基础研究 文章编号:文章编号:0253-3626(2009)07-0880-04

超声波对神经母细胞瘤株化疗敏感性影响的机制探讨

李 勤,金先庆,刘 伟,赵珍珍
(重庆医科大学附属儿童医院普外科,重庆 400014)

【摘 要】目的:研究使用超声辐照后神经母细胞瘤株 SK-N-SH 细胞超微结构及 P-gp 表达水平的改变,探讨超声波影响 SK-N-SH 细胞化疗敏感性的机制。方法:将 SK-N-SH 细胞分为实验组和对照组,实验组细胞进行超声辐照(频率:0.8 MHz,声强:1 W/cm^2,时间:40 s),对照组细胞进行超声假照。使用扫描电镜观察实验组和对照组细胞的超微结构并拍照。使用免疫组化方法检测实验组和对照组细胞 P-gp 的表达。结果:(1)通过观察对比实验组和对照组细胞扫描电镜照片发现:实验组细胞形态改变;细胞膜表面有大小不等的孔;细胞微绒毛脱落、减少。(2)免疫组化结果显示:对照组 SK-N-SH 细胞 P-gp 阳性表达率为 56.23% ± 9.86%, 实验组 SK-N-SH 细胞 P-gp 阳性表达率为 34.86% ± 6.19%,$P<0.05$。实验组细胞 P-gp 表达率较对照组明显降低。结论:超声辐照可以破坏 SK-N-SH 细胞的细胞膜结构以及使 SK-N-SH 细胞 P-gp 的表达降低,这导致 SK-N-SH 细胞化疗敏感性提高。

【关键词】超声波;神经母细胞瘤
【中国图书分类法分类号】R736.6 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-03-13

Mechanisms of ultrasound affecting the chemotherapeutic sensitivity of Neuroblastoma cell

LI Qin, et al
(*Department of General Surgery, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of ultrasound on the ultrastructure and expression of P-gp of Neuroblastoma cell in order to discuss the mechanisms of ultrasound affecting the chemotherapeutic sensitivity of SK-N-SH cell. *Methods*: The SK-N-SH cells were divided into the experimental group and the control group. In the experimental group, the cell suspensions were exposed to ultrasound irradiation. In the control group, the cell suspensions were exposed to sham irradiation . The changes of ultrastructure of tumor cells were observed by scanning electron microscope and the expression of P-gp in two groups were detected. *Results*: (1) In the pictures took by scanning electron microscope, we found that: the configuration of tumor cell changed and there were some holes of different diameters on the cell membrane and the numbers of microvillus reduced or disappeared after ultrasound irradiation. (2) The result of immunocytochemisty showed the expression rate of P-gp in SK-N-SH cells in the control group was 56.23% ± 9.86% vs 34.86% ± 6.19% in the experimental group ($P<0.05$), which shows the expression of P-gp in SK-N-SH cells exposed to ultrasound was lower than that of the cells exposed to sham irradiation. *Conclusion*: Ultrasound can damage the structure of cell membrane and reduce the expression of P-gp in SK-N-SH cells, which are the reasons for ultrasound enhancing the chemotherapeutic sensitivity of SK-N-SH cell.

【Key words】Ultrasound; Neuroblastoma cell

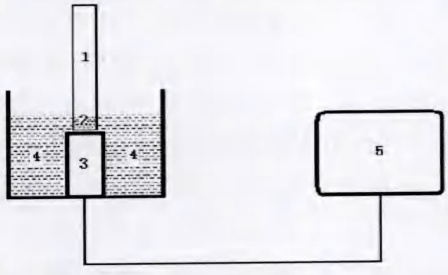
神经母细胞瘤(Neuroblastoma,NB)是儿童和婴儿最常见的实体肿瘤之一,治疗上目前主要采用手术、化疗、放疗等综合治疗措施,但治疗效果不够满意。近年来,随着超声波技术和设备的发展,聚焦超声技术已在临床上用于多种肿瘤的治疗并取得重大进展。在我们以前的研究中已经发现:使用非致死剂量的聚焦超声波(频率:0.8 MHz,声强:1.0 W/cm^2,照射时间:40 s)处理神经母细胞瘤细胞 SK-N-SH 后,肿瘤细胞对化疗药物长春新碱的敏感性提高,且化疗药物浓度较低时,其化疗增敏作用更明显[1]。为进一步探讨其作用机制,我们继续以 SK-N-SH 细胞为研究对象,研究其在该剂量超声波处理后细胞膜结构及 P-gp 表达的改变。

