



海马神经元ROS和Ca²⁺对极低频电磁场实时响应的研究方法研究*

岑泽南 黄伟伟 包家立** 郑秀秀 朱朝阳

(浙江大学医学院浙江省生物电磁学重点实验室生物物理与医学工程研究组, 杭州 310058)

摘要 现有极低频电磁场 (extremely low frequency-electromagnetic fields, ELF-EMFs) 生物效应的研究方法是非实时组间对照, 这种方法无法排除细胞对电磁场反应个体敏感性的差异, 以及实验过程中条件变化的差异. 本文提出一种对同一个细胞在同一条件下的前后对照实时观察 ELF-EMFs 反应的方法. 采用稳定域鉴别 ELF-EMFs 暴露前海马神经元的稳定性, 在电磁场加入时刻 ($t=60$ s) 分别用 0、0.09、0.38、0.76、7.33、14.78 mT 的 ELF-EMFs 作用于海马神经元, 实时记录海马神经元活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 和 Ca²⁺ 荧光响应曲线, 建立 ELF-EMFs 与 ROS 和 Ca²⁺ 的自相关函数. 结果表明: a. 在 ROS 暴发时间和 Ca²⁺ 暴发时间, ROS 和 Ca²⁺ 荧光响应具有阶跃性, 这是判断实时响应的重要标志; b. ROS 和 Ca²⁺ 对 ELF-EMFs 响应时间具有延时性, 并且不一致; c. ROS 和 Ca²⁺ 对 ELF-EMFs 实时响应具有剂量性; d. 海马神经元 ROS 对 ELF-EMFs 响应具有复杂性; e. 海马神经元 Ca²⁺ 对电磁场响应主要是渐进稳定. 当 ELF-EMFs 与 ROS 和 Ca²⁺ 实时响应的相关函数大于 0.3 可以判定具有相关性. 由此得出, 一种 ELF-EMFs 暴露下细胞 ROS 和胞内 Ca²⁺ 的实时响应方法对电磁生物效应评价是可行的.

关键词 极低频电磁场, 实时, ROS, 钙离子, 海马神经元, 稳定性, 随机过程, 相关性

中图分类号 Q64, Q68

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0368

随着电气化发展, 电气设备的应用越来越多, 由电气设备及其电力传输引起的极低频电磁场 (extremely low frequency-electromagnetic fields, ELF-EMFs) 对人类健康的影响引起社会关注. 1979 年, 美国流行病学专家 Wertheimer 和物理学家 Leeper^[1] 发表了关于高压线附近居民儿童白血病风险增加的报道, 引起学术界、产业界和公众的强烈关注. 为此, 世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 在 1997 年启动了“国际电磁场计划” (International EMF Projects, IEMFP), 在流行病学调查、人体、动物、细胞、分子等层次上开展研究, 旨在阐明电磁场对人类健康的影响, 建立电磁预防公共卫生政策, 向公众传播科学知识^[2]. 2007 年, 该计划在结束时总结认为: 总体上, 流行病学调查是电磁场影响健康客观评估的直接证据, 但流行病学调查困难、人群分类困难、协同因素复杂, 在流行病学调查难以得出结论的情况下, 应该开展生物物理机制研究, 主要方向是多细

胞系统的信噪比、磁性颗粒和自由基对机制^[3].

电磁生物效应在环境、分子、细胞、组织、器官、个体、人群各层次上是因果效应^[4], 它从原初的物理作用开始, 经过一系列物理、化学、生化、细胞、组织、器官的节联反应 (causal step), 最终产生健康终点效应^[5]. 自由基对机制在非常低的磁场强度下都可以观察到, 其在节联反应中起原初作用^[6]. 活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 是自由基对的主要类型, 在正常生理条件下, 由线粒体内氧化还原反应产生的 ROS 水平平衡, 代谢过程为生理内稳态^[7-8]. 当生物体暴露在足够强度的电磁场中, 如 ELF-EMFs, 细胞内 ROS 会产生病理应激^[9]. 很多文献表明在分子和细胞层次上电磁

* 传染病防治国家科技重大专项课题 (2018ZX10301201-002) 资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 0571-88208171, E-mail: baojl@zju.edu.cn

收稿日期: 2020-10-15, 接受日期: 2021-03-09

生物效应明显,但在流行病学调查、人体和动物层次上生物效应不明显^[10-11].苏海峰等^[12]和郑秀秀等^[13]都做过暴露在不同水平ELF-EMFs时的实验,发现一些海马神经元胞内ROS和Ca²⁺有变化,一些无变化.我们认为这种不确定的电磁生物效应与研究方法有很大关系.目前,细胞学研究一般采用将细胞放置在内置Helmholtz线圈的CO₂培养箱内进行电磁场暴露和假暴露的组间对照^[14-16].这种方法尽管可以排除实验环境条件的差异,但是无法排除细胞对电磁场反应个体敏感性的差异,以及实验过程中条件变化的差异,如细胞从CO₂培养箱移出时已经脱离电磁场暴露、CO₂培养箱与室温之间温差所致的细胞热应激等.因此,我们认为采用实时观察细胞对电磁场反应,可以对同一个细胞在同一条条件下的前后对照,是最可信的研究方法.

