

# 极低频率电磁场对离体肿瘤细胞的诱导凋亡作用

孙成群<sup>1</sup>,郭风劲<sup>1</sup>,许 涛<sup>2</sup>,王俊方<sup>1</sup>,陈安民<sup>1</sup>

**Effects of Extremely Low Frequency Electromagnetic Field on Apoptosis of Tumor Cells In Vitro**

SUN Cheng-qun<sup>1</sup>, GUO Feng-jing<sup>1</sup>, XU Tao<sup>2</sup>, WANG Jun-fang<sup>1</sup>, CHEN An-min<sup>1</sup>

1. Department of Rehabilitation, Tongji Hospital, Tongji Medical University, Wuhan 430030, China,

2. Department of Orthopaedics

**Abstract :Objective** To study effects of extremely low frequency electromagnetic field (EMF) on apoptosis of tumor cells in vitro. **Methods** Put human osteogenic sarcoma cells (MG63)、breast cancer cells (MCF7)、liver cancer cells (Hep G2) in 96-hole plates. These plates were exposed to electromagnetic field (10mT、20mT、40mT、60mT) for stimulation twice per day lasting 1 hour for 3 days. The sham exposure controls were correspondingly established. Inverted phase-contrast microscope was used to observe the cultured cells. MTT assay were applied to reveal viable cells with the OD value, and flow cytometry was used to detect the apoptosis results with Annexin V-FITC and PI. **Results** We compared the electromagnetic field groups with the normal groups by MTT assay after 72 hours. Analyzing the data in SPSS statistical software, we found the OD value of electromagnetic field groups were significantly less than the control groups ( $P < 0.05$ ). The rates of apoptosis cells by flow cytometry revealed EMF groups were higher than that in control groups. The contrast of two groups was significant. **Conclusion** Extremely low frequency electromagnetic field conspicuously restrained the growth status of tumor cells, and some tumor cells could be induced to apoptosis by EMF.

**Key words :** Extremely low frequency electromagnetic field; Tumor cells; Apoptosis; MTT

**摘要:** 目的 探讨极低频率电磁场对体外培养肿瘤细胞的抑制作用。方法 将人成骨肉瘤细胞(MG63)、乳腺癌细胞(MCF7)和肝癌细胞(Hep G2)接种到 96 孔板中,并置于磁场强度分别为 10mT、20mT、40mT、60mT 的磁场中进行干预,每天刺激 2 次,每次 1h,作用 3 天,同时每种细胞设置正常条件下的对照组。3 天后以 MTT 法检测细胞活性(OD 值),并采用流式细胞技术(Annexin V—FITC 和 PI 双标)检测 3 种细胞的凋亡情况。结果 72h 后以 MTT 法检测 3 种细胞的 OD 值,并与正常对照组进行比较,SPSS 软件统计结果显示,磁场组的 OD 值较正常组低( $P < 0.05$ );流式细胞技术结果显示,磁场组肿瘤细胞凋亡细胞的阳性比例高于正常组,两组之间的差异有显著性统计学意义。结论 极低频率电磁场对肿瘤细胞有明显抑制作用,在一定程度上诱导肿瘤细胞的凋亡。

**关键词:** 极低频率电磁场;肿瘤细胞;凋亡;MTT

中图分类号:Q274 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2007)01-0047-04

## 0 引言

现国内外许多学者都有应用磁场治疗肿瘤的报道,并取得一定的疗效。但磁场对于离体肿瘤细胞的作用及其原理的报道相对较少,本研究采用极低频率电磁场干预对数生长期的 3 种肿瘤细胞,并和正常生长条件下的肿瘤细胞相比较,旨在了解磁场对体外生长肿瘤细胞增殖、分化的影响,为磁场治疗

肿瘤提供实验性的依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 磁场来源 极低频率电磁场由武汉市海军工程学院提供(型号:DL—D03 由天津中环电工有限公司制造)。额定电压 250V,单相频率 50 Hz,由可调变压器及电阻调节输出磁场强度。

