DOI:10.16016/j.1000-5404.201511184

低频超声联合微泡增强宫颈癌 Hela 细胞对顺铂敏感性的实验研究

朱 燕[1,2],刘 政[3],杨 鹰[2],颜 苹[2],贾化平[1],梁会泽[1] (100101 北京,安徽医科大学解放军 306 临床学院[1];400037 重庆,第三军医大学新桥医院妇产科[2],超声科[3])

[摘要] **目的** 研究低频率、低声压超声激励微泡增强顺铂对宫颈癌 Hela 细胞的杀伤作用。**方法** 实验分为对照组(C 组),顺铂组(P 组),顺铂联合超声组(PU 组),超声微泡组(UM 组),超声微泡联合顺铂组(PUM 组)。采用频率 1MHz、声压 400 kPa 的非聚焦超声联合脂质微泡及顺铂,按照分组处理对数期生长的宫颈癌 Hela 细胞。Hoechst33342 染色后通过荧光显微镜观察并计算各组细胞的凋亡率;采用 Cell Counting Kit-8(CCK-8)法检测处理后各组细胞的增殖活性;对各组细胞行 Annexin V-FITC/PI 双染色后,运用流式细胞仪检测各组处理后 24 h 细胞凋亡情况。**结果** 测定 Hela 细胞对顺铂的敏感性,顺铂的 IC_{50}为 4.882 μg/mL。通过流式细胞仪检测到超声微泡顺铂组(PUM)的细胞凋亡率为 58.1%,较顺铂联合超声组(PU)增高 40%,明显高于其余各组,组间差异有统计学意义($P<0.05$);CCK-8 检测结果显示 PUM 组较其余各组细胞生长明显受到抑制;Hoechst33342 染色后,PUM 组典型凋亡细胞明显多于其余各组。**结论** 低频率低声压超声联合微泡可以增强顺铂对宫颈癌 Hela 细胞的杀伤作用,明显抑制 Hela 细胞生长,促进其凋亡。

[关键词] 低频超声;微泡;肿瘤化疗;宫颈癌;Hela 细胞
[中图法分类号] R454.3; R737.33; R979.19 [文献标志码] A

Low-frequency ultrasound combined with microbubble agent enhances cytotoxicity of cisplatin to Hela cells

Zhu Yan[1,2], Liu Zheng[3], Yang Ying[2], Yan Ping[2], Jia Huaping[1], Liang Huize[1] ([1]Department of Special Diagnosis, The 306 Clinical College of Anhui Medical University, Beijing, 100101; [2]Department of Obstetrics and Gynecology, [3]Department of Ultrasonography, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the antitumor effect of ultrasound-mediated chemotherapy, i.e. combination of microbubble agent and cisplatin exposing to low-intensity/low-frequency ultrasound, on human cervical cancer Hela cells. **Methods** Hela cells were divided into 5 groups: control group (C), cisplatin group (P), cisplatin combined ultrasound group (PU), microbubble enhanced ultrasound (UM), and cisplatin combined microbubble ultrasound group (PUM). Nonfocused ultrasound with 1MHz frequency and 400 kPa acoustic pressure was applied to treat the cells in log-phrase of growth. Cell apoptosis was measured by Hoechst33342 staining. Cell proliferation rate was examined by CCK-8 assay. The proportion of cell apoptosis was determined by flow cytometry after cell were treated for 24 h and double-stained with Annexin V-FITC/PI. **Results** The IC_{50} of cisplatin was 4.882 μg/mL in Hela cells. Flow cytometry analysis showed that apoptosis of PUM group was significantly higher than other groups ($P<0.05$). The apoptotic rate of PUM group was 58.1%, which was 40% higher than that in PU group. Cell growth was markedly inhibited in PUM group compared with other group detected by CCK-8 assay. Also, the apoptotic cells had typical morphological changes observed with inverted fluorescence microscope after Hoechst33342 staining. **Conclusion** Low-intensity and low-frequency ultrasound combined with microbubble agent can enhance the cytotoxicity of

[基金项目] 国家自然基金面上项目(81227004)
[通信作者] 梁会泽,电话:(010)66356115,E-mail:lianghuize@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160131.1127.001.html(2016-01-31)

cisplatin to Hela cells by inhibiting proliferation and promoting apoptosis.

