

· 基础研究 ·

天然恒磁场对肝癌细胞系增殖影响的研究

李建华 曹艳萍 吴涛 朱一帆

【摘要】目的 研究天然恒磁场对 3 个人肝癌细胞系增殖的影响。**方法** 将 3 个人肝癌细胞系 BEL-7402、HEP G-2 及 QGY-7701 分别暴露于 0.1 T、固定 600 Hz 频率的天然恒磁场,以及 0.2 T、频率分别为 F1(250 Hz)、F2(400 Hz)、F3(500 Hz)的天然恒磁场中。每天磁曝时间为 30 min,磁曝天数分为 3 d 组与 6 d 组,每组设置对照组与磁曝组。完成磁曝后以流式细胞仪及细胞增殖检测试剂盒检测细胞凋亡与增殖。以 t 检验对比磁曝组与对照之间结果的差别。**结果** 仅有 0.2 T 400 Hz 条件下的天然恒磁场可诱导 BEL-7402 细胞系凋亡,而同一条件下不能诱导其余 2 个人肝癌细胞系凋亡。**结论** 同一疾病不同细胞系对同一磁场的不同反应揭示了不同细胞系之间特性的差别,其中可能的机制需进一步研究。不同细胞对同一磁场的不同反应提示在临床中应采用个体化磁场治疗方案以取得较好疗效。

【关键词】 天然恒磁场; 人肝癌细胞系; 凋亡; 增殖

The effects of natural static magnetic fields on the proliferation of three human hepatocarcinoma cell lines

LI Jian-hua*, CAO Yan-ping, WU Tao, ZHU Yi-fan. *Department of Rehabilitation Medicine, Sir Run Run Shaw Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310016, China

Corresponding author: ZHU Yi-fan, Email: zyzyf_2000@yahoo.com

【Abstract】Objective To observe the effects of a natural static magnetic field (NSMF) on the proliferation of human hepatocarcinoma cells. **Methods** Three human hepatocarcinoma cell lines (BEL-7402, HEP G-2 and QGY-7701) were cultured under standard conditions and then exposed to NSMFs of 0.1 Tesla at 600 Hz, 0.2 Tesla at 250 Hz, 0.2 Tesla at 400 Hz or 0.2 Tesla at 500 Hz for 30 minutes daily for 3 or 6 days. Flow cytometry and the XTT cell proliferation assay were used to check apoptosis and the proliferation of cells all groups. **Results** Only exposure to 0.2 Tesla magnetism at 400 Hz induced apoptosis of the BEL-7402 cell line. None of the NSMFs induced apoptosis in the other 2 hepatocarcinoma cell lines. **Conclusions** Different reactions of the three hepatocarcinoma cell lines to the same NSMF implies that each cell line has its own features, and that individualized NSMF treatment protocols should be adopted for better clinical outcomes.

【Key words】 Magnetic fields; Hepatocarcinoma; Apoptosis; Proliferation

以磁场治疗肿瘤是目前肿瘤治疗方法的研究热点之一。有研究发现,磁场在一定条件下可抑制体内、体外肿瘤的生长^[1]。然而亦有研究表明,磁场对肿瘤生长无抑制作用^[2]或能够促进肿瘤生长^[3]。因此,鉴于磁场对肿瘤细胞作用的生物学效应及其作用机制的复杂性,磁场对肿瘤生长的正负效应目前尚无公认的结论。本研究以天然恒磁场处理体外培养的肝癌细胞系,以明确磁场对肝癌细胞生长的抑制或促进作用。

材料与方法

一、细胞培养

采用的人肝癌细胞系 BEL-7402、HEP G-2 及 QGY-7701 购自北京协和细胞中心,在 75 cm² 培养瓶 (Corning 公司) 中使用洛斯维公园纪念研究所 1640 培养液 (Roswell Park Memorial Institute 1640, RPMI1640) (Hyclone 公司提供) 进行培养,1000 ml 培养液中加入 10% 胎牛血清 (四季清公司)、青霉素 10 万 U/以及链霉素 0.1,于 37 ℃、5% CO₂ 恒温箱 (Thermo Scientific 公司提供) 中进行培养,每 3 d 更换培养液 1 次。在细胞对数生长期进行磁场处理。

