

·基础研究·

不同强度的静磁场对 K562 细胞的作用

宋国丽¹ 苏海静¹ 张小云^{1,2}

摘要 目的:研究不同强度的静磁场对体外培养的 K562 细胞的作用,探讨静磁场在恶性肿瘤治疗中的应用价值。**方法:**不同强度的磁场作用后,细胞计数、MTT 法检测细胞生长增殖状态;瑞氏染色观察细胞形态变化;透射电镜观察磁场对细胞超微结构的影响;硝基四氮唑蓝还原实验检测细胞功能分化状况;流式细胞仪检测细胞周期和细胞表面抗原 CD11b、CD14、CD71 的变化;RT-PCR 检测原癌基因 c-myc 表达。**结果:**静磁场能够抑制 K562 细胞增殖,高强度静磁场效应强于低强度静磁场;在静磁场作用下,细胞出现胞体缩小,核固缩,核质比下降等分化特征;同时细胞的 NBT 还原能力增强;磁场处理后,细胞表面 CD11b、CD14 的表达无明显变化($P>0.05$),而 CD71 的表达增强($P<0.05$),细胞周期阻断于 G2/M 期;电镜图片显示,磁场作用后细胞细胞质浓缩,次级溶酶体数量增多,线粒体嵴出现断裂,核内染色质凝集成块。RT-PCR 结果显示原癌基因 c-myc 的表达显著降低。**结论:**静磁场能够抑制 K562 细胞的增殖,诱导 K562 细胞分化,抑制原癌基因表达,破坏 K562 细胞膜结构。

关键词 静磁场;白血病细胞;增殖;分化

中图分类号:R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2009)-03-0204-04

Effects of static magnetic fields of different intensities on K562 leukemia cells/SONG Guoli, SU Haijing, ZHANG Xiaoyun//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2009, 24(3): 204—207

Abstract Objective: To investigate the effects of static magnetic fields of different intensities on K562 leukemia cells, elucidate the potential application value of static magnetic field in cancer treatment. **Method:** K562 cells were exposed to static magnetic fields of different intensities. Cells proliferation were analyzed by cell count and methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. Changes of cell morphology and ultrastructure were detected under light microscopy and transmission electron microscopy(TEM). Nitroblue tetrazolium(NBT)-reducing test was used to assess leukemia cell differentiation. Cell cycle distribution and expression of cell membrane surface differentiation-related antigens (such as CD11b, CD14 and CD71) were determined by flow-cytometry. RT-PCR was used to evaluate expression of protooncogene c-myc. **Result:** Static magnetic field could inhibit the proliferation of K562 cells, the effect of magnetic field of higher intensity was more obvious than that of lower one. Static magnetic field could induce K562 cell differentiation, leading to nuclear condensation and nuclear-cytoplasm ratio descending. The NBT-reducing ability of K562 cells ascended in the groups exposed to static magnetic field. In addition, after treated with magnetic field, cell ratio of S phase increased, cell cycle arrested in G2/M phase, while the expressions of CD11b and CD14 did not obviously change ($P>0.05$) and expressions of CD71 increased significantly ($P<0.05$). Moreover, K562 cells treated with magnetic field presented protoplasm concentration, secondary lysosome increasing, mitochondrial cristae broken and chromatic agglutination. Expression of c-myc evidently decreased in magnetic field. **Conclusion:** Static magnetic field could inhibit proliferation of K562 cells, induce differentiation of K562 cells, inhibit the expression of protooncogene c-myc and destroy the membrane structure of K562 cell.

Author's address College of Life Science, Shenzhen University, Shenzhen, 518060

Key words static magnetic field; leukemia cell; proliferation; differentiation

随着磁生物学效应研究的开展,人们已经把目光投向了磁场对肿瘤的生物学效应,特别是对肿瘤的抑制效应。本实验以体外培养的人白血病细胞株 K562 作为细胞模型,采用不同强度的静磁场处理 K562 细胞,研究静磁场对其增殖、分化、细胞周期、凋亡以及基因表达的影响,采用多种指标检测其在磁场作用下的变化,探讨磁场对白血病细胞的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株:人白血病细胞株 K562 细胞,由深圳大学生命科学学院实验室保存。

1.1.2 磁场:由稀土磁钢制成的方形永磁体,经高斯计测定实验组所处磁场强度分别为 0.25T、0.3T。

1 深圳大学生命科学学院,深圳,518060

2 通讯作者

作者简介:宋国丽,女,博士,副教授

收稿日期:2008-06-18

1.1.3 药品和试剂: RPMI-1640 培养基, 新生牛血清, MTT, NBT 及 FITC, PE 标记的流式抗体购自 BD 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: K562 细胞培养于含 10% 新生牛血清的 RPMI-1640 培养液中, 置于 37℃, 5% CO₂, 饱和湿度的培养箱中培养。

