文章编号:0253－3626(2003)01－0032－04

高强度聚焦超声破坏膀胱癌细胞株的实验研究

刘　川[1],乔天愚[1],杨光永[1],张唯力[1],伍　烽[2],王智彪[2]

(1.重庆医科大学第二临床学院泌尿外科,重庆　400010;2.重庆医科大学医学超声工程研究所,重庆　400016)

【摘　要】目的:探讨高强度聚焦超声(HIFU)治疗膀胱癌的可行性。方法:HIFU 辐照 T_{24}膀胱癌细胞株后用 MTT 法测定活细胞数,分析 HIFU 剂量与细胞存活率的关系,测定培养液内碱性磷酸酶(ALP)、肌酸激酶(CK)活性,并对癌细胞进行形态学观察。结果:随着 HIFU 剂量增加,膀胱癌细胞存活率迅速减少,残留癌细胞生长受抑。癌细胞结构受到不可逆性破坏。结论:HIFU 治疗膀胱癌是可行的。

【关键词】高强度聚焦超声;膀胱肿瘤;细胞株;超声治疗

【中国图书分类法分类号】R454.3;R737.14　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2002－03－15

The study of bladder cancer cell line irradiated with high intensity focused ultrasound

LIU Chuan, et al

(*Department of Urology, the Second College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】 *Objective*: To investigate the feasibility and mechanism of high intensity focused ultrasound (HIFU) in the treatment of bladder cancer. *Methods*: After irradiating the bladder cancer cell line T_{24}, the number of survival cells was detected with MTT colorimetry. The relationship between HIFU dosage and cell survival rate was analysed. The activity of alkaline phosphatase (ALP) and creatine－kinase (CK) in culture medium was determined and the structures of the cells were studied. *Results*: The relationship between sound intensity and cell survival rate is in power series. With increasing sound intensity, cell survival rate decreased sharply. The relationship between irradiation time and cell survival rate is linear. When sound intensity was 2300 W/cm^2, the optimum irradiation time was 7 seconds. After irradiation, cell growth was suppressed and cell numbers reduced continuously until 6 hours later. This indicated that there was necrobiosis in these cells. With the prolongation of the irradiation, the activity of ALP, CK in culture medium increased and reached it's peak at two seconds. Under optical and electronic microscopes, the damage to the cancer cell was irreversible. *Conclusion*: HIFU is an effective, minimally invasive treatment option for bladder tumor.

【Key words】 High intensity focused ultrasound; Bladder tumor; Cell line; Ultrasound therapy

高强度聚焦超声(HIFU)治疗肿瘤是近年兴起的高新技术,它利用超声波具有穿透性和可汇聚性的特点,将高强度的超声波穿过皮肤汇聚于深部肿瘤内,在焦点处产生瞬态高温和空化等生物效应,从而杀死肿瘤细胞,破坏肿瘤组织,达到治疗目的。因此,它治疗肿瘤具有安全、无创、可反复治疗等优点。为探讨此项技术治疗膀胱肿瘤的可行性,我们进行了 HIFU 对 T_{24}膀胱癌细胞株的体外杀伤实验,现将初步结果汇报如下。

1　材料与方法

作者介绍:刘　川(1971－　),男,讲师,硕士,
主要研究方向:泌尿、男性生殖系统肿瘤。

1.1　HIFU 治疗系统样机及对癌细胞株辐照过程

该机主要由 B 超显像和治疗探头组合而成。治疗探头利用平面压电晶片前加透镜聚焦原理制作而成,物理学焦域大小 1.1mm×1.1mm×3.3mm,焦距 80mm,焦域内声强:0～7200W/cm^2,连续可调。工作频率 1.6MHz,连续波。将装有癌细胞悬液的试管(1ml/支)置于二维移动支架上,使试管内癌细胞悬液浸于声耦合剂中,HIFU 焦域定位于细胞悬液中央。启动治疗系统,完成 HIFU 对癌细胞的体外辐照。

