基础研究 文章编号:0253-3626(2009)08-1019-05

聚焦超声对人宫颈癌裸鼠皮下移植瘤生物学特性的影响

祝建芳[1],赵 涌[2],李发琪[1],吕玉宇[2]

(1. 重庆医科大学生物医学工程系、医学超声工程研究所;2. 重庆医科大学基础医学院病理学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察聚焦超声对人宫颈癌裸鼠皮下移植瘤治疗作用及对治疗靶区边缘肿瘤组织生物学特性的影响。方法:32 例人宫颈癌裸鼠皮下移植瘤模型,不同剂量聚焦超声辐照后,不同时间观察荷瘤鼠的一般生命体征、瘤体生长情况。取辐照靶区及靶区边缘肿瘤组织,观察组织病理学及超微结构变化。原位末端标记法检测瘤细胞凋亡,免疫组化检测 Bax、Bcl-2、PCNA 及 MMP-9 的表达。结果:聚焦超声可明显抑制人宫颈癌裸鼠皮下移植瘤的生长,随辐照剂量增加其抑制作用亦增强。病理组织学观察可见各治疗组靶区变性、坏死,核结构破坏。靶区边缘肿瘤细胞肿胀、排列疏松,电镜示线粒体肿胀,胞质空化泡形成,核结构变化不显著。TUNEL 检测靶区边缘瘤组织凋亡细胞数目增多,免疫组化检测 Bax 表达上调,Bcl-2 表达下调,PCNA 及 MMP-9 蛋白表达减弱。结论:聚焦超声可明显破坏人宫颈癌裸鼠皮下移植瘤细胞并抑制肿瘤生长,对辐照靶区边缘肿瘤细胞有促进凋亡作用,该过程可能与聚焦超声热效应激活线粒体介导的细胞凋亡信号通路有关。

【关键词】移植瘤;聚焦超声;凋亡

【中国图书分类法分类号】R737.33 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-01-08

Effects of focused ultrasound on biological characteristics of cervical tumor transplanted subcutaneously in nude mice

ZHU Jian-fang, et al

(*Institute of Medical Ultrasound Engineering, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To observe the treating effect of focused ultrasound on human cervical tumor transplanted subcutaneously in nude mice. *Methods*: After irradiated with different dose of focused ultrasound, the thirty-two nude mice which transplanted subcutaneously with human cervical cancer were observed for the growth of the subcutaneously transplanted tumor and general vital sign and its effects on the biological characteristics of tumor tissues on the rim of the targeted areas at the different time. Target areas and the rim of the targeted areas in tumor samples were examined by light microscope and electron microscope for the change of histopathology and ultra-structure. Apoptosis was detected by TUNEL. The immunohistochemical method was applied to investigate the expressions of Bax, Bcl-2, PCNA and MMP-9. *Results*: Focused ultrasound had evident inhibitory effect on the growth of transplanted subcutaneously human cervical tumor in nude mice and the effect was positively related to the dose. Denaturation, necrosis and the damage of nuclear structure were found in targeted areas of each treatment group through pathohistological observation. Tumor cell that on the rim of the targeted areas were swelling and loosing arranged. Ultrastructural investigations showed mitochondrion swelling and the formation of cytoplasm cavitations bubbles, but the change of nuclear structure was not significant. Compared with that of unirradiated areas, apoptosis rate of tumor cell in the rim of the targeted areas was increasing, the expression of Bax was up-regulated and Bcl-2 was down regulated, and the expressions of PCNA and MMP-9 protein weakened. *Conclusions*: Focused ultrasound could significantly damage the tumor cells of human cervical cancer transplanted subcutaneously in nude mice tumor and induced apoptosis of tumor cell on the rim of the targeted areas significantly. The process maybe related to the mitochondria-mediated cell apoptosis signal passage that activated by the thermal effect of focused ultrasound.