作者介绍:李 勤(1971-),男,讲师,硕士,
研究方向:小儿腹部外科疾病。
基金项目:国家自然科学基金重点资助项目(30330590)。

1 材料与方法

1.1 主要材料

人神经母细胞瘤株 SK-N-SH 由中科院上海细胞库提供；扫描电镜 Hitachi-3000；免疫组化试剂：鼠抗人 P-gp 单克隆抗体 C494，VltraSenstive™ S-P 试剂盒，二氨基联苯胺（DAB）显色剂试剂盒均由福建迈新生物技术开发公司提供；倒置相差显微镜 Nikon TE2000U。聚焦超声波辐照系统由重庆医科大学医学超声工程研究所提供（见图 1），该系统由超声波发生装置和辅助设备构成：（1）超声波发生装置：超声波换能器的压电材料为人工陶瓷，一端外罩厚度适宜的铝片以起到保护作用，同时兼做超声谐振体以利声波外传；一端与功率源相连，功率源可提供与压电陶瓷形成谐振的电压。参数：频率：0.8 MHz，声强：1.0 W/cm²。（2）辅助设备：水槽：为有机玻璃制作，底部正中置超声波换能器，实验时槽内盛脱气水，脱气水内微小气泡含量极低，声阻抗小，超声通过时衰减小。试管：为内径 1 cm 的聚乙烯塑料试管，聚乙烯塑料是一种良好的透声材料，超声通过时衰减较低。



1. 试管；2. 细胞悬液；3. 换能器；4. 脱气水；5. 功率源

图 1 超声辐照装置示意图

1.2 细胞制备

神经母细胞瘤株 SK-N-SH 用含 10%灭活胎牛血清的 DMEM/F-12 培养液，在含 5%CO_2、37℃条件下培养。选对数生长期细胞，用胰酶+EDTA 消化，离心，无血清 DMEM/F-12 培养液制成单细胞悬液，调整细胞浓度为 1×10^6 个 /ml 备用。

1.3 细胞分组

将浓度为 1×10^6 个 /ml 的备用细胞分实验组和对照组。实验组给予超声辐照，辐照条件：频率：0.8 MHz，声强：1.0 W/cm²，照射时间：40 s。对照组予以超声假照。

1.4 扫描电镜检测

将实验组细胞进行超声辐照后，与进行超声假照的对照组细胞一起立即进行扫描电镜检测，观察两组细胞的细胞膜结构并照相。

1.5 免疫组化方法检测实验组和对照组细胞 P-gp 的表达

超声照射后，将实验组和对照组细胞分别离心，弃掉上清液，加入含 10%灭活胎牛血清的 DMEM/F-12 培养液，再分别接种于 6 孔培养板，每组各接种 3 孔，孔内预先放有 2 cm × 2 cm 的盖玻片，48 h 后，将细胞爬片取出，用 S-P 法检测 P-gp 的表达（具体步骤参照试剂盒说明书）。结果判断：在放大 200 倍的视野下，每张细胞爬片选取 10 个不同的视野，每个视野计数 100 个肿瘤细胞中染色阳性的细胞比率，实验组和对照组细胞 P-gp 的阳性表达率用均数 ± 标准差表示（$\bar{x}\pm s$）。

1.6 统计学处理

所有数据均采用两样本均数比较的 t 检验（$\alpha=0.05$），应用 SPSS10.0（SPSS Inc. USA）统计软件进行统计学分析，$P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 实验组和对照组扫描电镜图见图 2~5

