

低强度超声激活血卟啉对 S180 细胞的杀伤作用

孙世惠¹, 刘全宏¹, 齐浩¹, 张军平², 任耀辉¹, 丁德成¹

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

摘要:为探讨低强度超声激活血卟啉对在体 S180 肉瘤细胞的杀伤作用, 对荷瘤小鼠采用声动力疗法处理, 分别从癌组织生长状况、显微结构及超微结构等方面进行研究。结果表明: 超声激活血卟啉对肿瘤生长的抑制作用明显大于其他实验组, 癌细胞在处理后的不同时间段, 其显微结构及超微结构均表现出不同程度的损伤。

关键词:超声; 血卟啉; 超微结构; S180

中图分类号: Q274 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-274X(2002)02-0211-03

声动力疗法(Sonodynamic therapy)是近年来日本学者提出的一种利用超声激活血卟啉进行抗肿瘤研究的理论和方法^[1]。相关研究报道尚少, 有限的资料表明血卟啉能在肿瘤组织富集并长时间滞留, 它受超声激活后具有杀伤肿瘤细胞的特性^[2], 但由于不同的超声强度及血卟啉浓度在杀伤肿瘤细胞的同时, 对正常组织会造成一定程度的损伤, 所以筛选合适的超声频率、声强及血卟啉浓度使其达到最佳的抗癌效果, 并减少对正常组织的损伤。本研究采用超声频率为 1.1 MHz, 声强为 0.6 W/cm², 血卟啉浓度为 25 mg/kg 等实验参数, 探讨低强度超声激活血卟啉对在体 S180 肉瘤细胞杀伤作用, 为声动力疗法的临床应用积累资料。

1 材料和方法

1.1 材料

实验动物为昆明系小白鼠, 体重 18~22 g, 雌性。瘤株为 S180 腹水瘤细胞, 陕西中医药研究院实验动物中心提供。血卟啉(SIGMA 公司)用 0.1 MPBS (pH 7.2~7.4) 避光溶解, 终浓度 2.5 mg/mL, 灭菌、分装, 4℃ 避光保存。超声装置为陕西师范大学声学研究所研制, 探头面积 4.7 cm²。

1.2 方法

抽出接种于小鼠腹腔 1 周的 S180 腹水瘤细胞,

生理盐水稀释, 使肿瘤细胞悬液的细胞浓度为 1×10^7 cells/mL。取 0.1 mL 接种于小鼠右腋下, 待肿瘤直径长至 0.6 cm 时, 将小鼠随机分为 4 组: 对照组、血卟啉组(HpD)、超声组(U)、超声加血卟啉组(U+HpD)。U+HpD 组、HpD 组: 尾静脉注射血卟啉 0.2 mL, 使其终浓度为 25 mg/kg; U+HpD 组、U 组: 采用频率 1.1 MHz, 强度为 0.6 W/cm² 的超声照射 3 min;

在超声处理前将注射 HpD 的小鼠置于避光处饲养, 1 h 后用脱毛霜去毛, 硫喷妥钠麻醉, U+HpD 组、U 组进行超声照射。抑瘤生长实验的小鼠常规饲养, 癌组织细胞形态结构损伤观察的小鼠分别于辐照后 1 h, 3 h, 6 h 处死, 取材。

1.2.1 抑瘤生长观察 各实验组 6 只小鼠, 每日进行肿瘤体积测量, 详细记录相关数据, 绘制各组肿瘤生长曲线图, 于第 8 天用颈椎离断法处死小鼠, 取出肿瘤组织, 称重, 按下列公式计算体积、重量抑制率。

$$V = 1/6\pi D^3$$

体积抑制率 = $[1 - (\text{治疗组平均肿瘤体积} / \text{对照组平均肿瘤体积})] \times 100\%$

重量抑制率 = $[1 - (\text{治疗组平均肿瘤重量} / \text{对照组平均肿瘤重量})] \times 100\%$

1.2.2 光镜观察 常规取材, 石蜡切片, H-E 染色, 日本 OlympusBH-2 显微镜观察、照相。

1.2.3 电镜观察 用戊二醛、锇酸固定, Epon812

收稿日期: 2001-08-24

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计划”项目(2000)

