

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

(計畫名稱) 不同的生長因子對暴露於靜磁場下的纖維母細胞之影響與其作用機轉之研究

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 91-2320 -B -038 -019-

執行期間： 91 年 8 月 1 日至 92 年 7 月 31 日

計畫主持人：黃豪銘

共同主持人：李勝揚

計畫參與人員：范剛信，李龍義

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：臺北醫學大學

中文摘要

本研究比較 MG63 似骨母細胞在受靜磁場暴露與未受靜磁場暴露時其數目、活性與細胞週期的變化上之差異，結果發現不論是細胞數目還是細胞活性，均會隨著暴露的磁場強度之增加而減少。但暴露於不同磁場強度的細胞，其各週期間期的比例並不會隨著磁場強度的變動而變動。在加入生長因子的實驗組中， FGF、PDGF 均會導致細胞活性增加，但在靜磁場的作用下會分別明顯的減少 56.8%與 64.7% ($p<0.001$)。但在加入 IGF-1 的實驗組中，受磁場暴露的細胞其活性則未有明顯的減少。但 TNF- α 並不會影響未受磁場暴露的 MG63 細胞之生長曲線，可是受磁場暴露的細胞其活性反而明顯的增加了 142.2% ($p<0.001$)。由 TEM 的觀察中，受 4000 高斯磁鐵暴露 72 小時的 MG63 細胞，其細胞膜表面明顯可以看到有基質小泡(matrix vesicle)的產生，並有很多的細胞外基質(extracellular matrix)的分泌。基於以上的結果，我們總結靜磁鐵使用於矯正治療時會加速牙齒移動的原因，是因為在靜磁場作用下，會導致骨母細胞細胞膜上的生長因子受器無法與生長因子結合，此作用會導致骨母細胞生長速度受到抑制，而此抑制作用會導致骨母細胞分化成熟，並加速骨質 remodeling 的速度。

Abstract

Cell number and viability of Osteoblast-like cell (MG63) were tested under static magnetic field exposure. Our results showed that both cell number and viability of the cell decreased when SMF was treated. However no statistically significant different was found between each cell cycle phase when the cells exposed to various strength of SMF. In the growth factor experiments, both FGF and PDGF can increase the viability of the cell. However, when the cells were exposed to SMF, the effect of the FGF and PDGF on cell viability significantly decreased with a percentage of 56.8% and 64.7% ($p<0.01$), respectively. Furthermore, when the cell was treated with IGF-I, there is no significant effect was found when the cell was exposed to SMF. By contract, although TNF-a cannot affect the viability of the cells at the environment without SMF exposure, it did significantly increase the viability of the cell with a percentage of 142.2% ($p<0.01$) when exposed to SMF. The ultrastructure images showed that, matrix vesicle at the inner-membrane surface and extracellular matrix were secreted by the cells after exposed to 4000 Gauss SMF with a period of 72 hours. According to these findings, we make a hypothesis that the effects of SMF prompting the efficiency of bone modeling and remodeling is due to its interaction with cell membrane. This interaction may affect the status of various transmembrane growth factor receptors. When the growth factors cannot bind to its receptor, the proliferation rates of the cell decreased. These effects will cause the cell mature, and then, accelerate the rate of bone remodeling.

研究目的與文獻探討

靜磁場(static magnetic field, SMF)在口腔醫學上有許多的應用，早期主要作為全口鑲復體的力量來源。近幾年來，因為稀土金屬磁鐵製作技術的進步，尤其是鈷鐵硼磁鐵的發明，使得磁鐵得以在小型化之後仍能擁有足夠的磁力，這不僅使得磁鐵可以提供鑲復義齒所需的結合¹，更可作為臨床矯正所需的力量來源²。臨床報告顯示，磁鐵的使用在特定的情