1.2　细胞株及培养

人膀胱癌细胞株 T_{24}由重庆医科大学病理生理教研室提供,培养于 RPMI－1640 液中,至指数增生期进行实验。

1.3　观察项目

将癌细胞悬液按以下项目分组,并分别在 HIFU 辐照后用 MTT 法测定残留的活细胞数。

①HIFU 声强与细胞存活率的关系:按声强分组,分为 9

组,分别为 0～3328W/cm^2,辐照时间均为 7s;

②HIFU 辐照时间与细胞存活率的关系:按辐照时间分组,分为 11 组,分别为 0～10s,声强均为 2300W/cm^2;

③膀胱癌细胞生长曲线:按 HIFU 辐照后的培养时间分组,分为 7 组,分别为 0～120h,每组设相同数量的对照管。治疗组声强为 727.8W/cm^2,治疗时间 7s;

④HIFU 辐照时间与试管内细胞悬液温度关系:按 HIFU 辐照时间分组,分为 10 组,分别为 0～7s,HIFU 声强均为 3328W/cm^2。辐照后,立即将数字式温度计的热敏探针插入试管内癌细胞悬液中心进行测温;

⑤HIFU 治疗时间与碱性磷酶(ALP)、肌酸激酶(CK)活性的关系:按 HIFU 辐照时间分组,分为 10 组,分别为 0～7s,HIFU 声强均为 3328W/cm^2。辐照后,立即离心,取上清液加样于全自动生化分析仪,测定 ALP、CK 活性。

⑥光、电镜观察:取半致死剂量(LD_{50}:声强 277.5W/cm^2 辐照 7s)的 HIFU 辐照后立即离心,癌细胞团块经固定、染色后分别进行光镜和 H-600 透射电镜观察。

1.4 统计学分析方法

采用 SAS 软件进行回归分析,方差分析及 t 检验,检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结 果

2.1 HIFU 声强(x)与膀胱癌细胞存活率(y)的关系(图 1)

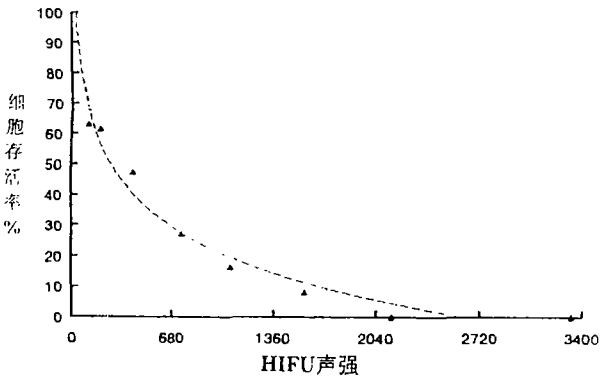


图 1 HIFU 声强与细胞存活率关系曲线

二者关系式为 $y=178.692-55.4074x^{0.1489}$($R^2=0.9659$)。由此可看出,当频率(1.6MHz)及辐照时间(7s)固定时,随着 HIFU 声强的增加,细胞存活率呈等比级数迅速减少,其半致死剂量为 277.5W/cm^2 辐照 7s。

2.2 HIFU 辐照时间(x)与膀胱癌细胞存活率(y)关系(图 2)

二者关系式:$y=7.584-0.831x$($R^2=0.9269$)。可看出,当 HIFU 频率(1.6MHz)及声强(2300W/cm^2)固定时,随着 HIFU 辐照时间延长,膀胱癌细胞存活率呈直线下降。在这种条件下,适宜的治疗时间为 7s,因为第 7s 的细胞存活率显著低于第 6s 的细胞存活率($P<0.05$),而 7s 以后的细胞存活率间无显著性差异($P>0.05$)。

2.3 膀胱癌细胞生长曲线(图 3)