观察实验组（图 3~5）和对照组（图 2）细胞的扫描电镜图发现：超声辐照后 SK-N-SH 细胞的细胞结构发生如下改变：

（1）细胞的细胞膜受到破坏，其上形成大小不等的孔。（2）细胞微绒毛脱落、减少。（3）细胞形态改变。

2.2 免疫组化实验结果

免疫组化见图 6、7。

实验组和对照组 P-gp 表达率：对照组（图 6）30 个视野 SK-N-SH 细胞 P-gp 阳性表达率（56.23%±9.86%），实验组（图 7）30 个视野 SK-N-SH 细胞 P-gp 阳性表达率为 34.86%±6.19%，比较两组细胞的 P-gp 阳性表达率，$P<0.05$，其差异有统计学意义。

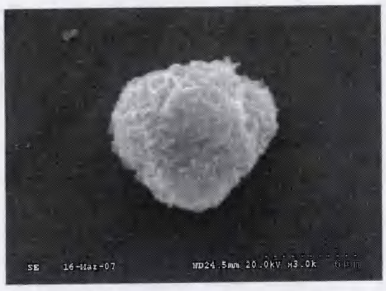


图 2 对照组 SK-N-SH 细胞的扫描电镜图片：细胞膜完整，微绒毛丰富



图 3 实验组 SK-N-SH 细胞的扫描电镜图片：细胞膜上可见小孔形成

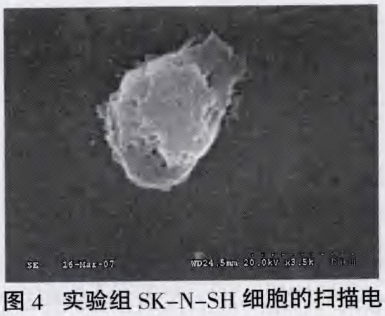


图 4 实验组 SK-N-SH 细胞的扫描电镜图片：细胞变形，细胞膜上可见大小不等的小孔，微绒毛脱落



图 5 实验组 SK-N-SH 细胞的扫描电镜图片:细胞微绒毛减少

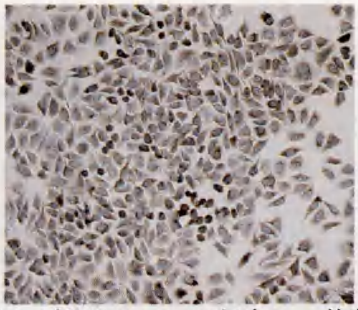


图 6 对照组 SK-N-SH 细胞 P-gp 的表达(免疫组化,×200)

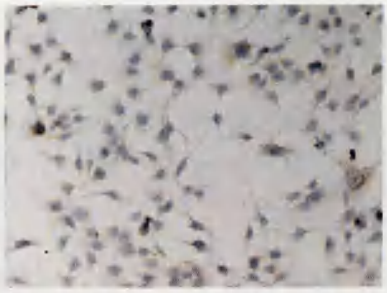


图 7 实验组 SK-N-SH 细胞 P-gp 的表达(免疫组化,×200)

免疫组化结果显示:实验组和对照组的 P-gp 表达率有明显差异,实验组细胞 P-gp 表达率较对照组明显降低。显微镜下观察细胞爬片还发现:实验组细胞爬片上细胞密度较对照组低,提示实验组细胞增殖能力减弱。

3 讨 论

NB 是儿童和婴儿最常见的实体肿瘤之一,其发病率约为 1/10 万,发病年龄多见于 1~5 岁,在儿童腹膜后恶性肿瘤中占第二位,仅次于肾母细胞瘤。神经母细胞瘤起源于神经嵴,肿瘤恶性度高,发展快,早期可发生转移。临床上神经母细胞瘤的治疗方法主要是手术、化疗和放疗,其他的治疗方法还有干细胞移植、生物治疗、免疫治疗和基因治疗等等。目前,对于早期发现的神经母细胞瘤治疗效果满意,但是大部分神经母细胞瘤患者就诊时已属中晚期,治疗效果不满意,死亡率较高,欧洲协作组对 1 277 例 NB 患儿长达 10 年的随访结果显示有骨髓转移的Ⅳ期患儿长期生存率仅 16%[2]。近年来,随着超声波技术和设备的发展,超声在治疗疾病方面的应用逐渐受到人们的重视,尤其是超声在肿瘤治疗中的作用已成为新的研究热点,何申戌等[3]总结了 869 例病人的治疗结果,其中包括 26 种肿瘤,他们的结果显示,该技术对盆腹腔的恶性实体肿瘤、子宫肌瘤和前列腺疾病均具有明显的疗效。2004 年伍烽、王智彪等[4]报道了利用 HIFU 治疗 1038 例恶性实体瘤的临床试验研究,其中包括原发性肝癌、转移性肝癌、乳腺癌、恶性骨肿瘤、软组织肉瘤、腹部和盆腔恶性肿瘤、良性乳腺肿瘤及其他实体肿瘤等,这是目前国际上涉及 HIFU 治疗病种最多的临床试用。这为人类战胜恶性肿瘤开辟了新的战场。在我们以前的研究中已经发现:使用非致死剂量的聚焦超声波(频率:0.8 MHz,声强:1.0 W/cm^2,照射时间:40 s)处理 NB 细胞 SK-N-SH 后,肿瘤细胞对化疗药物长春新碱的敏感性提高,且化疗药物浓度较低时,其化疗增敏作用更明显。

