

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.01.015

不同处理时间 50 Hz 3.6 mT 正弦交变磁场
对人脐带干细胞增殖与成骨性分化的研究周 建, 葛宝丰, 王家琪, 陈克明, 朱瑞清
(兰州军区兰州总医院骨科研究所, 兰州 730050)

【摘 要】目的: 研究 50 Hz 3.6 mT 不同处理时间的正弦交变电磁场(Sinusoidal electromagnetic field, SEMFs)对体外培养人脐带干细胞(Human umbilical cord stem cells, HUCSC)增殖与成骨性分化的影响。方法: 体外分离培养 HUCSC, 传代后随机分为 6 组。用频率 50 Hz, 3.6 mT 的 SEMFs 分别每天处理 HUCSC 0.0(对照组)、0.5、1.0、1.5、2.0 h 和 2.5 h, 倒置相差显微镜观察细胞形态, MTT 法测定细胞增殖, 在磁场处理后的 15 d 和 17 d 分别用茜素红和 vonkossa 对钙化结节进行染色, 在磁场处理后的第 4 天和第 6 天 PCR 检测胶原 I (Collagen-I) 和骨形态发生蛋白(Bone morphogenetic protein-2, BMP-2)mRNA 表达量的变化, 在磁场处理后的 10、12、14 d 和 16 d 测定 ALP 活性。结果: 1.0、1.5、2.0 h 和 2.5 h 组促进 HUCSC 增殖; 磁场处理后的 7~9 d 细胞出现钙化结节; 在 SEMFs 处理后的第 14 天和第 16 天 0.5 h 组和 1.0 h 组碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, ALP)活性显著高于对照; SEMFs 处理组能增加 HUCSC 钙化面积, 其中尤以 0.5 h 和 1.0 h 最为明显; SEMFs 能增加 Collagen-I 和 BMP-2 mRNA 表达量, 其中尤以 0.5 h 和 1.0 h 组作用最为明显。结论: 50 Hz, 3.6 mT 1.0、1.5、2.0 h 和 2.5 h 促进 HUCSC 增殖, 同时 SEMFs 组能促进体外培养 HUCSC 成骨性分化, 尤以处理 0.5 h 和 1.0 h 促进成骨性分化最为明显。

【关键词】人脐带干细胞; 增殖; 分化; 正弦交变电磁场

【中国图书分类法分类号】R318.08

【文献标志码】A

【收稿日期】2011-08-05

Effects of different durations of 50 Hz 3.6 mT sinusoidal electromagnetic field
on proliferation and differentiation of human umbilical cord stem cells in vitro

ZHOU Jian, GE Baofeng, WANG Jiaqi, CHEN Keming, ZHU Ruiqing

(Institute of Orthopaedics, Lanzhou General Hospital of PLA)

【Abstract】Objective: To investigate the effects of different durations of 50 Hz 3.6 mT sinusoidal electromagnetic fields (SEMFs) on the proliferation and differentiation of human umbilical cord stem cells (HUCSCs) in vitro. Methods: The HUCSCs were isolated from the neonate umbilical cord and randomly divided into 6 groups after one passage. The treatment groups were under 50 Hz 3.6 mT SEMFs respectively for 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 h, and 2.5 h each day, while the control group underwent no SEMFs treatment. All groups were observed under the contrast phase microscope each day. The proliferation was tested by MTT. At 15 d and 17 d after the SEMFs treatment the calcified nodules were stained by alizarin red and vonkossa respectively. At 4 d and 6 d after the SEMFs treatment the Collagen-I and BMP-2 mRNA were tested by real time PCR. At 10, 12, 14 d, and 16 d after the SEMFs treatment the ALP activity was tested. Results: the SEMFs were arranged in spiral appearance 7~9 d after the treatment. The SEMFs promoted the proliferation of HUCSCs, except in 0.5 h group. The ALP activity in 0.5 h and 1.0 h groups significantly increased at 14 d and 16 d after the SEMFs treatment. The calcified nodules number in 0.5 h and 1.0 h groups significantly increased after the SEMFs treatment. The Collagen-I and BMP-2 mRNA expression in 0.5 h and 1.0 h groups significantly increased after the SEMFs treatment. Conclusion: 1.0, 1.5, 2.0 h, and 2.5 h treatment of 50 Hz 3.6 mT SEMFs promoted the proliferation of HUCSC, 0.5 h and 1.0 h treatment of 50 Hz 3.6 mT SEMFs significantly enhanced the osteogenesis differentiation of human umbilical cord.

