

体外 ELF 电磁场对肝细胞 Ca^{2+} 生理浓度变化的影响^{*}

周永军¹, 牛中奇¹, 张 辉², 赵 越³

(1 西安电子科技大学工程学院, 陕西 西安 710071;

2 西北工业大学电子信息学院, 陕西 西安 710072

3 华中科技大学水电与数字化工程学院, 湖北 武汉 430074)

摘 要: 研究了 ELF 电磁场对细胞游离 Ca^{2+} 浓度的影响。分别通过 (a) 从单个肝细胞内钙离子振荡的动力学模型出发, 以细胞膜上 IP_3 受体浓度作为作用因子的数值计算和 (b) ELF 电磁场对细胞作用的实验结果分析电磁场对细胞游离 Ca^{2+} 浓度的影响。结果表明: 钙振荡的周期与 IP_3 受体的浓度成非线性关系, 外加 ELF 电磁场影响胞内钙振荡的周期和胞浆 Ca^{2+} 浓度; 强度为 53 V/m 频率为 16 Hz 和 45 Hz 和频率为 16 Hz 强度为 80 V/m 的电磁波可使细胞胞浆 Ca^{2+} 浓度上升明显, 有显著统计学意义, 强度为 53 V/m 频率为 32 Hz 和 60 Hz 和频率为 16 Hz 强度为 26 V/m 的电磁波作用后细胞胞浆 Ca^{2+} 浓度上升不明显, 无统计学意义。

关键词: ELF 电磁波; Ca^{2+} 生理浓度; 非线性; 自维持; 细胞

中图分类号: R318.04 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2007) S2-0236-04

细胞外的刺激信号, 如神经递质、局部化学介导因子, 以及某些环境因素, 如重力、电磁波等, 少部分可以直接引起生理反应, 多数只能在膜上被受体识别后, 通过膜上信号转换系统, 转变为胞内信号, 才能调节细胞代谢反应。细胞内信号传递是通过第二信使 (环磷酸腺苷 cAMP 钙离子 Ca^{2+} 等) 来完成的, 胞内游离 Ca^{2+} 浓度是细胞内生物化学和生物物理反应的主要调控因子之一, 其原因是 Ca^{2+} 在细胞中广泛参与各种生命活动, 它不仅控制着细胞代谢, 也与 DNA 复制和转录的调控有关, 胞浆内游离 Ca^{2+} 还担负着传递信息的作用。正常 Ca^{2+} 浓度的破坏往往导致细胞发生变异。在大多数细胞内 Ca^{2+} 经常出现振荡现象, 体现了 Ca^{2+} 浓度随时间变化的特征。近年来, 在细胞水平上的电磁场生物学效应的研究, 尤其是电磁场对于细胞钙振荡影响的研究日益引起人们的关注^[1-2], 钙振荡代表了一种信息编码方式, 即以频率编码替代幅度编码, 其种类繁多, 特征复杂, 其发生机制也不尽相同。迄今为止已提出了若干胞内钙振荡机制^[3-6]。由于组成细胞膜 Ca^{2+} 通道的蛋白质分子的二级结构是以每 3.6 个氨基酸残基绕轴线一周的 α -右手螺旋结构, 因而沿主链的几何结构和化学结构都具有周期性, 且每 2 个几何结构周期对应 1 个化学结构周期。这两种结构周期使得由 α -螺旋

蛋白质分子构成的 Ca^{2+} 通道沿轴线具有周期性的势垒分布, 即电位沿轴线以 2 个螺距为周期呈最大值—最小值—最大值—最小值……分布^[7]。这样, 由钙库通过细胞质膜上的 Ca^{2+} 通道流入胞浆的 Ca^{2+} 和由胞浆通过质膜上的 Ca^{2+} 通道流出细胞外的 Ca^{2+} 量便与外加电磁波频率密切相关。为了更好地了解电磁场与细胞代谢的作用机制和相互作用位点, 本研究分别通过实验和从钙振荡非线性动力学模型出发的数值计算两方面讨论电磁场对胞内游离钙离子浓度的影响。

1 实 验

1.1 细胞样品制备及荧光负载

细胞样品的制备: 取对数生长期人体肝癌 7721 细胞株, 经胰蛋白酶消化制成单层悬液, 当其成活率达 95% 以上时, 接种于培养皿中, 加含有 $w=10\%$ 小牛血清的 1640 培养液, 置于 37°C 、含 $\varphi(\text{CO}_2)=5\%$ 的培养箱中孵育 24 h

