

不同辐照模式低频超声对前列腺癌 DU145 细胞的影响

徐卫平 申锷 林艳端 白文坤 胡兵

【摘要】 目的 探讨不同辐照模式低频超声对前列腺癌DU145细胞的影响。方法 对体外培养的人前列腺癌DU145细胞悬液进行不同模式的低频超声辐照：第A组为对照组，第B组为脉冲波辐照模式，第C组为连续波辐照模式。辐照后即刻用荧光显微镜检测FD500染色阳性率反映细胞膜通透性改变情况；辐照后24 h用MTT法检测细胞增殖情况，流式细胞仪检测细胞凋亡情况。结果 与对照组相比，两种模式的超声波处理组FD500染色阳性率均增加；与连续波模式相比，脉冲波模式FD500染色阳性率增加明显，差异有统计学意义($P<0.01$)。脉冲波模式轻微抑制细胞增殖，连续波能明显抑制细胞增殖($P<0.05$)。与对照组相比，两种模式的超声波处理组DU145细胞凋亡率均增加；与脉冲波模式相比，连续波模式DU145细胞凋亡率明显增加，差异有统计学意义($P<0.01$)。结论 不同辐照模式低频超声能够影响前列腺癌DU145细胞的生物学行为。应用于基因转染或载药目的时，选择脉冲波模式增加细胞膜通透性；应用于治疗目的时，选择连续波模式能够抑制肿瘤生长。

【关键词】 前列腺肿瘤； 细胞膜通透性； 细胞凋亡； 辐照模式； 低频超声

Influence of low-frequency ultrasound with different radiation patterns in prostate cancer DU145 cells XU Wei-ping, SHEN E, LIN Yan-duan, BAI Wen-kun, HU Bing. Department of Ultrasound in Medicine, Shanghai Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai Institute of Ultrasound in Medicine, Shanghai 200233, China

Corresponding author: HU Bing, Email: hubing_1320@126.com

【Abstract】 **Objective** To explore the influence of low-frequency ultrasound with different radiation patterns on prostate cancer DU145 cells. **Methods** The cultured human prostate cancer DU145 cell suspension was radiated by low-frequency ultrasound with different radiation patterns. The cells were randomly divided into three groups: group A was taken as the control, pulsed radiation pattern was used in group B, while continuous radiation pattern was used in group C. The cell membrane permeability was reflected by the uptake of FD500 in DU145 cells. FD500 staining positive rate was measured by fluorescence microscopy immediately after radiation. The cell proliferation was determined by MTT method and flow cytometry instrument to detect cell apoptosis 24 h after low-frequency ultrasound exposure. **Results** Compared with the control group, the percentages of FD500 fluorescence-stained cells were increased in two patterns of ultrasound exposure groups. The rate of FD500 staining positive was more higher in pulse wave pattern than that of continuous wave, the difference was statistically significant($P<0.01$). The cell proliferation was slightly inhibited by pulsed ultrasound, and the inhibitory effect was significantly enhanced by continuous ultrasound($P<0.05$). The rate of DU145 cell apoptosis increased in two patterns of ultrasound treatment groups compared with the control group; the continuous ultrasound promoted cell apoptosis significantly than that of pulsed ultrasound, the difference had significant statistical significance($P<0.01$). **Conclusions** Low-frequency ultrasound using different radiation patterns can affect the biological behaviour of prostate cancer DU145 cells. For gene transfection or drug transport, pulsed ultrasound better increase the cell membrane permeability; Applied in the treatment of purpose, continuous ultrasound can inhibit tumor growth.

【Key words】 Prostatic neoplasms; Cell membrane permeability; Cell apoptosis; Radiation pattern; Low-frequency ultrasound

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.17.042

基金项目：国家自然科学基金(81271597)；上海市科委基础研究重点项目(10JC1412600)

作者单位：200233 上海交通大学附属第六人民医院超声医学科 上海超声医学研究所(徐卫平、申锷、林艳端、白文坤、胡兵)；上海瑞金医院集团闵行区中心医院超声科(徐卫平)

通讯作者：胡兵, Email: hubing_1320@126.com

随着科技的飞速发展,在肿瘤的临床治疗中,微创靶向技术综合治疗成为新的趋势。低频超声作为一种新的物理治疗方向,由于安全无创,是目前肿瘤治疗方面研究的热点。研究表明,低频超声由于空化效应,可在细胞膜上形成小孔,增加大分子物质的摄取^[1-2],亦可诱导敏感细胞发生凋亡^[3-4]。本研究旨在探讨不同辐照模式低频超声诱导体外培养的前列腺癌 DU145 细胞发生声致孔隙效应、凋亡和增殖情况,为低频超声应用于不同临床目的时提供参考。

