

## • 实验研究 •

热籽感应加热对恶性黑色素瘤细胞的杀伤作用<sup>\*</sup>夏启胜 刘 轩 徐 波 徐 梅 李红艳 李利亚 孙光飞<sup>①</sup> 祁毓俊<sup>①</sup> 胡润磊<sup>②</sup> 唐劲天<sup>\*\*</sup>

(中日友好医院临床医学研究所, 北京 100029)

【摘要】 目的 探讨热籽感应加热对体外培养的恶性黑色素瘤细胞的杀伤效果。方法 将体外培养的 B<sub>16</sub> 恶性黑色素瘤细胞分为对照组、单独磁场组、单独热籽组(一颗热籽、二颗热籽)、热籽加热组(一颗热籽、二颗热籽)6 组, 其中对照组、热籽加热组又分为 6 个时间亚组(5、10、15、20、25、30 min), 各组分别处理后, 倒置显微镜进行形态学观察, 四甲基噻唑兰比色法测定细胞活性, 得出每组处理后的细胞存活率。结果 实验中所用的铁磁热籽在现有参数交变磁场中具有良好的升温效果, 一颗热籽培养皿内加热温度可达(53.1 ± 0.5)℃, 二颗热籽则可达(56.5 ± 0.5)℃。热籽感应加热对体外培养的 B<sub>16</sub> 细胞具有明显的杀伤效应, 镜下观察出现明显的凋亡或坏死的形态学改变。二颗热籽加热组 20 min 细胞存活率为(3.1 ± 2.9)%, 25 min 和 30 min 便可将培养皿内肿瘤细胞全部杀死。加热 30 min 时, 单独磁场和单独热籽对 B<sub>16</sub> 细胞存活率影响不大, 存活率分别为(98.1 ± 5.1)%、(99.5 ± 2.3)%、(94.6 ± 11.0)%, 与对照组相比均无统计学差异(分别为  $q_{\text{对照}-\text{单独磁场}} = 0.497, P > 0.05$ ;  $q_{\text{对照}-\text{一颗热籽}} = 0.120, P > 0.05$ ;  $q_{\text{对照}-\text{二颗热籽}} = 1.419, P > 0.05$ ;  $q_{\text{单独磁场}-\text{一颗热籽}} = 0.377, P > 0.05$ ;  $q_{\text{单独磁场}-\text{二颗热籽}} = 0.922, P > 0.05$ ;  $q_{\text{一颗热籽}-\text{二颗热籽}} = 1.299, P > 0.05$ )。加热 30 min 时, 热籽加热组和对照组、单独磁场组、单独热籽组存活率相比有统计学差异( $q_{\text{对照}-\text{热籽加热}} = 16.934, P < 0.01$ ;  $q_{\text{单独磁场}-\text{热籽加热}} = 16.437, P < 0.01$ ;  $q_{\text{一颗热籽}-\text{热籽加热}} = 16.814, P < 0.01$ ;  $q_{\text{二颗热籽}-\text{热籽加热}} = 15.515, P < 0.01$ )。结论 热籽感应加热交变磁场中可升温到适宜的温度, 有效杀伤体外培养的黑色素瘤细胞, 导致肿瘤细胞凋亡或死亡。

【关键词】 热籽; 感应加热; B<sub>16</sub> 细胞; 交变磁场

中图分类号: R-33

文献标识: A

文章编号: 1009-6604(2007)11-1038-05

Killing Effect of Thermoseeds Inductive Heating on Malignant Melanoma Cells Xia Qisheng, Liu Xuan, Xu Bo, et al.  
Department of Oncology-Molecular Biology, Institute of Clinical Sciences, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China

