

超低频脉冲磁场诱导癌细胞凋亡机理研究^{*}

张沪生 邓仁清

(武汉大学物理科学与技术学院 武汉 430072)

摘要: 我们研究超低频脉冲磁场(峰值 0.6~2.0T, 梯度 10~100T·m⁻¹, 脉冲宽度 20~200ms, 重复频率 0.16~1.34Hz) 作用于鼠 S-180 肉瘤。在电镜下观察到肉瘤细胞程序性死亡的许多特征。这一磁场引起约 1.5mv 的跨膜电位变化, 导致钙离子 Ca²⁺ 内流, 促使癌细胞凋亡。磁场对运动电荷的洛伦兹力使运动的带电粒子束缚在拉莫尔(Larmor)半径以内, 影响正负带电离子对细胞膜和核膜的渗透能力, 甚至在膜上形成空洞。

关键词: 磁场; 癌; 细胞凋亡; 膜电位; 洛伦兹力; 细胞膜和核膜上的空洞

Mechanism Studies on Ultralow Frequency Pulsed Magnetic Field Inducing Apoptosis of Cancer Cell

ZHANG Hu-sheng, DENG Ren-qing

College of Physics, Wuhan University, Wuhan 430072, China

ABSTRACT: We studied the effects of ultralow frequency pulsed magnetic field (with maximum intensity of 0.6~2.0T, gradient of 10~100 T·m⁻¹, pulse width of 20~200 ms and frequency of 0.16~1.34 Hz) on S-180 sarcomas in mice. With a electron microscope, we found the programmed cell death (PCD) of the sarcoma cells. We consider the mechanism is that the pulsed magnetic field causes the change of the cellular membrane potentials, then causes the calcium-ion influxing, so leads to the programmed cell death. By Lorentz force the magnetic field keeps the moving ions within bounds of Larmor radius. Thus, penetrating capability of the positive and negative ions through the cellular and nuclear membrane was affected, even the role on cellular and nuclear membrane formed.

Key words: magnetic field; cancer; cell apoptosis; membrane potentials; Lorentz force; role on cellular and nuclear membrane

不同类型磁场的生物效应在多种生物系统上曾经研究过, 磁场影响肿瘤生长的报道较多^[1-9]。有人报导在功率输电线附近居民死于白血病的比例较高^[7,8], 此输电线周围变化的电磁场频率为 30~50Hz。如果脉冲磁场的变化频率接近人的生理频率(约 1Hz)或是静磁场, 则这样的磁场抑制和治疗癌。两者频率范围不同, 导致它们的生物效应截然相反。常汉英等用峰值 0.8T、脉宽 22ms、频率 1Hz 的脉冲磁场抑制鼠 S-180 肉瘤^[9], 并用上述脉冲磁场治疗中晚期癌症患者 18 例, 其中显效 9 例, 有效 9 例^[10], 瑞典医生 Wollin 从 1987 年起用 Nd-Fe-B 永磁体(表面磁场 0.4T)治疗 50 名瑞典和美国癌症患者均有效^[11], 我们报道了用电镜观测超低频脉冲磁场不仅抑制鼠 S-180 肉瘤生长, 而且能提高免疫细胞的功能, 加强免疫细胞的溶癌作用^[12,13]。我们还用上述磁场在广州军区武汉总医院肿瘤科治疗中晚期癌症者 6 例, 其中显效 4 例, 有效 2 例^[14]。

细胞凋亡是受遗传控制的细胞程序性死亡。不正常凋亡, 可使旺盛分裂的幼稚细胞堆积, 引起肿瘤的发生。而肿瘤细胞的凋亡又会抑制肿瘤的生长, 所以近来引起人们对细胞凋亡研究的兴趣^[15,16]。我们首次报道磁场诱导癌细胞凋亡和

抑制鼠恶性肿瘤生长^[17~19]。

本文深入探讨超低频脉冲磁场诱导癌细胞凋亡的机理: 磁场引起细胞跨膜电位变化, 导致 Ca²⁺ 内流, 促使细胞凋亡; 磁场对运动带电粒子的洛伦兹力, 将离子束缚在拉莫尔(Larmor)半径以内, 影响离子对细胞膜和核膜的渗透能力。

