

· 基础研究 ·

50 Hz 正弦电磁场对骨肉瘤 MG-63 细胞增殖的影响

尚林 刘阳 宋明宇 虞冀哲 吴华

【摘要】目的 探讨 50 Hz、1.0 mT 正弦电磁场对骨肉瘤 MG-63 细胞增殖的影响。**方法** 将骨肉瘤 MG-63 细胞分成对照组和实验组,对照组放在无电磁场的培养箱中,实验组放入含有 50 Hz、1.0 mT 正弦电磁场的培养箱中,分别在第 2 天、第 4 天和第 6 天采用细胞计数试剂盒-8 (CCK-8) 法检测细胞增殖活性,流式细胞仪测定细胞周期,逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 技术检测 cyclin B1 和 cyclin D1 的 mRNA 表达水平变化。**结果** 2 组比较,实验组细胞增殖活性明显降低、G0-G1 期细胞数目增多、cyclin B1 和 cyclin D1 的 mRNA 表达水平下降。**结论** 50 Hz、1.0 mT 正弦电磁场能够显著抑制骨肉瘤 MG-63 细胞增殖。

【关键词】 正弦电磁场; 骨肉瘤细胞; 增殖; 细胞周期

The effect of 50 Hz sinusoidal electromagnetic fields on the proliferation of the osteosarcoma cell line MG-63

SHANG Lin, LIU Yang, SONG Ming-yu, YU Ji-zhe, WU Hua. Department of Orthopedic Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical University, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Corresponding author: WU Hua, Email: hwhust@yahoo.cn

【Abstract】 Objective To investigate the biological effect of 50 Hz sinusoidal electromagnetic fields at 1 mT on the proliferation of the human osteosarcoma cell line MG-63. **Methods** Osteosarcoma MG-63 cells were divided into control and experimental groups. The control group was incubated without an electromagnetic field; the experimental group was incubated in a 50 Hz, 1.0 mT sinusoidal electromagnetic field. On the 2nd, 4th and 6th day, their proliferation was determined using a cell counting kit-8 (CCK-8) assay. Variations in the cell cycle were detected with flow cytometry (FCM). Semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to measure cyclin B1 and cyclin D1 mRNA. **Results** Compared with the control group, proliferation of the experimental group cells was reduced significantly. The percentage of cells at G0-G1 phase increased, and the mRNA expression of cyclin B1 and cyclin D1 was significantly reduced. **Conclusions** A 50 Hz sinusoidal electromagnetic field at 1.0 mT can inhibit the proliferation of osteosarcoma cell line MG-63 significantly.

【Key words】 Sinusoidal electromagnetic fields; Osteosarcoma cells; Proliferation; Cell cycle

由于化疗药物的不良反应及耐药性,对肿瘤的治疗一直是临床上的难题。随着磁生物学效应研究的开展,磁场日益广泛被应用于临床治疗。磁场对肿瘤细胞影响的研究越来越多,磁场能够影响肿瘤细胞的增殖、凋亡及黏附功能^[1-3]。将磁场作为癌症的治疗方法已经取得了部分效果,而且许多动物实验都已表明磁场有抑制肿瘤的作用^[4]。虽然国内外有磁场对骨肉瘤细胞增殖影响的研究报道,但其具体机制还不甚清楚。本研究从细胞增殖活性、细胞周期和基因表达水平等方面,研究 50 Hz 正弦电磁场对骨肉瘤 MG-63 细胞增殖的影响,以期为临床治疗提供理论依据。

材料与方法

一、材料

1. 主要试剂:优质胎牛血清(美国 Gibco 公司)和达尔伯克高糖必须基本培养基(Dulbecco's minimum essential medium-high glucose, DMEM-HG)(美国 Hyclone 公司);胰酶(Amersco 公司);引物合成及 Trizol Reagent(Invitrogen 公司);逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)试剂盒(Toyobo 公司);细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK-8)(碧云天生物技术有限公司)等。

2. 主要仪器:电磁场发生器(海军工程大学电机系设计与制造),电磁场发生器置入条件为 37℃、5% CO₂、饱和湿度的细胞培养箱中;倒置相差显微镜(Olympus, 日本);DG3022A 型酶联免疫检测仪(华东电子管厂);台式微型离心机,冷冻桌面离心机(Eppendorf 公司);基因扩增仪(Eppendorf 公司);紫外

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2011.011.004

基金项目:国家自然科学基金项目(51077065)

