

磁流体热疗对肺癌 A549 裸鼠移植瘤抑制作用的实验研究

胡润磊 李 许 柯贤福 王国卿 魏东山 王 炜

摘 要 **目的** 探讨 Fe3O4 磁流体热疗对人肺癌 A549 裸鼠移植瘤生长的抑制作用。**方法** 将人肺癌 A549 细胞接种于裸鼠背部皮下建立移植瘤模型,当肿瘤长至直径(6~8mm)时,在预实验的基础上随机分为 4 组:对照组、低剂量(67.5mg/ml)组、中剂量(90.0mg/ml)组、高剂量(112.5mg/ml)组。3 个实验组在注射 0.2ml 磁流体后 24h,分别在交变磁场作用下作用 30min,光纤传感器测量肿瘤内部和肛门的温度,每周测量肿瘤体积,观察磁流体热疗后肿瘤体积的变化、瘤体的病理变化,对肿瘤生长影响。**结果** 中、高剂量组的温度可以上升至有效治疗温度($>42^{\circ}\text{C}$),热疗后第 21 天,与对照组比较,中、高剂量组瘤体的增长受到明显的抑制($P<0.05$),抑制效果与剂量呈剂量-效果依赖关系。组织学检查肿瘤细胞呈凋亡、坏死样改变。**结论** 磁流体热疗可以明显诱导人肺癌 A549 凋亡、导致坏死,抑制肺癌裸鼠移植瘤的生长。

关键词 磁流体 热疗 肺癌 凋亡

Therapeutic Effects of Magnetic Fluid Hyperthermia Induced by an Alternative Magnetic Field on Human Carcinoma A549 in Nude Mice.

Hu Runlei, Li Hu, Ke Xianfu, Wang Guoqing, Wei Dongshan, Wang Wei. Department of Thoracic Surgery, Hangzhou First People's Hospital, Zhejiang 310006, China

Abstract **Objective** To study therapeutic effects of magnetic fluid hyperthermia induced by an alternating magnetic field on human carcinoma A549 in nude mice. **Methods** Xenografted animal model of human lung cancer was established by innoculating human lung cancer A549 cells into BALB/c nude mice subcutaneously. Then the mice were randomly divided into 4 groups: control group, low dose group (67.5mg/ml), medium dose group (90.0mg/ml) and high dose group (112.5mg/ml), respectively. Twenty four hours after magnetic fluid (0.2ml) was directly injected into the center of the tumor, the tumor was heated in an alternating magnetic field for 30 minutes. Tumor volumes were measured every week. The therapeutic effect was assessed by measuring the tumor volume and weight. Pathological examination was performed with light and electronic microscope after the treatment. **Results** Temperature of medium and high dosage group could reach 44.5°C and 46.8°C , respectively. The tumor grew slowly in medium dosage and high dosage groups compared with the control group. The difference was significant ($P<0.05$, respectively). Cytoclasis and apoptosis were observed under light microscope and electron microscope. **Conclusion** Magnetic fluid hyperthermia induced by AMF could inhibit the tumor growth and promote apoptosis of human being carcinoma A549 cells

Key words Magnetic fluid; Hyperthermia; Lung cancer; Apoptosis

局部热疗是近年来发展较快的一种肿瘤治疗方法,传统的热疗方法主要有射频热疗、微波热疗和超声热疗等。但是,射频热疗过程中由于电场较发散,不能对肿瘤准确的聚焦,从而导致肿瘤周围脂肪过热。微波的穿透深度非常有限,常只能作浅表肿瘤的

