

极低频电磁暴露对钙离子跨膜迁移的影响及机理分析

周永军¹,张辉¹,牛中奇²

1. 咸阳师范学院物理与电子工程学院, 陕西 咸阳 712000; 2. 西安电子科技大学电子工程学院, 陕西 西安 710071

【摘要】目的:研究极低频(ELF)电磁暴露对细胞钙离子跨膜迁移的影响。**方法:**以人体肝癌细胞为对象,激光扫描共聚焦显微镜为检测手段,研究细胞钙离子跨膜迁移对ELF电磁暴露的响应。**结果:**在磁场强度为 1.78×10^{-7} T条件下,与对照组对比,各暴露组均对不同频率和电场强度组合的外加电磁暴露环境有响应,其中 $f=16$ Hz且 $E_p=53$ V/m、 $f=45$ Hz且 $E_p=53$ V/m以及 $f=16$ Hz且 $E_p=80$ V/m的电磁暴露可使钙离子跨膜迁移量显著上升,而 $f=32$ Hz且 $E_p=53$ V/m、 $f=60$ Hz且 $E_p=53$ V/m、 $f=16$ Hz且 $E_p=26$ V/m以及 $f=16$ Hz且 $E_p=87$ V/m的电磁暴露未使钙离子跨膜迁移量显著上升。**结论:**不同频率和电场强度组合的ELF电磁暴露均会引起钙离子跨膜迁移量产生变化且呈现出明显差异,这可为ELF电磁环境下生物学应用提供实验依据;注重细胞膜离子通道物理、生物特性基础上探讨ELF电磁暴露对钙离子跨膜迁移影响的机理。

【关键词】极低频电磁暴露;钙离子;跨膜迁移;影响;机理

【中图分类号】R318

【文献标志码】A

【文章编号】1005-202X(2019)01-0112-05

Effects of extremely low frequency electromagnetic exposure on calcium ion transmembrane migration and mechanism analysis

ZHOU Yongjun¹, ZHANG Hui¹, NIU Zhongqi²

1. School of Physics and Electronic Engineering, Xianyang Normal University, Xianyang 712000, China; 2. School of Electric Engineering, Xidian University, Xi'an 710071, China

Abstract: Objective To study the effects of extremely low frequency (ELF) electromagnetic exposure on calcium ion transmembrane migration. **Methods** The human hepatoma cells were taken as the subjects in this study. The responses of calcium ion transmembrane migration to ELF electromagnetic exposure were detected by laser scanning confocal microscopy. **Results** Under the condition that the magnetic field strength remained at 1.78×10^{-7} T, the transmembrane migration of calcium ion in exposure groups was responded to the applied electromagnetic exposure environment with different properties. With the frequency (f) of 16 Hz or 45 Hz and electric field peak (E_p) of 53 V/m, f of 16 Hz and E_p of 80 V/m, the ELF electromagnetic exposure made calcium ion transmembrane migration increased significantly, while calcium ion transmembrane migration wasn't increased significantly under the exposure with f of 32 Hz or 60 Hz and E_p of 53 V/m, f of 16 Hz and E_p of 26 V/m or 87 V/m. **Conclusion** The combination of different frequencies and electric field peaks of ELF electromagnetic exposure can increase calcium ion transmembrane migration, and the differences are significant, which provides experimental basis for the biological application of ELF electromagnetic exposure. The mechanism of the effects of ELF electromagnetic exposure on calcium ion transmembrane migration should be discussed based on the physical and biological characteristics of cell membrane ion channels.