形中，會加速牙齒的移動速度^{3,4}。但其作用機制目前仍然未知。

Lohmann 等人(2000)⁵曾以直流脈衝式電磁場(PEMF)刺激似骨母細胞(MG63) 4 天，他們發現受暴露的細胞其細胞數目與[3H]Thymidine incorporation 的量均隨著暴露天數的進行而明顯的減少，也就是細胞受直流脈衝式電磁場刺激之後，增殖受到了抑制。且觀察到暴露直流脈衝式電磁場一天後的細胞，其有趨向分化的現象。他們因此推論，直流脈衝式電磁場導致骨質增生的作用機轉是直流脈衝式電磁場使骨母前驅細胞的增殖受抑制，而此抑制作用驅使其分化成較成熟的骨母細胞⁶，進而加速骨質的 modeling 與 remodeling^{3,7}。

1987 年 Bruce 等人曾以兔子進行實驗，結果發現受靜磁場暴露側的骨頭力學強度比未暴露側高超過 20% 以上，即靜磁場的暴露對骨組織有正面的效應⁷。後續的似骨母細胞(osteoblast-like cell TE-85)實驗亦發現靜磁場有促進骨質的作用⁸⁻¹⁰。這些研究推論認為，靜磁場增加了未成熟的前驅細胞成熟為骨母細胞(osteoblast)的速度，因此加速骨質的新陳代謝，因此使得矯正時牙齒的移動速度加速，但其結論仍屬推論性質，並無任何深入的實驗數據加以證明。

由於臨床使用的磁鐵材料本身對人體組織的毒性作用可以忽略¹¹⁻¹²，且這些磁鐵均已做過鍍層處理以減少磁鐵材料釋出物對組織可能的影響¹³。因此受磁場暴露的細胞與組織所產生的生物效應，應是來自磁場本身。但隨著磁鐵的應用日廣及高磁化製造技術的進步，磁場對組織的生物效應也開始受到了關切，但到目前為止相關的研究仍然侷限於其材料本身的生物相容性，或臨床應用時的磁鐵設計，對於磁場在分子領域所造成的生物效應，尤其是為何矯正用靜磁場可以導致牙齒移動速度增加，目前原因仍然不明且相關研究並不多見。因此在本研究中，我們使用等同於臨床矯正用強度的磁鐵，非接觸的刺激似骨母細胞，藉由觀察細胞的生長與分化情形，對靜磁場影響骨母細胞的機轉作一初探。

實驗材料與方法

1. 細胞培養

因此本研究依文獻之實驗結果及前述之初步實驗結果，選擇似骨母細胞株(MG-63)作為研究對象。依實驗需求將細胞以 1×10^4 的密度培養，所使用的培養基為含有 10% 胎牛血清與 1% 盤寧西林的 high glucose DMEM，並置於 37°C，5% 的 CO₂ 細胞培養箱中。

2 靜磁場之刺激

為了比較受靜磁場暴露與未受靜磁場暴露的骨母細胞在活性上之差異，受測之細胞將培養於兩台相同機型(RCO3000TABB, REVCO, USA)的細胞培養箱中(簡稱 A, B 培養箱)。所使用的兩台細胞培養箱內的上下各四個角落與中心點均曾以高斯計量測，在 AC(交流)與 DC(直流)模式下，各部位的磁場強度均低地磁的背景值(0.3-0.6)範圍內¹⁴。實驗進行時，A 培養箱中放入兩盤細胞，此兩盤細胞之距離為 25cm (經高斯計量測，表磁 4000 高斯之磁鐵在 25 公分外的磁場強度低於 0.4 高斯)，此兩盤細胞均放置於鈷鐵硼金屬塊上，其中一盤的鈷鐵硼金屬塊為充磁完成之永久磁鐵，另一盤細胞下之鈷鐵硼金屬塊則為未充磁之假暴露組，在實驗組與對照組之間再以鉬金屬 (Mo) 加以隔磁。此靜磁場強度之選擇係根據口腔矯正器或贗復義齒之臨床可能使用之情形^{2,15}。在 B 細胞培養箱中的細胞則為外控制組，細胞培養盤直接放置於格架上。在本研究計劃中，所有實驗之細胞一律控制暴露於 N 極下。為了驗證細胞在不同培養箱中的生長情形差異，分別在三日內每 24 小時檢測細胞的 MTT 代謝與細胞數目變化情形。本研究所使用的磁鐵表磁為 2500 高斯及 4000 高斯兩種。

