DOI:10.16016/j.1000-5404.201408161

论著

高强度聚焦超声不完全消融对体外培养肝癌细胞的影响

张映林[1],陈 蛟[1],吴涯昆[1],张文锋[1],周世骥[2],李生伟[1] (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院:肝胆外科[1],胃肠外科[2])

[摘要] **目的** 通过高强度聚焦超声不完全消融筛选残留肝癌细胞,探讨其生物学行为改变及对血管形成的影响。**方法** 在声功率5 W下,获得高强度聚焦超声辐照肝癌细胞的温度-时间关系,在某一温度下筛选出高强度聚焦超声不完全消融最佳肝癌细胞亚系并继续培养获得稳定子代。细胞活性实验检测细胞增殖率及热耐受性;划痕实验和Transwell小室侵袭实验检测迁移和侵袭能力;观察内皮细胞管腔形成的变化。**结果** 随着高强度聚焦超声照射时间增加,温度增加,细胞死亡率增加,在48 ℃及以上温度肝癌SMMC7721细胞基本全部死亡,而47 ℃筛选出的SMMC7721肝癌细胞亚系增殖率、热耐受性较正常肝癌细胞增强($P<0.05$),运动能力、侵袭能力无明显变化($P>0.05$);并能促进内皮细胞增殖、迁移和管腔形成($P<0.05$)。**结论** 高强度聚焦超声能够杀灭肿瘤细胞,然而高强度聚焦超声不完全消融会促使肝癌细胞生物学行为转变并能促进血管形成。

[关键词] 肝癌;残余癌;高强度聚焦超声;血管形成
[中图法分类号] R454.3; R73-354; R735.7 [文献标志码] A

Effect of insufficient ablation of high intensity focused ultrasound on hepatoma cells *in vitro*

Zhang Yinglin[1], Chen Jiao[1], Wu Yakun[1], Zhang Wenfeng[1], Zhou Shiji[2], Li Shengwei[1] ([1]Department of Hepatobiliary Surgery, [2]Department of Gastrointestinal Surgery, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the biological behavior and angiogenesis of residual hepatoma cells filtered by insufficient ablation of high intensity focused ultrasound (HIFU). **Methods** The relationship of temperature-time of HIFU irradiation to hepatoma SMMC7721 cells was firstly identified under a sound power of 5 W. Based on the determined temperature, a subline of SMMC7721 cells that can survive from HIFU treatment was screened under HIFU irradiation and then established and expanded. The proliferative rate and heat tolerance of the obtained cell subline was tested by CKK-8 assay, cell migration and invasion was measured by cell scratch assay and transwell chamber assay. **Results** With the time elapse of HIFU irradiation, the temperature was increased and the mortality was increased gradually. All SMMC7721 cells died at 48 ℃. The best cell subline generated at 47 ℃ had higher proliferation rate and stronger heat tolerance than control hepatoma cells ($P<0.05$), but had no significant alteration in movement and infiltration capacities, and could promot the proliferation, migration and lumen formation in human umbilical vein endothelial cells ($P<0.05$). **Conclusion** HIFU radiation can kill hepatoma cells, however, insufficient HIFU ablation results in transformation of some survival cells and promotion of angiogenesis.

[**Key words**] hepatocellular carcinoma; residual carcinoma; high intensity focused ultrasound; angiogenesis

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (81301975). Corresponding authors: Li Shengwei, E-mail: lishengwei11@163.com, Zhou Shiji, E-mail: zhoushiji2002@163.com

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金(81301975)
[通信作者] 李生伟,E-mail:lishengwei11@163.com
周世骥,E-mail:zhoushiji2002@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141204.1625.005.html(2014-12-04)

