

(19)中华人民共和国国家知识产权局



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108452438 A

(43)申请公布日 2018.08.28

(21)申请号 201710092289.8

(22)申请日 2017.02.21

(71)申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101 北京市朝阳区大屯路15号

(72)发明人 莫炜川 胡平东 刘缨 赫荣乔

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅 张立娜

(51)Int.Cl.

A61N 2/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图3页

### (54)发明名称

磁场约束设备在制备用于抑制肿瘤转移的产品中的应用

### (57)摘要

本发明公开了一种磁场约束设备的新用途。该新用途具体为磁场约束设备在如下任一中的应用:(A)制备用于抑制肿瘤转移的产品;(B)制备用于抑制肿瘤细胞迁移的产品。实验证明,磁场约束条件下(0-5  $\mu$ T),乳腺癌细胞的迁移能力和乳腺癌实体瘤的转移都会被显著的抑制。由于磁场约束条件,是一个很容易模拟的物理环境,能够非常方便地实现对肿瘤的处理,而且磁场可以穿透生物组织,能够做到无创处理。因此本发明方法不仅可以做到降低肿瘤的恶性程度,也能够提供一种简易无创的治疗环境。

1. 磁场约束设备在如下任一中的应用:

(A) 制备用于抑制肿瘤转移的产品;

(B) 制备用于抑制肿瘤细胞迁移的产品。

2. 根据权利要求1所述的应用,其特征为:所述应用中,所述磁场约束设备为能够提供0-5 $\mu$ T磁场强度的设备。

3. 根据权利要求1或2所述的应用,其特征为:所述应用(A)为所述磁场约束设备和可读性载体A在制备用于抑制肿瘤转移的产品中应用;所述可读性载体A上记载有如下内容:将患有所述肿瘤的动物置于磁场强度范围在0-5 $\mu$ T的环境中饲养;

所述应用(B)为所述磁场约束设备和可读性载体B在制备用于抑制肿瘤细胞迁移的产品中应用;所述可读性载体B上记载有如下内容:将所述肿瘤细胞置于磁场强度范围在0-5 $\mu$ T的环境中培养。

4. 一种用于抑制肿瘤转移的系统,由磁场约束设备和装置A组成;所述装置A具有将患有所述肿瘤的动物置于所述磁场约束设备提供的磁场强度范围在0-5 $\mu$ T的环境中饲养的功能。

5. 一种用于抑制肿瘤细胞迁移的系统,由磁场约束设备和装置B组成;所述装置B具有将所述肿瘤细胞置于所述磁场约束设备提供的磁场强度范围在0-5 $\mu$ T的环境中培养的功能。

6. 一种抑制肿瘤转移的方法,包括如下步骤:将患有肿瘤的动物置于磁场强度范围在0-5 $\mu$ T的环境中饲养。

7. 一种抑制肿瘤细胞迁移的方法,包括如下步骤:将肿瘤细胞置于磁场强度范围在0-5 $\mu$ T的环境中培养。

8. 根据权利要求3-5中任一所述的应用或系统或方法,其特征为:

所述饲养的时间大于等于最短有效抑制时间A,所述最短有效抑制时间A为置于所述磁场强度范围在0-5 $\mu$ T的环境中饲养的所述动物的肿瘤转移量显著低于对照组动物的肿瘤转移量所需的最短时间;所述对照组动物为置于地磁场环境中饲养的患有所述肿瘤的所述动物;

所述培养的时间大于等于最短有效抑制时间B,所述最短有效抑制时间B为置于所述磁场强度范围在0-5 $\mu$ T的环境中培养的所述肿瘤细胞的迁移速度显著低于对照组肿瘤细胞的迁移速度所需的最短时间;所述对照组肿瘤细胞为置于地磁场环境中培养的所述肿瘤细胞;