3. 細胞週期之偵測

本研究在細胞暴露於 2500 及 4000 高斯靜磁場條件下，連續三天偵測細胞週期之變化狀況。實驗時細胞以 3.5 公分培養盤培養，至代測時間點收集細胞後，以酒精固定細胞隔夜，接著處理以 0.5% TritonX-100，及 1mg/ml 的 Rnase A。最後再以 50 ug/ml 的 Propidium iodide 避光染色 30 分鐘後，利用流式細胞儀(FACSCalibur, BECTON BICKINSON, CA, USA)偵測細胞週期的變化。

4. 以生長因子對細胞的作用變化觀察磁場對細胞膜之影響

實驗時先將細胞依前述第一部份之準則以含有 10%胎牛血清的培養基培養於 96 孔盤中，於 24 小時後吸去培養液，並以 4°C PBS 清洗兩次，而後分別更換無胎牛血清的培養基，並分別加入濃度為 5 ng/ml 的 PDGF-bb、FGF-b、IGF-I、TNF- α 為實驗組，以培養基中含有 10%胎牛血清為陽性對照組，以不含有胎牛血清及任何生長因子為陰性對照組。每組實驗均製作相同的兩盤細胞試品，一盤暴露於靜磁場上(為實驗組)，一盤為假暴露組。因為生長因子的作用主要為增加骨細胞存活率與活性¹⁶，因此在本研究分別於加入生長因子時(0 小時)及 12 小時後，以 MTT 法測量受磁場暴露與未受磁鐵暴露細胞之細胞活性。

5. 細胞形態變化之觀察

本研究連續三天，利用穿透式電子顯微鏡(H-600, Hitachi, Tokyo, Japan)及掃描式電子顯微鏡(SEM System, Hitachi, Tokyo, Japan)觀察暴露於磁場下的細胞，其細胞基質小泡產生與細胞基質分泌之情形。在 TEM 方面，細胞培養至待測時間時先以戊二醇於 4°C 下固定細胞 30 分鐘後，再於 4°C 下以 0.2 M PBS 洗淨。並利用 osmium tetroxide 固定細胞 1 小時，接著依次使用 70%-100%的酒精脫水後利用 epoxy resin 包埋，並於烘乾後進行切片與染色及利用穿透式電子顯微鏡觀察並照相。在 SEM 方面，以同上的方法固定細胞 30 分鐘，接著以 0.2 M 的 PBS 清洗之後，再以 1%的鉻酸固定細胞 20 分鐘。接著依次使用 50%-100%的酒精脫水並作臨界點乾燥。最後以 200 Å 的厚度在細胞表面鍍上 Au 後，即可利用掃描式電子顯微鏡觀察細胞型態。

結果

為了瞭解在同一培養箱中的控制組細胞是否受到實驗組磁場的影響，本研究首先另一個相同的細胞培養箱中進行無磁場環境的外對照組實驗，結果顯示假暴露組細胞在數目與活性上的生長曲線，與無磁場環境的外對照組細胞生長情形沒有差別。

圖一為細胞暴露於不同磁場強度下 0-72 小時後的細胞數目(a)與細胞活性(b)情形。由圖中可以發現：不論磁場強度為何，隨著時間的增加，細胞數目與細胞活性均會增加，但在不同的磁場暴露強度下，細胞生長曲線卻會受磁場的影響，不論是細胞數目還是細胞活性，均會隨著暴露的磁場強度之增加而減少。在前 24 小時內，暴露於 2500 高斯與 4000 高斯磁場下的細胞數目比控制組分別明顯的減少了 24%與 32% ($p<0.001$)，細胞活性則分別明顯的減少了 17%與 29% ($p<0.001$)。

