基础研究 文章编号:0253-3626(2009)11-1475-04

HIFU 联合化疗对裸鼠皮下胶质瘤细胞凋亡及增殖的影响研究

肖 刚[1],霍 钢[2]

(1. 重庆市第一人民医院神外科,重庆 400011;2. 重庆医科大学附属第一医院神经外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨高强度聚焦超声(High intensity focused ultrosound,HIFU)联合化疗对裸鼠皮下胶质瘤靶区周围细胞凋亡和增殖的影响。方法:建立人(U251)胶质瘤移植模型,随机分入 3 组,局部分别行单 HIFU 治疗、单盐酸尼莫司汀(Nimustine,ACNU)及 HIFU 联合 ACNU 治疗。治疗 24 h 后切取肿瘤组织,行 HE 染色观察组织病理变化,免疫组织化学法检测增殖细胞核抗原(Proliferating cell nuclear antigen,PCNA)的表达和 TUNEL 法检测细胞凋亡。治疗 7 d 后分别测量 3 组瘤块体积。结果:HIFU 联合化疗组靶区周围组织凋亡细胞数较单 HIFU 组及单化疗组高($P<0.01$);而 PCNA 阳性细胞数较后两者降低($P<0.01$)。联合治疗组肿瘤体积较单 HIFU 组及单化疗组缩小($P<0.01$)。结论:HIFU 治疗及化疗在胶质瘤的治疗中具有协同作用。HIFU 联合化疗能明显提高 HIFU 治疗疗效,诱导靶区周围胶质瘤细胞凋亡并抑制其增殖发挥抗肿瘤作用,有利于胶质瘤的治疗。

【关键词】神经胶质瘤;高强度聚焦超声;细胞凋亡;增殖细胞核抗原;化疗

【中国图书分类法分类号】R739.41 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-02-16

Effect of HIFU combined with chemotherapy on apoptosis and proliferation of glioma cell in nude mice

XIAO Gang, et al

(*Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the changes of cell apoptosis and proliferation in the periphery of the target area on glioma subcutaneous transplanted model in nude mice treated with high inensity focused ultrasound (HIFU) in combination with chemotherapy. *Methods*: Experimental nude mice of subcutaneous transplanted models with human glioma (U251) was established. These nude mice bearing subcutaneous human neuron-gliocytoma xenografts were divided into three groups randomly, HIFU in combination with ACNU(Nimustine) adjuvant themotherapy group, single chemotherapy group and single HIFU group. 24 hours after tumors were treated, the pathological characteristics, apoptosis and proliferating cell nuclear antigen(PCNA) in tumor tissues were tested by HE staining examination, TdT-mediated UTP nick end labeling (TUNEL) and immunohistochemical staining respectively. 7 days later, the volume of the xenografts was measured. *Results*: After HIFU ablation, in the periphery of the target area, the percentage of PCNA in the HIFU in combination with adjuvant chemotherapy group was significantly less than that in single chemotherapy group and single HIFU group ($P<0.01$) and the apoptosis cells were more than these in the last two groups($P<0.01$). The volume of tumor tissues in HIFU in combination with ACNU group was smaller than that in single chemotherapy group and single HIFU group($P<0.01$). *Conclusion*: There were marked synergstic effects of both HIFU ablation and chemotherapy on U251 glioma in nude mice. In the periphery of the target area, HIFU in combination with adjuvant chemotherapy could enhance the HIFU therapeutic effects obviously, and also induce U251cell apoptosis and restrain its proliferation in glioma, thus it would promote the therapeutic efficacy for glioma.