本文运用自制的实时电磁场细胞暴露系统,观察在ELF-MFs暴露下海马神经元胞内ROS和Ca²⁺的实时响应,分析海马神经元ELF-EMFs暴露的实时特性,以证明电磁生物效应实时研究的可行性,为进一步研究电磁生物效应提供新技术和新方法.

1 材料与方法

1.1 实验材料

新生清洁级Sprague Dawley大鼠购自浙江省医学科学院,质量5~8 g,雌雄不限.溶液制备:磷酸盐溶液成分为:16% (v/v) NaCl、0.8% (v/v) KCl、0.48% (v/v) Na₂HPO₄·12H₂O、0.06% (v/v) KH₂PO₄、82.66% (v/v) 无菌水;解剖液(pH 7.2~7.4,成分为:0.3% (v/v) 葡萄糖、0.75% (v/v) 蔗糖、5% (v/v) 磷酸盐溶液、2.8% (v/v) HEPES缓冲液、91.15% 无菌水;种植液成分为:82.4% (v/v) DMEM (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)、7.8% (v/v) 胎牛血清 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)、7.8% (v/v) 马血清 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)、1% (v/v) 0.2 mol/L L-谷氨酰胺 (源叶生物, 上海)、1% (v/v) 青霉素-链霉素 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA); Neurobasal-A使用液成分为:96% (v/v) Neurobasal-A (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)、2% (v/v) B27 supplement (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)、1% (v/v) 0.2 mol/L L-谷氨酰胺、1% (v/v) 青霉素-链霉素.

1.2 海马神经元原代培养

24孔板细胞培养皿经0.1 g/L多聚赖氨酸(Sigma-Aldrich, MO, USA)包被30 min,过夜晒干备用.新生大鼠经75% (v/v) 酒精消毒,终止生命,开颅分离大脑海马组织,置于冰浴解剖液.医用手术剪切碎组织,转移至0.25%胰酶溶液(源叶生物, 上海),置于37℃和5%CO₂浓度的细胞培养箱内,消化20 min.种植液中止消化并清洗2次,移液枪轻轻吹打,在500 r/min转速下离心30 s收集海马神经元.种植液稀释细胞制备成10⁶/ml的细胞悬液,按每皿0.5 ml悬液接种于24孔板细胞培养皿.4 h后全量换液为Neurobasal-A使用液,之后每3 d半量换液,并添加体积0.5 ml、浓度10 mmol/L阿糖胞苷(Sigma-Aldrich, MO, USA),取第7天的海马神经元用于后续实验.

1.3 实时电磁场细胞暴露系统

实时电磁场细胞暴露系统由电磁场细胞暴露仪(OX9-1型,杭州蛇杖科技有限公司)和荧光显微镜系统两部分组成(图1)^[17].电磁场细胞暴露仪由励磁电流发生器、电磁场开关和C形电磁铁芯组成.励磁电流发生器通过C形电磁铁芯产生励磁电流以稳定磁场,经浙江省计量科学研究院检测,产生磁场的频率为0~340 Hz,磁感应强度为0.010 47~25.367 9 mT,精度为1.623%.C形电磁铁芯有一个槽口,用于放置细胞培养皿,填补磁回路.荧光显微镜系统由荧光显微镜(MF51型,广

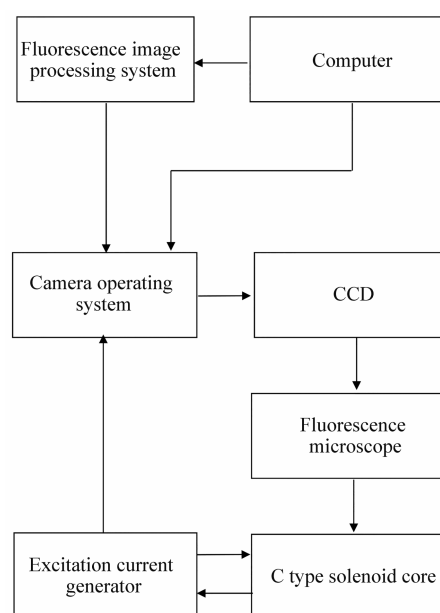


Fig. 1 Real-time electromagnetic fields cell exposure system

州市明美光电技术有限公司)、CCD摄像头(MC20-C型, 广州市明美光电技术有限公司)和荧光图像处理系统(EMF-1型, 杭州蛇杖科技有限公司)组成. 荧光显微镜(×25镜)和CCD摄像头(512×512 dpi)用于细胞显微图像的成像和记录, 图像采集频率2 s/帧. 荧光图像处理系统采用像线转换技术对记录的图像进行细胞识别和荧光测算, 并绘制时域荧光强度线.

1.4 海马神经元荧光探测准备

ROS探针DCFH-DA(碧云天生物, 上海)和Ca²⁺探针Fluo-4 AM(碧云天生物, 上海)分别经DMEM液稀释至10 μmol/L和2 μmol/L, 添加至去除Neurobasal-A使用液的细胞培养皿中, 置于细胞培养箱分别孵育20 min和30 min后, 用HBSS液(Thermo Fisher Scientific, MA, USA)清洗细胞3次, 将细胞培养皿置于荧光显微镜载物台上的C形电磁铁芯细胞槽口, 荧光激发波长为488 nm, 发射波长525 nm.