1.1.2 研究对象 三种肿瘤细胞中 Hep G2 由华中科技大学同济医学院附属同济医院肝外科实验中心提供,MG63 和 MCF7 由本实验室保存。

1.1.3 主要试剂 胎牛血清和 1640 培养基为 Hy-

收稿日期:2005-12-14;修回日期:2006-03-10

作者单位:1.430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院骨科,2.康复医学科

作者简介:孙成群(1976-),男,硕士在读,主要从事脊柱脊椎的损伤与修复研究

clone 公司产品。MTT、二甲基亚砜(DMSO)、Annexin - / FITC 和 PI、二氧化碳培养箱、倒置显微镜、荧光显微镜、EL X-800UV 型酶标测试仪、流式细胞仪(同济医学院免疫教研室)。

## 1.2 实验方法

1.2.1 肿瘤细胞生长形态观察 干预前及干预后 72h, 在相差显微镜下观察各组 3 种细胞的生长形态。

1.2.2 MTT(四甲基偶氮唑蓝)比色法测定细胞活力 将培养至第三代的 3 种细胞以 0.25% 胰酶消化后, 吹打制成单个细胞悬液(调整细胞密度为  $1.0 \times 10^4$ ), 分别接种 5 块到 96 孔板中。每块 96 孔板 1~3 列为不含细胞的血清, 以消除血清物质对光吸收值的影响; 4~6 列为 MG63 细胞悬液; 7~9 列为 MCF7 细胞悬液; 10~12 列为 Hep G2 细胞悬液。第 1 块 96 孔板为正常对照组, 放置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱; 第 2~5 块板分别放置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 并含有磁场线圈的培养箱中。96 孔板放于线圈的中央, 通过调节变压器来达到预设的磁场强度。第 2~5 块 96 孔板的磁场强度分别为 10mT、20mT、40mT、60mT, 刺激时间为每天 2 次, 每次持续 1h。3 天后每孔加入 MTT 溶液 20μl, 继续孵育 4h 后终止培养。小心吸弃上清液, 每小孔加入 DMSO 150μl 融解结晶物, 振荡 10min 后在酶标仪上测定各孔的吸光值。

1.2.3 流式细胞仪检测各组 3 种肿瘤细胞凋亡的比例 磁场强度及磁场作用的时间和方法同前。磁刺激停止后, 胰酶消化细胞并调整细胞浓度为  $1 \times 10^6$  个/ml。取 1ml 细胞 1000r/min 离心 10min, 弃上清; 加入 1ml 4℃的 PBS 轻轻振荡使细胞悬浮, 1000r/min 离心 10min 后弃上清, 重复本步骤共 3 次; 将细胞悬浮于 250μl 的结合缓冲液中, 取 100μl 的细胞悬液于 5ml 流式管中, 加入 5μl Annexin - / FITC 和 10μl PI 溶液, 混匀后室温避光孵育 15min, 在反应管中加入 400μl 的 PBS 后, 流式细胞仪(FACS)检测分析。每组取 5 样本, 每样本计数  $1 \times 10^6$  个细胞, 并计算其阳性率。在 480nm 的激发光下, 检测 3 种肿瘤细胞凋亡细胞占细胞总数的比例。

## 1.3 统计学处理

实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 11.0 统计软件, 应用单因素方差分析进行统计学处理。

## 2 结果

### 2.1 各组肿瘤细胞生长形态观察

干预后至 72h, 磁场各组和对照组肿瘤细胞均

有明显的生长, 正常组细胞体积饱满, 细胞密集; 磁场组细胞体积较正常组小, 密度稀疏, 贴壁细胞脱落, 凋亡上浮的细胞明显增多(通过预实验中收集 3 种贴壁生长细胞磁场干预 72h 后的细胞悬液进行流式分析)。

