维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2005)01-0005-04

聚焦超声对肝癌细胞 SMMC7721 增殖能力的影响

王春毅[1], 杨祖奎[1], 张 军[1], 胡 凯[2], 杜永洪[2]

(1.重庆医科大学临床学院普外科;2.重庆市超声医学工程重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究聚焦超声对肝癌细胞 SMMC7721 增殖能力的影响,初步探讨产生该影响的机制。方法:以剂量为 0.8MHz 20W 5s 的聚焦超声(该剂量照射过的 SMMC7721 细胞可保持 70% 的存活率)照射处于对数生长期的 SMMC7721 细胞,用免疫组化法及原位杂交法观察 SMMC7721 生化及基因表达的变化。结果:聚焦超声抑制 SMMC7721 细胞 VEGF 和 PCNA 蛋白的表达($P<0.05$)以及 VEGF 和 PCNA mRAN 的表达($P<0.05$)。结论:用聚焦超声照射后存活的 SMMC7721 细胞增殖能力减弱,其机制可能是通过抑制 VEGF 和 PCNA mRNA 的表达,使 VEGF 和 PCNA 蛋白表达减少来实现。

【关键词】聚焦超声;肝癌;VEGF;PCNA

【中国图书分类法分类号】R735.7 【文献标识码】A 【收稿日期】2004-04-12

Effects of focused ultrasound on capability of proliferation of human hepatocarcinoma cell SMMC7721 in vitro

WANG Chunyi, et al

(*Department of General Surgery, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To reseach the effects of focused ultrasound on the capability of proliferation that human hepatocarcinoma cell SMMC7721 have in vitro, and to determine the mechamism of this therapy initially. *Methods*: To irradiate the SMMC7721 cell which is in logarithmic growth time with ultrasound. The dosage of ultrasound was 0.8MHz 20W 25s, which make 70% of SMMC7721 cell that had been irradiated alive. The changes in cell morphology, biochemistry and gene expression were observed with immunohistochemistry and hybridization in situ. *Results*: The ultrastructure of SMMC7721 cell was changed by focused ultrasound, and the ultrasound could inhibit the expression of VEGF, PCNA, VEGF mRNA and PCNA mRNA($P<0.05$). *Conclusion*: The capability of proliferation of human hepatocarcinoma cell SMMC7721 was weakened by irradiation of focused ultrasound. The mechanism perhaps is that the irradiation of focused ultrasound inhibits the expression of VEGF mRNA and PCNA mRNA.

【Key words】Focused ultrasound; Hepatocarcinoma; Vascular endothelial growth factor; Proliferating cell nuclear antigen

高强度聚焦超声(HIFU)是一种非侵入性的治疗实体肿瘤的新技术,它将低强度的超声波汇聚于焦点处产生高强度聚焦区域,通过在聚焦区域产生瞬间高温、空化效应和机械效应使靶组织被破坏而周围组织很少或不受损伤[1]但由于肿瘤形态、位置、大小等原因,有一部分受到照射的肿瘤细胞仍会存活。本试验用聚焦超声照射肝癌细胞株 SMMC7721,观察存活细胞表达 VEGF(血管内皮生长因子)、VEGF-mRNA、PCNA(增殖细胞核抗原)、PCNA-mRNA 的改变,来探讨这部分肿瘤细胞的增殖复发能力是否下降。

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂

低强度聚焦超声仪由重庆医科大学超声研究所提供。Model5410CO_2 培养箱,美国 Napco 公司。CK-2 型倒置光显微镜,日本 Olympus 公司。小牛血清,中国医学科学院血液学研究所。细胞培养基 RPMI1640 为美国 Gibco 公司产品。重庆医科大学电镜室提供电镜观测。VEGF 和 PCNA 免疫组化试剂盒及 DAB 显色剂购自北京中山科技公司。VEGF mRNA 和 PCNA mRNA 原位杂交试剂盒购自武汉博士德公司。(以上仪器和试剂均由重庆市超声医学工程重点实验室提供。)

作者介绍:王春毅(1977-),男,住院医师,硕士,主要研究方向:肿瘤的基因治疗。

基金项目:本实验受国家自然科学基金项目(编号:30171060)资助,实验条件由省部共建国家重点实验室——重庆市超声医学工程重点实验室提供。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.2 细胞系来源和培养

SMMC7721 肝癌细胞系由重庆市超声医学工程重点实验室提供。培养基为 RPMI－1640 培养液(含 10% 小牛血清，10mM Hepes，100U/ml 青霉素，100μg/ml 链霉素)，37℃，5%CO_2 孵箱培养。