【Key words】human umbilical cord stem cells; proliferation; differentiation; sinusoidal electromagnetic fields

骨质疏松造成的骨痛长期以来一直影响着人们的生活质量, 一些研究者发现低频率电磁场可治疗和预防骨质疏松^[1], 因此有关电磁场生物效应有了大量体外和体内研究实验, 通

作者介绍: 周 建(1981-), 男, 硕士,

研究方向: 生物电磁治疗骨质疏松的相关研究。

通信作者: 陈克明, 男, 研究员, Email: chkeming@yahoo.com.cn。

过临床骨质疏松资料和实验动物模型研究发现电磁场能增加骨质疏松病人和实验模型动物骨密度^[2]。但骨质疏松症机制研究尚不是太清楚, 同时在电磁场治疗参数选择上存在很大的分歧。有文献报道磁场与体外培养细胞之间存在非线性“窗口效应”, 非线性效应窗口与磁场频率、振幅以及细胞在磁场中处理时间、细胞的代数和种类等有关^[3,4]。文献报道^[5]及

本实验室研究发现 50 Hz、1.8 mT 和 3.6 mT 正弦交变磁场是促进体外培养大鼠成骨细胞的成熟矿化 2 个强度效应窗口。也有文献发现低频率低强度电磁场促进大鼠骨髓间充质干细胞碱性磷酸酶 (Alkaline phosphatase, ALP) 活性增加和钙盐沉积量^[6]。但有关电磁场对人脐带干细胞 (Human umbilical cord stem cells, HUCSC) 的时间效应研究尚不多见, 因此本实验观测了 50 Hz 3.6 mT 的不同处理时间正弦交变电磁场 (Sinusoidal electromagnetic field, SEMFs) 对体外 HUCSC 增殖与分化的影响, 以期能为骨质疏松的研究提供一些实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 新生胎儿脐带 (兰州军区兰州总医院产房); 胎牛血清 (FBS, 兰州民海生物公司); DMEM/F12 培养基、胰蛋白酶 (Gibco 公司, 美国); 地塞米松、磷酸化抗坏血酸、 β -磷酸甘油钠、青霉素、链霉素、胰蛋白酶 (Sigma 公司, 美国)、茜素红 (上海生工); ALP 试剂盒 (南京建成)、酶标仪 (Bio, Model 550); RNAiso Reagent kit、TakaRa Prime Script™ SYBR® Pre-mix Ex Taq™ II PCR 扩增试剂盒 (大连宝生物公司)。

1.1.2 磁场发生仪 实验所用磁场发生仪由本实验组与兰州理工大学共同研制, 线圈内径为 180 mm, 频率、磁感应强度均精确可调。磁感应信号经计算机控制程序 (图 1A) 产生后, 经过信号放大器 (图 1B) 放大后传入磁场线圈 (图 1C)。经中国人民解放军兰州军区医学计量测试研究站测定表明, 磁场发生仪运行期间磁场环境均匀稳定, 报告编号: 医计磁字 ccqd-2008-01。仪器经紫外线照射消毒后放入细胞培养箱内, 由导线与外部控制装置相连。实验期间培养箱内温度, 控制在 $37^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 。

1.2 方法

1.2.1 细胞分离培养 从手术台取正常足月健康婴儿脐带组织 (根据医院规定并经家属同意), 浸泡于 DMEM/F₁₂ 中。超净台内取出脐带, PBS 洗涤残留血液, 去除脐静脉、脐动脉及脐带外膜, 剥离 Wharton 胶, 并将其剪碎至 1 mm^3 大小组织块。将组织块移至 0.1% 的 II 胶原酶中, 加入少许 DMEM/F₁₂, 37°C 消化, 直至 Wharton 胶全部消化。收集消化液加入培养基终止消化, 收集到的细胞悬液过 200 目的细胞筛过滤, $1\ 000\text{ r/min}$ 离心 10 min, 弃上清液, 用含 10% FBS 的 DMEM/F₁₂