利用流式細胞儀檢視受磁場暴露的細胞之細胞週期在各 phase 間的變化情形，結果如圖二所示：在 G0/G1, S 及 G2/M 三個時期的比例上，不論細胞所處的環境磁場強度為何，細胞在不同的時間點，各 phase 間會有不同的比例。在零小時，Go/G1, S, G2/M 的比例約為 48: 28:24，但隨著時間增加到 72 小時，Go/G1 的比例會逐步增加到接近 80%，而 S 與 G2/M

phase 則分別逐步減少至約 8% 與 12%。但不論時間點如何改變，在同一個時間下，暴露於不同磁場強度的細胞其各週期間期的比例，並不會隨著磁場強度的變動而變動。

爲了瞭解靜磁場影響骨母細胞生長曲線的過程中，生長因子所扮演的角色，在本研究中特於無胎牛血清的培養基中並分別加入濃度爲 5 ng/ml 的 PDGF-bb、FGF-b、IGF-I、TNF- α 爲實驗組，以 MTT 法測量受 4000 高斯靜磁場暴露 12 小時後之細胞活性。在圖三的結果中，不含 FBS 且不含生長因子的 MG63 細胞其活性均會下降，且其活性在暴露組會有比未暴露組來的低的趨勢。在含有 10% FBS 的實驗中，MG63 細胞的活性均會增加，但暴露組的活性明顯的低於未暴露組 ($p < 0.001$)。在加入生長因子的實驗組中，不同的生長因子則有不同的作用，FGF、PDGF-bb 均會導致細胞活性增加，但在靜磁場的作用下會分別明顯的減少 56.8% 與 64.7% ($p < 0.001$)。但在加入 IGF-1 的實驗組中，受磁場暴露的細胞其活性則未有明顯的減少。在 TNF- α 的實驗組中則有不一樣的結果，在沒有 TNF- α 的情形下不論含不含 FBS，靜磁場的作用均不會減少細胞的活性。而在加入 TNF- α 之後，不受磁場暴露的 MG63 細胞其活性與陰性對照組相同，但受磁場暴露的細胞其活性卻明顯的增加了 142.2% ($p < 0.001$)。

圖四爲受 4000 高斯磁鐵暴露 72 小時(a)與未暴露組(b)細胞的 TEM 型態，在圖 a 中可以明顯看到有基質小泡(matrix vesicle)的產生(白色箭頭)，而未暴露組細胞則沒有此一分泌現象，且圖 a 中也可以看到受靜磁場刺激後的 MG63 細胞，較未受刺激的細胞有更多的細胞外基質(extracellular matrix)的分泌(黑色箭頭處)。

討論

在圖一及圖二中，骨母細胞數目雖會因爲靜磁場的刺激而減少，但其細胞週期並未有變化，且亦沒有凋亡現象(apoptosis)的發生，這意味著磁場的作用應不會影響到骨母細胞的 DNA，這樣的結果與利用其他細胞進行的靜磁場暴露實驗結果相吻合¹⁷⁻¹⁹。不同的生長因子對骨母細胞會有不同程度的影響與作用；IGF-I、IGF-II、TGF- β 、FGF、PDGF-bb 均會促進骨細胞的分裂增生。相對於前面數種生長因子，TNF- α 對骨母細胞並沒有直接的作用，只有在其他因子存在時才會扮演 co-factor 的角色

Labes²⁰ 是第一個提出靜磁場可能會影響細胞膜的脂質分子的人，他認爲構成脂質雙層的磷脂質爲具有極性的桿狀分子，如同液晶分子一樣，磁場可能使脂質分子的方向改變，因而影響了細胞膜的通透性。而細胞膜的變化則可能導致生長因子受器構型的改變，並進而導致生長因子無法與其結合，而阻斷後續有關細胞成長的訊息傳遞路徑^{18,21,22}。在圖三中，我們發現 MG-63 細胞在不同的生長因子下於磁場暴露 12 小時後，會有不同的結果。由於 FGF-b、PDGF-bb 會促進骨質的增生，這個作用在未暴露組依然存在，但在暴露組卻不存在。而 TNF- α 對骨母細胞雖然沒有直接的作用，但在靜磁場的刺激下反而會增加其存活率。由這些結果知道，靜磁場的刺激確實改變了生長因子對 MG63 細胞的作用。