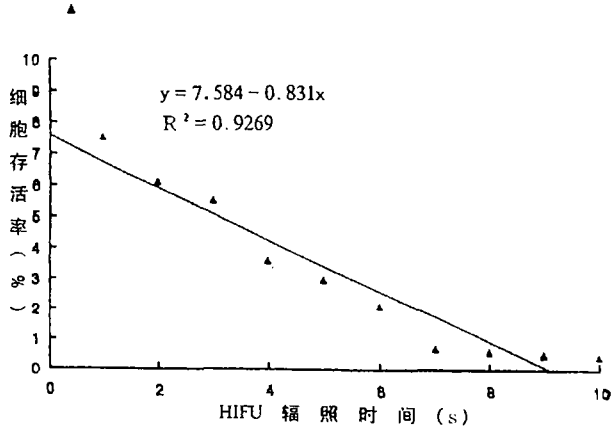


图 2 HIFU 辐照时间与细胞存活率关系直线

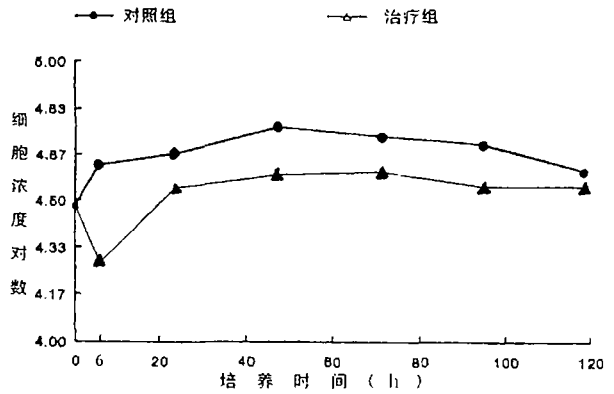


图 3 膀胱癌细胞生长曲线

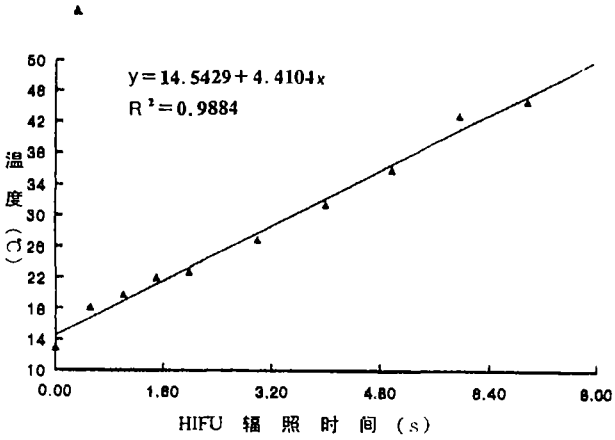


图 4 HIFU 辐照时间与癌细胞悬液温度关系直线

由图可见,HIFU 辐照后刚开始培养时,辐照组

与对照组细胞数相等，但培养 6h 后，辐照组细胞数反而进一步减少，明显少于对照组（$P<0.01$），此后细胞数才开始增加，但始终少于对照组（$P<0.01$），直到第 120h，对照组细胞也开始减少，辐照组细胞数才接近对照组（$P>0.05$）。

2.4　HIFU 辐照时间（x）与试管内癌细胞悬液温度（y）的关系（图 4）

二者关系式：$y = 14.5429 + 4.4104x$（$R^2 = 0.9884$），说明 HIFU 辐照时间与癌细胞悬液内温度间存在着直线关系，当 HIFU 频率（1.6MHz）及声强（3328 W/cm²）固定时，随着 HIFU 辐照时间延长，膀胱癌细胞悬液温度呈直线上升。