作者简介: 孙世惠(1968-), 女, 陕西咸阳人, 陕西师范大学硕士生, 从事动物细胞学研究。

包埋,超薄切片,双染,日立 H-600 透射电镜照相。

2 结果

2.1 抑瘤生长观察

2.1.1 据连续观察数据绘制 S180 肿瘤生长曲线见图 1。

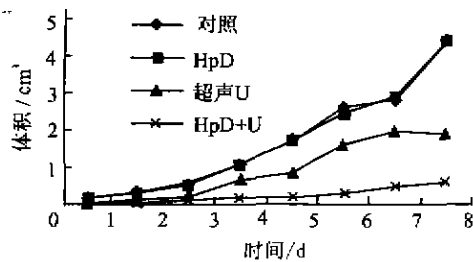


图 1 肿瘤生长曲线

Fig. 1 Graph of tumor growth

由图 1 可见:对照组、HpD 组肿瘤生长速度较快,U 组次之,U+HpD 组最慢。

2.1.2 肿瘤体积生长及重量抑制率 各实验组在处理后的第 8 天处死全部小鼠,剥离肿瘤组织,测量体积大小,称重,计算平均值,结果见表 1、表 2。

表 1 肿瘤体积生长抑制率比较

Tab. 1 Comparison of inhibition rate in growth of tumor-volume

分组	数量/只	体积/cm	抑制率/%	P
对照	6	4.33±0.79	0	<0.05
HpD	6	4.19±1.24	3.19	<0.05
U	6	1.86±0.28	57.07	<0.05
U+HpD	6	0.56±0.11	87.15	<0.05

表 2 肿瘤重量的抑制率比较

Tab. 2 Comparison of inhibition rate in weight of tumor

分组	数量/只	重量/g	抑制率/%	P
对照	6	3.65±0.45	0	<0.05
HpD	6	3.45±0.60	0.39	<0.05
U	6	2.09±0.22	39.9	<0.05
U+HpD	6	0.73±0.07	78.8	<0.05

2.2 肿瘤组织显微结构变化

光镜下可见对照组细胞近圆球形,胞膜完整,核质比大,核边界清晰、深染,胞质淡染,呈典型肿瘤细胞结构。血卟啉组在不同时间段取材的肿瘤细胞形态结构与对照组无明显差别。超声组肿瘤组织显微

结构在形态和染色特性方面表现出一定程度的损伤,辐照 1 h 后取材的细胞可观察到核嗜碱性轻度减弱;3 h 后取材的细胞可见膜局部轻度受损,部分染色质有凝集现象;6 h 后取材的组织有少量细胞结构不完整,并伴随胞质丢失现象。在超声激活血卟啉组中,1 h 后取材的细胞形态具多形性,部分细胞核物质高度聚缩深染;3 h 后取材的细胞形变严重,细胞膜大部破损,核内出现空泡化网状结构,核嗜碱性明显减弱呈淡染,胞质嗜酸性增强;6 h 后取材的细胞结构严重受损,大部分核物质分解,胞质解体,出现由残余核物质和膜碎片形成的“胞影”。

2.3 肿瘤细胞亚显微结构变化

电镜下可见对照组胞膜完整,胞质浓密,粗面内质网呈网状分布,线粒体完整,嵴丰富,核膜完整,核物质结构致密,异染色质较少(图版 1);血卟啉组中不同时间段取材的细胞结构与对照组无明显差别(图版 2,3);超声组肿瘤细胞,1 h 及 3 h 组胞膜完整,胞质出现空泡,可见少量内质网,线粒体数量较多,但 3 h 取材的细胞线粒体中嵴明显减少(图版 4,5);辐照后 6 h 取材的肿瘤细胞胞质空泡增多,线粒体肿胀变形,核膜结构不清楚,染色质高度凝集(图版 6);在超声激活血卟啉组中,1 h 取材的细胞膜完整,胞浆较丰富,线粒体肿胀变形,嵴减少,染色质高度凝集,异染色质增多,核周隙扩张明显(图版 7);3 h 取材的癌细胞膜破损,胞浆流失,胞质内空泡增多,线粒体嵴突减少,核膜皱缩,难以分辨双层核膜结构,部分核物质呈凝集状态(图版 8);6 h 取材的癌细胞中,大部分细胞结构不完整,质膜破裂,胞质丢失严重,胞质出现较多空区,线粒体极度肿胀,甚至破损,核膜不完整,核物质分解丢失,可见大量空泡及细胞器碎片(图版 9)。

3 讨论

根据抑瘤生长实验结果,发现对照组肿瘤生长速度、重量和体积变化符合正常荷瘤小鼠体内肿瘤生长规律。血卟啉组肿瘤生长速度与对照组相近,超声组生长速度低于血卟啉组,超声激活血卟啉组肿瘤在整个实验过程中生长缓慢。根据肿瘤体积生长曲线可以看出对照组、血卟啉组,超声组仅在前 3 天生长缓慢,从第 3 天起各组肿瘤的生长速度均快速增加,而超声激活血卟啉组的肿瘤在整个过程中生长缓慢,仅从第 6 天开始有所增加,但幅度不大。从肿瘤的重量抑制率可以看出:血卟啉对肿瘤的抑制

