

# 低频脉冲电磁场促进成骨细胞分化的基因调节和非基因调节探究

方清清<sup>1</sup>,李志忠<sup>2</sup>,周建<sup>1</sup>,石文贵<sup>1</sup>,闫娟丽<sup>1</sup>,陈克明<sup>1</sup>

1. 兰州军区兰州总医院全军骨科中心骨科研究所,甘肃兰州 730050

2. 兰州理工大学生命科学与工程学院,甘肃兰州 730050

**[摘要]** 目的:探究 50 Hz 0.6 mT 脉冲电磁场(PEMF)促进体外培养大鼠颅骨成骨细胞(ROB)分化成熟是否存在基因调节和非基因调节。方法:体外培养 ROB,传代融合后经 50 Hz 0.6 mT PEMF 处理 1.5 h,于 0、3、6、9、12 h 检测碱性磷酸酶(ALP)的活性及其基因表达,以及骨形成相关因子 Runx2、OSX 的基因和蛋白表达。结果:50 Hz 0.6 mT PEMF 处理后 3 h,ROB 中 ALP 的活性高于对照组( $P < 0.01$ ),而其基因表达在处理 6 h 才高于对照组。Runx2 的基因表达在处理后立即升高,持续至处理后 6 h 回归对照组水平,之后再次升高,其蛋白表达与之相对应但略有滞后。OSX 的基因表达亦在处理后立即升高,持续至处理后 6 h 回归对照组水平,至 12 h 时显著降低,其蛋白表达与之相对应但略有滞后。结论:50 Hz 0.6 mT PEMF 促进体外培养 ROB 分化成熟存在对 Runx2 和 OSX 的基因调节以及对 ALP 活性的非基因调节。



**[关键词]** 成骨细胞/辐射效应;颅骨;电磁场;动物,新生;细胞,培养的;细胞分化;基因,调节;大鼠,Wistar

**[中图分类号]** Q683; R68 **[文献标志码]** A

## Genic and non-genic regulation of low frequency pulsed electromagnetic fields on osteoblasts differentiation

FANG Qingqing<sup>1</sup>, LI Zhizhong<sup>2</sup>, ZHOU Jian<sup>1</sup>, SHI Wengui<sup>1</sup>, YAN Juanli<sup>1</sup>, CHEN Keming<sup>1</sup> (1. Institute of Orthopaedics Center, Lanzhou General Hospital of PLA, Lanzhou 730050, China; 2. College of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China)

Corresponding author: CHEN Keming, E-mail: chenkm@lut.cn; http://orcid.org/0000-0002-9749-8356

**[Abstract]** **Objective:** To study the genic and non-genic regulation of 50 Hz 0.6 mT

收稿日期:2016-09-30 接受日期:2016-10-31

基金项目:国家自然科学基金(81270963,81471090)

第一作者:方清清(1988—),女,硕士研究生,主要从事低频电磁场防治骨质疏松症的研究,E-mail: qingqinggsz@126.com; http://orcid.org/0000-0003-0996-2639

通讯作者:陈克明(1968—),男,博士,教授,博士生导师,主要从事骨质疏松症的机制和防治研究,E-mail: chenkm@lut.cn; http://orcid.org/0000-0002-9749-8356

pulsed electromagnetic fields (PEMF) on rat calvarial osteoblasts (ROB) differentiation. **Methods:** ROB were achieved by enzyme digestion, and treated with 50 Hz 0.6 mT PEMFs for 1.5 hours after subculture. The alkaline phosphatase (ALP) activity, mRNA transcription of ALP, Runx2 and OSX and protein expression of Runx2 and OSX were detected at 0, 3, 6, 9 and 12 hours after PEMF treatment. **Results:** The ALP activity at 3 hours after treatment was significantly higher than that in the control ( $P < 0.01$ ), while the mRNA transcription of ALP began to increase at 6 hours after treatment. The mRNA transcription of Runx2 increased immediately after treatment and regressed at 6 hours, then increased again. The protein expression of it corresponded but with a little lag. The mRNA transcription of OSX also raised instantly after treatment, then returned to the level of control at 6 hours, and lower than control at 12 hours significantly. The protein expression of it also corresponded but with a bit delay. **Conclusions:** There are genic regulation for the protein expression of Runx2 and OSX, and non-genic regulation for the ALP activity on the process of 50 Hz 0.6 mT PEMFs prompts ROB differentiation.