1.2.2 磁场处理: 强度为 0.25T 和 0.3T 的磁体消毒后, 置于 37℃, 5% CO₂, 饱和湿度的细胞培养箱中, 细胞培养于 96 孔或 24 孔的细胞培养板中, 培养板置于永磁体上暴磁处理。

1.2.3 细胞生长曲线的测定: 取对数生长期 K562 细胞, 5×10⁴ 个细胞/ml 接种于 96 孔细胞培养板中, 每孔 0.1ml 细胞悬液, 37℃, 5% CO₂, 饱和湿度培养, 分别于第 24、48、72、96、120、144、168 小时取样, 胎盼蓝染色, 血细胞计数板计数。

1.2.4 MTT 检测细胞活力: 静磁场作用 168h 后 96 孔细胞培养板的各组细胞悬液, 每孔加入 20μl MTT (5mg/ml) 溶液, 避光培养 4h, 2000 r/min 离心 10min, 弃上清, 每孔加入 150μl 二甲基亚砷 (DMSO), 震荡 5min, 酶标仪检测 570nm 处光吸收值(A)。按以下公式计算细胞抑制率:

$$\text{抑制率}(\%) = (1 - \text{实验孔 A 值} / \text{对照孔 A 值}) \times 100\%$$

1.2.5 瑞氏染色观察: 收集磁场作用 48h、96h、144h 的细胞, PBS 调整细胞浓度为 1×10⁵ 个细胞/ml, 离心涂片, 自然干燥, 瑞氏染色, 光镜下观察细胞形态变化。

1.2.6 硝基四氮唑蓝 (NBT) 还原实验: 磁场作用 48h、96h、144h 后, 每孔加入 0.5ml 0.1% 的 NBT 溶液, 避光培养 1h, 收集细胞并分为两份;

①PBS 调整细胞浓度为 1×10⁵ 个细胞/ml, 离心涂片, 瑞氏染色, 观察, 胞浆内含蓝黑色颗粒的为阳性细胞。油镜下计数 200 个细胞, 计算阳性细胞的百分率, 测定中性粒细胞活性氧产生的能力。②分光光度计测光吸收值: 收集细胞离心去上清, PBS 重悬, 分光光度计测 570nm 处的光吸收值。

1.2.7 流式细胞仪检测细胞表面分化抗原的变化: 磁场分别作用 48h 后, 收集细胞悬液, 1500r/min 离心 5min, 去上清, PBS 洗涤 2 次, 吸尽上清, 用 0.3ml PBS 重悬, 加入特异性荧光标记抗体, 4℃避光染色 30min, PBS 洗涤后流式细胞仪检测。

1.2.8 流式细胞仪分析细胞周期: 收集待测细胞悬液, 1500r/min 离心 5min, 去上清, PBS 洗两次, 加入 0.5ml PI(33μg/ml)染液, 重悬, 4℃避光染色 30min。检测细胞周期变化。

1.2.9 RT-PCR 检测 c-myc 基因表达: 提取细胞总 RNA, c-myc 引物由上海生工合成。序列如下:

上游引物: 5'-3' ATC ACA GCC CTC ACT CAC; 下游引物: 5'-3' ACA GAT TCC ACA AGG TGC。产物长度: 682bp。管家基因 B-actin(621bp)作为内参。

反应条件: 94℃变性 1min, 55℃退火 2min, 72℃延伸 1.5min, 共 35 次循环。

1.3 统计学分析

各实验均重复 3 次以上, 实验结果均以均数±标准差表示, SPSS10.0 软件分析各组数据。

2 结果

2.1 细胞生长曲线测定

见表 1, K562 细胞在磁场作用下, 生长受到抑制, 细胞活力下降。

2.2 MTT 检测细胞活力

见表 2, 磁场处理 168h 后, 用 MTT 法检测细胞活力, 0.25T 磁场组, 0.3T 磁场组与对照组相比均有显著差异 ($P < 0.05$), 对细胞增殖的抑制率分别为 30.3% 和 36.7%, 这与细胞计数检测结果一致。

2.3 形态学观察

曝磁处理 48h 后, 细胞体积缩小, 核固缩, 包膜突起, 核型发生变化。曝磁处理 96h 后, 大部分细胞向成熟分化, 胞体变小, 核质比下降, 核染色质变粗, 核仁消失 (图 1)。

