

温 沛,张鹏翔,李成兴,等. 高压静电场对小鼠骨组织钙沉积的影响[J]. 江苏农业科学,2021,49(10):146-149.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.10.027

高压静电场对小鼠骨组织钙沉积的影响

温 沛¹,张鹏翔¹,李成兴¹,杨 丁¹,原佳慧¹,罗小毛¹,刘振宇²,王海东¹

(1.山西农业大学动物医学学院,山西晋中 030801;2.山西农业大学信息科学与工程学院,山西晋中 030801)

摘要:为了探讨正负高压静电场对小鼠骨骼组织的影响,将 21 只健康 C57BL/6 小鼠随机分为正高压静电场组 A、负高压静电场组 B 以及空白对照组 C。A、B 组分别置于电场强度为 1.2 kV/cm 的正、负高压静电场中,于 7、14、21 d 取小鼠两侧股骨。结果表明,正、负高压静电场组与对照组相比,骨小梁的密集程度显著升高($P < 0.01$)、骨钙浓度及血钙浓度上升($P < 0.01$)。一定强度的高压静电场增加了骨小梁密集程度,引起骨钙及血钙浓度上升,对骨小梁的形成和骨组织钙化具有促进作用。

关键词:高压静电场;成骨细胞;骨小梁;骨钙;血钙

中图分类号: S858.91 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2021)10-0146-04

电场(electric field)是电荷及变化磁场周围空间里存在的一种特殊物质,对放入其中的电荷有力的作用^[1]。地球作为生物机体赖以生存的环境,其表面携带有负电荷,而大气层则携带正电,使地球本身形成静电场^[2],各种生物的生存繁衍、生长发育均适应于地球这一静电场下^[3]。自 18 世纪中叶静电场的生物效应被发现后,利用高压静电场辐照处理植物种子以提高种子活力的研究十分广泛,在玉米、水稻、棉花等作物及瓜果蔬菜方面均有应用^[5]。

高压静电场不仅对植物的生长发育有利,对动物也有一定作用^[8]。研究发现,高压静电场能影响动物的体质量、血压、血糖及超氧化物歧化酶等生理指标^[9],并对动物机体的免疫系统产生作用。此外,有研究表明,电能可促进骨的生长与修复,但临床治疗使用的主要方式是用直流电直接刺激骨折部位,进而促进骨骼的愈合^[10]。而高压静电场能否促进骨组织的生长发育,目前尚无研究。骨骼作为机体的支架,也是运动系统的重要组成部分,骨基质中无机成分主要是羟磷灰石结晶 $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ ^[11],骨钙的代谢将直接影响骨的质量,从而影响机体正常生命活动^[12]。理论上,静电场会对其

内所有离子产生力的作用,即使是体内的 Ca^{2+} 也不能例外,但目前并没有研究报道高压静电场影响 Ca^{2+} 在动物体内的代谢以及调节骨基质中羟磷灰石结晶形成的作用。

本试验主要研究高压静电场作用下对小鼠骨组织骨钙沉积和血钙变化在成骨过程的影响,证明高压静电场对小鼠骨组织的影响,以期为进一步探究高压静电场对骨性疾病治疗作用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试剂与仪器 钙试剂盒(南京建成生物工程研究所有限公司);苏木精、伊红染液及中性树脂(北京索莱宝科技有限公司);斯玛特全自动生化分析仪(成都斯玛特科技有限公司);高压直流电源[东文高压电源(天津)股份有限公司]。

脱钙液由 100 g EDTA - Na₂(乙二胺四乙酸二钠)溶于 1 L 磷酸缓冲盐溶液中,加入 NaOH 搅拌溶解后用 HCl 调节溶液 pH 值至 7.2 制成。骨固定液由 8 mL 3% 戊二醛和 8 mL 4% 多聚甲醛混合,加入 4 mL 4% 组织固定液制成。

1.1.2 试验动物 选用 C57BL/6 的 5 周龄雄性小鼠,购自山西医科大学实验动物中心。

1.2 试验方法

1.2.1 试验系统 试验地点位于山西农业大学动物医学国家级实验教学示范中心,小鼠每日给予光照、黑暗各 12 h,饲养环境温度保持在(25 ± 0.5) °C,湿度为 50% ~ 60%,自由饮水和采食。适应性饲养

