

超声激活血卟啉对 SW-480 癌细胞的杀伤作用

刘全宏¹, 张坤¹, 张凤月¹, 齐浩¹, 尚志远², 姚潇¹

(1. 陕西师范大学 生命科学学院; 2. 陕西师范大学 应用声学研究所, 陕西 西安 710062)

摘要:采用 1.1 MHz, 0.9 W/cm² 低强度超声, 结合血卟啉对体外培养的人肿瘤细胞 SW-480 进行声照处理, 通过噻唑蓝(MTT)法、PI, HO 双荧光染色等方法, 根据癌细胞形态结构和功能的变化; 探讨超声激活血卟啉对肿瘤细胞的杀伤作用。结果表明: 血卟啉对癌细胞无明显的损伤, 超声加血卟啉处理 30 s 是引起 SW-480 细胞受损的敏感位点, 90 s 为杀伤癌细胞的优选时间段; 杀伤作用呈癌细胞显微结构逐步破坏的变化, 并随声照时间的延长而加剧; 声照时间在 30 s 至 90 s 区间细胞具有明显凋亡特征, 提示超声激活血卟啉杀伤癌细胞机制中可能存在诱导肿瘤细胞凋亡的作用。

关键词:超声; 血卟啉; SW-480; 肿瘤

中图分类号: Q274 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-274 X (2003)01-0094-005

血卟啉(Hematoporphyrin derivatives, HpD)及其衍生物是一类光敏剂, 它具有在肿瘤组织中优先聚集的特性。从 1961 年 Lipson 开始用 HpD 结合光暴露治疗胸肿瘤患者到 1975 年 Weishaupt 首次提出光动力治疗(Photodynamic Therapy, PDT)至今, 国内外研究者在激光激活血卟啉的抗肿瘤机理、理论和临床应用等方面作了大量研究。由于激光不能穿透生物体深层组织, 所以 PDT 法仅限于治疗身体浅表部位的肿瘤, 加之用药量大, 易引发皮肤过敏等副作用, 使 PDT 法的应用范围受到限制。20 世纪 90 年代初开始对超声激活血卟啉治疗肿瘤进行探索, 与激光相比, 超声对动物及人体组织有较强的穿透性并可无损伤地聚集声能于深层组织的特定部位。研究中亦发现超声激活血卟啉对肿瘤细胞有杀伤作用, 由此提出声动力学疗法(Sonodynamic Therapy, SDT)^[1~4]。SDT 作为抗癌的新理论和方法的提出, 目前主要是通过采用不同的超声参数和不同的声敏物质(如 photofrin、镍卟啉衍生物 ATX-70 等), 对不同癌细胞的杀伤作用机制进行研究^[5~15]。发现 SDT 的抑癌作用与声照产物单线态氧等自由基的产生有关, 提出单线态氧杀伤机制^[5~9], 但在 SDT 抗癌的细胞形态学变化研究尚少。本文拟采用频率 1.1 MHz, 强度为 0.9 W/cm² 等声照参数和 MTT

法、PI, HO33342 荧光双重染色法等, 研究低强度超声激活血卟啉对离体培养的人结肠癌细胞 SW-480 杀伤的细胞死亡过程形态学变化及相关功能改变, 可为声动力学疗法理论和临床应用积累数据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 人肿瘤细胞 SW-480 由第四军医大学提供。细胞培养于体积分数为 10% 小牛血清的 RPMI1640(Hyclone)培养基中, 在 37℃ 5%CO₂ 及饱和水蒸气的 CO₂ 孵箱中培养。

1.1.2 试剂 MTT 和血卟啉均为 Sigma 公司的产品, 溶于 PBS(0.1 mol/L, pH=7.2~7.4)中, 使质量浓度分别为 1 mg/mL 和 5 mg/mL, 避光过滤除菌后分装保存。PI, HO33342 荧光染料由北京师范大学教育部重点开放实验室赠送。

1.2 超声照射装置

超声照射装置由陕西师范大学应用声学研究所研制, 功率放大器的频率为 1.1 MHz, 输出功率可调; 照射用试管为医用聚乙烯薄壁管, 经测试不影响声透率; 实验过程中水温变化±2℃; 实验用水为静置除汽蒸馏水。

收稿日期: 2002-06-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39870240); 教育部“高等学校骨干教师资助项目”