2.4 电镜观察

见图 2。

2.5 NBT 还原实验

见表 3, 磁场作用 48h 后, 各实验组 NBT 阳性细胞率有所增加, 但差异不明显 ($P > 0.05$); 作用 96h 后 0.25T、0.3T 组的阳性细胞率与对照组相比差异有显著意义 ($P < 0.05$); 作用 144h 后 0.25T、0.3T 组的

表 1 不同强度的磁场对 K562 细胞生长曲线的影响 ($\bar{x} \pm s$)

时间	对照组	0.25T 组	0.3T 组
第 1 天	17.00±2.65	11.33±2.08 ^①	9.67±2.08 ^①
第 2 天	26.00±1.00	22.33±5.03	20.67±2.52 ^①
第 3 天	52.33±4.73	44.33±9.02	43.00±5.29 ^①
第 4 天	98.50±13.23	65.67±15.63 ^①	53.00±5.57 ^①
第 5 天	108.00±17.44	87.33±13.58 ^①	79.33±6.03
第 6 天	99.33±5.86	87.00±12.28	80.67±5.51 ^①
第 7 天	94.33±4.72	83.67±5.03	81.67±9.50

① $P < 0.05$

表 2 磁场作用 168h 后 MTT 法检测 K562 细胞增殖活力 ($\bar{x} \pm s$)

组别	OD 值	抑制率 (%)
对照组	0.624±0.034	—
0.25T 组	0.434±0.057 ^①	30.3±1.32
0.3T 组	0.397±0.047 ^①	36.7±0.96

① $P < 0.05$

阳性细胞率与对照组相比差异有极显著意义 ($P<0.01$)。144h 光吸收值(OD)检测结果基本一致。对照组 OD 值为 0.29 ± 0.010 , 0.25T 组 OD 值为 0.52 ± 0.026 (与对照组比 $P<0.01$), 0.3 T 组 OD 值为 0.50 ± 0.026 (与对照组比 $P<0.01$)。

2.6 磁场对 K562 细胞周期的影响

在磁场作用下, G0/G1 期的细胞比例分别由对照组的 60.2% 减少到 50.8% 和 48.9%, G2/M 期细胞由 13% 增加到 21.6% 和 17.4%(表 4)。

2.7 磁场对表面分化抗原的影响

在不同强度的磁场作用下, K562 细胞表面分化抗原 CD11b、CD14 无明显变化, 而 CD71 表达阳性率达到 99% 以上, 但其表达平均荧光强度明显增

强, 0.25T 磁场的效应更为明显(表 5)。

2.8 磁场对 c-myc 基因表达的影响

由图 3 可以看出, 0.25T、0.3T 磁场作用 144h 后, 原癌基因 c-myc 表达明显受到抑制。

表 3 磁场作用后对细胞 NBT 阳性细胞率的影响 ($\bar{x}\pm s$)

时间(h)	对照组(%)	0.25T 组(%)	0.3T 组(%)
48	13.00 $\pm$ 1.80	16.00 $\pm$ 2.00	16.50 $\pm$ 1.32
96	14.00 $\pm$ 1.32	23.50 $\pm$ 2.78 ^①	37.00 $\pm$ 4.58 ^②
144	14.50 $\pm$ 1.32	44.00 $\pm$ 4.36 ^②	53.50 $\pm$ 3.50 ^②

与 48 h 比: ① $P<0.05$, ② $P<0.01$

表 4 磁场作用 48h 对细胞周期的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	凋亡	G0/G1	S	G2/M
对照组	6.90 $\pm$ 3.40	60.20 $\pm$ 2.80	17.30 $\pm$ 1.50	13.00 $\pm$ 1.80
0.25T 组	7.10 $\pm$ 3.50	50.80 $\pm$ 4.70 ^①	18.50 $\pm$ 1.80	21.60 $\pm$ 4.20 ^②
0.3T 组	11.30 $\pm$ 7.00	48.90 $\pm$ 4.60 ^②	18.90 $\pm$ 1.90	17.40 $\pm$ 4.40 ^①

① $P<0.05$, ② $P<0.01$

表 5 磁场作用 48h 细胞表面分化抗原变化

($\bar{x}\pm s$)