所述磁场强度范围在0-5 $\mu$ T的环境为磁场强度为0.1-0.5 $\mu$ T的环境。

9. 根据权利要求1-8中任一所述的应用或系统或方法,其特征为:所述肿瘤为乳腺癌;所述肿瘤细胞为乳腺癌细胞;所述肿瘤和所述肿瘤细胞均来自于哺乳动物。

10. 根据权利要求9所述的应用或系统或方法,其特征为:所述哺乳动物选自人、大鼠、小鼠。

## 磁场约束设备在制备用于抑制肿瘤转移的产品中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物物理领域,涉及磁场约束设备在制备用于抑制肿瘤转移的产品中的应用。

### 背景技术

[0002] 正常细胞增殖失控之后就会发展成为肿瘤。当其表现为破坏性生长,侵袭性和转移性等特征时,就被诊断为恶性肿瘤。肿瘤的侵袭会严重破坏周边的组织器官。它会特异性的破坏包围组织的基底层,形成肿瘤细胞的局部扩散。肿瘤细胞常常会通过循环系统进行扩散。肿瘤的转移意味着肿瘤细胞通过淋巴或血液循环系统向从原发位点向其他器官进行扩散。广义来说,肿瘤细胞在体腔内的蔓延和扩散也是肿瘤的转移。肿瘤的转移能力决定了其恶性程度。

[0003] 目前,手术,放疗和化疗,以及这些方法的联合使用,已广泛应用于肿瘤的治疗。比如乳腺癌,直肠癌,皮肤癌,都能够通过手术方法有效地移除集中于特定病灶的坏死肿瘤组织。但是神经组织(如脑和脊髓)内的肿瘤细胞,以及外周循环系统(淋巴和血液)中的肿瘤细胞,如癌变的白细胞和淋巴细胞,以及从其他病灶转移至循环系统的恶性肿瘤细胞,很难通过手术进行移除,化疗和放疗是这类癌症的常规治疗手段。但是,接受系统化疗的患者必须承受,如呕吐,运动迟缓等,严重的化疗副作用。这严重影响了患者的生活质量。化疗和放疗的副作用,是目前癌症治疗中最大的临床难题之一。此外,化疗药物的使用具有多种限制性。每个疗程的用药量,受到药物毒性剂量的约束。病人对药物的耐受能力具有个体差异性。因此化疗药物在使用必须非常小心,做到因人而异。特别是儿童对于药物的耐受力普遍低于成年人。而且,药物的毒性很可能影响儿童的生长发育,这对儿童癌症的治疗带来了极大的限制。此外,肿瘤细胞对化疗药物敏感性往往随着治疗过程而降低。因此,病人在治疗过程中通常会在几个疗程中,更换化疗药物。疗程的增加和药物的更换,会延长甚至加重药物副作用给病人带来的痛苦。更重要的是,化疗和放疗虽然能够有效阻断肿瘤细胞的增殖和代谢过程,但是化疗药物并不能明显抑制肿瘤的转移,降低肿瘤的恶性程度。因此,一种可以限制肿瘤的恶性化发展的,温和的、无创的、简便的物理条件,不仅可以给肿瘤的治疗带来方便,甚至还可以降低化疗药物的用量和疗程,从而缓解化疗副作用给病人带来的痛苦,有效提高患者的生活质量。

[0004] 物理辅助疗法指的是通过物理刺激,如热,电,光,超声波和电磁场等物理手段对肿瘤进行辅助治疗或预防的治疗策略。

[0005] 磁场约束环境,是利用设备把环境中的地磁场进行精确控制后,产生的一种稳定的强度一致的弱磁场环境,大小可控制在地磁场的1/10以下(0-5000nT)。目前还没有极弱磁场在肿瘤治疗中的应用研究。

### 发明内容

[0006] 本发明的一个目的是提供一种磁场约束设备的新用途。

[0007] 该新用途具体为磁场约束设备在如下任一中的应用：

[0008] (A) 制备用于抑制肿瘤转移的产品；

[0009] (B) 制备用于抑制肿瘤细胞迁移的产品。

[0010] 在本发明中，所述磁场约束设备为能够将环境中的磁场削弱到0-5 $\mu$ T (如0.1-0.5 $\mu$ T) 范围的设备。

[0011] 进一步，所述应用(A)为所述磁场约束设备和可读性载体A在制备用于抑制肿瘤转移的产品中应用；所述可读性载体A上记载有如下内容：将患有所述肿瘤的动物置于磁场强度范围在0-5 $\mu$ T的环境中饲养