收稿日期:2020-10-14

基金项目:国家自然科学基金(编号:31772690)。

作者简介:温 沛(1996—),男,山西太原人,硕士,从事动物肌肉发育及脂肪代谢的研究。E-mail:wmichaelp@163.com。

通信作者:王海东,博士,教授,博士生导师,从事动物肌肉发育及脂肪代谢的研究。E-mail:whd1232123@163.com。

1 周后随机分为 3 组,其中 2 组分别置于正高压静电场、负高压静电场下继续饲养 3 周,每日辐照 12 h 后正常饲养,另 1 组设为对照组。正、负电场场强均稳定在 1.2 kV/cm。试验时间为 2019 年 10 月至 2020 年 1 月。

1.2.2 取样与固定 分别于试验 7、14、21 d 从 3 组中随机选取 3 只小鼠,摘取眼球采集血液,后脱颈处死,取其两侧股骨。血样以 4 000 r/min、4 ℃ 离心 10 min 后分离血清,置于 -20 ℃ 保存,用于血钙测定。将一侧股骨置于 4% 多聚甲醛固定 24 h 后,置于 10% 脱钙液中,脱钙 3 周,定期更换脱钙液直至骨组织变软,截取 2/3 远端股骨做石蜡包埋切片。另一侧股骨于 -80 ℃ 保存,用于骨钙含量测定。

1.2.3 脱钙组织的制片和观察 取 1.0 cm × 0.5 cm × 0.5 cm 大小的脱钙骨骼组织,以大头针顺利插入骨骼组织作为脱钙终点的判断依据,流水冲洗 8 h。梯度乙醇脱水(70% 2 h,80% 2 h,90% 1 h,95% 1 h,100% 45 min)、二甲苯透明(45 min),浸蜡 3 h 后包埋,以 7 μm 厚度切片,50 ℃ 烤片机烘干。组织切片依次用二甲苯、梯度乙醇、苏木精、伊红染液、中性树脂,对组织脱脂、染色、封片。显微镜下观察骨组织的形态结构,使用 Image-Pro Plus

统计骨小梁的面积占比。

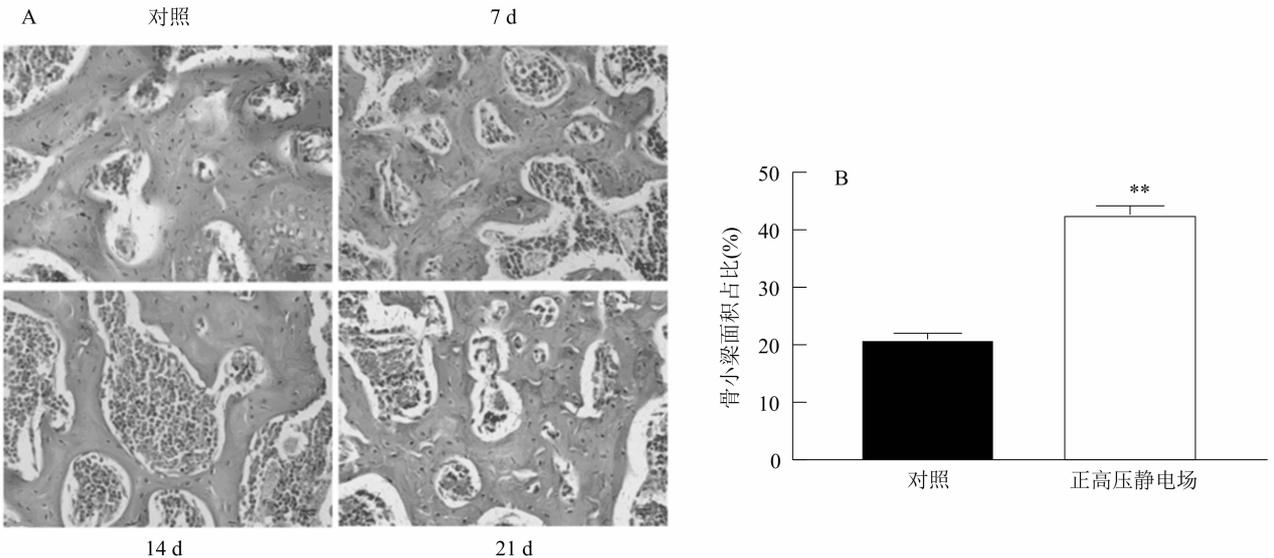
1.2.4 骨钙浓度的测定 将保存于 -80 ℃ 的骨组织取出称质量,加入生理盐水,研钵研磨,静置 5 min 后,以 2 500 r/min 的速度 4 ℃ 离心 10 min,取上清液待测。在 96 孔板中加入对应试剂和样本,混匀后,静置 5 min,在酶标仪 610 nm 处测定吸光度,绘制标准曲线计算浓度。

