

• 实验研究 •

磁流体热疗对荷 Lewis 肺癌小鼠肿瘤细胞凋亡和周期的影响

胡润磊^① 刘 轩 徐 波 夏启胜 李红艳 杨鸿生^② 唐劲天^{**}

(中日友好医院临床医学研究所, 北京 100029)

【摘要】 目的 探讨磁流体热疗对荷 Lewis 肺癌小鼠肿瘤细胞的凋亡和周期的影响。 **方法** 接种 Lewis 肺癌细胞悬液于 C57BL/6 小鼠的皮下, 等肿瘤长至直径约为 (0.8 ± 0.1) cm 时, 随机分为 4 组: 对照组、磁场组、磁流体组、实验组。加温治疗后 48 h, 眼球取血, 检测血中白细胞的变化, 切取肿瘤标本, 流式细胞仪检测细胞凋亡率和周期的变化。 **结果** 热疗后 4 组血中白细胞没有明显的变化 ($F=0.62, P=0.613$); 肿瘤细胞凋亡率实验组为 $(63.55 \pm 8.39)\%$, 对照组、磁场组、磁流体组分别为 $(28.43 \pm 6.29)\%$, $(32.75 \pm 5.07)\%$, $(32.42 \pm 6.15)\%$, 实验组肿瘤细胞凋亡率明显高于其他 3 组 ($q=11.925, P<0.05$; $q=10.458, P<0.05$; $q=10.570, P<0.05$); 实验组细胞周期出现明显 G1/G0 期阻滞为 $(68.13 \pm 5.73)\%$ 显著高于对照组 $(47.95 \pm 9.98)\%$ ($q=5.501, P<0.05$), 磁场组 $(49.23 \pm 6.62)\%$ ($q=5.152, P<0.05$), 磁流体组 $(52.28 \pm 9.64)\%$ ($q=4.320, P<0.05$)。 **结论** 磁流体热疗可明显提高 Lewis 肺癌细胞的凋亡率, 抑制 Lewis 肺癌细胞 G1 期向 S 期的进程。

【关键词】 凋亡; 细胞周期; 磁流体; 热疗

中图分类号: R-332

文献标识: A

文章编号: 1009-6604(2007)11-1046-03

Effect of Magnetic Fluid Hyperthermia on Apoptosis and Cell Cycle of Tumor Cells in Mice with Lewis Lung Carcinoma Hu Runlei, 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 effect of magnetic fluid hyperthermia on apoptosis and cell cycle of tumor cells in mice with Lewis lung carcinoma. **Methods** A total of 20 C57BL/6 mice were subcutaneously inoculated with Lewis lung carcinoma cells. When the tumor grew to (0.8 ± 0.1) cm in diameter, the mice were randomly divided into four groups: control, magnetic, magnetic fluid, and experiment groups. Forty-eight hours after being treated with hyperthermia, blood samples were collected from the eyes of the mice, and the WBC was counted. The tumors were removed to evaluate the apoptosis rate and the cell cycles by flow cytometry. **Results** No significant change of WBC count was detected in the four groups after hyperthermia ($F=0.62, P=0.613$). The apoptosis rate of the tumor cells in the experiment group was $(63.55 \pm 8.39)\%$, which was significantly higher than that in the control [$(28.43 \pm 6.29)\%$; $q=11.925, P<0.05$], magnetic [$(32.75 \pm 5.07)\%$, $q=10.458, P<0.05$], and magnetic fluid groups [$(32.42 \pm 6.15)\%$; $q=10.570, P<0.05$]. In the experiment group, $(68.13 \pm 5.73)\%$ of the tumor cells were arrested at G0/G1. The percentage was significantly higher than that in the other 3 groups [$(47.95 \pm 9.98)\%$ in the control, $q=5.501, P<0.05$; $(49.23 \pm 6.62)\%$ in the magnetic group, $q=5.152, P<0.05$; $(52.28 \pm 9.64)\%$ in the magnetic fluid group, $q=4.320, P<0.05$]. **Conclusions** Magnetic fluid hyperthermia can increase the apoptotic rate of Lewis lung carcinoma cells, and inhibit the cell progress from G1 to S stage.