采用的荧光探针 (试剂) 为 Fluo-3。用荧光强度描述胞浆 Ca^{2+} 浓度的原理是: 当把 AM 衍生物形式的荧光试剂与活细胞一起孵育时, 它可透过细胞膜进入细胞内而被胞浆脂酶水解成游离酸形式, 该形式的游离酸可与胞浆内的游离 Ca^{2+} 结合而成为复合物, 这种复合物的荧光光谱变化可用显

* 收稿日期: 2007-10-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30470429)

作者简介: 周永军 (1976年生), 男, 博士; 通讯联系人: 牛中奇; Email: hoozy@tom.com

微镜检测，从而起荧光探针的作用。上述过程被称为“荧光负载”。很显然，负载后细胞内的荧光强度与胞浆 Ca^{2+} 浓度是正相关的，因而，可通过对细胞内荧光强度的测量反映胞浆游离 Ca^{2+} 浓度的大小。

1.2 电磁波照射系统及照射方法

电磁波照射系统由 ELF (极低频) 信号源, 频率计, 毫伏计, TEM 小室 (Transverse Electromagnetic Wave Transmission Cell 横电磁波传输小室), 保温箱, 温度控制系统, 温度检测系统和功率计 (兼做匹配负载) 组成, 其框图见图 1。

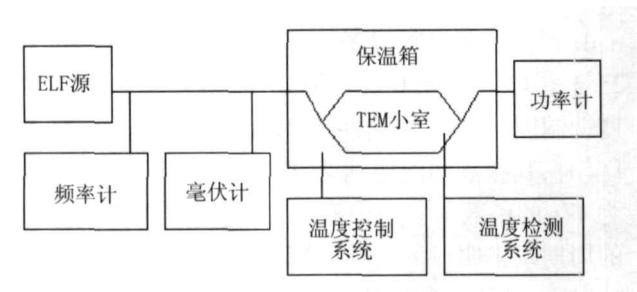


图 1 电磁波照射系统
Fig 1 The irradiation system of electromagnetic wave

1.3 实验结果

样品在用激光扫描共聚焦显微镜进行荧光强度检测而获得对照组数据之后, 即刻被置于 TEM 小室主段的芯板之上接受电磁波照射 20 min。具体照射方法见参考文献 [8]。在此应说明得是 TEM 小室是变形的同轴线, 其主段为外导体呈矩形箱体而内导体呈矩形芯板的结构, 主段的两端各与一个外导体呈矩形喇叭而内导体呈三角形芯板的结构对接, 最终将其两端转变成 $50\ \Omega$ 的同轴线插座。TEM 小室的功能是在主段这一有限的封闭空间内产生一系列均匀平面电磁波, 受照射的生物样品或生物体就放置在主段的内外导体之间接受电磁波辐照。这样既可对照射参数进行控制, 又便于对受照射的生物样品或生物体的吸收剂量进行准确评价, 同时造就了一个既能电磁屏蔽又可对温度进行精确控制的环境。本文 TEM 小室内的温度保持在 $35.0\pm0.2\ ^\circ\text{C}$ 。将每一样品在激光扫描共聚焦显微镜下进行荧光强度检测以便获得细胞胞浆中的荧光强度和背景荧光强度数据, 这样在同一时刻胞浆荧光强度与背景荧光强度之差便是一个原始数据, 每一样品中所有原始数据的统计平均便是一个对照组数据, 在获得对照组数据后, 再将每一样品放在上述的电磁波照射系统中接受电磁波照射, 照射之后, 再次在激光扫描共聚焦显微镜下进行荧光强度检

测, 其过程和方法与对照组完全相同。照射后获得的便是实验组数据。实验数据如表 1 所示。

表 1 ELF 电磁场对肝癌细胞胞浆 Ca^{2+} 浓度影响¹⁾
Tab 1 The effect of ELF electromagnetic field on the Concentration of Intracellular Cytosolic Ca^{2+} in Liver Cancer Cells

f (Hz)	电场 峰值 (V/m)	样品序号					P
		1	2	3	4	5	
16	53	3.35	2.35	2.32	2.40	3.62	75.7*
		6.34	7.86	8.38	6.22	7.08	
32	53	2.43	3.16	3.28	2.94	3.07	0.123
		2.62	3.02	2.89	2.20	2.77	
45	53	3.66	3.15	2.85	2.94	2.50	18.1*
		3.50	6.91	4.33	7.76	6.31	
60	53	2.67	3.11	3.71	4.42	3.70	5.149
		2.43	3.52	1.69	2.47	2.75	
16	26	3.21	4.07	2.62	2.87	4.22	3.42
		2.14	3.59	2.19	3.42	3.12	
16	80	2.46	1.42	1.16	2.41	1.35	33.4*
		3.09	4.03	3.50	3.41	3.38	

