

# 毫米波对人骨髓细胞和白血病细胞克隆能力的作用

史泓浏, 伍新尧, 崔芙蓉

(中山医科大学法医系, 广东 广州 510089)

**摘要:**【目的】探索毫米波对人骨髓细胞和白血病细胞克隆能力的影响。【方法】以波长 8 mm, 功率密度为  $4 \text{ mW/cm}^2$  的毫米波辐射人骨髓细胞和 HL60 细胞、K562 细胞, 测定粒巨噬细胞集落形成单位(GM-CFU)和肿瘤细胞集落形成单位(tCFU)。【结果】连续 2 次 60 min 的辐射使实验组的 GM-CFU 比对照组明显上升( $P < 0.05$ ), 连续 10 次 30 min 或 60 min 的辐射均使 tCFU 较之于对照组显著降低( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。其余辐射方式则对 GM-CFU 和 tCFU 的变化无明显作用( $P > 0.05$ )。【结论】毫米波的短期辐射(2 次)能增强正常人骨髓细胞的克隆能力而不影响 HL60 细胞和 K562 细胞的克隆能力, 较长时间的辐射(10 次)则使 HL60 细胞及 K562 细胞的克隆能力明显降低。提示微波的非热效应可能会影响白血病细胞的净化。

关键词: 微波; 造血干细胞/辐射效应; 白血病细胞/辐射效应

中图分类号: R454.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2000)04S0-0102-03

## Effects of Millimeter-wave Radiation on the Clonogenic Capacity of Human Bone Marrow Cell and Leukemic Cells

SHI Hong-liu, WU Xin-yao, CUI Fu-rong

(Faculty of Forensic Medicine, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China)

**Abstract:**【Objective】To study the effects of millimeter-wave radiation on the clonogenic capacity of human bone marrow cell and leukemic cells. 【Methods】Normal human bone marrow cells, HL60 and K562 were exposed to 8.0 millimeter-wave at a power density of  $4 \text{ mW/cm}^2$ . GM-CFU and tCFU were measured. 【Results】It was found that two times of 60 minutes radiation could result in significant increase of GM-CFU ( $P < 0.05$ ) while ten times of 30 minutes or 60 minutes radiation could lead to remarkable decrease of tCFU compared with control group( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). And the other kinds of radiation had no significant effects on both GM-CFU and tCFU( $P > 0.05$ ). 【Conclusion】A short-time millimeter-wave radiation (twice) could strengthen the clonogenic capacity of human bone marrow cell but not on that of HL60 cells and K562 cells. The longer time millimeter-wave radiation (ten times) could decreased the clonogenic capacity of HL60 cells and K562 cells significantly. It was suggested that nonthermal effect of microwave might influence purgation of leukemic cells.

**Key words:** microwaves; hematopoietic stem cells/radiation effects; leukemic cells/radiation effects

微波技术已广泛应用于生物医学领域<sup>[1]</sup>, 我们在白血病细胞的净化研究中使用了微波, 对在净化过程中可能存在的微波非热效应产生了兴趣。毫米波因其波长短、在生物组织中穿透深度小、产热少等特点而成为研究非热效应的适宜工具。本实

验使用低功率的 8 mm 微波源来研究毫米波对人骨髓细胞和 HL60 细胞及 K562 细胞克隆能力的影响, 为探讨微波的非热效应对净化白血病细胞的影响提供依据。

收稿日期: 2000-05-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(69172009)

作者简介: 史泓浏(1967-), 男, 江苏泰兴人, 博士, 讲师, 崔芙蓉, 华南理工大学电子信息学院 1997 年級博士生

© 1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与装置

1.1.1 试样 8 例正常骨髓细胞取自正常献髓者(6 例)及非恶性血液病患者(缺铁性贫血及真性红细胞增多症各 1 例)。所采的骨髓细胞经淋巴细胞分离液(相对密度 1.077)制成单核细胞(MNC)悬液,将  $2 \times 10^9/L$  细胞置于体积分数为 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液中,备用。HL60 细胞株和 K562 细胞株(均由广州军区总医院实验科提供)分别作为急性早幼粒白血病(M3)及红白血病(M6)的模型,用体积分数为 10% 的小牛血清 RPMI-1640 培养液进行传代培养,待细胞处于对数生长期时用于实验。

