维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2004)03－0261－05

聚焦超声诱导卵巢癌细胞株 COC1 凋亡及其机制的初步研究

杨志宏，王智彪

(重庆医科大学医学超声工程研究所，重庆 400016)

【摘 要】目的：研究低频脉冲聚焦超声波对人卵巢癌细胞株 COC1 的抗肿瘤作用，并探讨其诱导细胞凋亡的分子机制。方法：以低频脉冲聚焦超声(超声频率 0.8MHz，声强 83.6W/cm^2，脉肿持续时间：50μs)辐照卵巢癌 COC1 细胞 10s，然后采用 MTT 法观察超声对 COC1 细胞增殖的抑制作用；流式细胞仪(FCM)、TUNEL 法、荧光染色和光、电镜检测细胞凋亡；应用 FCM 免疫荧光技术观察 Bcl－2、bax 基因蛋白表达的变化。结果：超声可明显抑制存活卵巢癌 COC1 细胞的增殖，辐照后 12h、24h、36h、48h，COC1 细胞 MTT 光吸收值与对照组相比显著降低；FCM 检测超声辐照后 6h 的 COC1 细胞凋亡率达(23.57±4.62)%；Bcl－2 蛋白的荧光指数(FI)降低，而 bax 蛋白 FI 升高。同时 TUNEL 法观察到棕褐色着染的凋亡细胞；荧光显微镜和电镜下观察到凋亡小体形成等典型的形态学改变。结论：低频脉冲聚焦超声辐照对人卵巢癌细胞株 COC1 具有细胞毒作用，其机制为诱导辐照后存活的人卵巢癌细胞株 COC1 凋亡，bcl－2 和 bax 蛋白可能参与了 COC1 细胞凋亡过程。

【关键词】聚焦超声；细胞凋亡；COC1 细胞

【中国图书分类法分类号】R73－3 【文献标识码】A 【收稿日期】2003－10－27

Preliminary study of apoptosis in human ovarian cell line COC1 induced by ultrasound and its mechanism

YANG Zhihong, et al

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

【Abstract】*Objective*: To investigate the antitumor effect of Low－Frequency Pulse Forcusd Ultrasound(LFPFU) exposure in human cell line COC1, and to clarify its probable mechanism. *Methods*: The growth inhibitory effect of ultrasound exposure[0.8MHz, 83.6W/cm^2, pulse duration(PD) 50μs; sonication time of 10s] on COC1 cell was observed by MTT colormetric assay. Apoptosis was analyzed using flow cytometry(FCM) and terminal deoxynucleotidyl transferase－mediated dUTP－digoxin nick end labeling(TUNEL), and fluorescent microscope and electron microscope were applied to detect the morphological changes of COC1 cell. The protein expression of bcl－2 and bax affected by LFPFU were determined by FCM and immunofluorescent techniques. *Results*: Sonication could obviously suppress proliferation of COC1 cells surviving ultrasound exposure. The absorbance value(A_{570}) of MTT decreased significantly at 12h, 24h, 36h and 48h after sonication as compared with control group. The hightest apoptosis rate was found to reach 23.57±4.62% by FCM, and brown－colored positive apoptotic cells were observed with TUNEL method at 6h after sonication. Typical morphological changes of apoptosis such as apoptotic body was found under fluorescent microscope and transmission electron microscope. Fluorescence index(FI) of bcl－2 decreased, and FI of bax increased after LFPFU exposure. *Conclusion*: LFPFU can induce apoptosis in vitro in human ovarian cell line COC1 surviving ultrasound exposure. The bcl－2 and bax protein may be involved in the apoptotic process.