【Key words】Transplanted tumor; Focused ultrasound; Apoptosis

聚焦超声是近几年迅速发展起来的局部治疗肿瘤的新技术,目前已广泛应用于多种良恶性肿瘤的治疗。但因某些肿瘤组织生长部位的特殊性及形状不规则性,为避免损伤肿瘤周围的正常组织器官而不宜扩大辐照区域,可能会造成辐照靶区边缘肿瘤细胞的残留,目前还不清楚这些细胞的生物学特性有何改变。本实验对 32 只裸鼠皮下移植瘤进行

作者介绍:祝建芳(1980-),女,硕士,
研究方向:妇科肿瘤病理。

通讯作者:赵 涌,男,教授,E-mail:blys01@163.com。

低能量聚焦超声点辐射治疗，观察肿瘤细胞特别是辐照靶区边缘肿瘤细胞的形态学变化和生物学特性的改变，以期为聚焦超声治疗宫颈癌及其他恶性肿瘤提供理论和实践依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 HPV16 阳性的人宫颈癌细胞系 caski，由重庆医科大学基础医学院分子生物学教研室惠赠。用RPM1640（含 10%小牛血清）培养基于 37℃、5% CO_2 条件下常规传代培养。取对数生长期的细胞，胰酶消化、重悬，显微镜下经台盼蓝染色法检测癌细胞成活率大于 95%，用生理盐水调整细胞浓度为 5×10^7 个 /ml 的单细胞悬液。

1.1.2 主要试剂及仪器 CZF 型超声波治疗仪（重庆海扶（HIFU）技术有限公司研制，RPMI 1640 培养基（Gibco），四唑盐（MTT；sigma，U.S.），TUNEL 试剂盒，鼠抗人 Bax、Bcl-2、MMP-9 和 PCNA 单克隆抗体，SP 免疫组化试剂盒（均购自北京中杉金桥生物技术有限公司）。

1.1.3 实验动物 BALB/c 裸小鼠 32 只，4～6 周龄，雌性，体重 17.5～20.5 g，由重庆医科大学实验动物中心提供，饲养于 SPF（无特殊病原体）的环境中，饲料、饮水、笼具及垫料等均经无菌消毒。在无菌条件下于裸鼠背部靠近腋窝处皮下接种 0.2 ml/ 只（相当于 1×10^7 个 /ml）。1 周后可扪及皮下结节，32 只裸鼠全部接种成功。大约需 2 周待肿瘤最大直径约 1.0 cm（用游标卡尺测量）时进入实验阶段。

1.1.4 动物模型的分组及治疗 肿瘤接种成功的 32 只裸鼠称重后随机分为 4 组，每组 8 只，分别为对照组（假照组）、单点辐照 10 s 组、15 s 组、30 s 组。按 2 ml/kg（3%戊巴比妥钠注射液）腹腔注射麻醉，固定后肿瘤表面涂以耦合剂，使治疗头紧贴裸鼠皮肤表面。治疗探头参数：频率 9.75 MHz，功率 5 W。治疗组采用单点连续超声波，辐照时间分别为 10、15、30 s，均为单点单次辐照；对照组不开治疗头，实行假照。

1.2 荷瘤鼠一般情况及形态学观察

1.2.1 一般情况 治疗后每天观察荷瘤鼠的饮食、睡眠、治疗区皮肤变化、生存期等一般情况。

1.2.2 形态学观察 于聚焦超声治疗后 1、3、7、14、21、28、35 d 处死荷瘤鼠，取包含有靶区、靶区边缘带和未幅照区肿瘤组织置于 10%中性福尔马林中固定，常规脱水、石蜡包埋、HE 染色镜检。另分别取 1 mm^3 大小瘤组织和靶区边缘带组织（坏死组织与形态完好的肿瘤组织之间约 2 mm 区域）立即置入 4%戊二醛固定、脱水、环氧树酯包埋，光镜下定位后切片，经醋酸双氧铀及枸橼酸铅染色，日立 H-7000 型透射电镜观察。

1.3 肿瘤生长监测及裸鼠体重变化

于治疗后第 1、3、7、14、21、28、35 d 处死荷瘤鼠，剥瘤块称瘤重，量瘤体积（V）。肿瘤的体积 $V=\pi ab^2/6$（用游标卡尺测量：a 为最长径，b 为最短径）。于治疗前和治疗后的第 35 d 称各组荷瘤鼠的体重，计算平均值（$\bar{x}\pm s$）。

1.4 TUNEL 及 SP 免疫组化检测

凋亡检测按 TUNEL 试剂盒（Roche）使用说明对组织切片染色，DAB 显色，苏木素复染。光镜下观察细胞核呈棕黄色为阳性细胞，每张切片 400 倍光镜下随机选取 10 个视野中 200 个瘤细胞中阳性细胞数，计算出凋亡指数（Apoptosis index，AI，AI= 阳性细胞数 /200 个细胞 ×100%）。免疫组织化学染色 Bax、MMP-9 以细胞浆呈现棕黄色颗粒为阳性细胞，Bcl-2 阳性表达在胞浆或胞膜，PCNA 细胞核呈棕黄色为阳性细胞，每张切片 400 倍光镜下随机选取 10 个视野中 200 个瘤细胞中阳性细胞数，计算阳性率。