1.3 细胞系的处理

取对数生长期的 SMMC7721 细胞消化制成单细胞悬液分 A、B 两组校正细胞浓度至 2.0×10^6/ml。A 组假照，B 组照射剂量用 20W 作用 5s。换能器固定于盛脱气水之容器底部，实验中水温保持 37℃，超声频率为 0.8MHz，探头焦距 50－80mm，即焦域长 30mm，盛细胞悬液之带塞聚乙烯管固定于焦域内，试管底部距探头 50mm。照射后 1h 以台酚兰拒染法测定 B 组活细胞计数，并调整 A 组活细胞数与 B 组一致，分别种入 12 孔培养板进行细胞爬片，每孔细胞数为 5×10^4，放入 37℃，5%CO_2 孵箱培养 2d 后进行免疫组化染色以及原位杂交。

1.4 免疫细胞化学染色

取 SMMC7721 细胞爬片，95% 乙醇室温固定，采用 SP 染色法，DAB 显色，VEGF 一抗工作浓度为 1:80，PCNA 一抗工作浓度为 1:200。阳性对照为人乳腺癌细胞标本(由试剂公司提供)，阴性对照为 SMMC7721 细胞爬片染色时以 PBS 缓冲液代替一抗，其余步骤相同。

1.5 原位杂交检测

取 SMMC7721 细胞爬片，4% 多聚甲醛/0.1M PBS (pH7.2－7.6)室温固定，实验步骤按原位杂交检测试剂盒使用说明书进行，DAB 显色，所有试剂均用 0.1% 的 DEPC 处理。阴性对照为 SMMC7721 细胞爬片以 PBS 缓冲液代替探针，其余步骤相同。

1.6 结果判定

VEGF 以细胞膜、细胞浆出现棕黄色或黄褐色颗粒状着色为阳性，未着色或浅黄色为阴性。PCNA 以细胞核出现棕黄色或黄褐色颗粒状着色为阳性，未着色或浅黄色为阴性。VEGF mRNA 和 PCNA mRNA 均以细胞胞浆着色呈棕黄色或黄褐色为阳性，未着色或浅黄色为阴性。每张染色的细胞爬片取高染色区和低染色区各 10 个高倍视野，取其算术平均数为该细胞爬片的阳性染色率。以乳腺癌细胞为阳性对照，实验中以 PBS 液替代一抗为阴性对照。

1.7 统计学处理

采用 F 检验和 t 检验，以 $P<0.05$ 为显著性。

2 结 果

2.1 剂量－效应关系

在频率、功率恒定的情况下，随着时间的延长(5s、10s、15s、20s、25s)细胞的死亡率增加，在 0.8MHz、20W、25S 的照射强度下，肝癌细胞 SMMC7721 的存活率稳定在 30% 左右，再增加照射时间，则细胞死亡率急升。(如图 1)

2.2 聚焦超声对 SMMC7721 细胞 VEGF 和 PCNA 表达及 VEGF mRNA 和 PCNA mRNA 表达的影响

未照组(A 组)的 VEGF、VEGF mRNA 和 PCNA、PCNA mRNA 呈高表达，照射组(B 组)的 VEGF、VEGF mRNA 和 PCNA、PCNA mRNA 呈低表达甚至不表达，两组比较 $P<0.05$，有统计学意义。($P<0.05$)(如图 2～9 示)

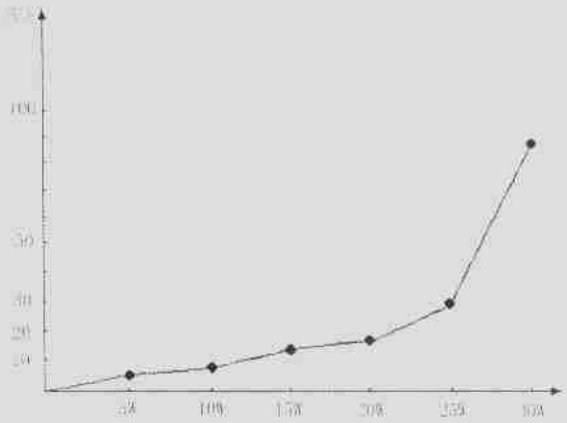


图 1 剂量—效应曲线



图 2 照射组 SMMC7721 细胞表达的 VEGF mRNA 染色(可见多数细胞胞浆浅染)



图 3 未射组 SMMC7721 细胞表达的 VEGF mRNA 染色(可见多数细胞胞浆深染)

