

· 基础研究 ·

脉冲强磁场对小鼠 H22 肝癌杀伤作用的影响

王晓杰 胡大为 张秀芹 刘耀敏 马立辉 敖亚洲 张海峰

【摘要】 目的 探讨交变脉冲强磁场(AIMF)对肿瘤组织的杀伤作用及免疫效应。方法 应用 AIMF 对 60 只接种 H22 肝癌瘤株的昆明小鼠作杀伤实验,对组织形态学、抑瘤曲线、抑瘤率及免疫指标进行检测。结果 AIMF 对肿瘤细胞具有选择性杀伤和抑制肿瘤组织生长的作用,对正常组织无明显损伤。各免疫指标均显著高出对照组。结论 AIMF 具有直接杀伤癌细胞、抑制肿瘤组织生长的作用。并且对荷瘤小鼠的免疫功能有一定调节作用。

【关键词】 磁场; 肿瘤; 实验; 小鼠

Injurious effect of strong impulse magnetic field on tumor cells in mice bearing H22 hepatoma WANG Xiao-jie, HU Da-wei, ZHANG Xiu-qin, LIU Yao-min, MA Li-hui, AO Ya-zhou, ZHANG Hai-feng. Department of Oncology, Affiliated Hospital, Chengde Medical College, Chengde 067000, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect and mechanism of strong alternating impulse magnetic field (AIMF) on tumor cells and immune effect for H22 hepatoma-bearing mice. **Methods** Sixty Kunming mice inoculated with H22 hepatoma cancer were subject to the alternating impulse magnetic field action. The histomorphological change, tumor-suppression rate, tumor-suppression curves and immune indexes were measured in experimental group and control group. **Results** Under the light microscope, it was seen that the tumor cells were selectively killed and tumor growth was suppressed after AIMF treatment. However, this magnetic field did not injure the normal tissues and organs. There was a significant difference between the experimental and the control groups with regard to the immune indexes. **Conclusion** It was suggested that the AIMF can directly kill the tumor cells, suppress the tumor growth and regulate the immune function of the H22 hepatoma bearing mice.

【Key words】 Magnetic field; Neoplasm; Experiment; Mice

近年来,关于磁场对肿瘤的杀伤作用的研究,已引起国内、外专家的高度重视^[1-3]。本实验从调节免疫功能作用和超微结构方面进行研究,多角度地探讨交变脉冲强磁场(alternating impulse magnetic field, AIMF)对肿瘤的杀伤作用及免疫效应,为临床应用磁场治疗肿瘤提供依据。

材料与方法

一、动物模型的建立

选用白求恩医科大学动物部提供的雄性昆明种小鼠 60 只,鼠龄 10~12 周,体重 20~22 g。所有小鼠均于右后肢外侧皮下接种 H22 肝癌(腹腔传种接代)瘤株[内含瘤细胞 2×10^6 个/只(白求恩医科大学基础医学院病理教研室提供)],接种后常温下正常饮食饲养。

二、脉冲强磁场

采用承德医学院物理教研室设计的脉冲磁场仪,磁极横截面积为 $3 \text{ cm} \times 3 \text{ cm}$, N、S 极间距 $2 \sim 8 \text{ cm}$, 可调,脉冲磁感应强度的峰值 2.8 T, 可调,实际磁感应

强度 2.0~2.2 T, 肿瘤处磁感应强度 1.8~2.0 T。脉冲宽度 $\geq 15 \text{ ms}$, 重复频率为 1 次/15 s。

三、实验方法

根据检测目的不同,将 60 只昆明小鼠分为组织学检测组(A 组)和抑瘤检测及免疫指标检测组(B 组)2 组,每组 30 只。

1. A 组:将 30 只昆明小鼠分别接种瘤苗,于肿瘤接种后第 7 天,肿瘤直径达 $(0.5 \pm 0.1) \text{ cm}$ 时,再随机分为实验组(A_1)和对照组(A_2)两个亚组,每个亚组各 15 只小鼠。 A_1 组行磁场治疗,将小鼠固定在治疗架上,后腿肿瘤部分放置在两个磁极面中间曝磁。脉冲磁场强度的峰值为 2.8 T, 每只小鼠均接受 100 次脉冲治疗。 A_2 组小鼠接种肿瘤后不作任何处理。曝磁后将 2 组在同等条件下饲养,任其自然生存,于 A_1 组曝磁后 24 h、72 h、5 d、7 d、15 d 5 个时间点分别将 A_1 组和 A_2 组小鼠各处死 3 只,取出瘤组织及心、肝、肺、脾、肾器官,制成病理切片以备观察。