【Abstract】 Objective To study the killing effect of thermoseeds inductive heating on malignant melanoma cells cultured *in vitro*. Methods *In vitro* cultured B<sub>16</sub> malignant melanoma cells were divided into 6 groups: control, magnetic, thermoseeds (one thermoseed and two thermoseeds), and thermoseeds heating (one thermoseed and two thermoseeds) groups. The control and thermoseeds heating groups were further divided into six subgroups (5, 10, 15, 20, 25, and 30 minutes). Cell morphological changes were observed by inverted microscopy. The cell activity of each group was measured by MTT method after treatment. The survival rate of the cells was calculated. Results The thermoseeds used in our experiment showed a good heating ability in alternating magnetic field. Temperature of culture dishes with one and two thermoseeds could reach (53.5 ± 0.5)℃ and (56.5 ± 0.5)℃, respectively. The B<sub>16</sub> melanoma cells were apparently killed or damaged by thermoseed inductive heating. Inverted microscopy showed apoptosis and necrosis of the tumor cells. The survival rate of the cells heated with two thermoseeds for 20 minutes was (3.1 ± 2.9)%. After being heated for 25 or 30 minutes, all the tumor cells cultured in the dish were killed. In the magnetic and thermoseed groups, the survival rate of the tumor cells were (98.1 ± 5.1)%, (99.5 ± 2.3)%, and (94.6 ± 11.0)%, respectively, which are not significantly lower than that in the control group ( $q_{\text{Control-Magnetic}} = 0.497, P > 0.05$ ;  $q_{\text{Control-One thermoseed}} = 0.120, P > 0.05$ ;  $q_{\text{Control-Two thermoseeds}} = 1.419, P > 0.05$ ;  $q_{\text{Magnetic-One thermoseed}} = 0.377, P > 0.05$ ;  $q_{\text{Magnetic-Two thermoseeds}} = 0.922, P > 0.05$ ; and  $q_{\text{One thermoseed-Two thermoseeds}} = 1.299, P > 0.05$ ). After being heated for 30 minutes, the survival rate of the thermoseeds heating group was significantly lower than that in the control, magnetic, and thermoseeds groups ( $q_{\text{Control-One thermoseed heating}} = 16.934, P < 0.01$ ;  $q_{\text{Magnetic-One thermoseed heating}} = 16.437, P < 0.01$ ;  $q_{\text{One thermoseed-One thermoseed heating}} = 16.814, P < 0.01$ ; and  $q_{\text{Two thermoseeds-One thermoseed heating}} = 15.515, P < 0.01$ ). Conclusions Thermoseeds inductive heating technology can achieve an appropriate temperature to effectively kill *in vitro* cultured melanoma cells, leading to apoptosis or death of the tumor cells.

【Key Words】 Thermoseed; Inductive heating; B<sub>16</sub> cells; Alternating magnetic field

• 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30271465, 10645005 和 30571779), 北京市科技计划项目(编号 H030230160130), 清华大学裕元医学基金(20240000519)

\*\* 通讯作者(清华大学工程物理系医学物理与工程研究所, 北京 100084)

① (北京科技大学材料科学与工程学院, 北京 100083)

② (杭州市第一人民医院陶外科, 杭州 310006)

加温治疗作为肿瘤的一种治疗方法之一,在临床中既可以单独使用,也可作为辅助治疗方法与放疗或(和)化疗合并应用<sup>[1-3]</sup>。较低温度(42~43℃)的加温治疗,能够增强放疗和化疗的治疗效果,产生协同效应,这一温度时的肿瘤细胞的死亡形式以凋亡为主;而更高的温度时(>46℃),则对细胞具有直接的杀伤效应,肿瘤细胞的死亡形式以坏死为主<sup>[4,5]</sup>。目前,肿瘤加温治疗中常用的加温方法有射频、微波和超声,但这些方法在都有一些不足<sup>[6-9]</sup>,热籽感应加温技术则有望克服这些不足,适形、精确将肿瘤组织加热到有效治疗温度范围,在深部肿瘤的加温治疗中具有较好的应用前景<sup>[10,11]</sup>。热籽感应加温技术属磁介导热疗(magnetic mediated hyperthermia, MMH)的一种,是在射频感应加热的基础的发展而来的<sup>[12]</sup>,其技术要点是将具有铁磁性的热籽合金在影像学引导下通过各种方法适形的植入到肿瘤部位,置于特定参数的交变磁场中,热籽因感应涡流等机制而发热,热量传递到周围肿瘤组织而将肿瘤区域加热到有效治疗温度范围,达到杀灭肿瘤细胞的目的<sup>[10]</sup>。本文研究热籽感应加温对外培养的 B<sub>16</sub>黑色素瘤细胞的杀伤效应。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料与设备