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院整形外科

通信作者:吴华,Email:hwhust@yahoo.cn

分光光度计 (Beckman Coulter 公司) 及凝胶成像仪 (Vilber 公司) 等。

人骨肉瘤 MG-63 细胞株由中国典型培养物保藏中心提供。

二、实验方法

1. 细胞培养: MG-63 细胞用含有 10% 胎牛血清的高糖 DMEM, 在 37℃、5% CO₂ 条件下培养, 每隔 2 d 换液并及时传代。将生长状态良好、呈对数生长期的 MG-63 细胞经 0.25% 胰蛋白酶消化后, 以 3×10^3 个/孔的密度种于 96 孔板中, 或以 2×10^4 个/皿的密度接种 35 mm 直径的细胞培养皿中, 或以 1×10^5 个/瓶的密度接种于 50 ml 体积的培养瓶中。

2. 分组与磁场干预: 待细胞充分贴壁后, 放入 50 Hz、1.0 mT 的正弦电磁场中, 分别干预第 0 天、第 2 天、第 4 天及第 6 天, 其中干预第 0 天组设为对照组, 其他为实验组。

3. 细胞增殖活性测定: 采用 CCK-8 法检测细胞增殖活性。按照 CCK-8 试剂盒说明书, 磷酸盐缓冲液 (phosphate-buffered saline, PBS) 漂洗细胞, 小心吸干孔内液体后, 每孔加入 100 ml 无血清 DMEM, 避光条件下每孔加入 10 ml CCK-8, 置于 37℃、5% 的 CO₂ 饱和湿度培养箱中避光孵育 1 h。使用酶标仪在 450 nm 波长测吸光度 (optical density, OD) 值, 并绘制成立方图。

4. 细胞周期测定: 采用碘化丙啶 (propidium Iodide, PI) 染色法检测细胞周期, 离心收集细胞, 预冷 PBS 洗涤, 预冷 70% 乙醇 4℃ 固定过夜, 细胞染色, 以标准程序用流式细胞仪检测细胞周期。

5. RT-PCR 技术: 每个培养瓶加 1 ml Trizol, 按试剂盒说明步骤提取总 RNA, 紫外分光光度计测定 A260/A280 值并计 RNA 浓度。取总 RNA 1 μg, 加 Oligo (dT)20、随机引物、去离子水于 65℃ 热变性 5 min 后置冰上操作, 再加入 5 × buffer、dNTP Mixture、RNA 酶抑制剂至总体积为 20 μl。42℃ 反应 20 min, 99℃ 5 min, 瞬间离心, 得到 cDNA。然后取各组 cDNA 1 μl 分别加入上/下游引物 (10 μM) 各 1 μl、2 × PCR TaqMix 12.5 μl (含 100 mmol/L KCl, 20 mmol/L Tris-HCl, 3 mmol/L MgCl₂, 500 μmol/L dNTP Mixture, 0.1 U/μl Taq DNA 聚合酶等), 补足超纯水至 25 μl。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 然后利用凝胶照相分析系统成像, 对各电泳条带吸光灰度值进行分析。引物设计见表 1。

三、统计学分析

每组 3 个样本, 重复进行 3 次独立实验, 实验数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 17.0 版统计软件进行配对资料 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 引物序列、PCR 条件及产物大小

引物名	引物序列 (5'-3')	退火温度	循环数	产物 (bp)
GAPDH	S: ACGACCACTTTGTCAAGCTC A: GTGAGGAGGGGAGATTCACT	54	40	210
cyclin B1	S: CCATTATTGATCGGTTTCATGCAG A: CTAGTGCAGAATTCAGCTGTGGT	55	32	585
cyclin D1	S: GAGGAACAGAAGTGCGAGGA A: TCTGGAGAGGAAGCGTGTGA	61	34	501

结 果

一、细胞增殖活性测定

50 Hz 正弦电磁场对细胞增殖活性的影响如表 2 所示。干预第 2 天、第 4 天、第 6 天与干预前相比, 细胞增殖活性明显被抑制, 并且随着干预时间的延长, 这种抑制效应越来越明显, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 2 2 组 CCK-8 法所测 OD 值 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	第 2 天 OD 值	第 4 天 OD 值	第 6 天 OD 值
对照组	0.732 ± 0.045	1.300 ± 0.034	1.972 ± 0.105
实验组	0.502 ± 0.026 ^a	0.999 ± 0.075 ^a	1.148 ± 0.068 ^a