热疗;超声不能穿透含气空腔,因此应用比较局限。磁流体热疗(magnetic fluid hyperthermia, MFH)是将纳米技术和热疗技术相结合的一种新兴热疗方法。Jordan 首先开展了此方面的研究,将磁流体通过直接注射的方式到达肿瘤内部,磁流体在交变磁场下通过 Neel 松弛机制升温^[1,2]。由于磁性颗粒是通过直接注射的方式到达肿瘤内部,周围正常组织由于没有磁性颗粒的分布,升温不明显或不升温,因此大大提高了热疗的靶向性。本研究将 Fe3O4 磁流体在交变磁场作用下对肺癌 A549 裸鼠移植瘤进行了初步研究,研究了其作用机制,探讨了磁流体热疗治疗肺癌的可行性。

基金项目:浙江省医药卫生科学研究基金资助项目(2009A163);杭州市科技发展计划项目(20080333B02);杭州市医药卫生科技计划项目(2007B001)

作者单位:310006 杭州市第一人民医院胸外科(胡润磊、李许、王国卿、魏东山、王炜);310013 浙江省医学科学院动物实验中心(柯贤福)

通讯作者:李许,电子信箱:hurunlei@163.com

材料与方法

1. 主要材料: (1) 试剂: 主要试剂: MTT (四唑氮盐), DM-SO (二甲亚砜), 胰蛋白酶, 细胞培养基粉 (RPMI1640) 由 Sigma 公司提供。 (2) 细胞株: 人肺癌细胞株 A549, 由杭州吴天生物有限公司提供。用含 10% 胎牛血清 RPMI1640 培养液常规传代培养。 (3) 磁流体: 纳米级 Fe_3O_4 颗粒, 采用化学共沉淀法制成胶体混悬液, 呈黑色。样品粒径范围为 10 ~ 40 nm, 磁饱和度: 磁饱和强度是 360 GS。样品使用前均以超声波处理 5 min, 使 Fe_3O_4 颗粒分布更均匀。 (4) 实验动物: 4 ~ 5 周龄 BALB/C 雌性裸小鼠 32 只, 质量 20 ~ 24 g, 浙江省医学科学院动物实验中心提供并饲养, 实验动物生产许可证号: SCXK (浙) 2008 - 0035。饲养于浙江省实验动物中心实验动物屏障系统, 空气洁净度万级, 换气次数 15 次/小时, 温度 21 ~ 24℃, 湿度 75% ~ 80%。实验动物使用许可证号: SYXK (浙) 2008 - 0113。 (5) 主要仪器设备: 高频感应加热机: 型号: SP - 04AC 4kW, 深圳市双平电源技术有限公司提供。频率为 100 ~ 250 kHz, 感应线圈由 4 匝直径为 4 mm 的铜管平行绕成内径为 3 cm, 长为 4 cm 的线圈, 铜管内通循环水。① 流式细胞仪 (FCM): 型号 EPICS XL 型, 美国 Coulter 公司; ② 透射电镜: JEM - 1230 型透射电镜, 日本 JEOL 公司; ③ 测温设备: 光纤温度传感器, YF - 200。