热籽:镍-铜合金,居里点为 57℃,72%镍、27%铜,直径 0.9 mm,长约 1.1 cm,与北京科技大学金属物理研究室合作研制。交变磁场仪:型号 SP-04ABC 4KW,频率 100~250 kHz,加热电流 100~450 A,感应线圈直径 5 cm,4 匝双股,深圳双平电源技术有限公司制造。温度测量与记录系统:测温探头为 It-18 型铜-康铜热电偶,直径 1 mm,温度响应时间 0.1 s,美国 Physitemp 公司制造。温度显示装置,为四通道数显仪,型号 XS01A-4,北京昆仑天辰仪表科技有限公司制造,数显仪连接计算机对数据进行记录并存盘。

其他设备:美国 Thermo 公司 Forma 3111 型二氧化碳细胞培养箱;DL-CJ-1N 高性能无菌实验台(哈尔滨东联电子技术开发有限公司北京分公司);IX51 倒置式基础型显微镜(日本 OLYMPUS 公司),PM10SP 全自动显微照相系统(日本 OLYMPUS 公司),DG3022 酶联免疫检测仪(中国人民解放军第四军医大学与国营华东电子管厂联合研制),3-18K 恒温离心机(SIGMA 公司)。

### 1.2 主要试剂

DMEM 培养基由美国 GIBCO 公司提供;甲基噻唑基四唑(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)由北京天象邦定生物医学科技有限公司提供;二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)由中国医药公司北京公司提供;5%胰蛋白酶由 GIBCO 公司提供;小牛血清由 SIGMA 公司提供。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 细胞株和细胞培养

肿瘤细胞,购自中国科学院上海生命科学研究院;B<sub>16</sub>细胞接种于 DMEM 培养基(含 10% 小牛血清,50 U/ml 青霉素,50 U/ml 庆大霉素),置 37℃,5% CO<sub>2</sub> 条件下培养,隔日传代。当传代后的细胞处于指数增生期时,以 0.25% 胰酶消化;2 min 后终止消化,以吸管反复吹打,使细胞悬浮;加入培养基制成细胞浓度为  $2 \times 10^5$ /ml 的细胞悬液,分装于细胞培养皿(CORNING 公司产品,规格 35 mm × 10 mm)中,每个培养皿 2.0 ml。分装后的细胞置于 37℃,5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养过夜,待培养皿中细胞完全贴壁时进行实验。

1.3.2 分组 对照组、单独磁场组、一颗热籽组、二颗热籽组、一颗热籽加温组、二颗热籽加温组;其中对照组、一颗热籽加温组和二颗热籽加温组又分为 6 个时间亚组(5、10、15、20、25、30 min)。实验重复 3 次,结果取平均值。

1.3.3 加温 加温前各培养皿均更换新鲜培养基,以保证培养皿内液体均为 2.0 ml。加温组和热籽组分别放入热籽,热籽组和对照组放在室温下,加温组和磁场组放入磁场线圈中,加热电流固定在 450 A,分别在加热 5、10、15、20、25、30 min 后取出培养皿,进行形态学观察和细胞活性测定。

1.3.4 热籽培养皿内加热曲线的测定 分别将一颗、二颗长度为 1.22 cm 的热籽(居里点 57℃)固定在培养皿(内无细胞)底部中心位置,加入 2.0 ml 细胞培养基,培养皿外用泡沫保温材料保温,放入交变磁场线圈中心位置,使热籽长轴方向与磁场方向平行。加热电流固定在 450 A,加热时间为 60 min。

1.3.5 MTT 标准曲线的制作 在 96 孔培养板中按等比递增的顺序定量加入正常培养条件下(37℃,5% CO<sub>2</sub>)的 B<sub>16</sub> 细胞,1500 转离心 10 min,按 MTT 比色法处理后,测定 OD 值。以细胞数为横坐标,OD 值为纵坐标,绘制标准曲线。根据标准曲线,可以得到各细胞的最佳接种数目。