[**Key words**] low-frequency ultrasound; sensibilization chemotherapy; cervical carcinoma; Hela cells

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81227004). Corresponding author: Liang Huize, Tel: 86-10-66356115, E-mail: lianghuize@126.com

宫颈肿瘤是女性常见肿瘤,其发病率高,全球年发病例数46 000,其中发展中国家占80%,我国每年新发病例占全球新发病例近30%,经过规范化治疗,其5年生存率达80%[1]。传统的宫颈癌治疗方式为实施子宫及盆腔根治性切除手术,近年来随着宫颈癌发病日趋年轻化,患者对生育及生活质量的要求逐渐增高,因此化学治疗逐渐受到重视,化疗后宫颈肿瘤的手术切除率约为48%~100%,5年生存率约为83%明显高于行传统手术及放疗的5年生存率(40%~50%)[2]。但肿瘤对化疗耐药反应及化疗药物的毒副作用使化疗应用受到限制,有学者曾利用超声增强化疗药物对肿瘤的杀伤作用,同时通过降低化疗药物的用量而减轻化疗对正常细胞的毒副作用[3]。本课题组前期研究发现不同强度、不同频率的超声波联合微泡介导的空化效应能对肿瘤内部微小血管产生不同程度的影响,高声压超声波多数造成肿瘤血管的损毁,血栓形成,肿瘤细胞结构破坏,低声压超声波可使肿瘤血管扩张,肿瘤血流灌注增强[4];此外,低能量超声产生的空化效应可以避免高声压高能量超声对细胞产生的直接破坏,如使细胞破裂,坏死[5]。因此,低频率低声压超声以其较小的副作用为优势更具有临床应用价值。本实验中,运用低频率低声压超声联合微泡辅助顺铂作用于宫颈癌Hela细胞,通过检测细胞的增殖凋亡情况研究超声联合微泡增强宫颈癌化疗的可行性。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

人宫颈癌细胞株Hela由第三军医大学新桥医院中心实验室惠赠,DMEM高糖细胞培养基、胎牛血清、0.25%胰酶、青霉素-链霉素双抗、磷酸盐缓冲液(Hyclone,USA),细胞增殖与活性检测试剂盒(Dojindo,Japan),“脂氟显”微泡造影剂为第三军医大学新桥医院超声科自制并由刘政教授惠赠,核心气体为全氟丙烷,平均粒径2 μm,浓度约为(4~9)×10^9/mL,顺铂(大连美仑),Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒(BD,USA),Hoechst33342(碧云天);仪器:新型数字化超声空化治疗仪(DCT-700型,深圳市威尔德医疗电子有限公司生产),倒置荧光显微镜(Olympus CKX41),酶标仪(Bio-Rad),CO_2恒温细胞培养箱,流式细胞仪(BD FACSCalibur)。

1.2 分组与方法

1.2.1 细胞培养及分组 人宫颈癌Hela细胞在DMEM(Dulbecco's modified eagle medium,改良杜氏伊格尔培养基)中培养,培养基含有10%的胎牛血清和1%青霉素-链霉素,并置于37 ℃、5% CO_2孵箱中培养,每2~3 d传代1次,取对数生长期的Hela细胞以0.25%胰酶消化后,制备单细胞悬液用于实验;实验分为5组,顺铂组(P),超声+顺铂组(PU),超声+微泡+顺铂组(PUM),超声+微泡组(UM),空白对照组(C)。

1.2.2 超声辐照参数 使用深圳市威尔德公司生产超声空化治疗仪,治疗头截面呈圆形,面积2.5 cm^2,为平面式换能器,本实验将超声探头水平置于细胞培养皿液面内,与培养皿底部保持5~10 mm间距,并匀速旋转探头均匀辐照肿瘤细胞;超声参数设置为频率1 MHz,声压400 kPa,占空比1%,辐照时间60 s。