材料与方法

1. 主要试剂及仪器:人前列腺癌 DU145 细胞株(购自上海中科院生物研究所),10%胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司),RPMI-1640 培养基(Gibco 公司,美国),0.25%胰酶(Invitrogen 公司,美国),异硫氰酸荧光素钠标记的右旋糖苷(FD500)(Sigma 公司,美国),MTT 细胞增殖及 Annexin V-EGFP 细胞凋亡检测试剂盒均购自南京凯基生物公司。荧光显微镜(ZX70, OLYMPUS, 日本),流式细胞仪(CyFlow Counter, 德国)。低频超声波处理器由上海第六人民医院超声医学研究所自行研制。频率为 80 kHz,功率为 0~3 W,可自行调节,发射连续波和脉冲波,探头呈圆柱形,直径 13 mm,辐照面垂直向上固定于不锈钢支架上。

2. 实验方法:(1)细胞培养:人前列腺癌 DU145 细胞株,用含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基培养于 25 cm² 培养瓶中,在 37 °C,5% CO₂ 培养箱中培养,每 3~5 d 传代。取对数生长期的细胞进行实验。(2)FD500 溶液配制:在 1 ml 的 PBS 中加入 25 mg FD500,充分溶解后放置于 4 °C 冰箱中避光保存备用。(3)实验分组:实验分为三组,分别为对照组(细胞悬液 1 ml,不进行超声辐照)、脉冲波超声组(脉冲波,占空比 20%,即 2 s 开/8 s 关,150 s)、连续波超声组(连续波,30 s)。(4)超声辐照:取对数生长期的 DU145 细胞制成单细胞悬液(终浓度为 1×10⁶ 个/ml),将单细胞悬液分为两部分,一部分加入适量 FD500(1 ml 细胞悬液加入 10 μl FD500),另一部分不添加 FD500。将超声探头固定于不锈钢支架上,辐射面垂直朝上,将装有 1 ml 细胞悬液的聚乙烯管放置于超声探头上,其间用耦合剂填充,以免中间留有气泡。整个过程避光操作。以上实验共重复 6 次。实验中超声频率为 80 kHz,声强为 0.45 W/cm²。

3. 荧光显微镜检测前列腺癌细胞 FD500 染色阳性率:辐照完毕后,立即将细胞悬液转入离心管,在离心机中离心 1000 转/min,5 min,弃去上清液,以 PBS

洗涤 3 次,立即置于荧光显微镜下观察并摄片保存,胞质内见绿色荧光者为 FD500 染色阳性细胞,并计算细胞 FD500 染色阳性率。细胞 FD500 染色阳性率=荧光染色阳性细胞数/总细胞数×100%。上述比率各取 5 个 200 倍高倍镜视野计算。

4. MTT 法检测 DU145 细胞增殖:选对数生长的 DU145 细胞消化后,制成细胞浓度 1×10⁴/ml 的细胞悬液,经实验处理后接种于 96 孔板中孵育 24 h 后,每孔加入 5 g/L MTT 溶液 50 μl,37 °C 继续培养 4 h 后弃上清,每孔加入 150 μl DMSO,充分摇匀,酶标仪上测定 492 nm 处的吸光光度值(OD 值)。细胞存活率用 OD(实验组)/OD(对照组)×100% 计算。每组设 4 个复孔。

5. 流式细胞仪检测细胞凋亡:细胞经不同的干预处理后,转入六孔细胞培养板中,培养箱继续培养 24 h 后进行消化,调整细胞浓度为 1×10⁶/ml,4 °C 离心,弃上清液,将细胞重悬于 200 μl 结合缓冲液中,加入 10 μl Annexin V-EGFP 和 5 μl PI,轻轻混匀,避光室温反应 15min,然后及时上流式细胞仪进行分析。

6. 统计学分析:采用 Graphpad 5.0 软件进行统计处理,实验数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间差异采用单因素方差分析(ANOVA),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 荧光显微镜观察前列腺癌 DU145 细胞 FD500 染色结果:荧光显微镜观察:高倍镜下对照组仅个别视野见极少量细胞的胞质内呈绿色荧光,强度微弱,连续波超声组可见少量细胞胞质内呈绿色荧光,强度较明亮,脉冲波超声组可见较多细胞胞质内呈绿色荧光,强度明亮。与对照组相比,连续波超声组和脉冲波超声组前列腺癌 DU145 细胞 FD500 染色阳性细胞数都明显增多,差异有统计学意义($P < 0.01$);与连续波超声组比较,脉冲波超声组前列腺癌 DU145 细胞 FD500 染色阳性细胞数也显著增多,差异有统计学意义($P < 0.01$)(图 1)。