2. 实验方法: (1) 人肺癌 A549 裸鼠移植瘤模型的建立: 将处于对数生长期的人肺癌 A549 细胞, 以 0.25% 胰酶 + 0.02% EDTA 液进行消化, 以血细胞计数板进行计数后用不含血清的 DMEM 培养液稀释, 调整细胞浓度为 $1 \times 10^7/\text{ml}$ 。用 1 ml 注射器分别在裸鼠背部皮下注射上述细胞悬液 0.2 ml。观察小鼠精神、饮食及排便等情况, 每周用游标卡尺测量肿瘤的长径 (a)、短径 (b), 按公式 $V = ab^2/2$, 估算肿瘤近似体积。 (2) 磁流体热疗: 接种后第 21 天, 各组移植瘤平均直径约 6 mm, 在预实验的基础上将裸鼠随机分为: 对照组、低剂量组、中剂量组、高剂量组, 每组 8 只。2% 戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 腹腔注射麻醉。① 对照组: 予以 1 次进针、多点注射 0.2 ml 的生理盐水; ② 低剂量组: 予以 1 次进针、多点注射 0.2 ml 浓度为 67.5 mg/ml 的磁流体, 含磁流体约 13.5 mg; ③ 中剂量组: 予以 1 次进针、多点注射 0.2 ml 浓度为 90.0 mg/ml 的磁流体, 含磁流体约 18 mg; ④ 高剂量组: 予以 1 次进针、多点注射 0.2 ml 浓度为 112.5 mg/ml 的磁流体, 含磁流体约 22.5 mg。3 个实验组在注射磁流体后 24 h, 分别在交变磁场作用下作用 30 min, 光纤传感器测量肿瘤内部和肛门的温度。 (3) 病理学观察: 加温后 48 h, 各组随机挑选 2 只裸鼠, 离断法处死, 迅速取出瘤体, 剖开经 10% 甲醛缓冲液固定, 石蜡包埋切片, 苏木素 - 伊红 (HE) 染色, 光学显微镜下观察肿瘤组织学变化。另一部分瘤体 4% 预冷戊二醛 4℃ 固定过夜, 1% 的锇酸溶液固定样品 1 ~ 2 h, 将经过渗透处理的样品包埋起来, 70℃ 加热过夜, 在 Reichert 超薄切片机上切成 70 ~ 90 nm 的薄片, 用柠檬酸铅溶液和醋酸双氧铀 50% 乙醇饱和溶液各染色 15 min, 透射电镜中观察。 (4) 热疗对荷瘤小鼠瘤体的抑制作用: 热疗后第 21

天, 离断法处死所有的荷瘤小鼠, 剥取瘤体, 天平称重。根据瘤体的体积计算各组的肿瘤体积抑制率, 肿瘤体积抑制率 = $(1 - \text{实验组瘤体体积} / \text{对照组瘤体体积}) \times 100\%$ 。根据各组荷瘤小鼠瘤重计算肿瘤的质量抑制率, 肿瘤质量抑制率 = $(1 - \text{实验组瘤体质量} / \text{对照组瘤体质量}) \times 100\%$ 。

3. 统计学方法: 实验数据采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 应用 SPSS 13.0 软件做方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

1. 移植瘤生长情况: 裸鼠一般情况及皮下成瘤: 32 只裸鼠成瘤, 成瘤率 100%, 瘤结节形成时间为细胞种植后第 4 ~ 13 天, 集中在第 8 ~ 10 天。肿瘤细胞种植后第 21 天, 肿瘤直径平均达 6 mm。成瘤后早期裸鼠的体质量和活动情况没有明显改变, 随着肿瘤形成并逐渐增大, 裸鼠逐渐出现消瘦, 活动减少。

2. 磁流体热疗对移植瘤的抑制作用: 磁流体在低剂量组、中剂量组、高剂量组瘤体的平均温度分别为 41.3℃、44.5℃、46.8℃, 小鼠肛门温度在 30 ~ 34℃ 之间。热疗后第 21 天, 4 组的体积分别为: 对照组 $831.0 \pm 126.2 \text{ mm}^3$ 、低剂量组 $713.2 \pm 157.1 \text{ mm}^3$ 、中剂量组 $399.2 \pm 199.2 \text{ mm}^3$ 、高剂量组 $247.3 \pm 102.0 \text{ mm}^3$ 。低、中、高剂量组体积抑制率分别为 14.1%、51.9%、70.2%。方差分析组间差异显示, 与对照组比较, 中剂量组、高剂量组肿瘤生长明显缓慢, 差异有统计学意义 (P 均 < 0.05)。低剂量组的肿瘤体积与对照组比较无明显差异 ($P > 0.05$), 各组肿瘤体积增长趋势见图 1。