作者简介: 刘全宏(1957-)男, 陕西白水人, 陕西师范大学副教授, 博士生, 从事细胞生物学研究。

1.3 方法

1.3.1 MTT法 实验设对照组、血卟啉组(HpD组)、超声组(U)、超声加血卟啉组(U+HpD组)。取处于对数生长期的SW-480细胞,0.25%胰酶消化,NaCl清洗并调节细胞个数为 1×10^6 cells/mL。对照组试管中仅加SW-480细胞悬液,HpD组试管中加SW-480细胞悬液和血卟啉,不进行超声处理;U组加SW-480细胞悬液;U+HpD组将一定量细胞悬液加入试管中,每只试管中加入血卟啉,使其终浓度为0.1 mg/mL,在超声频率为1.1 MHz,超声强度为 0.9 W/cm^2 的超声装置中进行处理。U组和U+HpD组的声照时间分别为15,30,60,90,120,150,180 s。不同实验组的细胞悬液接种于96孔板中,设12个复孔,每孔加入0.1 mL细胞悬液和0.01 mL MTT溶液,于CO₂孵箱孵育4 h后,在4℃下以4 000 rpm离心30 min,小心吸弃上清液,每孔加入0.2 mL二甲亚砜,用TECAN A-2082 RUN-RISE酶标仪测定吸光度(A)值。计算超声对人肿瘤细胞SW-480的杀伤率(1-实验组吸光度值/对照组吸光度值 $\times 100\%$)^[16~17],并利用SPSS软件进行回归分析和方差分析,若差异显著,再进行多重比较。

1.3.2 细胞形态结构变化观察 SW-480细胞接种于盖玻片上继续培养到细胞即将汇合时,按上述实验分组进行超声处理,然后将细胞接种到培养瓶,继续培养8 h后分别进行H-E染色和PI,HO33342双重染色,普通光学显微镜及荧光显微镜下观察细胞形态结构的变化并照相。

2 结果

2.1 癌细胞杀伤与声照时间的关系

不同的实验处理与A值结果显示:各实验组及

不同处理时间与A值大小相关,其回归方程分别为 $y=0.0914x^{-0.599}$ ($R^2=0.9315$, $p<0.01$), $y=0.0001x^4-0.0027x^3+0.0215x^2-0.0693x+0.1362$ ($R^2=0.9572$, $p<0.01$)。对照组A值最高,HpD组和U组15~120 s,U+HpD组15 s处理的A值接近,U组150 s和180 s的A值分别对应于U+HpD组的30,60 s;U+HpD各实验组随着超声处理时间的延长,A值逐渐降低,但处理90 s后变化不明显,可见超声+血卟啉处理对SW-480细胞有明显的杀伤效应。在超声处理过程中,不同的处理时间对SW-480细胞的杀伤效应不同,30和60 s处理时对细胞的杀伤率为59%,90 s及120 s时杀伤率为69%,150 s为68%,180 s时为71%。方差分析结果也显示,各不同处理时间差异显著。为此,我们进行了多重比较,采用最小显著差数(LSD)法对不同处理时间A值的差异显著性进行了检验(表1,表2)。从表中可以看出:0对照与各处理组间差异极显著或显著,0对照与血卟啉组差异显著。表1显示U+HpD组处理时间为90 s的A值与对照组、HpD组及处理时间为15,30,60 s的A值的差异均为极显著或显著,而与处理120,150,180 s的A值的差异不显著。表2显示U组处理时间为150 s的A值与对照组、HpD组及处理时间为15,30,60,90,120 s的A值的差异均为极显著,而与U组处理180 s的A值的差异不显著,且U组时间为15~120 s的各处理时间差异不显著。由以上分析可知,在频率1.1 MHz,强度为 0.9 W/cm^2 的实验条件下,U+HpD处理时间为90 s可获得较为理想的杀伤效果。

2.2 声照后细胞形态结构变化

各实验组细胞H-E染色后,在光镜下可见,对照组、HpD组、U组15~120 s时间段和U+HpD组15 s处理的细胞均呈正常培养细胞SW-480细

表1 LSD法检验U+HpD组不同处理时间差异的显著性结果

Tab. 1 The result of significance of difference in U+HpD groups tested by LSD method

处理时间/s	0对照	血卟啉	15 s	30 s	60 s	90 s	120 s	150 s
180	0.000 3**	0.000 3**	0.000 3**	0.001**	0.000 3**	0.438	0.455	0.311
150	0.000 3**	0.000 3**	0.000 3**	0.013*	0.011*	0.811	0.788	
120	0.000 3**	0.000 3**	0.000 3**	0.006**	0.005**	0.976		
90	0.000 3**	0.000 3**	0.000 3**	0.006**	0.005**			
60	0.000 3**	0.000 3**	0.000 3**	0.952				
30	0.000 3**	0.000 3**	0.000 3**					
15	0.014*	0.843						
血卟啉	0.022*							