[0012] 所述应用(B)为所述磁场约束设备和可读性载体B在制备用于抑制肿瘤细胞迁移的产品中应用；所述可读性载体B上记载有如下内容：将所述肿瘤细胞置于磁场强度范围在0-5 $\mu$ T的环境中培养。

[0013] 本发明的另一个目的是提供一种用于抑制肿瘤转移的系统，以及一种用于抑制肿瘤细胞迁移的系统。

[0014] 本发明所提供的用于抑制肿瘤转移的系统，由磁场约束设备和装置A组成；所述装置A具有将患有所述肿瘤的动物置于所述磁场约束设备提供的磁场强度范围在0-5 $\mu$ T的环境中饲养的功能。

[0015] 本发明所提供的用于抑制肿瘤细胞迁移的系统，由磁场约束设备和装置B组成；所述装置B具有将所述肿瘤细胞置于所述磁场约束设备提供的磁场强度范围在0-5 $\mu$ T的环境中培养的功能。

[0016] 本发明的第三个目的是提供一种抑制肿瘤转移的方法，以及一种抑制肿瘤细胞迁移的方法。

[0017] 本发明所提供的抑制肿瘤转移的方法，具体可包括如下步骤：将患有肿瘤的动物置于磁场强度范围在0-5 $\mu$ T的环境中饲养。

[0018] 本发明所提供的抑制肿瘤细胞迁移的方法，具体可包括如下步骤：将肿瘤细胞置于磁场强度范围在0-5 $\mu$ T的环境中培养。

[0019] 以上本发明所提供的抑制肿瘤转移的方法以及抑制肿瘤细胞迁移的方法，既可为非疾病诊断治疗的方法，也可以为疾病诊断治疗的方法。

[0020] 在本发明中，所述饲养的时间需大于等于最短有效抑制时间A，所述最短有效抑制时间A为置于所述磁场强度范围在0-5 $\mu$ T的环境中饲养的所述动物的肿瘤转移量显著低于对照组动物的肿瘤转移量所需的最短时间；所述对照组动物为置于地磁场环境中饲养的患有所述肿瘤的所述动物。所述培养的时间需大于等于最短有效抑制时间B，所述最短有效抑制时间B为置于所述磁场强度范围在0-5 $\mu$ T的环境中培养的所述肿瘤细胞的迁移速度显著低于对照组肿瘤细胞的迁移速度所需的最短时间；所述对照组肿瘤细胞为置于地磁场环境中培养的所述肿瘤细胞。所述磁场强度范围在0-5 $\mu$ T的环境具体可为磁场强度为0.1-0.5 $\mu$ T的环境。

[0021] 更加具体的，在本发明的一个实施例中，所述饲养的时间为1个月(4T1乳腺癌实体瘤晚期肺转移小鼠)。在本发明的另一个实施例中，所述培养的时间为6小时以上，如48小时(4T1细胞)。

[0022] 在本发明中，所述肿瘤具体为乳腺癌；所述肿瘤细胞具体为乳腺癌细胞。所述肿瘤

和所述肿瘤细胞均来自于哺乳动物。

[0023] 其中,所述哺乳动物可选自人、大鼠、小鼠。

[0024] 实验证明,磁场约束条件下(磁场强度范围在0-5 $\mu$ T),乳腺癌细胞的迁移能力和乳腺癌实体瘤的转移都会被显著的抑制。由于磁场约束条件,是一个很容易模拟的物理环境,能够非常方便地实现对肿瘤的处理,而且磁场可以穿透生物组织,能够做到无创处理。因此本发明方法不仅可以做到降低肿瘤的恶性程度,也能够提供一种简易无创的治疗环境。

#### 附图说明

[0025] 图1为磁场约束和地磁场对照两组细胞的培养环境示意图。

[0026] 图2为磁场约束和地磁场对照两组中4T1细胞的迁移速度测定结果。

[0027] 图3为磁场约束和地磁场对照两组中OCM-1细胞的迁移速度测定结果。

[0028] 图4为磁场约束和地磁场对照两组中MUM-2B细胞的迁移速度测定结果。

[0029] 图5为磁场约束和地磁场对照两组动物的饲养环境示意图。

[0030] 图6为磁场约束和地磁场对照两组中4T1实体瘤的肺转移统计情况。

#### 具体实施方式

[0031] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0032] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0033] 实施例1、磁场约束抑制4T1细胞的迁移