超声对肿瘤的生物效应包括热、机械和空化机制。超声波的机械作用主要是辐射压强和超声压强所引起的。辐射压强能引起蛋白质变性,细胞、组织变形。超声压强可引起细胞的分解[5]。超声的空化效应是指液体中存在的微小气泡(空化核)在超声波作用下产生的振荡、扩大、收缩至内爆等一系列动力学过程[6]。此作用能够使组织结构之间发生相对震荡运动,从而在局部产生电离和放出自由基,破坏细胞结构[7]。由于人体组织中含有大量液体,因此空化作用所引起的生物效应是不可避免的[8]。超声辐照对离体细胞的生物学效应主要分两种:(1)细胞溶解效应,包括胞膜破裂,细胞裂解;(2)细胞结构和功能改变,如细胞膜通透性、细胞电泳迁移率,细胞膜表面形态改变;细胞骨架蛋白改变造成的细胞粘附迁移改变;伴随单链 DNA 断裂引起细胞生长抑制,以及细胞染色体断裂,姐妹染色体交换率改变[9]。在我们的实验中,从超声辐照后的扫描电镜照片上明显可以发现超声辐照对细胞结构的破坏:细胞变形,肿胀;在细胞膜上形成孔径大小不一的孔;微绒毛减少、脱落。超声对细胞膜的破坏可以使细胞膜的通透性增加。1997 年 Bao[10]发现,中华田鼠卵巢细胞的悬浮液经超声(声压 2 MPa)辐照后,细胞膜可以对大分子暂时开放,随后闭合,大分子可进入细胞并被细胞俘获,称此现象为“声孔效应”。肿瘤细胞的细胞膜通透性增加可以使化疗药物进入细胞内的量提高,从而增强化疗药物的细胞毒作用。这可能是超声增强肿瘤细胞化疗敏感性的主要原因之一。扫描电镜图片上超声辐照后肿瘤细胞结构的另外一种变化就是微绒毛减少,甚至脱落。微

绒毛是细胞表面伸出的细长指状突起,广泛存在于动物细胞表面。微绒毛直径约为 0.1 μm。长度则因细胞种类和生理状况不同而有所不同。微绒毛的存在扩大了细胞的表面积,有利于细胞同外环境的物质交换,其长度和数量,都与细胞的代谢强度有着相应的关系。肿瘤细胞对葡萄糖和氨基酸的需求量都很大,因而大都带有大量的微绒毛。受到超声辐照后的肿瘤细胞微绒毛减少,细胞表面积缩小,吸收营养物质能力降低,将会影响细胞的代谢,最终影响细胞的生长繁殖,甚至导致细胞死亡。其机制可能与超声的空化效应有关。