1.5 统计学处理

所有计量数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用统计软件包 SPSS10.0 进行，两组间比较采用 t 检验，$P\leq0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 聚焦超声治疗后肿瘤生长及形态学观察

2.1.1 一般观察 治疗后裸鼠饮食、睡眠、活动力等一般生命体征良好，辐照区皮肤发白，30 s 组治疗区皮肤有一过性的充血水肿现象，皮肤温度升高。观察期内（聚焦超声治疗后 35 d）无自然死亡病例，各组的生存期无明显差异。各组荷瘤鼠随鼠龄的增长，体重增加。治疗前和治疗后 35 d 各组荷瘤鼠体重与对照组相比均无显著性差异（$P>0.05$）（表 1）。

表 1 荷瘤鼠治疗前后体重的变化（$\bar{x}\pm s$）

分组	治疗前（g）	治疗后 35 d（g）
对照组	22.4 ± 1.2	26.3 ± 1.5
10 s 组	21.7 ± 1.4	25.0 ± 1.1
15 s 组	22.1 ± 1.4	26.3 ± 1.4
30 s 组	20.2 ± 1.5	24.5 ± 1.3

注：治疗 35 d 与对照组相比 $P>0.05$，差异无统计学意义

2.1.2 肉眼观察 治疗靶区为黄白色，质地较实，形状不规则，未辐照区瘤组织半透明质地细腻，两者边界清楚（图 2）。随辐照剂量的增加，聚焦超声抑制肿瘤生长的作用逐渐增强（图 2），各治疗组与对照组相比差异有统计学意义（$P<0.05$）。

2.1.3 形态学观察 辐照后 1~3 d，光镜下靶区内肿瘤组织破坏，呈红染的无结构颗粒，可见少量核碎屑。靶区边缘细胞水肿，排列疏松，部分细胞核轻度缩小，间质充血水肿明显局部有出血（图 3、4），治疗后 7~14 d 靶区周围已有肉芽组织形成，随时间延长逐渐形成纤维组织包裹；而未辐照区细胞排列紧密，细胞核嗜碱性强、异型性明显，辐照区与未辐照

区分界清楚。电镜观察：辐照靶区癌细胞膜破裂，胞内物质外溢，核周间隙增宽，核内异染色质凝集，核浓缩变小，线粒体和内质网肿胀破裂，胞浆有空化泡出现（图 5）。辐照靶区边缘区肿瘤细胞胞膜完整，线粒体和内质网肿胀，核异染色质较少，常染色质电子密度均匀（图 5）。

2.2 TUNEL 及免疫组织化学标记

TUNEL 结果显示：聚焦超声治疗后靶区边缘肿瘤组织凋亡阳性细胞明显增多（图 6），于第 3 d AI 达高峰，为 21.36%±1.65%，以后逐渐下降（图 7）。

Bax、Bcl-2、MMP-9 和 PCNA 在辐照靶区边缘肿瘤细胞和未辐照区瘤细胞中阳性率分别82.6%、10%、48.3%、15%和 9.2%、91.2%、10%、90%。比较上述各标记物在靶区边缘肿瘤组织与未辐照区表达率差异有统计学意义（$P<0.05$）（图 8~10）。

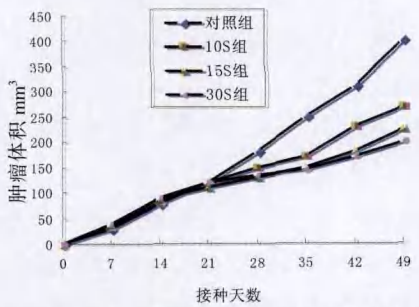
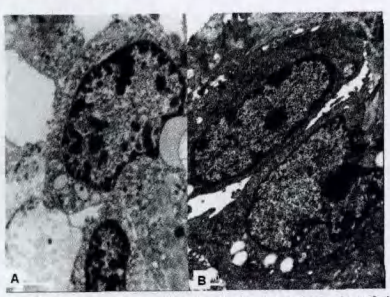