高强度聚焦超声(high intensity focused ultrasound, HIFU)作为一种无创的、有效的、可重复性的肝癌治疗的新型手段应用于多种良恶性肿瘤的治疗,其疗效确切。其机制是利用超声波聚焦于病变组织发挥热效应、机械效应及空化效应等作用,达到破坏病变组织的目的。随着临床工作的深入,发现 HIFU 治疗肝癌后局部快速复发是影响 HIFU 治疗效果的巨大阻碍。HIFU 消融不完全或不能全部杀灭肿瘤细胞及血供的恢复是造成肿瘤细胞残留及快速复发的重要机制。目前对 HIFU 不完全消融 SMMC7721 肝癌细胞的生物学作用及其对血管形成的影响并没有直接的研究。本研究拟了解 HIFU 不完全消融肝癌细胞的生物学行为改变及其对血管内皮细胞的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞株 人肝癌 SMMC7721 细胞株、人脐静脉内皮细胞株(human umbilical vein endothelial cells,HUVEC)由重庆医科大学生物工程学院惠赠。

1.1.2 HIFU 系统 重庆医科大学超声工程研究所研制,本实验采用声功率 5 W,声波频率 10.10 MHz。

1.1.3 材料与仪器 DMEM 培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司,CCK-8 试剂购自日本同仁公司,Transwell 小室、Matrigel 基质胶购自美国 BD 公司,热电偶温度计(精确度 ±0.1℃)由重庆 HIFU 公司机电部仪表材料研究所研制,聚乙烯试管购自江苏海门三和万红玻璃仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养及细胞悬液制备 人肝癌 SMMC7721 细胞株、HUVEC 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,37 ℃、5% CO_2 常规培养,1 ~ 2 d 换液传代。取对数生长期的细胞消化、吹打充分后制备成浓度为 2×10^6/mL 的细胞悬液,分装到无菌带盖的聚乙烯试管中,每管 2 mL。

1.2.2 HIFU 辐照细胞悬液 将人肝癌细胞悬液分装到 10 只聚乙烯试管中;试管放置于 37 ℃恒温水浴箱预热 10 min,使细胞悬液起始温度为 37 ℃,超声探头与聚乙烯试管底部分别涂上超声耦合剂,完全接触后,超声波由下向上发出连续辐照试管中的细胞悬液。通过放置在试管中央的热电偶温度计连续测温:当温度上升到 40、43、45、46、47、48、49、50、55 ℃时立刻停止照射,观察各温度值所需辐照的时间,37 ℃组予以假照,重复 3 次,于处理后 1 h 0.04% 台盼蓝染色,镜下计数每组的活细胞数计算急性杀伤率。

1.2.3 检测不同温度组肝癌细胞生存状况及形态观察 将上述各个温度组肝癌细胞浓度调整为 4×10^4/mL,取 100 μL 接种于 96 孔板,以上各组重复 6 次,并设置空白孔(只含培养基),分别于 4、24、48、72 h 各时间点加入 10 μL CCK-8 继续培养 2 h,使用酶标仪测定光密度值 $D(450)$,计算细胞活力,绘制细胞相对数-时间曲线。分别取各温度组细胞悬液 50 μL 接种于 24 孔板内,于处理后 1、72 h 观察各个温度组细胞形态。根据细胞相对数-时间曲线及生长情况筛选出最佳肝癌细胞亚系,进行长期培养,获得稳定的肝癌细胞亚系。

1.2.4 增殖率比较 将 HIFU 未处理的肝癌细胞作为对照组,HIFU 处理后筛选的最佳肝癌细胞亚系作为实验组。消化离心,调整细胞浓度为 4×10^4/mL,按每孔 100 μL 接种到 96 孔培养板中,每组设 6 个复孔,分别培养 0、24、48、72 h,加入 CCK-8 继续培养 2 h,使用酶标仪,测定波长为 450 nm,测定光密度值 $D(450)$,重复 3 次,计算细胞相对活力。

1.2.5 划痕实验 取对数生长期的对照组、实验组肝癌细胞消化离心制备细胞悬液。调整细胞浓度为 5×10^5/mL,取 1 mL 接种于 6 孔板内,于 37 ℃,5% CO_2 孵箱中继续培养 SMMC7721 肝癌细胞至相互融合,用 10 μL 枪头垂直于皿底在单层细胞上划痕,造成培养细胞伤口模型,划痕后用 PBS 液轻柔漂洗 3 次,加入无血清的 DMEM 培养基后放入 37 ℃、5% CO_2 培养箱继续培养,于 0、24 h 倒置显微镜下观察并拍照。