【Key words】Forcusd ultrasound; Apoptosis; COC1 Cell

聚焦超声作为近年来兴起的非侵入性肿瘤治疗技术在肿瘤治疗中已显示应用前景，高强度聚焦超声治疗实体肿瘤已进入临床[1]。超声在抗癌治疗应用的临床前研究涉及基因治疗、化疗增效、声动力治疗等[2]。超声对癌细胞的生物学效应与空化作用有关[3]。近来，超声空化机制诱导离体血液和淋

作者介绍：杨志宏(1965－)，男，副主任医师，博士生，主要研究方向：肿瘤超声治疗。

基金项目：国家自然科学基金资助项目(30200060)。

实 验 室：省部共建国家重点实验室。

维普资讯 http://www.cqvip.com

巴系统肿瘤细胞系凋亡的研究已有报道[4,5]。

由于目前尚无超声诱导实体肿瘤细胞株凋亡的研究报道。本研究旨在探讨低频率脉冲聚焦超声辐照对卵巢癌 COC1 细胞株增殖的影响，是否具有诱导 COC1 细胞株凋亡的作用，为低频脉冲聚焦超声应用于肿瘤临床治疗中提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

卵巢癌 COC1 细胞株为悬浮细胞，源于分化较差的卵巢癌患者腹水，中国医科院肿瘤所建株，由中国典型培养物宝藏中心提供。MTT、碘化丙啶(PI)和 RNA 酶均为 sigma 公司产品。兔抗人 bcl－2、bax 多克隆抗体，羊抗兔 FITC－IgG 二抗均购自 Santa Cruz 公司；脱氧核苷酸末端转移酶原位标记(TUNEL)检测试剂盒为 Introgen(ApopTag Kit. Intergen Company)产品；Bio－Rad Model 550 酶联免疫检测仪为美国 Bio－Rad 产品；FACSCalibur 流式细胞术是美国 B－D 公司的产品。透射电镜 H－600 为日本日立公司产品；超声辐照装置由重庆医科大学医学超声工程研究所设计制造；参数设计根据 Ashush H 报道[4]，探头直径 8cm，以透镜聚焦，焦距 50～80mm，声强固定为 83.6W/cm^2；超声频率为 0.8MHz，脉冲持续时间(Pulse duration，PD)20μs－100μs 可调，探头位于盛脱气生理盐水底部，声波由下向上发出。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 卵巢癌 COC1 细胞用含 10%灭活小牛血清的 PRMI－1640 培养液，在含 5%CO_2、37℃ 条件下培养。当细胞接种 24h 达对数生长期时，调整细胞浓度为 5×10^6～1×10^7/ml，取 1ml 细胞悬液放入聚乙烯试管固定于焦域内，试管底部距探头 50mm 进行辐照，根据前期研究发现，声强为 83.6W/cm^2 时，超声辐照即刻细胞杀伤率与辐照时间及 PD 成正比(待发表)，当辐照时间 10s，PD 50μs 时，部分细胞即刻死亡，0.4%的台盼蓝染色显微镜下细胞计数板记数，细胞存活率为(37.33±8.41)%，以下研究上述剂量超声(83.6W/cm^2×10s，PD50μs)对存活细胞的生物学效应。

1.2.2 COC1 细胞活性 MTT 检测 调整超声辐照后(83.6W/cm^2×10s，PD 50μs)幸存的 COC1 细胞密度至 5×10^4/ml，每孔 100μl 分别接种于 4 块 96 孔板，37℃ 5%CO_2 培养箱培养，1～3 列作为对照组，4～6 列为辐照组。辐照后 12h、24h、36h 和 48h，分别取一块 96 孔板做 MTT 染色，用酶联免疫检测术在 570nm 波长下测定吸光度值 A_{570}。