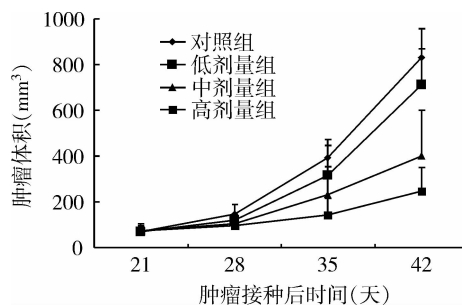


图 1 各组 A549 肺癌裸鼠移植瘤生长曲线

4 组的瘤体重量分别为: 对照组 $1.71 \pm 1.11 \text{ g}$, 低剂量组 $1.51 \pm 0.25 \text{ g}$, 中剂量组 $0.93 \pm 0.40 \text{ g}$, 高剂量组 $0.65 \pm 0.21 \text{ g}$, 低、中、高剂量组质量抑瘤率分别为 11.7%、45.6%、62.0%, 方差分析组间差异显示, 与对照组比较, 中剂量组、高剂量组肿瘤生长明显缓慢, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。低剂量组的肿瘤重量与对照组比较无明显差异 ($P > 0.05$) (表 1)。

表 1 不同剂量的磁流体热疗后对小鼠瘤
体体积和质量抑制作用

组别	肿瘤体积 (mm ³ , $\bar{x} \pm s$)	体积抑制率 (%)	肿瘤质量 (g, $\bar{x} \pm s$)	质量抑制率 (%)
对照组	831 ± 126.2	0.0	1.71 ± 1.11	0.0
低剂量组	713.2 ± 157.1	14.1 [☆]	1.51 ± 0.25	11.7 [☆]
中剂量组	399.2 ± 199.2	51.9 [△]	0.93 ± 0.40	45.6 [△]
高剂量组	247.3 ± 102.0	70.2 [△]	0.65 ± 0.21	62.0 [△]

△ 与对照组和低剂量组比较, $P < 0.05$; ☆ 与对照组比较, $P > 0.05$

3. 热疗后移植瘤的病理学观察:(1)大体观察:
磁流体热疗后,对照组的移植瘤体积进行性增长,瘤

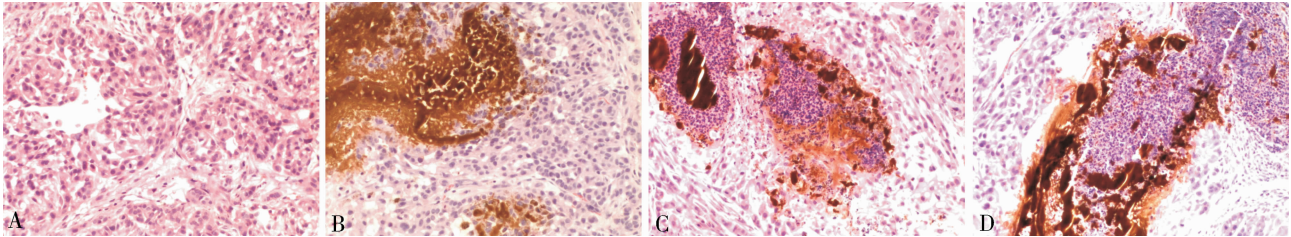


图 2 各组肿瘤在磁流体热疗后的光镜下表现(HE × 400)