在圖四的 TEM 照片中，受 4000 高斯磁鐵暴露 72 小時的 MG63 細胞膜表面明顯看到有基質小泡(matrix vesicle)的產生(白色箭頭)，而未暴露組細胞則沒有此一分泌現象，且受靜磁場刺激後的細胞，也有很多的細胞外基質(extracellular matrix)的分泌。這樣的結果顯示受靜磁場刺激之後確實趨向於分化成熟。

基於以上的結果，我們總結靜磁鐵使用於矯正治療時，會加速牙齒移動的原因是因爲靜磁場作用下，會導致骨母細胞細胞膜上的生長因子受器無法與生長因子結合，此作用會導致骨母細胞生長受到抑制，而此抑制作用會導致骨母細胞分化成熟，並開始分泌基質小泡及細胞外基質。

參考文獻

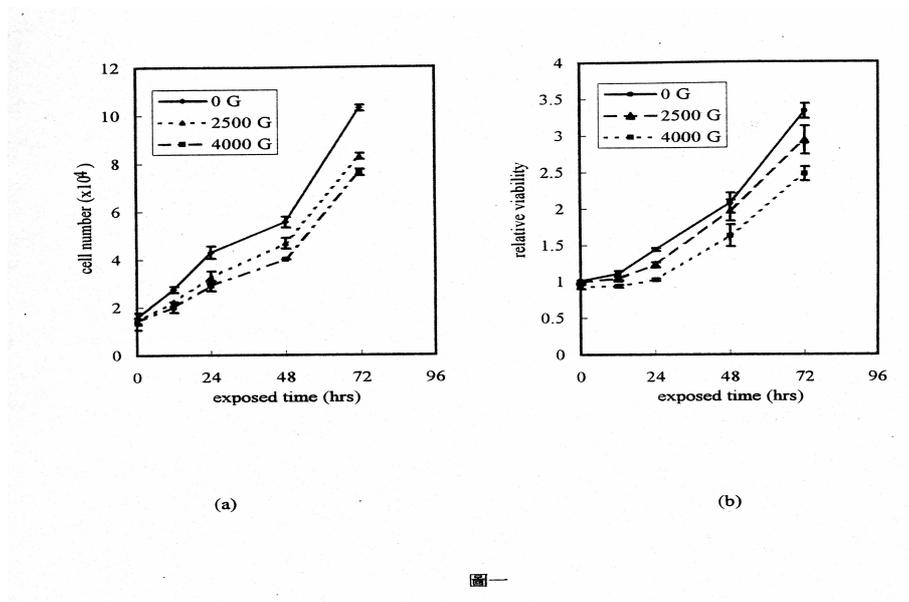
1. Melissa AR, Anthony DW, Ivor RH. (2001) Magnets in prosthetic dentistry. *J Prosth Dent* 86: 137-142.
2. Darendeliler MA, Darendeliler A, Mandurino M. (1997) Clinical application of magnets in orthodontics and biological implications: a review. *Eur J Orthod* 19:431-442.
3. Darendeliler MA, Sinclair PM, Kusy RP. (1995) The effects of samarium-cobalt magnets and pulsed electromagnetic fields on tooth movement. *Am J Orthod Dentfac Orthop* 107: 578-588.
4. Tengku BS, Joseph BK, Harbrow D, Taverne AAR, Symons AL. (2000) Effect of a static magnetic field on orthodontic tooth movement in the rat. *Eur J Orthod* 22: 475-487.
5. Lohmann CH, Schwartz Z, Liu Y, Duerkov H, Dean DD. (2000) Pulsed electromagnetic field stimulation of MG63 osteoblast-like cells affects differentiation and local production. *J Orthop Res* 18:637-646.
6. Stein GS, Lian JB, Owen TA. (1990) Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. *FASEB J* 4: 3111-3123.
7. Bruce GK, Howlett CR, Huckstep RL. (1987) Effect of a static magnetic field on fracture healing in a rabbit radius: preliminary results. *Clin Orthop Rel Res* 222: 300-306.
8. Fitzsimmon RJ, Ryaby JT, Magee FP, Baylink DJ. (1995) IGF-II receptor number is increased in TE-85 osteosarcoma cells by combined magnetic fields. *J Bone Miner Res* 10: 812-819.
9. Camilleri S, McDonald F. (1993) Static magnetic field effects on the sagittal suture in *Rattus Norvegicus*. *Am J Orthod Dentfac Orthop* 103: 240-246.
10. McDonald F. (1993) Effect of static magnetic fields on osteoblasts and fibroblasts in vitro. *Bioelectromagnetics* 14: 187-196.
11. Bondemark L, Kurol J, Wennberg A. (1994a) Biocompatibility of new, clinically, and recycled orthodontic samarium-cobalt magnets. *Am J Orthod Dentfac Orthop* 105: 568-574.
12. Bondemark L, Kurol J, Wennberg A. (1994b) Orthodontic rare earth magnets-in vitro assessment of cytotoxicity. *Brit J Orthod* 21: 335-341.
13. vans RD, McDonald F. (1995) Effects of magnet corrosion products (neodymium iron boron) on oral fibroblast proliferation. *J Appl Biomater* 6: 199-202.
14. Bondemark L, Kurol J, Larsson A. (1995) Human dental pulp and gingival tissue after static magnetic field expose. *Eur J Orthod* 17: 85-91.
15. Riley MA, Walmsley AD, Harris IR. (2001) Magnets in prosthetic dentistry. *J Prosthet Dent* 86: 137-142.
16. Hill PA, Tumber A, Meikle MC (1997) Multiple extracellular signals promote osteoblast survival and apoptosis. *Endocrinology* 138: 3849-3858.
17. Raymond RR, Clavo AC, Wahl, RL. (1996) Exposure to strong static magnetic field slows the growth of human cancer cells in vitro. *Bioelectromagnetics* 17: 358-363.
18. Pacini S, Vannelli GB, Barni T, Ruggiero M, Sardi I, Pacini P, Gulisano M. (1999) Effects of 0.2 T static magnetic field on human neurons: remodeling and inhibition of signal transduction without genome instability. *Neuro sci Lett* 267: 185-188.
19. Sakurai H, Okuno K, Kubo A, Nakamura K, Shoda M. (1999) Effect of a 7-tesla