### 2.2 MTT(四甲基偶氮唑蓝)比色法测定细胞活力

在不同强度磁场刺激后各组的光密度值均数(OD 值,  $\bar{x} \pm s$ ) (见表 1) 和不同磁场强度对肿瘤的抑制率(见表 2)。结果可见, 在正常对照组, 3 种肿瘤细胞生长状态良好, 其 OD 值均高于各磁场组; 在各磁场组的 OD 值均有不同程度的下降, 其最大抑制率可达 34.82% (MG63, 20mT 组), 其中 MG63 和 MCF7 均在 20mT 出现最大抑制率(分别为 34.82%、31.06%), 而 Hep G2 在 60mT 出现最大抑制率(19.69%)。经 SPSS 软件方差分析, 各磁场组与对照组间差异有显著性意义( $P < 0.05$ ), 各磁场强度组间差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。

表 1 三种肿瘤细胞 OD 值( $\bar{x} \pm s$ )

Groups	MG63	MCF7	Hep G2
Normal	0.28196 ± 0.040534	0.29192 ± 0.076783	0.38904 ± 0.122703
10mT	0.27333 ± 0.073808	0.26587 ± 0.088417	0.33175 ± 0.048231 *
20mT	0.18379 ± 0.028210 *	0.20125 ± 0.112910 *	0.33258 ± 0.041450 *
40mT	0.22483 ± 0.048511 *	0.22321 ± 0.069787 *	0.33875 ± 0.073433 *
60mT	0.24717 ± 0.043168 *	0.21314 ± 0.033524 *	0.31242 ± 0.070449 *

注: 与正常组比较, \*标记:  $P < 0.05$

表 2 磁场对肿瘤细胞生长抑制率

$$\text{抑制率} = (\frac{1 - \text{OD}_{\text{磁场}}}{\text{OD}_{\text{对照}}} \times 100\%)$$

Groups	MG63 (%)	MCF7 (%)	Hep G2 (%)
10mT	3.06	8.92	14.73
20mT	34.82	31.06	14.51
40mT	20.26	23.54	12.93
60mT	12.34	26.99	19.69

### 2.3 流式细胞仪检测结果

对于流式细胞检测, 本实验是基于 MTT 的结果上进行的, 即在 3 种肿瘤细胞在 MTT 检测上出现最大抑制率的磁场条件下进行的流式细胞术分析。每个条件取 5 个样本管, 并设置正常条件下的对比组, 见图 1~4, 如在同一种条件下, 其正常对照组的细胞凋亡率大于 5%, 则考虑有其他因素影响本实验结果, 这样的样本管放弃统计。其结果数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 见表 3。

表 3 不同磁场强度对 3 种肿瘤细胞的抑制  
(流式细胞仪检测)

Groups	Inhibition ratio (%)	( $\bar{x} \pm s$ )
MG63 20mT	21.54、12.77、18.35、9.52、11.38	14.712 ± 0.0420
MCF7 20mT	12.27、7.91、15.26、11.42、8.29	11.03 ± 0.0342
Hep G2 60mT	12.30、5.32、7.99、5.54、8.75	7.98 ± 0.8410