维普资讯 http://www.cqvip.com



图 4 照射组 SMMC7721 细胞表达的 VEGF 染色（可见多数细胞胞浆浅染）

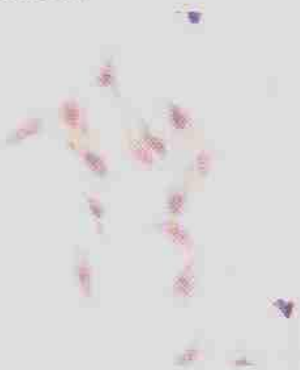


图 5 未射组 SMMC7721 细胞表达的 VEGF 染色（可见多数细胞胞浆深染）



图 6 照射组 SMMC7721 细胞表达的 PCNA mRNA 染色（可见多数细胞胞浆浅染）



图 7 未射组 SMMC7721 细胞表达的 PCNA mRNA 染色（可见多数细胞胞浆深染）



图 8 照射组 SMMC7721 细胞表达的 PCNA 染色（可见多数细胞胞浆浅染）



图 9 未射组 SMMC7721 细胞表达的 PCNA 染色（可见多数细胞胞浆浅染）

表 1 聚焦超声对 SMMC7721 细胞表达的影响

分组	样本例数 n	$\bar{x} \pm s$
照射组 VEGF	24	0.180 ± 0.040
未照组 VEGF	24	0.670 ± 0.030
照射组 VEGF mRNA	24	0.160 ± 0.045
未照组 VEGF mRNA	24	0.430 ± 0.033
照射组 PCNA	24	0.210 ± 0.038
未照组 PCNA	24	0.760 ± 0.027
照射组 PCNA mRNA	24	0.180 ± 0.035
未照组 PCNA mRNA	24	0.420 ± 0.029

3 讨 论

PCNA 是增殖细胞合成 DNA 所必需的核蛋白，它已被作为癌细胞增殖的标志物。运用免疫组化的方法检测 PCNA 是研究肝癌细胞增殖活性最常用的方法。结合组织病理特点，PCNA 标签指数（Labeling Index）是评估肝癌恶性程度，预测复发及病人预后有价值的分子标志物[2]。

VEGF 是一种高度特异的血管内皮细胞有丝分裂素，可作为肿瘤转移和复发及预后判断的独立指标。机体 VEGF 表达与大多数肿瘤的预后呈负相

维普资讯 http://www.cqvip.c

关,VEGF 对抗癌治疗的效果有预测和监测作用。Poon 等研究证实,VEGF 高表达与肝内转移,微静脉侵袭等显著相关,并且认为 VEGF 是肝癌侵袭和预后的分子标志物[3~5]。

肝癌细胞表达的 VEGF、VEGF - mRNA、PCNA、PCNA - mRNA 的改变,反映了其增殖复发能力的改变。聚焦超声通过影响肝癌细胞的 VEGF、PCNA 的表达就可能改变肝癌细胞的增殖复发能力。

实验发现,以聚焦超声作用肝癌细胞后,部分 SMMC7721 细胞虽可继续存活,但其 VEGF 和 PCNA 蛋白的表达被抑制($P<0.05$)以及 VEGF mRNA 和 PCNA mRNA 的表达被抑制($P<0.05$)。这表明经聚焦超声照射后存活的 SMMC7721 细胞增殖复发能力减弱,而其机制可能通过空化效应致生物组织内自由基产生而抑制 VEGF mRNA 和 PCNA mRNA 的表达,使 VEGF 和 PCNA 蛋白的表达减少来实现。另外,聚焦超声可导致 SMMC7721 细胞线粒体损伤,而线粒体损伤可能导致迟发性抑制,有引起肿瘤干细胞增殖受抑之可能,且有研究证明聚焦超声可提高细胞膜通透性[6],这些事实都提示经聚焦超声照射治疗后的残余存活肝癌细胞的生物学活性已有降低。可见,聚焦超声作为肝癌的一种全新的无创介入治疗手段不仅可以杀灭大部分肿瘤组织,对未被杀死但受到照射的残存肿瘤细胞也有杀伤作用,在改善患者预后,预防肝癌细胞增殖复发上有积极的作用。

参 考 文 献

[1] Li CX, Xu GL, Li JJ, et al. High intensity focused ultrasound for liver cancer[J]. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi, 2003; 25 (1): 94 - 96.

[2] Lin GY, Chen ZL, Lu CM, et al. Immunohistochemical study on p53, H - ras, c - erB - 2 protein and PCNA expression in HCC tissues of Han and Minority ethnic patients[J]. World J Gastroenterol, 2000; 6: 234 - 238.

[3] Salven P, Ruotsalainen T, Mattson K, et al. High pre - treatment serum level of vascular endothelial grouth factor (VEGF) is associated with poor outcome in small - cell lung cancer[J]. Int J cancer, 1998; 17: 144 - 146.

[4] Yoshikawa T, Tsuburaya A, Kobayashi O, et al. Plasma concerntrations of VEGF and b FGF in patients with gastric carcinoma[J]. Cancer lett, 2000; 153: 7 - 12.

[5] Miyake H, Hara I, Yamanaka K, et al. Elevation of serum level of vascular endothelial growth factor as a new predictor of recurrence and disease progression in patients with superficial urothelial cancer[J]. Urology, 1999; 53: 302 - 307.

[6] Suzuki k, Hayashi N, Miyamoto Y, et al. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in human atocellular carcinoma[J]. Cancer Res, 1996; 56 (13): 3004 - 3009.