1 材料与方法

1.1 小白鼠的脉冲梯度磁场处理

取年龄(2个月)和体重(36~40g)相近的昆明小白鼠 24 只, 雌雄不限, 随机分成 2 组, 1~12 号鼠为治疗组, 13~24 号鼠为对照组, 用 S-180 肉瘤细胞腹水液对 24 只白鼠接种, 皮下注射到鼠右前肢下方, 4~5d 以后有瘤长出。将治疗组置于自行设计的脉冲梯度磁场发生器的磁头上。其参数值: 峰值磁场 0.6~2.0T, 磁场梯度 10~100T·m⁻¹, 脉冲宽度 20~200ms, 重复频率 0.16~1.34Hz。每天对治疗组白鼠治疗 1 次, 每次 15min, 对照组白鼠不给治疗。28d 以后将小白鼠都拉断颈椎处死, 取出肉瘤, 称瘤重, 取瘤组织, 制备样品, 用光镜和电子显微镜观察。

1.2 光学显微镜制样和观察

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 39870823)

(收稿日期: 2006-01-27 接受日期: 2006-02-23)

取 1cm^3 左右鼠肉瘤组织, 10% 福尔马林室温固定, 酒精梯度脱水, 二甲苯透明, 60°C 温箱中浸蜡, 室温下石蜡包埋, 切片厚度为 $3\sim 4\mu\text{m}$, HE 染色, 光镜观察的高倍为 300 倍, 低倍为 100 倍。

1.3 透射电镜制样和观察

取肉瘤组织约 1mm^3 , 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 50nm , 醋酸铀、柠檬酸铅双染色。用日产 HU-11A 型透射电镜观察, 加速电压 50kV 。

2 实验结果

2.1 瘤重统计结果和肉眼观察

实验两周后对照组鼠平均体重下降, 表明对照组鼠身体状况劣于磁疗组。4 周后有统计学差异: 磁疗组鼠平均体重为 $(42.30 \pm 4.92)\text{g}$, 对照组为 $(38.20 \pm 3.57)\text{g}$ ($P < 0.05$)。另一方面, 磁疗组瘤重 $(0.51 \pm 0.13)\text{g}$, 明显小于对照组瘤重 $(2.48 \pm 0.64)\text{g}$ ($P < 0.01$)。治疗组的瘤体较小, 较硬, 易剥离, 可见表面有粘膜包裹, 与周围组织分界清楚, 横切面呈灰红色, 对照组的瘤体较大, 较软, 离散呈菜花状, 难剥离, 与邻近正常组织连接紧密, 未见明显包膜, 横切面呈灰红色。

2.2 光镜和透射电镜的观察结果

在光镜下看到磁疗组肉瘤细胞核分裂相较少, 而对照组核分裂相较多。在透射电镜下观察到磁疗组许多癌细胞出现细胞程序性死亡的特征: 异染色质浓缩并凝结成块, 沿核膜内侧排列, 出现“核着边”现象; 内质网池状水肿; 有许多被完整细胞膜包裹的凋亡小体, 内含一些核糖体、细胞器及核物质; 凋亡小体被附近一些淋巴细胞、巨噬细胞吞噬。另外, 一些并未凋亡的肉瘤细胞中可见线粒体肿大, 内质网水肿; 肉瘤内微血管中红细胞变形、萎缩。对照组鼠肉瘤细胞内结构正常, 内质网丰富和分化完全^[17]。

在透射电镜下我们还观察到细胞膜和核膜上形成空洞, 空洞的线度大约 $1.5 \times 10^2\text{nm}$ 。

3 机理研究

3.1 研究表明, 细胞膜厚度为 $5\sim 10\text{nm}$, 为了维持细胞的正常生理功能, 大约有 70mV 的自然静息膜电位, 线粒体膜上也有 $50\sim 80\text{mV}$ 的静膜息电位。我们所用脉冲磁场峰值为 $0.6\sim 2\text{T}$, 脉冲宽度为 $20\sim 200\text{ms}$, $0\sim 10\text{Hz}$ 的频段能量占总能量的 90%。根据文献^[20]的计算模型, 磁场作用产生的跨膜电位为:

$$\Delta U = -\frac{j\omega B_0 CD}{2} \sin\theta \cdot \cos\phi \cdot \frac{3S_0 S_2}{S_1(2S_0 + S_2)}$$