homogeneous magnetic field on mammalian cells. Bioelectrochemistry and bioenergetics 49: 57-63.

20. Labes, M.M. (1966) A possible explanation for the effect of magnetic fields on biological system. Nature 211: 968.

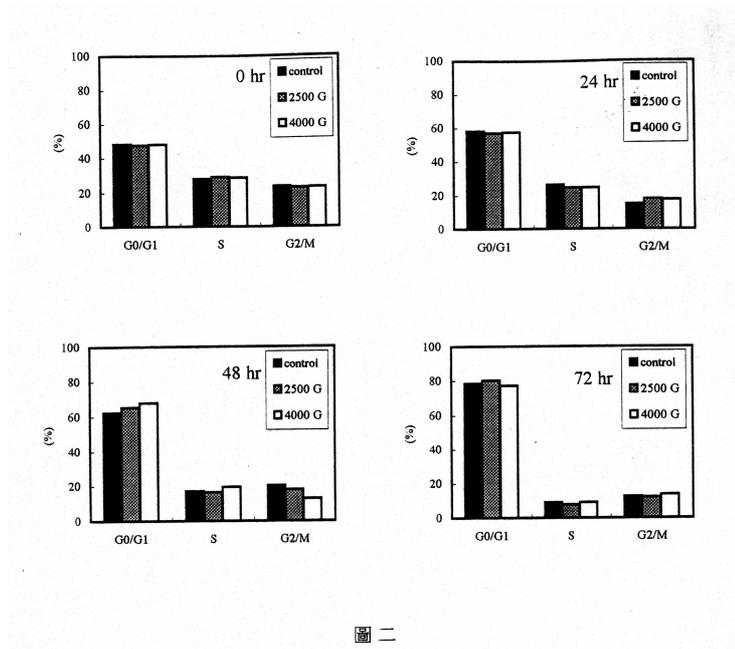
21. Short WO, Goodwill L, Taylor CW, Job C, Arthur ME. (1992) Alteration of human tumor cell adhesion by high-strength static magnetic fields. Invest Radiol 27: 836-840.