【Key words】Glioma; High intensive focused ultrasound; Apoptosis; Proliferating cell nuclear antigen; Chemotherapy

高强度聚焦超声(High inensity focused ultrasound,HIFU)是近年来兴起的一种新的非侵袭性肿瘤治疗方法,在治疗前列腺癌、肝癌、乳腺癌等方面,取得了良好的效果[1-3]。郭晓辉等[4]证实,HIFU 能明显提高化疗疗效,诱导肿瘤细胞凋亡并抑制其增殖发挥抗肿瘤作用。但还未见有 HIFU 及化疗联合作用于胶质瘤的研究。本实验建立 U251 人胶质瘤裸鼠皮下移植模型,对其进行 HIFU 联合化学药物治疗,分析治疗后靶区周围肿瘤细胞凋亡和增殖细胞

作者介绍:肖 刚(1977-),男,硕士,
研究方向:恶性胶质瘤的基础与临床。
通讯作者:霍 钢,男,主任医师,E-mail:xiaomin198171@tom.com。

核抗原(Proliferating cell nuclear antigen, PCNA)表达的变化和意义。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

人脑胶质母细胞瘤 U251 细胞购自 ATCC(American type culture collection), 由重庆医科大学基础研究所保存培养。U251 细胞常规复苏后用含 10%胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 g/ml 链霉素和 DMEM/F12 完全培养基,在 37℃饱和湿度及 5%CO_2 条件下传代培养。小鼠抗人 PCNA 单克隆抗体(mAb) PC-10(美国 Santa Cruz 公司);细胞凋亡原位检测试剂盒(德国 Roche 公司);链霉卵白素生物素复合物(LsAB)免疫组化染色试剂盒,DAB 显色试剂盒 (武汉博士德公司), ACNU(日本 Daiichi Sankyo 公司)。

1.2 HIFU 治疗仪及其治疗参数

本试验采用的 CZF-Ⅱ型超声治疗仪(重庆海扶技术有限公司研制),由重庆医科大学超声工程研究所提供,包括功率源、治疗探头及循环脱气水降温系统 3 部分。治疗探头频率为 9.7 MHz ,直径 9.5 mm,焦距 4.5 mm,脉冲 1 MHz,最大输出功率 5 W,焦点处声强 2 500 W/cm^2。

1.3 动物实验

BALB/C nu/nu 品系的裸小鼠 15 只,雄性,4 ~ 10 周龄,体重 12 ~ 22 g,购自中国医学科学院肿瘤医院动物室,饲养于重庆医科大学动物室实验中心 SPF 条件下的超净层流系统中。每次操作前,超净工作台常规 70%乙醇擦拭,紫外线照射 30 min,更换无菌衣帽,戴无菌手套后操作。定期更换高压灭菌的木屑、鼠笼及添加灭菌处理的食物、水。U251 细胞生长至 95%融合时,0.25%胰酶消化,完全培养基中止消化,无血清 DMEM/F12 培养基重悬, 并调节细胞浓度为 8×10^6 个/100 μl。接种于裸鼠双侧臀部皮下,100 μl/瘤,建立胶质瘤移植模型。观测胶质瘤生长情况。定期测量裸小鼠肿瘤的最长径 a(mm),最宽径 b(mm),1 次/7 d,共计 35 d。按公式:$V=a \times b^2/2$ 计算肿瘤近似体积(mm^3),根据肿瘤体积绘制肿瘤生长曲线。

肿瘤生长至 28 d(最长径约 1.0~1.2 cm,为纳入标准),将裸小鼠(30 瘤块),随机分入单化疗组、单 HIFU 组和 HIFU 联合化疗组,每组各 5 只。实验方法:碘伏常规消毒后,3%水合氯醛 35 μl/10 g 腹腔注射麻醉,约 5 min 麻醉起效后(1) 单化疗组, ACNU 0.4 mg/0.1 ml 肿瘤局部注射,表面皮肤涂以超声耦合剂,输入治疗参数,不发出超声波,假照 20 s;(2)单 HIFU 组肿瘤局部注射生理盐水 0.1 ml,30 min 后表面皮肤涂以超声耦合剂, 输入前述固定参数辐照 20 s;(3) 联合治疗组,ACNU 0.4 mg/0.1 ml 肿瘤局部注射,30 min 后表面皮肤涂以超声耦合剂,以前述固定参数连续辐照 20 s。治疗后即 24 h,切取各组肿瘤(左侧瘤块,每组 5 瘤),用 4%中性甲醛固定,制作常规石蜡切片分别行 HE 染色、免疫组化和 TUNEL 染色后光光学显微镜下观测。7 d 后测量右侧瘤块体积(右侧瘤块,每组 5 瘤)。