(葡萄糖含量 4.5 g/L 以上、谷氨酰胺 2 mmol/L)^[7]。培养基重悬浮细胞, 在 37°C 、5% CO_2 培养箱内培养。细胞贴壁后, 第 3 天首次换液, 以后每 3 d 换液 1 次。倒置相差显微镜下观察细胞形态。细胞达 70%~80% 融合后, 用 0.1% 的胰酶消化传代, 续扩增培养。

1.2.2 细胞分组与磁场处理 将第 1 代传代细胞 (P_1) 调整浓度 3×10^4 个/ml 接种于 35 mm 培养皿, 随机分为 6 组, 0.0 (对照)、0.5、1.0、1.5、2.0 h 和 2.5 h 组。

1.3 细胞增殖分析

P_1 代细胞接种 12 h 后按照分组对其进行磁场处理。第一磁场处理 72 h 后换含 0.5% MTT 的无血清培养基继续培养 4 h, 弃培养液, 加入 DMSO 摇床震荡 10 min, 待紫色结晶沉淀彻底溶解后于 570 nm 波长测定 A 值。

1.4 成骨性分化分析

将 P_1 代细胞接种于 35 mm 培养皿, 每 3 d 换液 1 次, 待细胞 70%~80% 融合成片时加入成骨性诱导剂 (50 mg/L 磷酸化抗坏血酸、10 mmol/L β -甘油磷酸钠和 1×10^{-8} mol/L 的地塞米松), 按照分组对其进行磁场处理。

1.4.1 ALP 活性测定 在磁场第 10、12、14 天和 16 天分别测定各组 ALP 活性, ALP 活性测定按试剂盒说明书操作, 每组分别按缓冲液: 基质液=1:1 加入充分摇匀; 然后 37°C 水浴 15 min, 加入 3 倍于基质液显色液, 充分混匀显色后, 测定 507 nm 处 A 值, 换算成金氏单位。

1.4.2 成骨性分化钙化结节染色鉴定 磁场处理至第 15 天, 弃培养液, PBS 漂洗 2 遍, 加入 10% 福尔马林固定 10 min, 弃固定液, 加入 pH 8.9、0.1% 的茜素红染色液, 37°C 水浴 1 h, 流水冲洗, 换固定液照相记录结果。照相后采用 Ipp (Image-Pro Plus 6.0) 灰度分析软件, 扫描钙化结节染色区域的面积应用公式: 培养皿的面积 $\times$ (钙化结节染色区域扫描面积/照片中皿的扫描面积)^[8]。磁场处理后第 17 天, 弃培养液, PBS 漂洗 2 遍, 加入 10% 福尔马林固定 10 min, 弃固定液, 加入新配置 5% 的硝酸银, 紫外灯下照 1 h, 流水冲洗后, 加入硫代硫酸钠还原, 换固定液照相记录结果。照相后采用 Ipp (Image-Pro Plus 6.0) 灰度分析软件, 扫描钙化结节染色区域的面积应用公式: 培养皿的面积 $\times$ (钙化结节染色区域扫描面积/照片中皿的扫描面积)。

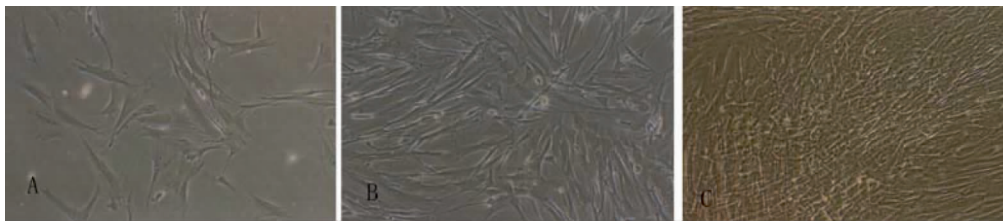
1.4.3 ALP 组织化学染色 磁场暴露处理至第 13 天时进行耦氮耦合染色。方法同参考文献[9], 待出现紫色斑点后停止染色, 观察记录结果, 数据结果分析; 照相后采用 Ipp (Image-Pro Plus 6.0) 灰度分析软件, 扫描 ALP 染色区域的面积应用