1.5 电磁场暴露实验方法

实验分组为0、0.09、0.38、0.76、7.33、14.78 mT和H₂O₂七组. 电磁场细胞暴露仪产生频率为50 Hz, 磁感应强度分别为0、0.09、0.38、0.76、7.33、14.78 mT的工频磁场, 实时记录时间分0~60 s和60~300 s两个时间段, 由电磁场开关控制. 电磁场暴露前为 $t=0\sim60$ s时间段, 电磁场开关为“关”, 无电磁场. 电磁场暴露后为 $t=60\sim300$ s时间段, 电磁场开关为“开”, 有电磁场. 荧光显微镜系统全程($t=0\sim300$ s)记录细胞培养皿中海马神经元ROS和Ca²⁺的荧光强度. 阳性对照实验中, $t=60$ s为H₂O₂加入时刻, 将2 μl 10 μmol/L H₂O₂(国药集团, 上海)滴入细胞培养皿中, 荧光显微镜系统全程($t=0\sim300$ s)记录细胞培养皿中海马神经元ROS和Ca²⁺的荧光强度. 实验完毕, 荧光显微镜系统保存、记录ROS和Ca²⁺荧光图像, 并校正、绘制成实时曲线^[17]. 每个分组重复5~12次.

1.6 数据质量与稳定域

为确保研究结果可靠, 参与分析的记录曲线 $x(t)$ 入选标准是: 在电磁场暴露前时间段($t=0\sim60$ s), ROS和Ca²⁺的荧光强度稳定. 判断标准是: $x(t)$ 数据在以无扰细胞系统稳定点($x_e, 0$)为中心, 以 $r=K\sqrt{\sigma^2+\lambda^2}$ 为半径的稳定域内^[13]. 其中, 在遍历时间($0, t_0=60$ s)内, 其均值 x_e 和方差 σ^2 分别为:

$$x_e = \frac{1}{m+1} \sum_{i=0}^m x(i) \quad (1)$$

$$\sigma^2 = \frac{1}{m+1} \sum_{i=0}^m (x(i) - x_e)^2 \quad (2)$$

式中 x_e 为稳态点, 其状态变化率为:

$$\dot{x}(i) = \frac{x(i) - x(i-1)}{\Delta t} \quad (3)$$

在稳态点 x_e , 有 $\dot{x}_e = 0$. 则偏差 λ 为:

$$\lambda^2 = \frac{1}{m} \sum_{i=0}^m (\dot{x}(i) - \dot{x}_e)^2 \quad (4)$$

K 是置信系数.

1.7 实时响应的状态转移

ROS和Ca²⁺荧光强度 $x(t)$ 是一条依赖于时间的一组随机变量全体, 是一个随机过程. 电磁场为外扰因素, 当神经元受到外扰电磁场作用时, 神经元ROS和Ca²⁺状态与扰动前相比将发生变化. 这个变化有3种: a. 稳定. $x(t)$ 在规定时间段内, 在受扰前状态的稳定域内. b. 渐进稳定. $x(t)$ 在规定时间段内, 暂时离开受扰前状态稳定域, 但最后返回稳定域. c. 不稳定. $x(t)$ 在规定时间段内, 离开受扰前状态稳定域, 不再返回. 不稳定可以使状态转移, 即状态转移到另一个稳定域内. 实时响应状态变化的判断依据就是观察 $x(t)$ 是否在稳定域内.

1.8 自相关函数

随机过程ROS和Ca²⁺荧光强度 $x(t)$ 在遍历时间($T=N\Delta t$)内, $x(t)$ 在两个不同时间点 $t_1=i\Delta t$ 和 $t_2=m\Delta t$ 的相关函数为:

$$R_{xx}(i, K) = \frac{\sum_{i=1}^{N-K} (x(i) - \bar{x})(x(i+K) - \bar{x})}{\sum_{i=1}^N (x(i) - \bar{x})^2} \quad (5)$$

遍历时间内均值为:

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x(i) \quad (6)$$

2 结 果

2.1 ROS的实时响应

在0、0.09、0.38、0.76、7.33、14.78 mT磁场以及H₂O₂暴露期内, 实时电磁场细胞暴露系统以图像采集的方式记录每个细胞培养皿中海马神经元ROS荧光实时图像, 从这些图像中选择5~8个目标细胞绘制实时曲线. 图2是各种磁感应强度及H₂O₂暴露下, 多个目标细胞中的1个细胞ROS实时曲线 $x(t)$, 其中 $t=0\sim60$ s为无电磁场暴露期, $t=60$ s为电磁场开关打开或H₂O₂滴入时刻, $t=60\sim300$ s