电镜标本的取材时间同上,每一时间点各取 2 只小鼠瘤组织,每块直径 1 cm, 经过前固定,缓冲后固定、脱水、浸透、包埋后,超薄切片,厚度约为 50 nm, 醋酸铀、柠檬酸铅双染色,用日本 HU-11A 型透射电镜观

察,加速电压为 50 kV。

2. B 组:将本组 30 只昆明小鼠随机分为实验组 (B_1 组)和对照组 (B_2 组)两个亚组,每个组各 15 只。肿瘤接种、实验组磁场治疗方法同 A 组。曝磁后每天应用游标卡尺准确测量肿瘤长、短径,按公式计算肿瘤体积,作出 B_1 抑瘤曲线和 B_2 肿瘤自然生长曲线。并于接种后 22 d (曝磁后 15 d) 将 2 组小鼠全部拉颈处死,取出肿瘤称重及测量体积,瘤体积 $V = \pi/6 [(A+B)/2]^3$ (A、B 分别为肿瘤的长、短径),计算肿瘤重量和体积抑瘤率 (IR)。重量抑瘤率 = $[(\text{对照组瘤重} - \text{实验组瘤重}) / \text{对照组瘤重}] \times 100\%$, 体积抑瘤率 = $[(\text{对照组瘤体积} - \text{实验组瘤体积}) / \text{对照组瘤体积}] \times 100\%$ [4]。取标本进行免疫指标测定,淋巴细胞转化率采用 $^3\text{H} - \text{TdR}$ 掺入法测 CPM 值;T 淋巴细胞亚群分类采用微量全血流式细胞仪技术;脾细胞 NK 活性及 LAK 活性采用 MTT 比色法 [5]。

四、统计学分析

采用 SPSS 程序进行统计学分析,所有检测数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,组间比较采用 t 检验。

结 果

一、组织学检测

肉眼观察: A_2 组肿瘤表面可见点状瘀血区,未见包膜,切面呈灰红色鱼肉状,质硬。 A_1 组肿瘤表面可见大片状瘀血区,未见明显包膜,切面可见中央坏死区,其周围见少部分呈灰红色鱼肉状,质软。

显微镜下观察: A_1 组切片见癌细胞生长活跃,细胞密集,间质少,呈片状分布,癌细胞呈圆形,不规则形,细胞边界清楚,核大染色深,核结构清晰,核分裂相多见。 A_2 组于 A_1 组曝磁后 24 h 的切片见癌细胞边界不清,胞浆出现空泡性改变,核固缩、破裂、溶解,出现坏死。曝磁后 72 h 癌细胞坏死更加广泛,癌细胞分布不规则,坏死为凝固性或液化性。曝磁后 15 d,坏死边缘有肉芽组织生长,少数残存的癌细胞呈分散分布,有的全为肉芽组织填补,未见癌细胞。另外, A_1 组可见间质内大量淋巴细胞浸润,呈大片状,尤以坏死边缘为甚,吞噬细胞数量也较多。而 A_2 组淋巴细胞浸润较少,呈散在局灶性,吞噬细胞数量较少。 A_1 组与 A_2 组在接种肿瘤后不同时间点取出的心、肝、肺、脾、肾等器官组织均未见明显的病理改变,尤其在 A_1 组未发现由于 AIMF 作用而引起重要器官组织发生病理改变。

电镜观察:透射电镜下可见癌细胞的胞核解体、破碎,染色质浓缩,核膜消失,线粒体肿胀,大小不均,嵴残缺或消失,有的嵴断裂,胞质内多见空泡样改变,细胞膜结构不清,表明脉冲强磁场可同时破坏癌细胞的胞核、线粒体及细胞膜。

二、抑瘤检测及免疫指标检测

1. B_2 组肿瘤生长曲线及 B_1 组肿瘤抑制曲线:从图 1 可以看出, B_1 和 B_2 2 组的肿瘤生长在曝磁后第 2 天开始出现差别, B_1 组肿瘤生长受到抑制,随着小鼠荷瘤生存时间的延长,2 组肿瘤的生长速度差别逐渐增大 ($P < 0.05$)。