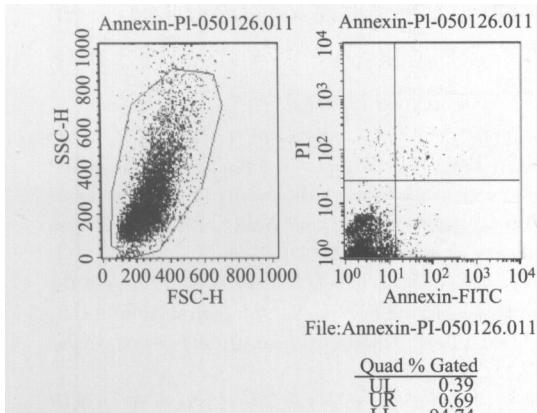


图 1 MG63 正常条件组 Annexin-V 和 PI 双标

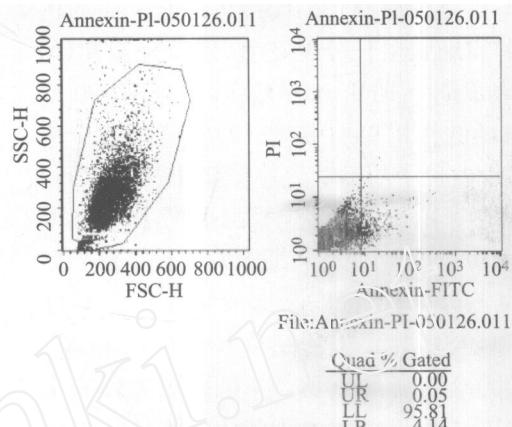


图 2 MG63 20mT 磁场组 Annexin-V 单标

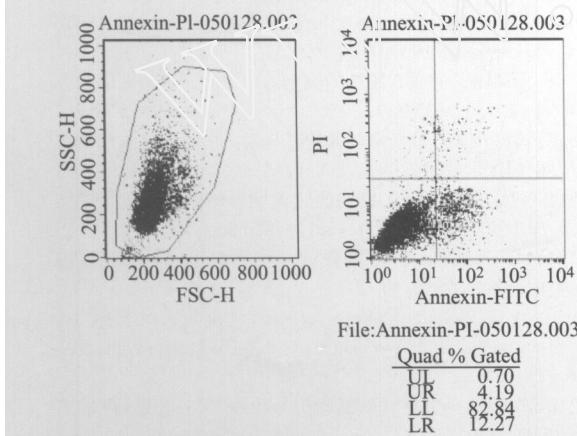


图 3 MCF7 20mT 磁场组 Annexin-V 和 PI 双标

### 3 讨论

国内外许多学者研究了磁场对荷瘤动物的免疫力和离体肿瘤细胞的生物性状影响<sup>[1,2]</sup>。其使用磁场类型和强度不同,所产生的生物学效应也不尽相同。并且,即使在相同的磁场条件下,不同的肿瘤细胞可产生不同的效果,我们在预实验中发现 50 Hz 的交变磁场对体外培养的肿瘤细胞有抑制作用<sup>[3]</sup>。为进一步探讨磁场对多种肿瘤细胞的作用,我们选择 3 种肿瘤细胞在多种磁场强度下作用,并对其结果作如下分析:

从我们的实验可以看到,磁场对多种肿瘤细胞均有明显的抑制作用。Santi 等<sup>[4]</sup>亦在实验中证明磁场可抑制肿瘤细胞的生长,并可显著延长荷瘤裸鼠的寿命,而在实验的过程中,我们进一步观察到,磁场对肿瘤细胞的抑制作用主要为诱导肿瘤细胞的凋亡,而非杀伤作用。在培养的过程中,如果培养的周期超过一定的时间期限(如 10 天),则 3 种肿瘤细胞在 4 种磁场强度作用下和正常的肿瘤细胞在 MTT 检测及流式检测上并无明显的差异( $P > 0.05$ )。因为一旦肿瘤细胞的生长速度超过了磁场对其的抑制作用,过长时期的培养结果将是肿瘤细胞长满整个培养瓶。我们选择对数生长期细胞用 MTT 和流式细胞术两个方面检测肿瘤细胞的凋亡。

