

复频聚焦超声激活血卟啉杀伤肿瘤 细胞 K₅₆₂ 的实验研究

石新军, 朱旭宁
(武警广州指挥学院, 广州 510440)

尚志远
(陕西师范大学应用声学研究所, 西安 710062)

摘要: 为了研究单复频超声激活血卟啉对人体肿瘤细胞的杀伤效应, 利用自制的复频聚焦换能器激活血卟啉, 以肿瘤细胞 K₅₆₂ 为研究对象, 采用 MTT 法(四唑盐比色法)检测在不同超声处理时间、不同频率、不同溶液环境下、不同孵育时间条件下, 声动力学激活血卟啉法对肿瘤细胞的杀伤效应。结果表明, 复频聚焦超声激活血卟啉对肿瘤细胞具有较强的杀伤效应, 是一种有应用前景的治疗肿瘤的新技术。

关键词: 抗肿瘤效应; 复频聚焦超声; 血卟啉; 声动力学疗法

中图分类号: O426.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3630(2004)02-0084-04

Cell killing of K₅₆₂ cells by hematoporphyrin derivatives activated by focused bi-frequency ultrasound

SHI Xin-jun, ZHU Xu-ning

(Guangzhou Command College of Armed Police Force, Guangzhou 510440, China)

SHANG Zhi-yuan

(Applied Acoustic Institute, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract: A bi-frequency focusing ultrasonic transducer is used to activate hematoporphyrin in order to kill cancer cells of K₅₆₂. The cell-killing effects of the sonodynamic-therapy with different time, frequencies, liquor conditions and incubation time are studied. It is concluded that bi-frequency focused ultrasound can increase the cell-killing effect in homodynamic therapy. The longer the irradiation time, the better the cell-killing effect.

Key words: cell-killing effect; bi-frequency focused ultrasound; hematoporphyrin; sonodynamic therapy

1 引言

利用超声能量激活血卟啉及其衍生物来产生抗肿瘤的方法被称为声动力学疗法^[1]。它是利用超声作用下的空化能引起声化学效应激活血卟啉产生单线态氧。单线态氧具有强氧化性,能与组织发生反应,氧化肿瘤组织从而达到抑制或杀死肿瘤组织目的。而复频超声叠加由于产生声散射现象,使声场频谱变宽,频率成分丰富,从而能激活更多不同半径的气

泡发生空化。同时,复频叠加能加速气泡的定向扩散运动,加速空化核的膨胀与崩溃过程,增强超声空化效应^[4,5]。因此文献[6]中设计了一种能实现复频超声叠加的自聚焦换能器,并对其声场特性进行分析和测试。但实际操作中超声照射参数时间的选择也是影响实验成败的关键因素^[7,8,14],本文利用对比的方法对实验中的时间参数进行筛选,在此基础上研究了在不同超声处理时间、不同频率、不同溶液环境、不同孵育时间情况下声动力学疗法对肿瘤细胞 K₅₆₂ 杀伤效应。

2 实验部分

收稿日期: 2003-07-14; 修回日期: 2003-10-24

作者简介: 石新军(1974),男,陕西洛南人,讲师,主要从事声学和大学物理教学方面的研究。

2.1 实验仪器

CO₂ 培养箱(BB16HF), 由上海力申科学仪器有限公司制造; TECA N A-2082 RUNRI SE 酶标仪, 由澳大利亚 TECA N 公司制造; 高速冷冻离心机(5810R), 由德国 Eppendorf 公司制造。

2.2 细胞系及细胞培养

实验所用的人体肿瘤细胞 K₅₆₂ 来自陕西师范大学生命科学学院, 细胞在 37℃ 的 5% CO₂ 及饱和水蒸汽的 CO₂ 孵箱中培养。

2.3 实验配置用试剂

MTT(四唑盐比色法), 血卟啉(Hp), 青霉素, 链霉素, PRMI1640 培养基, K₅₆₂ 完全培养基, Verson 消化液, 2.5% 胰酶消化液, DMSO(二甲基亚砷)。