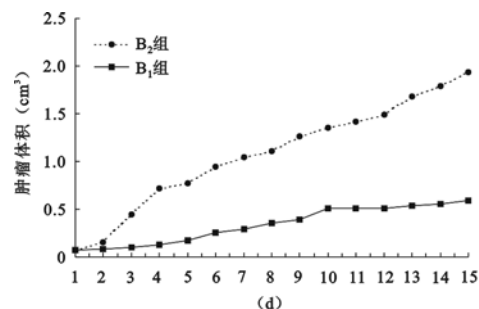


图 1 B_1 和 B_2 2 组大鼠肿瘤的抑制、生长曲线图

2. 肿瘤体积抑制率、肿瘤质量抑制率及小鼠体重:曝磁后第 15 天, B_1 组较 B_2 组肿瘤体积、肿瘤质量和体重差异均具有显著性意义 ($P < 0.01$),瘤体积抑制率为 61.0%,瘤质量抑制率为 59.5% (表 1)。

表 1 治疗后第 15 天 2 组荷瘤小鼠肿瘤体积、肿瘤质量及小鼠体重 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	肿瘤体积 (cm³)	肿瘤质量 (g)	小鼠体重 (g)
B_1 组	15	0.631 ± 0.201 *	0.73 ± 0.14 *	27.50 ± 3.71 *
B_2 组	15	1.938 ± 0.197	2.10 ± 0.05	23.94 ± 2.75

注:与 B_2 组比较, * $P < 0.01$

3. 脉冲强磁场治疗后的免疫效应:AIMF 对 H22 肝癌荷瘤鼠淋巴细胞转化的影响见表 2。

表 2 脉冲强磁场对 H22 肝癌荷瘤鼠淋巴细胞转化的影响 (cpm, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	胸腺自发增殖	脾自发增殖
B_1 组	15	10 127.6 ± 3 667.2 *	10 621.3 ± 4 441.5 *
B_2 组	15	5 633.8 ± 3 773.8	7 927.5 ± 5 452.5

注:与 B_2 组比较, * $P < 0.05$

AIMF 治疗后, B_1 组的 CD_4^+ / CD_8^+ 值升高 ($P < 0.05$),由此可见 AIMF 对 CD_4^+ T 淋巴细胞有选择性作用见表 3。

表 3 脉冲强磁场对小鼠 H22 肝癌荷瘤鼠 T 淋巴细胞亚群分类的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CD_3^+	CD_4^+	CD_8^+	CD_4^+ / CD_8^+
B_1 组	15	76.28 ± 4.96	39.86 ± 4.46	33.28 ± 3.68	1.21 ± 0.23 *
B_2 组	15	63.24 ± 4.86	25.47 ± 4.14	36.04 ± 2.67	0.71 ± 0.15

注:与 B_2 组比较, * $P < 0.01$

AIMF 治疗后能提高荷瘤鼠脾细胞 NK 细胞活性及 LAK 细胞活性,与 B_2 组相比较差异有显著性意义 ($P < 0.05$) (表 4)。

表 4 脉冲强磁场对小鼠 H22 肝癌荷瘤鼠 NK 及 LAK 细胞活性的影响(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	NK 细胞活性	LAK 细胞活性
B ₁ 组	15	24.8 ± 2.1 *	23.8 ± 2.7 *
B ₂ 组	15	12.1 ± 2.9	11.9 ± 1.8

注:与 B₂ 组比较, * $P < 0.05$

讨 论

本实验结果证明, AIMF 对小鼠 H22 肝癌组织细胞具有选择性杀伤作用。形态学研究发现, AIMF 治疗后 24 h 就可见到癌细胞空泡性改变, 核固缩、破裂、溶解, 出现坏死。而且随着时间推移, 癌细胞坏死更加明显, 以致出现凝固性或液化性坏死。在治疗后 15 d, 这些坏死瘤组织边缘由肉芽组织生长将其填补, 而不是出现新生癌组织填补。同时局部可见大量淋巴细胞浸润, 吞噬细胞数量也明显增多。巨噬细胞既是免疫效应细胞又是免疫调节细胞, 活化的巨噬细胞不但能吞噬各种病原体, 杀伤肿瘤细胞, 而且还能向 T 淋巴细胞提呈抗原, 分泌 IL-1 等参与免疫应答的调节。这表明 AIMF 不仅可以抑制癌细胞的生长分裂, 而且可以产生免疫效应, 从而起到杀伤癌细胞抑制肿瘤生长的作用。抑瘤率的研究结果也证实了这一点。