磁场线圈部分安装于 5% CO_2 、 37°C 以及完全饱和湿度的培养箱中, 培养皿可放置于线圈中进行磁场处理

图 1 磁场发生仪主要组成

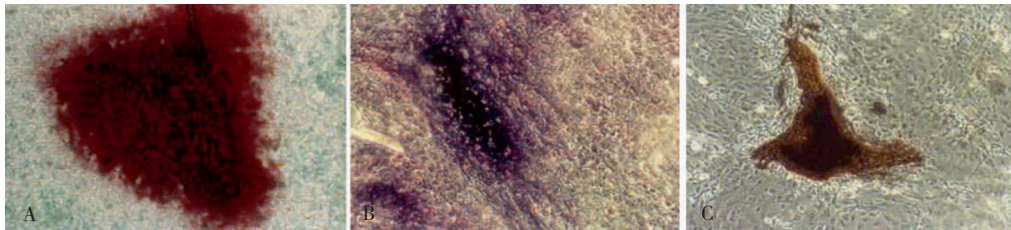
Fig.1 The main consisted of SEMFs device



脐带间充质干细胞形态 (100×) 倒置相差显微镜。A. 传代细胞接种 48 h; B. 接种 4 d; C. 接种 8 d

图 2 脐带干细胞形态

Fig.2 The morphology of HUCSC



脐带脐带干细胞成骨性分化染色鉴定: A. 茜素红染色鉴定; B. ALP 染色鉴定; C. vonkossa 染色

图 3 脐带脐带干细胞成骨性分化染色鉴定

Fig.3 The HUCSC differentiation tested assays

公式: 培养皿的面积×(碱性磷酸酶染色区域扫描面积/照片中皿的扫描面积)。

1.4.4 基因表达水平分析 Total RNA 提取: P₁ 代细胞在第一次磁场处理后第 4 天和第 6 天后弃培养液, 加入无酶 PBS 漂洗 2 次, 加入 1 ml RNAiso Reagent Kit 裂解细胞, 收集裂解液后加入 200 μ l 氯仿 4℃ 13 500 r/min 离心 15 min, 取上清液加入等体积的异丙醇冰上静置 15 min, 4℃ 13 500 r/min 离心 15 min 弃上清液, 75% 乙醇重悬沉淀 4℃ 13 500 r/min 离心 5 min, 弃上清后 -70℃ 保存, 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性, 在 A₂₆₀ nm、A₂₈₀ nm、A₃₂₀ nm、A₂₃₀ nm 测定 A 值, 调整 Total RNA 的浓度。

逆转录: 使用 TakaRa Prime Script™ reagent Kit (TakaRa Code: DRR037A) 反转录试剂盒合成反转录出第一条 cDNA 链。反应体系: 5×Prime Script™ Buffer 4 μ l, Prime Script™ RT Enzyme Mix I 1.0 μ l, Oligo dT Primer (50 μ m) 1.0 μ l, Random 6 Primer (100 μ m) 1.0 μ l, Total RNA 10 μ l (1 000 ng) 补 RNase Free 水至 20 μ l。37℃ 反应 15 min, 85℃ 5 s, -20℃ 保存。

引物设计: 根据实验要求, 在 GenBank 查询所需要基因目的序列的 mRNA 序列, 后由宝生物 (大连) 公司根据实验要求设计并合成。Collagen-I: NG_007405, 上游 5'-tgtgcac-caattgaaggac-3', 下游 5'-cgcatattat tgagtacctg-3' 产物长度 187 bp; BMP-2: NM_001200.2 上游 5'-agactgcgcggcgccgac-3', 下游 5'-agccagccgagccaactg-3', 产物长度 178 bp; GAPDH: NG_007073.2 上游 5'-ggttctgggctggctaagac-3', 下游 5'-gca-gaaagtacaggaggttc-3', 产物长度 143 bp。