1.2.5 血钙浓度的测定 将保存于 -20 ℃ 的血清取出,取 100 μL 血清加入试剂盒中,置于全自动血液生化分析仪,测量并计算分析血钙含量。

2 结果与分析

2.1 正高压静电场造成骨小梁比例增加

正高压静电场处理下的小鼠,骨组织 HE(苏木精伊红染色)结果表明,对照组骨小梁分布均匀,密集程度较低。正高压静电场组深处可见骨髓腔中充满大量的髓质骨小梁。正高压静电场组的骨小梁密集度较高、骨小梁周围成骨细胞较多(图 1-A)。对骨组织形态进行统计学分析发现,正高压静电场组与对照组相比有显著差异(图 1-B)。结果表明,正高压静电场组可增加骨骼内骨小梁和成骨细胞数量,从而促进成骨过程。



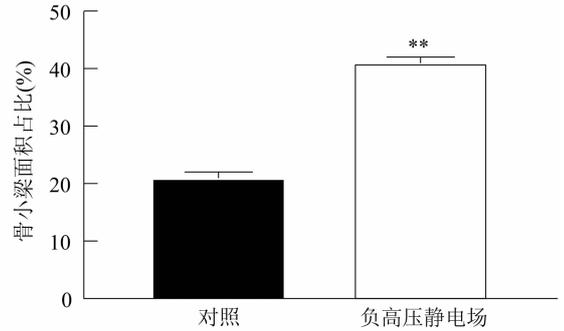
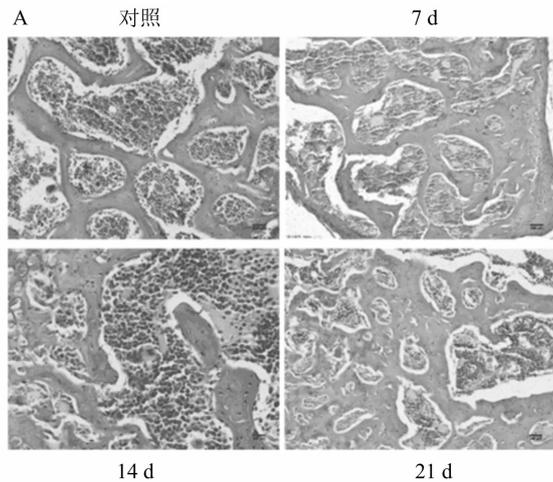
A—对照组和正高压静电场组处理期间的 HE 染色结果; B—对照组和正高压静电场组处理后(14 d)的骨小梁面积百分比; **—与对照相比在 0.01 水平上差异显著,图 2 同

图 1 正高压静电场对骨小梁的影响

2.2 负高压静电场促进成骨发育

负高压静电场处理下的小鼠骨组织 HE 结果显示,与对照组相比,负高压静电场组的骨小梁密集度较高、其周围成骨细胞较多(图 2-A)。同样对

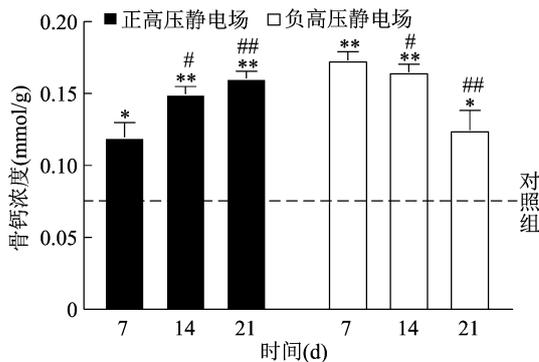
负高压静电场组进行骨组织形态统计,分析发现负高压静电场组与对照组相比具有显著差异(图 2-B)。结果表明,负高压静电场处理会造成骨骼内骨小梁增加,促进成骨过程。