2.4 超声照射装置

超声照射系统由高频信号发生器、宽带功率放大器、高频毫伏表、复频超声聚焦换能器、水槽、温度计、盛放细胞液体的塑料试管、支架等组成(见图 1)。其中: 高频信号源是上海无线电 23 厂生产的 XFG-7 型高频信号发生器, 可产生 100kHz~30MHz 的信号; 功率放大器是美国 ENI 公司生产的 2100L 型宽带功率放大器, 该放大器频响好、性能稳定, 换能器为文献[4]设计的同类型换能器; 可产生 0.6MHz 和 1.1MHz 的复频聚焦超声换能器; 实验水槽具有精密三维定位系统, 内侧装有吸声材料以消除界面反射, 槽内装有静置的除汽蒸馏水。实验中用英国 Medisonic 公司生产的型号为 Active Hydrophone II 的微型水听器。水听器能将接受到的声波转化为电信号, 在示波器上显示。水槽上的支架用来调整容器和换能器之间的距离。实验时将样品放在声场焦点之内, 照射时不断旋转和晃动样品容器, 保证样品被均匀辐射。

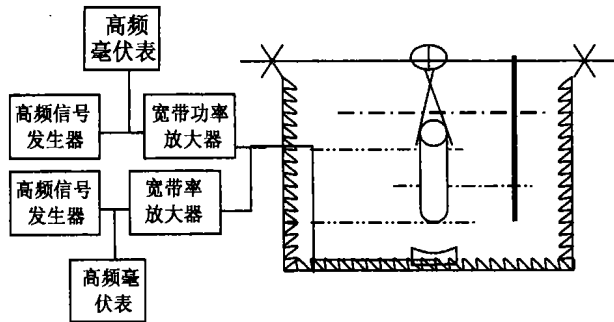


图 1 实验装置示意图

2.5 实验步骤和杀伤效果

实验步骤与文献[10]基本相同, 而实验采用 MTT^[9] 法测试声动力学方法对肿瘤细胞的杀伤作

用。

3 结果与讨论

血卟啉浓度是实验中必须考虑的因素, 齐浩、马玉英等^[10,11] 曾利用 MTT 法对人体肿瘤细胞 K₅₆₂ 筛选了最佳血卟啉浓度, 实验结果表明在声动力学抗肿瘤时, 血卟啉浓度为 200μg/ml, 可取得较好效果。经光谱分析对比, 本实验选用 Sigma 公司生产的血卟啉, 使用终浓度亦为 200μg/ml。

3.1 复频超声不同处理时间对肿瘤细胞 K₅₆₂ 杀伤率的影响

实验时调整信号发生器的输入电压, 保持焦点处的声强度为 1.5W/cm² 不变。血卟啉浓度为 200μg/ml。细胞样品随机分成四组: 对照组(0 组), 单纯血卟啉组(1 组), 单纯超声组(2 组) 和超声加血卟啉组(3 组)。每组各取 0.5ml, 放入一次性塑料采血管内。除超声加血卟啉组加入培养基溶液和血卟啉溶液外, 其他各组分别加适量培养基溶液, 使每组体积最终为 1ml。双路同时激发两种频率的换能器, 超声处理时间分别取 30s、60s、90s、150s。超声照射后用 MTT 法检测细胞的存活率, 结果如图 2 所示。