2. MTT 法检测 DU145 细胞增殖情况结果:对照组、脉冲波超声组、连续波超声组前列腺癌 DU145 细胞存活率分别为 100%、(94.35±3.32)%、(87.77±5.31)%。与对照组相比,脉冲波超声组轻微抑制前列腺癌 DU145 细胞增殖,差别无统计学意义($P > 0.05$),连续波超声组明显抑制前列腺癌 DU145 细胞增殖,差别有统计学意义($P < 0.05$)。

3. 流式细胞仪检测 DU145 细胞凋亡结果:与对照组相比,脉冲波超声组和连续波超声组细胞凋亡率增

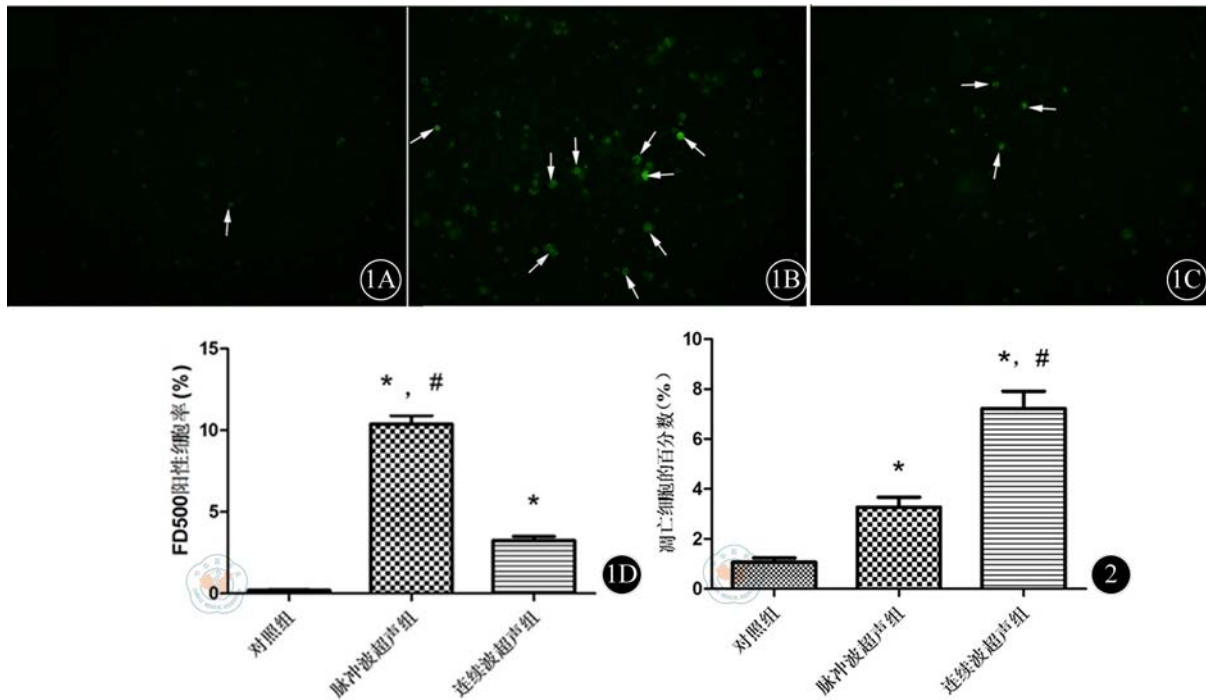


图1 荧光显微镜观察不同辐照模式低频超声条件下DU145细胞FD500染色阳性细胞(箭头所指)(×200) 1A: 对照组, 仅极少量细胞的胞浆内呈绿色荧光, 强度微弱; 1B: 脉冲波超声组, 可见较多细胞胞浆内呈绿色荧光, 强度明亮; 1C: 连续波超声组, 可见少量细胞胞浆内呈绿色荧光, 强度较明亮; 1D: 不同辐照模式低频超声条件下DU145细胞FD500染色阳性率。与对照组比较, * $P < 0.01$; 与连续波超声组比较, # $P < 0.01$ 图2 不同辐照模式低频超声对DU145细胞凋亡的影响。与对照组比较, * $P < 0.01$; 与脉冲波超声组比较, # $P < 0.01$

加, 差别均有显著统计学意义 ($P < 0.01$); 与脉冲波超声组相比, 连续波超声组细胞凋亡率明显增加, 差异有显著统计学意义 ($P < 0.01$) (图2)。

讨 论

超声可在组织水平、细胞水平产生多种生物学效应, 是超声治疗肿瘤的基础。超声生物效应与超声频率、声强、辐照时间及生物组织本身的性质密切相关^[5]。在一定的超声辐照强度下, 辐照时间越长, 引起的生物效应越明显。以往研究不同超声参数对肿瘤细胞生物学作用多采用单一辐照模式^[6-8], 本实验在固定频率(80 kHz)和声强(0.45 W/cm²)条件下, 研究不同辐照模式在实际辐照时间相同情况下对前列腺癌 DU145 细胞的生物学作用。