A—对照和负高压静电场组在7、14和21 d的HE染色结果；B—对照组和负高压静电场组处理14 d的骨小梁面积百分比
图2 负高压静电场对骨小梁的影响

2.3 高压静电场引起骨钙沉积

通过使用钙试剂盒测量骨钙浓度,结果(图3)表明,与对照组相比,正、负高压静电场处理的小鼠骨钙浓度均表现为显著性升高。随着正高压静电场处理时间的增加,骨钙浓度呈现上升趋势。负高压静电场则表现相反趋势,即随着处理时间的增加,骨钙浓度呈现下降趋势。结果表明,正高压静电场的长时间作用会导致骨钙沉积增多,负高压静电场的长时间作用会导致骨钙沉积量下降;但与对照组相比,正、负高压静电场处理均引起骨钙沉积。



*、** 分别表示与对照组相比在0.05、0.01水平上差异显著；#、## 分别表示与7 d处理组相比在0.05、0.01水平上差异显著,图4同

图3 高压静电场处理对骨钙沉积的影响

2.4 高压静电场影响血钙浓度

由图4可知,与对照组相比,高压静电场处理的小鼠血钙浓度均有所升高。在正高压静电场处理时,不同时长下(7、14、21 d)均比对照组有微量升高趋势,在21 d时浓度提升具有显著性差异。负高压静电场处理结果与正高压静电场处理结果相似,血钙浓度在21 d时表达升高,具有显著性差异。用正

高压静电场或负高压静电场处理组中,处理7 d和14 d小鼠的血钙浓度均没有表现出显著的差异,但在21 d时显著提高。高压静电场长时间作用对小鼠血钙浓度的升高有一定的影响,而正高压静电场与负高压静电场在促进血钙浓度方面没有显著区别。

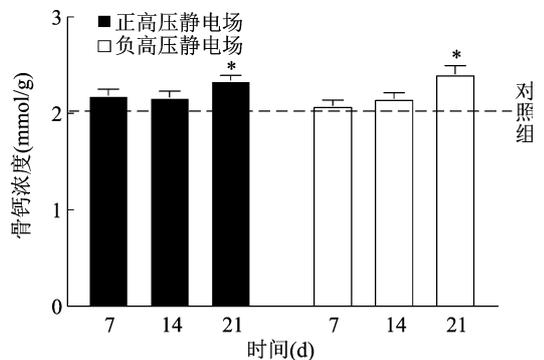


图4 高压静电场处理对血钙浓度的影响

3 讨论与结论

骨小梁是由针状或片状的骨板及骨细胞构成的,对骨质的强度和硬度有重要的影响,是成骨过程重要的一环^[11]。本试验通过对骨小梁进行切片观察及形态计量学统计分析,发现高压静电场处理显著导致了骨小梁增加,说明在高压静电场的作用下会促使成骨细胞的增殖及其在骨钙沉积中的作用。

细胞生物电是机体新陈代谢的物质基础,高压静电场作为环境物理因素对生物体的影响实质上是外加电环境对细胞生物电转变过程的影响^[12],细胞正是由于这些影响导致了一系列复杂的生理变

化,最终致使其生命运动做出相应的调整^[13]。有研究表明,外加高压静电场下影响细胞膜电位,使膜两侧离子浓度发生变化^[14]。电压门控的离子通道的活化对膜电位具有强烈的依赖性,在电场作用下,门控电流引起孔洞的构象变化,从而活化离子通道^[15-16]。

