

超声激活血卟啉抗癌作用的实验研究

马玉英 张伊立 张军平 丛维维 王仲会* 袁仕取*

(陕西师范大学应用声学所 西安·710062)

本文介绍了利用超声波激活血卟啉治疗癌肿瘤的设备、方法、离体及活体实验结果。实验表明,超声激活血卟啉具有明显的抗肿瘤作用。当血卟啉浓度为 $50\mu\text{g/ml}$ 时,用超声激活后,对 S_{180} 细胞的杀伤率可达95%以上,同样强度的超声作用相同时间后,对 S_{180} 细胞的杀伤率只有3.67%。含有血卟啉的肿瘤细胞经二次超声照射后,对 S_{180} 实体肿瘤增长的抑制率可达57.52%。文中还给出了声参量与肿瘤细胞杀伤率之间的关系曲线,并用荧光分析仪对肿瘤细胞损伤作用进行了定量测定,给出了结果。

关键词: 超声、血卟啉、抗肿瘤效应。

An experimental study on the antitumor effect of hematoporphyrin derivatives irritated by ultrasound

Ma Yuying Zhang Yili Zhang Junping Cong Weiwei

(Applied Acoustic Institute, Shanxi Teachers University)

Wang Zhonghui Yan Shiqu

(Department of Biology, Shanxi Teachers University)

In vitro and in vivo experiments show that Hematoporphyrin derivatives (HPD) irritated by ultrasound has obvious antitumor effect. At the concentration of $50\mu\text{g/ml}$, the killing rate of HPD on S_{180} cells is 95% or more when irritated by ultrasound. The inhibit rate of HPD on mouse S_{180} tumor growth reached 57.52% after irritated twice with ultrasound. The damage to tumor cells caused by HPD irritated by ultrasound was also measured quantitatively by fluoroscent spectrophotometry. The submicroscopic structure change of the tumor cells was also observed with electron microscope. The principle and the equipment used in the experiments are also reported.

Key words: ultrasound, hematoporphyrin, antitumor effect.

血卟啉是从血清中提取的一种光敏物质,当60年代Lipson^[1,2]提出用血卟啉做光敏剂进行肿瘤的诊断和治疗后,人们已在

这方面做了不少工作^[3],激光技术的引入,

*陕西师范大学生物系

收稿日期: 92-10-12

修回日期: 92-12-22

又使得该技术得到了发展和应用^[4,6]。由于光的穿透能力差、以及激光在某些正常器官的滞留浓度过高,限制了以激光为动力的光动力学疗法(PDT)的应用和推广。而超声对生物组织有较强的穿透作用,并可聚焦于深层部位。超声波还能在某些药物中引起抗肿瘤效应,这些都将使超声作为动力的声动力学疗法(SDT)有可能成为一种极有潜力和有效的肿瘤治疗方法。本文通过离体和活体实验证明了超声激活血卟啉治疗肿瘤的可能性,并初步摸索出声参量与治疗效果间的关系,给临床试验提供了参考数据。

1 设备、材料和方法

1.1 超声波设备

共由四部分组成:高频信号源、宽带功率放大器、超声换能器(简称声头)、实验水槽,其实验装置方框图如图1所示。

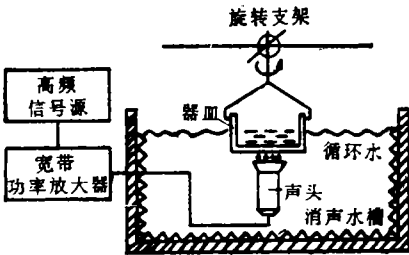


图1 实验装置方框图

其中高频信号源为XFG—7型高频信号发生器,可产生100kHz~30MHz的信号。

宽带功率放大器:输出功率25W、频率范围为10kHz~10MHz。该放大器由于采用了传输线变压器,使频带展宽,频率覆盖系数增加,也减小了漏感及分布电容对频率的影响。本放大器还采用晶体管合成法,克服了高频大功率管使用寿命短、性能不稳定等弊端。宽带放大器的方框图及频响曲线如图2~3所示。

超声换能器:用PZT-F型压陶瓷电片与匹配板组成,匹配板为半波长的整数倍。实

验所用声头频率分别为800kHz、850kHz、940kHz、1.5MHz、1.8MHz和2.2MHz。经试用声头辐射声场较均匀,性能稳定。

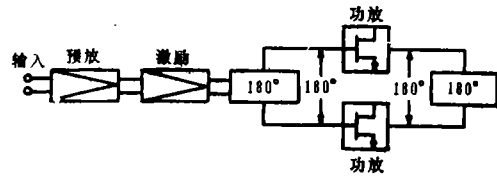


图2 功率放大器方框图

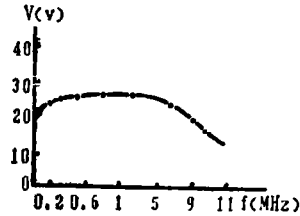


图3 放大器频响曲线

1.2 声参量的测定

声功率的测定是选用英国Medisonic公司的超声精密功率计,测量精度为0.1mW,频率范围为0.5~8MHz,声功率为0.1mW~20W。声频率测定采用声传输法,其测量误差在2%以下。