2.5　HIFU 辐照时间与膀胱癌细胞悬液内 ALP、CK 活性关系（图 5）

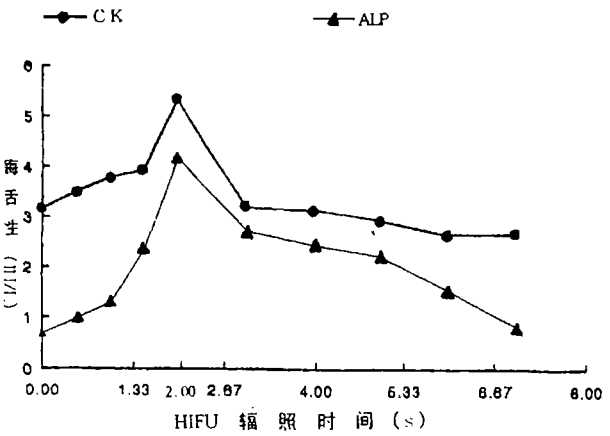


图 5　HIFU 辐照时间与细胞悬液内 ALP，CK 活性关系曲线

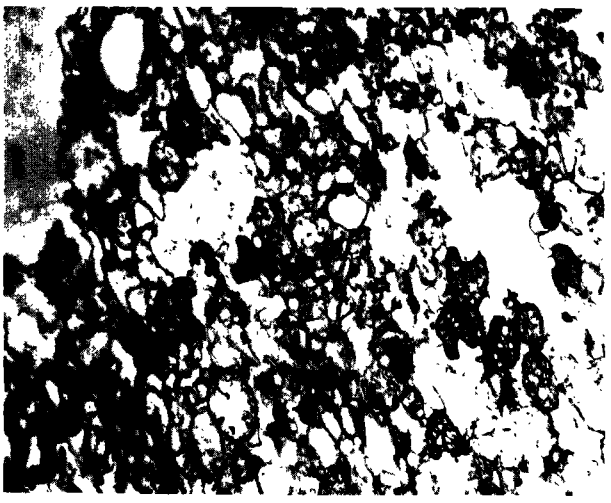


图 6　溢出细胞外的细胞器，已变性、坏死　EM（电子显微镜）×10,000

可以看出，在辐照过程中的前 2s 内，随着辐照时间的延长，细胞悬液内 ALP、CK 活性迅速增加，在第 2s 时达高峰（$P<0.05$），以后随着辐照时间的延长，ALP、CK 活性迅速下降。

2.6　膀胱癌细胞光、电镜观察



图 7　细胞膜破裂后胞浆流失，仅剩下裸露的细胞核，且核膜破裂　EM（电子显微镜）×8,000

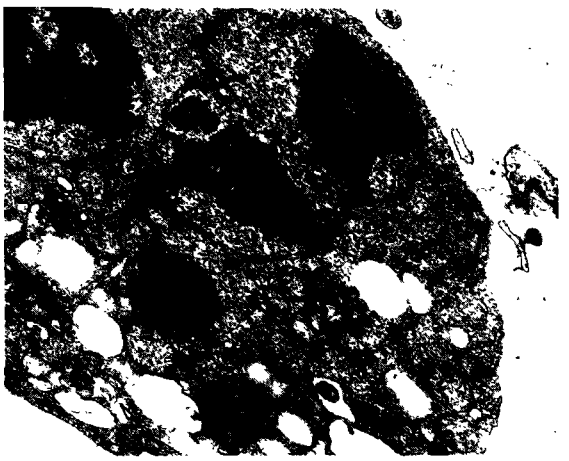


图 8　核固缩、碎裂　EM×17,000



图 9　胞浆、胞核完全溶解，细胞坏死　EM×12,000

HIFU 辐照后立即可见大量细胞完全崩解，细胞膜破裂，肿胀、破裂的细胞器溢出细胞外（图6），

仅残存裸露的细胞核，核膜也破裂(图 7)。培养 6h 后再观察，发现残留细胞的细胞器明显肿胀，胞浆开始溶解，核固缩、碎裂(图 8)。甚至有的胞浆、胞核完全溶解，形成一团无定形物质(图 9)。

3 讨 论

HIFU 的剂量主要包括 3 个因素：频率、时间和声强。(1)频率一般多选用 1～2MHz，此频率的超声波具有一定的穿透性，且能被靶组织较好地吸收[1～3]。因此本实验选用的频率为 1.6MHz。(2)治疗时间是 HIFU 剂量的重要因素，本实验发现随着治疗时间的延长，细胞存活率呈直线下降，但在 7s 以后，细胞存活率下降不再明显。(3)本实验发现，增加 HIFU 声强对癌细胞的破坏作用比延长辐照时间更大，HIFU 声强与细胞存活率关系曲线为幂曲线，随着声强的增加，细胞存活率呈等比级数迅速减少。