1.3.6 MTT 比色法测定细胞活性 活细胞的线粒体脱氢酶能将 MTT 转变为不可溶性的紫色颗粒,后者可被 DMSO 溶解后呈现出一定的色度,经比色分析得出的 OD 值可反映出活细胞水平。经处理的各组 B<sub>16</sub> 细胞消化,加入完全培养基,吹打混匀,接种于 96 孔培养板中,每孔 200 μl,每组接种 6 孔。加好各组细胞的 96 孔板用 1500 转离心 10 min。每孔再加入 5 mg/ml MTT 20 μl,37℃ 孵育 4 h,小心吸去上清,每孔加入 DMSO 150 μl,同时加一对照孔,30 min 后酶标仪上测量 OD 值。测定波长为 570 nm,参考波长 492 nm。

### 1.4 数据处理与统计学分析

细胞存活率的计算:细胞存活率 =  $(OD_{\text{实验}} - OD_{\text{空白}} / OD_{\text{对照}} - OD_{\text{空白}}) \times 100\%$ ,  $OD_{\text{空白}}$  = B<sub>16</sub> 细胞数为 0 时所测得的 OD 值,  $OD_{\text{对照}}$  = B<sub>16</sub> 细胞在室温对照下所测得的 OD 值。  $OD_{\text{实验}}$  = B<sub>16</sub> 在其它各处理条件下所测得的 OD 值。细胞死亡率 = 1 - 细胞存活率。实验所得数据应用 SPSS11.5 统计软件进行处

理,组间差异采用单因素方差分析进行检验, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异非常显著。相关分析检验 OD 值与细胞活性间的相关性。

## 2 结果

### 2.1 热籽培养皿内加热温度曲线

实验中所用的居里点为  $57^{\circ}\text{C}$  的热籽放入细胞培养皿中心位置,加入 2.0 ml 培养基,测温探头固定在培养皿边缘位置,记录水温变化情况,所得的温度曲线见图 1。加热 15 min 后,温度均开始达到平台期,一颗热籽平台期温度为  $(53.1 \pm 0.5)^{\circ}\text{C}$ ,二颗热籽(平行紧挨排列)加热时,平台期温度为  $(56.5 \pm 0.5)^{\circ}\text{C}$ 。实验进行 3 次,取平均值。

### 2.2 MTT 比色法标准曲线

正常培养条件下  $B_{16}$  细胞数和 OD 值之间的曲线,见图 2。结果表明 MTT 法测得 OD 值与活细胞数之间有很好的相关性( $r = 0.967$ ,  $P = 0.002$ ,  $n = 6$ ),可以根据实验中测得的 OD 值进行数据分析。根据标准曲线我们确定接种于培养皿的最佳细胞数为  $10^5/\text{ml}$  附近。

### 2.3 形态学观察

各组  $B_{16}$  细胞经处理后的形态学结果见图 3。培养皿内细胞形态呈梭型。对照组  $B_{16}$  细胞与在孵箱内正常培养的  $B_{16}$  细胞形态基本无差别,细胞形态分布规则,胞核清晰突出;单独磁场组、单独热籽组与对照组相比无明显的形态差别。加热组的细胞形态同各对照组相比则呈现出了较大的差别,一颗热籽加热组中可见细胞体积缩小,表面起泡,呈毛刺状,核固缩、染色质边聚,呈现出凋亡形态学改变,也可见部分细胞呈现坏死改变。二颗热籽加热组由于

加热温度更高,大部分细胞呈现坏死改变,表现为细胞肿胀,细胞膜破裂,胞质溢出,核碎裂和大量细胞碎片。以上结果证实热籽加热能够达到杀伤体外培养的肿瘤细胞的目的,导致肿瘤细胞凋亡或坏死。