1.2.6 侵袭实验 予 Transwell 小室铺上 Matrigel 基质胶。取对数生长期的对照组、实验组肝癌细胞消化离心制备细胞悬液。无血清培养液调整细胞浓度为 5×10^5/mL,取细胞悬液 200 μL 加入 Transwell 小室,下室加入 500 μL 含 10% 胎牛血清的培养基,培养 24 h 后,取出侵袭小室结晶紫染色,每组重复 3 次。用倒置显微镜拍照并随机计数 5 个视野(×100)中的细胞。以侵袭细胞的相对数表示肿瘤细胞的侵袭力。

1.2.7 热耐受性比较 取对数生长期的对照组、实验组肝癌细胞消化离心,调整细胞浓度为 4×10^4/mL,按每孔 100 μL 接种到 96 孔培养板中,每组设 6 个复孔,并设空白孔(只含培养基),培养箱培养过夜,将 96 孔培养板封闭完全后置于 49 ℃和 50 ℃恒温水浴箱热处理 10 min,分别于热处理后 4、24、48 h,加入 CCK-8 溶液,继续培养 2 h,使用酶标仪,测定波长为 450 nm 的光密度 $D(450)$值,每组重复 3 次。计算细胞相对活力。

1.2.8 人脐静脉内皮细胞活力检测 待对照组、实

验组肝癌细胞细胞铺完 90% 后，予以更换含 0.1% 胎牛血清培养基，置于 37 ℃、5% 的 CO_2 培养箱培养 14 h，3 000 r/min，20 min，离心收集培养液，置于 −80 ℃ 保存。取对数生长期的 HUVEC 消化离心，调整细胞浓度为 1×10^5/mL，取 100 μL 接种到 96 孔培养板中，每组设 6 个复孔，培养箱培养过夜，去除培养液，加入收集的对照组、实验组培养液培养 24 h，加入 CCK-8 溶液，继续培养 2 h，使用酶标仪，测定波长为 450 nm，测定光密度 D(450)值，每组重复 3 次，计算细胞相对活力。

1.2.9　人脐静脉内皮细胞迁移实验　　将对数生长期的 HUVEC 消化离心，无血清培养液调整细胞浓度为 5×10^5/mL，取细胞悬液 100 μL 加入 Transwell 小室，再添加无血清培养液 100 mL；下室加入收集的对照组、实验组培养液培养 12 h，取出侵袭小室结晶紫染色，每组重复 3 次，倒置相差显显微镜下（×100）照相计数。

1.2.10　人脐静脉内皮细胞小管成形实验　　将对数生长期的 HUVEC 消化离心，使用收集的对照组、实验组培养液重悬调整细胞浓度为 2×10^5/mL，取细胞悬液 100 μL 加入到铺好 Matrigel 基质胶的 96 孔培养板，培养 6 h，每组重复 3 次。倒置相差显微镜下任选 5 个视野（×100）计算小管长度。

1.3　统计学方法

应用 SPSS 19.0 统计软件进行统计分析，数据均采用 $\bar{x}\pm s$，以单因素方差分析计算多组间差异，两两比较采用 q 检验。

2　结果

2.1　高强度聚焦超声辐照细胞悬液的温度时间关系

在超声强度一定的前提下，高强度聚焦超声辐照 SMMC7721 肝癌细胞悬液，随着辐照时间延长，温度增高（图 1），其对细胞的杀伤作用增强，台盼蓝染色计算急性死亡率结果如图 2。