低频超声具有穿透力强, 组织损伤小, 对恶性肿瘤细胞敏感^[9]等优点, 因此低频超声在肿瘤治疗中具有明显优势。本研究发现, 连续波模式和脉冲波模式的低频超声均可诱导体外培养的前列腺癌 DU145 细胞凋亡, 抑制细胞增殖, 同时增加细胞膜通透性。但不同的辐照模式引起 DU145 细胞凋亡、增殖抑制及通透性改变不同。连续波模式明显抑制 DU145 细胞增殖, 促进凋亡; 而脉冲波模式明显增加 FD500 染色阳性率, 说明细胞膜通透性改变明显, 组间比较差别均有统计

学意义 ($P < 0.05$)。这可能是由于脉冲辐照方式能有效地控制超声声流(acoustic streaming)^[10], 易于产生空化, 空化效应使细胞膜通透性增加^[11], 产生声致孔隙效应, 而对细胞直接损伤小。在实际辐照时间相同条件下, 脉冲波模式和连续波模式辐照剂量在时间上的分配不同。与连续波不同, 脉冲波是不连续发射, 传递给细胞的超声总强度减弱, 对细胞损伤作用小, 而且由于脉冲超声有较长的时间间歇, 损伤细胞易于恢复, “声孔”可逆, 因此表现为抑制细胞增殖作用弱, 凋亡率低, 而 FD500 染色阳性率较高。

由于不同频率、不同类型、不同剂量超声对不同细胞具有不同的生物效应。低频超声在一定的辐照剂量及辐照模式条件下, 可增加前列腺癌 DU145 细胞的细胞膜通透性, 实现基因和药物的定向转运; 当超过一定的超声剂量时, 可诱导肿瘤细胞凋亡, 进而抑制肿瘤细胞增殖。但其具体作用机制还不明确, 应用于不同治疗目的时, 超声作用频率、强度及作用时间, 作用方式等参数尚需要进一步的优化。深入研究超声剂量、类型与不同组织、细胞的超声生物学效应, 将为超声医学在肿瘤治疗中的应用提供实验基础。

参 考 文 献

[1] Ueda H, Mutoh M, Seki T, et al. Acoustic cavitation as an enhancing mechanism of low-frequency sonophoresis for transdermal drug delivery.

- Biol Pharm Bull, 2009, 32: 916-920.
- [2] Herwadkar A, Sachdeva V, Taylor LF, et al. Low frequency sonophoresis mediated transdermal and intradermal delivery of ketoprofen. *Int J Pharm*, 2012, 423: 289-296.
- [3] Zhang Z, Chen J, Chen L, et al. Low frequency and intensity ultrasound induces apoptosis of brain glioma in rats mediated by caspase-3, Bcl-2, and survivin. *Brain Res*, 2012, 1473: 25-34.
- [4] Palumbo P, Cinque B, Miconi G, et al. Biological effects of low frequency high intensity ultrasound application on ex vivo human adipose tissue. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2011, 24: 411-422.
- [5] Shang Z, Gen S, Bai Y, et al. Experimental study on killing tumor cells by activation of hematoporphyrin derivatives by bi-frequency focal ultrasound in vitro. *Ultrasonics*, 2006, 44: e251-253.
- [6] 徐静, 许川山, 夏新蜀, 等. 低强度超声对小鼠肝癌 H22 细胞抑制效应的初步研究. *激光杂志*, 2009, 30: 69-71.
- [7] Staples BJ, Roeder BL, Hussein GA, et al. Role of frequency and mechanical index in ultrasonic-enhanced chemotherapy in rats. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2009, 64: 593-600.
- [8] Tang YJ, Zhang LY, Wang L, et al. Study on the parameter optimization for therapeutic ultrasound mediated microbubble destruction enhances gene transfection in rat muscle in vivo. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2012, 43: 930-935.
- [9] Lejbkowitz F, Salzberg S. Distinct sensitivity of normal and malignant cells to ultrasound in vitro. *Environ Health Perspect*, 1997, 105: 1575-1578.
- [10] Hoyos M, Castro A. Controlling the acoustic streaming by pulsed ultrasounds. *Ultrasonics*, 2013, 53: 70-76.
- [11] Cancelos S, Moraga FJ, Lahey RT, et al. The effect of acoustically-induced cavitation on the permeance of a bullfrog urinary bladder. *J Acoust Soc Am*, 2010, 128: 2726-2738.
- (收稿日期: 2013-07-16)
(本文编辑: 张岚)
- 徐卫平, 申钙, 林艳端, 等. 不同辐照模式低频超声对前列腺癌 DU145 细胞的影响 [J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2013, 7 (17): 7847-7850.