AIMF 治疗可减少肿瘤负荷, 并且具有对荷瘤鼠的免疫调节作用, 本实验的免疫指标检测进一步证实了这一点。AIMF 可提高荷瘤小鼠的淋巴细胞转化

率, 提高 CD₄⁺/CD₈⁺ 的值, 增强脾细胞 NK 细胞活性及 LAK 细胞活性, 对荷瘤小鼠具有明确的免疫增强作用。

因此, 我们认为 AIMF 对肿瘤细胞的杀伤和抑制瘤组织生长的作用可能与下列因素有关: ①直接细胞毒作用; ②影响癌细胞的分化合成; ③减弱肿瘤负荷的免疫抑制, 增强机体免疫功能; ④促成坏死肿瘤组织释放某种物质形成抗原, 刺激免疫反应; ⑤抑制某些肿瘤生长因子的产生。

本实验证实了 AIMF 对荷瘤小鼠具有直接杀伤和免疫功能调节双重效应, 为将来应用于临床肿瘤治疗提供了依据。

参 考 文 献

- 1 胡大为, 张国军, 王群, 等. 脉冲强磁场对小鼠移植性实体瘤的杀伤作用. 中华物理医学与康复杂志, 1999, 21:29-30.
- 2 邹本荣, 姜艳芳, 胡大为, 等. 交变脉冲强磁场对肺癌细胞杀伤作用的实验研究. 中华物理医学与康复杂志, 1998, 20:8-10.
- 3 夏绪刚, 黄兆民. 近十五年国内磁医学研究进展. 中华物理医学与康复杂志, 1995, 17:118-120.
- 4 张恩黑, 钟强荣, 孙振权, 等. 血卜啉衍生物对人食管鳞状细胞癌裸鼠移的放射增敏研究. 癌症杂志, 1992, 11:10-12.
- 5 周道洪, 沈远珊, 赵曼瑞. 测定淋巴细胞转化和鼠白细胞介素 2 活性的新方法-MTT 比色分析法. 中国免疫学杂志, 1986, 2:39-44.

(收稿日期:2004-03-15)

(本文编辑:阮仕衡)

· 研究简报 ·

兔股骨头缺血性坏死模型的血管改变和血液流变学研究

叶建红 宁亚功 李峻辉 王云华 彭仲杰 贺斌 杨举伦 蔡学敏 卫仲艮

股骨头缺血性坏死是临床难治疾病, 近年来呈逐渐上升趋势。引起股骨头缺血性坏死的因素有多种, 激素是引起股骨头坏死较重要的病因之一。我们按照文献[1]的方法, 建立股骨头缺血性坏死动物模型, 并进行组织学、数字减影血管造影(digital subtract angiography, DSA)观察和血液流变学研究, 对糖皮质激素引起的股骨头缺血性坏死的发病机制作一些初步探讨。

材料与方 法

一、实验动物

健康成年 24 周龄以上的纯种新西兰大白兔 14 只, 雌雄不

拘, 体重(2.5 ± 0.2) kg, 由本院实验动物中心提供。标准饲料喂养。将实验动物随机分为 2 组: 对照组 6 只, 模型组 8 只。

二、股骨头缺血性坏死动物模型制作

模型组按照文献[1]的方法, 给兔臀部肌肉注射醋酸泼尼松龙注射液(浙江产, 规格: 125 mg/5 ml/支), 给药量 12.25 mg/kg 体重, 每周 2 次, 共 8 周。经 X 线片和病理切片进行组织学观察, 证实双侧股骨头缺血性坏死造模成功。对照组正常饲养, 未作任何处理。

三、组织学观察

将股骨头沿冠状面剖开, 10% 甲醛固定, 5% 硝酸脱钙, 流水冲洗, 在软骨下 2 ~ 3 mm 处取材, 石蜡包埋切片, HE 染色, 光镜观察。任选 5 个高倍视野, 计数血管数目, 测量血管口径, 求出平均值。

四、DSA 观察

给实验动物腹腔内注射 3% 戊巴比妥钠(0.5 ml/kg 体重)进行麻醉, 局部切口, 显露股动脉。用 20 号针头穿刺成功后,

基金项目: 云南省自然科学基金青年项目(No. 2002C0025Q)

作者单位: 650032 昆明, 中国人民解放军成都军区昆明总医院中医科, 全军中医内科中心, 国家中医药管理局股骨头坏死专病中心(叶建红、宁亚功、李峻辉、王云华、彭仲杰), 放射科介入室(贺斌), 病理科(杨举伦、蔡学敏、卫仲艮)