1.2.3 流式细胞术检测 DNA 含量及 bcl－2、bax 基因表达 超声辐照后的 COC1 细胞继续培养，并于 6h、12h 和 24h，取 10^6 细胞离心 PBS 洗涤，沉淀，4℃ 70%酒精固定，RNA 酶孵育，PI 染色，上机测定细胞周期分布和凋亡率；以正常的 COC1 作为对照组。超声辐照前、后 3h、6h COC1 细胞，4%多聚甲醛固定，70%的甲醇 4℃ 作用 30min 后，加入兔抗人多克隆抗体 4℃ 悬浮 1h，PBS 洗涤，再加羊抗兔 FITC－IgG 于避光处冰浴 30min，PBS 洗涤 2 次后 FCM 检测荧光强度，计算荧光指数(Fluorescence Index，FI)，FI＝(实验样品的平均荧光强度－阴性对照的平均荧光强度)/(阳性对照样品的平均荧光强度－阴性对照的平均荧光强度)，以荧光指数(FI)表示 bcl－2、bax 蛋白的相对含量。

1.2.4 细胞形态学观察

①Heoehst 33258 染色观察细胞核形态改变：超声处理后的 COC1 细胞，离心去上清，加固定液(甲醇：乙酸＝3：1)100μl，4℃ 固定 10min，混匀后滴于载玻片上，Heochst 33258 染色(5μg/ml)，紫外光激发，荧光显微镜下观察并照像。

②透射电镜观察细胞超微结构：超声处理后 6h，收集细胞用 2.5%戊二醛固定 2h，制备透射电镜标本观察其超微结构并拍照。

1.2.5 TUNEL 法检测凋亡细胞 超声辐照后的 COC1 细胞继续培养 6h，离心涂片，用 TUNEL 试剂盒检测凋亡细胞，显微镜下观察并拍照。

1.2.6 统计学分析：本实验资料数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，两组均数间比较采用 t 检验 $P<0.05$ 为有显著性差异。

2 结 果

2.1 超声对 COC1 细胞生长的影响

超声辐照后，存活的细胞调整密度后继续培养，用 MTT 法检测超声作用后 12h、24h、36h 和 48h COC1 细胞的吸光度值(A_{570})明显较对照组低(图 1)。提示超声辐照抑制 COC1 细胞增殖。

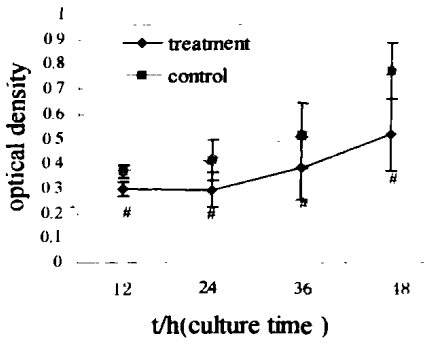


图 1 超声对 COC1 细胞增殖的影响

2.2 FCM 检测超声对 COC1 细胞凋亡的诱导作用

超声辐照 COC1 细胞后 6h、12h、24h 后，均出现亚二倍体峰(Hypodiploid peak，亚 G1 峰)，凋亡率在 6h 达到高峰(23.57±4.62)%，随后逐渐下降，分别为(21.71±4.59)%和(15.23±3.71)%。图 2 示 FCM 检测的超声作用后不同时间 COC1 细胞凋亡