Keywords: extremely low frequency electromagnetic exposure; calcium ion; transmembrane migration; influence; mechanism

【收稿日期】2018-07-17

【基金项目】陕西省科技研究发展计划项目(2016JM6053);陕西省教育厅专项科研计划项目(18JK0831);咸阳师范学院科研基金项目(14XSYK009);咸阳师范学院教改项目(201402010);陕西省大学生创新创业训练计划项目(2510);咸阳师范学院创新创业训练计划项目(2017079);咸阳师范学院科研项目(XSYK18094)

【作者简介】周永军,副教授,研究方向:电磁场与微波技术,E-mail:hoozyj@tom.com

前言

极低频(Extremely Low Frequency, ELF)电磁环境是指频率在3~1 000 Hz的交变电磁场环境^[1]。随着工业化、信息化技术的快速发展及其产品的广泛使用,人类无时无刻不暴露在ELF电磁环境中且暴露的ELF电磁功率密度也越来越大。早在1975年就有环境科学家预言,人类生存环境空间电磁能量密

度将每年增加7%~14%,照此速度,2125年人类生存环境空间电磁能量密度是1975年的700倍^[2]。毫无疑问,ELF电磁环境污染将是今后人类所面临且必须应对的问题之一。

自1979年Wertheimer等^[3]首次报道大电流配电站附近ELF电磁暴露感应强度高与儿童癌症发病率相关以来,ELF电磁暴露对健康影响问题受到了越来越多的关注^[4-6]。目前,虽然ELF电磁暴露生物效应研究已从流行病学调查逐步深入到细胞及分子水平,但对ELF电磁暴露生物学效应,如量效关系、效应阈值、致伤机理等方面仍缺乏令人信服的结论。因此,继续深入开展ELF电磁暴露生物学效应研究仍具有十分重要的意义。

众所周知,细胞是生物体形态结构和生命活动的基本单位,细胞无论是在培养中或在肌体内,其行为的基本规律是一样的,加之实验过程在某种程度上是在可控环境中进行且基于细胞的机理分析研究对象又相对清晰,所以建立在细胞基础上的实验研究、机理分析仍然是探索ELF电磁生物学效应的重要手段。

细胞内自由钙离子作为维持细胞正常新陈代谢和生理机能的第二信使,控制着细胞的许多生理、生化过程,而ELF电磁环境是包含人类在内整个生物界生存和发展的一个重要环境因素。有研究表明,胞间信号分子(如胰岛素)和胞内第二信使(自由钙离子)等是电磁场与细胞相互作用的重要场所^[7-9]。所以,研究ELF电磁暴露对细胞内自由钙离子跨膜迁移的影响及机理无疑对开展ELF电磁暴露的防护、合理开发利用从而促进人类健康发展具有重要意义。基于此,以人体肝癌细胞为研究对象,实验研究ELF电磁暴露对钙离子跨膜迁移的影响,在注重细胞膜离子通道物理、生物特性基础上探讨ELF电磁暴露对钙离子跨膜迁移影响的机理。

1 实验

1.1 实验试剂、设备和方法

1.1.1 试剂 (1)M1640培养基(Gibco Brc公司),小牛血清(杭州四季青生物工程材料研究所),Fluo-3(美国BIO-RAD产品),二甲基亚砜(DMSO),胰蛋白酶(华美生物工程公司);(2)Hank's液^[10](用国产分析纯和超纯水配制):NaCl 8.00 g/L;KCl 0.40 g/L;MgSO₄·7H₂O 0.20 g/L;Na₂HPO₄·12H₂O 0.12 g/L;KH₂PO₄ 0.06 g/L;CaCl₂ 0.14 g/L;NaHCO₃ 0.35 g/L。

1.1.2 仪器设备

(1)实验系统设备:YB1561功率信号函数发生器(江苏扬中电子仪器厂);YB2172交流毫伏表(江苏扬中电子仪器厂);V-252示波器,电磁暴露小室(西安电子科技大学电子工程学院);SWK-1温度控制仪;MC数字温度计;50Ω匹配负载;(2)LSCM激光扫描共聚焦显微镜。

1.2 细胞样品制备与荧光负载

1.2.1 细胞样品制备 将对数生长期人体肝癌细胞株(7721)经胰蛋白酶制成单层悬液,并用苔盼蓝染液计数检验细胞成活率,当成活率达95%以上时,将该单层悬液接种于特制的50 mm培养皿(培养皿下部中央开一个直径约为10 mm小孔,从下方粘贴一个盖玻片)底部的载玻片上,加入1640培养液(含10%小牛血清)置于含5%二氧化碳,温度37℃培养箱中孵育24 h。