【Key Words】 Apoptosis; Cell cycle; Magnetic fluid; Hyperthermia

肿瘤局部热疗是采用加热的方法使癌变处的局部温度升高 ($>41.0^\circ\text{C}$) 从而杀死肿瘤细胞的一种治疗方法, 是继手术、放疗、化疗和生物治疗后又一重要的肿瘤治疗手段。磁流体热疗 (magnetic fluid hyperthermia, MFH) 是将磁流体通过直接注射到达

肿瘤内部, 磁流体被肿瘤细胞吞噬或沉积在细胞之间, 在交变磁场下通过 Neel 松弛机制升温, 从而杀死肿瘤细胞, 而周围正常组织升温不明显, 具有高度的靶向性。本研究旨在探讨磁流体热疗诱导 Lewis 肺癌细胞凋亡和对细胞周期的影响。

• 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 (H030230160130), 清华大学裕元医学基金 (20240000519)

** 通信作者 (清华大学工程物理系, 北京 100084)

① (杭州市第一人民医院胸外科, 杭州 310006)

② (昆明医学院第一附属医院胸外科, 昆明 650031)

1 材料与方法

1.1 实验材料及主要设备

1.1.1 材料及试剂 磁流体:水基磁性液体,安徽金科磁性液体有限公司提供,性能参数: Fe_3O_4 颗粒,磁饱和强度 270 Gs,直径 10 nm 浓度百分比:40%。麻醉剂:戊巴比妥钠,北京试剂公司提供,德国进口分装。碘化丙锭(PI)、RNA 酶:Sigma 公司提供。

1.1.2 主要设备 加温设备:分体式高频感应加热机,型号:SP-04ABC 4 KW,频率 100~250 KHz,感应线圈直径 5 cm,深圳市双平电源技术有限公司提供。测温设备:铜-康铜热电偶,型号:It-18,温度响应时间:0.1 s,美国 Physitemp 公司提供温度显示设备;四通道毫伏计(热电偶测温显示温度用),型号:XSO1A-4,北京昆仑天辰仪表科技有限公司提供;流式细胞仪(FCM):型号 EPICS XL 型,美国 Coulter 公司。

1.2 实验动物

健康 C57/BL6 小鼠,雄性,8 周龄,体重(20 ± 2)g,由中国医学科学院实验动物研究所提供,许可证号:SCXK 京 2004-0001,清洁级饲养。瘤株:小鼠 Lewis 肺癌瘤株,由中国医学科学院药物所提供。

1.3 荷 Lewis 肺癌模型的制作

将液氮冻存的 Lewis 肺癌细胞悬液取出,37.0 °C 水浴充分融化冰块,低速离心,弃去上清液,1640 培养基稀释后接种于小鼠右侧腋下,一般接种 2 只,待复苏肿瘤直径长至 1.5~2.0 cm 时,离断法处死,无菌条件下剥离瘤组织,选取生长良好的肿块,按肿瘤(g):生理盐水(ml)为 1:3 比例匀浆,调细胞数约为 $1.0 \times 10^7/\text{ml}$ 。C57/BL6 小鼠,右侧肋腹部皮下接种此悬液 0.2 ml。接种后第 4 天开始观察肿瘤生长情况,隔天用游标卡尺测量上述瘤体的大小,并以下列公式计算肿瘤体积: $V = 1/2ab^2$ (a 为肿瘤的长径,b 为垂直于长径的短径),单位:cm。待肿瘤长至长径约为(0.8 ± 0.1) cm 时开始治疗。

1.4 加温治疗

随机分为 4 组,每组 5 只,2%戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔麻醉。A 组:对照组,不予以任何治疗。B 组:磁场组,将荷瘤小鼠放在交变磁场下作用 30 min。C 组:磁流体组,向肿瘤内注射磁流体 20 mg,不予磁场作用,具体方法:用 1 ml 注射器将 50 μl 的

磁流体(约含 20 mg Fe_3O_4 nm 颗粒)缓慢注射到瘤体内部。D 组:实验组,按上述方法注射磁流体 24 h 后,在交变磁场下加温 1 次,通过控制磁场的强度,将温度稳定在 46.0 °C 左右,时间为 30 min。

1.5 白细胞计数和流式细胞仪检测细胞凋亡和周期的变化

加温治疗后 48 h,各组小鼠眼球取血约 1 ml,放入抗凝管中,进行白细胞计数,然后离断法处死,剥离出瘤体,放入玻璃匀浆器中,剪成小块,加入适量的 0.9% 生理盐水,150 目筛网过滤,制成细胞悬液,低速离心(室温,1200 rpm,7 min),弃上清液,0.9% 生理盐水清洗、离心,重复 2 遍,75% 乙醇固定,打散,4 °C 保存过夜。