PCR 检测: 按照 Applied Biosystems 公司 7300 仪器操作说明进行实验。其中 PCR 反应体系 20 μ l, 包括 SYBR® Premix Ex Taq™ II (2×) 10 μ l, PCR Forward Primer (10 μ m) 0.8 μ l Reverse Primer (10 μ m) 0.8 μ l, ROX reference Dye or Dye II (50×) 0.4 μ l, cDNA 模板 2 μ l (50 ng/ μ l), 补 RNase Free 水至 20 μ l。PCR 反应条件: 两步法反应条件 95℃ 预变性 30 s; 94℃

变性 5 s, 退火 31 s, 40 个循环; Real-time RT-PCR 数据分析处理采用 $\Delta\Delta C_t$ 处理数据, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示数据的结果。

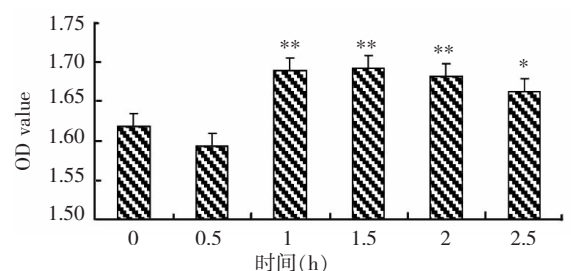
2 结果

2.1 HUCSC 形态

原代培养至 7 d 可见细胞数量开始增多, 细胞形态为长而扁平的梭形, 为典型的成纤维细胞形态。培养至 10 d 左右细胞汇合达到 90% 左右, 细胞呈极性排列, 集落。细胞传代后, 贴壁速度加快, 生长迅速; 48 h 后, 贴壁的细胞间可见有细胞集落形成, 细胞大多呈长梭形, 细胞核较大, 数量也逐渐增多 (图 2A); 3~4 d 后首次换液 (图 2B), 5~8 d 左右细胞便铺满皿底, 融合成片, 细胞排列较整齐, 分布较均匀 (图 2C), 生长较一致, 杂细胞相对已较少。15 d 茜素红染色鉴定 (图 3A), 13 d ALP 组织化学染色鉴定 (图 3B)。

2.2 细胞增殖分析结果

图 4 为 SEMFs 对 HUCSC 增殖影响的 MTT 测定结果, 1.0、1.5、2 h 和 2.5 h 促进 HUCSC 增殖, 0.5 h 无显著作用。



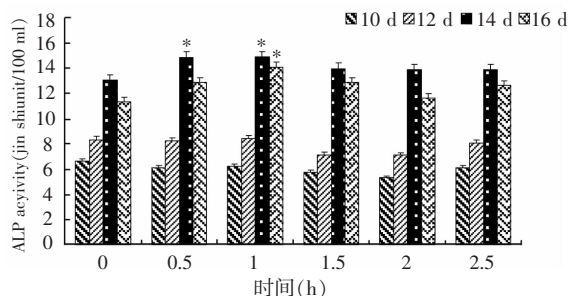
MTT 测定电磁场对 HUCSC 增殖影响, 1.0、1.5、2 h 和 2.5 h 组 SEMFs 促进 HUCSC 增殖。 $\bar{x} \pm s$, $n=6$; **, $P<0.01$ 与对照组相比; *, $P<0.05$ 与对照组相比

图 4 HUCSC 增殖分析

Fig.4 The osteoblast Proliferation assay by MTT

2.3 ALP 活性测定结果

图 5 为 SEMFs 对 HUCSC ALP 活性影响的测定结果,在 SEMFs 处理 14 d,0.5 h 和 1.0 h 组促进 ALP 活性($P<0.05$),16 d,0.5 h 组显著增加 ALP 的活性。其他组无显著作用。



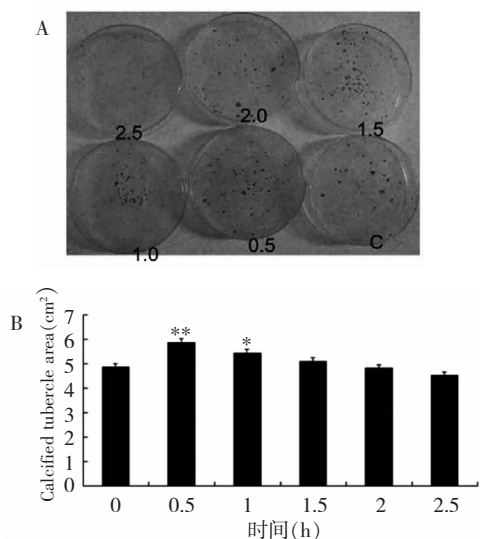
ALP活性测定结果。用 ALP 活性测定试剂盒在 SEMFs 处理 HUCSC 10、12、14 d 和 16 d 后测定 ALP 活性。 $\bar{x} \pm s, n=6$; *, $P<0.05$ 与对照组相比