1) S=实验组; T=对照组; P=信度系数

只有当实验组数据与对照组数据存在显著性差异时 ($P<0.05$), 才认为该照射参数的电磁波引起了胞浆 Ca^{2+} 浓度的显著性变化。从表 1 中可以看出, 电磁场峰值为 $53\ \text{V/m}$ 时, 频率分别为 $16\ \text{Hz}$ 和 $45\ \text{Hz}$ 的电磁波可使肝癌细胞胞浆 Ca^{2+} 浓度显著性增加 ($P<0.05$), 而与之相邻的 $32\ \text{Hz}$ 和 $60\ \text{Hz}$ 却不使其发生显著性变化 ($P>0.1$), 当频率为 $16\ \text{Hz}$ 时, 电场峰值为 $80\ \text{V/m}$ 的电磁波使人体肝癌细胞胞浆 Ca^{2+} 浓度显著性增高 ($P<0.01$), 而与之相邻的 $26\ \text{V/m}$ 却没有发生明显变化 ($P>0.1$)。

2 数值仿真

本文从 Hofer 提出的单个肝细胞振荡模型出发, 将钙振荡理论模型用于研究外加电磁场对细胞钙振荡影响, 通过数值分析, 研究电磁场对胞内钙振荡 (Ca^{2+} 浓度随时间的变化) 的影响。单个肝细胞钙振荡的动力学模型描述如下。

如果用 x 表示细胞浆的钙离子浓度, z 为细胞内总的钙离子浓度, 则:

$$\frac{dx}{dt} = \rho \left(\gamma + \frac{p}{K_0 + p} - \frac{\gamma}{K_1 + x} + \frac{\alpha k}{\beta} \left(z - (1 + \beta) x \right) - \alpha \frac{\gamma}{K_2 + x} \right) \quad (1)$$

$$\frac{dz}{dt} = \rho \left(\gamma + \frac{p}{K_0 + p} - \frac{\gamma}{K_1 + x} \right) \quad (2)$$

在上述方程中, P 是细胞的 IP_3 浓度, IP_3 的释放函数 k_7 为

$$k_7 = k_7 \left[\frac{d_2 (d_1 + P) P x}{(d_0 + P) (d_3 + x) (d_2 (d_1 + P) + x d_3 + P)} \right]^3 + k_2 \tag{3}$$

ρ, α, β 是用来描述细胞结构的参数, γ 是背景钙泄漏的速率, v_1, v_2, v_3 分别表示由 IP_3 诱导的钙泄漏的速率, 内质网中钙离子上升的最大速率以及胞外钙离子内流的最大速率。该模型中的其它参数意义, 可参看 Hofe 的论文。

在电磁场对细胞钙振荡影响的研究中, Eichwald 和 Kaise[9] 认为电磁场对细胞钙振荡的影响是活性受体和 G 蛋白间的信号耦合通道受到调制, 其形式为: $V_T(1 + F_1 \cos \omega t)$, 其中 F_1 是调制的幅度。黄春明等人[10] 根据细胞的电容特性, 假设外加电磁场对钙信号通路的作用产生了形如 $\beta(1 + f(\omega) \cos \omega t)$ 的时频变化, 其中, $f(\omega) = \frac{a\omega}{\sqrt{\omega^2 + \omega_0^2}}$, a 为电磁场的调制振幅, ω 为电磁场的角频率, ω_0 是由细胞膜的特性参数所决定的 3 dB 截至频率。在此我们讨论电磁场对单个肝细胞的钙振荡影响, 认为 IP_3 受体的浓度受到电磁场的调制, 其形式为 $P(1 + F_1 \cos \omega t)$ 。

根据文献 [11], Hofe 模型中的各参数取值为: $\gamma = 0.2 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $v_1 = 4.0 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $v_2 =$