将 75% 乙醇固定的细胞悬液低速离心(1200 rpm)5 min 后,弃上清,0.9% 生理盐水清洗 2 次,加入 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNA 酶温浴 30 min,加碘化丙锭至终浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$,4 °C 暗处作用 30 min,300 目尼龙网过滤,调整细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$,上机检测细胞凋亡的变化。

2 结果

2.1 白细胞计数的变化

加温治疗后 48 h,各组的白细胞计数见表 1,磁场组、磁流体组及实验组的白细胞在加温后没有显著的变化。

表 1 热疗后 48 h 各组小鼠白细胞计数比较

组别	WBC($\times 10^9$)
对照组(n=5)	5.23 ± 1.70
磁场组(n=5)	4.43 ± 1.52
磁流体组(n=5)	5.51 ± 1.42
实验组(n=5)	4.43 ± 1.65
F, P 值	0.62, 0.613

2.2 磁流体热疗对 Lewis 肺癌细胞凋亡率的影响

加温后 48 h,磁流体热疗可以明显诱导 Lewis 肺癌细胞的凋亡,对照组凋亡率为(28.43 ± 6.29)%,磁场组为(32.75 ± 5.07)%,磁流体组为(32.42 ± 6.15)%,实验组为(63.55 ± 8.39)%,实验组与其他 3 组比较有显著差异($F = 30.61$, $P = 0.000$; $q = 11.925$, $P < 0.05$; $q = 10.458$, $P < 0.05$; $q = 10.570$, $P < 0.05$),见图 1。

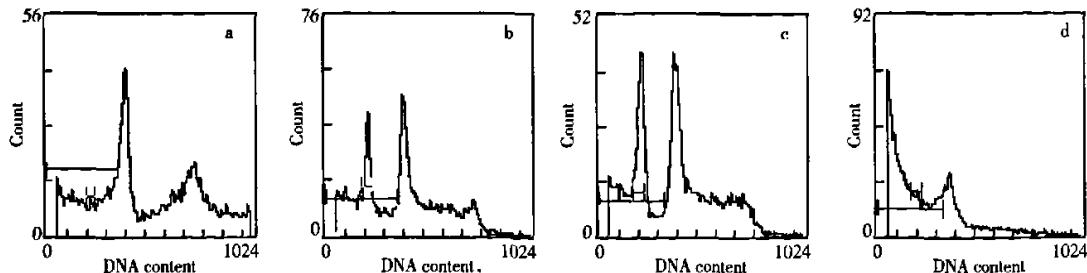


图 1 加温后 48 h 后各组荷瘤小鼠细胞凋亡率

a 对照组; b 磁场组; c 磁流体组; d 实验组,可见实验组凋亡率明显升高

2.3 磁流体热疗对 Lewis 肺癌细胞周期的影响

磁流体热疗后可以出现明显的 G0/G1 期阻滞, 见表 2。

表 2 热疗后 48 h 4 组荷瘤小鼠肿瘤细胞
周期变化的比较 (%)

组别	G0/G1	S	G2/M
对照组(n=5)①	47.95 ± 9.98	31.12 ± 7.13	20.91 ± 13.59
磁场组(n=5)②	49.23 ± 6.62	27.36 ± 5.71	23.41 ± 8.63
磁流体组(n=5)③	52.28 ± 9.64	21.75 ± 7.12	25.97 ± 11.11
实验组(n=5)④	68.13 ± 5.73	22.05 ± 5.71	9.82 ± 7.74
F, P 值	6.47, 0.004	2.44, 0.102	2.29, 0.118
q, P 值	q ₄₋₁ = 5.501, P < 0.05		
	q ₄₋₂ = 5.152, P < 0.05		
	q ₄₋₃ = 4.320, P < 0.05		
	q ₃₋₁ = 1.180, P > 0.05		

3 讨论

本实验研究了磁流体热疗在 46.0 ℃ 的温度下对 Lewis 肺癌细胞凋亡和细胞周期的变化。研究证实, 42.0 ~ 46.0 ℃ 导致肿瘤细胞死亡的机理主要以诱导凋亡、导致坏死为主, 热疗过高温度的热疗 (>50 ℃) 会将产生大量的肿瘤坏死产物, 容易造成休克综合征^[1], 我们将温度控制在 46 ℃ 左右, 因而避免了上述风险, 通过对热疗后荷瘤小鼠的白细胞检测结果表明, 热疗后白细胞与对照组的差异没有统计学意义, 说明在此温度的热疗条件是安全的。