其中 C 为细胞距磁场中心的距离 (cm), D 为膜厚度 (nm), S_0, S_1, S_2 分别为细胞外, 细胞膜, 细胞内的复电导率, 在低频近

似下

$$3S_0 S_2 / S_1(2S_0 + S_2) = 1.83 \times 10^5,$$

当取, $\sin\theta \cdot \cos\phi = 1$, $B = 1\text{T}$, $C = 5\text{cm}$, $D = 10\text{nm}$, $f = 5\text{Hz}$, $\omega = 2\pi f$ 时, 膜内诱发电场达到 $1.5 \times 10^5\text{V/m}$, 即有 1.5mV 的跨膜电位变化, 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^[1]。细胞外的 Ca^{2+} 浓度高出细胞为 Ca^{2+} 浓度约 1000 倍, 线粒体内 Ca^{2+} 浓度高出细胞质内 Ca^{2+} 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内 Ca^{2+} 的内流和引起线粒体 Ca^{2+} 的外流。而 Ca^{2+} 浓度是细胞内信号系统中重要的信号, 其中死亡程序的启动就依赖于 Ca^{2+} 的内流。导致细胞程序性死亡的 DNA 内切酶就有一部分可由 Ca^{2+} 直接活化, 或者依赖于 Ca^{2+} 参与合成。

文献^[22]中报道了关于线粒体膜蛋白 bcl-2 抑制程序死亡的机制, 推测 bcl-2 可稳定膜电位, 防止线粒体中 Ca^{2+} 的外流, 从而抑制细胞凋亡。细胞凋亡程序是否启动取决于由凋亡基因构成的两把“铡刀”: 一个是 bcl-2/Bax ; 另一个是 ICH-1(L)/ICH-1(S) 。在这两个控制点 Checkpoint 上, 又有很多相关基因对其进行正反两方面调节。凋亡基因正是某些病毒攻击的靶, 如腺病毒 E1B19K 蛋白、EB 病毒 BHRF1 蛋白可失活 Bax, 并模拟 bcl-2 的功能使之过度表达, 使感染细胞逃脱死亡的命运进一步转化。

我们认为脉冲磁场引起跨膜电位的变化, 导致细胞质内 Ca^{2+} 浓度升高, 激活 DNA 内切酶, 使逃离细胞凋亡程序的和本身有基因缺陷的癌细胞凋亡。

用 Faulgen 染色法测定鼠肉瘤细胞核 DNA 倍性, 对照组为近 8 倍体, 磁疗组为超 2 倍体^[13]。这说明磁场可以抑制肉瘤细胞核 DNA 复制, 从而抑制肉瘤细胞的恶性增殖。我们推测脉冲磁场引起 Ca^{2+} 的内流, 替代了被攻击的死亡基因的某种功能, 从而使断缺的死亡程序链条重新运行, 使本身有基因缺陷的肉瘤细胞凋亡。

正常细胞由于程序性死亡基因完备, 可实行正反调控, 另外正常细胞本身没有 DNA 损伤, 染色体缺失, 所以能顺利通过控制点而分裂增殖, 相对受脉冲磁场影响较小。

3.2 磁场对运动电荷的洛伦兹力使运动的带电粒子束缚在拉莫尔(Larmor)半径以内, 影响正负带电离子对细胞膜和核膜的渗透能力, 从而抑制癌细胞的代谢和生长, 甚至在细胞膜和核膜上形成空洞, 空洞的线度约 $1.5 \times 10^2\text{nm}$, 空洞附近膜内外在交换物质。