[ **Key words** ] Osteoblasts/radiation effects; Skull; Electromagnetic fields; Animals, newborn; Cells, cultured; Cell differentiation; Genes, regulator; Rats, Wistar

[ J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2016,45(6):568-574. ]

骨质疏松症是以骨密度降低、骨微结构破坏为特征,导致骨组织脆性增加和骨折危险性升高的一种常见老年骨病<sup>[1]</sup>。其在发病初期没有明显的症状,直到引起骨折,因此被称作“悄无声息的杀手”<sup>[2]</sup>。目前治疗骨质疏松症的方法主要有雌激素替代疗法和双膦酸盐疗法,但是都有一定的副作用<sup>[3]</sup>,因此人们试图寻找一种安全有效的骨质疏松症治疗方法。近年来,骨质疏松症的物理疗法成为一个热门话题,大量文献表明,电磁场可以促进成骨细胞分化成熟<sup>[4,6]</sup>,然而其中作用机制不明。

细胞是一个多层次、非线性、复杂的系统<sup>[7]</sup>,通过各方面的协调感知外界环境的刺激,完成一系列生理生化反应以维持自身的稳态。激素类物质在这个过程中发挥着重要作用,其经被动扩散进入细胞后与受体结合,使受体构象发生变化而暴露核定位序列,进而与激素反应元件结合,启动相关基因的转录,引起相应的生物学效应,被称为基因组效应。此外,其也可以与质膜表面受体结合或与质膜上的其他蛋白相互作用,启动信号级联,引起细胞快速的应激反应,被称为非基因组效应<sup>[8]</sup>。非基因组效应又分为特异性非基因组效应和非特异性非基因组效应,其中特异性非基因

组效应主要通过细胞膜上的膜受体或细胞质中的受体介导,而非特异性非基因组效应主要通过细胞膜的直接物理化学反应调节基因的表达<sup>[9]</sup>。在细胞的代谢调节过程中,基因组效应和非基因组效应往往相互重叠,即非基因组效应最终会引起基因转录的改变<sup>[10]</sup>。那么脉冲电磁场(pulsed electromagnetic fields, PEMF)在促进成骨细胞矿化成成熟的过程中是否也存在基因调节和非基因调节?对此本文进行了研究,以期进一步了解电磁场促进骨形成的机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 低频电磁场细胞处理仪

实验所用极低频电磁场细胞处理仪由本课题组自行研制(发明专利号:ZL2011 10423102.0)。整套装置由电脑控制系统、数模转化装置、信号放大装置、线圈、磁场传感器及温度传感器等组成。其中线圈使用 Opera 3D 大型磁场工程软件辅助设计完成,长 27 cm,由三组相互串联的不同匝数的线圈缠绕内径为 10 cm 的螺线管而成,可在其内部 120 mm × 90 mm × 90 mm 的区域内产生频率为 5 ~ 200 Hz,强度为 0.0 ~ 9.0 mT 的大范围均匀磁场(均匀偏差值 < 5%),确保 60 mm 培养皿

内所有细胞受到相同均匀磁场处理。实验过程中,为保证细胞不受除电磁场以外的其他因素影响,线圈置于细胞培养箱中,通过导线与外部装置连接。

## 1.2 实验动物及材料

出生 48 h 以内的 SPF 级 Wistar 大鼠[甘肃省中医药大学动物实验中心,合格证号:SCXK(甘)2004-0006-152]; $\alpha$ -MEM 培养基(Gibco,美国);胎牛血清(兰州民海生物工程有限公司);胰蛋白酶(西安科昊生物工程有限责任公司);II 型胶原酶(Gibco,美国);碱性磷酸酶(alkaline phosphates, ALP)试剂盒(南京建成生物工程研究所);RNAiso Plus 试剂、PrimeScript™ 试剂盒、PCR 扩增试剂盒(大连宝生物工程有限公司);PIRA 蛋白裂解液(北京普利莱基因技术有限公司);苯甲基磺酰氟(PMSF)、5×蛋白上样缓冲液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒、ECL Plus 超敏发光液(北京索莱宝科技有限公司);Runt 相关转录因子 2(Runx2)抗体、Osterix(OSX)抗体(Abcam,美国); $\beta$ -actin 抗体(BioWorld Technology,美国);辣根过氧化物酶标二抗(上海碧云天生物技术有限公司)。