图 5 ALP 活性分析

Fig.5 The ALP activity

2.4 钙化结节染色结果

图 6 为 SEMFs 对 HUCSC 钙化面积的影响,0.5 h 和 1 h 组均显著增加 HUCSC 钙化面积($P<0.01$)。



用 vankossa 染色在 SEMFs 处理脐带肝细胞 17 d 后,用 Ipp (Image-Pro Plus 6.0) 灰度分析软件扫描染色区域面积。 $\bar{x} \pm s, n=6$; **, $P<0.01$ 与对照组相比;*, $P<0.05$ 与对照组相比

图 6 钙化面积分析

Fig.6 The Calcified tubercle area

2.5 ALP 染色结果

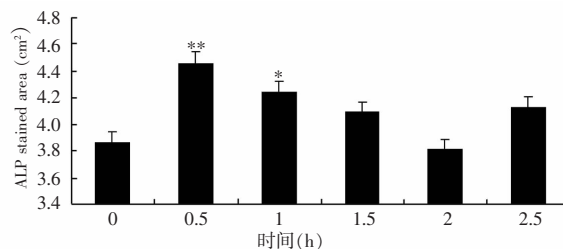
图 7 为 SEMFs 对 HUCSC ALP 活性化面积的影响,0.5 h 和 1.0 h 组均显著增加 HUCSC ALP 染色面积($P<0.05$)。

2.6 基因表达分析

图 8 所示为 SEMFs 对 HUCSC Collagen- I mRNA 表达量变化,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法处理数据。图 8 分别表示了第 1 次 SEMFs 处理 HUCSC 4 d 和 6 d Collagen- I mRNA 表达量的变化。在 SEMFs 处理 HUCSC 4 d 后同对照组比较 0.5 h 和 1 h

组显著促进 Collagen- I mRNA 表达水平($P<0.05$);在 SEMFs 处理 HUCSC 6 d,0.5 h 和 1 h 组同对照组比较能显著促进 Collagen- I mRNA 的表达($P<0.01$),磁场组比较 1.5 mT 和 1.8 mT 组显著促进 Collagen- I mRNA 的表达($P<0.05$)。

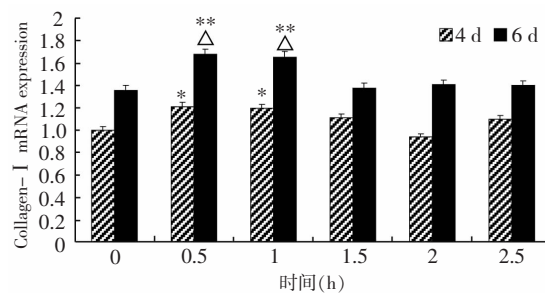
图 9 所示为 SEMFs 对 HUCSC BMP-2 mRNA 表达量变化,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法处理数据。图 9 分别表示了第 1 次 SEMFs 处理 HUCSC 4 d 和 6 d 后 BMP-2 mRNA 表达量的变化。在磁场处理 HUCSC 4 d 后 0.5 h 组 BMP-2 mRNA 表达量显著高于对照($P<0.05$);在 SEMFs 处理 HUCSC 6 d 后 0.5 h 和 1 h 组同对照组比较能显著促进 BMP-2 mRNA 的表达($P<0.01$)。



ALP染色结果。用 ALP 组织化学染色在 SEMFs 处理 HUCSC 13 d, 用 Ipp 灰度分析软件扫描染色区域面积。 $\bar{x} \pm s, n=6$; **, $P<0.01$ 与对照组相比;*, $P<0.05$ 与对照组相比

