

· 基础研究 ·

电磁场对骨肉瘤 MG63 细胞系化疗的增敏作用

饶耀剑 许涛 刘慧娟 程杰 夏仁云

【摘要】目的 探讨电磁场对骨肉瘤细胞系 MG63 细胞化疗增敏作用的机制。**方法** 以频率为 50 Hz, 强度为 0.8 mT、1.6 mT、3.2 mT 的电磁场, 对具有一定阿霉素浓度的 MG63 细胞进行磁场干预, 采用四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 法检测并确定磁场对骨肉瘤化疗作用最明显的磁场强度, 逆转录酶聚合酶链反应技术 (RT-PCR) 检测在最佳磁场作用下增殖细胞核抗原 (PCNA) 和 Survivin mRNA 的表达以及流式细胞仪检测细胞周期情况。**结果** MTT 显示磁场化疗组 (D 组) 细胞生存率较单纯阿霉素化疗组 (B 组) 下降, 且 1.6 mT 作用最明显; RT-PCR 结果显示 PCNA mRNA、Survivin mRNA 表达下降; 流式细胞仪检测 D 组 G_2/M 期阻滞较 B 组高, D 组 G_2/M 期细胞达 $(80.20 \pm 0.96)\%$, 高于 B 组的 $(18.08 \pm 1.50)\%$ 、单纯磁场组 (C 组) 的 $(55.11 \pm 2.20)\%$ ($P < 0.05$)。**结论** 适当窗口的电磁场作用可以提高肿瘤的化疗效果, 为临床化疗提供一个新的辅助措施。

【关键词】 电磁场; 增敏作用; MG63

The sensitizing effects of electromagnetic fields on chemotherapy of osteosarcoma cell line MG63 RAO Yao-jian*, XU Tao, LIU Hui-juan, CHENG Jie, XIA Ren-yun. * Department of Orthopedics, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

【Abstract】Objective To investigate the sensitizing mechanism of electromagnetic fields (EF) on chemotherapy of osteosarcoma cell line MG63. **Methods** MG63 cell line, co-incubated with Adriamycin, was interfered by EF with intensities of 0.8 mT, 1.6 mT and 3.2 mT, respectively. The most obvious intensity of EF for the chemotherapy of osteosarcoma was determined by using MTT assay, while the expression of proliferation cell nuclear antigen (PCNA) mRNA and survivin mRNA in the most suitable EF was measured with reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), the cell cycle was observed by using flow cytometry. **Results** It is shown by MTT that the survival rate of cells in the chemotherapy plus EF group (group D) was significantly decreased as compared to that in the Adriamycin group (group B), especially at 1.6 mT. The expression of PCNA mRNA and survivin mRNA was decreased according to the results of RT-PCR. It is indicated by the results of flow cytometry that the amount of cells, obstructed in G_2/M phase, was increased in group D $(80.2 \pm 0.96)\%$ with comparison of that in group B $(18.08 \pm 1.5)\%$ and that in the EF group (group C) $(55.11 \pm 2.2)\%$ ($P < 0.05$). **Conclusion** EF with appropriate intensity can enhance the effects of chemotherapy on tumor, and it can provide clinical chemotherapy with a new assistant way.

【Key words】 Electromagnetic field; Sensitization; MG63

低频电磁场是指频率为 0 ~ 3 000 Hz 的电磁场, 其中频率为 50 Hz (美国等少数国家为 60 Hz) 的电磁场为工频电磁场, 是我们日常生活中接触最多的电磁场。电磁场对肿瘤的抑制作用是一个活跃的研究领域, 国内外有关电磁场治疗恶性肿瘤的报道很多。Mulay 等^[1]报道了工频电磁场对肉瘤的治疗作用, 北京友谊医院肿瘤科^[2]应用脉冲电磁场治疗恶性肿瘤取得一定疗效, 但其作用机理尚不清楚。电磁场对肿瘤化疗的影响目前尚未见到报道。本实验从细胞水平上研究电磁场对肿瘤抑制及对肿瘤化疗敏感性影响的作用机制, 旨在为临床电磁场辅助治疗肿瘤提供理论依据。