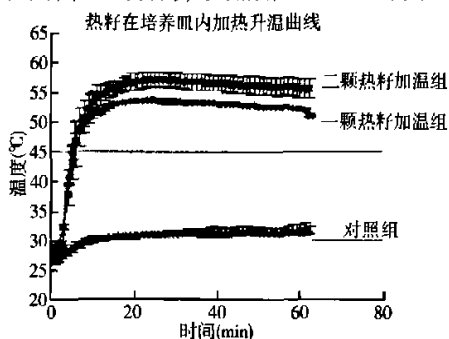


图1 热籽细胞培养皿(35 mm × 10 mm,加入 2.0 ml 培养基)内加热升温曲线,实验数据为 3 次独立实验所得的平均值

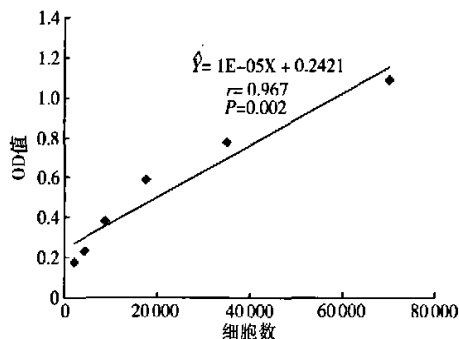


图2 接种细胞数与 MTT 比色法测得的 OD 值散点图

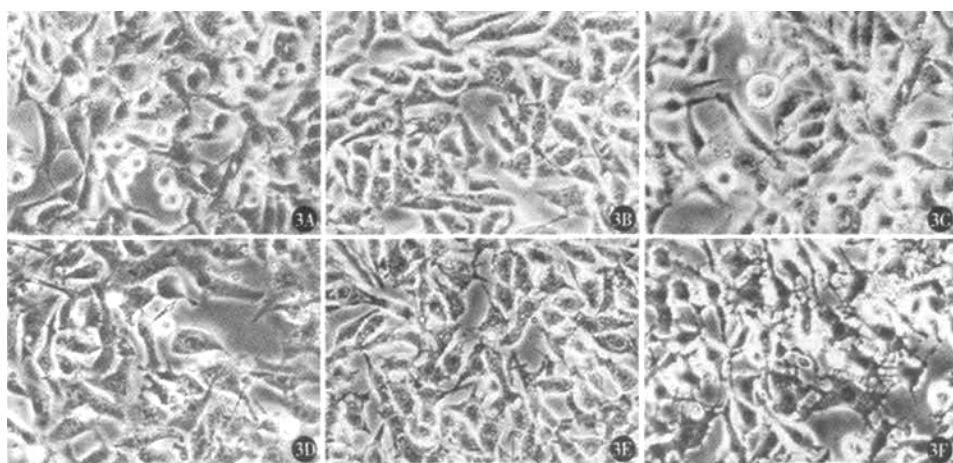


图3 各组  $B_{16}$  黑色素瘤细胞经各种处理后,倒置光学显微镜形态学观察,处理时间除 F 为 25 min 外其它各组均为 30 min。A 对照组;B 单独磁场组;C 一颗热籽组;D 二颗热籽组;E 一颗热籽加热组;F 二颗热籽加热组。A、B、C、D 细胞生长形态基本差别不大,呈梭形,分布规则,胞核清晰突出;E 细胞则表现为细胞体积缩小、表面起泡、呈毛刺状、核固缩、染色质边聚等现象(如箭头所示);F 可见细胞肿胀、细胞膜破裂、大量细胞碎片(如箭头所示)。放大倍数均为  $\times 200$

2.4 B<sub>16</sub>细胞活性

各组 B<sub>16</sub>细胞存活率见表 1。实验结果显示单纯磁场或单纯热籽作用 30 min 对 B<sub>16</sub>细胞的存活率影响不大,对照组、单独磁场组、单独热籽组之间差异不显著,而热籽加热对 B<sub>16</sub>细胞的存活率影响较明显,温度越高对 B<sub>16</sub>细胞杀伤力越大,一颗热籽加温组 20 min 后 B<sub>16</sub>细胞死亡率为 53%,而相同作用时间下二颗热籽加温组 B<sub>16</sub>细胞死亡率可达到 96.9%。同一温度条件下,随着作用时间的延长,细胞死亡率随之增加,二颗热籽加温组 5 min 细胞死

亡率为 40%,10 min 为 66%,15 min 为 90.1%,25 min 及以后时间测定的 OD 值小于空白对照的 OD 值,表明已基本无细胞存活,死亡率为 100%。