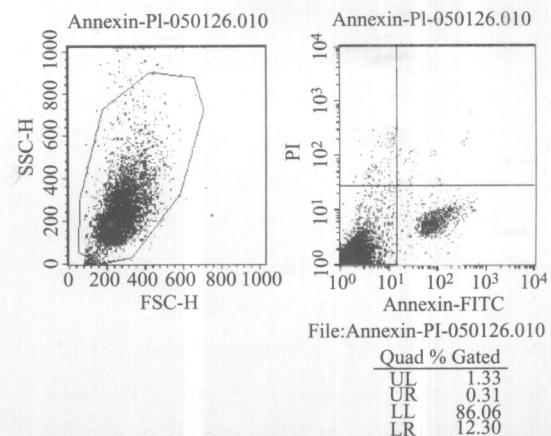


图 4 HepG2 60mT 磁场组 Annexin-V 和 PI 双标

磁场对肿瘤细胞的诱导凋亡作用也并非与磁场的强度呈简单的线性比例关系。在实验中观察到,当磁场的强度过大(磁场强度  $< 1 \text{ mT}$ ),实验中的 3 种肿瘤细胞在 MTT 和流式检测上并没有明显的差异性;而当磁场的强度过大时,磁场也将影响到正常细胞的分裂过程,对其构成直接的损伤作用<sup>[5]</sup>,这种过强的磁场强度,其治疗肿瘤作用的可行性值得怀疑,我们的实验可以看到,不同的细胞在某一种磁场强度下,其诱导凋亡的作用最大,其中 MG63 和 MCF7 均在 20mT 出现最大抑制率(分别为 34.82%、31.06%),而 Hep G2 在 60mT 出现最大抑制率(19.69%)。我们只是讨论了 3 种肿瘤细胞的参考值,而多种肿瘤细胞的最适合诱导凋亡磁场强度值得进一步探讨。霍小林等<sup>[6]</sup>报道 Hep G2 细胞经 0.2 T 静磁场分别处理 15 min、30 min 及 24 h 后,采用 MTT 检测结果表明实验组和对照组之间无显著差别。这些实验结果的差异进一步表明,磁场与细胞之间的相互作用机制相当复杂,不同磁场强度、磁场类型、不同曝磁方式以及不同细胞种类,均会对实验结果产生不同的影响<sup>[7]</sup>,这也进一步表明,磁场对肿瘤细胞的作用决不是只通过某些分子和某种单一的机制来实现的。

磁场诱导肿瘤细胞凋亡的作用可能与下面的机制有关:(1)肿瘤细胞生长分裂旺盛,处于分裂期(M期)和DNA合成期(S期)的细胞较多,相对正常细胞而言,其对磁场的作用更加敏感;(2)在磁场的作用下,瘤细胞内带电粒子的运动轨迹受到干扰,使细胞内分子与带点粒子的作用与传递受到干扰,影响到整个细胞的生理功能,从而使肿瘤细胞的生长繁殖受到影响<sup>[8]</sup>。在细胞外,Ca<sup>2+</sup>浓度高出细胞内Ca<sup>2+</sup>浓度约1000倍。线粒体内Ca<sup>2+</sup>浓度高出细胞质内Ca<sup>2+</sup>浓度也有1000倍。脉冲磁场产生的跨膜电位变化会影响到细胞外Ca<sup>2+</sup>的内流和引起线粒体Ca<sup>2+</sup>的外流。而Ca<sup>2+</sup>浓度是细胞内信号系统中重要的信号,跨膜电位的变化必然会改变细胞膜离子通道状态,导致离子浓度变化<sup>[9]</sup>;(3)磁场可引起瘤细胞内带电荷基团大分子(如:酶)的构象发生改变,从而影响到其生物活性的发挥<sup>[5]</sup>。(4)磁场作用于细胞膜以及细胞膜上的受体,通过细胞信号转导网络的介导作用,将信号传到细胞内,引起相应的生物学效应<sup>[10]</sup>。即电磁场-膜及膜上受体-信号的跨膜传导-生物学效应,进一步影响到肿瘤细胞的生物行为。

从国内外的研究来看,尽管磁场对肿瘤作用机制比较复杂,其中的一些因素还存在不确定性,但应用磁场作为肿瘤的一种治疗手段,已经在很多方面取得了一定的疗效,尽管这种效果多属于缓解症状,