## 1.3 大鼠颅骨成骨细胞(rat calvarial osteoblasts, ROB)的分离和培养

如文献[11]所述,取出生 48 h 以内的 Wistar 大鼠 5 只,置于 75% 的乙醇中消毒后处死,取颅骨,剔除血管、结缔组织等,PBS 漂洗后剪成约 2 mm<sup>2</sup> 的骨碎片置于培养瓶中,加入约 3 mL 0.25% 的胰蛋白酶 37 °C 水浴消化 10 min,弃消化液,重复一次,换用 0.1% 的 II 型胶原酶 37 °C 水浴消化 10 min,弃消化液,之后用 0.1% 的 II 型胶原酶 37 °C 水浴消化三次,每次 20 min,其消化液收集于装有约 10 mL 含 10% 胎牛血清的  $\alpha$ -MEM 培养液的培养瓶中,200 目细胞筛过滤除去残余骨片,以相对离心力 175.6 × g 离心 10 min,弃上清液,细胞沉淀经重悬后调整密度至 3 × 10<sup>4</sup> 细胞/mL,接种于 90 mm 培养皿中,置于 37 °C 5% 二氧化碳培养箱中培养,待细胞生长至 90% 以上融合时,用 0.25% 的胰蛋白酶消化传代用于实验。

## 1.4 比色法测定 ALP 活性

P1 代 ROB 生长至完全融合时随机分为对照组、0 h 组、3 h 组、6 h 组、9 h 组和 12 h 组。除对照组不作任何处理外,其余各组经电磁场处理 1.5 h 后分别于 0、3、6、9、12 h 后检测其 ALP 活

性。测定方法如试剂盒说明书所述,即弃培养液,PBS 漂洗三次后加入基质液和缓冲液各 250  $\mu$ L,轻微振荡混匀后 37 °C 孵育 15 min,加入显色液 750  $\mu$ L,轻微振荡混匀后于波长 520 nm 处测定吸光度值,通过换算获得细胞 ALP 活性值。

## 1.5 实时荧光定量 RT-PCR 检测成骨基因表达

P1 代 ROB 生长至完全融合时按照 1.4 所述分组并进行相应处理,之后弃培养液,PBS 漂洗三次,加入 1 mL RNAiso Plus 试剂裂解细胞,收集细胞裂解液,加入 200  $\mu$ L 氯仿,振荡混匀后 4 °C 14 006 × g 离心 15 min,吸取上清液加入等体积的异丙醇,轻微上下颠倒混匀后 4 °C 14 006 × g 离心 15 min,弃上清液,加入 1 mL 75% 的乙醇清洗沉淀,4 °C 14 006 × g 离心 15 min,弃上清液后加入适量 DEPC 水溶解沉淀,紫外分光光度计于波长 230、260、280、320 nm 处检测 RNA 质量,根据 RNA 浓度使用 PrimeScript™ 试剂盒递转录:37 °C 15 min,85 °C 5 s,递转录产物 cDNA 使用 PCR 扩增试剂盒扩增:95 °C 30 s 变性,95 °C 5 s 退火,60 °C 31 s 延伸,40 个循环。引物序列见表 1。数据使用 2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup> 法进行分析。

表 1 实时荧光定量 RT-PCR 引物序列一览表

Table 1 Primer sequences

基因	引物序列
Gapdh	正向:5'-GGCACACTCAAGGCTGAGAATC-3'
	反向:5'-ATGCTGGTGAAGACGCCAGTA-3'
ALP	正向:5'-CACGTTGACTCTGCTTACTGCTCA-3'
	反向:5'-CCTTGTAAACCAGGCCCGTTG-3'
Runx2	正向:5'-GCACCCAGCCCAATAGA-3'
	反向:5'-TTGGAGCAAGCAGAACCC-3'
OSX	正向:5'-GCCTACTTACCCGCTGACTTT-3'
	反向:5'-CCCCACTATGCCAACTGC-3'