1.3 药品及样品

血卟啉(Hemetoporphyrin derivatives HPD):北京制药工业研究所提供。

S₁₈₀肿瘤细胞:取自第四军医大学动物实验中心,提供的腹水型ICR系荷瘤小鼠,实验时无血清RPMI-1640培养基悬浮成 5×10^6 细胞/毫升的悬液。

荧光光谱分析仪:Shimadzu spectrofluorophotometer RF-540。

活体动物:20±1g的ICR小鼠。

1.4 方法:

离体细胞实验方法,取10ml细胞悬液盛于 $\phi 6$ cm,底部很薄的培养皿中,加一定量的血卟啉后,避光超声照射,处理时将培养皿底部及超声声头均浸在循环水箱中,培养皿底部距声头端面的距离随频率而定,水槽及细胞悬液的温度随时监测,其温度不超过

2℃。

超声处理后,取 1ml 细胞悬浮液,加 0.1%伊红Y染色,血球计数板计数,计算着染率。离心(1000rpm, 5')收集剩余细胞、重悬浮于pH5.5生理盐水中,加1/10体积的饱和二丙酸酯荧光素液,25℃保温15分钟后,离心洗涤细胞三次,弃上清,80℃水浴15分钟,加10ml、1%的Triton-X100 生理盐水液破碎细胞,2小时后离心(4000rpm,10'),取上清液,用RF-540 荧光光谱分析仪测量(激发光495nm,发射光518nm)荧光强度。经多次实验选取最佳频率、声强及处理时间。

活体实验方法:给体重 $20 \pm 1g$ 的ICR系小鼠,在前肢腋下接种 S_{180} 肿瘤细胞悬液 0.2ml, 4~6 天后,瘤径为3~5mm时,随机分为四组:对照组;血卟啉治疗组;纯超声治疗组;血卟啉加超声治疗组,每组 8 只。第四组腹腔注射一定量血卟啉,24小时后用硫喷妥钠(50mg/kg)麻醉,超声处理两次后,24小时测其瘤径及瘤重。其中第二组血卟啉用量与第四组相同,第三组的麻醉剂量、方法与第四组相同。

2 结果与分析

2.1 超声频率、血卟啉浓度对细胞杀伤率的影响

图 4 给出不同超声频率与 S_{180} 细胞杀伤率的关系曲线,(其中血卟啉浓度为 $50\mu g/ml$)。

从曲线看,声频率对肿瘤细胞死亡百分率影响不很明显,但在实验中发现,频率为 1.8MHz时,杀伤肿瘤细胞所需的声功率较小(约0.5W)就可收到良好的效果。

图 5 超声加血卟啉组中当超声参量保持一定时,改变血卟啉浓度对肿瘤杀伤率影响曲线。(超声频率为 1.8MHz,声功率为 0.8W),血卟啉含量单位为 $\mu g/ml$ 。

从曲线看,肿瘤细胞死亡百分率随血卟啉

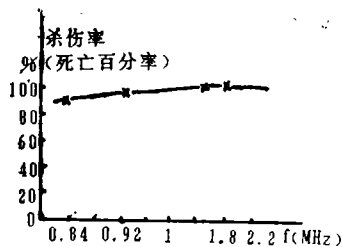


图 4 频率与肿瘤杀伤率关系曲线

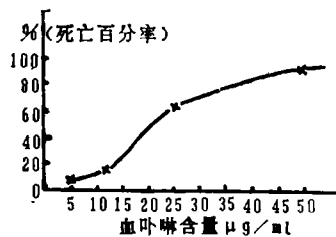


图 5 血卟啉浓度与肿瘤杀伤率的关系曲线

浓度的增加而增加,是否存在最佳值有待进一步实验摸索。

2.2 超声激活血卟啉对离体肿瘤细胞的杀伤效果

表 1 列出了用一定频率、功率的超声波处理,加血卟啉或不加血卟啉,或纯超声作用对肿瘤细胞 S_{180} 杀伤效果及各样品细胞内荧光素的荧光强度。

由表 1 可见,超声激活血卟啉有明显的杀伤肿瘤细胞作用。由于细胞内荧光素强度是细胞膜完整性及细胞活力的反映。因此超声激活血卟啉作用后,细胞膜受到损伤、细胞活力下降甚至丧失。