2.4.1 相同时间组间比较 5 min 时,一颗热籽加温组 and 对照组 B<sub>16</sub>细胞存活率无显著性差异( $q = 4.082, P > 0.05$ );二颗热籽加温组 and 对照组间有显著性差异( $q = 7.689, P < 0.01$ );一颗热籽加温组 and 二颗热籽加温间有显著性差异( $q = 9.328, P < 0.01$ )。10、15、20、25 min 时,一颗热籽加温组、二颗热籽加温组及对照组 B<sub>16</sub>细胞存活率均有显著性差

表 1 6 组作用不同时间后 B<sub>16</sub>细胞的存活率(%) ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	加热时间(min)						F, P 值	q, P 值
	5	10	15	20	25	30		
对照组①	1	1	1	1	1	1		
单独磁场组②	—	—	—	—	—	98.1 ± 5.1		
一颗热籽组③	—	—	—	—	—	99.5 ± 2.3		
二颗热籽组④	—	—	—	—	—	94.6 ± 11.0		
一颗热籽加温组⑤	86.0 ± 8.2	69.1 ± 6.6	54.1 ± 7.4	47.3 ± 8.1	37.2 ± 3.3	35.0 ± 8.3	F = 22.48, P = 0.000	q <sub>5-10</sub> = 4.082, P < 0.05 q <sub>5-15</sub> = 7.689, P < 0.01 q <sub>5-20</sub> = 9.328, P < 0.01 q <sub>5-25</sub> = 11.761, P < 0.01 q <sub>5-30</sub> = 12.292, P < 0.01 q <sub>10-15</sub> = 3.607, P < 0.05 q <sub>10-20</sub> = 5.246, P < 0.01 q <sub>10-25</sub> = 7.679, P < 0.01 q <sub>10-30</sub> = 8.210, P < 0.01 q <sub>15-20</sub> = 1.639, P > 0.05 q <sub>15-25</sub> = 4.072, P < 0.05 q <sub>15-30</sub> = 4.603, P < 0.05 q <sub>20-25</sub> = 2.433, P > 0.05 q <sub>20-30</sub> = 2.964, P > 0.05 q <sub>25-30</sub> = 0.531, P > 0.05
二颗热籽加温组⑥	60.2 ± 13.7	34.4 ± 10.6	9.9 ± 2.9	3.1 ± 2.9	0	0	F = 30.49, P = 0.000	q <sub>5-10</sub> = 5.579, P < 0.01 q <sub>5-15</sub> = 10.892, P < 0.01 q <sub>5-20</sub> = 12.371, P < 0.01 q <sub>5-25</sub> = 13.034, P < 0.01 q <sub>10-15</sub> = 5.312, P < 0.01 q <sub>10-20</sub> = 6.791, P < 0.01 q <sub>10-25</sub> = 7.455, P < 0.01 q <sub>15-20</sub> = 1.479, P > 0.05 q <sub>15-25</sub> = 2.142, P > 0.05 q <sub>20-25</sub> = 0.664, P > 0.05
F, P 值	F = 14.31, P = 0.005	F = 61.88, P = 0.000	F = 286.48, P = 0.000	F = 285.41, P = 0.000	F = 2167.82, P = 0.000	F = 54.27, P = 0.000		
q, P 值	q <sub>1-5</sub> = 4.082, P > 0.05	q <sub>1-5</sub> = 7.412, P < 0.01	q <sub>1-5</sub> = 17.232, P < 0.01	q <sub>1-5</sub> = 18.336, P < 0.01	q <sub>1-5</sub> = 57.820, P < 0.01	q <sub>1-2</sub> = 0.497, P > 0.05 q <sub>1-3</sub> = 0.120, P > 0.05 q <sub>1-4</sub> = 1.419, P > 0.05 q <sub>1-5</sub> = 16.934, P < 0.01 q <sub>2-3</sub> = 0.377, P > 0.05 q <sub>2-4</sub> = 0.922, P > 0.05 q <sub>2-5</sub> = 16.437, P < 0.01 q <sub>3-4</sub> = 1.299, P > 0.05 q <sub>3-5</sub> = 16.814, P < 0.01 q <sub>4-5</sub> = 15.515, P < 0.01		