1.2.3 测定顺铂对Hela细胞的毒性作用及其联合超声微泡对细胞增殖活性的影响 将顺铂标准品溶解于生理盐水中,使用细胞培养液稀释药物,使其终浓度分别为15、10、7.5、5、2.5、1 μg/mL,每组设3个复孔。取8×10^3/孔细胞接种于96孔板中,设立空白对照组,于37 ℃,5% CO_2孵箱中培养24 h后,弃去培养基,加入CCK-8溶液10 μL,37 ℃,5% CO_2孵育1 h。用酶标仪检测各孔波长450 nm处光密度(A)值,并取平均值,同时设以空白培养基为对照,按公式计算细胞增殖率,计算细胞增殖抑制率=[(实验组A值-阴性对照组A值)/阴性对照组A值]×100%。用IC_50计算软件计算出50%抑制浓度(IC_{50},half maximal inhibitory concentration),为后续实验提供浓度参考。

取对数生长期细胞用于增殖活性测定实验,按照实验分组:顺铂组(P)使用顺铂终浓度为半数抑制浓度4.882 μg/mL的培养液7 mL培养Hela细胞;超声+顺铂组(PU)在细胞培养皿内加入含4.882 μg/mL顺铂的等量培养基后进行超声辐照;超声+顺铂+微泡组(PUM)在细胞培养皿中同时加入含4.882 μg/mL顺铂和10^6/mL微泡的等量细胞培养液后进行超声辐照;超声+微泡组(UM)仅在培养基中加入10^6/mL微泡后进行超声辐照;空白对照组(C)加入等量培养液。将上述处理后的细胞接种于96孔板,每孔100 μL,每组设3个复孔。放入孵箱继续培养,分别检测24、48、

72、96 h Hela 细胞的增殖情况。

1.2.4　流式细胞仪检测及 Hoechst33342 染色评价细胞凋亡　　取对数生长期的 Hela 细胞按照 8×10^5/皿接种于细胞培养皿中,按照前述分组、处理细胞并置于孵箱中培育 24 h,收集所有悬浮及贴壁细胞,进行 Annexin V-FITC/PI 双染色,使用流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况。

将 P 组,PU 组,PUM 组,UM 组,C 组细胞弃去培养基,PBS 漂洗 2 次后加入 Hoechst33342 染液 1 mL,37 ℃孵箱染色 30 min 后,使用荧光显微镜观察并摄像,每组均随机选取高倍镜下 5 个视野,计数凋亡细胞个数,并根据每个视野镜下凋亡细胞数/每个视野镜下细胞总数 = 细胞凋亡率,比较各组细胞凋亡情况。

1.3　统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,根据直线回归方程计算药物 50% 抑制浓度(IC_{50}),使用 SPSS 18.0 软件进行统计分析,两组间比较行独立样本 t 检验,两组以上的比较行单因素方差分析。

2　结果

2.1　顺铂对 Hela 细胞的毒性作用的测定

CCK-8 检测结果显示,用不同浓度的顺铂处理细胞 24 h 后,细胞增殖受到不同程度的抑制,并且随着顺铂浓度的增加细胞的毒性作用增强。浓度为 15、10、7.5、5、2.5、1 μg/mL 的顺铂作用 Hela 细胞 24 h 后的抑制率分别为:71%、71%、69%、58%、20%、18%。通过终浓度抑制率回归曲线图计算得出其 IC_{50} 值为 4.882 μg/mL(图 1)。