二、磁疗机及磁场处理方法

为保持磁场的稳定性、简化磁场变化参数以便对磁场的生物学效应做出精确判断,本研究采用天然恒磁石产生的恒磁场处理细胞。委托杭州康尔磁疗机厂定制 2 台天然恒磁旋转磁疗机,一台磁场强度为 0.1 T,固定频率为 600 Hz,另一台磁场强度为 0.2 T,旋转频率 0 ~ 1000 Hz,可数字化调节。天然恒磁位于细胞处理平台下方,细胞处理平台的磁场强度如上述。

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2012.02.006

基金项目:浙江省自然科学基金项目(Y2080042)

作者单位:310016 杭州,浙江大学医学院附属邵逸夫医院康复医学科(李建华、吴涛);四川省人民医院器官移植研究所细胞移植中心(朱一帆),四川省人民医院护士学校(曹艳萍)

通信作者:朱一帆,Email: zyzyf_2000@yahoo.com

三、实验研究处理方法

1. 对照组与磁场处理组(磁曝组):细胞培养条件相同。

2. 对照组:实验开始时细胞培养密度为 1×10^5 个/ml。每天将对照组取出培养箱置于室温下 30 min,不接受任何磁曝。

3. 磁曝组:每天于室温下在磁场内接受磁曝,磁曝时将装有磁场处理组细胞的 75 cm^2 培养瓶置于磁场中接受磁曝;每 3 d 更换上清培养液一次。于实验结束对各组细胞进行凋亡分析。

4. 磁场参数及磁曝处理方案:详见表 1、表 2,每组实验均重复 3 次。

表 1 0.1 T 600 Hz 磁场处理细胞系实验设置

组别	磁场处理天数(d)	每天处理时间(min)	每个细胞系分组
3 d 组	3	室温下 30 min	磁曝组与对照组
6 d 组	6	室温下 30 min	磁曝组与对照组

表 2 0.2 T 磁场处理细胞系实验设置

组别	磁场处理天数(d)	每天处理时间(min)	磁场处理频率	每个细胞系分组
3 d 组	3	室温下 30 min	F1 = 250 Hz, F2 = 400 Hz, F3 = 500 Hz	每个频率设磁曝组与对照组
6 d 组	6	室温下 30 min	F1 = 250 Hz, F2 = 400 Hz, F3 = 500 Hz	每个频率设磁曝组与对照组

四、实验检测指标

1. 细胞凋亡检测:按照上述实验方案完成磁场处理后,收集并以磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)清洗对照组及磁曝组所有细胞,按照凋亡检测试剂盒(细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒与膜联蛋白-异硫氰酸荧光素(annexin V-fluorescein isothiocyanate)细胞凋亡检测试剂盒(碧云天公司)的要求及指示混悬细胞并染色,以流式细胞仪(美国 Beckon Dickinson 公司)进行检测。

2. 细胞增殖检测:分别将 2×10^4 个磁曝组及对照组细胞置于 96 孔培养板(Corning 公司)中,按照试剂盒要求每组设置复孔及空白对照。根据上述磁场处理方案处理细胞的结果,以能引起显著细胞凋亡的磁场参数处理细胞至设定天数(期间不更换培养液),按照二甲氧喹黄细胞增殖试剂盒(Roche 公司)的指示完成细胞增殖检测,以与细胞增殖情况正性对应的细胞增殖吸光度表示细胞增殖结果。

五、统计学分析

采用 SPSS 18.0 版统计软件对数据进行统计学处理,组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

