H,Marie-Louise M,Alavi A. The clinical role of fusion imaging using PET,CT, and MR imaging[J]. Magn Reson Imaging Clin North Am,2010,18(1):133-149.
- [7] Zu WQ. Issues in clinical applications of high intensity focused ultrasound (HIFU) [J]. Curr Med Imaging Rev, 2010,6(3):136-144.
- [8] Rove KO,Sullivan KF,Crawford ED. High-intensity focused ultrasound: ready for primetime [J]. Urol Clin North Am,2010,37(1):27-35.
- [9] Mine Y,Kiharat,Obata H,et al. Registration of 4D-ultra-

sound volumes using a volume similarity index based on mutual information for multiple small regions [J]. Med Imaging Technol,2010,28(4):279-291

- [10] Vincent D,Jerome T,Jocelyne T,et al. An information fusion method for the automatic delineation of the bone-soft tissues interface in ultrasound Images [J]. Lect Notes Comput Sci,2004(3117):218-229.
- [11] Huang X,Nicholas A,Hill J,et al. Dynamic 3D ultrasound and MR image registration of the beating heart [J]. Lect Notes Comput Sci,2005(3750):171-178.
- [12] Wein W,Roper B,Navab N. Automatic registration and fusion of ultrasound with CT for radiotherapy [J]. Med Image Comput Assist Interv Int Conf Med Image Comput Assist Interv,2005,8(2):303-311.
- [13] Fuller DB,Jin H,Kozioł JA,et al. CT-ultrasound fusion prostate brachytherapy: a dynamic dosimetry feedback and improvement method. A report of 54 consecutive cases [J]. Brachytherapy,2005,4(3):207-216.
- [14] Li X,Dawant BM,Welch EB,et al. A nonrigid registration algorithm for longitudinal breast MR images and the analysis of breast tumor response [J]. Magn Reson Imaging,2009,27(9):1258-1270.
- [15] 王昌军. 异机图像融合技术在临床中的应用 [J]. 中国医疗设备,2010,25(4):112-113.
- [16] 赵永明,肖昌炎,陈亚珠. 多模态图像配准在 HIFU 定位系统中的应用 [J]. 北京生物医学工程,2004,23(4):246-250.
- [17] 赵永明,肖昌炎,孙俊喜,等. 多模态图像配准技术在 HIFU 手术中的应用 [J]. 生物医学工程学杂志,2004,21(6):935-938.

(收稿日期:2011-01-09 修回日期:2011-05-22)

(上接第 321 页)

- 血病细胞 K562 生长抑制作用研究初所 [J]. 西安文理学院学报,2005,8(1):11-14.
- [7] 杨凌,巢永烈,杜莉. 磁性附着体模拟静磁声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.
- [8] Nakahara Y,Agnchi H,Yoshida M,et al. Effects of exposure of CHO-K1 cells to a 10-T static magnetic field [J]. Radiology,2002,224(3):817-822.
- [9] Wiskirchen J,Gronewaler E,Heinzelmann F,et al. Human fetal hmg fibroblasts in vitro study of repetitive magnetic field exposure at 0.2,1.0, and 1.5 T [J]. Radiology,2000,215(G):858-862.
- [10] Kotani H,Kawaguchi H,Shimoaka T,et al. Strong static magnetic field stimulates bone formation to a definite ori-

entation in vitro and in vivo [J]. J Bone Min Res,2002,17(10):1814-1811.

- [11] Linder A,Forsberg CM,Rygh P,et al. Tissue response to Biocompatibility of new clinically used and recy space closure in monkeys: a comparison of orthodontic magnets and clod orthodontic sam arium-cob-altmagnet [J]. Eur J Orthod,1996,18(6):581-588.
- [12] Rizzuto R,Pinton P,Ferrari D,et al. Calcium and apoptosis: facts and hypotheses [J]. Oncogene,2003,22(53):8619-8627.
- [13] Cheng H,Wang SQ. Calcium signaling between sarcolemmal calcium channels and ryanodine receptors in heart cells [J]. Front Biosci,2002,1(7):1867-1878.

(收稿日期:2011-05-20 修回日期:2011-08-30)