1.4 TUNEL 法检测细胞凋亡

TUNEL 检测细胞凋亡:切 4 μm 厚片作 TUNEL 原位细胞凋亡检测,按购自 Roche 公司试剂盒说明进行。每瘤组织切片常规脱蜡至水,去除内源性过氧化物酶,蛋白酶 K37℃消化 20 min 去除组织蛋白。0.1%Triton 细胞打孔, 滴加 TUNEL 反应液,在 37℃湿盒中孵育 1 h。以上各操作步骤均用 0.01 mol/L 的 PBS(pH 7.4)缓冲液洗涤。分别设立阴性(PBS)、阳性实验对照,中性树脂封片。光镜下凋亡细胞核为棕黄颗粒染色。靶区边缘作为观察区,于 100 倍显微镜下观测细胞形态变化;于 400 倍显微镜下连续计数 1000 个细胞,计数凋亡细胞个数,计算凋亡指数(Apoptosis index, AI), AI=凋亡细胞数/1 000 × 100%。

1.5 PCNA 免疫组化法检测细胞增殖

PCNA 检测细胞增殖:按常规 SP 法进行,4 μm 厚的石蜡切片,58 ℃烤片 45 min,脱蜡入水,去除内源性过氧化物酶,微波抗原修复;用已知阳性切片做阳性对照,PBS 代替一抗做空白对照。PCNA 阳性细胞:细胞核染色呈棕黄色,胞质及胞膜不着色。靶区边缘作为观察区,于 100 倍显微镜下观测细胞形态变化;于 400 倍显微镜下连续计数 1000 个细胞,计算 PCNA 阳性表达率(Proliferation Index, PI)。

1.6 数据收集和统计学处理

计量资料数据用表示,与联合治疗组比较,行 Dunnett-t 方差检验进行统计分析,检验标准为 α=0.05。用 SPSS13.0 统计软件包进行数据统计处理。

2 结 果

2.1 肿瘤生长曲线及干预后肿瘤体积变化

细胞悬液接种后,第 8 d 左右可见裸鼠皮下小结节形成(肉眼可见判定为成瘤),肿瘤生长迅速,成瘤率 100%。接种 28 d 后最长径为 1.0~1.2 cm 为 HIFU 治疗纳入标准,肿瘤体积约为(496.5±10.65) mm^3。第 35 d,测量肿瘤体积见各组肿瘤生长均受到抑制,联合组肿瘤体积较单化疗组、单 HIFU 组缩小(图 1,表 1),具有统计学意义,$P<0.01$。

2.2 大体标本及光学显微镜观察

大体标本所见:所有荷瘤鼠脑、心、肺、肝、脾、肾等组织未见肿瘤远处转移;同一时限相同组别,荷瘤鼠皮下肿瘤大小相对均一。

HE 染色显示,肿瘤细胞大小不一,排列紊乱,形态多样,呈圆形、梭形或多角形;细胞核深染,核浆比例增大,病理性核分裂相多见;细胞质较少,略嗜伊红染色,细胞间质少见(图 2)。HIFU 组及联合组可见靶区内出现呈片状大小不一空泡,组织结构形态仍存在,细胞结构紊乱,核固缩,胞浆减少,胞浆内有不规则空泡形成等呈凝固性坏死表现(图 3);靶区周围组织大片状呈浅染,细胞间隙变大,细

胞皱缩等改变。HIFU 联合化疗组除有单纯 HIFU 治疗后细胞形态分布外，在远边缘区≥6 mm 还可见散在小片状肿瘤细胞坏死，细胞浆溶解，仅剩堆集在一起的核碎片，与生长旺盛之肿瘤组织间存在边界。

2.3 TUNEL 法对凋亡细胞的检测

凋亡细胞 TUNEL 标记阳性标记为：细胞核染色质呈棕褐色，具有核固缩，染色质呈颗粒状或块状，圆形或椭圆形团块集于核膜下等形态特点。而坏死细胞胞浆呈弱而散在着色。坏死为非特异性着色。