热疗可以通过物理作用造成正常细胞和肿瘤细胞的凋亡和坏死^[2]。将 MFH-2NR 细胞在体外 43 ℃ 条件下加温 1 h 后可以导致细胞的凋亡, 且随着温度的升高, 凋亡越明显^[3]。凋亡是一种细胞主动自杀的过程, 是细胞死亡的一种形式, 研究表明凋亡有一些特征性的改变, 主要表现为: DNA 碎片的形成、染色质边集、胞浆空泡化, 细胞皱缩、凋亡小体的形成等^[4,5]。我们将温度控制在 46 ℃, 流式细胞仪检测实体瘤细胞凋亡, 结果显示实验组的凋亡率与其他 3 组相比明显增加 (P < 0.05), 而其他 3 组之间的比较没有明显差异 (P > 0.05), 与文献报道基本符合^[6]。

真核细胞周期分为有丝分裂期和间期, 细胞的生长、分裂时依次经过 G1、S、G2、M 期, 已有报道^[7,8]热疗后细胞周期可以发生从 G0/G1 期到 S-G2/M 期的阻滞。国内报道热疗后肿瘤细胞发生了不同程度的 G1 期阻滞和 G2/M 期阻滞^[9,10]。我们

用流式细胞仪测定热疗后 Lewis 肺癌细胞周期的变化, 结果表明加温 46 ℃ 30 min 后细胞周期发生了明显的改变, G1 期细胞增多。G1 期又称细胞复制前期, 是指细胞从有丝分裂完成到 DNA 复制之前, G1 期是制造产生 rRNA、mRNA、tRNA 及核蛋白体, 因此 G1 期末是细胞运行的关键时刻。因此, 我们用磁流体热疗抑制了细胞周期的 G1 期, 使 G1 期细胞堆积不能进入 S 期, 抑制了 G1 期的 RNA 和蛋白质的合成, 间接地使肿瘤细胞的 RNA 合成减少。

综上所述, 磁流体热疗在 46.0 ℃ 左右的条件下对荷瘤小鼠机体没有明显的影响, 而且可以明显诱导 Lewis 肺癌细胞的凋亡, 阻止 Lewis 肺癌细胞 G1 期向 S 期的进程。磁流体热疗诱导肿瘤细胞凋亡的生物学作用有待于进一步研究。

参考文献

- Moroz P, Jones SK, Gray BN, et al. Magnetically mediated hyperthermia: current status and future directions. *Int J Hyperthermia*, 2002, 18(18): 267-284.
- Tronov VA, Konstantinov EM, Kramarenko II. Hyperthermia induced signal apoptosis and pathways of its transduction in the cells. *Tsitologia*, 2002, 44(11): 1079-1088.
- Chen G, Luo B, Wang H, et al. Effect of hyperthermia on rat hippocampal pyramidal cell apoptosis in vitro. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2003, 23(3): 233-235.
- Mathiasen IS, Sergeev IN, Bastholm L, et al. Jaattela M. Calcium and calpain as key mediators of apoptosis-like death induced by vitamin D compounds in breast cancer cells. *J Biol Chem*, 2002, 277: 30738-30745.
- Barni S, Pontiggia P, Bertone V, et al. Hyperthermia-induced cell death by apoptosis in myeloma cells. *Biomed Pharmacother*, 2001, 55(3): 170-173.
- 何永文, 王升志, 边 莉, 等. 热化疗诱导荷瘤鼠肿瘤细胞凋亡的研究. *肿瘤防治杂志*, 2003, 10(11): 1133-1136.
- Yuguchi T, Saito M, Yokoyama Y, et al. Combined used hyperthermia and irradiation cause antiproliferative activity and cell death to human esophageal cell carcinoma cells-mainly cell cycle examination. *Hum Cell*, 2002, 15(1): 33-42.
- 何跃明, 吕新生, 艾中立, 等. 磁介导热疗联合顺铂化疗对肝癌细胞的影响及其机制. *中华实验外科杂志*, 2004, 21(10): 1170-1172.
- 冯青杰, 杜柏山, 舒 畅, 等. 高温诱导 Hep-2 细胞凋亡及其对细胞周期进程的影响. *吉林大学学报(医学版)*, 2004, 30(1): 103-104.
- 颜士岩, 张东生, 郑 杰, 等. Fe₂O₃ 纳米磁流体热疗治疗肝癌. *中华实验外科杂志*, 2004, 21(12): 1443-1446.

(收稿日期: 2007-01-15)

(修回日期: 2007-07-27)

(责任编辑: 李贺琼)