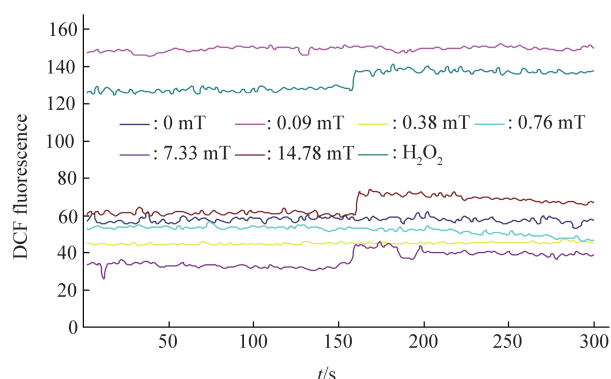


Fig. 2 Time domain curve of ROS fluorescence in the hippocampal neuron

为有电磁场或有 H_2O_2 暴露期. 在无电磁场暴露期 ($t = 0 \sim 60$ s), 各海马神经元状态稳定点 x_e 和稳定域

r 如表 1 所示. 海马神经元状态稳定点 x_e 和稳定域 r 大小不一, 反映了电磁场暴露前, 海马神经元具有较大个体差异. 对这些差异, 只要细胞状态稳定, 不会影响电磁场暴露实验. 阴性对照组 (0 mT) 在电磁场暴露期, 海马神经元 ROS 状态稳定. 阳性对照组 (H_2O_2) 在暴露期, 海马神经元 ROS 状态发生转移, 表明对照组能起到阴阳性对照作用.

各组海马神经元 ROS 荧光实时响应状态变化如表 1 所示, 0 mT 组的 $x(t)$ 值在遍历时间内 ($t = 60 \sim 300$ s) 电磁场暴露前的稳定域内, 属稳定状态. 0.09 mT 和 0.38 mT 组分别有 70.0% 和 93.3% 的 $x(t)$ 值在稳定域内, 属渐进稳定状态. 0.76 mT 组在 $t = 218$ s 后, 离开原稳定域内, 为不稳定状态. 7.33 mT、14.78 mT 和 H_2O_2 组在 ROS 暴发时间 ($t = 160$ s) 状态发生转移.

Table 1 The status of the hippocampal neuron for real-time respond of ROS

Group	Cell state before exposure			Real-time corresponding cell state after exposure	
	K value	Stable point (x_e)	Stable domain (r)	60~160 s	160~300 s
H_2O_2	3	126.74	4.19	Stable	State shift
14.78 mT	3	61.31	3.51	Stable	State shift
7.33 mT	2	33.64	4.25	Stable	State shift
0.76 mT	3	53.56	2.07	Unstable after 218 s	
0.38 mT	3	44.46	1.58	93.3% in stable domain, gradually stable	
0.09 mT	2	147.89	2.55	70.0% in stable domain, gradually stable	
0 mT	3	57.06	5.94	Stable	

各组电磁场或 H_2O_2 暴露与海马神经元 ROS 荧光实时响应自相关函数关系如图 3 所示, 各组在电磁场或 H_2O_2 加入时刻 ($t = 60$ s), 相关函数均为 1, 随观察时间的延长, 相关函数呈下降. 0、0.09 和 0.38 mT 组自相关函数随时间呈交变, 0.76、7.33、14.78 mT 和 H_2O_2 组自相关函数呈 V 形. 各组自相关函数均呈双相 (有正有负), 从式 (5) 分析, 正相关是 $x(t_1)$ 和 $x(t_2)$ 具有同相性, 负相关具有异相性. 因此, 在 ROS 暴发时间 ($t = 160$ s), $x(t_2)$ 值与 $x(t_1)$ 差异较大, 必为负相关. 0.76、7.33、14.78 mT、 H_2O_2 组在 ROS 暴发时间的相关函数分别为 -0.09、-0.31、-0.38、-0.30, 可以判断 7.33、14.78 mT、 H_2O_2 组在 ROS 暴发时间出现的阶跃性多数是由电磁场或 H_2O_2 加入引起, 而 0.76 mT 由电磁场引起概率很小, 且不存在阶跃性.

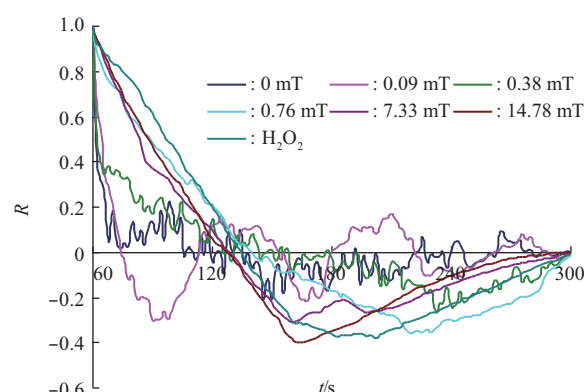


Fig. 3 Relation function of ROS fluorescence in the hippocampal neuron

从海马神经元ROS实时响应状态变化可见以下4个规律:

a. 在电磁场暴露期 ($t = 60 \sim 300$ s), 7.33 mT、14.78 mT 和 H₂O₂ 三组曲线 $x(t)$ 在 $t = 160$ s 处有一个明显的阶跃, 表明海马神经元对电磁场ROS的实时响应具有阶跃性. 这是判断电磁生物效应实时性的重要标志.

b. 7.33 mT、14.78 mT 和 H₂O₂ 三组曲线 $x(t)$ 是3个不同细胞培养皿中神经元对电磁场和H₂O₂的实时响应, 海马神经元在电磁场加入后的100 s发生反应, 这个时间称响应时间. 表1结果表明海马神经元对电磁响应时间具有延时性.

c. 低剂量电磁场0.09 mT和0.38 mT组暴露后, ROS状态为渐进稳定, 而高剂量电磁场7.33 mT、14.78 mT组暴露后, ROS状态发生转移, 表明只要有电磁场剂量, 海马神经元对电磁场就有响应, 并且具有剂量效应.

d. 中水平电磁场0.76 mT组暴露后, ROS状态前期渐进稳定, 后期 ($t = 218$ s) 不稳定, 并且不存在明显阶跃性, 表明该海马神经元ROS状态变化不是由电磁场所致, 海马神经元对电磁场响应具有复杂性.