一、细胞凋亡检测结果

0.1 T 600 Hz 的磁曝均未能诱发 3 个细胞系的凋亡反应。0.2 T 各个频率处理 3 d 后在 3 个细胞系中未见到凋亡。3 个细胞系对 0.2 T 400 Hz 的磁曝反应相差很多。

BEL-7402 细胞系以 0.2 T、频率 F2(400 Hz)处理 6 d 后在磁曝组可见到大量细胞凋亡,与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 1、2、3。而处理 3 d 后与对照组比较细胞凋亡差异无统计学意义($P > 0.05$)。

HEP G-2 细胞系与 QGY-7701 细胞系在 0.2 T 频率 F2(400 Hz)条件下处理 6 d 后与对照组比较未见显著差异性细胞凋亡差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 个细胞系在 0.2 T 250 Hz、500 Hz 频率处理 6 d 后未见到凋亡。

二、细胞增殖检测结果

在确定 0.2 T、频率 F2(400 Hz)处理 6 d 后可引起 BEL-7402 细胞凋亡后,遂以 96 孔板培养细胞、重复实验,并进行了 XTT 细胞增殖检测,结果显示磁曝组细胞的增殖被抑制,与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 4。

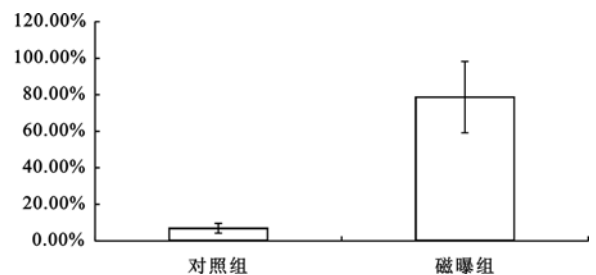


图 1 BEL-7402 细胞在 0.2 T 400 Hz 磁场中处理 6 d 后凋亡情况

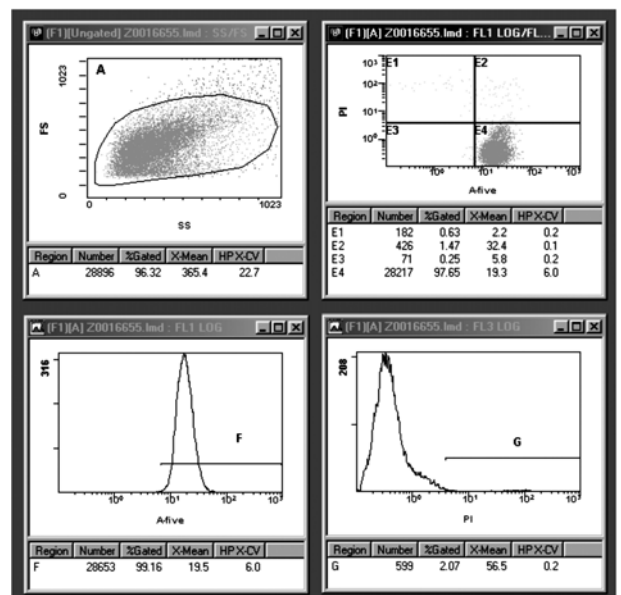


图 2 0.2 T 400 Hz 处理 BEL-7402 细胞 6 d 后凋亡情况

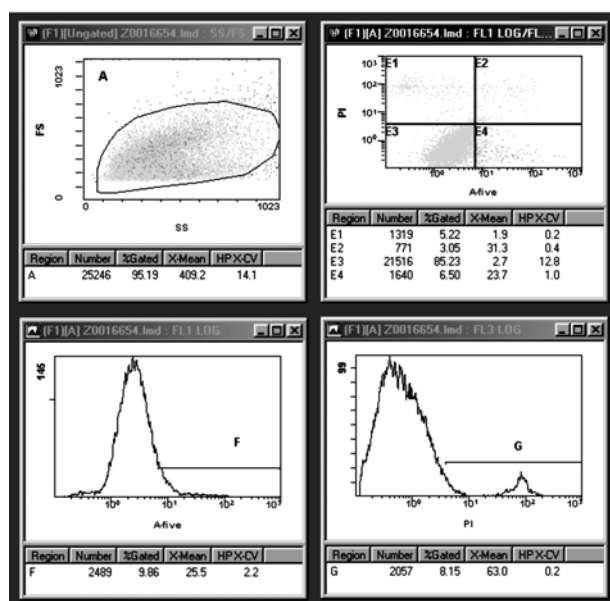


图3 BEL-7402 对照组培养 6 d 后凋亡情况

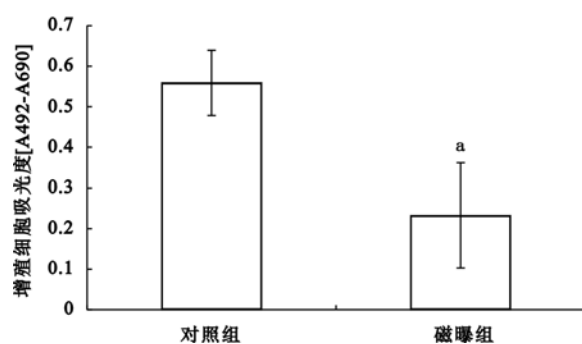
注:与对照组比较,^a $P < 0.01$