率仅为 0.39%,其次为超声组,增加至 39.90%,而超声激活血卟啉对肿瘤的抑制作用最大,达到 78.80%。上述结果表明在个体水平上,血卟啉对肿瘤生长的抑制作用甚微,超声有一定的抑制肿瘤生长效应,超声激活血卟啉能够有效地抑制肿瘤生长。

综合肿瘤细胞显微及超微结构变化,说明血卟啉对肿瘤细胞影响较小,超声和超声激活血卟啉均具有破坏细胞结构的作用,首先表现在生物膜系统和遗传信息表达系统受损。细胞膜、核膜及线粒体等膜性细胞器的破损必然影响细胞内外微环境的稳定和能量代谢。核物质聚缩、异染色质增多或分解丢失导致基因表达障碍或基因调控等功能丧失,这些变化都可以使细胞正常代谢紊乱,功能失调,最终引起

细胞死亡;其次表现为损伤的时滞效应,即损伤程度随处理后时间的推移而加剧,1 h 出现轻度局部损伤,3 h 损伤位点增多,程度加大,6 h 损伤加剧直至细胞解体死亡。这种随时间延长而损伤扩大的原因是否为一种初级损伤的级联放大连锁反应尚需进一步研究探讨;第三,早期损伤还敏感地表现在线粒体肿胀,嵴减少直至空泡化。这一现象同前期工作结论一致^[1],说明线粒体是细胞器受损的显著标志之一。结合近年来细胞凋亡研究机制中关于线粒体内膜上细胞色素分子脱落启动细胞凋亡过程的讨论,是否提示在超声激活血卟啉导致细胞死亡的过程中,也存在着由于线粒体结构的破坏而诱导细胞凋亡的死亡模式。

参考文献:

- [1] UMEMURA S, YUMITA N, NISHIGAKI R, *et al.* Sonochemical activation of hematoporphyrin: A potential modality for cancer treatment [J]. IEEE. Ultrasonics Symposium, 1989, 9: 55-60.
- [2] HAYATA Y, KATO H, KONAKA C, *et al.* Hematoporphyrin derivative and laser photoradiation in the treatment of lung cancer [J]. Chest, 1982, 81: 269-277.
- [3] 刘全宏, 王仲会, 任耀辉, 等. 超声激活血卟啉杀伤 S180 癌细胞研究初报 [J]. 科学通报, 1994, 39: 936-939.

(编辑 徐象平)

The killing effect of lower-intensity ultrasound (US) irritating HpD on sarcoma 180

SUN Shi-hui¹, LIU Quan-hong¹,

QI Hao¹, ZHANG Jun-ping², REN Yao-hui¹, DING De-cheng¹

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

Abstract: The antitumor effects of combined use of lower-intensity ultrasound (US) and a photosensitizer, hematoporphyrin derivative (HpD) were determined in mice bearing sarcoma 180 by sonodynamic therapy (SDT). Antitumor effects were evaluated by investigating the tumors' growing condition, microscopic structures and ultrastructures. The combined treatment with US and HpD showed remarkable synergistic effects on sarcoma 180. The structures of cancer cells showed various damages during different times.

Key words: ultrasound (US); hematoporphyrin derivative (HpD); ultrastructures; S180

图版说明

N 示细胞核 M 示线粒体 ER 示粗面内质网。1. 对照组示正常癌细胞 ($\times 8000$) 2. 血卟啉 + b 组示血卟啉处理后 1 h 取材的肿瘤细胞 ($\times 10000$) 3. 血卟啉 3 h 组 ($\times 10000$) 4. 超声 1 h 组示经超声辐照后 1 h 取材的肿瘤细胞 ($\times 5000$) 5. 超声 3 h 组示部分线粒体肿胀, 嵴减少 ($\times 5000$) 6. 超声 6 h 组示线粒体极度肿胀, 空泡增多 (10000) 7. 血卟啉加超声 + b 组示注射血卟啉经超声处理后 1 h 取材的肿瘤细胞, 染色质凝集 ($\times 15000$) 8. 血卟啉加超声 3 h 组示核皱缩 ($\times 10000$) 9. 血卟啉加超声 6 h 组示细胞严重受损 (10000)