[0034] 供试细胞:4T1细胞,为小鼠乳腺癌细胞株。在协和细胞库和美国ATCC细胞库,均可购买获得。

[0035] 1、实验分组及方法

[0036] 分为磁场约束组和地磁场对照组。

[0037] 1.1磁场条件:

[0038] 磁场约束组:利用磁场约束设备将环境中的磁场强度控制为0.1-0.5 $\mu$ T。

[0039] 地磁场对照组:磁场环境为40 $\mu$ T,与北京市的地磁场相同。

[0040] 磁场约束组的细胞在磁场约束设备内培养。地磁场对照组在磁场约束设备外培养。两组细胞在同一个细胞培养箱内(图1)。

[0041] 1.2.细胞培养:

[0042] 细胞培养基:高糖DMEM培养基(Gibco,USA),含10%(v/v)胎牛血清FBS(PAA Laboratories,Austria),MEM非必须氨基酸(NEAA)(1:100稀释)(Gibco,USA)。

[0043] 培养环境:37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>,>95%相对湿度,由细胞培养箱提供(型号,HERA240i;赛默飞,美国)。

[0044] 细胞接种:将4T1细胞按照密度20万/皿,接种在35mm直径细胞培养皿中培养48h。细胞培养基中的血清浓度降到1%,排除细胞增殖对细胞运动的影响。

[0045] 1.3.细胞迁移速度测量:

[0046] 细胞在培养的第24小时和48小时,从培养环境中取出,放入全息活细胞工作站(HoloMonitor M4;Phase Holographic Imaging,Sweden)中进行运动学参数的测量。细胞迁移速度的测量,拍摄30分钟细胞的运动。计算单个细胞的迁移距离,除以30分钟,得到迁

移速度,单位“微米/小时”。每次测量,取至少15个细胞的有效测量数据,共分三个细胞培养批次,进行独立测量。最终汇总,24小时和48小时,磁场约束组都获得了65个细胞的有效数据。地磁场对照组分别获得了62和49个细胞的有效数据。

#### [0047] 2、实验结果

[0048] 磁场约束和地磁场对照两组中,4T1细胞的迁移速度测定结果具体如图2所示。由图可见,在地磁场中,4T1细胞的迁移速度会随着培养时间的增加显著上升(两个白色的柱状图;\*\* $p < 0.01$ ,Mann-Whitney检验)。但是,磁场约束环境中,4T1细胞的迁移速度保持稳定。特别是,在48小时培养之后,细胞的迁移速度显著低于地磁场组的对照细胞(48h,黑色和白色的柱状图;### $p < 0.001$ ,Mann-Whitney检验)。

[0049] 该结果表明磁场范围在 $0.1-0.5\mu\text{T}$ 的环境可以有效抑制4T1细胞的迁移。

[0050] 对比例1、磁场约束对人视网膜葡萄膜黑色素瘤细胞(OCM-1和MUM-2B)的迁移的影响

[0051] OCM-1细胞:为人低侵袭性脉络膜黑色素瘤细胞株。在协和细胞库和美国ATCC细胞库,均可购买获得。

[0052] MUM-2B细胞:为人侵袭性脉络膜黑色素瘤细胞株。在协和细胞库和美国ATCC细胞库,均可购买获得。

[0053] 细胞培养基:RPMI-1640培养基(Corning,USA),含10%(v/v)胎牛血清FBS(PAA Laboratories,Austria)。

[0054] 细胞接种,分组和迁移速度测量方法与实施例1中的4T1细胞完全一样。

[0055] 实验结果:

#### [0056] 1、OCM-1细胞

[0057] 磁场约束和地磁场对照两组中,OCM-1细胞的迁移速度测定结果具体如图3所示。由图可见,在地磁场中,OCM-1细胞的迁移速度会随着培养时间的增加显著上升(两个白色的柱状图;\*\*\* $p < 0.001$ ,Mann-Whitney检验)。但是,磁场约束环境中,4T1细胞的迁移速度呈现先高,后降低的特点(两个黑色的柱状图;\*\*\* $p < 0.001$ ,Mann-Whitney检验)。虽然,在48小时磁场约束培养之后,细胞的迁移速度显著低于地磁场组的对照细胞(48h,黑色和白色的柱状图;### $p < 0.001$ ,Mann-Whitney检验)。但是,24小时磁场约束培养后,细胞的迁移速度显著高于地磁场组的对照细胞(24h,黑色和白色的柱状图;### $p < 0.001$ ,Mann-Whitney检验)。

[0058] 该结果表明磁场范围在 $0.1-0.5\mu\text{T}$ 的环境,可以在48h培养后,有效抑制4T1细胞的迁移。但是当处理时间在24h时,细胞所表现出的迁移速度升高的现象提示,磁场约束环境对于OCM-1细胞的转移的抑制存在时间依赖性,效果要差于4T1细胞。

#### [0059] 2、MUM-2B细胞

[0060] 磁场约束和地磁场对照两组中,MUM-2B细胞的迁移速度测定结果具体如图4所示。由图可见,在地磁场和磁场约束环境中,MUM-2B细胞的迁移速度都会随着培养时间的增加显著上升(两个白色的柱状图和两个黑色的柱状图;\*\* $p < 0.01$ ,\*\*\* $p < 0.001$ ,Mann-Whitney检验)。而且,相同培养时间下,磁场约束环境中和地磁场中细胞的迁移速度没有显著差异。

[0061] 该结果表明磁场范围在 $0.1-0.5\mu\text{T}$ 的环境,不能有效抑制MUM-2B细胞的迁移。

[0062] 通过实施例1和对比例1中的数据结果可以看出:磁场范围在 $0.1-0.5\mu\text{T}$ 的环境对

于4T1细胞的迁移抑制效果要好于OCM-1和MUM-2B细胞。

[0063] 实施例2、磁场约束抑制4T1实体瘤的肺转移

[0064] 供试细胞:4T1细胞,为小鼠乳腺癌细胞株。

[0065] 供试动物:Balb/c小鼠。该动物由医科院肿瘤医院动物房提供。可以通过商业途径购买到完全一样品系的小鼠(维通利华)。

[0066] 1、实验方法

[0067] (1) 4T1乳腺癌实体瘤晚期肺转移动物模型的制备

[0068] 制备4T1细胞的生理盐水悬液,浓度200万细胞/毫升。向小鼠左侧腹部第四乳头肉垫处注射100微升4T1细胞悬液,注射量20万细胞。注射后,小鼠在实验环境中适应1天。

[0069] (2) 实验分组

[0070] 小鼠按照5只/笼进行随机分笼。在地磁场和磁场约束环境中分别饲养3笼。每组都有15个动物。

[0071] 磁场约束组:利用磁场约束设备将环境中的磁场强度控制为0.1-0.5 $\mu$ T(图5)。

[0072] 地磁场对照组:动物放在同一个房间内,在磁场约束设备外,磁场环境为42-55 $\mu$ T,与北京市地磁场相当。其余操作均同磁场约束组。

[0073] (3) 动物饲养和实体瘤观察

[0074] 8天后,细胞注射部位开始能够观察到实体瘤块。之后,每天都对实体瘤块的大小用游标卡尺进行测量。当实体瘤体积达到1 $\text{cm}^3$ 时,检测动物肺部的肿瘤转移(注射后一个月)。

[0075] (4) 转移结节测量

[0076] 取出小鼠的肺组织,用生理盐水清洗后,用多聚甲醛固定。

[0077] 固定后的组织用Bouin's溶液(饱和苦味酸75毫升+40%甲醛25毫升+冰醋酸5毫升)进行染色。正常组织呈棕黄色,转移结节呈白色隆起。

[0078] 在显微镜下,对肺组织上的结节数量进行统计。计算每个动物的肺转移结节总量。

[0079] 2、实验结果

[0080] 磁场约束和地磁场对照两组中,4T1实体瘤的肺转移统计情况具体如图6所示。由图可见,经过1个月的亚磁场处理,小鼠肺部的转移结节的数量显著下降(\*,  $p < 0.05$ , Student's t-test)。该结果表明磁场范围在0.1-0.5 $\mu$ T的环境可以有效抑制4T1实体瘤的肺转移。