图4 0.2 T 400 Hz 磁场处理 BEL-7402 细胞系 6 d 细胞增殖情况

讨 论

我国以磁场治疗肿瘤始于 20 世纪 70 年代。有研究显示,磁场可减轻肿瘤引起的疼痛、抑制肿瘤生长^[4-6]。然而亦有研究表明,磁场对肿瘤生长无抑制作用^[2]或能够促进肿瘤生长^[3]。究其原因有如下几个方面:①各个研究使用的磁场类型、强度、转换频率、治疗时间等重要参数均不相同,造成研究结果相差很大;②各个研究使用的肿瘤细胞系或体内肿瘤类型亦不相同,造成研究结果不能相互印证;③磁场对肿瘤细胞作用的生物学效应及其作用机制尚不明确。本研究旨在明确相同磁场对同一疾病不同类型细胞系的生长抑制或促进作用。

本研究结果显示,各个细胞系对同一磁场参数的反应不同。0.1 T 600 Hz 的磁场不能导致 3 个细胞系凋亡。在 0.2 T 的条件下,仅 BEL-7402 细胞系可在 400 Hz 磁场作用下产生凋亡,而相同条件下 HEP G-2 与 QGY-7701 细胞系不能产生显著凋亡。250 Hz 及

500 Hz 的磁场不能诱发 3 个细胞系的凋亡。这一结果说明各个细胞系对磁场频率的反应存在特异性差异。

目前对磁场促使肿瘤细胞凋亡的机制尚不清楚,主要包括以下几种观点:①磁场作用于细胞内的带电粒子(Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Cl^- 等),离子在洛伦兹力的作用下行为方式发生改变,进而影响了细胞膜的通透性,造成 Ca^{2+} 内流,细胞内 Ca^{2+} 浓度升高将诱发一系列酶链反应,最终导致细胞的损伤和凋亡^[7-8];②磁场可造成肿瘤细胞内部结构改变,如内质网池断裂、微管解聚、酶蛋白构象改变、线粒体水肿,从而影响肿瘤细胞的存活^[9-12];③磁场影响 DNA 链上的氢键,造成 DNA 复制出现差错。差错在肿瘤细胞高速的 DNA 复制中被逐级放大,最终影响肿瘤细胞的增殖及生存^[13-14]。

从本研究结果中看到,0.1 T 的磁场未诱发肝癌细胞凋亡,而 0.2 T 的磁场可诱发细胞凋亡。0.2 T 磁场处理 3 d 后未诱发细胞凋亡,处理 6 d 后可诱发细胞凋亡,证实了磁场引起宏观生物效应需要时间的积累。