单纯化疗后，凋亡细胞散在或呈灶状分布 AI 为 10.22%±3.76%；单 HIFU 治疗后靶区以大片状、非特异性浅黄色坏死为主，靶区周围凋亡细胞增多，AI 为 20.43%±4.65%；HIFU 联合化疗组除有单 HIFU 治疗后细胞形态分布外，靶区周围凋亡细胞较纯 HIFU 治疗组更为弥散，远边缘区（≥6 mm）凋亡也大为增加，各时点可见小片状 TUNEL 阳性细胞 AI 为 36.78%±4.85%，显著多余单纯 HIFU 组。HIFU 联合化疗组细胞凋亡率高于单 HIFU 组及单化疗组，$P<0.01$（图 4A、4B、4C，表 1）。

2.4 细胞表达的 PCNA 的检测

胶质瘤切片 PCNA 蛋白表达特点是细胞核呈棕黄色或棕色，均匀地分布在肿瘤组织中。联合治疗组及单 HIFU 组靶区均无 PCNA 表达。联合组靶区周围 PCNA 表达为小片状，稀疏分布，PI 为 30.23%±2.16%。单 HIFU 组呈片状分布，较密集，PI 为 37.69%±2.06%。前者较后者降低 $P<0.01$（图 5A、5B、5C，表 1）。单化疗组 PCNA 表达呈大片状 56.62%±3.75%，联合组较之显著降低 $P<0.01$（图 5A、5B、5C，表 1）。

3 讨 论

胶质瘤为最常见颅内肿瘤，其中恶性胶质瘤占颅内肿瘤 1/3 以上，复发率极高[5]。目前，恶性胶质瘤以手术治疗为主，辅以放疗、化疗、生物治疗等综合治疗。即使如此，恶性胶质瘤，确诊后中位生存期仅为 9~12 个月[6]。治疗的失败部分原因在于胶质瘤细胞侵袭性生长以及与周围正常、功能重要脑组织相交错，外科手术难以完全切除[7]；同时由于其异常的生物学特性，对放、化疗的抗拒，导致术后放、化疗失败，而且经常以同级别或更高级别胶质瘤复发[8]。因此，寻找一种新的有效的胶质瘤治疗方法或技术意义重大。运用各种干预手段诱导胶质瘤细胞凋亡及抑制其增殖已成为胶质瘤治疗的新方向。PCNA 是一个相对分子量为 36 kD 的 DNA 多聚酶辅助蛋

表 1 各组 AI、PI（$\bar{x}\pm s$，%）及干预后肿瘤体积（mm^3）

组别	例数	AI	PI	肿瘤体积
联合组	5	36.78 ± 4.85	30.23 ± 2.16	217.6 ± 7.10
单 HIFU 组	5	20.43 ± 4.65	37.60 ± 2.06	441.8 ± 11.62
单化疗组	5	10.22 ± 3.76	56.62 ± 3.75	500.2 ± 11.09