脉冲磁场抑制恶性肿瘤的进一步实验和机理探讨正在进行中。用脉冲磁场诱导癌细胞凋亡和抑制恶性肿瘤将为研究癌症治疗和死亡基因提供一条崭新的途径。

(下转第 4 页)

能紊乱。从分析中可知,产生的振荡力的幅值与磁场的频率无关,但与电场的频率有关联。

细胞膜的两侧存在自由离子,如 K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , 等等。离子对细胞膜的稳定性,细胞的动态平衡,以及生物体的转换过程起着许多重要的作用^[12, 13]。促使离子进出细胞的动力可以归结为细胞膜内外的浓度和电位差。当磁场穿透细胞膜时,必定对膜内外的每个离子以及正在经过通道蛋白的离子产生作用力^[12]。

本文的实验效果可能是由于交变磁场、磁场感应的电场与离子交互作用的结果。各种场产生的力作用于运动的离子以及束缚着活性离子的通道蛋白,影响通道的开闭状态。这些改变都和细胞膜的通透性直接有关。 Na^+ 、 K^+ 通道的开启导致离子从细胞内流出,引起细胞外离子浓度的升高。本课题组最近发表的一篇文章阐明了磁场对骨髓间充质干细胞离子的作用^[14]。更多的理论和实验研究将有助于我们更进一步理解电磁场和细胞相互作用的机理。

Reference:

- [1] Levin. M. Bioelectromagnetics in Morphogenesis[J]. Bioelectromagnetics, 2003, 24:295- 315
- [2] Berg, H. Problems of weak electromagnetic field effects in cell biology [J]. Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 1999, 48: 355- 360
- [3] Sinko, M. and M. O. Mattsson, Extremely low frequency electromagnetic fields as effectors of cellular responses in vitro: Possible immune cell activation[J]. J. Cell. Biochem, 2004, 93(1): 83- 92
- [4] 董良, 黄玲珍, 陈彦田, 等. 极低频磁场对人肝癌细胞生长、代谢及细胞周期的影响[J]. 生物磁学, 2005, 5(3): 1- 6
- [5] 张沪生, 邓仁清, 刘庆华. 试论磁场治疗恶性肿瘤中的三对矛盾: 凋亡与增殖免疫与肿瘤, 阻塞与供给[J]. 生物磁学, 2005, 5(4): 14- 16
- [6] Koch, C. L. M. B., M. Sommarin, and B. R. R. Persson, Interaction between Weak Low Frequency Magnetic Fields and Cell Membranes[J]. Bioelectromagnetics, 2003, 24: 395- 402
- [7] Schinmelfeng, J. and H. Dertinger. The action of 50 Hz magnetic and electric fields upon cell proliferation and cyclic AMP content of cultured mammalian cells[J]. Bioelectrochem Bioenerg, 1993, 30: 143- 150
- [8] Binhi, V. N. and A. V. Savin, Molecular gyroscopes and biological effects of weak extremely low - frequency magnetic fields[J]. Physical Review E, 2002, 65:051912
- [9] Barnes, M. Z. a. F, Frequency and Amplitude Windows in the Combined Action of DC and Low Frequency AC Magnetic Fields on Ion Thermal Motion in a Macromolecule [J]. Theoretical Analysis Biobioelectromagnetics, 2005, 26:323- 330
- [10] Liboff, A. R. Geomagnetic cyclotron resonance in membrane transport [J]. J Biol Phys, 1985, 13: 99- 102
- [11] Liboff, A. and B. McLeod, Kinetics of channelized membrane ions in magnetic fields[J]. Bioelectromagnetics, 1988, 9: 39- 51
- [12] Panagopoulos, D. J., A. Karabounis, and L. H. Margaritis, Mechanism for action of electromagnetic fields on cells[J]. Biochemical And Biophysical Research Communications, 2002, 298(1): 95- 102
- [13] Adair, R. A physical analysis of the ion parametric resonance model [J]. Bioelectromagnetics, 1998, 19: 181- 191
- [14] Huang, L, L Dong, etc. Effects of Oscillating Magnetic Field on Cells: Theoretical Analysis and Experiments [J]. WSEAS TRANS. on COMMUNICATIONS and SYSTEMS, 2006, 5: 46- 52