维普资讯 http://www.cqvip.com

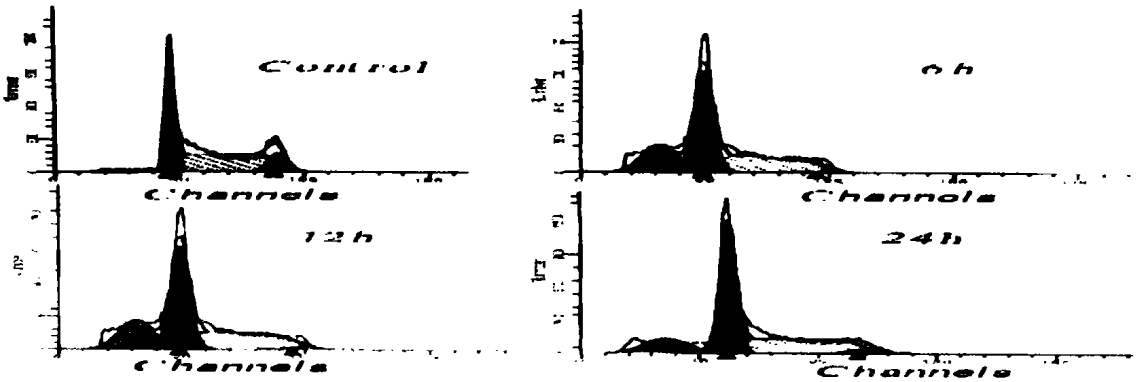


图 2 超声辐照后不同时间培养的 COC1 细胞流式细胞术对凋亡细胞的检测分析

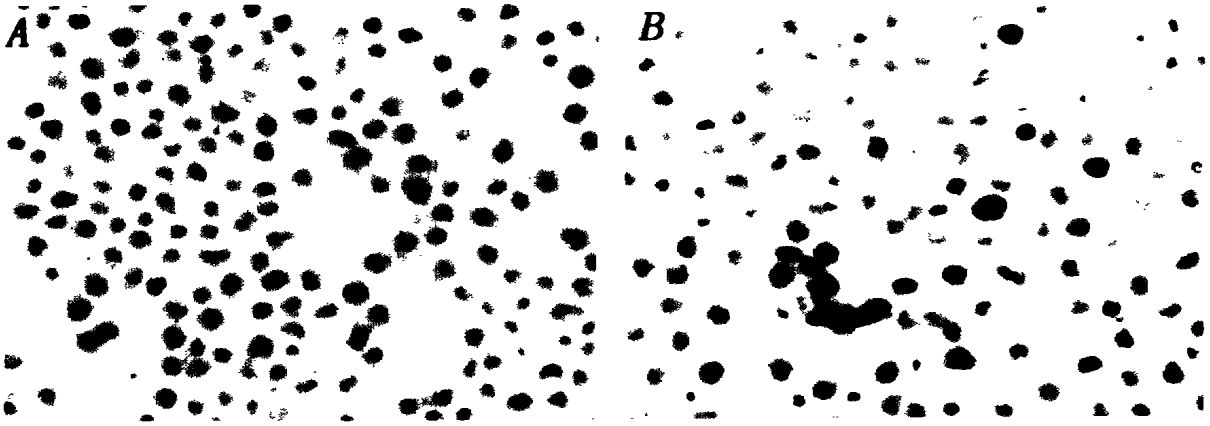


图 3 TUNEL 方法检测超声辐照后 6h 诱导的 COC1 细胞凋亡

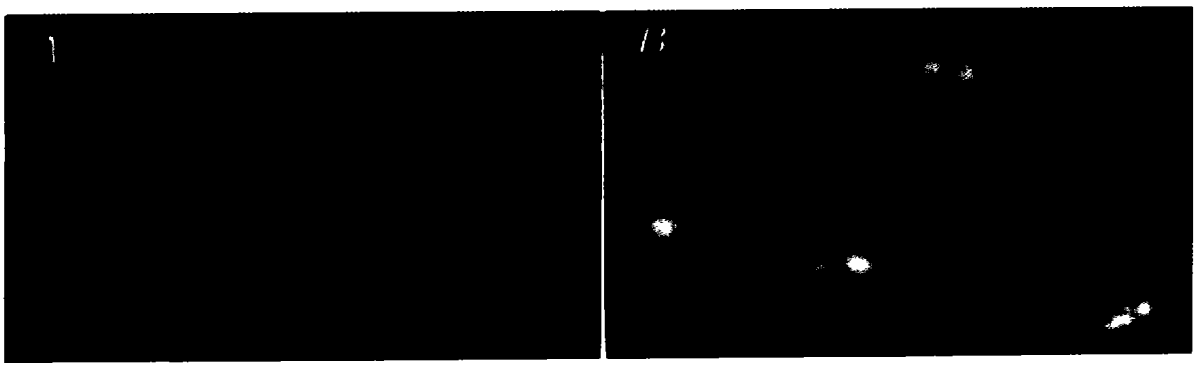


图 4 超声辐照 6h 后荧光显微镜观察 COC1 细胞核形态（×200）

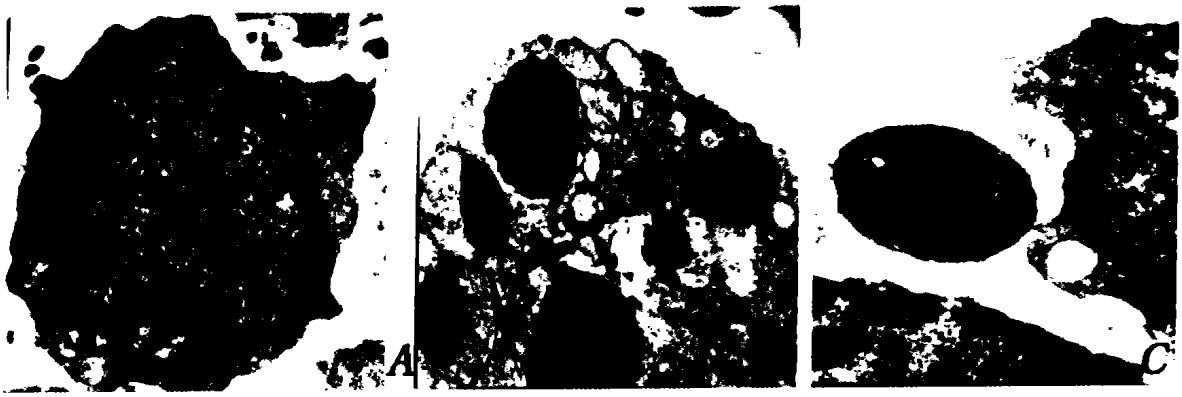


图 5 超声辐照 6h 后，透谢电镜下观察 COC1 细胞超微结构

维普资讯 http://www.cqvip.com

的分析图。以上结果提示超声辐照能诱导 COC1 细胞凋亡。

2.3 TUNEL 法检测凋亡细胞

超声辐照 COC1 细胞后 6h,可见凋亡细胞核呈棕色或棕褐色着色,凋亡细胞变圆,体积缩小;而对照组着色细胞极少(图 3)。提示超声通过激活核酸内切酶导致 COC1 细胞凋亡。

2.4 细胞形态学特征观察

超声辐照后 6h 的 COC1 细胞,Heochst 33258 染色荧光显微镜下观察发现,COC1 细胞核染色质高度浓缩凝集呈致密强荧光,并见细胞出泡形成凋亡小体;电镜超微结构见染色质凝集分块(图 4),最终形成凋亡小体(图 5)。表明超声诱导 COC1 细胞凋亡呈现凋亡细胞相同一致的特征性改变。

2.5 超声辐照 COC1 细胞 bcl-2 和 bax 蛋白表达的变化

超声辐照后 3h 和 6h,COC1 细胞 bcl-2 表达与超声辐照前相比明显降低($P<0.05$);而 bax 表达明显升高($P<0.01$),见表 1。提示 bcl-2 和 bax 蛋白可能参与超声诱导 COC1 细胞凋亡。

表 1 超声辐照 COC1 细胞后 bcl-2 和 bax 蛋白的表达(FI 值,$\bar{x}\pm s$)

组 别	bcl-2	bax
超声辐照前	1	1
超声辐照后 3h	0.94 ± 0.06	$1.38\pm0.16^{*}$
超声辐照后 6h	$0.81\pm0.08^{*}$	$1.54\pm0.21^{**}$