各组均与联合治疗组比较，$P<0.01$

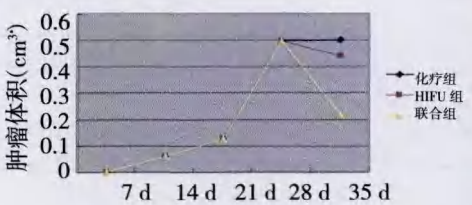


图 1 各组肿瘤生长曲线

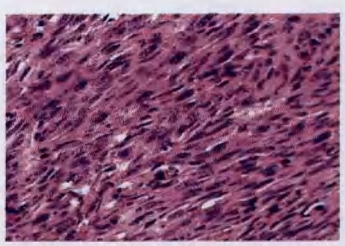


图 2 裸鼠皮下胶质瘤（U251）（HE 染色 × 400）

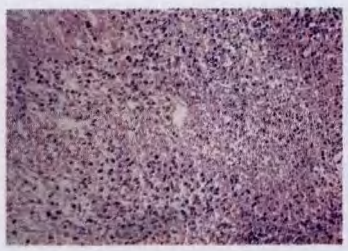


图 3 靶区凝固性坏死（HE 染色 × 100）

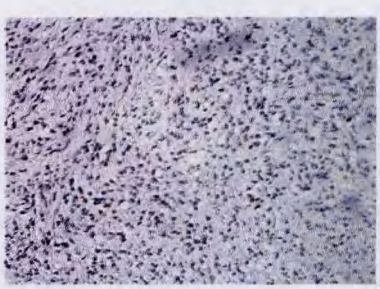


图 4A 联合组靶区边缘 TUNEL 染色（×100）

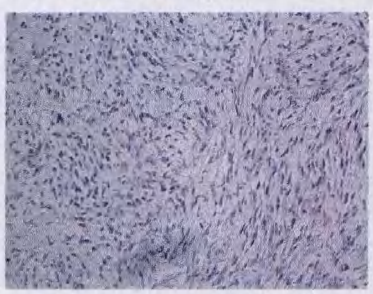


图 4B 单 HIFU 靶区边缘 TUNEL 染色（×100）

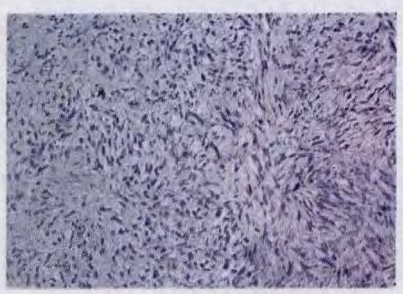


图 4C 单化疗组 TUNEL 染色（× 100）

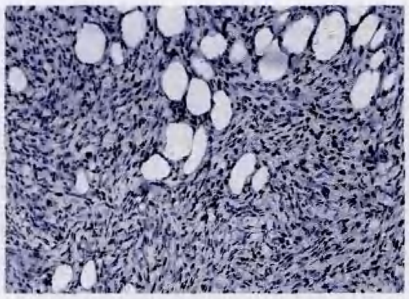


图 5A 联合组靶区边缘 PCNA 表达(×100)

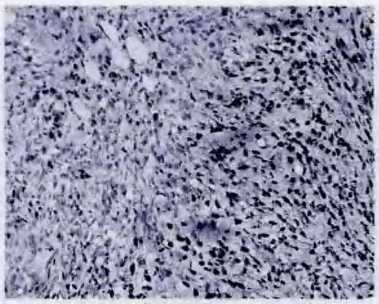


图 5B 单 HIFU 靶区边缘 PCNA 表达(×100)

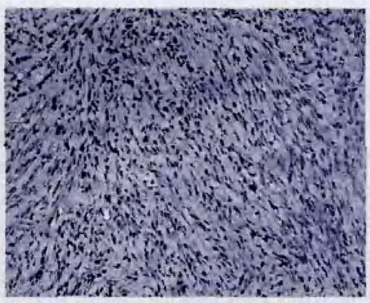


图 5C 单化疗组 PCNA 表达(×100)

白,在 S 期集聚于细胞核内,是增殖期细胞特异表达的核蛋白,它的含量和表达程度反映了细胞的增殖活性[9]。细胞凋亡是由基因调控的细胞主动的程序性死亡过程[10]。HIFU 是通过瞬间高温效应及空化效应、声化学效应致靶区细胞坏死,破坏组织结构[11],属于高温热疗。霍钢、肖文峰等[12,13]确认了 HIFU 靶向治疗胶质瘤疗效。但是胶质瘤侵袭性生长部分往往超出 HIFU 精确定位所依赖的 MRI、CT 等影像检查技术的最小分辨率范围,也就不能被 HIFU 靶向治疗清除。更重要的是,这部分细胞是胶质瘤复发的病理基础。为了提高疗效,改善患者的生存质量,延长其生存期,寻求这部分的有效治疗就显得尤为必要。罗文等[14]研究表明 HIFU 辐照后除靶区形成凝固性坏死外,在靶区周围还可诱导兔肝细胞凋亡和抑制其增殖。低温热疗为其可能机制。如果该效应也存在于胶质瘤 HIFU 治疗过程中,将有利于靶区周围部分的治疗。ACNU 为细胞周期非特异性烷化剂,作用于细胞分裂的各个时期,可诱导胶质瘤细胞凋亡和抑制其增殖,可穿过血脑屏障。本实验将 HIFU 联合化疗作用于裸鼠皮下人胶质瘤组织。与前期实验一致,HIFU 辐照后靶区凝固性坏死。更重要的是,试验中发现 HIFU 联合化疗也能诱导靶区周围胶质瘤细胞凋亡并抑制其增殖,能明显提高 HIFU 治疗疗效。其机制可能为 HIFU 在胶质瘤靶区周围形成了一个低温热疗区带,在此基础上与化疗发生协同作用。低温热疗与化疗协同作用机制[15]有:①热疗增加了烷化剂的细胞毒性;②肿瘤周边血供较多,化疗药物容易到达,化疗具有优势;肿瘤中心血供较差,多为乏氧细胞,不易散热,对热疗敏感,二者具有协同作用。HIFU 治疗和化疗合用,既发挥了 HIFU 精确的靶向治疗优势,又在靶区周围治疗中具有协同作用,提高了 HIFU 治疗疗效,有利于胶质瘤的治疗。但实验观察期较短,需进一步实验探讨内在作用机制及肿瘤体积变化规律。