图 1 聚焦超声对裸鼠皮下移植瘤体积的影响



靶区右下肿瘤组织结构破坏，细胞变性坏死呈红染无结构物，左上为未辐照区，细胞排列紧密，结构完整

图 3 聚焦超声辐照后 1 d（HE，×100）



A. 聚焦超声辐照后靶区瘤细胞膜破裂，核异染色质凝集，核仁消失，线粒体肿胀，胞质内见空化泡；B. 靶区边缘瘤细胞核结构无明显变化，胞质内可见空化泡

图 5 聚焦超声治疗后电镜下靶区及靶区边缘的肿瘤组织（TEM，×10 000）

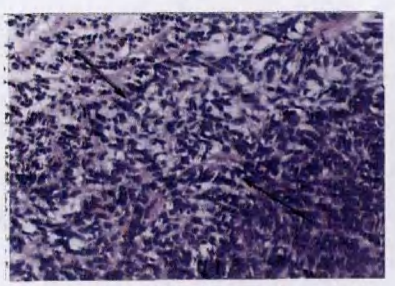
3 讨 论

宫颈癌是妇女常见的肿瘤死亡原因之一，其发病年龄有逐渐年轻化的趋势，尤其在 25~34 岁年龄组发病率上升明显[1,2]，目前主要采用手术结合放化疗进行治疗，怎样对早期宫颈癌采取合理而有效的临床治疗，特别是避免过度治疗是值得探讨的课题。聚焦超声是一种体外非侵入性“切除”实体肿瘤新的高科技手段，其治疗使焦点处肿瘤靶组织发生不可逆的凝固性坏死，而周围组织极少或不受损伤



A. 白色质地较实区域为单点辐照靶区；B. 半透明质地细腻区域为未辐照的肿瘤组织

图 2 聚焦超声辐照后的肿瘤组织块



箭头所示为幅照边缘区，瘤细胞水肿、变性，部分胞核轻度缩小

图 4 聚焦超声治疗后 3 d 肿瘤组织（HE，×100）

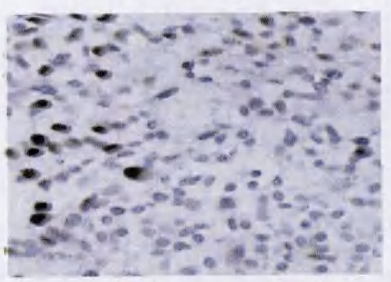


图 6 聚焦超声辐照后靶区边缘肿瘤组织 TUNEL 法标记显示凋亡细胞明显增多（DAB，×200）

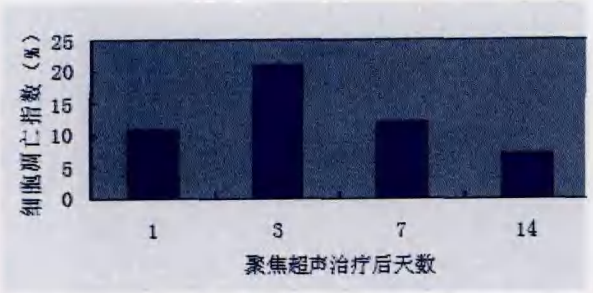
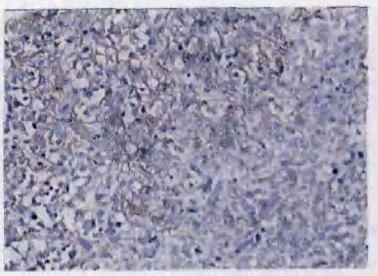
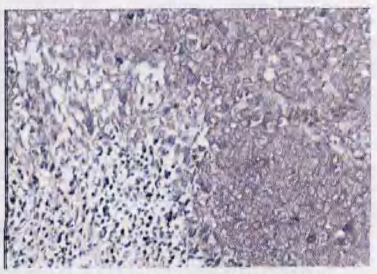


图 7 聚焦超声治疗后靶区周围组织细胞凋亡指数变化



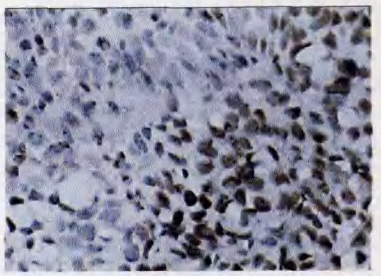
左上肿瘤组织 bax 的表达，右下为未辐照区域

图 8 聚焦超声辐照后辐照区边缘(SP，×200)



辐照后靶区边缘比未辐照区明显减弱

图 9 聚焦超声辐照后靶区边缘肿瘤组织 bcl-2 的表达比(SP，×200)



辐照后靶区边缘阳性细胞(左)比未辐照区(右)明显减少

图 10 聚焦超声辐照后靶区边缘肿瘤组织 PCNA 的表达(SP，×200)