异( $P < 0.01$ ); 30 min 时, 单独磁场组、一颗热籽组、二颗热籽组、对照组  $B_{16}$  细胞存活率均无显著性差异; 一颗热籽加热组与其他组各时间有显著性差异( $q = 16.934, P < 0.01; q = 16.437, P < 0.01; q = 16.814, P < 0.01; q = 15.515, P < 0.01$ )。

2.4.2 组内不同时间比较 一颗热籽加温组不同时间点相比较,  $B_{16}$  细胞存活率 15 min 与 20 min、20 min 与 25 min、25 min 与 30 min 及 20 min 与 30 min 无显著性差异( $q_{15-20} = 1.639, P > 0.05; q_{20-25} = 2.433, P > 0.05; q_{20-30} = 2.964, P > 0.05; q_{25-30} = 0.531, P > 0.05$ ); 其他各时间点  $B_{16}$  细胞存活率均有显著性差异( $P < 0.01$ )。二颗热籽加温组不同时间点相比较, 15 min 与 20 min、20 min 与 25 min、15 min 与 25 min  $B_{16}$  细胞存活率无显著性差异( $q_{15-20} = 1.479, P > 0.05; q_{15-25} = 2.142, P > 0.05; q_{20-25} = 0.664, P > 0.05$ ); 其他各时间点  $B_{16}$  细胞存活率均有显著性差异( $P < 0.01$ )。

### 3 讨论

热籽感应加温治疗技术可以克服其他加温治疗方法在热定位、热分布和肿瘤组织与正常组织温差小等方面的缺点<sup>[12]</sup>。近年来, 随着交变磁场设备性能进一步的完善, 热籽感应加温技术取得了较多的进展, 各种不同的磁性材料在基础实验和临床实验方面进行了广泛的<sup>[13-16]</sup>, 但这些方面的报道以国外为主, 国内鲜有报道。

热籽感应加温的实验报道主要集中在基础实验和动物实验方面, 热籽感应加温细胞水平的实验研究则报道较少, 韩国的 Lee 等<sup>[17]</sup>研究了一种含有铁氧体(ferrite)的玻璃陶瓷热籽在交变磁场中加热时对 KB 细胞(一种肿瘤细胞, 来源于人类口腔上皮)影响, 结果表明可以有效杀伤邻近热籽位置的肿瘤细胞, 距离较远的细胞则不能完全杀伤。我们的实验结果也证实了这一点, 在细胞水平上热籽感应加温可以对恶性黑色素瘤细胞造成明显的杀伤, 温度越高、加热时间越长对细胞造成的损害或杀伤效果越好。从加温后的形态学观察来看, 一颗热籽加热时, 温度可达到 53.1℃, 加热后  $B_{16}$  细胞呈现凋亡和坏死并存的形态学改变, 而二颗热籽加热温度可达到 56.5℃, 加热后则主要为坏死的形态学改变。在存活率方面, 一颗热籽加温组随着加热时间的延长, 逐渐下降, 但是到 25 min 以后就降低的比较缓慢, 基本到达平台期, 加热 30 min 后还有 35% 的  $B_{16}$  细胞存活; 而二颗热籽加温组随着加热时间的延长, 存活率急剧下降, 在加热 25 min 后便基本没有  $B_{16}$  细胞存活了, 以上结果提示要取得对  $B_{16}$  细胞较好的杀伤效果, 在本实验条件下, 采用二颗及以上的热籽进行加热是必要的。实验结果还显示单独的交变磁场和单独的热籽与肿瘤细胞培养对肿瘤细胞的形态学和存活率影响并不大, 统计学结果显示差异不显著, 但这仅限于在实验中所应用的时间(最长 30 min)。单独磁场或热籽对肿瘤细胞及正常细胞的生物学影响也是需要考虑的问题之一, 更长时间的单独磁场或单独热籽对体外培养的肿瘤细胞的影响