免疫组化结果显示超声辐照后 SK-N-SH 细胞 P-gp 的表达降低。mdr1 基因定位于人 7 号染色体(7q21.1),编码蛋白—P-gp[11],它是一种能量依赖性药物排除泵,属于 ABC 家族(ATP binding cassette family)成员,分子上具有药物结合点和水解三磷酸腺苷活性及能量偶合位点,通过水解 ATP 获得能量将已进入细胞内的化疗药物泵出细胞外,使细胞内药物浓度降低,从而使细胞能够在浓度降低了的药物环境中存活,导致肿瘤细胞耐药。由 P-gp 介导的耐药机制是肿瘤多药耐药机制中最主要的机制之一。从我们的实验中可以看到,P-gp 在未经超声处理的神经母细胞瘤株 SK-N-SH 中有较高的表达,而使用超声波处理后的 SK-N-SH 细胞 P-gp 的表达明显降低。其原因可能是超声波损伤细胞膜的同时破坏了嵌于细胞膜内的 P-gp,使 P-gp 的数量减少或者功能降低。表明超声可能具有逆转肿瘤细胞 MDR 的作用。这是超声增强肿瘤细胞化疗敏感性的另外一个重要原因。如何克服肿瘤细胞对 P-gp 介导的多药耐药性,恢复肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,一直是人们研究重点。目前针对 P-gp 的逆转剂主要是化学逆转剂,此外细胞因子、类固醇激素、单克隆抗体、免疫毒素、特异性双抗、反义寡聚核苷酸、结合白蛋白的药物都可逆转肿瘤的耐药性。虽然目前化学逆转剂不断更新换代,高效低毒的药物层出不穷;基因治疗的效果也不断提高,但仍存在诸多缺陷,如化学药物对人体有潜在的毒副作用,基因药物与人体正常的遗传物质极其相似,可能对人体遗传物质的稳定性带来威胁,尤其重要的一点是所有这些措施都没有很强的选择性,作用于肿瘤细胞的同时,对正常细胞也同样具有杀伤作用。高效、无毒、有精确的靶向性是理想的逆转措施的标准。而超声波恰恰具备这些方面的优点:机械波,无毒;在组织内有一定的穿透性,方向性好,可聚焦;剂量可控;有广泛的生物学效应。因此,超声波在逆转 P-gp 介导的肿瘤多药耐药方面将发挥着越来越重要的作用。

参 考 文 献

[1] 李 勤,汪 洋,金先庆,等. 超声辐照对神经母细胞瘤株化疗敏感性的影响[J]. 中华小儿外科杂志,2008,29(8):467-470.

[2] Cotterill S J,Pearson A D,Pritchant J,et al.Clinical prognostic factors in 1277 paients with neuroblastoma:results of The European Neuroblastoma Study Group 's Survey 1982-1992 [J]. Eur J Cancer,2000,36(7):901.

[3] 何申戌,熊六林,王国民,等. 高强度聚焦超声治疗 869 例腹腔、盆腔实性癌瘤和组织增生症临床初步报告[J]. 中国超声医学杂志,2002,18(3):180-183.

[4] Wu F,Wang Z B,Chen W Z,et al. Extracorporeal focused ultrasound surgery for treatment of human solid carcinomas:early Chinese clinical experience[J]. Ultrasound Med Biol,2004,30(2):245-260.

[5] 胡 洁,李苏宜,姜 藻. 高强度聚焦超声治疗恶性肿瘤进展[J]. 肿瘤学杂志,2003,9(2):103-106.

[6] 冯 若,李化茂.声化学及其应用[M].合肥:安徽科技出版社,1992. 67-151.

[7] 冀 敏,赵 洪,滑炎卿. 聚焦超声波治疗肿瘤的物理机制及有关问题探讨[J].上海医学影像,2005,14(4):310-312.

[8] 刘普和,邝华俊,吴幸生. 医学物理学[M],北京:人民卫生出版社,1980. 585-588.

[9] 杨志宏,王智彪,胡 凯,等. 聚焦超声对卵巢癌细胞株 COC1 细胞凋亡和 Bcl-2/bax 基因表达的影响[J]. 中国医学物理学杂志,2004,21(4):207-210.

[10] Bao S,Thrall B D,Miller D L,et al. Transfection of a reporter plasmid into cultured cells by sonoporation[J]. Ult rasound Med Biol,1997,23(6):953-959.

[11] Filipits M,Suchomel R M,Dekam C,et al. Expression of multidrug resistance associated protein gene in colorectal carcinomas [J]. Br J Cancer,1997,75(2):208-212.

(责任编辑:冉明会)