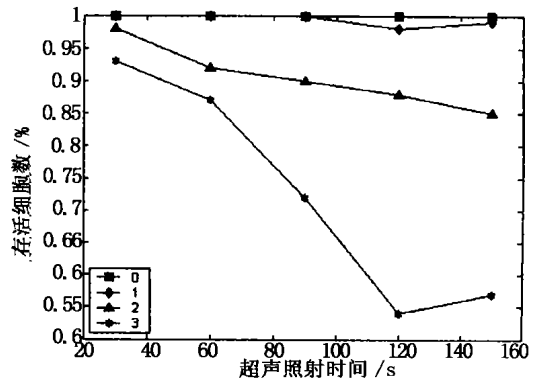


图 2 不同组别在不同处理时间下的细胞存活率

由图 2 可见: 单独使用血卟啉对细胞无杀伤作用, 单独使用低强度超声对细胞的损伤作用也不明显(杀伤率仅为 15%), 但和血卟啉结合对肿瘤细胞的杀伤作用, 在照射时间同为 120s 时, 比用纯超声提高近 4 倍。图 2 结果还表明, 超声加血卟啉组对肿瘤细胞杀伤率随照射时间的增加而提高, 照射 120s 时细胞的杀伤率明显提高, 由于 120s 和 150s 作用效果基本相同, 因此认为: 在实验条件下, 照射 120s 即可满足较好杀伤肿瘤细胞的目的。

3.2 单频超声作用不同时间对肿瘤细胞 K₅₆₂ 杀伤率的影响

上面讨论的是在复频聚焦超声处理时, 细胞死亡率受时间的影响。在同样条件下, 分别用两种单频超声重复上述过程, 用 MTT 测得细胞死亡率结果如表 1 所示, 其中 U 表示超声, H 表示血卟啉。

表 1 单频超声作用不同时间对细胞的杀伤率

时间/s	不同组别杀伤率/%			
	U+ H(1.1MHz)	U(1.1MHz)	U+ H(0.6MHz)	U(0.6MHz)
30	13	4	11	8
60	18	6	26	11
90	21	10	32	16
120	28	14	43	20
150	22	17	41	21

比较两种单频超声对 K₅₆₂ 细胞的作用, 发现在相同的时间和能量条件下, 较低频率的超声杀伤率较高, 表明细胞对低频超声更敏感。这可能与细胞结构与离体细胞的生长方式有关, 也与超声空化阈有关, 频率越低, 空化阈越小, 更容易造成细胞损伤。超声加血卟啉组对频率似乎没有特别要求, 而且超声结合血卟啉处理肿瘤细胞比单纯使用超声杀伤率高。

将以上两次(1.1MHz 与 0.6MHz) 使用单频超声激活血卟啉处理相同时间的效果, 与上面得到的复频超声激活血卟啉对细胞杀伤作用相比(见图 3 所示)。图 3 中曲线 a 表示两次单频超声激活血卟啉对细胞杀伤率之和, 曲线 b 表示复频超声激活血卟啉对细胞杀伤率。结合表 1 和图 3 不难发现, 复频超声激活血卟啉对细胞杀伤作用比单频效果明显, 有时复频超声作用效果比单频效果之和还要好得多。

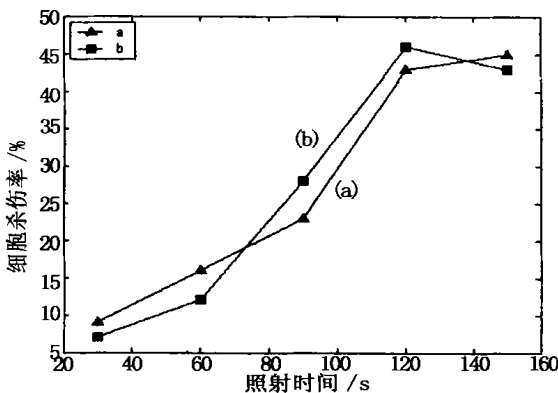


图 3 复频超声和两次单频超声激活血卟啉对细胞的杀伤率比较

3.3 超声激活血卟啉对白血病肿瘤细胞 K₅₆₂ 杀伤效应的研究

上面对 K₅₆₂ 细胞系进行了一些常用参数的筛选, 利用上述结论, 在超声强度为 1.5 W/cm²、血卟啉浓度为 200 μg/ml、超声照射时间为 2 min 的条件下, 分别用单、复频超声处理不同溶液环境中悬浮的肿瘤细胞 K₅₆₂, 不仅考虑有无血卟啉对细胞损伤率的影响, 而且研究超声处理后在不同溶液环境、不同孵育时间对肿瘤细胞的影响。细胞死亡率仍然用 MTT 法检测。