## 1.6 蛋白质印迹法检测成骨蛋白表达

P1 代 ROB 生长至完全融合时按照 1.4 所述分组并进行相应处理,之后弃培养液,PBS 漂洗三次,加入 400  $\mu$ L(含 1% PMSF)PIRA 蛋白裂解液裂解细胞,收集细胞裂解液,4 °C 14 006 × g 离心 30 min,收集上清液,取 25  $\mu$ L 使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白质浓度,剩余上清液中加入 1/4 体积的上样缓冲液,沸水浴 10 min,取 20  $\mu$ g 进行 SDS-PAGE,然后电转至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,一抗 4 °C 孵育过夜,TBST 清洗(8 min × 4)后二抗室温孵育 2 h,

TBST 清洗 (8 min × 4) 后使用 ECL Plus 超敏发光液发光显影, 结果条带使用 IPP 6.0 软件进行量化处理。

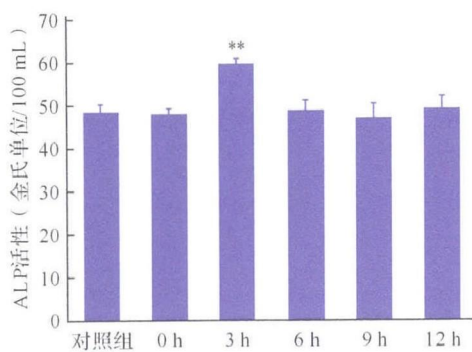
### 1.7 统计学方法

所有实验均重复三次, 采用 SPSS 20.0 统计软件分析, 结果以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 组间多重比较采用 LSD 方法, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 电磁场处理后不同时间 ALP 活性的变化

P1 代 ROB 经电磁场处理后 0、3、6、9 和 12 h 检测 ALP 活性, 结果如图 1 所示。ALP 活性在电磁场处理后 3 h 出现峰值, 与对照组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 而其他各组 ALP 活性与



与对照组比较, \*\*  $P < 0.01$ 。

图1 电磁场处理后不同时间大鼠颅骨成骨细胞中碱性磷酸酶 (ALP) 活性的变化

Figure 1 Alkaline phosphates (ALP) activity in calvarial osteoblasts of rats received pulsed electromagnetic fields treatment

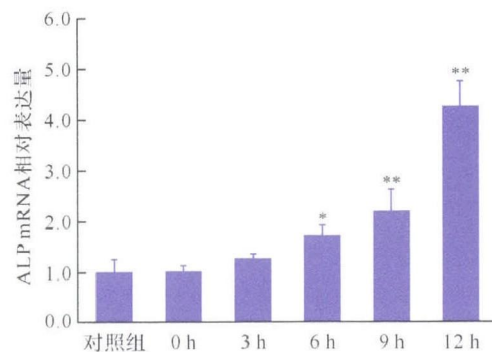
对照组比较差异均无统计学意义 (均  $P > 0.05$ ), 说明电磁场处理可引起 ROB ALP 活性的短暂升高。

### 2.2 电磁场处理后不同时间 ALP 基因表达的变化

电磁场处理后 0、3、6、9 和 12 h 时 ALP 基因表达变化如图 2。ALP 的表达量在电磁场处理后 6 h 升高 ( $P < 0.05$ ), 之后继续升高, 与 ALP 活性变化不对应, 提示电磁场处理后 3 h 时 ALP 活性的短暂升高并非由于 ALP 基因表达的升高而致。