注:*表示显著 **表示极显著

表 2 LSD 法检验 U 组不同处理时间差异显著性结果

Tab. 2 The result of significance of difference in U groups tested by LSD method

处理时间/s	0 对照	血卟啉	15 s	30 s	60 s	90 s	120 s	150 s
180	0.000 3**	0.000 3**	0.000 3**	0.000 3**	0.000 3**	0.000 3**	0.000 3**	0.454
150	0.000 3**	0.000 3**	0.000 3**	0.000 3**	0.000 3**	0.000 3**	0.000 3**	
120	0.006**	0.038*	0.056	0.098	0.921	0.482		
90	0.001**	0.015*	0.033*	0.067	0.679			
60	0.009**	0.664	0.772	0.635				
30	0.011*	0.768	0.871					
15	0.014*	0.843						
血卟啉	0.022*							

注: * 表示显著 ** 表示极显著

胞形态特征,胞体为多角或纺锤形,细胞膜完整,核质比高,核仁清晰;U 组 150,180 s 处理的细胞表现出一定的形态变化,其程度与 U+HpD 组 30 s 相近;在 U+HpD 组 30 s 实验组中,全部细胞形态呈圆形,部分细胞胞体明显增大,少数细胞核物质聚缩深染,大多数细胞核物质淡染,呈稀疏网状结构;60 s 处理的细胞形态不规则,胞体大小差异明显,细胞核物质聚缩深染,少数细胞膜局部破损,胞质轻度丢失;90,120 s 处理的细胞形态结构不完整,除了有明显的核聚缩变化外,大部分细胞膜破损,胞质丢失严重,部分细胞已解体脱落;150,180 s 处理的细胞密度锐减,残留在盖片上的细胞少数含固缩化的核,其他细胞形成由膜碎片和颗粒组成的“胞影”。上述形态学观察结果表明:对照组、HpD 组和 U 组 15~120 s 处理的细胞形态结构与正常培养的 SW-480 基本一致,说明单纯血卟啉和低强度超声 120 s 以下时间处理对 SW-480 细胞结构无明显的损伤,这一结果与作者在超声激活血卟啉对 S180 细胞杀伤作用的研究结论一致^[17]。U 组 150,180 s 处理和 U+HpD 组 30,60,90 s 处理样品中,部分细胞表现出程度不同的凋亡细胞形态学特性,部分细胞呈现坏死细胞形态学特性,而 U+HpD 组 120,150,180 s 的处理,细胞受损趋于严重,最终死亡并脱落,残余细胞主要表现为坏死的不同形态学特征。

2.3 PI,HO33342,双荧光检测细胞凋亡现象

PI 和 HO 均可使用紫外光激发,其荧光分别为红色和蓝色。荧光显微镜下可见对照组细胞贴壁生长良好,HO 均匀性染色,细胞表面突起,胞质及核为蓝色荧光;HpD 组、U 组 15~120 s 处理和 U+HpD 组 15 s 处理的细胞贴壁性下降,细胞表面突起减少,核染色的荧光亮度明显高于胞质;U 组 150,180 s 和 U+HpD 组处理 30 s 的细胞结构完整,胞体有所增大,少数细胞质被 PI 着色呈红色荧光,而

蓝色荧光减弱;U+HpD 组处理 60 s 处理的实验组细胞质呈红色的细胞数量增多,胞体及核体膨大明显,U+HpD 组 90 s 处理的实验组细胞核、细胞质呈红色荧光的数量可达细胞总数的 50% 以上,核物质聚缩处呈强红色荧光,部分细胞膜有破损现象;120 s 处理的细胞全部显示红色荧光,荧光强弱在不同细胞中差异较大;150,180 s 处理的细胞均呈强红色荧光;但 180 s 处理的细胞坏死脱落的较多,少数留存的细胞呈结构不完整的红色荧光。根据 PI 和 HO 双重染色显示凋亡细胞的原理,认为其中 HO 蓝色荧光较弱,也有很弱的红色荧光的细胞为早期凋亡细胞,PI 红色荧光最强的细胞为坏死细胞,而介于二者之间的细胞可以根据凋亡细胞形态学特征,如细胞核的皱缩、染色质的凝集和膜的完整性来判断是属于凋亡还是坏死的细胞^[18]。因此,实验结果显示:与正常培养细胞相比,血卟啉及单纯超声短时间处理在一定程度上影响细胞的表面结构,使细胞贴壁性下降,但仍具正常细胞荧光染色特征,说明单独血卟啉和 120 s 以下的超声处理对细胞活性无影响;在超声 150 s 以上和超声加血卟啉的不同时间段处理中会造成细胞结构不同程度的损伤和破坏。早期细胞膜结构的轻度损伤使膜对 PI 染料的通透性增强,因此,处理时间从 30 s 到 90 s 具凋亡特征的细胞逐渐增多,并且细胞所处凋亡形态与处理时间成正相关,而 120 s 及更长时间的处理加剧了细胞结构的破坏,从而使 PI 染料分子大量进入细胞,较多地结合在细胞结构的不同部位,尤其是密集于固缩的细胞核,使细胞呈现出坏死的强红色荧光特征。