参 考 文 献

[1] Koch M O, Gardner T, Cheng L, et al. Phase Ⅰ/Ⅱ Trial of high intensity focused ultrasound for the treatment of previously untreated localized prostate cancer[J]. The Journal of Urology, 2007, 178(6): 2366-2371.

[2] Yi J, Li N, Jiang L S, et al. The study of clinical application of high intensity focused ultrasound in non-invasive therapy for liver cancer[J]. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2005, 36(3): 426-428.

[3] Wu F, Wang Z B, Zhu H, et al. Extracorporeal high intensity focused ultrasound treatment for patients with breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 2005, 92(1): 51-60.

[4] 郭晓辉,周晓东,任小龙,等.高强度聚焦超声治疗对乳腺癌肿瘤细胞凋亡和增殖细胞核抗原的影响研究[J].中国超声医学杂志, 2007, 23(7): 499-502.

[5] 王忠诚.神经外科学[M].武汉:湖北科学技术出版社, 1998: 397-452.

[6] Hegde M, Rodcoe J, Cala P, et al. Amiloride kills malignant glioma cells independent of its inhibition of the sodium-hydrogen exchanger[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2004, 310(1): 67-74.

[7] Joy A M, Beaudry C E, Tran N L, et al. Migrating glioma cells activate the P13-K pathway and display decreased susceptibility to apoptosis[J]. J Cell Sci, 2003, 116 (21): 4409-4417.

[8] Hulsebos T J, Troost D, Leenstra S. Molecular-genetic characterization of gliomas that recur as same grade or higher grade tumours[J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2004, 75(5): 723-726.

[9] Kerr J F, Wyllie A H, Currie A R. Apoptosis: A basic biological phenomelion with wide-ranging implications in tissue kinetics[J]. Br J Cancer, 1972, 26 (4): 238-258.

[10] Maga G, Hubscher U. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): A dancer with many partners[J]. J Cell Sci, 2003, 116(Pt15): 3051-3060.

[11] Melodelima D, Chapelon J Y, Theillere Y, et al. Combination of thermal and cavitation effects to generate deep lesions with an endocavitary applicator using a plane transducer: ex vivo studies[J]. Ultrasound Med Biol, 2004, 30 (1): 103-110.

[12] 霍 钢,李九州,郑履平,等.高强度聚焦超声损伤离体恶性胶质瘤的研究[J].第三军医大学学报, 2006, 8(11): 1229-1330.

[13] 肖文峰,霍 钢,郑履平,等.高强度聚焦超声对裸鼠皮下人胶质瘤的治疗作用[J].中国神经精神疾病杂志, 2008, 34(4): 208-211.

[14] 罗 文,周晓东,巩箫音,等.HIFU 消融后兔肝细胞凋亡和增殖的研究[J].中国超声医学杂志, 2007, 23(4): 250-252.

[15] 罗 洁.热疗联合化疗治疗晚期非小细胞肺癌研究进展[J].治疗防治研究, 2007, 34(10): 802.

(责任编辑:关蕴良)