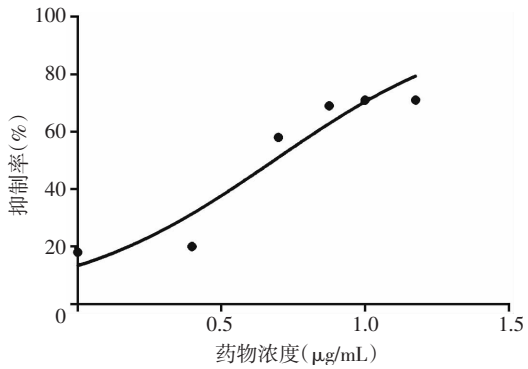
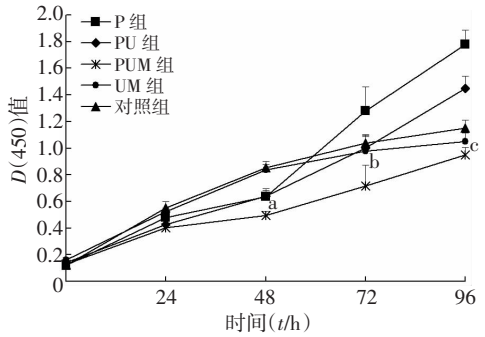


图 1　药物浓度-抑制率曲线图

2.2　各处理组细胞的增殖活性检测

分别检测各组细胞在 24、48、72、96 h 时生长情况,发现 PUM 组的生长明显受到抑制,增殖速度减慢,P 组和 PU 组的肿瘤细胞在 48 h 前生长缓慢,48 h 时,PUM 组、PU 组、P 组的抑制率分别为 59%、42%、42%,但 48 h 后生长速度明显加快,呈现持续的快速增长,对照组和 UM 组生长趋势大致相同无明显差异,此外,P 组及 PU 组细胞增殖活性分别在 60、72 h 超过不含顺铂的对照组及 UM 组,而 PUM 组在 48 h 增殖活性稍有增高,但与对照组及 UM 组相比无明显增殖优势(图 2)。

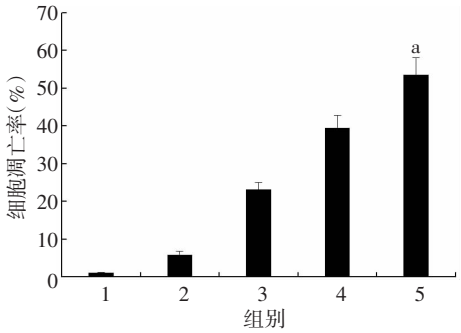


a:$P<0.05$,与同时间点的对照组、UM 组比较;b:$P<0.05$,与同时间点的 P、PU 组比较

图 2　Control、UM、P、PU、PUM 在 24、48、72、96 h 的细胞生长增殖图

2.3　各处理组细胞的凋亡检测

超声 + 顺铂 + 微泡组(PUM)在处理后 24 h 细胞凋亡率(Annexin V + PI- + Annexin V + PI +)为 58.1%,单纯顺铂组(P)和顺铂 + 超声组(PU)的凋亡率分别为 25.3%、41.5%,对照组(C)和超声 + 微泡组(UM)的凋亡不明显,根据图 3,比较各组凋亡率,可见 PUM 组肿瘤细胞凋亡明显高于 P 组、PU 组,各组差异均有统计学意义($P<0.05$)(图 3)。