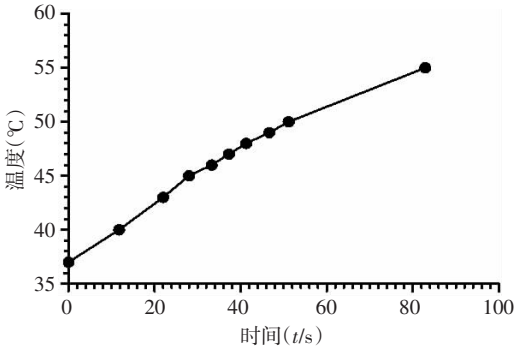


图 1　HIFU 辐照的温度-时间关系

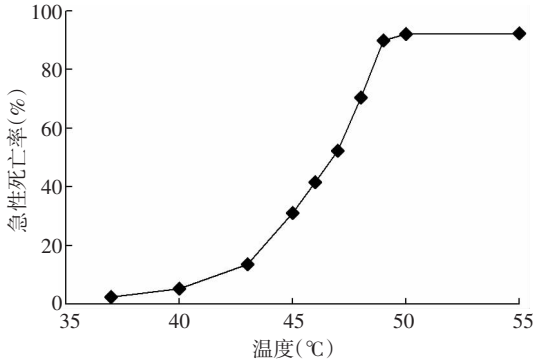


图 2　不同温度下细胞急性死亡率分析

2.2　各个温度组 SMMC7721 肝癌细胞生存状况

在超声强度一定的前提下，比较处理后各个温度组在 4、24、48、72 h 时的细胞相对数（图 3）。我们发现高强度聚焦超声处理后肝癌细胞的 3 种不同生存状态，在 37 ~ 43 ℃之间细胞增殖未受明显抑制，可持续增殖；在 45 ~ 47 ℃之间细胞增殖明显受到抑制，一些残留的肝癌细胞培养 72 h 后仍能存活下来并增殖；在 48 ℃及以上温度肝癌细胞会逐渐或立即死亡，通过此实验能得到明显的细胞生存界限。随着辐照时间延长，温度增高，细胞活力逐渐降低，增殖抑制率明显增强，细胞死亡率增高。其杀伤率与 HIFU 剂量呈正相关。通过形态观察发现随着温度升高，细胞死亡率增高，结果与 CCK-8 检测结果相近。而死亡细胞的形态改变主要表现为体积变小变圆，胞浆内的颗粒增多、空泡形成，并伴随温度增高细胞碎片增多。经过 72 h 培养后，温度越高组贴壁细胞形态变化较 HIFU 未处理肝癌细胞越明显（图 4）。

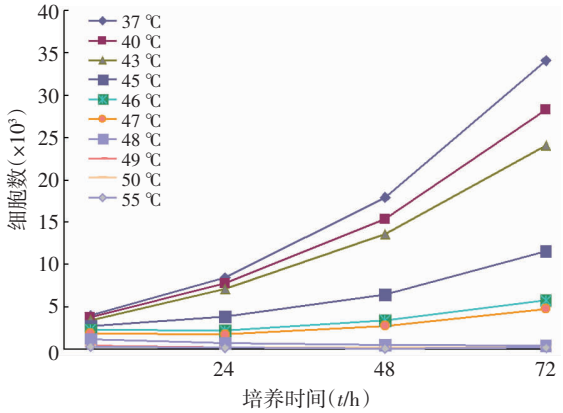


图 3　不同温度下细胞生长曲线

2.3　增殖率比较

根据前期研究，发现高强度聚焦超声辐照肝癌细胞会出现明显的存活界限，即 SMMC7721 肝癌细胞的存活界限为 47 ℃，为了发挥最大的高强度聚焦超声效应，我们选择此温度组细胞作为实验组进行细胞生物