1.2.2 荧光负载 将一支50 μg的Fluo-3荧光探针加入到50 μL的二甲基亚砜中,待荧光探针溶化后将其均匀分装在10个小瓶并存储于-20℃环境,取一小瓶并将其注入500 μL Hank's液后摇匀用于细胞荧光负载。细胞荧光负载时首先在24~35℃避光条件下用纯Hank's液(pH值为7.0±0.1)洗涤样本细胞2~3次,再将洗涤后的样本细胞同上述制备的含有Fluo-3的Hank's液一起孵育30 min(待细胞内聚集足够高浓度的荧光探针),再用纯Hank's液冲洗细胞样本多次以便彻底洗掉细胞外荧光探针,至此制备完成细胞样品荧光负载。

1.3 实验系统搭建及数据获得

1.3.1 实验系统搭建 为了观察ELF电磁暴露对钙离子跨膜迁移的影响,需将荧光负载后的细胞样品置于ELF电磁环境中暴露一定时间,同时考虑实验尽可能不污染环境及屏蔽外来电磁的干扰。本文采用第1.1.2节中所示仪器搭建实验系统的原理图如图1所示,其中温控设备一方面是为了满足生物样品的生理需求,另一方面是确保实验产生的非热生物效应不因温度原因而淹没。整个实验过程温度保持在(35.0±0.2)℃,磁场强度为1.78×10⁻⁷T。

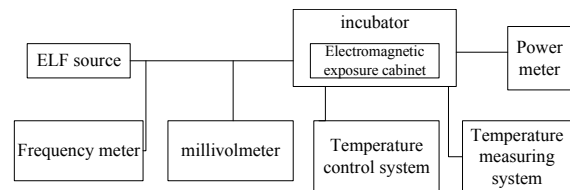


图1 实验系统原理图

Fig.1 Schematic diagram of experimental system

ELF: Extremely low frequency

1.3.2 实验数据获得 待细胞样品荧光负载后即刻用激光共聚焦扫描显微镜对细胞样品胞浆中的荧光强度和本底荧光强度(培养皿内细胞外培养基中残留的荧光强度)进行测量,被测细胞胞浆内荧光强度减去本底荧光强度便是对照组样品荧光强度数据,然后即刻将样品置入预设ELF电磁参数暴露小室内暴露20 min,再用激光共聚焦扫描显微镜样品细胞胞浆内荧光强度和本底荧光强度进行检测,被测细胞胞浆内荧光强度减去本底荧光强度便是暴露组样品荧光强度数据。在足够多样本上获得对照组和暴露组数据后,将暴露组和对照组数据进行统计处理便得到实验数据。

2 结果

样品细胞经ELF电磁暴露前后钙离子跨膜迁移量统计如表1所示。从表1所列7组数据可以看出, $f=16\text{ Hz}$ 且 $E_p=53\text{ V/m}$ 、 $f=45\text{ Hz}$ 且 $E_p=53\text{ V/m}$ 以及 $f=16\text{ Hz}$ 且 $E_p=80\text{ V/m}$ 的ELF电磁暴露可使暴露组样品钙离子迁移量显著高于对照组($P<0.001$, $P<0.005$, $P<0.001$); 而 $f=32\text{ Hz}$ 且 $E_p=53\text{ V/m}$ 、 $f=60\text{ Hz}$ 且 $E_p=53\text{ V/m}$ 、 $f=16\text{ Hz}$ 且 $E_p=26\text{ V/m}$ 以及 $f=16\text{ Hz}$ 且 $E_p=87\text{ V/m}$ 的ELF电磁暴露未使暴露组样品钙离子迁移量显著高于对照组($P>0.10$, $P>0.05$, $P>0.01$, $P>0.10$)。