2.2 Ca²⁺的实时响应

在0、0.09、0.38、0.76、7.33、14.78 mT 磁场以及H₂O₂暴露期内, 实时记录海马神经元Ca²⁺荧光实时图像, 在每个细胞培养皿中选择5~8个目标细胞, 并绘制Ca²⁺荧光实时曲线 $x(t)$. 图4是各种磁感应强度及H₂O₂暴露下, 这些目标细胞中的1个细胞Ca²⁺实时曲线, 其中 $t = 0 \sim 60$ s 为无电磁场暴露期, $t = 60$ s 为电磁场开关打开或H₂O₂滴入时刻, $t = 60 \sim 300$ s 为有电磁场或有H₂O₂暴露期. 在无电磁场暴露期 ($t = 0 \sim 60$ s), 各海马神经元的状态稳定点

x_e 和稳定域 r 列在表2. 这些海马神经元状态稳定点 x_e 和稳定域 r 也是不一致的, 表明海马神经元个体差异性. 电磁生物效应是在确保细胞状态稳定前提下进行, 细胞个体差异不影响实验. 阴性对照组 (0 mT) 在电磁场暴露期, 海马神经元Ca²⁺状态稳定. 阳性对照组 (H₂O₂) 在暴露期, 海马神经元Ca²⁺状态在 $t = 170$ s 发生转移, 表明对照组能起到阴阳性对照作用.

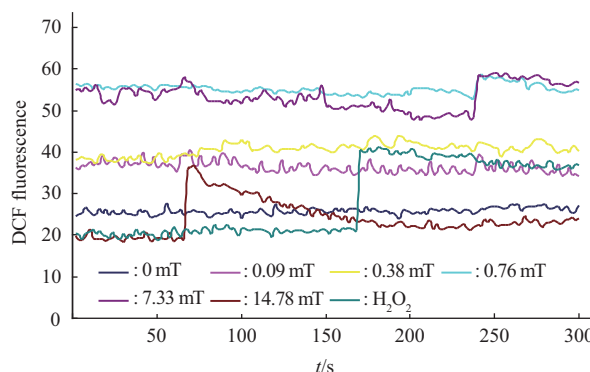


Fig. 4 Time domain curve of Ca²⁺ fluorescence in the hippocampal neuron

各组海马神经元Ca²⁺荧光实时响应状态变化如表2所示. 0.09 mT组 $x(t)$ 值在遍历时间内 ($t = 60 \sim 300$ s) 均处于电磁场暴露前的稳定域内, 属稳定状态. 0.38 mT组 $x(t)$ 值在 $t = 76$ s 时刻离开电磁场暴露前的状态稳定域, 不再返回, 属不稳定状态. 0.76 mT 和 7.33 mT 组在 $t = 60 \sim 240$ s 时段内保持状态稳定, 在 $t = 240$ s 时刻后分别有63.3%和59.2%的 $x(t)$ 值暂时离开状态稳定域, 属先稳定后渐进稳定状态. 14.78 mT 组和H₂O₂组分别在Ca²⁺暴发时间 ($t = 68$ s 和 $t = 170$ s) 发生状态转移.

Table 2 The status of the hippocampal neuron for real-time respond of Ca²⁺

Group	Cell state before exposure			Real-time corresponding cell state after exposure	
	K value	Stable point (x_e)	Stable domain (r)	60~300 s	
H ₂ O ₂	2	20.18	1.87	State shift after 170 s	
14.78 mT	3	19.32	2.43	State shift after 68 s	
7.33 mT	2	54.21	2.76	Step at 240 s, then gradually stable	
0.76 mT	2	55.78	0.93	Step at 240 s, then gradually stable	
0.38 mT	2	38.34	1.50	Unstable after 76 s	
0.09 mT	3	37.28	3.42	Stable	
0 mT	3	25.39	2.55	Stable	

各组电磁场或 H_2O_2 暴露与海马神经元 Ca^{2+} 荧光实时响应自相关函数关系如图5所示, 各组在电磁场或 H_2O_2 加入时刻 ($t = 60$ s), 相关函数均为1, 随观察时间的延长, 相关函数呈下降. 0、0.09、0.38、0.76、7.33 mT组自相关函数随时间呈交变, 14.78 mT、 H_2O_2 组自相关函数呈V形. 0.76、7.33、14.78 mT、 H_2O_2 组在 Ca^{2+} 暴发时间 ($t = 240$ 、240、68、170 s) 的相关函数分别为0.08、0.06、0.61、-0.39, 可以判断14.78 mT、 H_2O_2 组在 Ca^{2+} 暴发时间出现的阶跃性多数是由电磁场或 H_2O_2 加入引起, 而0.76和7.33 mT的阶跃性由电磁场引起概率很小.