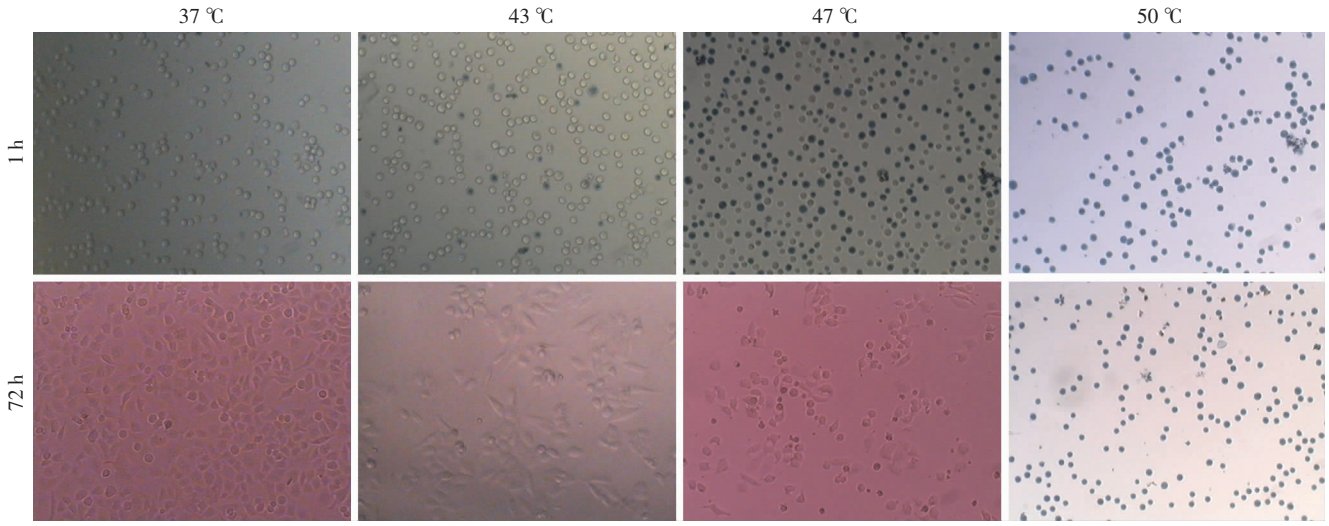
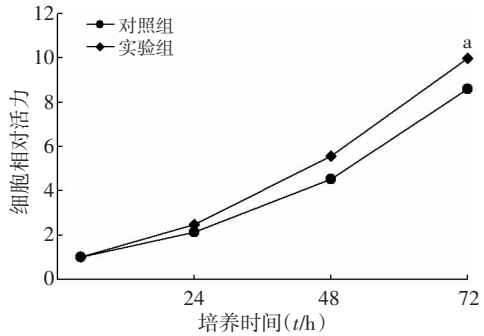


图4 不同温度下细胞形态变化(×100)

学行为的研究,将此实验组细胞与对照组细胞在4、24、48、72 h时间点的增殖率进行比较,发现高强度聚焦超声不完全消融筛选出肝癌细胞亚系增殖率较对照组增高($P<0.05$,图5)。



a:$P<0.05$,与对照组比较

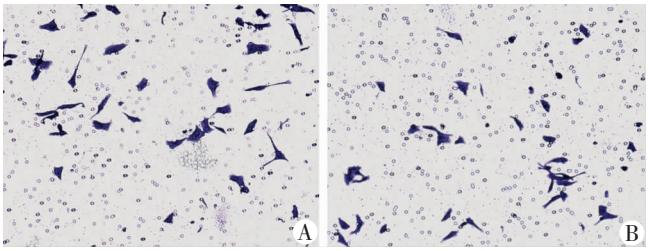
图5 HIFU未处理肝癌细胞(对照组)和处理后肝癌细胞(实验组)的比较

2.4 HIFU对人肝癌细胞运动能力的影响

肝癌细胞亚系的运动能力与对照组无明显差异($P>0.05$,图6)。

2.5 HIFU对人肝癌细胞侵袭能力的影响

肝癌细胞亚系的侵袭能力与对照组相比无明显差异($P>0.05$,图7)。

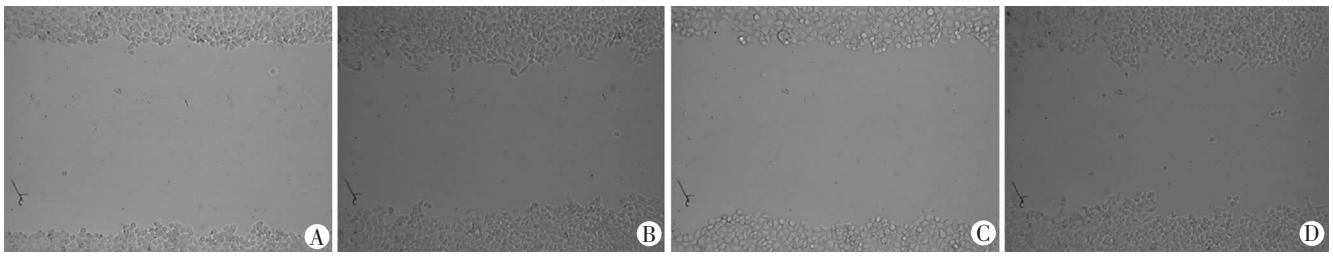


A:对照组;B:实验组

图7 HIFU未处理肝癌细胞(对照组)和处理后肝癌细胞(实验组)侵袭能力比较 (结晶紫 ×100)