达到无创“切除(Ablation)”肿瘤的目的[3]。国内报道 HIFU 治疗肝癌、胰腺癌、前列腺癌、直肠癌等获得了 65.8% 的有效率[4]，但用于宫颈癌的临床治疗还未见报道。

由于在 HIFU 的实际治疗应用中，可能因肿瘤形状不规则、部位特殊或顾忌邻近脏器和组织误伤等，治疗后靶区边缘可能残留少量肿瘤细胞，亦有报道靶区中央偶见残留的瘤细胞团，这些残留细胞接受的超声能量较弱，其形态学和生物学特性有什么变化，文献中相关研究报道极少。本实验主要就这方面做一初步研究，同时探讨聚焦超声对宫颈癌移植瘤的治疗作用及其可能的作用机制，为临床实际应用提供实验依据。

本实验结果显示聚焦超声对宫颈癌移植瘤有治疗作用，与对照组相比随辐照剂量的增加聚焦超声对肿瘤生长的抑制作用逐渐增强，各治疗组与对照组相比差异有统计学意义($P<0.05$)。HE 染色可见靶区肿瘤细胞轮廓模糊不清，核固缩、核碎裂，随辐照时间的延长靶区肿瘤坏死更为彻底，与未辐照区分界清楚，电镜观察靶区肿瘤细胞核破坏，靶区边缘肿瘤细胞线粒体肿胀，细胞核无明显损伤。孔凡斌等[5]研究证实：HIFU 治疗患宫颈癌 u14 小鼠后，能够激活小鼠脾淋巴细胞，发挥抗肿瘤免疫功能，起到“HIFU 原位固化瘤疫苗”的作用，且对机体无明显副作用。本实验 3 个治疗组和对照组裸鼠体重均呈上升趋势，且治疗后 35d 裸鼠体重与对照组相比差异无显著性($P>0.05$)，这也反映了聚焦超声对机体没有明显损害作用。

有文献报道聚焦超声具有促肿瘤细胞凋亡作用[6,7]，本实验聚焦超声治疗后 TUNEL 法检测显示靶区边缘肿瘤组织凋亡细胞数目增多，同时免疫组化标记 Bax 在辐照靶区边缘阳性强度增高，而 Bcl-2 表达则显著降低，这明显提示聚焦超声对靶区中央瘤细胞主要通过瞬时热效应、空化效应等方式导致其毁损破坏，但对于靶区边缘瘤细胞，因超声能量强度较弱，则以促进其凋亡的方式使其生长受到抑制，由于靶区边缘瘤细胞中有部分未凋亡破坏，很有可能成为肿瘤复发的“种子”。

细胞凋亡的调控是一种复杂的多水平的调控，多种因素相互作用促进或抑制凋亡的发生。热效应是聚焦超声治疗的主要机制之一，研究证实热刺激等可引起线粒体膜通透性的改变，促进凋亡因子的释放，激活线粒体介导的细胞凋亡信号通路，上调凋亡相关基因 bax 的表达和下调 bcl-2 的表达而诱导细胞发生凋亡[6]。聚焦超声诱导靶区边缘细胞凋亡的具体机制还不是很清楚，Lindholm 等[8]认为，聚焦超声热效应损伤线粒体，受损线粒体释放出细胞色素 C 和凋亡诱导因子，促进 Caspase 家族的酶联反应，引起细胞凋亡，这是导致细胞凋亡的途径之一。本实验观察到电镜下靶区边缘肿瘤细胞线粒体

肿胀,部分线粒体嵴有断裂等损伤表现,bax 的表达上调而 bcl-2 的表达下调,这些结果支持这种解释。此外,超声瞬态空化效应产生自由基和微声流粘滞应力致细胞膜、细胞骨架损伤和 DNA 单链断裂,通过细胞信号传导,引起细胞凋亡。