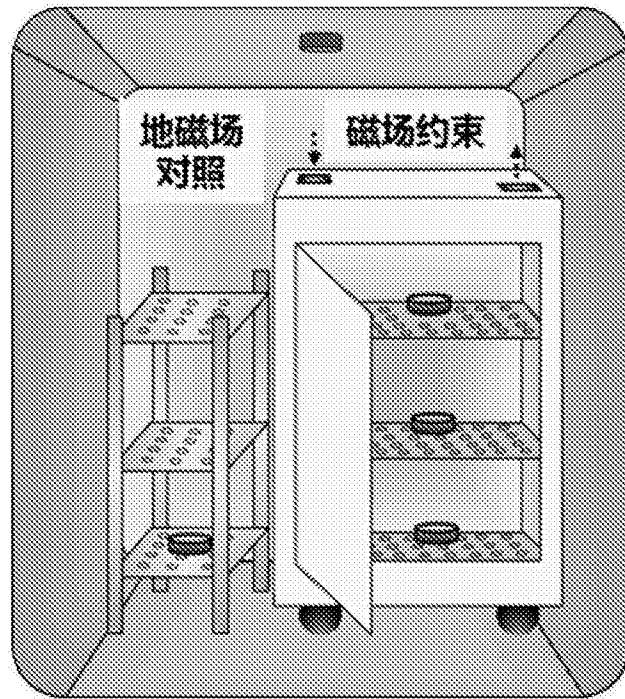


图1

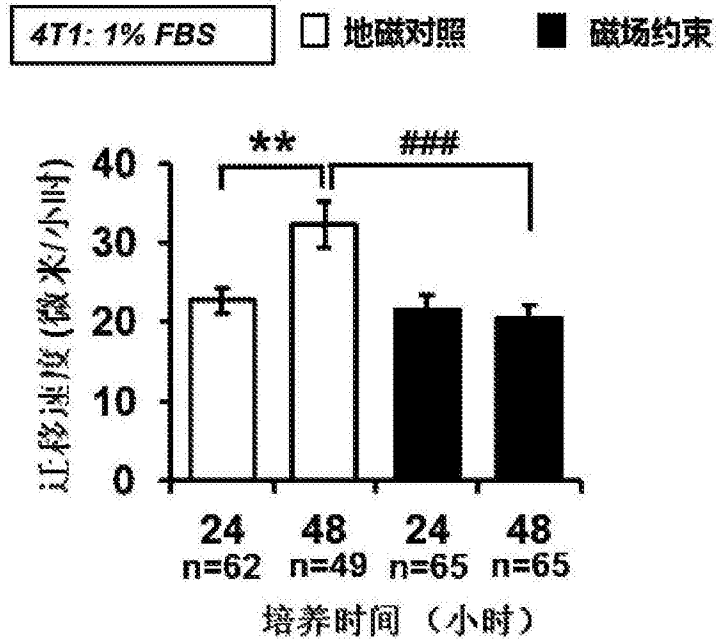


图2



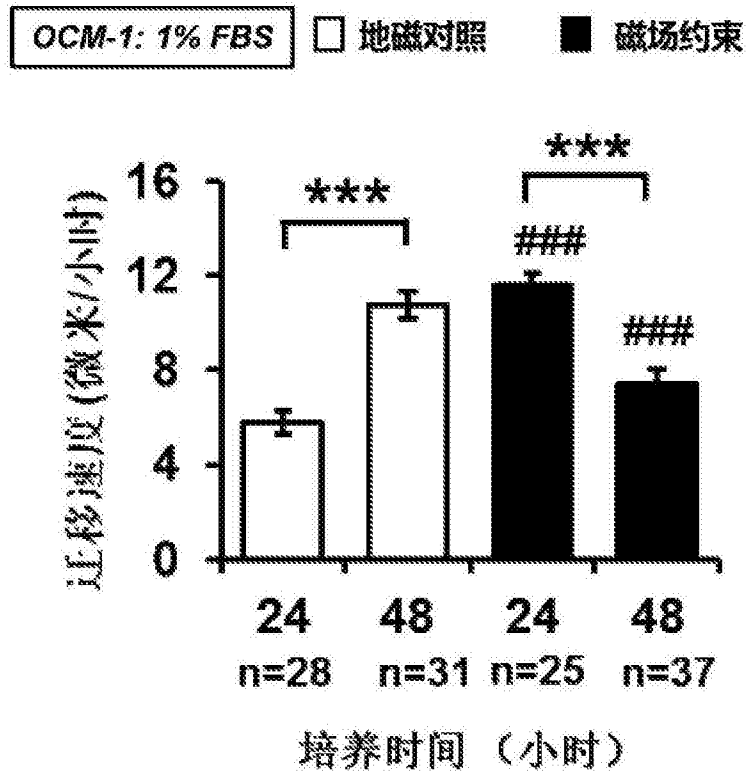


图3