注:$n=5$,超声辐照后与超声辐照前相比,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$

3 讨 论

多细胞生物在组织发育和器官形成中必须去除生长数量过多的或有潜在危险的细胞,形成了称为程序化细胞死亡或细胞凋亡的本能的自我毁灭机制;细胞凋亡是可以被多种生理、病理刺激所诱发的,是细胞对所处环境某些特定信息的一种应答反应,涉及细胞信号传导及调控。细胞增殖失控和凋亡抑制是肿瘤发生的主要原因,凋亡诱导途径的缺陷导致肿瘤细胞增多。当细胞凋亡抵抗机制阻止携带 DNA 损伤的细胞凋亡时,则有助于肿瘤的形成,所以规避凋亡是肿瘤形成的基础[6]。化疗主要是通过诱导肿瘤细胞的凋亡[7],因而诱导肿瘤细胞的凋亡就会抑制肿瘤的生长。

超声生物效应包括热、机械和空化机制。超声空化分为稳态空化和瞬态空化,稳态空化指媒介中气泡振动进入共振状态;瞬态空化指当声强较高时,在声波负压半周期内气泡迅速膨胀,随后被压缩至崩溃,在短时间内气泡温度可达数千度,压力高达几百个大气压,导致气泡内水蒸气裂解为 H 和 OH 自由基损伤细胞[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(cell lysis effect),包括胞膜破裂,细胞裂解;这一事实早已报道,研究表明,0.75MHz-1.1MHz 的连续波超声辐照人工培养的动物细胞,发生细胞溶解的阈值声强为 $1W/cm^2$;且已证明源于超声稳态空化机[8];后来有学者把离体培养细胞溶解作为超声辐照,产生空化效应的标志[3]。(2)对超声辐照后存活细胞的生物学效应[9]包括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黏附迁移改变;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[3,9]。

当超声波辐照低浓度细胞悬液时,或使用较低的超声频率时,超声吸收系数较小,产生的热量和温升均接近于可忽略的程度,其产生的效应主要与空化机制有关[3],包括微声流(microstreaming)导致的粘滞应力和超声瞬态空化产生的自由基[8]。根据经验公式[11],本研究所用的强度,频率、足以产生超声瞬态空化,但不会引起温度升高。本研究表明,超声辐照后即刻细胞存活率为(37.3±8.4)%,提示超声空化效应的存在;通过 MTT 法检测存活 COC1 细胞,发现超声抑制其增殖;FCM 检测 DNA 亚二倍体峰发现,超声辐照后 6h 凋亡率最高(23.57±4.62)%,以后逐渐降低;通过 TUNEL 法、荧光染色和光电镜技术观察发现超声作用 6h 后 COC1 细胞呈现细胞凋亡的典型形态改变:凋亡细胞发泡(bledding)、染色质浓缩和核小体形成。这与 Ashush H 和 Honda H 的研究结果一致[4,5],尽管所用的超声辐照条件和参数有所不同,提示人肿瘤细胞对超声损伤刺激反应的一致性。

超声瞬态空化效应产生自由基和微声流粘滞应力,对细胞膜、细胞骨架的损伤和 DNA 单链断裂均可通过细胞信号传导,引起细胞凋亡,其中涉及许多凋亡相关基因参与,bcl-2 家族蛋白是细胞凋亡的主要调控者之一,bcl-2 具有抗凋亡功能,其在肿瘤细胞过渡表达抑制肿瘤细胞凋亡,bax 与 bcl-2 作

维普资讯 http://www.cqvip.com

用相反,促进细胞凋亡[7]。本研究结果表明,超声辐照 COC1 细胞可上调 bax 基因表达,下调 bcl-2 基因表达,其表达量的改变可能在超声诱导 COC1 细胞凋亡过程中发挥重要作用;但本研究超声诱导细胞凋亡的机制仍需进一步研究,如本研究条件下的超声辐照对 DNA 修复及细胞骨架的影响,其诱导细胞凋亡的细胞信号传导通路等。

本研究结果表明,低频脉冲聚焦超声具有诱导辐照后存活的人卵巢癌细胞株 COC1 凋亡的作用,由于超声波在体外细胞悬液与体内组织所通过的介质不同,体外研究结果与体内研究可能存在一定的差异。本研究可为低频脉冲聚焦超声抑制肿瘤生长的在体(In Vivo)实验研究提供依据,并将在以后的动物在体肿瘤研究中进一步证实,同时本研究也提示低频超声诱导肿瘤细胞凋亡在治疗实体肿瘤中应用的可能性。

参 考 文 献

[1] ter Haar GR. High intensity focused ultrasound for the treatment of tumors[J]. Echocardiography, 2001; 18(4): 317-322.