22. Feinendegen LE, Muhlensiepen H. (1987) In vivo enzyme control through a strong stationary magnetic field - the case of thymidine kinase in mouse bone marrow clls. Int J Radiat Biol 52: 469-479.



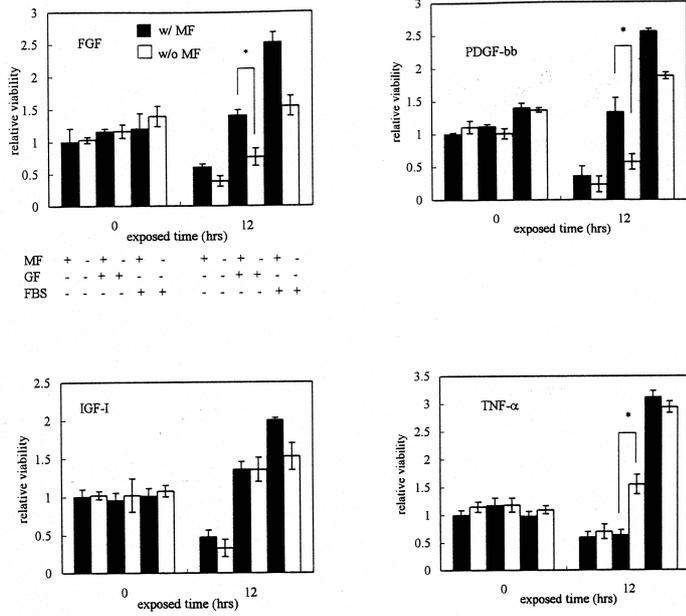
圖一

圖一：為細胞暴露於不同磁場強度下 0-72 小時後的細胞數目(a)與細胞活性(b)情形。



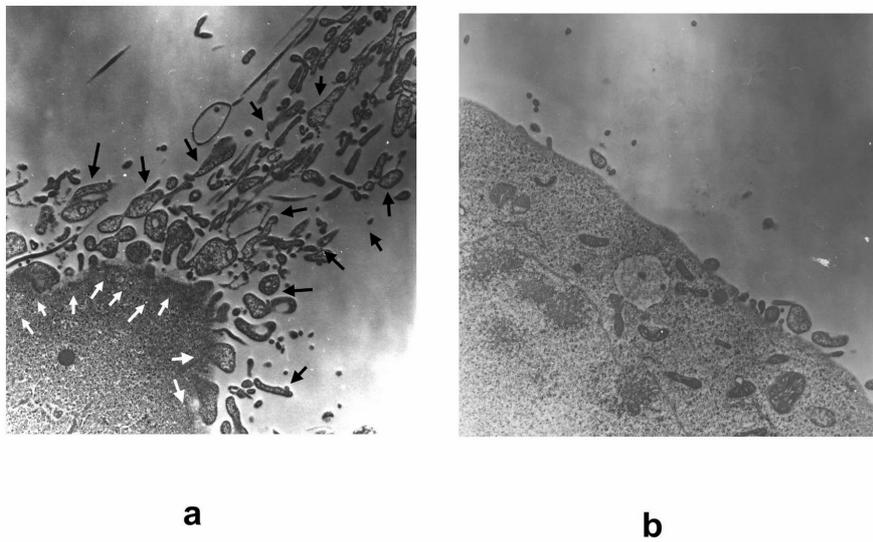
圖二

圖二：利用流式細胞儀檢視受磁場暴露的細胞之細胞週期在各 phase 間的變化情形。



圖三

圖三：PDGF-bb、FGF-b， IGF-I、TNF-α 等生長因子在靜磁場影響骨母細胞生長曲線的過程中所扮演的角色。



圖四：受 4000 高斯磁鐵暴露 72 小時(a)與未暴露組(b)細胞的 TEM 型態。