组别	CD11b		CD14		CD71	
	阳性细胞率(%)	平均荧光强度	阳性细胞率(%)	平均荧光强度	阳性细胞率(%)	平均荧光强度
对照组	1.14 $\pm$ 0.15	5.98 $\pm$ 0.21	1.66 $\pm$ 0.14	5.87 $\pm$ 0.33	99.2 $\pm$ 1.6	6.45 $\pm$ 0.4
0.25T 组	1.14 $\pm$ 0.23	6.12 $\pm$ 0.32	1.72 $\pm$ 0.16	5.95 $\pm$ 0.29	99.4 $\pm$ 1.9	10.7 $\pm$ 0.65 ^②
0.3T 组	1.36 $\pm$ 0.17	6.04 $\pm$ 0.24	2.07 $\pm$ 0.19	6.02 $\pm$ 0.35	99.7 $\pm$ 2.3	7.92 $\pm$ 0.53 ^①

① $P<0.05$, ② $P<0.01$



对照组



0.25T 磁场组



0.3T 磁场组

图 1 不同强度的静磁场作用后细胞形态的变化

($\times 400$)



对照组



磁场处理组

图 2 0.3T 磁场处理 72h 后的 K562 细胞超微结构的变化

($\times 3900$)

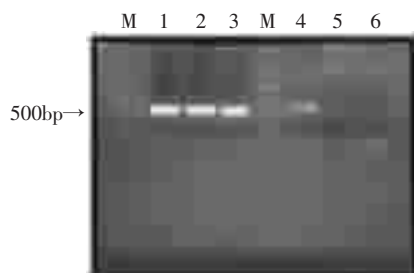


图 3 磁场作用 144 h RT-PCR 检测 c-myc 表达

1. 对照组 B-actin(621bp); 2. 0.25T 组 B-actin(621bp); 3. 0.3T 组 B-actin(621bp); 4. 对照组 c-myc(682 bp); 5. 0.25T 组 c-myc(682 bp); 6. 0.3T 组 c-myc(682 bp)

3 讨论

磁疗有着悠久的历史, 但磁场对细胞生物效应的具体机制至今仍没有定论。张小云等^[1-2]发现 0.4T 旋转磁场处理可使细胞的微管解聚, 促进骨髓基质细胞向成骨细胞方向分化, 促进成骨细胞增殖, 并且抑制破骨细胞生长; 陈文芳等^[3-4]发现磁场不仅可以抑制 K562 细胞增殖, 还可以协同环磷酰胺杀伤细胞。Raylman^[5]也证实了强静磁场通过延缓细胞由 S 期进入 G2 期而抑制体外培养的肿瘤细胞的生长。季百苗^[6-7]等发现旋转磁场可以促进正常造血细胞的分裂, 促进放疗化疗损伤小鼠造血系统的恢复。磁场的生物效应是磁场与细胞相互作用的结果, 与两者的参数以及作用方式密切相关。

静磁场是一种“温和”的物理作用因子。对细胞中的带电物质的运动产生作用, 使胞内的极性大分子(如蛋白质)的定向运动发生偏转; 使周期运行受阻, 增殖缓慢。MTT 检测结果也表明了静磁场能抑制 K562 细胞增殖, 这种增殖抑制作用随着磁场强

度的增大而增强。Sabo^[8]也报道, HL-60 细胞在 1T 静磁场处理 72h 后, 代谢活力发生了下降。

瑞氏染色进行 K562 的细胞学形态观察发现, 曝磁处理 48h 后, 细胞体积缩小, 核固缩, 包膜突起, 核型发生变化。曝磁处理 96h 后, 大部分细胞向成熟分化, 胞体变小, 核质比下降, 核染色质变粗, 核仁消失。同时曝磁处理后细胞 NBT 还原能力增强, 说明静磁场对 K562 细胞有诱导分化的作用。这种诱导分化作用将随着曝磁时间的延长而增强。经磁场处理后检测细胞表面抗原 CD11、CD14 的表达差异无显著意义; CD71 的平均荧光强度显著增加, 这些情况说明磁场可能诱导白血病细胞向红系分化。c-myc 基因在许多肿瘤的发生、发展过程中起着重要作用, 它主要通过对靶基因的转录调控发挥作用^[10-11]。细胞恶性转化及增殖往往与 c-myc 的高表达相关, 王方金^[12]应用 siRNA 抑制 K562 细胞 c-myc 基因的表达使细胞的增殖活性降低; 陈龙等^[13]也通过重组反义核酸降低 c-myc 基因表达使细胞增殖受到抑制并诱导肿瘤细胞凋亡。本实验发现磁场可以降低 c-myc 基因的表达, 提示磁场诱导 K562 细胞分化可能是通过调节 c-myc 基因的表达来实现。