A. 对照组 A549 肺癌细胞;B. 低剂量组 A549 肺癌细胞;C. 中剂量组 A549 肺癌细胞;D. 高剂量组 A549 肺癌细胞

4. 电镜观察:低剂量组肺癌细胞在热疗后与对照
组肺癌细胞比较无明显变化;中剂量组肺癌细胞出现
典型的凋亡样改变,表现为染色体边聚、胞质空泡化、

细胞核裂解;高剂量组肺癌细胞核呈现溶解,正常细
胞结构消失,呈坏死表现(图 3)。

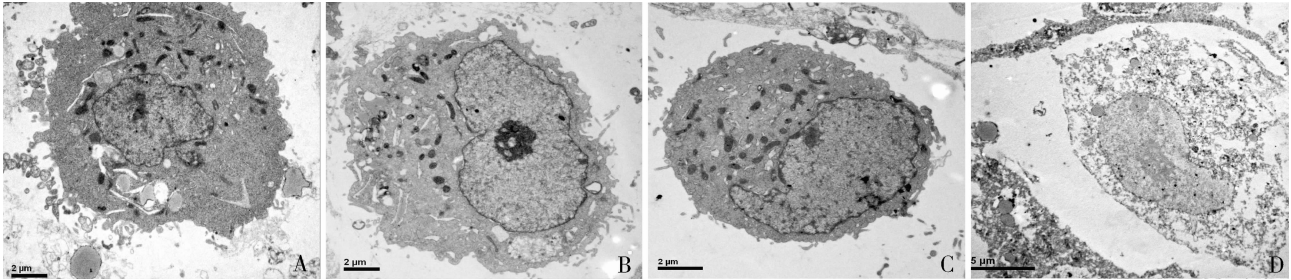


图 3 各组肺癌细胞磁流体热疗后的透射电镜观察

A. 对照组,正常的 A549 肺癌细胞(×8000);B. 低剂量组 A549 肺癌细胞(×8000);
C. 中剂量组 A549 肺癌细胞(×8000);D. 高剂量组 A549 肺癌细胞(×10000)

讨 论

肺癌是严重危害人民生命健康的常见疾病。其
发病率和病死率已居所有癌症之首^[1]。但由于大部
分患者发现已属晚期,手术效果差,传统的放化疗由
于不良反应大且价格昂贵,多数患者不能耐受。因
此,探索一种新的有效的治疗肺癌的方法成为我们工
作首要任务。近年来,以射频为主的传统的热疗方法
对肺癌的局部控制起到了良好的作用,但是射频加温
由于电场较发散,不能对肿瘤准确定位,导致脂肪过
热,因此靶向性差,应用比较局限^[2]。

磁流体热疗的一个优点就是高度靶向性和特异
性,我们将磁流体热疗对裸鼠肺癌移植瘤进行治疗实
验,结果证实磁流体在肿瘤内部可以升温至有效的治
疗温度,而小鼠肛门温度却稳定在 30 ~ 34℃ 之间,说
明周围正常组织没有明显的升温,初步实现了磁流体
热疗的靶向性。

研究证实,热疗的有效温度是 >42.0℃^[3]。Ivk-
ov 等^[4]报道当磁流体的温度升高至有效温度以后,
磁流体热疗对肿瘤的抑制效果与温度呈剂量 - 效果
依赖关系。我们将不同剂量的磁流体注射到瘤体内

部,结果发现,低剂量组的肿瘤内部温度升温至41.3℃左右,没有明显的抑瘤效果,而中、高剂量组的温度均升高至42.0℃以上,抑瘤效果明显,高剂量组的抑瘤效果较中剂量组明显($P < 0.05$)。与上述报道基本一致,证实了磁流体热疗的可操作性。

研究表明,热疗可以诱导肿瘤细胞凋亡,导致坏死,在42.0~46.0℃条件下,肿瘤细胞已凋亡为主,在46.0℃以上的条件下,高温可以直接导致肿瘤细胞坏死^[5]。我们通过光镜观察,中、高剂量组肿瘤细胞加热后大量出现凝固性坏死的征象,表现为嗜酸性增强,正常细胞结构消失,核碎裂、溶解;在坏死的一些区域偶可见出血灶,表现为坏死肿瘤细胞周围大量的红细胞分布,血管破裂;磁流体分布于凋亡和坏死的区域中。电镜观察中剂量组肿瘤细胞呈典型的凋亡样改变,表现为染色质边集、胞质空泡化、细胞核裂解,在高剂量组,细胞核呈现溶解,正常细胞结构消失,呈坏死表现。证实磁流体热疗可以诱导肺癌细胞凋亡,在高温时直接导致肺癌细胞坏死。