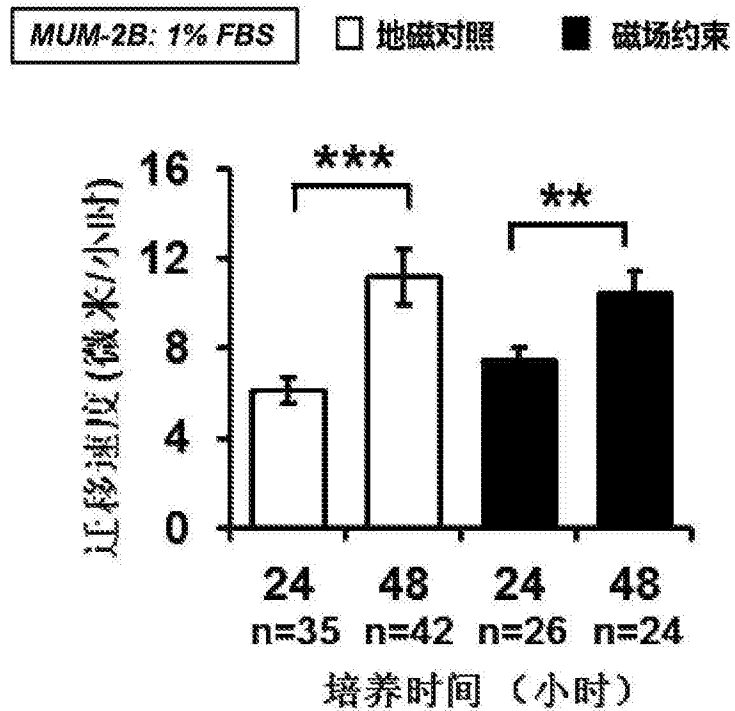
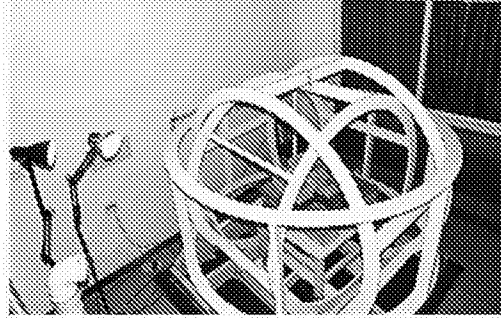


图4

磁场约束



地磁场对照



图5

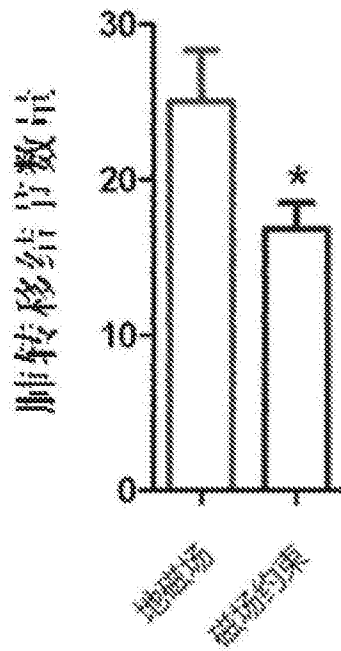


图6