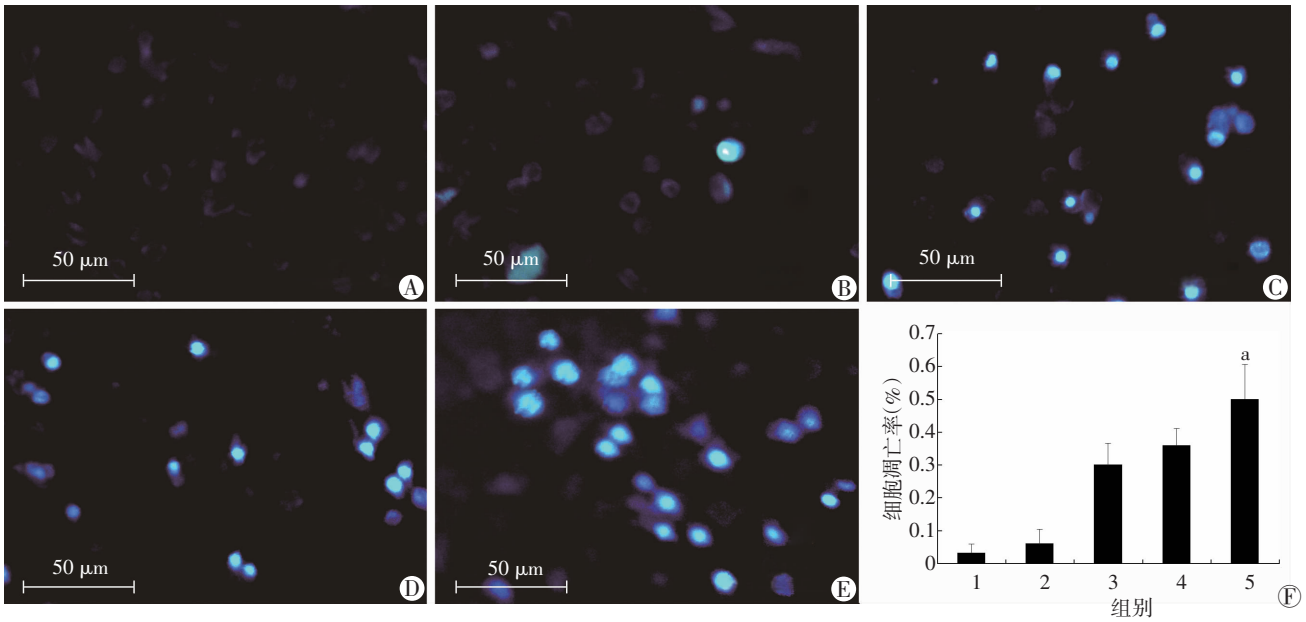


1:对照组;2:UM 组;3:P 组;4:PU 组;5:PUM 组

a:$P<0.05$,与其他各组的凋亡率比较

图 3　流式细胞仪分析各组细胞凋亡

Hoechst33342 染色后通过荧光显微镜观察 A 细胞分布均匀,图中可见弥漫的正常细胞核的低强度荧光,B 可见仅有数个细胞胞核呈浓染致密的固缩状态,显示为高强度荧光,C、D、E 显示凋亡细胞数量逐渐增多,细胞染色质密度增高,细胞核明显固缩、凝聚,形成典型的凋亡细胞,胞核蓝染高亮,且这类细胞在 PUM 组明显增多(图 4)。



A:正常 Hela 细胞;B:超声联合微泡处理后(UM);C、D、E:分别为 P 组,PU 组,PUM 组;F:高倍镜下细胞计数分析,分析各组细胞凋亡比例 1:对照组;2:UM 组;3:P 组;4:PU 组;5:PUM 组;a:$P<0.05$,与其他各组细胞凋亡数相比

图 4 Hoechst33342 染色检测细胞凋亡

3 讨论

目前,超声联合微泡在临床肿瘤中的应用已不仅仅局限于对肿瘤的观察及诊断,其对肿瘤的治疗作用也逐渐崭露头角[6],以往的研究多是通过高声压高能量超声对肿瘤细胞造成损伤,损毁肿瘤微血管从而达到治疗肿瘤的目的[7],有学者发现低声压[8-9]产生的空化效应也会对细胞膜产生影响,易化药物进入肿瘤细胞而发挥作用,从而增强细胞毒性。国外的学者[10]使用低声压超声辐照头颈部鳞癌细胞系,认为微泡联合超声治疗(microbubble-mediated ultrasound therapy, MB-UST)能增强细胞膜对一种小分子荧光素的摄取,他们又使用荧光标记化疗药物,发现用超声联合微泡辐照组与单药治疗组相比,细胞内药物增加 28%。Kotopoulis 等[11]将 MB-UST 使用在胰腺癌化疗的患者中,经超声联合微泡治疗后的 10 例患者中,2 例生存期超过 1 年,与胰腺癌传统化疗的生存期(仅 3 ~ 6 个月)相比,MB-UST 显示出明显的优势,并使得此项研究备受关注;并且低声压超声激励联合化疗是诱导肿瘤细胞发生改变而增加其对化疗药物的敏感性,与通过超声击破载药微泡[12]的给药方式相比具有明显的优势,因后者药物装载有限,超声联合微泡的作用时间也受限制,制约了其使用范围,也较难达到预期治疗效果。