人体内的血钙会在成骨细胞的作用下,沉积在骨骼上形成骨钙;骨钙则会在破骨细胞的作用下,从骨钙转变为血钙^[17]。因此,血钙浓度可以在一定程度上改变骨钙沉积。本研究表明,与对照组相比,高压静电场处理组血钙浓度普遍升高,这在一定程度上促进了骨钙浓度的上升,试验数据也表明了这一点,但短时间的处理未造成血钙浓度的显著性提升,说明高压静电场对血钙浓度的变化需要长时间的作用。本次试验说明高压静电场可以促进血钙上升、骨钙沉积。但短时间的高压静电场处理对血钙浓度效果不显著的原因可能是电场刺激过程中产生的低浓度臭氧影响了作用效果^[18];长时间的负高压静电场处理下骨钙浓度效果反而下降的主要原因可能是自然界通常处于低压正静电场状态,外加负高压静电场会阻碍生物机体中原有的生理过程。本研究还有很多不足之处,首先不确定高压静电场是否会对动物其他生理指标产生影响,其次对高压静电场对成骨的影响机制也不清楚。整体来说,高压静电场在骨钙沉积以及血钙浓度的影响上有一定的作用,可以促进成骨分化,但须要控制适当的时间和适当的场强,有望成为在治愈骨折过程中重要的一个辅助手段。

本研究表明,高压静电场处理可以提高骨小梁的形成和骨钙沉积,以及促进血钙浓度上调,从而导致成骨分化和骨骼强度的增加。

参考文献:

- [1] Roche J. Introducing electric fields[J]. *Physics Education*, 2016, 51:5.
- [2] 陶玉香. 地球电场、电荷和电势状况分析[J]. *甘肃科学学报*, 2003, 15(2):126-127.
- [3] 全宇欣. 静电场技术在设施农业中的应用现状与前景[J]. *农业工程技术*, 2015(11):44-46.
- [4] 吴旭红, 孙为民, 张红燕. 静电场对植物的生物学效应[J]. *黑龙江农业科学*, 2005(2):44-46.
- [5] 李 宸, 杨小环, 吴冬梅, 等. 高压静电场处理缓解高粱种子快速脱水伤害的生理机制[J]. *山西农业科学*, 2020, 48(3):339-344.
- [6] 王进康, 季 旭, 杨昌春, 等. 高压电场及通风对玉米干燥特性的影响研究[J]. *云南师范大学学报(自然科学版)*, 2019, 39(1):20-24.
- [7] 蔡兴旺, 林昌华. 高压静电场处理对黄瓜种子发芽的影响[J]. *种子*, 2002(6):16-17.
- [8] 袁 媛, 季 婉, 张 岩, 等. 高压静电场协同抗氧化剂抑制大豆油氧化[J]. *食品科学*, 2018, 39(13):81-86.
- [9] 王惠惠, 莫树平, 柏建玲, 等. 高压脉冲电场灭菌对木瓜果酒中维生素C损失的影响[J]. *酿酒科技*, 2018(9):22-25.
- [10] 汤押庚. 电能对骨生长和修复的作用[J]. *国外医学(外科学分册)*, 1979(4):7-11.
- [11] 原佳慧, 王玉鑫, 温 沛, 等. 高压静电场对小鼠血液生化指标的影响[J]. *畜禽业*, 2019(8):4-5.
- [12] 邓一兵, 殷高方. 电场辐射对南美白对虾幼虾抗逆性影响的研究[J]. *浙江海洋学院学报(自然科学版)*, 2007, 26(1):33-36.
- [13] 孙 菲, 邢沈阳, 孙 寒, 等. 高压静电场对发育小鼠生理及生化指标的影响[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2005, 31(6):29-32.
- [14] 嵇志红. 高压静电场对家兔血压的影响[J]. *大连大学学报*, 1998, 19(2):61-64.
- [15] 甘 平, 胡国虎, 陈 宏, 等. 高压静电场影响小白鼠体重增长的研究[J]. *生物物理学报*, 1997, 13(4):705-707.
- [16] Zhao L, Li M Y Sun H. Effects of dietary calcium to available phosphorus ratios on bone metabolism and osteoclast activity of the OPG/RANK/RANKL signalling pathway in piglets[J]. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2019, 103(4):1224-1232.
- [17] Su C Y, Fang T, Fang H W. Effects of electrostatic field on osteoblast cells for bone regeneration applications [J]. *BioMed Research International*, 2017:7124817.
- [18] 周正适, 周智君, 汤百争. 低浓度臭氧对小鼠生长发育的影响[J]. *中国实验动物学报*, 2008, 16(3):217-219.