1.1.2 毫米波辐射装置 由电子部第 55 所提供。辐射参量为:波长 8 mm,功率密度为  $4 \text{ mW/cm}^2$ ,辐射喇叭口径为  $34 \text{ mm} \times 40 \text{ mm}$ 。

1.1.3 辐射方式 将  $4 \text{ mL}$  细胞数密度为  $3 \times 10^5/mL$  的细胞悬液接种于直径为 35 mm 的培养皿中,静置片刻后给予微波辐射。培养皿和辐射的角锥喇叭均置于  $36^\circ\text{C}$  的恒温箱中。

### 1.2 实验分组

被照样品都分为辐射组和对照组,辐射时间分为 30 min 和 60 min,每日辐射 1 次。正常人骨髓细胞共辐射 3 次,HL60 细胞和 K562 细胞共辐射 10 次,对照组在相同条件下进行假辐射。每次辐射结束均取相等数量的细胞进行 GM-CFU(粒巨噬细胞集落形成单位)和 tCFU(肿瘤细胞集落形成单位)的测定,并用台盼蓝染色率确定细胞活度(台盼蓝染色率为光镜下每 100 个细胞中被台盼蓝染上的细胞个数)。其余细胞经半量换液后继续培养。

### 1.3 培养体系

1.3.1 GM-CFU 的培养体系 参照文献[2]完成,培养总体积  $1 \text{ mL}$ ,均含  $1 \times 10^5$  个 MNC,体积分数为 20% 小牛血清,体积分数为 10% PHA-LCM(植物血球凝集素刺激的淋巴细胞培养上清),质量分数为 0.5% 甲基纤维素(Sigma 公司产品),青链霉素各 100 U,加入 24 孔板中,置体积分数为 5%  $\text{CO}_2$ ,  $37^\circ\text{C}$ ,饱和湿度下培养 8 d,分别计数 40 个细胞以上的集落数。集落存活率 = 试验组集落均数/对照组集落均数  $\times 100\%$ 。

1.3.2 tCFU 的培养体系 HL60 细胞和 K562 细

胞数密度均为  $2 \times 10^3/mL$ ,不加 PHA-LCM,其余和 GM-CFU 培养方法相同。

1.4 统计学处理 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用  $t$  检验。

## 2 结果

表 1 和表 2 显示,在为期 3 d 的培养和辐射中,无论是 30 min 还是 60 min 的毫米波辐射,对 GM-CFU 和 tCFU 的影响都不显著,人骨髓细胞和两种白血病细胞株的台盼蓝染色率和其对照组相比,也无明显变化,仅有经过 2 次辐射的正常骨髓细胞,其 GM-CFU 比对照组有明显上升( $P < 0.05$ ),而 HL60 细胞和 K562 细胞经过连续 10 d 的培养和辐射,30 min、60 min 的 HL60 细胞的 tCFU 分别降至对照组的 43% 和 35%;K562 细胞的 tCFU 则分别降至对照组的 66% 和 47%;HL60 细胞和 K562 细胞的台盼蓝染色率最高升为 29.3% 和 25.2%,和各自的对照组相比,上升较为显著( $P < 0.05$ );对于所有细胞来说,30 min 和 60 min 的毫米波处理之间没有明显差别( $P > 0.05$ ),但从趋势上看,60 min 的毫米波的作用效果要强于 30 min 的毫米波作用,集落存活率和台盼蓝染色率都是如此。

## 3 讨论

清除骨髓中残存的白血病细胞是提高自体骨髓移植疗效的关键。郑华金等<sup>[3]</sup>在微波净化白血病细胞的研究中发现:微波比单纯高热对白血病细胞具有更强的选择性杀伤作用。我们的工作也得到类似结论<sup>[4]</sup>。微波的非热效应是否也是引起这种选择性杀伤作用的一个因素一直为我们所关注。在此之前沈世人等<sup>[5]</sup>在小鼠上所做的工作说明  $7.9 \text{ mm}$ 、 $3 \text{ mW/cm}^2$  的微波不仅能减轻钴射线造成的损伤,而且能促进放射后受损骨髓造血功能的恢复;李国光等<sup>[6]</sup>的实验则表明毫米波辐射对受化疗处理的小鼠造血系统有一定的保护作用;刘守礼等<sup>[7]</sup>还发现小鼠离体骨髓悬液经  $7.9 \text{ mm}$ 、 $2 \text{ mW/cm}^2$  微波的辐射可以促进骨髓中粒系造血祖细胞的增殖,这一明显有利于骨髓细胞良性生长的非热效应间接支持了上述假设:即微波在净化白血病细胞的过程中除了热效应外,非热效应也可能起一定作用。在本实验中,我们发现:波长为  $8 \text{ mm}$  的微波