铂类药物是目前治疗妇科肿瘤最为有效的化疗药物之一,有文献报道其反应率高达 23% ~ 50%,宫颈癌的化疗方案中,以顺铂为基础的联合方案应用最广泛[13]。2015 年美国 NCCN 指南中针对宫颈癌的化疗无论是联合化疗还是单药化疗均将顺铂作为一线用药治疗复发或转移的宫颈癌患者[14]。尽管如此,顺铂耐药是制约其应用的一个重要因素,在卵巢癌中因铂类药物耐药,有 62% 卵巢癌患者最终复发或疾病持续存在[15],但耐药作用分子机制复杂,至今尚未明确。低频率低声压超声微泡联合顺铂的化疗对手术前需要利用化疗来局限病灶,缩小肿块的患者可能有着较为重要的临床意义,为此,本研究通过体外实验证实超声联合微泡能影响化疗药物作用下肿瘤细胞的增殖和凋亡。通过分析肿瘤细胞的增殖曲线,48 h 时,顺铂组(P)、顺铂 + 超声组(PU)、顺铂 + 超声微泡(PUM)细胞生存率分别为 75%、75%、58%,48 ~ 72 h,单纯顺铂组(P)及顺铂 + 超声组(PU)肿瘤细胞的增殖出现加快趋势(在此期间增殖率分别增加了 49%、36%),推测是由于肿瘤细胞对顺铂产生了一定程度上的耐药引起的,相比之下,超声 + 微泡 + 顺铂组(PUM)的肿瘤细胞增殖速度改变不明显(增殖率增加了 30%),72 h 后,单纯顺铂组(P)和顺铂 + 超声组(PU)的细胞增殖活性已明显超过对照组(C)和超声 + 微泡组(UM),而顺铂 + 超声微泡组(PUM)细胞仍增殖缓慢,数量较少,这可能是由于超声微泡联合顺铂的处理方案延缓

了肿瘤细胞的耐药现象的产生。关于低频超声联合微泡介导的化疗对凋亡的影响,有学者认为与胞内药物浓度密切相关。董虹美等[3]运用高效液相色谱法测定各组细胞内化疗药物浓度,同样发现超声联合微泡作用后细胞内药物浓度为0.58 μg/mL,较单纯药物组0.39 μg/mL有了明显增高,这可能与超声联合微泡产生"空化效应"密切相关,即微泡在超声波作用下谐振,发生压缩膨胀、破碎等一系列形态变化,并在此过程中使肿瘤细胞膜表面产生大量微小孔隙,促进细胞的内吞作用,改变细胞膜表面的酶活性,使药物能快速大量进入细胞内,致使细胞凋亡增加。通过对各组处理后的细胞进行Hoechst33342染色及Annexin V+PI染色流式细胞仪分析,超声+微泡联合顺铂作用后,出现较多的典型凋亡肿瘤细胞,或许是由超声联合微泡增强了肿瘤细胞对药物的摄取而引起的。本部分结果也进一步印证了董虹美等的研究结论。另外有数据显示超声的频率、作用时间及药物剂量是影响凋亡和增殖的关键因素。Yang等[16]通过研究在超声微泡作用下阿霉素对K562细胞的毒性作用,比较了不同药物剂量,不同超声作用时间及频率对细胞的不同影响,发现超声频率轻微增加可增强阿霉素的抗肿瘤作用,延长超声作用时间同样可增强药物的疗效;这提示我们在低频超声联合微泡介导的宫颈癌化疗的基础理论研究中,超声辐照的强度、辐照持续时间、微泡造影剂浓度,微泡大小与空化作用的效应强度及作用的相关性仍需给予更多的关注并深入探讨研究。

参考文献:

[1] Partridge E E, Abu-Rustum N, Giuliano A, *et al*. Cervical cancer screening[J]. J Natl Compr Canc Netw, 2014, 12(3): 333-341.