HIFU 治疗膀胱肿瘤主要是利用其空化效应[4]。空化效应使培养液及癌细胞内空化泡迅速形成，并振荡、生长、收缩乃至崩溃，在其崩溃时，极短时间内在空化泡周围的极小空间内，产生 4700℃以上的高温和大约 5×10^7Pa 的高压，温度变化率高达 10^9℃/s，并伴生强烈的冲击波和(或)时速达 400km 的射流[5]。这种强烈的作用完全可导致焦域内肿瘤细胞大量破坏，出现光、电镜下所见到的细胞的碎裂、崩解。

ALP、CK 主要位于细胞内，癌细胞受到 HIFU 辐照时，由于细胞膜通透性增加或细胞破裂，这两种酶释放到细胞外，在第 2s 时，已有 94% 的细胞遭到破坏，因此，培养液中酶活性达高峰。但辐照 2s 以后，ALP、CK 活性迅速下降，此时细胞悬液内温度仅为 23.36℃，因此酶活性下降不是由于 HIFU 的热效应，空化效应才是主要的。空化过程中空化泡崩溃瞬间产生的高温、高压对 ALP、CK 产生破坏作用，这种作用迅速累积，在 2s 以后，HIFU 破坏的酶多于由破碎细胞释放入培养液中的有活性的酶，因此 ALP、CK 活性迅速下降。这提示 HIFU 还可能通过破坏肿瘤细胞的多种酶，抑制肿瘤细胞的代谢，从而发挥治疗作用。

HIFU 辐照后肿瘤细胞生长受抑，其生长曲线变平，辐照组细胞数明显少于对照组($P<0.01$)，这与 Chartier－Kastler 等[6]的报道一致。本实验还发现 HIFU 治疗后 6h，细胞数进一步减少，低于 HIFU 治疗后立即测得的细胞数($P<0.01$)，这说明 HIFU 治疗后残留癌细胞存在着渐进性坏死现象，并在光、电镜下进一步证实了此现象。Yang 等[7]用 HIFU 治疗实体性肝肿瘤时，也有相似的发现，他们认为是由于肿瘤的微循环遭到彻底破坏、肿瘤组织缺血引起的。本实验为体外实验，没有体内因素的干扰，说明 HIFU 可直接导致肿瘤细胞的渐进性坏死。

(致谢：本实验承蒙白晋、王芷龙、杜永洪、涂刚、胡自力、徐光勇的大力支持，谨表感谢)

参 考 文 献

[1] Hill CR, Ter Haar GR. High intensity focused ultrasound－potential for caner treatment [J]. Brit J Radiol, 1995; 68(816): 1296－1303.

[2] Vanghan MG, Ter Haar GR, Hill CR, et al. Minimally invasive cancer surgery using focused ultrasound a pre－clinical, normal tissue study [J]. Brit J Radiol, 1994; 67(795): 267－274.

[3] Watkin NA, Ter Haar GR, Rivesn L. The intensity dependence of the site of maximal energy deposition in focused ultrasound surgery [J]. Ultrasound in Med & Biol, 1996; 22(4): 483－491.

[4] Lübbe AS. Bergemann. Ultrasound therapy for malignant tumors: a conceptual assessment [J]. J. Clin Ultrasound, 1994; 22(4): 113－117.

[5] 袁易全，陈思忠，冯 若，等. 近代超声原理与应用 [M]. 南京：南京大学出版社，1996; 133.

[6] Chartier－Kastler E, Chopin D, Vallancien G. The effects of focused extracorporal pyrotherapy on human bladder tumor cell line (647v) [J]. J Urol, 1993; 149(3): 643－647.

[7] Yang R, Relly CR, Rescorla FJ, et al. High－intensity focused ultrasound in the treatment of experimental liver cancer [J]. Arch Surg, 1991; 126(8): 1002－1010.