材料与方法

一、材料

1. 细胞及主要试剂: MG63 骨肉瘤细胞系 (武汉大学典藏生物中心), RPMI-1640 培养基 (Hyclone 公司), 小牛血清 (Gibco 公司), 阿霉素 (Sigma 公司), 胰蛋白酶 (Amersco 公司), 碘化丙啶 (PI)、TRIZOL (Invitrogen 公司), MMLV 逆转录酶 (Promega 公司), OligodT15 (Sabco 公司), RNasin (华美公司), dNTPs (Roche 公司), Taq DNA 聚合酶、四甲基偶氮唑蓝 (MTT) (晶美生物技术公司), 焦碳酸二乙酯 (diethyl procarbonate, DEPC, TBD 公司产品), 琼脂糖粉剂 (Amersco 公司), 100 bp DNA Ladder (北京中山生物技术有限公司), 引物由北京赛百胜生物工程公司合成。

作者单位: 430030 武汉, 华中科技大学同济医学院附属同济医院骨科 (饶耀剑、程杰、夏仁云), 康复医学科 (许涛); 黄石冶钢医院骨科 (刘慧娟)

2. 电磁场发生器:采用 Helmholtz 线圈,能生成场强为 0~100 高斯连续可调的 50 Hz 正弦波电磁场,磁场均匀性较好,分布差异 <1%,由海军工程大学研制^[3]。

二、实验方法

1. 细胞培养:MG63 细胞系置于含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液中生长,37℃、5% CO₂ 温箱中培养,0.25% 胰蛋白酶和 0.02% 乙二胺四乙酸(ethylene-diamine tetraacetic acid, EDTA)的复合消化液中消化传代。

2. MTT 检测电磁场作用下阿霉素对 MG63 细胞的抑制率:将生长状态良好、对数生长期的 MG63 细胞接种到 96 孔板,置培养箱中培养过夜,待充分贴壁后,以场强分别为 0.8 mT、1.6 mT、3.2 mT 的电磁场、浓度为 0.1 μg/ml 的阿霉素进行干预。磁场干预细胞每日曝磁 1 h,连续 3 d,非磁场干预细胞在同样条件下不加磁场放置 1 h,连续 3 d 检测细胞抑制情况。根据磁场和药物的干预方式不同共分 4 大组:A 组为不加磁场和化疗组;B 组为单纯阿霉素化疗组;C 组为单纯磁场组,根据磁场强度的不同又分为 3 个亚组,即 C₁、C₂、C₃ 组,其磁场强度分别为 0.8 mT、1.6 mT、3.2 mT;D 组为磁场化疗组,根据磁场强度的不同也分 3 个亚组,即 D₁、D₂、D₃ 组,强度分别为 0.8 mT、1.6 mT、3.2 mT。检测时每孔加入 5 g/L 的 MTT 10 μl,继续孵育 4 h,每孔加入 100 μl 二甲亚砷避光振荡 15 min。酶标仪 570 nm 检测吸光值,以 A 组为对照组,其细胞活力为 100%,以 B、C、D 组为干预组,按细胞抑制率 = 1 - (干预组吸光值/对照组吸光值)这一公式计算各干预组细胞生存率,重复 3 次。

3. RT-PCR 检测各组增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA) mRNA 和 Survivin mRNA 的表达:本实验选用阿霉素的浓度为 0.1 μg/ml、电磁场强度为 1.6 mT。以不同条件共分 A、B、C、D 4 组(具体分组同方法 2)。每组细胞均以 100 ml 培养瓶培养,待细胞出现 80% 融合时开始以不同条件处理细胞(干预方法同 MTT 方法),3 d 后用 0.25% 的胰酶消化、血清终止消化,1 000 转/min 离心 5 min,弃上清, PBS 缓冲液洗 2 次并离心,按产品说明书用 Trizol 一步法提取细胞总 RNA,经紫外分光光度法定量后各取 2 μg RNA 进行逆转录反应合成 cDNA。以 Actin-beta 为内参,分别取 1 μl cDNA 模板进行 PCR 反应,相应引物及 PCR 反应条件为引物序列如下:Actin-beta 上游引物 5' ATGTTTGAGACCTTCAACAC3',下游引物 5' CACGTCACACTTCATGATGG3',扩增产物长度 489 bp; PCNA 上游引物 5' AAAGTAGCTAGACTTTCCTC 3',下游引物 5' TCACGCCATGGCCAGGTTG3',扩增产物长度 274 bp,94℃ 变性 45 s、56℃ 退火 60 s、72℃ 延伸 90 s,

35 个循环;Survivin 上游引物 5' GTGAATTTTGAAACT-GGACAG3',下游引物 5' CCTTTCCTAAGACATTGCT-TAAG 3',扩增产物长度 243 bp,94℃ 变性 30 s、57℃ 退火 45 s、72℃ 延伸 60 s,35 个循环。重复 3 次。