[2] Rosenfeld E. Non-thermal non-cavitational effects of ultrasound[J]. Ultraschall Med, 2003; 24(1): 40-44.

[3] Miller M W, Miller D L, Brayman A A. A review of in vitro bioeffects of inertial ultrasonic cavitation from a mechanistic perspective[J]. Utrasound Med Bio, 1996; 22(9): 1131-1154.

[4] Ashush H, Rozenszajn LA, Blass M, et al. Apoptosis induction of human myeloid leukemic cells by ultrasound exposure [J]. Cancer Res, 2000; 60(4): 1014-1022.

[5] Honda H, Zhao Q L, Kondo T. Effect of dissolved gases and an echo contrast agent on apoptosis induced by ultrasound and its mechanism via the mitochondria-caspase pathway[J]. Utrasound Med Bio, 2002; 28(5): 673-682.

[6] Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer[J]. Cell, 2000; 100(1): 57-70.

[7] Kaufmann SH, Eamshaw WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy[J]. Exp Cell Res, 2000, 256(1): 42-49.

[8] Riesz P, Kondo T. Free radical formation induced by ultrasound and its biological implications [J]. Free Radic Biol Med, 1992; 13(3): 247-270.

[9] Alter A, Rozenszajn LA, Miller HI, et al. Ultrasound inhibits the adhesion and migration of smooth muscle cells in vitro [J]. Ultrasound MedBiol, 1998; 24(5): 711-721.

[10] Clarke RL, ter Haar GR. Temperature rise recorded during lesion formation by high-intensity focused ultrasound[J]. Ultrasound Med Biol, 1997; 23(2): 299-306.

伴有感觉平面的截瘫型吉兰-巴雷综合征 1 例报道

李光勤 , 彭国光

(重庆医科大学临床学院神经内科,重庆 400016)

典型的吉兰-巴雷综合征的临床表现为急性起病的四肢对称性弛缓性瘫痪,但有大约 10% 的患者其临床表现不典型,称为变异型。在吉兰-巴雷综合征的变异型中,以 Fisher 综合征最常见,而截瘫型仅国外有个例报道[1],并认为不应有感觉平面。现将我科收治的 1 例伴有确切感觉平面的截瘫型吉兰-巴雷综合征报道如下。

1 临床资料

患者,女,37 岁,2003 年 5 月 16 日入院。12 天前患者于受凉后次日感双手指足趾麻木,因程度较轻未予重视。后双下肢麻木由足趾发展至小腿。5 天后出现上楼梯困难,但走平路尚可以。病后第 6 天到当地县医院就诊,按"周围神经炎"治疗,病情仍逐渐加重,麻木发展至胸部,并出现行走困难而转入我院。病后饮食及大小便正常。入院后内科检查正常。神经系统检查:颅神经正常;双上肢肌力正常,双腕以下痛触觉减退;双下肢近端肌力Ⅳ级,远端 0 级,无肌肉萎缩,肌张力偏低;双侧 T8 以下痛温觉减退,双下肢远端深感觉减退;双侧腹壁反射消失,四肢腱反射消失,病理征(-)。入院当日胸髓 MRI 正常。电生理示上肢正中神经及尺神经运动传导速度较正常减慢 20%~30%,下肢胫神经和腓总神经运动传导速度减慢 40%~55%,F 波及 H 反射不出波。腰穿脑脊液无色清亮,压力正常, 潘氏反应 (+), 细胞总数 8×10⁶/L, 白细胞 2×10⁶/L,蛋白 0.78g/L,(下转第 291 页)