表1 ELF电磁暴露对钙离子跨膜迁移的影响

Tab.1 Effects of ELF electromagnetic exposure on calcium ion transmembrane migration

| f/Hz | Electric field peak (E_p)/ $\text{V}\cdot\text{m}^{-1}$ | Group | Sample number | | | | | Reliability coefficient |
|---------------|--|----------|---------------|------|------|------|------|-------------------------|
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | P value |
| 16 | 53 | Exposure | 3.35 | 2.35 | 2.32 | 2.40 | 3.62 | <0.001 |
| | | Control | 6.34 | 7.86 | 8.38 | 6.22 | 7.08 | |
| 32 | 53 | Exposure | 2.43 | 3.16 | 3.28 | 2.94 | 3.07 | >0.100 |
| | | Control | 2.62 | 3.02 | 2.89 | 2.20 | 2.77 | |
| 45 | 53 | Exposure | 0.66 | 3.15 | 2.85 | 2.94 | 2.50 | <0.005 |
| | | Control | 3.50 | 6.91 | 4.33 | 7.76 | 6.31 | |
| 60 | 53 | Exposure | 2.67 | 3.11 | 3.71 | 4.42 | 3.70 | >0.050 |
| | | Control | 2.43 | 3.52 | 1.69 | 2.47 | 2.75 | |
| 16 | 26 | Exposure | 3.21 | 4.07 | 2.62 | 2.87 | 4.22 | >0.100 |
| | | Control | 2.14 | 3.59 | 2.19 | 3.42 | 3.12 | |
| 16 | 80 | Exposure | 2.46 | 1.42 | 1.16 | 2.41 | 1.35 | <0.001 |
| | | Control | 3.09 | 4.03 | 3.50 | 3.41 | 3.38 | |
| 16 | 87 | Exposure | 4.53 | 2.15 | 5.97 | 3.78 | 1.76 | >0.100 |
| | | Control | 4.91 | 4.47 | 4.98 | 2.15 | 4.79 | |

3 讨论

当暴露组数据与对照组数据存在显著性差异时,才认为该组ELF电磁暴露可显著影响钙离子跨膜迁移率,否则认为该组ELF电磁暴露未影响细胞内自由钙离子跨膜迁移率。

从实验结果可知并非实验所用ELF电磁暴露均能显著影响钙离子跨膜迁移,另外由于ELF电磁暴露携带能量很低(几乎淹没于分子的热运动),钙离子是如何获得ELF电磁暴露所提供的能量实现跨膜迁移? 科研工作者虽已从不同角度提出多种理论进

行阐释,但至今仍缺乏令人信服的结论^[11]。

有研究表明细胞内、外离子迁移是通过跨接在细胞膜两端由 α -螺旋蛋白质分子构成的离子通道来完成,而离子通道存在一定势垒,且其势垒呈现出两端较高,中间沿轴线呈周期性分布的特点^[12]。对于本文而言,影响钙离子跨膜迁移的因子只有ELF电磁环境,由于其携带的能量很低(几乎淹没于分子的热运动),那么细胞内带电粒子是如何克服离子通道内势垒阻碍产生显著迁移? 有研究表明细胞里的各种“细胞器”均包裹在由磷脂形成的双分子膜里,它既非液体、亦非固体,而更接近液体晶体^[13];生物组

织是以细胞为基元吸收电磁能量的^[14-15];细胞膜是ELF电磁作用的初始靶点^[16]。当作用于介质的外部场强达 10^7 V/m量级时,介质就会表现出明显的非线性特征^[17]。对跨越在细胞膜两端由 α -螺旋蛋白质分子构成的离子通道而言,其内部场强却已达到这个数量级(这是因为正常新陈代谢细胞膜内外存在 10^2 mV静息膜电位,而细胞膜厚度为10 nm量级),因此细胞膜离子通道的非线性极化特性就不容忽视。细胞膜离子通道的非线性特性可使入射电磁能量聚焦在一定区域内,从而使该区域的带电粒子获得远大于入射电磁能量的能量,从而实现跨越一个或多个势垒做轴向运动,当在运动后的位置上再次获得能量时,便可再次跨越一个或多个势垒,此过程周而复始直至离子穿出离子通道。但是根据表1看到,并非所有高于某个阈值的电磁能量都可引起生物学效应,这又是什么原因?离子通道内沿轴线周期性势垒分布意味着带电粒子要沿着轴向运动所需能量是某一基本能量单元的整数倍,而这个基本能量单元 W_0 与势垒高度 U 的关系为:

$$W_0 = qU \quad (1)$$

其中, q 为带电粒子的电量, U 为周期性分布势垒的振幅。如果要能够跨越一个或几个势垒,则带电粒子所获得的能量就应为基本能量单元的一倍或几倍,即:

$$W_n = nW_0 \quad (n = 1, 2, 3 \dots) \quad (2)$$

这就要求为带电粒子提供能量的聚焦于局部区域电磁场能量应是以势垒高度为基本能量单元的整数倍。在离子通道自身聚焦特性确定条件下,聚焦于局部电磁能量与入射电磁能量有确定性关系,而电磁场能量又与电场强度平方成正比例,故要求入射电磁场电场强度也要满足一定比例关系时(即具有量子化特征)才能显著影响带电粒子跨膜迁移(即只有特定电场强度的ELF电磁暴露才能显著影响带电粒子跨膜迁移)。

另外从表1还可看出要产生生物学效应,除了电场强度满足上述条件外,入射电磁场频率也要满足一定要求。由于细胞膜离子通道具有单向通透性,因此在ELF电磁的一个周期内,只有半个周期电场方向是沿场方向才能对带电粒子施加沿场方向运动的力促使其跨膜迁移。故带电粒子沿场方向跨越一个势垒所用时间 τ 与ELF电磁周期 T 间必须满足以下关系:

$$n\tau = T/2 \quad (n = 1, 2, 3 \dots) \quad (3)$$

其中, n 为半个周期内跨越势垒个数。式(3)表明只有ELF电磁半个周期正好等于跨越一个势垒所需时

间 τ 的整数倍时,才有助于带电粒子跨越整数倍个势垒。这意味ELF电磁的周期也需满足一定的要求,由于频率和周期成倒数关系[即 $f = 1/T(\omega = 2\pi/T)$],结合式(3)可得:

$$f_n = 1/2n\tau \quad (4)$$

式(4)表明:(1)能使带电粒子跨越势垒的ELF电磁频率是一组离散的特定频率;(2)该组离散频率中有一阈值 f_c ,其它频率是该阈值的整数倍。这与实验结果相一致($f = 16$ Hz、 $f = 45$ Hz能促进离子跨膜迁移,而 $f = 60$ Hz不可以)。

本文研究ELF电磁暴露对钙离子跨膜迁移的影响,并在注重细胞膜离子通道物理、生物特性基础上探讨ELF电磁暴露对钙离子跨膜迁移的影响机理,这可为ELF电磁暴露风险评估及其合理开发利用提供具有一定参考价值的实验数据和理论依据。

【参考文献】

- [1] 陈惠晓,陈国璋.关于电磁场的非热生物学效应问题[C].杭州:第六届全国生物电磁学暨第二届全国微波生物医学学术论文集,1997:20-25.
CHEN H X, CHEN G Z. On the non-thermal biological effects of electromagnetic fields[C]. Hangzhou: the Academic Papers of the 6th National Bioelectromagnetism and the 2th National Microwave Biomedical, 1997: 20-25.
- [2] 高攸纲,刁庆安.再谈工频电磁场对人体健康的危害影响[C].成都:全国第二届毫米波医学应用及第一届电磁辐射生物学学术研讨会论文集,2001:4-6.
GAO Y G, DIAO Q A. Further discussion on the impact of power frequency electromagnetic field on human health[C]. Chengdu: Compilation of the Second National Millimeter Wave Medical Application and the First Academic Conference on Electromagnetic Radiation Biology, 2001: 4-6.
- [3] WERTHEIMER N, LEEPER E. Electrical wiring configurations and childhood cancer[J]. Am J Epidermiol, 1979, 109: 273-284.
- [4] 刘欣,赵龙宇,陈慧玲,等.极低频电磁场暴露对从业人员肝脏功能的影响[J].中华劳动卫生职业病杂志,2013,31(8):599-601.
LIU X, ZHAO L Y, CHEN H L, et al. Effect of exposure to extremely low-frequency electromagnetic fields on liver function of workers[J]. Chinese Journal of Industrial Hygiene and Occupational Diseases, 2013, 31(8): 599-601.
- [5] GRELLIER J, RAVAZZANI P, CARDIS E. Potential health impacts of residential exposures to extremely low frequency magnetic fields in Europe[J]. Environ Int, 2014, 62: 55-63.
- [6] 曲敏,毕卓悦,唐雨萌,等.生物电磁技术应用及其相关健康风险评估对策[J].高压技术,2015,41(8):2625-2634.
QU M, BI Z Y, TANG Y M, et al. Application of bio-electromagnetic technique and its related health risk assessment strategy[J]. High Voltage Engineering, 2015, 41(8): 2625-2634.
- [7] 田冰,贾彩丽,夏若红,等.50 Hz脉冲电场作用下胰岛素构象变化的拉曼光谱分析[J].光谱与光谱分析,2004,24(11):1334-1337.
TIAN B, JIA C L, XIA R H, et al. Raman analysis of conformation changes of insulin solvent after being exposed to ELF pulsed electric field[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2004, 24(11): 1334-1337.
- [8] LINSTROM E, LINSTROM P, BERGLUND A, et al. Intracellular