(上接第 14 页)

参考文献

- [1] 李国栋, 周万松, 郭立文等. 生物磁学——应用、技术、原理[J]. 北京: 国防工业出版社, 1993
- [2] Stuchly M A. Electromagnetics in biology and medicine[J]. Radio Science, 1995, 30(1): 471~ 522
- [3] 张小云, 刘栋, 张裕恒等. 磁场对细胞生长分裂的影响及其机制的探讨[J]. 中国科学(B 辑), 1989, (2): 164
- [4] Mulay I L, Mulay L N. Effects of a magnetic field on sarcoma 37 ascites tumor cells[J]. Nature, 1961
- [5] 杨逢瑜. 磁场对肿瘤细胞的抑制作用[J]. 生物磁学, 2004, 4(1): 1~ 4
- [6] 周万松. 磁场生物效应的研究进展. 生物磁学, 2003, 3(1): 6~ 9
- [7] Poole C. Extremely low frequency electric and magnetic fields and cancer [J]. Cancer Causes Control, 1991, 2: 267~ 270
- [8] 陈家森. 电磁场与生命体[J]. 生物磁学, 2004, 4(2): 33~ 35
- [9] 常汉英, 李桂兰, 潘玉明等. 磁场对鼠 S- 180 肉瘤影响的实验观察. 中华物理医学杂志, 1985, 3: 169- 170
- [10] 常汉英, 李桂兰, 汪国珠. 磁场疗法治疗恶性肿瘤 18 例初步报告. 见: 生物医学物理研究[M]. 武汉: 武汉大学出版社, 1990: 74~ 75
- [11] 周万松. 磁场治疗肿瘤的应用进展[J]. 生物磁学, 1994, 8(2): 1~ 6
- [12] Zhang H S, Ye H, Zhang Q C. SEM and TEM observations on inhibitory effect of ultralow frequency pulse magnetic field on mice's S- 180 Sarcomas[J]. Chinese Science Bulletin, 1995, 40(6): 512~ 516
- [13] Zhang H S, Ye H, Zhang Q Q. Experiment studies on extremely low frequency pulsed magnetic field inhibiting sarcoma and enhancing cellular immune functions[J]. Science in China, Ser. C, 1997, 40(4): 392~ 397
- [14] 张沪生, 金祥瑞, 叶晖等. 超低频脉冲磁场抑制动物和人体内癌细胞. 见: 生物磁学研究与应用[M]. 北京: 原子能出版社, 1994: 18- 21
- [15] Fang M, Zhang H Q, Xue S B. Role of calcium in apoptosis of HL- 60 cells induced by haring tonine[J]. Science in China, Ser. C, 1998, 41(6): 600~ 607
- [16] Silva C P, Oliveira CR, Lima MCP. Apoptosis as a mechanism of cell death induced by different chemotherapeutic drugs in human leukemic T lymphocytes[J]. Biochem Pharmacol, 1996, 51: 1331~ 1340
- [17] 曾繁清, 郑从义, 张新晨, 等. 超低频脉冲梯度磁场诱导癌细胞凋亡和抑制癌细胞生长实验研究[J]. 中国科学(C 辑), 2001, 31(5): 453~ 457
- [18] 张沪生. 超低频脉冲梯度磁场诱导癌细胞凋亡[J]. 生物磁学, 2004, 4(1): 14- 15
- [19] 张沪生. 一定参数的磁场在不同生物层次上抑制恶性肿瘤生长[J]. 生物磁学, 2004, 4(2): 1- 4
- [20] 叶晖, 林家瑞, 叶琴. 低频磁场对细胞膜离子通道状态的影响[J]. 武汉大学学报(自然科学版), 1997, 42(6): 217~ 222
- [21] Charles A C. Biological effects of oscillating electric fields: Role of voltage- sensitive ion channels[J]. Bioelectromagnetics, 1981, 2: 23
- [22] Korsmeyer S J, Oliva Z N. Checkpoint of dueling dimmers foli death wishes[J]. Cell, 1994, 79: 189~ 192