流式细胞仪分析经不同强度磁场处理 48h 后 K562 细胞的周期变化。发现实验组与对照组相比较, G0/G1 细胞减少, S 期细胞增多, 阻断于 G2/M 期, 与 Raylman^[4]的研究有类似的现象。S 期是 DNA 合成期, DNA 复制完成以后, 细胞就进入 G2/M 期。这两个时期细胞内部有大量的新物质合成, 定向转运, 静磁场的特性就在于改变带电粒子的运动, 使细胞通过 S 期和 G2/M 期的速度减慢。G2 期是对磁场最敏感的时期。磁场可以促使细胞从静止期进入细胞周期。进而提示可能和药物具有协同作用。

电镜下对照组细胞呈圆形, 胞浆均匀, 各种膜结构和细胞器清晰可见。实验组细胞收缩变小、细胞质浓缩, 出现空泡; 核内染色质固缩并凝集成块, 聚集在核膜的周边。静磁场对细胞膜结构造成了一定破坏, 并使细胞线粒体嵴减少, 并出现断裂现象, 本实验室之前研究曾发现磁场可使微管蛋白解聚, 二者之间是否有联系还需深入研究。Aldinucci 等^[14-15]发现 4.75T 静磁场能改变肿瘤细胞的细胞膜特性, 却

对正常淋巴细胞无明显作用。

因此, 本实验表明, 静磁场能够抑制 K562 细胞的增殖, 产生周期阻滞; 静磁场能够诱导 K562 细胞分化, 原癌基因表达降低, 而且能够破坏细胞膜结构。目前对磁场产生这种影响的机制还不是很清楚, 有待于进一步深入研究。

参考文献

- [1] 张小云, 张宇. 恒定磁场对骨组织中细胞影响的研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2006, 12(4): 333—337.
- [2] 何成奇, 王维, 肖登, 等. 不同频率脉冲电磁场对去势大鼠血清雌二醇及股骨骨钙含量的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2007, 22(4): 303—305.
- [3] 陈文芳, 齐浩, 孙润广. 稳恒磁场对人白血病细胞 K562 生长抑制作用研究初报[J]. 西安文理学院学报, 2005, 8(1): 11—14.
- [4] 陈文芳, 齐浩, 孙润广. 磁场对环磷酰胺杀伤人白血病细胞 K562 协同作用的研究初报[J]. 生物磁学, 2005, 5(1): 9—12.
- [5] Raylman RR, Clavo AC, Wahl RL. Exposure to strong static magnetic field slows the growth of human cancer cells in vitro [J]. Bioelectromagnetics, 1996, 17(5): 358—363.
- [6] 季百苗, 宋国丽, 张小云. 旋转恒定磁场对化疗损伤小鼠造血功能保护作用的研究[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2006, 28(7): 446—449.
- [7] 宋国丽, 王敏, 张小云. 不同频率旋转磁场对放射损伤小鼠的保护及造血作用恢复的研究 [J]. 中国康复医学杂志, 2006, 21(8): 689—692.
- [8] Sabo J, Mirossay L, Horovcak, L, et al. Effects of static magnetic field on human leukemic cell line HL-60 [J]. Bioelectrochemistry, 2002, 56(1): 227—231.
- [9] Pagliara P, Lanubile R, Dwikat M, et al. Differentiation of monocytic U937 cells under static magnetic field exposure[J]. Eur J Histochem, 2005, 49(1): 75—86.
- [10] 白阳, 叶健, 王敬泽. c-Myc 功能及其下游靶点[J]. 细胞生物学杂志, 2007, 29(2): 191—196.
- [11] 陈龙, 陈洁平. c-myc 对肿瘤生长抑制基因的转录调控[J]. 中国肿瘤防治杂志, 2006, 13(22): 1752—1754.
- [12] 王方金, 何蕴韶. 应用 siRNA 抑制 K562 细胞 c-Myc 基因的表达[J]. 解剖学研究, 2005, 27(1): 12—14.
- [13] 陈龙, 陈洁平, 林晨, 等. 重组反义 c-myc 腺病毒抑制 K562 细胞生长、诱导凋亡的作用[J]. 肿瘤, 2006, 26(1): 24—28.
- [14] Aldinucci C, Garcia JB, Palmi M, et al. The effect of strong static magnetic field on lymphocytes [J]. Bioelectromagnetics, 2003, 24(2): 109—117.
- [15] Dini L, Abbro L. Bioeffects of moderate -intensity static magnetic fields on cell cultures[J]. Micron, 2005, 36(3): 195—217.