还有待进一步的研究。但与韩国学者进行的研究相比较, 本实验是在液体培养基情况下进行的, 而热籽在液态环境下的传热与在组织内的传热并不完全一样, 实验中对细胞活性的检测方法采用的 MTT 比色法, 而判断肿瘤细胞活性的最佳方式应该是增殖性死亡, 如克隆形成率, 因此, 有必要采用固体培养基和克隆形成率等方法对实验结果进行进一步的验证。

综上所述, 本实验结果表明热籽感应加温在交变磁场中升温到适宜的温度, 有效杀伤体外培养肿瘤细胞, 导致肿瘤细胞凋亡或死亡, 达到治疗恶性肿瘤的目的。

致谢: 本课题研究得到中日友好医院临床医学研究所赵天德教授、陈惟昌教授的大力指导, 在此谨致谢意。

### 参考文献

- 1 Wust P, Hildebrandt B, Sreenivasa G, et al. Hyperthermia in combined treatment of cancer. *Lancet Oncol*, 2002, 3:487-497.
- 2 Falk MH, Issels RD. Hyperthermia in oncology. *Int J Hyperthermia*, 2001, 17:1-18.
- 3 Langlands A. Hyperthermia in the treatment of cancer. *Med J Aust*, 1990, 152:283-284.
- 4 Harmon BV, Takano YS, Winterford CM, et al. The role of apoptosis in the response of cells and tumors to mild hyperthermia. *Int J Rad Biol*, 1991, 59:489.
- 5 Van-Wieringen N, Kotte AN, Van-Leeuwen GM, et al. Dose uniformity of ferromagnetic seed implants in tissue with discrete vasculature: a numerical study on the impact of seed character and implantation techniques. *Phys Med Biol*, 1998, 43:121-138.
- 6 Tazawa K, Nagae H, Takemori S, et al. A study of inductive heating for cancer with use of dextran magnetite (DM), effect for various cancer cells by intracellular hyperthermia. *Jpn J Hyperthermic Oncol*, 1991, 7: 381-390.
- 7 Masuko Y, Tazawa K, Sato H, et al. Antitumor activity for selective hyperthermia in tumor-bearing rats using thermosensitive magnetiliposomes as a new hyperthermic material. *Drug Deliv*, 1997, 4: 37-42.
- 8 陈敏山, 郑云, 张亚奇, 等. 经皮射频联合瘤内无水酒精注射治疗肝癌. *癌症*, 2001, 20:759-761.
- 9 霍彦明, 陈亚珠. HIFU 技术换能器探头的比较研究. *中国医疗器械杂志*. 2000, 24:97-101.
- 10 夏启胜, 刘轩, 徐波, 等. 铁磁热籽加温治疗肿瘤机理研究现状. *中国医学物理学杂志*, 2004, 21:213-215.
- 11 夏启胜, 刘轩, 李红艳, 等. 热籽感应加温治疗肿瘤实验与临床研究进展. *中华物理医学与康复杂志*, 2005, 27:380-382.
- 12 Moroz P, Jones SK, Gray BN, et al. Magnetic mediated hyperthermia: current status and future directions. *Int J Hyperthermia*, 2002, 18:267-284.
- 13 耿跃春, 王想, 胡焰, 等. 铁磁热籽诱导加热治疗肝癌的实验研究. *中华理疗杂志*, 1997, 20:204-206.
- 14 熊国欣, 李伟, 王光志, 等. 温敏磁性材料居里点效应治疗肿瘤的研究. *中国医学物理学杂志*, 2000, 17:101-102.
- 15 Park BH, Koo BS, Kim YK, et al. The induction of hyperthermia in rabbit liver by means of duplex stainless steel thermoseeds. *Korean J Radiol*, 2002, 3:98-104.
- 16 Tucker RD. Use of interstitial temperature self-regulating thermal rods in the treatment of prostate cancer. *J Endourol*, 2003, 17: 601-607.
- 17 Lee YK, Lee SB, Kim YU, et al. Effect of ferrite thermoseeds on destruction of carcinoma cells under alternating magnetic field. *J Mater Sci*, 2003, 38:4221-4233. (收稿日期:2007-01-15) (修回日期:2007-08-08)

(责任编辑:李贺琼)