$9.0 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $v_3 = 3.6 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $K_0 = 4.0 \mu\text{mol L}^{-1}$, $K_1 = 0.12 \mu\text{mol L}^{-1}$, $K_2 = 0.12 \mu\text{mol L}^{-1}$, $d_1 = 0.3 \mu\text{mol L}^{-1}$, $d_2 = 0.4 \mu\text{mol L}^{-1}$, $d_3 = 0.2 \mu\text{mol L}^{-1}$, $d_4 = 0.2 \mu\text{mol L}^{-1}$, $k_1 = 40.0 \text{ s}^{-1}$, $k_2 = 0.02 \text{ s}^{-1}$, $\rho = 0.02 \text{ m}^{-1}$, $\alpha = 2.0$, $\beta = 0.1$ 。基于肝细胞钙振荡的动力学模型, 下面采用四阶龙格-库塔法数值分析胞内钙离子浓度随时间的变化关系。

图 2 是在一定强度的电磁场作用下, 胞浆内钙离子随时间变化 (钙振荡) 的关系图, 在此假设 P 受到电磁场的调制, 调制的方式采用与 Eichwald 的形式, 即 $P(1 + F_1 \cos \frac{2\pi}{T} t)$, 其中, $P = 4 \mu\text{M}$ 在图 2a, b, c, d 中幅度调制因子 $F_1 = 0.5$, 周期分别为 $T = 23.5 \text{ s}, 47.0 \text{ s}, 71.0 \text{ s}, 91.0 \text{ s}, 138.0 \text{ s}$; 图 2e, f 对应的幅度调制因子为 0.2, 周期为 47.0 s 。在 $P = 4 \mu\text{mol L}^{-1}$ 时, 其振荡的周期约为 47 s ; 其中 $91 \text{ s}, 138 \text{ s}$ 约为 47 s 的整数倍。图中显示, 在这些周期下, 钙振荡的周期发生明显的变化, 这说明在调制因子一定的情况下, 外加电磁场的频率影响胞浆内钙离子的浓度随时间的分布, 频率不同, 其钙振荡的周期不同, 其结果将导致细胞水平上的电磁场生物学效应。比较图 2b 和 f, 二者的周期以及胞浆内钙离子浓度的最大值几乎不发生变化, 这说明一定范围内的调制因子不是影响钙振荡的主要原因。

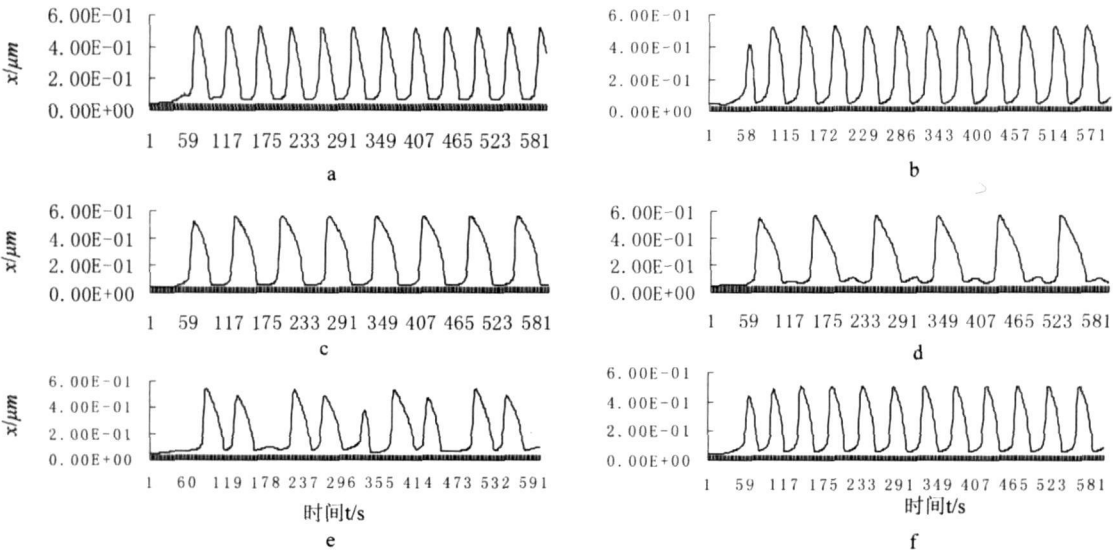


图 2 胞浆内钙离子浓度随时间的变化关系
Fig 2 Time evolution of the intracellular calcium concentration