本研究结果还显示,各个细胞系对磁场频率反应的特异性差异可能是由于各个细胞系自身的特性有关,如可能与各个细胞系细胞内不同的蛋白表达(结构蛋白、酶蛋白或 DNA 复制相关蛋白)程度或离子浓度有关。因此我们推测在各种肝癌细胞内是否存在一种“磁场敏感蛋白”,这一蛋白可对特定磁场强度、频率产生反应从而诱发细胞凋亡,也正是由于磁场敏感蛋白在细胞内表达程度的不同决定了细胞对磁场强度及频率的反应。具体机制需要进一步的深入研究。这一结果也提示,在临床肿瘤的磁场治疗中,由于每个肝癌患者的肝癌细胞自身特性存在差异,应采用个体化的、有效的磁场参数(强度、频率)实施治疗。

参 考 文 献

- [1] 刘元昆,郭立安,梁国栋,等.阿霉素磁性白蛋白微球的研制.第四军医大学学报,1991,12:399-400.
- [2] 霍小林,郑涛,宋涛.旋转磁场及静磁场对人肝癌细胞增殖的影响.中国医学物理学杂志,2003,20:62-63.
- [3] Anderson LE, Morris JE, Sasser LB, et al. Effects of 50- or 60-hertz, 100 microT magnetic field exposure in the DMBA mammary cancer model in Sprague-Dawley rats: possible explanations for different results from two laboratories. Environ Health Perspect, 2000,108:797-802.
- [4] 北京积水潭医院磁疗小组.磁场疗法初探.新医药杂志,1976,1:34.
- [5] 徐雪雄.磁疗 10 例恶性肿瘤临床观察.中华生物磁学,1982,1:45.
- [6] 张沪生.生物医学物理研究.北京:原子能出版社,1992:19.
- [7] Deng RQ, Liu QH, Zhang HS. Mechanical studies on treatment of malignant tumors by ultra-low frequency pulsed gradient magnetic fields. J Wuhan University, 2003,8:433-436.
- [8] Aldinucci C, Garcia JB, Palmi M, et al. The effect of strong static

- magnetic field on lymphocytes. Bioelectromagnetics, 2003, 24: 109-117.
- [9] 张卓立, 李俊峡. 强恒磁场对大鼠移植癌细胞凋亡的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2001, 23: 61-62.
- [10] 张小云, 刘栋, 张晓鄂, 等. 磁场对细胞生长分裂的影响及其机制的探讨. 中国科学(B 辑), 1989, 19: 164-170.
- [11] 张小云, 张维德. 磁场的细胞效应研究. 基础医学与临床, 1994, 14: 15-19.
- [12] Pacini S, Gulisano M, Peruzzi B, et al. Effects of 0.2 T static magnetic field on human skin fibroblasts. Cancer Detect Prev, 2003, 27: 327-32.
- [13] Miyakoshi J. Effects of static magnetic fields at the cellular level. Prog Biophys Mol Biol, 2005, 87: 213-223.
- [14] Dini L, Abbro L. Bioeffects of moderate-intensive static magnetic fields on cell cultures. Micon, 2005, 36: 195-217.

(修回日期: 2011-12-12)

(本文编辑: 松 明)

· 短篇论著 ·

超短波联合颞下颌关节阻滞疗法治疗颞下颌关节紊乱综合征的疗效观察

赵枫林 王济生 刘金梅

颞下颌关节紊乱综合征(temporomandibular disorder, TMD)是咀嚼肌平衡失调, 颞颌关节各组成结构之间运动失常而引起的疼痛、张口受限、弹响等综合征^[1]。由于 TMD 症状较为复杂, 易反复发作, 且病因尚未完全明确, 故治疗有一定难度^[2]。我科采用超短波联合颞下颌关节阻滞疗法治疗颞下颌关节紊乱综合征 44 例, 取得了满意的疗效。报道如下。