### 2.3 电磁场处理后不同时间 Runx2 和 OSX 基因表达的变化

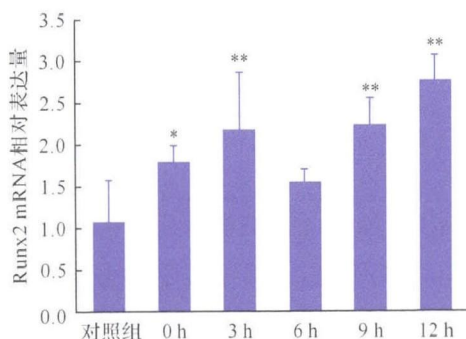
电磁场处理后不同时间 ROB 中 Runx2 和 OSX 的 mRNA 表达结果如图 3 所示。Runx2 的表达量在处理后立即升高 (与对照组比较,  $P < 0.05$ ), 3 h 时继续升高, 6 h 时回归对照组水平 (与对照组比较,  $P > 0.05$ ), 9 h 时再次升高, 之后继



与对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

图2 电磁场处理后不同时间大鼠颅骨成骨细胞中碱性磷酸酶 (ALP) 基因表达的变化

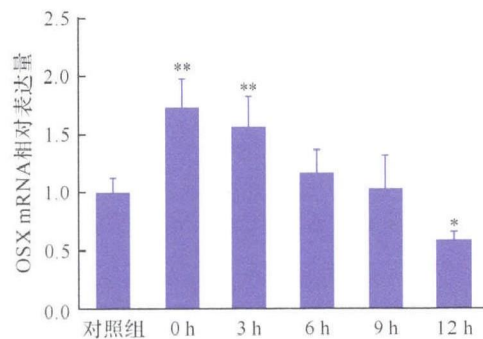
Figure 2 mRNA expression of ALP in calvarial osteoblasts of rats received pulsed electromagnetic fields treatment



与对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

图3 电磁场处理后不同时间大鼠颅骨成骨细胞中 Runx2 和 OSX 基因表达的变化

Figure 3 mRNA expression of osteogenic genes in calvarial osteoblasts of rats received pulsed electromagnetic fields treatment



续升高;OSX 的表达量在电磁场处理后亦立即升高( $P < 0.01$ ),持续至处理后 3 h 后下降,至 6 h 时回归对照组水平(与对照组比较, $P > 0.05$ ),至 12 h 时低于对照组(与对照组比较, $P < 0.05$ ),提示电磁场处理引起了 ROB 骨形成相关因子 Runx2 和 OSX 基因表达的升高。

#### 2.4 电磁场处理后不同时间 Runx2 和 OSX 蛋白表达的变化

为了解经电磁场处理后 ROB 基因与蛋白表达的对应性,检测了 Runx2 和 OSX 的蛋白表达水平,结果如图 4、5 所示。Runx2 的表达量在处理后立即升高(与对照组比较, $P < 0.01$ ),至 9 h 时回归对照组水平(与对照组比较, $P > 0.05$ ),12 h 时再次升高(与对照组比较, $P < 0.01$ );OSX 的表达量在处理后亦立即升高(与对照组比较, $P < 0.05$ ),之后继续升高(与对照

组比较, $P < 0.01$ ),持续至处理后 6 h,于 9 h 时回归对照组水平(与对照组比较, $P > 0.05$ )。上述蛋白表达水平变化与 Runx2 和 OSX 基因表达存在一定的对应性,提示电磁场通过影响 Runx2 和 OSX 的转录而改变其蛋白的表达水平。

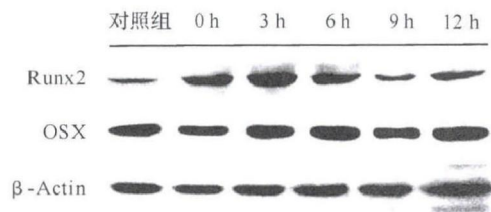
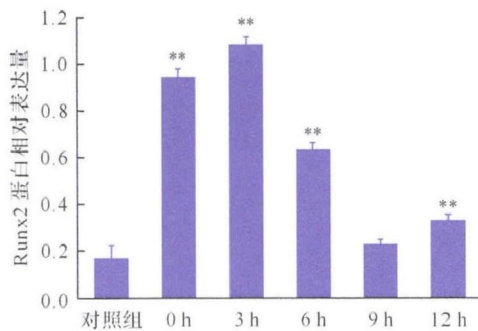