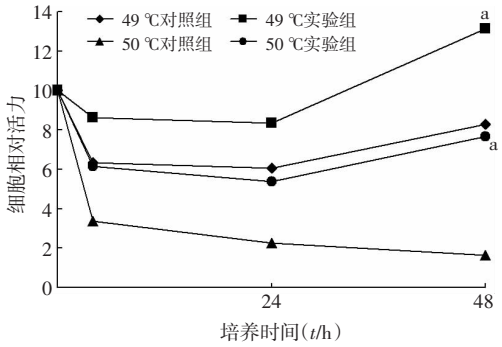
2.6 热敏实验

在49 ℃和50 ℃的热处理下,实验组细胞较对照组细胞具有更高的存活率,并能继续增殖,说明实验组细胞较对照组有更高的热耐受性,差别有统计学意义($P<0.05$,图8)。



A:对照组0 h;B:对照组24 h;C:实验组0 h;D:实验组24 h

图6 HIFU未处理肝癌细胞(对照组)和处理后肝癌细胞(实验组)运动能力比较 (×100)

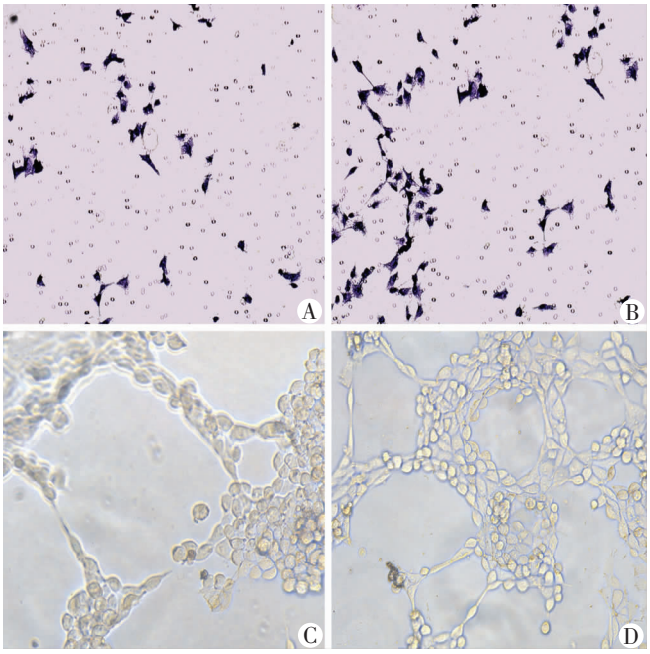


a:$P<0.05$,与对照组比较

图 8 HIFU 未处理肝癌细胞(对照组)和处理后肝癌细胞(实验组)热耐受性比较

2.7 肝癌细胞株亚系能够促进血管形成

相对于对照组,实验组 HUVEC 细胞活力增高 12.3%,实验组培养液对 HUVEC 的活力、迁移、小管成形能力有更强的促进作用,两组的差异有统计学意义($P<0.05$,图 9),说明残留的肝癌细胞具有更强的促血管形成作用。



A、B:分别为对照组、实验组 HUVEC 迁移能力比较;C、D:分别为对照组、实验组 HUVEC 管腔成形能力比较

图 9 HUVEC 经两组细胞上清液处理后的变化 (×100)