一、资料与方法

(一) 临床资料

选取 2009 年 10 月至 2011 年 10 月我科收治的 TMD 患者 83 例, 均符合《临床疼痛治疗学》中 TMD 的诊断标准^[3], 所有入选患者颞颌关节张口位平片均无器质性病变。将 TMD 患者 83 例分成治疗组 44 例和对照组 39 例, 入选患者均签署知情同意书。2 组患者的年龄、性别、病程、病情等一般资料, 经统计学分析, 差异无统计学意义($P > 0.05$), 具有可比性, 详见表 1。

表 1 2 组患者一般资料比较

组别	例数	性别(例)		年龄(岁)	病程(月)
		男	女		
治疗组	44	24	20	35.25 ± 6.32	3.56 ± 8.23
对照组	39	21	18	36.10 ± 8.18	3.35 ± 6.12

(二) 治疗方法

治疗组超短波治疗联合颞下颌关节阻滞疗法, 对照组采用与治疗组方法相同的超短波治疗, 并联合调制中频进行治疗。具体方法如下。

1. 超短波: 采用上海产 80 型五官超短波治疗机, 波长 6 m, 功率 50 W, 直径 6 cm 的圆形电极 2 块, 间隙 2 cm, 双侧颞下颌关节对置法, 剂量为微热量, 每日 1 次, 每次 15 min, 6 d 为 1 个疗程, 连续治疗 3 个疗程。

2. 颞下颌关节阻滞疗法^[3]: 包括关节腔内和关节周围注射, 阻滞前患者轻微张口、闭口, 扪及髁状突的前后缘及其关节

面的最高点, 用 5~6 号细针头于髁状突的前方轻轻刺入皮肤后, 使针头向上、向后、向中线深入约 0.5~1.0 cm, 于髁状突关节面最高点平齐处, 垂直刺入深约 0.5~0.8 cm 即可进入下关节腔进行注射, 然后将针头退至皮下注射。共注入复合液(由 2% 的利多可因 1 ml + 曲安奈德 10 mg + VitB₁₂ 0.5 mg/1 ml + 生理盐水 20 ml 配制而成) 10 ml。每 6 d 注射 1 次, 共注射 3 次。

3. 调制中频治疗: 采用北京产 K824 型电脑中频治疗机, 载波频率 1~10 KHz, 调制频率 0.125~1500 Hz, 2 块 4 cm × 2 cm 的电极板, 治疗时患区部位并置或对置, 选用 2 号处方, 电流取患者耐受限, 每日 1 次, 每次 15 min, 6 d 为 1 个疗程, 连续治疗 3 个疗程。

(三) 疗效标准

2 组患者均于治疗前和治疗 3 周后(治疗后)采用以下标准评定疗效。①张口度: 测量测量上、下切牙切缘间的距离^[4]。②目测类比评分法(visual analogue scale, VAS)^[3]: 采用中华医学会监制的 VAS 卡, 在白纸上画一条长 10 cm 的直线, 两端分别标上无痛和最严重痛。患者根据自己所感受的疼痛程度, 在直线上某一点做记号, 以表示疼痛程度, 从起点至记号处的距离长度也就是疼痛的程度。0 分为无痛, 10 分为剧痛。③疗效标准^[5]: 痊愈为关节疼痛、弹响消失, 下颌关节运动正常, 张口自如; 显效为关节疼痛、弹响明显好转, 下颌关节运动基本正常; 好转为关节疼痛、弹响部分消失, 下颌关节运动有所改善; 无效为症状及体征无改善。

(四) 统计学分析

采用 SPSS 15.0 版统计学软件进行数据分析, 数据以($\bar{x} \pm s$)表示, 计量资料采用 t 检验, 计数资料采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

二、结果

治疗前, 2 组患者的张口度和 VAS 评分组间差异均无统计学意义($P > 0.05$), 治疗后, 2 组的张口度和 VAS 评分与组内治疗前比较, 差异均有统计学意义($P < 0.05$), 且治疗组的张口度和 VAS 评分与对照组治疗后比较, 差异亦有统计学意义($P < 0.05$), 详见表 2。另, 治疗后, 治疗组的痊愈显效率为 86.36%,