3 讨论

钙离子作为第二信使, 是维持细胞正常代谢和

生理机能的一种基础元素, 它作为一种重要的调控因子控制着许多亚细胞过程, 控制着细胞生物物理和生物化学过程。电磁场是一个主要环境因素。所

以, 研究电磁场对胞内钙振荡影响具有非常重要的意义。本文中所采用的是 Hofe 提出的用来解释在肝细胞中钙振荡同步性的动力学方程, 该方程式是非线性微分方程, 通过数值分析可知外加电磁场的频率影响胞浆内钙离子的浓度分布, 频率不同则钙振荡的周期, 胞浆内钙离子浓度随时间的分布不通, 调制因子不是影响钙振荡的主要原因。实验结果也说明细胞在受 ELF 电磁场作用后, 细胞胞浆 Ca^{2+} 浓度产生相应的变化 (有的参数可使细胞胞浆 Ca^{2+} 浓度可产生显著性变化, 有的参数并不使细胞胞浆 Ca^{2+} 浓度产生显著性变化)。

参考文献:

- [1] EICHWARD C, KAISER F Model for external influences on cellular signal transduction pathways including cytosolic calcium oscillations [J]. Bioplectro — magnetics, 1995, 16: 75—85
- [2] 黄春明, 徐邦荃, 林家瑞. 极低频磁场对激动剂诱发钙振荡的影响 [J]. 生物物理学报, 1999, 15 (3) 543—546
- [3] GOIDBEITER A, DUPONT G, BERRIDGE J Minimal model for signal — induced oscillations and for their frequency encoding through protein Phosphorylation [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 7: 1461—1465
- [4] MEYER T, SIRYER L Molecular model for receptor — stimulated calcium spiking [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85: 5051—5055
- [5] EICHWARD C, KAISER F Model for external influences on cellular signal transduction pathways including cytosolic calcium oscillations [J]. Bioplectromagnetics, 1995, 16: 75—85
- [6] SOMOGYI R, STUCKI JW. Hormone — induced calcium oscillations in liver cells can be explained by a simple one pool model [J]. J Biol Chem, 1991, 266: 11068—11077
- [7] 牛中奇. 电磁波的生物学窗效应及其回旋谐振理论 [J]. 中国生物医学工程学报, 1993, 11(1): 61—69
- [8] 牛中奇. 电磁波的生物学窗效应 [J]. 中国生物医学工程学报, 2003, 22(2): 126—132
- [9] EICHWARD C, KAISER F Model for external influences on cellular signal transduction pathways including cytosolic calcium oscillations [J]. Bioplectro — magnetics, 1995, 16: 75—85
- [10] 黄春明, 徐邦荃, 林家瑞. 极低频磁场对激动剂诱发钙振荡的影响 [J]. 生物物理学报, 1999, 15 (3) 543—546
- [11] THOMAS HOFER Model of Intracellular Calcium Oscillation in Hepatocytes: Synchronization of heterogeneous cells [J]. Biophys, 1999, 77(3): 1244—1256

The Effect of Extraneous ELF Electromagnetic Fields on the Variety of Physiological Concentration of Intracellular Ca^{2+} in Liver Cells

ZHOU Yong-jun¹, NIU Zhong-qi², ZHANG Hu², ZHAO Yue³

(1. Electric Engineering Department, Xidian University, Xi'an 710071, China;

2. Northwestern Polytechnic University, Xi'an 710072, China; 3. College of Hydropower & Information

Engineering, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract: The effect of ELF electromagnetic fields on intracellular Ca^{2+} concentration of cells was studied. It was analysed by (a) based on the nonlinear dynamic model of the calcium oscillation in heterogeneous liver cell, the influence of the electromagnetic field to the calcium oscillation was numerical analyzed while the IP_3 receptor concentration was as action factor and (b) the experiment result of the cells were exposed to ELF electromagnetic fields. The result show that there was the nonlinear relation between the calcium oscillation periods and the IP_3 receptor concentration, the extraneous electromagnetic field would influence calcium oscillation periods and cytosolic Ca^{2+} concentration. The ELF electromagnetic fields was divided to two circumstances in this research, the one which the intensity was 53 v/m, the frequency were 16 Hz and 45 Hz or the intensity was 80 v/m, the frequency was 16 Hz that result in certain changes, which significance of difference was observed, the one that the intensity was 53 v/m, the frequency were 32 Hz and 60 Hz or the intensity was 26 v/m, the frequency was 16 Hz which didn't.

Key words: ELF Pulse electromagnetic waves; Calcium Physiological Concentration; Nonlinear; Self-sustained Cell