图4 电磁场处理后不同时间大鼠颅骨成骨细胞中 Runx2 和 OSX 蛋白表达的电泳图

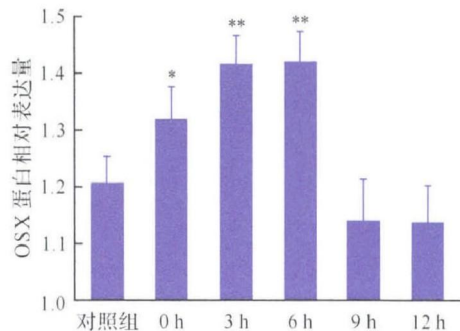
Figure 4 Electrophoretogram of Runx2 and OSX expression in calvarial osteoblasts of rats received pulsed electromagnetic fields treatment



与对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

图5 电磁场处理后不同时间大鼠颅骨成骨细胞中 Runx2 和 OSX 蛋白表达的变化

Figure 5 Protein expression of Runx2 and OSX in calvarial osteoblasts of rats received pulsed electromagnetic fields treatment



### 3 讨论

PEMF 已广泛用于促进骨折愈合及一系列相关骨病的治疗<sup>[12-13]</sup>,但其发挥作用存在“窗效应”<sup>[14]</sup>。本课题组研究发现,50 Hz 0.6 mT PEMF 作用 1.5 h 能够显著促进大鼠 ROB 矿化成熟<sup>[15-16]</sup>,但作为一种物理疗法,其具体的作用机制尚不明确。力学载荷在维持生物骨量方面发挥重要作用,研究显示其通过活化雌激素受体  $\alpha$ 、 $\beta$ ,以非配体依赖的方式激活相关信号级联反应,促进骨形成<sup>[17-18]</sup>。进一步的研究表明,其引起的成骨效应与雌激素所产生的成骨效应属同一途径<sup>[19]</sup>。而雌激素发挥作用存在基因组效应和非基因组效应,在骨代谢调节方面主要通过非基因

组效应起作用<sup>[20]</sup>。那么同作为物理刺激,电磁场是否与力学载荷作用类似,通过非基因调节促进骨形成?对此本文通过检测电磁场处理后不同时间 ROB 成骨性基因、蛋白表达的变化以及 ALP 活性的变化发现,电磁场通过不同机制多角度促进骨形成。

ALP 活性与骨组织钙化息息相关<sup>[21]</sup>,是成骨细胞外基质矿化成熟的早期标志。本文通过检测 ALP 活性及 ALP 基因的表达发现,ALP 活性在电磁场处理后 3 h 升高,但 ALP 基因却没有与其相对应,而是在处理后逐渐升高,至 6 h 时才高于对照组,之后继续升高,表明在电磁场处理后 3 h 时 ALP 活性的短暂升高并非由于其基因表达的升高而引起,而是由于其他因素。有研究显示,电磁场

可以调节离子酶的活性<sup>[22]</sup>,而 ALP 属金属酶,活性部位由 Asp-Ser-Ala、空间上相互靠近的两个锌离子、镁离子及配体组成<sup>[23]</sup>。金属离子在酶发挥催化作用时起重要作用,电磁场或许影响了金属离子,进而影响了酶与底物的定向,从而提高了酶活性。同时电磁场也可能通过激活一系列信号级联反应而影响 ALP 的活性<sup>[24]</sup>。因此我们推测电磁场在促进骨形成的过程中存在对 ALP 活性的非基因调节。

Runx2 和 OSX 作为转录因子,可以活化骨钙素、I 型胶原等的表达,是成骨性分化的重要指标<sup>[25]</sup>,本研究通过检测 Runx2 和 OSX 的基因及蛋白表达发现,电磁场处理后 Runx2 基因的表达迅速升高,延续至处理后 6 h 时回归对照组水平,之后再次升高,其蛋白的表达与之相对应;OSX 基因的表达亦在处理后立即升高,持续至处理后 6 h 时降至对照组水平,其蛋白表达亦与之对应,表明电磁场通过影响 Runx2、OSX 基因的表达而影响其蛋白的表达。因此我们推测电磁场在促进骨形成的过程中存在对转录因子 Runx2 和 OSX 的基因调节。