注: 与对照组同期比较, ^a $P < 0.05$

二、细胞周期检测

细胞周期变化如表 3 所示。随着磁场干预时间延长, 2 组相比, 实验组 G0-G1 期细胞所占比例更大, S、G2-M) 期细胞所占比例更小, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 3 对照组和实验组细胞周期测定 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	细胞周期		
	G0-G1	S	G2-M
对照组			
第 2 天	51.78 ± 0.25	28.05 ± 0.21	20.17 ± 0.15
第 4 天	60.47 ± 0.13	29.30 ± 0.10	10.27 ± 0.11
第 6 天	69.48 ± 0.12	14.49 ± 0.23	16.03 ± 0.31
实验组			
第 2 天	54.86 ± 0.13 ^a	26.93 ± 0.41 ^a	18.21 ± 0.16 ^a
第 4 天	64.27 ± 0.20 ^a	27.25 ± 0.28 ^a	8.48 ± 0.50 ^a
第 6 天	79.95 ± 0.21 ^a	9.39 ± 0.12 ^a	10.66 ± 0.22 ^a

注: 与对照组同期比较, ^a $P < 0.05$

三、RT-PCR

不同干预时间时, 对照组和实验组的 GAPDH、cyclin B1、cyclin D1 的 mRNAs 表达量的变化如图 1 所示; 2 组相比, 实验组 cyclin B1 和 cyclin D1 的 mRNAs 表达量降低, 并且随着干预时间延长呈递减趋势。

讨 论

骨肉瘤是一种起源于骨间叶组织、好发于青少年长管状骨干骺端的原发性恶性肿瘤, 其发病率在原发

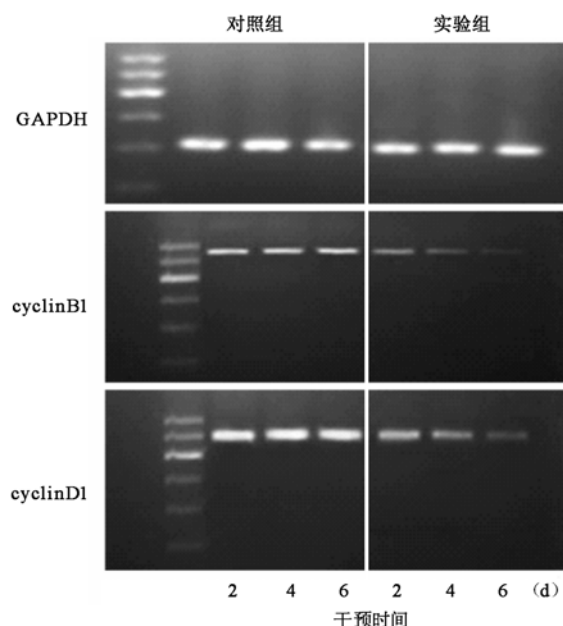


图1 实验组分别在干预第2天、第4天和第6天与对照组比较,内参和目的基因的变化

性恶性肿瘤中占首位^[5]。由于骨肉瘤对化疗或放疗不敏感,因此利用磁场治疗肿瘤的可行性和重要性越来越被人们所认识。Santini 等^[6]在研究50 Hz正弦电磁场对骨肉瘤细胞黏附分子影响中发现,电磁场可以显著改变 MG-63 和 Sao-2 的增殖效应。Sabo 等^[7]在研究稳恒磁场对 HL-60 细胞的影响时发现,1 T 稳恒磁场作用 72 h 可以降低癌细胞的活性。祝文涛等^[8]研究发现,经过低频电磁场干预的实验组 MG-63 细胞与对照组相比,其增值能力下降。

CCK-8 是一种检测细胞增殖的方法,它可以被线粒体内的脱氢酶还原生成橙黄色的甲臞,生成的甲臞量和活细胞数量成正比,间接反映活细胞数量。细胞的生长周期主要有 DNA 合成前期(G₁)、DNA 合成期(S),DNA 合成后期(G₂)及细胞分裂期(M)。其中后3个阶段一般比较稳定,细胞周期所经历的时间差异主要取决于 G₁期的长短^[9]。cyclin B1 是有丝分裂过程中起调控作用的周期蛋白,它作为调节亚基参与成熟促进因子活化调节,进而参与有丝分裂起始和退出调控^[10]。cyclin B1 过表达能促进 G₂-M 期转换,甚至导致细胞增生失控以及恶性转化^[11]。cyclin D1 作为 G₁ 期细胞周期素,在细胞周期中最重要的调控点 G₁-S 转换中起重要作用。其过表达是导致 G₁-S 期监测点缺陷主要原因。监测点功能缺陷可能会导致遗传基因突变和染色体结构异常的细胞增殖,从而导致肿瘤发生^[12]。cyclin D1 基因激活,则 cyclin D1 持续高表达,将导致 G₁ 期缩短,提前进入 S 期,使细胞增殖失控,最终形成肿瘤^[13]。