组别中第一个字母表示溶液代码(R 表示细胞悬浮在 PRMI1640 培养基中, M 表示细胞悬浮液中有血清和 PRMI1640 培养基, N 表示细胞悬浮在 NaCl 溶液中, 这与人体肿瘤细胞生长的体内环境很接近), 其余字母表示分组(O 代表对照组, F 代表复频超声组, fa 表示 0.6 MHz 的超声, fb 表示频率为 1.1 MHz 的超声组)。

表 2 PRMI1640 培养液中的 K₅₆₂ 细胞超声处理结果(吸光度)

组别	纯超声组(照后 孵育 4h)	超声+ HpD(照 后孵育 4h)	纯超声组(照后 孵育 16h)	超声+ HpD(照 后孵育 16h)
RO	0.672±0.070	0.463±0.015	0.457±0.039	0.304±0.035
RF	0.547±0.005	0.206±0.066	0.308±0.055	0.105±0.017
Rfa	0.525±0.066	0.257±0.056	0.384±0.027	0.375±0.045
Rfb	0.315±0.037	0.585±0.082	0.424±0.058	0.576±0.020

由表 2 可知, 复频纯超声不加血卟啉组对肿瘤细胞作用不大, 照射孵育 4 h 杀伤率为 18%, 孵育时间延长至 16 h, 杀伤率为 32%。对单频纯超声而言, 延长孵育时间, 杀伤率却变小(比如 0.6 MHz 超声孵育 4 h, 杀伤率为 21%, 孵育时间延长至 16 h, 杀伤率变为 16%), 说明有部分细胞恢复活性。

超声激活血卟啉组表明, 使用复频超声比单频损伤作用更强, 而且延长孵育时间有延迟死亡现象, 孵育 4 h 杀伤率为 55%, 孵育时间延长至 16 h, 杀伤率变为 66%。比较孵育时间至 16 h 的复频超声组和复频超声加血卟啉组, 两者的杀伤率分别为 32% 和 66%, 这表明低强度超声激活血卟啉比单独使用超声对细胞损伤更大。

表 3 K₅₆₂ 细胞在模拟体内环境中的超声处理结果(吸光度)

组别	纯超声组(照后 孵育 4h)	超声+ HpD(照 后孵育 4h)	纯超声组(照后 孵育 16h)	超声+ HpD(照 后孵育 16h)
MO	0.586±0.037	0.610±0.089	0.457±0.028	0.520±0.086
MF	0.531±0.030	0.275±0.037	0.327±0.071	0.145±0.003
Mfa	0.363±0.015	0.403±0.064	0.406±0.056	0.396±0.046
Mfb	0.463±0.068	0.339±0.019	0.432±0.034	0.402±0.060

比较表 3 中纯超声 4 h 的各组结果, 发现使用两种单频的效果比复频更佳, 但孵育时间延长至 16 h, 复频超声比单频杀伤作用更大, 提高近 3 倍, 表明复频有延迟杀伤效应。将同样的孵育时间、单纯超声组和超声激活血卟啉组相比较, 发现无论是单频超声还是复频超声, 前者对肿瘤细胞的杀伤效应总不如后者显著。

表 4 NaCl 溶液中的 K₅₆₂ 细胞超声处理结果(吸光度)

组别	纯超声组(照后 孵育 4h)	超声+ HpD(照 后孵育 4h)	纯超声组(照后 孵育 16h)	超声+ HpD(照 后孵育 16h)
NO	0.172+	0.027 0.036+	0.008 0.344+	0.036 0.051+
NF	0.143+	0.012 0.019+	0.002 0.231+	0.020 0.018+
Nfa	0.103+	0.053 0.025+	0.004 0.303+	0.052 0.076+
Nfb	0.114+	0.024 0.021+	0.008 0.319+	0.036 0.116+

对比表 4 中单、复频超声照射细胞的作用结果, 孵育 4h 时低频超声单独作用的效果比复频超声效果好, 细胞死亡率分别为 40% 和 16%, 孵育 16 h 时的结果却表明复频超声杀伤率高, 约为 33%, 而此时低频超声的杀伤率为 12%, 表明该溶液有利于细胞复苏。超声卟啉组仍然是复频效果好于单频, 延长声照射时间有助于进一步提高超声激活血卟啉组杀伤效率。孵育 16 h 后, 复频超声激活血卟啉组的杀伤率为 65%。