自 1977 年 Bassett 使用脉冲电磁场成功治愈一例骨折病例以来,电磁场已广泛应用于骨质疏松症等一系列相关骨病的治疗<sup>[26]</sup>。然而作为一种物理刺激,其不存在直接的、特异性的细胞因子及其靶点,也因此导致其具体的作用机制至今仍不十分明确。本研究通过检测电磁场处理后不同时间 ROB 的 ALP 活性、骨形成相关因子基因及蛋白的表达,推测电磁场促进骨形成不仅存在基因调节,而且存在非基因调节。然而电磁场作为一种能量表现形式引起这些效应的机制,有待进一步研究。

## 参考文献

- [1] KANIS J A, MELTON L J, CHRISTIANSEN C, et al. The diagnosis of osteoporosis[J]. *J Bone Miner Res*, 1994, 9(8):1137-1141.
- [2] KULAR J, TICKNER J, CHIM S M, et al. An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level[J]. *Clin Biochem*, 2012, 45(12): 863-873.
- [3] LI X D, LIU Z Y, CHANG B, et al. Panax notoginseng saponins promote osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells through the ERK and p38 MAPK signaling pathways [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2011, 28(2):367-376.
- [4] MARTINO C F, BELCHENKO D, FERGUSON V, et al. The effects of pulsed electromagnetic fields on the cellular activity of SaOS-2 cells [J]. *Bioelectromagnetics*, 2008, 29(2):125-132.
- [5] WIESMANN H P, HARTIG M, STRATMANN U, et al. Electrical stimulation influences mineral formation of osteoblast-like cells *in vitro* [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1538(1):28-37.
- [6] TAYLOR K F, INOUE N, RAFIEE B, et al. Effect of pulsed electromagnetic fields on maturation of regenerate bone in a rabbit limb lengthening model [J]. *J Orthop Res*, 2006, 24(1):2-10.
- [7] 翟中和,王喜忠,丁明孝. 细胞生物学[M]. 2版. 北京:高等教育出版社,2000:19. ZHAI Zhonghe, WANG Xizhong, DING Mingxiao. *Cell biology* [M]. 2nd ed. Beijing: Higher Education Press, 2000:19. (in Chinese)
- [8] 孙大业,崔素娟,孙颖. 细胞信号转导[M]. 4版. 北京:科学出版社,2010:68-69. SUN Daye, CUI Sujuan, SUN Ying. *Cellular signal transduction* [M]. 4th ed. Beijing: Science Press, 2010:68-69. (in Chinese)
- [9] 鞠辉明,陈星云,刘宗平,等. 糖皮质激素非基因组效应的研究[J]. 现代生物医学进展,2009,9(14): 2741-2744. JU Huiming, CHEN Xingyun, LIU Zongping, et al. Research on non-genomic glucocorticoid effects [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2009, 9(14): 2741-2744. (in Chinese)
- [10] DAVIS P J, LIN H Y, MOUSA S A, et al. Overlapping nongenomic and genomic actions of thyroid hormone and steroids [J]. *Steroids*, 2011, 76(9):829-833.
- [11] ZHOU J, MING L G, GE B F, et al. Effects of 50Hz sinusoidal electromagnetic fields of different intensities on proliferation, differentiation and mineralization potentials of rat osteoblasts [J]. *Bone*, 2011, 49(4):753-761.
- [12] SCHWARTZ Z, FISHER M, LOHMANN C H, et al. Osteoprotegerin (OPG) production by cells in the osteoblast lineage is regulated by pulsed electromagnetic fields in cultures grown on calcium phosphate substrates [J]. *Ann Biomed Eng*, 2009, 37(3):437-444.
- [13] LI K, MA S, LI Y, et al. Effects of PEMF exposure at different pulses on osteogenesis of MC3T3-E1 cells [J]. *Arch Oral Biol*, 2014, 59(9):921-927.
- [14] MANNI V, LISI A, RIETI S, et al. Low