3 讨论

原发性肝细胞癌是消化系统中常见的具有高发病率、病情隐匿、预后凶险等临床特征的恶性肿瘤[1]。外科手术虽能提供更好的远期生存疗效,但诸多因素使得适合和接受手术者仅为 20% 左右[2]。近 10 年来,HIFU 作为肝癌局部治疗手段,利用超声波聚焦于病变组织发挥热效应、机械效应及空化效应等,达到破坏病变组织的目的[3]。同时患者对 HIFU 治疗具有更好的耐受性等优势[4],对巨块型、多结节型肝癌均可治疗并取得了很好的疗效,已成为最有前途的肝癌辅助治疗方法之一[5]。但是局部快速复发及转移是影响 HIFU 治疗效果的巨大阻碍,我们发现 HIFU 治疗肝癌时存在以下缺陷。①HIFU 治疗系统所使用的超声实时监测存在监测偏差,使残留病灶未被完全破坏[6]。②血液流动具有冷却效应,从而降低组织内热沉积效率,使聚焦点升温缓慢,而生物学焦域的限制,使热能分布不均匀,造成肿瘤内部残留血供及岛状癌灶存在。③由于 HIFU 治疗是以点线扫描方式进行辐照消融从而造成治疗盲点,残留存活的肝癌细胞。④呼吸运动造成病灶投射靶点的偏差。同时,我院 HIFU 中心越来越多地注意到,HIFU 治疗后残留癌可发生快速进展,在短时间内形成肝内外转移,但具体分子机制还亟待进一步研究。

综上所述,HIFU 消融不完全或不能全部杀灭肿瘤细胞及血供的恢复是造成肿瘤细胞残留及快速复发的重要机制。

Kojiro 等[7]已证实 HCC 的恶性进展在一定程度上与治疗相关。但对这一说法没有强有力的证据。相对于其他研究,我们的研究致力于亚致死剂量的高强度聚焦超声对癌细胞的影响,能重复不完全消融的效果,高热温度较高,持续时间较短,并侧重于处理后肝癌细胞的生物学行为的远期研究。本研究在一定超声强度下,通过 HIFU 不完全消融筛选出残留 SMMC7721 肝癌细胞,探讨其生物学行为改变及对血管形成的影响。结果发现随着作用时间的延长,细胞悬液的温度逐渐升高,对细胞的杀伤作用也逐渐增强,在声功率为 5 W 时,悬液温度升到 43 ℃时肝癌细胞便可出现部分死亡(13. 11%),当悬液温度达到 48 ℃癌细胞急性死亡率达 70.04%,后期全部死亡。而单纯的热效应并不能在短时间能对细胞产生如此明显的杀伤作用,这也证明了 HIFU 对肝癌细胞的杀伤作用不仅有热效应,还有机械效应和空化效应,从而在短时间内能对癌细胞造成明显的杀伤,此外,对细胞的损伤还有迟发效应[8]。同时肝癌细胞亚系相对于未处理肝癌细胞表现出更强的增殖能力及热耐受能力。而文献[9]研究也证实了热处理后会促进肝癌细胞的恶性进展。此研究结果说明 HIFU 不完全消融残留的肝癌细胞的生物学行为发生变化。本研究目前集中在宏观现象的观察,而残留的细胞是否会在 HIFU 不完全消融的筛选压力下引起细胞基因蛋白的改变,从而出现上述改变有待进一步证实。

肝癌细胞无限制的增殖及血管新生对肝癌的生

长、转移乃至预后都有极其重要的影响。肝癌是一个血管富集的肿瘤,目前研究已经证实肝癌生长直径超过0.5 mm会诱导血管内皮细胞增殖并促进癌组织进一步恶化[10],因此血管新生在肝癌发生、发展过程中起着举足轻重的作用。若能证实残留肝癌细胞对血管内皮细胞的影响,必能为HIFU治疗肝癌快速复发提供依据。我们的研究揭示相比于未用HIFU处理的肝癌细胞,肝癌细胞亚系对内皮细胞的增殖、迁移、小管形成都有一定促进作用,拥有更强的促血管形成作用。而VEGF是目前发现的作用最强、特异性最高的血管生长因子之一,VEGF及VEGFR的信号转导通路的活化可刺激血管内皮细胞增殖、迁移、在肝癌血管生成并促进肿瘤生长、转移和预后中发挥了重要作用[11-12]。亚系肝癌细胞表达VEGF的水平是否增高有待进一步证实。我们先前的动物实验也证实高强度聚焦超声不完全消融会促进血管形成[13]。很明显HIFU不完全消融后残余肝癌组织快速生长的机制值得进一步探讨。