但磁流体热疗对肿瘤的具体作用机制目前还有争议,翟羽等^[6]研究发现,磁流体热疗后实验组肿瘤的细胞的凋亡无明显增加,诱导凋亡不是抑制移植瘤生长的主要原因,可能与研究的条件、肿瘤的属性等因素有关。

总之,我们的结果证实磁流体热疗对肺癌裸鼠移植瘤具有明显抑制作用,热疗后肺癌细胞呈现凋亡和坏死样改变,在有效温度范围的抑瘤效果与温度呈剂量-效果依赖关系。将为磁流体热疗在肺癌领域的进一步深入研究打下良好的基础。

参考文献

- 1 Parkin DM, Bray F, Ferlay J, *et al.* Global cancer statistics[J]. *Ca Cancer J Clin*, 2005, 55:74-108
- 2 Samanta B, Yan H, Fischer NO, *et al.* Protein-passivated Fe₃O₄ nanoparticles; low toxicity and rapid heating for thermal therapy[J]. *J Mater Chem*, 2008, 18(11): 1204-1208
- 3 Tseng HY, Lee GB, Lee CY, *et al.* Localised heating of tumours utilising injectable magnetic nanoparticles for hyperthermia cancer therapy[J]. *IET Nanobiotechnol*, 2009, 3(2): 46-54
- 4 Ivkov R, DeNardo SJ, Daum W, *et al.* Application of high amplitude alternating magnetic fields for heat induction of nanoparticles localized in cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(19 Pt 2): 7093-7103
- 5 Shellman YG, Howe WR, Miller LA, *et al.* Hyperthermia induces endoplasmic reticulum-mediated apoptosis in melanoma and non-melanoma skin cancer cells[J]. *J Invest Dermatol*, 2008, 128(4): 949-956
- 6 翟羽,谢弘,古宏晨. 葡聚糖磁流体热处理对小鼠 H22 移植瘤生长的影响及机制初探[J]. *肿瘤防治研究*, 2006, 33(3): 141-144

(收稿:2011-03-16)

(修回:2011-04-01)

动脉压力感受性反射对兔室性心律失常心外膜单相动作电位的影响

张洁 李想 黄涛 但家祥 袁琳佳

摘要 目的 探讨动脉压力感受性反射(ABR)对兔缺血性室性心律失常时心外膜单相动作电位(MAP)的影响。方法 采用闭胸记录兔心外膜 MAP 和心电图的技术,观察心肌缺血背景下致心律失常前后各组 MAP 参数的变化。结果 在去窦弓神经组($n=10$),与缺血前相比,心率(HR)减慢,心外膜振幅(MAPA)降低,0相最大上升速率(V_{max})减慢,MAPD₅₀和 MAPD₉₀缩短($P < 0.05$),与单纯缺血组($n=10$)相比,HR 加快,MAPA 增加($P < 0.05$),而 V_{max} 、MAPD₅₀和 MAPD₉₀无明显变化;在美托洛尔组($n=9$),用美托洛尔预处理后,与缺血前相比,HR 减慢、心外膜 MAPA 降低、 V_{max} 减慢($P < 0.05$),而 MAPD₅₀和 MAPD₉₀无明显变化;与单纯缺血组相比,心外膜 MAPA 增加、MAPD₅₀和 MAPD₉₀延长($P < 0.05$),而 HR 和 V_{max} 无明显变化。结论 ABR 可影响缺血性室性心律失常心外膜 MAP 改变程度,可能参与缺血性室性心律失常的发生发展过程。

关键词 动脉压力感受性反射 室性心律失常 心外膜 单相动作电位

基金项目:四川省教育厅课题(2006C050)

作者单位:610083 成都医学院生理学教研室(张洁、黄涛);临床医学系(李想、但家祥、袁琳佳)

通讯作者:张洁,电子信箱:zhangjiefa8888@126.com