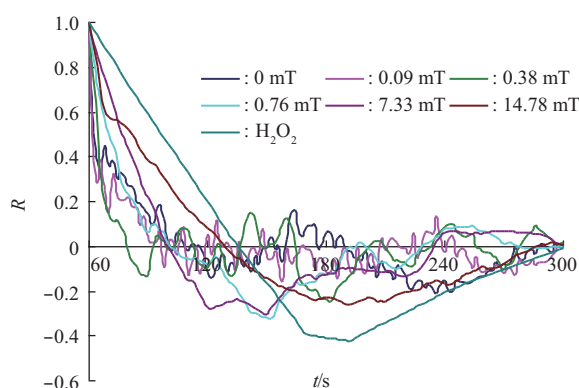


Fig. 5 Relation function of Ca^{2+} fluorescence in the hippocampal neuron

从海马神经元 Ca^{2+} 实时响应状态变化可见以下4个规律:

a. 在电磁场暴露期 ($t = 60 \sim 300$ s), 0.76 mT、7.33 mT、14.78 mT和 H_2O_2 组的 Ca^{2+} 荧光实时曲线 $x(t)$ 均存在明显的阶跃响应, 表明海马神经元对电磁场的 Ca^{2+} 实时响应具有阶跃性, 这是判断实时响应的重要标志.

b. 0.76 mT、7.33 mT、14.78 mT和 H_2O_2 组 Ca^{2+} 实时响应是在电磁场暴露或 H_2O_2 滴入后4个不同细胞培养皿中海马神经元 Ca^{2+} 的响应时间分别是240 s、240 s、68 s和170 s, 表明海马神经元对外扰电磁场或 H_2O_2 的响应时间具有延时性, 并且不一致.

c. 低剂量电磁场0.09 mT和0.76 mT暴露后, 海马神经元 Ca^{2+} 状态或为稳定, 或为不稳定, 而高剂量电磁场7.33 mT和14.78 mT组暴露后, Ca^{2+} 状态或为渐进稳定, 或为状态转移, 表明海马神经元

Ca^{2+} 对电磁场实时响应具有剂量性, 并且低剂量电磁场对海马神经元 Ca^{2+} 不产生生物效应.

d. 0.76 mT、7.33 mT、14.78 mT组海马神经元对电磁场响应后, Ca^{2+} 荧光强度随时间逐渐下降(图4), 表明海马神经元对 Ca^{2+} 的电磁场响应主要是渐进稳定, 但与电磁场剂量有关, 剂量愈高, 响应时间愈长.

3 讨 论

3.1 可靠性判断

电磁生物效应是一个节联反应, 具有因果性, 生物系统状态将影响后续生物效应的结果. 因此, 生物系统的原初状态必须是稳定的. 采用的稳定域方法可以有效地判断细胞的原初状态, 甄别和筛选稳定的细胞. 该方法是基于电磁场暴露前ROS和 Ca^{2+} 荧光实时曲线, 实时测量是生物系统稳定判断的基础.

采用自相关函数来判断ROS暴发和 Ca^{2+} 暴发事件是否由电磁场或 H_2O_2 所引起, 从而确认电磁生物效应的存在性. 自相关函数可以有正负双相, 正相关表示两个观察事件同相, 负正相关表示两个观察事件异相. 异相事件具有大差别, 更容易判断事件发生的差异性. 当自相关函数为1表示完全相关, 为0表示完全不相关, 近于1表示强相关, 远于1表示弱相关. 相关事件出现时间是影响相关函数的重要因素, 出现时间愈长, 自相关函数值愈小. 因此, 在电磁场加入立即产生生物效应的可靠性更高.

3.2 ELF-EMFs、ROS和 Ca^{2+} 的因果性

许多研究表明, Ca^{2+} 对于ROS的产生是必不可少的, Ca^{2+} 和ROS是细胞不同过程中相互作用的信使^[18]. 一些研究认为 Ca^{2+} 是导致ROS变化的原因, 通过线粒体呼吸链激活ROS生成酶升高细胞内 Ca^{2+} 水平, 以及受到ROS刺激增加胞内 Ca^{2+} . 胞内 Ca^{2+} -ATP酶和 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换物活性受细胞内氧化还原状态调节. 同时, Ca^{2+} 可激活过氧化氢酶和谷胱甘肽还原酶等抗氧化酶, 提高细胞超氧化物歧化酶水平^[19]. 另一些研究认为ROS是导致 Ca^{2+} 变化的原因. 第三种是共同相互作用, 如肌/内/质网(sarco/endoplasmic reticulun, SR/ER)与线粒体构成的连接物^[20]. ROS形成、 Ca^{2+} 浓度升高和线粒体死亡之间的相互作用, 构成了细胞死亡前的因果关系, 影响程度或顺序尚未确定^[21].