[2] Dottino J A, Cliby W A, Myers E R, *et al*. Improving NCCN guideline-adherent care for ovarian cancer: Value of an intervention[J]. Gynecol Oncol, 2015, 138(3): 694-699. DOI: 10.1016/j.ygyno.2015.06.013

[3] 董虹美, 王志刚, 冉海涛, 等. 低频超声辐照微泡造影剂增强米托蒽醌对乳腺癌细胞的毒性作用[J]. 中国医学影像技术, 2010, 26(3):401-404. DOI: 10.13929/j.1003-3289.2010.03.041

[4] 薛雯, 张莉, 李莎, 等. 超声峰值负压与肿瘤微循环阻断程度的相关性研究[J]. 中国超声医学杂志, 2014, 30(4): 372-375.

[5] 李莎, 张金龙, 崔海, 等. 微泡增强的超声空化效应对兔肌肉和肺微血管的损伤作用[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(22): 2439-2442. DOI:10.16016/j.1000-5404.2013.22.004

[6] Ibsen S, Schutt C E, Esener S. Microbubble-mediated ultrasound therapy: a review of its potential in cancer treatment[J]. Drug Des Devel Ther, 2013, 3(7):375-388. DOI: 10.2147/DDDT.S31564

[7] Liu Z, Gao S, Zhao Y, *et al*. Disruption of tumor neovasculature by microbubble enhanced ultrasound: a potential new physical therapy of anti-angiogenesis[J]. Ultrasound Med Biol, 2012, 38(2):253-261. DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2011.11.007

[8] Hwang J H, Brayman A A, Reidy M A, *et al*. Vascular effects induced by combined 1-MHz ultrasound and microbubble contrast agent treatments *in vivo*[J]. Ultrasound Med Biol, 2005, 31(4): 553-564.

[9] Wood A K, Sehgal C M. A review of low-intensity ultrasound for cancer therapy[J]. Ultrasound Med Biol, 2015, 41(4): 905-928. DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2014.11.019

[10] Heath C H, Sorace A, Knowles J, *et al*. Microbubble therapy enhances anti-tumor properties of cisplatin and cetuximab *in vitro* and *in vivo*[J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 2012, 146(6):938-945. DOI: 10.1177/0194599812436648

[11] Kotopoulis S, Dimcevski G, Gilja O H, *et al*. Treatment of human pancreatic cancer using combined ultrasound, microbubbles, and gemcitabine: a clinical case study[J]. Med Phys, 2013, 40(7):072902. DOI: 10.1118/1.4808149

[12] 张丽, 谢明星. 超声靶向微泡击破介导基因转染或药物传输的研究进展[J]. 中国医学影像技术, 2010, 26(7): 1366-1369. DOI: 10.13929/j.1003-3289.2010.07.012

[13] Torre L A, Bray F, Siegel R L, *et al*. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2):87-108. DOI: 10.3322/caac.21262

[14] 周晖, 卢淮武, 彭永排, 等.《2015年NCCN宫颈癌临床实践指南》解读[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2015, 3(31): 185-191. DOI: 10.7504/fk2015020101

[15] Yakirevich E, Sabo E, Naroditsky I, *et al*. Multidrug resistance-related phenotype and apoptosis-related protein expression in ovarian serous carcinomas[J]. Gynecol Oncol, 2006, 100(1):152-159.

[16] Yang S, Wang P, Wang X, *et al*. Activation of microbubbles by low-level therapeutic ultrasound enhances the antitumor effects of doxorubicin[J]. Eur Radiol, 2014, 24(11): 2739-2753. DOI: 10.1007/s00330-014-3334-3

(**收稿**:2015-11-26;**修回**:2016-01-17)

(编辑 邓强庭)