2.3 超声激活血卟啉对活体肿瘤的抑制作用

从表 2 给出的超声激活血卟啉对 ICR 小鼠移植性肿瘤作用结果可以看出,超声激活血卟啉对小鼠移植性肿瘤的增长有明显的抑制作用。

2.4 超声激活血卟啉作用后 S_{180} 细胞超微结构的变化

采用电镜观察,发现处理后细胞线粒体膨大,嵴消失,内质网呈空泡样结构,这与司静懿等^[6]观察的激光激活血卟啉作用后

表 1 不同浓度血卟啉加超声后S₁₈₀细胞死亡率及样品细胞内荧光素的荧光强度

	空白对照	血卟啉 处理组 (25μg/ml)	超声处理组	血卟啉加超声处理组 (μg/ml)			
				5	12.5	25	50
细胞死亡率(%)	1.37	1.90	3.67	7.70	17.66	65.42	95
细胞内荧光素强度* (平均值)	70.2	74.5	79.3	52.5	36.1	22.2	9.1

(* 细胞内荧光素的荧光强度为5次重复实验的相对平均值,其标准差按公式 $\sigma = \sqrt{\frac{\sum(x-\mu)^2}{N}}$ 计算—

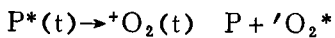
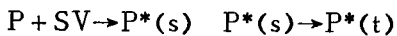
一般为0.2~0.3。)

表 2 超声激活血卟啉对ICR小鼠移植性肿瘤作用结果(接种5天后试验)

	空白对照	超声处理组	血卟啉处理组 (50μg/ml)	超声加血卟啉处理组50μg/ml		
					增长抑制率 (%)	P 值
动物数(起始/终止)	8/8	8/7	8/8	8/8		
平均瘤重(g)	1.13±0.16	1.13±0.17	1.17±0.26	0.48±0.07	57.52	0.01
平均瘤径(mm)	起始4.6±0.9 终止 10.8±1.0	4.6±0.9 10.8±1.1	4.6±0.9 10.3±1.3	7.3±1.3	43.55	0.01

*本组数据为接种5天后测得的起始数据,所测瘤重及瘤径均为8组平均值。

肿瘤细胞的超微结构变化相似。超声激活血卟啉治疗肿瘤的机理,可能与超声空化作用所引起的声化学激活血卟啉产生单态氧有关,单态氧从卟啉产生的步骤^[7],可用下列著名公式说明。



式中P——卟啉;SV——声能;P*——激发态卟啉;S——单价态;t——三价态;
{}^1O_2^*——激发态的单态氧。

按上述公式知,卟啉的三价态产物是影响单态氧的主要因素,而单态氧产生是与超声空化效应分不开。至于热效应,由于采用循环水等措施,热效应已得到排除。具体机理还有待进一步实验分析。

3 结 论

(1)超声激活血卟啉有明显的杀伤离体肿瘤细胞作用。对血卟啉浓度为50μg/ml时,用超声激活后,对S₁₈₀细胞的杀伤率达95%以上。相同强度的纯超声作用对S₁₈₀细胞的杀伤仅3.67%。未发现由血卟啉引起的细胞损伤。

(2)超声激活血卟啉对S₁₈₀实体肿瘤生长有明显的抑制作用,当超声照射两次后,实体瘤增长抑制率可达57.52%。

(3)从超微结构分析,超声激活血卟啉治疗肿瘤的机理与超声空化效应引起的单态氧有关,而与热效应无关。

(4)实验表明,超声能激活血卟啉,若与聚焦超声结合,用声动力学疗法治疗深部肿瘤和中晚期肿瘤,将会成为一种有效而有潜力的方法。

参考文献

1. Lipson, R. L., et al. J. natl. cancer inst., 1961, 26(1)
2. Lipson, R. L., et al. Cancer, 1968, 20: 2255
3. Dougherty, T. J., et al. Cancer. res,

1978, 38:2628

4. Dougherty, T. J., et al. Cancer res, 1981, 41:401

5. 谢建国等, 中华肿瘤杂志, 1985, 7(2): 113

6. 司静懿等, 中国医学科学院学报, 1985, 7(4):244

7. Yoshihiro Hayata and Thomas J. Dougherty. IGAKU-SHOIN Ltd., Tokyo 1983

8. Shin-ichiro Umemura et al. 1989. IEEE ultrasonic symposium, 1989

为您介绍优质超群的HP电信测试仪表

请在回执上填写您的姓名及地址寄来, 我们会免费送上一本名为“HP电信/数据通信测量仪表总览”的小册子, 供您参考。

姓名: _____

职位: _____

公司名称: _____

地址: _____

城市: _____

电话: _____

传真: _____