在电磁场介导产生ROS和 Ca^{2+} 变化因果性方

面, 采用比色法、形态学法检测增殖率, 但受到技术方法限制. 神经元中ROS、Ca²⁺和ELF-EMFs的因果性研究尚存困难. 研究者提出可以采用单细胞视频显微镜监测细胞内ROS和Ca²⁺变化^[22]. 实践表明, 实时记录是动态Ca²⁺测量的有效方法^[23-24]. 实时电磁场细胞暴露有利于ROS与Ca²⁺因果性研究.

3.3 随机过程与信噪比

在时间序列中, 随机过程是指随时间变化的随机变量. ROS和Ca²⁺荧光实时曲线 $x(t)$ 包括信号 $s(t)$ 和噪声 $n(t)$ 两部分:

$$x(t) = s(t) + n(t) \quad (7)$$

噪声 $n(t)$ 具有随机性, 因此ROS和Ca²⁺荧光实时曲线 $x(t)$ 是一个随机过程. 随机过程有两个数字特性均值 $\bar{x}(t)$ 和方差 $\sigma^2(t)$, 也是随时间变化. 随机过程包括平稳随机过程和非平稳随机过程两种, 平稳随机过程的数字特征是均值 $\bar{x}(t)$ 稳定, 这是判断电磁场暴露前神经元稳定性的理论依据. 非平稳随机过程的数字特征是均值 $\bar{x}(t)$ 随时间变化, 这是分析电磁场暴露后神经元状态变化的理论依据.

信噪比 $SNR=s(t)/n(t)$ 是电磁生物效应生物物理机制的一个重要方向^[3], 可以用于解释低水平电磁场生物效应的生物物理机制^[25], 尤其是生物分子随机共振^[26]. 从ROS和Ca²⁺荧光实时曲线 $x(t)$ 随机过程的信噪比 SNR 角度, 研究电磁生物效应, 尤其是弱效应的不确定性, 阐明电磁生物效应生物物理机制具有重要意义.

4 结 论

我们提出的一种ELF-EMFs暴露下细胞ROS和胞内Ca²⁺的实时响应方法包括电磁场暴露前细胞状态的鉴别、电磁场暴露后状态转移、电磁场作用的相关分析等. 通过在海马神经元ELF-EMFs暴露ROS和胞内Ca²⁺实时响应的应用实践, 我们证明这种方法在评价电磁生物效应是可行的, 可以进一步为电磁生物效应的随机过程及其特性研究提供新技术和新方法.

参 考 文 献

- [1] Wertheimer N, Leeper E. Electrical wiring configurations and childhood cancer. *Am J Epidemiol*, 1979, **109**(3): 273-284
- [2] Repacholi M H. WHO's health risk assessment of ELF fields. *Radiat Prot Dosimetry*, 2003, **106**(4): 297-299
- [3] World Health Organization. 2007 WHO research agenda for extremely low frequency fields. World Health Organization, 2007, https://www.who.int/peh-emf/research/elf_research_agenda_2007.pdf?ua=1
- [4] Valberg P A, Kavet R, Rafferty C N. Can low-level 50/60 Hz electric and magnetic fields cause biological effects?. *Radiat Res*, 1997, **148**(1): 2-21
- [5] Repacholi M H, Greenebaum B. Interaction of static and extremely low frequency electric and magnetic fields with living systems: health effects and research needs. *Bioelectromagnetics*, 1999, **20**(3): 133-160
- [6] Brocklehurst B, McLauchlan K A. Free radical mechanism for the effects of environmental electromagnetic fields on biological systems. *Int J Radiat Biol*, 1996, **69**(1): 3-24
- [7] Raha S, Robinson B H. Mitochondria, oxygen free radicals, and apoptosis. *Am J Med Genet*, 2001, **106**(1): 62-70
- [8] Sun Y, Lu Y F, Saredy J, *et al.* ROS systems are a new integrated network for sensing homeostasis and alarming stresses in organelle metabolic processes. *Redox Biol*, 2020, **37**: 101696
- [9] Wang H Z, Zhang X. Magnetic fields and reactive oxygen species. *Int J Mol Sci*, 2017, **18**(10): 2175
- [10] 包家立. 极低频电磁场的健康效应. *高电压技术*, 2015, **41**(8): 2550-2561
Bao J L. *High Volt Eng*, 2015, **41**(8): 2550-2561
- [11] 包家立, 胡亚楠. 射频电磁场的健康效应. *高电压技术*, 2016, **42**(8): 2465-2478
Bao J L, Hu Y N. *High Volt Eng*, 2016, **42**(8): 2465-2478
- [12] 苏海峰, 包家立, 李鹏. 电磁场暴露海马神经元自由基和胞内Ca²⁺的变化. *生物化学与生物物理进展*, 2013, **37**(3): 313-318
Su H F, Bao J L, Li P. *Prog Biochem Biophys*, 2013, **37**(3): 313-318
- [13] 郑秀秀, 包家立, 朱朝阳. 电磁场扰动下的细胞系统鲁棒性. *高电压技术*, 2014, **40**(12): 3837-3845
Zheng X X, Bao J L, Zhu C Y. *High Volt Eng*, 2014, **40**(12): 3837-3845
- [14] Schuderer J, Oesch W, Felber N, *et al.* *In vitro* exposure apparatus for ELF magnetic fields. *Bioelectromagnetics*, 2004, **25**(8): 582-591
- [15] Feng B H, Qiu L P, Ye C M, *et al.* Exposure to a 50-Hz magnetic field induced mitochondrial permeability transition through the ROS/GSK-3 β signaling pathway. *Int J Radiat Biol*, **92**(3): 148-155
- [16] Feng B H, Ye C M, Qiu L P, *et al.* Mitochondrial ROS release and subsequent Akt activation potentially mediated the anti-apoptotic effect of a 50-Hz magnetic field on FL cells. *Cell Physiol Biochem*, 2016, **38**(6): 2489-2499
- [17] 王顺, 包家立, 朱朝阳. 实时电磁场细胞暴露系统的研制. *高电压技术*, 2015, **41**(4): 1409-1416
Wang S, Bao J L, Zhu C Y. *High Volt Eng*, 2015, **41**(4): 1409-1416
- [18] Camello-Almaraz C, Gomez-Pinilla P J, Pozo M J, *et al.* Mitochondrial reactive oxygen species and Ca²⁺ signaling. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006, **291**: C1082-C1088
- [19] Gordeeva A V, Zvyagilskaya R A, Labas Y A. Cross-talk between reactive oxygen species and calcium in living cells. *Biochemistry (Mosc)*, 2003, **68**(10): 1077-1080
- [20] Csordás G, Hajnóczky G. SR/ER-mitochondrial local