表1 毫米波对 GM-CFU 和 tCFU 的影响

Table 1 Effects of millimeter-wave radiation on GM-CFU and tCFU ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

Group	n	t <sub>rad</sub> /min	1 time	2 times	3 times	10 times
Control	8	0	100	100	100	
GM-CFU	8	30	115±29	131±42	96±28	
	8	60	137±31	148±45 <sup>1)</sup>	127±33	
Control	5	0	100	100	100	100
HL60(tCFU)	5	30	95±28	92±31	90±25	43±16 <sup>2)</sup>
	5	60	93±30	91±26	88±30	35±13 <sup>2)</sup>
Control	5	0	100	100	100	100
K562(tCFU)	5	30	97±25	96±32	96±23	66±21 <sup>1)</sup>
	5	60	96±32	94±30	92±31	47±18 <sup>2)</sup>

1) Compared with control,  $P < 0.05$ ; 2) Compared with control,  $P < 0.01$

表2 毫米波对正常骨髓细胞和白血病细胞的细胞活度的影响

Table 2 Effects of millimeter-wave radiation on cell activity of NBMC<sup>1)</sup> and leukemic cells ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

Group	n	t <sub>rad</sub> /min	1 time	2 times	3 times	10 times
Control	8	0	6.5±2.0	9.3±3.5	15.3±5.0	
NBMC	8	30	7.0±2.1	7.5±2.5	13.2±4.5	
	8	60	6.1±2.3	8.0±3.0	11.8±3.6	
Control	5	0	9.6±3.0	10.5±3.5	9.8±3.1	18.2±5.5
HL60	5	30	10.3±3.5	9.7±3.2	11.4±3.8	23.1±8.0
	5	60	11.2±3.8	9.7±3.2	13.5±5.0	29.3±9.6 <sup>2)</sup>
Control	5	0	7.1±2.5	7.5±2.4	8.4±2.8	15.3±4.7
K562	5	30	8.3±2.8	8.5±2.7	9.1±3.0	20.4±5.8
	5	60	8.8±3.0	9.3±3.1	9.5±3.2	25.2±8.0 <sup>2)</sup>

1) NBMC: normal bone marrow cell; 2) Compared with control,  $P < 0.05$

对正常人骨髓细胞和白血病细胞的作用是不同的。前者虽然只有经过2次60 min辐射后其GM-CFU才显著超过对照组,但白血病细胞却是随着辐射次数的增加而呈下降趋势;台盼蓝染色的结果表明细胞的死亡数是随着辐射次数的增加而缓慢增加的,HL60细胞经过连续10 d的培养和辐射,其台盼蓝染色率分别升为23.1%和29.3%,换言之此时尚有76.9%和70.7%的细胞存活,但其tCFU却分别降为对照组的43%和35%,显示有相当一部分活细胞已经丧失了克隆能力,即出现了增殖死亡,尽管这些细胞的形态和某些生理功能仍与正常细胞相同。K562细胞也存在类似效应。而通常大功率微波的热杀伤作用会造成细胞的大量坏死,这与毫米波的作用是有区别的。8 mm的微波对正常人骨髓细胞和白血病细胞的不同影响可能是造成选择性杀伤作用的一个原因。因为辐射体系处于36℃的恒温箱中,故热效应可以忽略,这种作用应属

微波的非热效应。

毫米波杀伤肿瘤细胞的机理尚不清楚,人们在这方面已经做了许多工作<sup>[8,9]</sup>。Webb曾发现在50~200 GHz范围内,癌细胞对毫米波段的吸收谱不同于正常细胞,利用毫米波能量可选择性地干扰或破坏肿瘤细胞的代谢。从生物学角度来看,就目前所知除了降低癌细胞的克隆能力外,抑制癌细胞的DNA合成、表面受体的改变、细胞形态的损伤以及某一时期超微结构的变化等都是导致癌细胞死亡的原因。最后需要说明的是,在本实验的培养体系中,HL60细胞和K562细胞可无限传代,而正常人骨髓细胞则自培养的第3 d起死亡数量增多,所以对其仅进行了3 d的培养和观察。

参考文献:

[1] Adey W R. Effects of microwave on cell and molecules

(下转第115页)

化无源而致脏腑功能的减退和气血阴阳的亏虚。因此,脾胃病的病因和临床表现错综复杂,病机变化多端,或化寒化热或伤阴伤阳。因此,必须应用多种辨证方法、综合分析作出诊断。八纲辨证中的阴阳辨证是辨别疾病性质的基本原则,贯穿于整个辨证过程。因此,我们把虚和实作为脾胃病辨证第一步,然后再辨别既相互对立又相互联系,并不是完整而具体的证。八纲要成为临床辨别疾病的最基本的证型,还必须与气血津液和脏腑辨证结合起来,使寒热、虚实、表里、阴阳和气血落实到脏腑,便于对症用药。笔者把中医脾胃病临床辨证思维过程和步骤总结为一棵诊断树,使脾胃病辨证过程达到客观化、标准化,便于编制电脑诊断软件。

### 3.2 证型

根据诊断树的尾端、临床常见脾胃病呕吐、泄泻、胃脘痛、腹痛等和临床实际情况确立了基本证型 33 种。为了便于编制电脑专家辨证诊断程序,把一些证型进行了拆分,并根据其性质把它们分虚实二类。其中虚证 18 种,实证 28 种,基本涵盖了脾胃病的证型,可满足临床的需要。

### 3.3 问题条目

条目池的问题条目包括了脾胃病临床的主观症状和体征,通过专家的第一轮、第二轮的筛选,删除了重复的内容,并对多含义的条目进行拆分确立

了量表的问题条目。同时,把每一个问题条目变成一个问,并请专家对问题表述的精确度进行了逆向翻译,力求使问题明确而便于回答,避免使被调查者对问题的回答产生歧义。

### 3.4 量表

对软指标进行定量分析的量表测评方法,已被广泛应用于心理测量和生存质量测评中,并得到国际大多数专家的认可。量表中问题条目的五级量化方法,已被广泛应用于世界卫生组织研制的生存质量量表<sup>[3,4]</sup>,并被国际上大多数学者所认可。本研究力求使脾胃病辨证量表科学性强,易于操作。

#### 参考文献:

- [1] 王永炎主编. 中医内科学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1997. 158~200.
- [2] 朱文锋主编. 中医诊断学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1995. 117~139, 148~158.
- [3] WHO. The 100 Questions with response scales; WHO-QOL-100. Geneva: WHO, 1995.
- [4] WHO. WHOQOL—Measuring Quality of Life. MSA/MNH/PSF. Geneva: WHO, 1997. 4.

(编辑 刘清海)

(上接第 104 页)

- [1] J. Nature, 1988, 332: 401.
- [2] Burgess A W, Wilson EMA, Metcalf D. Stimulation by human placental conditioned medium of hematoipoietic colony formation by human bone marrow cell[J]. Blood, 1977, 49(4): 573.
- [3] 郑华金, 苏毅, 薛毅琪, 等. 微波净化自体骨髓治疗白血病临床和实验研究[J]. 中华血液学杂志, 1991, 12(10): 513.
- [4] 史泓渊, 王晓怀, 江悦华, 等. 微波和长春新碱体外净化白血病细胞的研究[J]. 中华物理医学与康复杂志, 1999, 21(3): 162.
- [5] 沈世人, 陈景藻, 刘守礼. 毫米波照射小鼠外周血象及<sup>60</sup>Co $\gamma$ 射线照射后骨髓细胞 CFU-C 生成量的影响[J]. 第四军医大学学报, 1990, 11(2): 99.
- [6] 李国光, 邱书明, 林崇文, 等. EHF 毫米波辐照对受化疗处理期小鼠造血系统的保护作用[J]. 中华物理医学杂志, 1995, 17(3): 175.
- [7] 刘守礼, 沈世人, 陈景藻, 等. 38GHz 等幅波对造血干细胞体外培养的影响[J]. 中华理疗杂志, 1987, 10(3): 130.
- [8] 杜忠民, 郭鹤, 曹云新. 毫米波辐照对细胞膜 ConA 受体的影响[J]. 中华理疗杂志, 1993, 16(3): 194.
- [9] 张峰, 孙仲藩, 彭俊云, 等. 毫米波放疗治疗浅表转移瘤的研究[J]. 中华理疗杂志, 1996, 19(1): 3.

(编辑 关淡庄)