- electromagnetic field (50 Hz) induces differentiation on primary human oral keratinocytes (HOK) [J]. **Bioelectromagnetics**, 2004, 25(2):118-126.
- [15] YAN J L, ZHOU J, MA H P, et al. Pulsed electromagnetic fields promote osteoblast mineralization and maturation needing the existence of primary cilia [J]. **Mol Cell Endocrinol**, 2015, 404:132-140.
- [16] 周建,葛宝丰,陈克明,等. 正弦交变电磁场促进体外培养成骨细胞成熟矿化的时间效应[J]. **生物医学工程学杂志**, 2011, 28(6):1085-1088. ZHOU Jian, GE Baofeng, CHEN Keming, et al. Time effect of sinusoidal electromagnetic on enhancing the maturation and mineralization of osteoblast *in vitro* [J]. **Journal of Biomedical Engineering**, 2011, 28(6):1085-1088. (in Chinese)
- [17] WINDAHL S H, SAXON L, BÖRJESSON A E, et al. Estrogen receptor- $\alpha$  is required for the osteogenic response to mechanical loading in a ligand-independent manner involving its activation function 1 but not 2 [J]. **J Bone Miner Res**, 2013, 28(2):291-301.
- [18] ACUIRRE J I, PLOTKIN L I, GORTAZAR A R, et al. A novel ligand-independent function of the estrogen receptor is essential for osteocyte and osteoblast mechanotransduction [J]. **J Biol Chem**, 2007, 282(35):25501-25508.
- [19] GALEA C L, PRICE J S, LANYON L E. Estrogen receptors' roles in the control of mechanically adaptive bone (re) modeling [J]. **Bonekey Rep**, 2013, 2:413.
- [20] KOUSTENI S, CHEN J R, BELLIDO T, et al. Reversal of bone loss in mice by nongenotropic signaling of sex steroids [J]. **Science**, 2002, 298(5594):843-846.
- [21] JI Z, CHENG Y, YUAN P, et al. Panax notoginseng stimulates alkaline phosphatase activity, collagen synthesis, and mineralization in osteoblastic MC3T3-E1 cells [J]. **In Vitro Cell Dev Biol Anim**, 2015, 51(9):950-957.
- [22] VOJISAVLJEVIC V, PIROGOVA E, COSIC I. Review of studies on modulating enzyme activity by low intensity electromagnetic radiation [J]. **Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc**, 2010, 2010:835-838.
- [23] 王秋颖. 碱性磷酸酶特性及其应用的研究进展 [J]. **中国畜牧兽医**, 2011, 38(1):157-161. WANG Qiuying. Advances on characteristic and application of alkaline phosphatase [J]. **China Animal Husbandry & Veterinary Medicine**, 2011, 38(1):157-161. (in Chinese)
- [24] TANG J, YUAN Z, YANG L, et al. Exposure to 900MHz electromagnetic fields activates the mmp-1/ERK pathway and causes blood-brain barrier damage and cognitive impairment in rats [J]. **Brain Res**, 2015, 1601:92-101.
- [25] SOLTANOFF C S, YANG S, CHEN W, et al. Signaling networks that control the lineage commitment and differentiation of bone cells [J]. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr**, 2009, 19(1):1-46.
- [26] TABRAH F, HOFFMEIER M, GILBERT F, et al. Bone density changes in osteoporosis-prone women exposed to pulsed electromagnetic fields (PEMFs) [J]. **J Bone Miner Res**, 1990, 5(5):437-442.

[本文编辑 黎仕娟 余方]

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 作者投稿时请提供 ORCID

开放研究者与贡献者身份识别码(open researcher and contributor identifier, ORCID)是由汤森路透和自然出版集团等单位于2009年共同发起创建的,其意义与科学文献领域的DOI(数字对象标识符)类似:DOI为科技文献的身份证,一文一证;ORCID为科研人员的学术身份证,一人一证。若尚未获取ORCID的作者请先登录<http://orcid.org>,进入网站注册(register)后免费获取ORCID。本刊从2015年第3期起在作者信息栏添加ORCID,即<http://orcid.org>/后16位数字。如贺晶ORCID为0000-0002-9579-9593,作者信息最后加上[http://orcid.org/0000-0002-9579-9593](http://orcid.org)。