基质金属蛋白酶(Matrix metalloporteinase,MMPs)能降解细胞外基质中的多种蛋白成分,在恶性肿瘤的侵袭和转移中起重要作用,其中 MMP-9 主要以Ⅳ型胶原为降解底物,常以非活性形式存在,而在恶性肿瘤中被激活且表达增高[9]。PCNA 是一种酸性核蛋白,其表达在细胞增值周期 G_1 后期开始升高,G_1/S 期时达高峰,S期持续高水平[10],是反映细胞增殖活性的一个良好指标。聚焦超声治疗后 MMP-9 及 PCNA 在辐照靶区边缘肿瘤组织的表达较未辐照区细胞阳性率减少($P<0.05$),着色强度降低,说明辐照靶区边缘肿瘤组织在细胞增殖及浸润转移潜能均有降低趋势。刘三光等[11]研究发现 HIFU 治疗兔肝癌,非靶区肿瘤组织的致瘤性与兔肝癌肿瘤组织相比,差异有显著性意义($P<0.01$),有可能是靶区中心主要是热效应引起细胞死亡,而边缘因热度或物理强度未达到至细胞死亡水平,而是通过诱发凋亡至细胞死亡。MMP-9 和 PCNA 在靶区边缘表达降低,提示聚焦超声对肿瘤细胞的浸润转移和细胞增殖等生物学行为都有着不同程度的影响。

本实验显示聚焦超声抑制肿瘤增长主要是通过直接杀伤肿瘤组织、诱导凋亡和抑制增殖等方式而实现。靶区边缘瘤细胞接受的聚焦超声能量较少,主要以诱导凋亡和抑制细胞增殖活性而发挥抑制其增长的作用。

参 考 文 献

[1] Frega A,Stentella P,De loris A,et al. Young women cervical intraepithelial neoplasia and human papillomavirus:risk factors for persistence and recurrence [J]. Cancer etters ,2003,196(2):127-134.

[2] Denny-Smith T,Bairan A,Page M C.A survey of female nursing students knowledge,health beliefs,perceptions of risk,and risk behaviors regarding human papillomavirus and cervical cancer[J]. J Am Acad Nurse Pract,2006,18(2):62-69.

[3] Zhang C,Zhu Z,Wang G,et al. Effects of mycophenolate mofetil on renal interstitial fibrosis after unilateral ureteral obstruction ioncologic procedurerats[J]. J Huazhong Univ Sci Technology Med Sci,2003,23(3):269-270,282.

[4] 周际昌.实用肿瘤内科学[M].第 2 版.北京:人民卫生出版社,2003.29-30.

[5] 孔凡斌,宁 燕,王智彪,等.高强度超声对患宫颈癌 U14 小鼠的脾淋巴细胞增殖及细胞毒性的影响[J].中国超声医学杂志,2005,21(1):17-21.

[6] 杨志宏,王智彪,于廷和.低频超声对卵巢癌 COC1 细胞增殖和凋亡的影响[J].肿瘤防治研究,2004,11(5):65-68.

[7] Creagh E M,Conroy H,Martin S J. Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity[J]. Immunol Rev,2003,193:10-21.

[8] Lindholm D,Eriksson O,Korhonen L. Mitochondrial proteins in neuronal degeneration[J]. Biochem Biophys Res Commun,2004,321(4):753-758.

[9] Hanemaaijer R,Verheijen J.Matrix metalloproteinase inhibitors:current developments and future perspectives[J]. The Oncologist,2001,6(5):415-427.

[10] Mise K,Tashiro S,Yogitas,et al.Assessment of the biological malignancy of hepatocellular carcinoma:relationship to clinicopathological factors and prognosis[J]. J Clin Cancer Res,1998,4(6):1475-1482.

[11] 刘三光,尹建华,路文彦,等.高强度聚焦超声对兔肝癌非靶区肿瘤组织的抑制作用[J].中华实验外科杂志,2004,21(9):1030.

(责任编辑:冉明会)

读者·编者·作者

校 对 须 知

为保证作者文稿刊出准确无误,本编辑部将排版后的校样一律交作者校对,请作者务必在校样上按以下要求校对:

1. 对正文(包括外文字母及大小写)、标点符号、数据、图表、计量单位、参考文献等认真细致逐一校对(诵读),毋需重新打字。不能增加图表或成句的文字。

2. 若发现错误,请用红笔将正确的字符书写清楚(避免使用不规范汉字);必须改动的字符,宜在样稿的空白处写出(毋需重描编辑已改过的字符),所增删的字数最好相等。

3. 样稿中编者提出的问题(有"?"处)请予改正或作出解释,参考文献的缺项的内容,按本学报规定格式补充。务请作者认真核实所引用的文献是否正确,并核查文内角码是否与文末参考文献序号相对应

4. 请核实(或补充)作者介绍,包括出生年、性别、职称等信息。

5. 请用规范药名(不用商品名)及医学名词;认真核查法定计量单位及药物剂量。

6. 若特殊情况需要样稿,请作者自行复印留底。

7. 若不能在规定时间内校回,本编辑部只能将文稿延期出版。

本刊编辑部