3 讨论

在 MTT 法测试的各实验组中,A 值变化可间

接反映不同处理对癌细胞的杀伤率差异。与对照组相比,HpD组的A值有所降低,表明HpD对酶活性有一定影响;U组15~120s,U+HpD组15s的A值虽略低于HpD组,但较为接近,U组150,180s及U+HpD30s以上时间处理A值下降明显,说明30s处理是造成SW-480细胞酶活性迅速下降的敏感位点;声照90sA值降至最低且不为时间继续延长而明显下降,表明90s处理是杀伤癌细胞的优选时间段。

通过H-E染色、光镜观察发现超声激活血卟啉杀伤癌细胞的过程是通过逐步损伤细胞结构实现的。其主要变化依次为细胞形态变圆、胞体膨大、细胞核固缩、细胞膜破损、胞质丢失直至细胞解体,并随声照时间的延长损伤程度加剧。

研究中发现,U+HpD杀伤癌细胞引起的细胞死亡形态学变化和MTT法所测的A值变化特征并不完全对应。U+HpD组90s的A值与其他实验组和U+HpD处理30s及60s的A值的差异均为极显著,而与处理120,150,180s的A值的差异均不显著,但在相应处理的细胞死亡形态学变化呈现出明显的梯度变化。两者变化的不同步性,其一,表明癌细胞线粒体上琥珀酸脱氢酶活性变化敏感于形态变化,其活性下降到一定程度出现不随处理时间加长的低活性段;其二,反映了细胞死亡形态学变化是细胞整体结构变化的复杂过程,线粒体作为易受理化因子影响的细胞内敏感结构^[17],在短时间处理条件下受损后必然影响细胞内一系列生理生化反应的受阻,同时引起细胞内其他细胞器乃至整个细胞结构的继发性损伤;其三,随着处理时间的加长,超声激活血卟啉杀伤强度增加也会直接造成生物膜系统、核结构和细胞骨架系统不同程度的损伤。所以,在U+HpD90s以上的处理细胞破损程度上,有明显的梯度变化。

光镜观察和PI,HO双荧光标记进一步发现声照细胞表面突起减少、贴壁性下降和膜通透性增大是癌细胞受损早期形态学特征,而单独超声150,180s和超声激活血卟啉30,60,90s处理的癌细胞荧光染色特征及细胞核皱缩、染色质深染、细胞核边缘化以及最终破裂为凋亡小体等凋亡细胞的形态学变化揭示了在超声激活血卟啉杀伤癌细胞的机制中可能存在着细胞凋亡途径。Ashush^[18]等在高强度超声脉冲处理人的多种细胞系时发现细胞凋亡现象,提出高强度超声产生的空化效应是导致细胞凋亡的主要原因。本研究采用的低强度超声激活血卟

啉引起细胞凋亡导致癌细胞死亡无疑在降低超声剂量和缩短处理时间及避免产生临床副作用方面具有一定的意义。

参考文献:

- [1] YUMITA N, NISHIGAKI R, UMEMURA K, *et al.* Hematoporphyrin as a sensitizer of cell-damaging effect of ultrasound[J]. *Jpn J Cancer Res*, 1989, 80(3): 219-222.
- [2] YUMITA N, NISHIGAKI R, UMEMURA K, *et al.* Synergistic effect of ultrasound and hematoporphyrin on sarcoma 180[J]. *Jpn J Cancer Res*, 1990, 81: 304-308.
- [3] AMSON N. Applications of therapeutic ultrasound in medicine[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 1994, (1): 69-71.
- [4] UMEMURA S, KAWABATA K, SASAKI K, *et al.* Recent advances in sonodynamic approach to cancer therapy [J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 1996, (3): 187-191.
- [5] MIYOSHI N, MISIK V, FUKUDA M, *et al.* Effect of gallium porphyrin analogue ATX-70 on nitroxide formation from a cyclic secondary amine by ultrasound; on the mechanism of sonodynamic activation[J]. *Radiat Res*, 1995, 143(2): 194-202.
- [6] SAKUSABE N, OKADA K, SATO K, *et al.* Enhanced sonodynamic antitumor effect of ultrasound in the presence of nonsteroidal anti-inflammatory drugs[J]. *Jpn J Cancer Res*, 1999, 90(10): 146-151.
- [7] MISIK V, RIESZ P. Free radical intermediate in sonodynamic therapy[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2000, 899: 335-348.
- [8] YUMITA N, UMEMURA S, NISHIGAKI R. Ultrasonically induced cell damage enhanced by photofrin I: mechanism of sonodynamic activation[J]. *In Vivo*, 2000, 14(3): 425-429.
- [9] MIYOSHI N, IGARASHI T, RIESZ P. Evidence against singlet oxygen formation by sonolysis of aqueous oxygen-saturated solutions of Hematoporphyrin and rose bengal. the mechanism of sonodynamic therapy[J]. *Ultrason Sonochem*, 2000, 7(3): 121-124.
- [10] KESSEL D, JEFFERS R, FOWLKES J B, *et al.* Effects of sonodynamic and photodynamic treatment on cellular thiol levels [J]. *Photochem Photobiol B*, 1996, 32(1-2): 103-106.
- [11] MISIK V, RIESZ P. Peroxyl radical formation in aqueous solutions of N, N-dimethyl formamide, N-methylformamide, and dimethylsulfoxide by ultra-

sound ;implications for sonosensitized cell killing[J]. Free Radic Res,1996,25(1):13-22.

[12] UCHIDA T, TACHIBANA K, HISANO S, *et al.* Elimination of adult T cell leukemia cells by ultrasound in the presence of porfimer sodium [J]. Anticancer Drugs, 1997, 8(4): 329-335.

[13] MIYOSHI N, MISIK V, RIESZ P. Sonodynamic toxicity of gallium-porphyrin analogue ATX-70 in human leukemia cell[J]. Radiat Res, 1997, 148(1): 43-47.

[14] WORTHINGTON A E, THOMPSON J, RAUTH A M, *et al.* (Mechanism of ultrasound enhanced porphyrin cytotoxicity: A search for free radical effect) [J]. Ultrasound Med Biol, 1997, 23(7): 1 095-1 105.

[15] HRISTOV P K, PETROV L A, RUSSANOV EM. Lipid peroxidation induced by ultrasonication in Ehrlich ascitic tumor cells[J]. Cancer Lett, 1997, 121(1): 7-10.

[16] 齐 浩, 谭声江, 马玉英, 等. 不同频率聚焦超声与血卟啉对人体肿瘤细胞的协同作用[J]. 中国科学(C辑), 1998, 28(5): 477-480.

[17] 刘全宏, 王仲会, 任耀辉, 等. 超声激活血卟啉杀伤 S180 肉瘤细胞研究初报[J]. 科学通报, 1994, 39: 936-938.

[18] ASHUSH H, ROZENSZAJN LA, BLASS M *et al.* Apoptosis induction of human myeloid leukemic cells by ultrasound exposure[J]. Cancer Res, 2000, 60(4): 1 014-1 020.

(编 辑 徐象平)

A study of cell killing on SW-480 cancer cells by ultrasound activate hematopor-phyrin derivatives

LIU Quan-hong¹, ZHANG Kun¹, ZHANG Feng-yue¹
 QI Hao¹, SHANG Zhi-yuan², YIAO Xiao¹

(1. College of Life Science, Shaanxi Normal University; 2. Institute of Applied Acoustics, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract: The combined use of ultrasound and HpD were studied at lower frequency of 1.1 MHz and intensity of 0.9W/cm². MTT method, morphological observation and double-fluos staining method were used to study the combined killing faculty of ultrasound and HpD to tumor cells according to morphological and functional variation. HpD has little effort on tumor cells, 30s is the sensitive threshold value when insonated by ultrasound combined use HpD and 90s is the best period to kill the tumor cells. The damage became aggravating with time passing. SW-480 cells have apoptosis character during 30 s and 90 s, which indicates that the mechanism of killing cells has the apoptosis mode when induce the cancer cells to death.

Key words: ultrasound; HpD; SW-480; cancer

• 学术动态 •

2002 年我校新建 10 家高新技术企业和研发中心

2002 年, 我校依托自身高新技术, 先后与企业联合组建了西安科林基因药业有限责任公司、陕西药王医药科技股份有限公司等 5 家高技术公司, 注册资本金共计 10 641 万元, 学校技术股份占 1 595 万股。另外, 还与企业联合组建了西北大学资源信息研发中心、西大-九州天然药物研究中心等 5 家研发中心。

这些高技术公司和研发中心的组建, 将为学校广纳社会资金参与学校科研, 促进学校技术产业化进程做出积极的贡献。

(薛 鲍)