- communication: calcium and ROS. *Biochim Biophys Acta*, 2009, **1787**(11): 1352-1362
- [21] Chinopoulos C, Adam-Vizi V. Calcium, mitochondria and oxidative stress in neuronal pathology. Novel aspects of an enduring theme. *FEBS J*, 2006, **273**(3): 433-450
- [22] Morabito C, Guarnieri S, Fanò G, *et al.* Effects of acute and chronic low frequency electromagnetic field exposure on PC12 cells during neuronal differentiation. *Cell Physiol Biochem*, 2010, **26**(6): 947-958
- [23] McCreary C R, Dixon S J, Fraher L J, *et al.* Real-time measurement of cytosolic free calcium concentration in Jurkat cells during ELF magnetic field exposure and evaluation of the role of cell cycle. *Bioelectromagnetics*, 2006, **27**(5): 354-364
- [24] Rozanski C, Belton M, Prato F S, *et al.* Real-time measurement of cytosolic free calcium concentration in DEM-treated HL-60 cells during static magnetic field exposure and activation by ATP. *Bioelectromagnetics*, 2009, **30**(3): 213-221
- [25] Vaughan T E, Weaver J C. Molecular change signal-to-noise criteria for interpreting experiments involving exposure of biological systems to weakly interacting electromagnetic fields. *Bioelectromagnetics*, 2005, **26**(4): 305-322
- [26] Astumian R D, Adair R K, Weaver J C. Stochastic resonance at the single-cell level. *Nature*, 1997, **388**(6643): 632-633

Methodology Study on The Real-time Response of ROS and Ca²⁺ to Extremely Low Frequency Electromagnetic Fields in The Hippocampal Neurons*

CEN Ze-Nan, HUANG Wei-Wei, BAO Jia-Li**, ZHENG Xiu-Xiu, ZHU Chao-Yang

(Research Team of Biophysics and Medical Engineering, Bioelectromagnetics Laboratory of Zhejiang Province, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract Existing research methods for biological effects of extremely low frequency electromagnetic fields (ELF-EMFs) are comparison between groups, with inability to exclude individual differences in cell sensitivity or changes in conditions during experiment. This work proposed a method for real-time effects observation of ELF-EMFs in the same cell and same condition. The stability domain was used to identify the stability of hippocampal neurons before ELF-EMFs exposure. At the time of electromagnetic field intervention ($t=60$ s), ELF-EMFs were exposed to hippocampal neurons at 0, 0.09, 0.38, 0.76, 7.33 and 14.78 mT, respectively. Reactive oxygen species (ROS) and Ca²⁺ fluorescence response curves of hippocampal neurons were recorded in real-time, and the autocorrelation function between ELF-EMFs and fluorescence response was established. The results showed as follows: (1) The step properties of fluorescence response were clear at the burst times of ROS and Ca²⁺, which were important indicator to identify the real-time response; (2) The response time of ROS and Ca²⁺ to ELF-EMFs were delayed and inconsistent; (3) ROS and Ca²⁺ had dose-dependent response to ELF-EMFs; (4) The response of ROS to ELF-EMFs was complex; (5) The response of Ca²⁺ to ELF-EMFs was asymptotically stable. When correlation function exceeded 0.3, the real-time response of ELF-EMFs and ROS/Ca²⁺ was correlated. It was concluded that a real-time response method of intracellular ROS and Ca²⁺ to ELF-EMFs exposure was feasible for the evaluation of electromagnetic bioeffects.

Key words ELF-EMF, real-time, ROS, Ca²⁺, hippocampal neurons, stability, stochastic process, correlation

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0368

* This work was supported by a grant from National S&T Major Project of China (2018ZX10301201-002).

** Corresponding author.

Tel: 86-571-88208171, E-mail: baojl@zju.edu.cn

Received: October 15, 2020 Accepted: March 9, 2021