4. 流式细胞术检测电磁场作用下阿霉素对 MG63 细胞凋亡的影响:细胞处理和分组如方法 2,离心收集细胞,PBS 洗 2 次离心,70% 的冰乙醇固定,-20℃ 过夜,次日离心去上清,调节细胞浓度为 10⁶ 个/ml,加入 RNase A(终浓度为 0.25 mg/ml)和 PI 染色液(终浓度为 50 μg/ml),室温避光染色 30 min,流式细胞仪检测细胞周期,重复 3 次。

三、统计学分析

实验数据采用($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 11.0 统计分析软件包对 A、B、C、D 组采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、MTT 结果显示磁场对肿瘤细胞化疗的影响

图 1 显示单纯磁场中 C₂ 组 48 h 细胞生存率为 (78.5 ± 6.1)%,与 A 组 48 h 的 (98.0 ± 3.0)% 比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);D₂ 组在 72 h 细胞生存率为 (20.7 ± 2.0)%,与 B 组的 (47.8 ± 4.8)% 及 C₂ 组的 (72.0 ± 4.3)% 比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

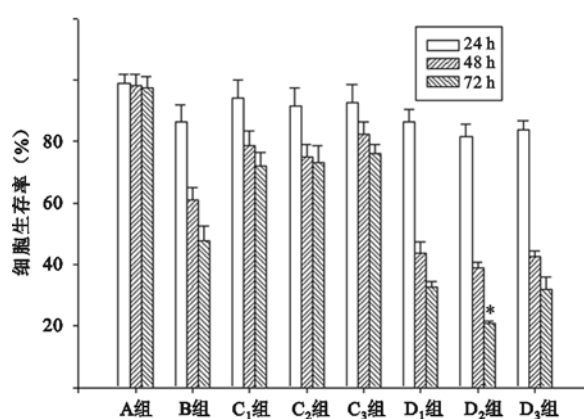


图 1 各组 3 个时间段的细胞生存率

注:D₂ 组 72 h 细胞生存率为 (20.7 ± 2.0)%,与 C₂ 组 72 h 的 (72.0 ± 4.3)%、B 组 72 h 的 (47.8 ± 4.8)% 比较,* $P < 0.05$

二、RT-PCR 显示 Survivin mRNA 的表达

图 2A 表明,D 组 Survivin mRNA 表达最低。灰度值扫描各组与内参比值:D 组的 (42.3 ± 1.3)% 与 A 组的 (72.3 ± 1.2)% 比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);C 组的 (69.2 ± 2.4)%、B 组的 (70.2 ± 2.4)% 与 A 组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),说明单纯磁场或药物作用对 Survivin mRNA 的表达没有影响。图 2B 表明,PCNA mRNA 的表达在 D 组为 (32.5 ± 1.2)%,与 A 组

的 $(89.2 \pm 1.8)\%$ 比较,差异有统计学意义($P < 0.05$); C 组的 $(62.3 \pm 1.5)\%$ 与 A 组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

三、磁场和化疗对 MG63 细胞细胞周期的影响

从图 3 可以看出 A、B、C、D 组的细胞周期情况。其中 D 组 G_2/M 期阻滞达 $(80.20 \pm 0.96)\%$,明显高于 B 组的 $(55.11 \pm 2.20)\%$ 和 C 组的 $(18.08 \pm 1.50)\%$ ($P < 0.05$),表明磁场对肿瘤细胞的细胞周期有一定的影响。