虽然细胞性能转变的确切机制仍不清楚,但是我们的数据支持来自于聚焦超声的物理能量能影响HCC的临床进程。而我们的研究并没有否认HIFU的重要性。同时表明HIFU治疗肝癌应以杀死所有癌细胞为目的。虽然我们并没有对其机制进行深入了解,而我们的数据提示不完全高强度聚焦超声消融可能会进一步促进肝癌的恶性转变并导致不利预后。

参考文献:

[1] Jemal A, Bray F, Center M M, *et al*. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.

[2] Lau W Y, Lai E C. The current role of radiofrequency ablation in the management of hepatocellular carcinoma: a systematic review[J]. Ann Surg, 2009, 249(1): 20-25.

[3] Zhang L, Zhu H, Jin C, *et al*. High-intensity focused ultrasound (HIFU): effective and safe therapy for hepatocellular carcinoma adjacent to major hepatic veins[J]. Eur Radiol, 2009, 19(2): 437-445.

[4] Cheung T T, Chu F S, Jenkins C R, *et al*. Tolerance of high-intensity focused ultrasound ablation in patients with hepatocellular carcinoma[J]. World J Surg, 2012, 36(10): 2420-2427.

[5] Zhang L, Wang Z B. High-intensity focused ultrasound tumor ablation: review of ten years of clinical experience[J]. Front Med China, 2010, 4(3): 294-302.

[6] Yu T, Xu C. Hyperecho as the indicator of tissue necrosis during microbubble-assisted high intensity focused ultrasound: sensitivity, specificity and predictive value[J]. Ultrasound Med Biol, 2008, 34(8): 1343-1347.

[7] Kojiro M, Sugihara S, Kakizoe S, *et al*. Hepatocellular carcinoma with sarcomatous change: a special reference to the relationship with anticancer therapy[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 1989, 23(Suppl): S4-S8.

[8] 高尚梅, 赖春冬, 王智彪. 高强度聚焦超声致培养肿瘤细胞的温升效应[J]. 中国超声医学杂志, 2001, 17(1): 4-6.

[9] Kong J, Kong J, Pan B, *et al*. Insufficient radiofrequency ablation promotes angiogenesis of residual hepatocellular carcinoma *via* HIF-1alpha/VEGFA[J]. PLoS One, 2012, 7(5): e37266.

[10] Zhu A X, Duda D G, Sahani D V, *et al*. HCC and angiogenesis: possible targets and future directions[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2011, 8(5): 292-301.

[11] Shibuya M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis[J]. J Biochem Mol Biol, 2006, 39(5): 469-478.

[12] 周亮,王德盛,赵辉,等. EphA3通过调控VEGF参与肝癌细胞侵袭的机制[J]. 中华消化外科杂志, 2014, 13(3): 207-212.

[13] Wu L, Fu Z, Zhou S, *et al*. HIF-1α and HIF-2α: siblings in promoting angiogenesis of residual hepatocellular carcinoma after high-intensity focused ultrasound ablation[J]. PLoS One, 2014, 9(2): e88913.

(**收稿**:2014-08-24;**修回**:2014-10-19)

(编辑 邓强庭)

《第三军医大学学报》2015年第4期"埃博拉病毒病防治"特别报道预告

1. 利比里亚埃博拉防控指挥协调体系特点分析…… 王云贵
2. 从埃博拉出血热到埃博拉病毒病:更新认识、科学救治…… 毛 青
3. 埃博拉病毒病之病原学…… 饶贤才
4. 5例埃博拉病毒病患者的临床特征分析 …… 向德栋
5. 儿童埃博拉病毒病的诊治策略…… 陈 盛
6. 埃博拉病毒病实验室检测方案的规划与实践…… 黄 庆
7. 增加埃博拉病毒病隔离病房个人防护装备的必要性探讨…… 游建平