本研究中,1.0 mT、50 Hz 的正弦电磁场通过对

MG-63 细胞进行连续刺激,使细胞中的细胞周期素 cyclin B1 和 cyclin D1 的基因表达降低。cyclin B1 基因表达降低,抑制 G₂-M 期转换,从而减弱细胞有丝分裂,DNA 复制。cyclin D1 基因表达降低,导致 G₀-G₁ 期延长,推迟进入 S 期。通过对以上 2 个基因的调控,实验组细胞的增殖活性被明显抑制。

本研究初步证实:①1.0 mT、50 Hz 的正弦电磁场对骨肉瘤 MG-63 细胞的增值活性具有明显的抑制作用;②50 Hz 正弦电磁场通过抑制 cyclin B1 和 cyclin D1 基因表达,从而使骨肉瘤 MG-63 细胞在细胞周期的 G₀-G₁ 期延长,延迟进入 S 期,减弱 DNA 复制,从而达到抑制骨肉瘤 MG-63 细胞增值的效果;③随着暴磁时间的延长,这种抑制增殖的作用越来越明显,即具有时间依赖性。这为今后 50 Hz 正弦电磁场应用于临床对骨肉瘤的治疗提供了理论依据。

参 考 文 献

- [1] 曹建平, 蹇爱荣, 张维, 等. 0.2-0.4T 静磁场对肿瘤细胞生长和黏附功能的响. 世界华人消化杂志, 2010, 18: 1337-1343.
- [2] 朱杰西. 稳恒磁场抑制肿瘤增殖的实验研究与理论探讨. 生物磁学, 2006, 6: 10-13.
- [3] 王可, 张沪生, 郑从义. 超低频脉冲梯度磁场治疗肿瘤及其机理的探讨. 武汉大学学报(理学版), 2001, 47: 220-224.
- [4] 付文祥. 磁场抑制肿瘤的机理. 生物磁学, 2005, 5: 41-43.
- [5] Tsuchiya H, Kanazawa Y, Abdel-Wanis ME, et al. Effect of timing of pulmonary metastases identification on prognosis of patients with osteosarcoma: the Japanese Musculoskeletal Oncology Group study. J Clin Oncol, 2002, 20: 3470-3477.
- [6] Santini MT, Rainaldi G, Ferrante A, et al. Effects of a 50Hz sinusoidal magnetic field on cell adhesion molecule expression in two human osteosarcoma cell lines (MG-63 and Saos-2). Bioelectromagnetics, 2003, 24: 327-38.
- [7] Sabo J, Mirossay L, Horovcak L, et al. Effects of static magnetic field on human leukemic cell line HL-60. Bioelectrochemistry, 2002, 56: 227-231.
- [8] 祝文涛, 陈安民, 郭风劲, 等. 低频电磁场对骨肉瘤 MG-63 细胞侵袭和转移的生物学特性. 中国康复, 2007, 22: 386-388.
- [9] 方真华, 吴华, 马伟明, 等. 50 Hz 电磁场对小鼠骨髓间充质干细胞增殖的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2004, 26: 1-4.
- [10] 秦丽莉, 樊飞跃, 詹启敏. CyclinB1 在细胞周期调控及肿瘤发生发展中的作用. 医学研究杂志, 2008, 37: 8-10.
- [11] Harwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. Science, 1994, 266: 1821-1828.
- [12] Udhayakumar G, Jayanthi V, Devaraj N, et al. Interaction of MUC1 with beta-catenin modulates the Wnt target gene cyclinD1 in H. pylori-induced gastric cancer. Mol Carcinog, 2007, 46: 807-817.
- [13] 王前, 邓晶, 蒋永新. CyclinD1 的研究进展. 现代肿瘤医学, 2009, 17: 350-353.

(修回日期: 2011-07-14)

(本文编辑: 松 明)