延长生命时间,但这也是有意义的,值得我们进一步探讨。

#### 参考文献:

- [1] Farrell J M, Barber M, Krause D, et al. Effects of low frequency electromagnetic fields on the activity of ornithine decarboxylase in developing chicken embryos[J]. Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 1997, 43(1): 91-96.
- [2] Chen Gang, Cai Guoping, Zhang Riqing, et al. Effects of the weak alternating electric field on Na<sup>+</sup> concentration inside human red blood cells[J]. Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 1998, 45(1): 127-130.
- [3] 丁翠兰,雷蕾,刘方平.50Hz 正弦交变磁场对K<sub>562</sub>和WZD<sub>s</sub>细胞生长的影响[J].中国医学物理学杂志,1996,13(4):223-225.
- [4] Santi Tofani, Marcella Cintorino, Domenico Barone, et al. Increased mouse survival, tumor growth inhibition and decreased immunoreactive p53 after exposure to magnetic fields[J]. Bioelectromagnetics, 2002, 23(3): 230-238.
- [5] 张小云,张维德,卢丽.磁场的细胞效应研究.基础医学与临床,1994, 14(5): 335-339.
- [6] 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[J].中国医学物理学杂志,2003,20(1):62-63.
- [7] 王益民,王怡,张伯礼,等.国内研究磁场对细胞作用效果进展[J].天津中医学院学报,2001,20(3):51-53.
- [8] 曾繁清,海汇,杜碧,等.工频磁场对鼠肿瘤作用的实验观测[J].生物磁学,1999(3/4):20.
- [9] Charles A C. Biological effects of oscillating electrics fields: Role of voltage-sensitive ion channels[J]. bioelectromagnetics, 1981, 2(1):23-32.
- [10] 孙大业,郭艳玲,马力耕,等.细胞信号转导[M].北京:科学出版社,2003. 168-175.

[编辑:贺文]

(上接第 46 页)

arresten 是 Colorado 等在 2000 年发现的血管生成抑制因子,该因子能够抑制裸鼠移植瘤的生长。arresten 与内皮抑素同为来自胶原蛋白的血管生成抑制因子,但与内皮抑素 endostatin 一样无任何毒副作用,而且它还有 arresten 自身的优点,它是一种稳定的蛋白质,能够有效的保持其活性,而内皮抑素因其蛋白质的不稳定可能限制其使用,更重要的是,arresten 抑制裸鼠移植瘤生长的效果均强于内皮抑素<sup>[1]</sup>。然而 arresten 确切的抑制血管生成的具体途径及其相关机制目前并不清楚,而获得该因子是深入进行 arresten 相关研究的前提。

我们在先前研究已经在国内首先获得原核表达的 arresten 蛋白<sup>[3]</sup>,原核表达虽产量高,但产物的复性差、活性低,我们用原核表达的 arresten 进行的相关实验也未得到理想的结果。而 CHO 细胞是目前较常用的真核表达体系,它可较长时间地表达所携带的基因而不衰减,并能稳定地大量表达,其表达产生的蛋白质具有糖基化、磷酸化等修饰,具有良好的生物学活性,因此被广泛用于蛋白表达和疫苗生产。我们通过脂质体转染方法将 arresten 基因导

入 CHO 细胞,经抗生素 Zeocin 筛选获得了阳性克隆细胞,随后进行的 RT-PCR 证实我们成功在 CHO 细胞中导入 arresten 基因,并通过 Western-blot 检测到 arresten 蛋白的表达条带,该结果表明,即我们已成功将 arresten 成功整合到 CHO 细胞染色体中,并正常转录和特异表达。这表明我们成功建立了人 arresten 真核表达细胞克隆体系。在此基础上,我们可以进行蛋白纯化并获得 arresten 蛋白,为深入研究 arresten 的作用机制提供了基础。

综上所述,本实验在国内首先成功获得了稳定转染 arresten 基因的真核 CHO 细胞克隆,为深入研究 arresten 因子抑制血管生成的作用途径及其相关机制奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] Colorado PC, Torre A, Kamphaus G, et al. anti-angiogenic cues from vascular basement membrane collagen[J]. Cancer Res, 2000, 60(11):2520-2526.
- [2] Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis[J]. Cell, 1996, 86(7):353-364.
- [3] 关启昌,郑幼伟,宋自芳,等.血管生成抑制因子 arresten 基因的克隆表达[J].中国生物工程杂志,2002,22(4):89-92.

[编辑:贺文]