图 7 ALP 染色面积分析

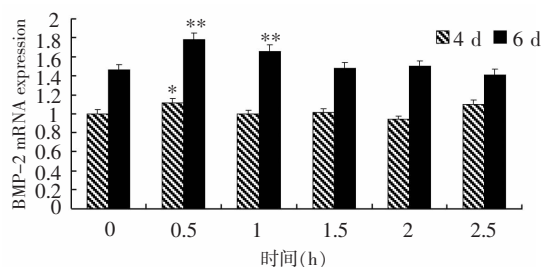
Fig.7 The ALP staining area



Real-time RT-PCR 分析 Collagen- I mRNA 表达。在 SEMFs 处理 HUCSC 4 d 和 6 d,用 Real-Time PCR 检测表达量的变化。 $\bar{x} \pm s, n=3$; **, $P<0.01$ 与对照组相比;*, $P<0.05$ 与对照组相比;△, $P<0.05$ 与 SEMFs 组相比

图 8 Collagen- I mRNA 表达分析

Fig.8 The Collagen- I mRNA expression



BMP-2 mRNA 表达分析,在 SEMFs 处理 HUCSC 4 d 和 6 d,用 Real-Time PCR 检测表达量的变化。 $\bar{x} \pm s, n=3$; **, $P<0.01$ 与对照组相比;*, $P<0.05$ 与对照组相比

图 9 BMP-2 mRNA 表达分析

Fig.9 BMP-2 mRNA expression

3 讨论

骨质疏松症是一种发病率极高的系统性、全身性骨骼疾病^[10]。有关骨质疏松的治疗有药物和激素疗法,但长期使用激素和药物治疗存在一定的副作用,因此有人试图寻找另一种疗法即电磁治疗骨质疏松^[11],有研究发现电磁与体外培养细胞之间存在一个非线性“效应窗口”^[13,4]。用 50 Hz,强度为 3.6 mT 的 SEMFs 分别每天处理 HUCSC 0.0(对照组)、0.5、1.0、1.5、2.0 h 和 2.5 h,研究其对 HUCSC 增殖与成骨性分化的影响,以期找到 50 Hz,3.6 mT 与 SEMFs 与 HUCSC 之间的 1 个效应窗口。研究发现 50 Hz,强度为 3.6 mT SEMFs 1.0、1.5、2.0 h 和 2.5 h 组促进 HUCSC 的增殖,而 0.5 h 组和 1.0 h 组显著促进 HUCSC 成骨性分化,因此进一步确证了 SEMFs 与 HUCSC 之间存在时间效应窗口。

ALP 活性是干细胞成骨性分化活性的标志性指标,有文献报道电磁场能增加血清中和体外培养成骨细胞 ALP 活性^[12,13],本研究发现 50 Hz 3.6 mT 0.5 h 和 1.0 h 组能显著增加体外培养 HUCSC ALP 活性。钙盐是骨骼形成主要成分,因此钙盐的沉积量也就成了衡量成骨细胞分化成熟重要指标,文献报道电磁场能增加体外培养成骨细胞的钙盐的沉积量^[14]。本实验也发现电磁场能促进体外培养 HUCSC 钙盐的沉积量,尤以 0.5 h 和 1.0 h 组钙盐沉积作增加作用最为明显。因此找到了 50 Hz 3.6 mT SEMFs 对 HUCSC 增殖与成骨性分化影响的时间“效应窗口”即 0.5 h 和 1.0 h。实验也从基因水平检测 SEMFs 对体外培养 HUCSC 的 Collagen-I 和 BMP-2 mRNA 表达水平的影响,实验发现 0.5 h 和 1.0 h 组能显著增加 Collagen-I 和 BMP-2 mRNA 的表达量。因此实验从细胞和分子水平找到了促进 HUCSC 成骨性分化的时间“效应窗口”。

实验研究了 SEMFs 对体外培养 HUCSC 增殖与成骨性分化的研究,发现电磁场与 HUCSC 之间存在一个时间“效应窗口”即 50 Hz 3.6 mT 0.5 h 和 1.0 h,这种“效应窗口”,可能与文献报的电磁生物效应的阈值理论一致^[15]。电磁在治疗骨质疏松、骨折延迟愈合和骨不连接等相关骨病也可能存在一个时间“效应窗口”,此结果有待进一步的动物实验和临床试验研究。我们将以本次实验结果为依据,通过建立动物骨质疏松模型,对电磁场治疗骨质疏松的相关参数和机理进行动物水平的研究,有望为临床大规模应用电磁场治疗骨病参数的选择提供一个细胞水平的实验依据。