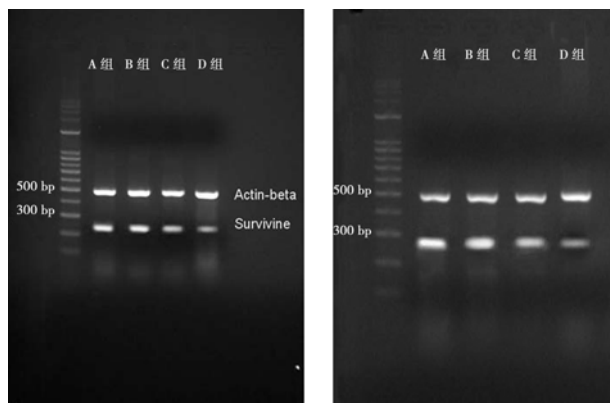


图 2A 各组 Survivin mRNA 的表达

图 2B 各组 PCNA mRNA 的表达

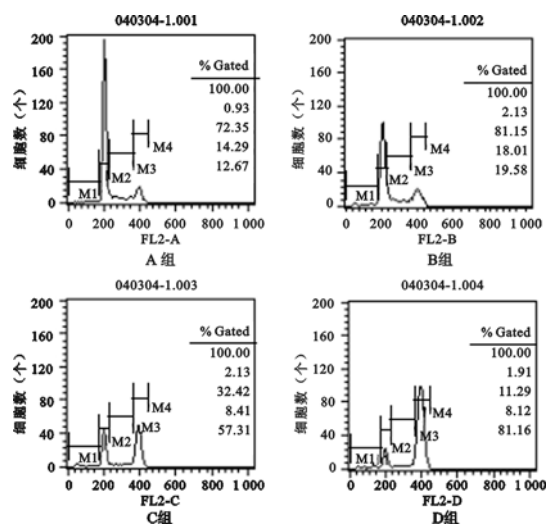


图 3 各组细胞周期情况

讨 论

生命与磁场密切相关,外磁场对肿瘤细胞的抑制作用影响了肿瘤细胞的正常生长。运动的电流产生磁场,而生物细胞的细胞膜及细胞核上都存在着生物电。正常细胞与癌细胞的电磁特性不同,Amdrose^[4]用电泳技术测定了小鼠肾脏的正常细胞和癌细胞的电泳率,发现癌细胞的电泳率高于正常细胞,癌细胞膜电位亦高于正常。

吴明忠^[5]探讨了恒定磁场对肿瘤细胞抑制作用

的机制,认为是恒定磁场通过对生物体内带电颗粒的洛伦兹作用力和对抗磁各向异性物质的磁转矩作用产生生物效应所致。Blackman 等^[6]研究发现,电磁场可抑制细胞核的生长。本实验发现,电磁场对 PCNA mRNA 的表达的影响与 A 组比较,差异有统计学意义。PCNA 作为 DNA 聚合酶 δ 的辅助因子,不仅在 DNA 复制中起关键作用,而且参与来自细胞外的增殖信号的处理,因而在细胞增殖及细胞周期调控中发挥着极为重要的作用。磁场对 PCNA mRNA 表达的影响可能是磁场对肿瘤细胞抑制作用的分子机制,即通过调控 PCNA mRNA 影响了肿瘤细胞核的复制,影响细胞核的生长,这与 Blackman 等^[6]的研究结果相一致。

磁场对肿瘤的抑制作用的机制是复杂的,其对肿瘤细胞的抑制作用也是多方面的。本实验观察到一定强度的电磁场可以提高肿瘤对化疗的敏感性,使化疗的细胞凋亡率升高,其机理可能为:(1)外加磁场改变了肿瘤的膜电位,影响了膜表面的泵药蛋白的泵药能力,使细胞内药物浓度增加,增强了化疗效果。(2)电磁场作用下阿霉素抑制肿瘤细胞 Survivin 基因 mRNA 的表达,Survivin 是新近发现的凋亡抑制蛋白家族成员,在有丝分裂和凋亡的调控中起重要作用^[7,8]。Survivin 过表达是某些肿瘤预后不良的一个因素,是导致肿瘤细胞耐药性的因素^[9]。在磁场的作用下,阿霉素下调 Survivin 基因 mRNA 的表达,有可能是磁场影响阿霉素化疗效果的原因之一。

参 考 文 献

- 1 Mulay IL, Mulay LN. Effect of a magnetic field on sarcoma 37 ascite tumour cells. *Naturwissenschaften*, 1961, 190:1019-1027.
- 2 北京友谊医院肿瘤科. 电磁场治疗恶性肿瘤的临床初步报告. *物理医学*, 1978, 3:1.
- 3 赵文春, 赵治华, 马伟明, 等. 基于综合补偿的磁场发生器的研制. *电工电能新技术*, 2003, 22:69-72.
- 4 Ambrose EJ. Electrophoretic behaviour of cells. *Prog Biophys Mol Biol*, 1966, 16:241-265.
- 5 吴明忠. 磁场和磁性材料在肿瘤治疗中的应用. *磁性材料及器件*, 1998, 4:19-31.
- 6 Blackman CF, Blanchard JP, Benane SG, et al. Empirical test of an ion parametric resonance model for magnetic field interactions with PC-12 cells. *Bioelectromagnetics*, 1994, 15:239-260.
- 7 Li F, Ambrosini G, Chu EY, et al. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature*, 1998, 396:580-584.
- 8 Shin S, Sung BJ, Cho YS, et al. An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7. *Biochemistry*, 2001, 40:1117-1123.
- 9 Altieri DC. The molecular basis and potential role of survivin in cancer diagnosis and therapy. *Trends Mol*, 2001, 7:542-547.

(修回日期:2004-10-25)

(本文编辑:松 明)