calcium oscillations induced in a T-cell line by a weak 50 Hz magnetic field[J]. Cell Physiol, 1993, 156(2): 395-398.

[9] BARBIER E, DUFY B, VEYRET B. Stimulation of Ca²⁺ influx in rat pituitary cells under exposure to a 50 Hz magnetic field [J]. Bioelectromagnetics, 1996, 17(4): 303-311.

[10] 柴文祥, 李彤, 梁继河, 等. 重复急性缺氧再给氧对培养鼠主动脉内皮细胞内钙的影响[J]. 第四军医大学学报, 1997, 18(12): 43-45.
CHAI W X, LI T, LIANG J H, et al. The effect of repeated hypoxia and reoxygenation on calcium in cultured rat aortic endothelial cells [J]. Journal of the Fourth Military Medical University, 1997, 18(12): 43-45.

[11] 王保义, 唐敬贤, 江汉保. 电磁场在生物医学中的应用[M]. 北京: 国防工业出版社, 1990: 80-135.
WANG B Y, TANG J X, JIANG H B. Application of electromagnetic field in biomedicine[M]. Beijing: National Defense Industry Press, 1990: 80-135.

[12] 牛中奇. 电磁波的生物窗效应及其回旋谐振理论[J]. 中国生物医学工程学报, 1993, 12(1): 61-69.
NIU Z Q. Biological window effects of electromagnetic-wave and the cyclotronresonance theory [J]. Chinese Journal of Biomedical Engineering, 1993, 12(1): 61-69.

[13] 郝柏林. 物理学和生物学[J]. 物理, 2003, 32(6): 353-359.
HAO B L. Physics and biology[J]. Physics, 2003, 32(6): 353-359.

[14] 刘银春, 尤华明. 喷浇磁水的灵芝细胞超微结构的变化[J]. 福建林学院学报, 2001, 21(3): 220-223.
LIU Y C, YOU H M. Cell ultrastructure of canoderma lacidum sprinkled with magnetized water[J]. Journal of Fujian College of Forestry, 2001, 21(3): 220-223.

[15] 刘银春. 木材对5.43 μm红外线的吸收及其穿透规律的研究[J]. 福建林学院学报, 2002, 22(3): 222-231.
LIU Y C. Study on the law of experiment of wood absorbed 5.43 μm infrared and it's penetrability for the infrared[J]. Journal of Fujian College of Forestry, 2002, 22(3): 222-231.

[16] ZHOU J L, LI C L, YAO G D, et al. Gene expression of cytokine receptore in HL60 cells exposed to a 50 Hz magnetic field [J]. Bioelectromagnetics, 2002, 23(5): 339-346.

[17] 张绘蓝. 全息空间光孤子的理论研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2007: 3-10.
ZHANG H L. Theoretical study on holographic optical solitons[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2007: 3-10.

(编辑:陈丽霞)