参 考 文 献

- [1] Huang L Q, He H C, He C Q, et al. Clinical update of pulsed electromagnetic fields on osteoporosis[J]. Chinese Medical Journal, 2008, 121(20): 2095-2099.
- [2] Funk R H, Monsees T, Ozkucur N. Electromagnetic effects from cell biology to medicine[J]. Progress in Histochemistry and Cytochemistry, 2009, 43(4): 177-264.
- [3] Ivancsits S, Pilger A, Diem E, et al. Cell type-specific genotoxic effects of intermittent extremely low-frequency electromagnetic fields[J]. Mutat Res, 2005, 583(2): 184-188.
- [4] Sul A R, Park S N, Suh H. Effects of electromagnetic fields on structure and function of rat glioma cell line[J]. Res J Microbiol, 2006, 32(1): 124-135.
- [5] 周建, 陈克明, 葛宝丰, 等. 不同强度正弦交变磁场对体外培养成骨细胞增殖与分化的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2010, 16(7): 1-4.
- [6] Zhou J, Chem K M, Ge B F, et al. Effect of sinusoidal electromagnetic field at different intensity on the proliferation and differentiation of osteoblasts in vitro[J]. Chin J Osteoporos, 2010, 16(7): 1-4.
- [7] Ming T T, Wan J L, Rocky S T, et al. Modulation of osteogenesis in human mesenchymal stem cells by specific pulsed electromagnetic field stimulation[J]. Chinese Medical Journal, 2009, 15(1): 1-6.
- [8] 吴燕峰, 黎阳. 实用医学细胞培养技术[M]. 广州: 中山大学出版社, 2010. 465-468.
- [9] Wu Y F, Li Y. The utility of medical cell culture technique[M]. Guangzhou: Zhongshan University Press, 2010. 465-468.
- [10] Noriko Y, Kazuyuki F, Keigo H. Progressive development of the osteoblast phenotype during differentiation of osteoprogenitor cells derived from fetal rat calvaria: model for in vitro bone formation[J]. Biol. Pharm. Bull, 2002, 25(4): 509-515.
- [11] Ma H P, Ming L G, Ge B F, et al. Icaritin is more potent than genistein in promoting osteoblast differentiation and mineralization in vitro[J]. J Cell Biochem, 2011, 112(3): 916-923.
- [12] 刘忠厚. 骨矿与临床[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2006. 46-65.
- [13] Liu Z H. Bone mineral and clinical[M]. Beijing: China Science and Technology Press, 2006. 46-65.
- [14] Chao E Y, Inoue N, Koo T K, et al. Biomechanical considerations of fracture treatment and bone quality maintenance in elderly patients and patients with osteoporosis[J]. Clin Orthop Relat Res, 2004, 4(25): 12-25.
- [15] Hartig M, Joos U, Wiesmann H P. Capacitively coupled electric fields accelerate proliferation of osteoblast-like primary cells and increase bone extracellular matrix formation in vitro[J]. Eur Biophys J, 2000, 29(7): 499-506.
- [16] Jiang Y Z, Chen B. Short term effect of pulsed electromagnetic fields on management of osteoporosis[J]. Chin J Osteoporos (Chin), 2005, 11: 365-367.
- [17] Chang W H S, Chen L T, Sun J S, et al. Effect of pulseburst electromagnetic field stimulation on osteoblast cell activities[J]. Bioelectromagnetics, 2004, 25(6): 457-465.
- [18] 宋涛, 霍小林, 吴石增. 生物电磁特性及其应用[M]. 北京: 北京工业大学出版社, 2008. 280-300.
- [19] Song T, Huo X L, Wu S Z. Biological electromagnetic characteristics and application[M]. Beijing: Beijing Gongye Daxue Chubanshe, 2008. 280-300.

(责任编辑: 冉明会)