4 结 论

本文采用单复频超声结合血卟啉对人体肿瘤细胞 K₅₆₂ 的杀伤效应进行了实验研究, 筛选了常用的最佳实验参数, 即血卟啉浓度取 200 μ g/ml, 超声强度为 1.5W/cm²、照射时间为 120s 时对肿瘤细胞的杀伤作用较好。并对血卟啉、单频超声、复频超声、超声加血卟啉对肿瘤细胞 K₅₆₂ 在不同溶液环境下的杀伤作用进行了对比, 结果表明复频超声较之单频超声能更有效的激活血卟啉杀伤肿瘤细胞。从声化学角度解释为^[12, 13]: 在复频作用下, 两种频率的超声各自产生空化过程, 当各自空化泡内爆时, 会产生许多新的空化核, 这些空化核不仅维持该频率的自身再空化, 同时也为另一种频率的空化提供更多空化核, 况且复频叠加时, 声场的频率成分也更丰富, 所以空化效应较之单频有所增强, 杀伤率也比单频高。而实验中发现不同孵育时间条件下复频的延迟杀伤效应和单频照射作用下细胞的复苏的物理生物机理有待进一步的研究。

致谢: 陕西师范大学生命科学院齐浩、刘权宏教

授的悉心指导和帮助, 李清、刘坤研究生在实验中也作了大量工作, 在此对以上各位老师和校友致以真挚的谢意!

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 Ultrasonic Symposium, 1989, 1(36): 955-969.
- [2] Yumita N, Nishigaki R, Umemura K, et al. Hematoporphyrin as a sensitizer of cell-damaging effect of ultrasound [J], Japanese Journal of cancer research, 1989, 1(80): 219-222.
- [3] Nagahiko Yumita. Synergistic effect of ultrasound in combination with hematoporphyrin [J]. Japanese Journal of cancer research, 1990, 2(81): 304-308.
- [4] Umemura S. Enhancement of sonodynamic tissue damage production by second-harmonic superimposition: theoretical analysis of its mechanism [J]. IEEE Ultrasonic Symposium, 1996, 1(43): 1054-1062.
- [5] Hsieh Y, Splisset M. Theory of rectified diffusion of mass into gas bubbles [J]. J. Acoust. Soc. Am, 1961, 2(33): 206-215.
- [6] 朱旭宁, 石新军, 尚志远. 复频聚焦超声换能器声场研究 [J]. 陕西师范大学学报(自然科学版), 2002, 3(30): 67-70.
- [7] 齐浩, 谭声江, 马玉英, 等. 不同频率聚焦超声与对人体肿瘤细胞的协同作用 [J]. 中国科学(C 辑), 1998, 5(28): 236-241.
- [8] 马玉英, 张伊利, 张军平. 超声激活血卟啉抗肿瘤作用的实验研究 [J]. 声学技术, 1993, 2(12): 31-35.
- [9] 扬汉民. 细胞生物学实验 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1997. 78-80.
- [10] 宋存牛, 马玉英, 齐浩. 超声激活血卟啉对 K₅₆₂ 肿瘤作用的研究 [J]. 陕西师范大学学报(自然科学版), 1998, 2(26): 33-35.
- [11] Umemura S. Mechanism of cell damaged by ultrasound in combination with hematoporphyrin [J]. Japanese Journal of cancer research, 1990, 3(81): 962-966.
- [12] 钱祖文. 非线性声学 [M]. 上海: 上海科技出版社, 1966. 35-60.
- [13] Oh H, Lee S E, YANG J A, et al. Establishment of a biological indicator for the radiation and safety of diagnostic ultrasound using apoptosis [J]. In Vivo and In Vitro, 2000, 2(14): 345-349.
- [14] 彭健新, 马玉英. 利用声化学激活血卟啉抗肿瘤效应的研究 [J]. 声学技术, 1995, 14(4): 187-191.