

· 基础研究 ·

超声消融术对癌细胞超微结构和细胞周期的影响

程树群 吴孟超 钱德初 曹惠芳 崔贞福

(第二军医大学东方肝胆外科医院,上海 200438)

【摘要】 目的 探讨超声消融术对癌细胞超微结构和细胞周期的影响。**方法** 体外超声消融(42 kHz, 0.22 W) Walker-256 细胞,扫描电镜、透射电镜和流式细胞仪分别观察细胞变化。**结果** 超声消融 Walker-256 细胞后,电镜观察发现细胞膜破裂、细胞器紊乱不清、核染色质碎裂,提示细胞已受到严重的损伤。流式细胞仪检查发现,随着超声剂量的增大,细胞 S 期下降, G₂ + M 期增加,说明细胞合成抑制,放射敏感性增加。**结论** 在细胞水平验证了超声消融术对癌细胞具有杀伤效应。

【关键词】 超声消融术; 肝癌; 门静脉癌栓

中图分类号 R735.705.4

文献标识 A

文章编号 1009-6604(2005)02-0119-03

Effect of ultrasound-mediated disruption on the ultrastructure and the cell cycle of hepatoma Cheng Shuqun, Wu Mengchao, Qian Dechu, et al. Department of Surgery, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Shanghai 200438, China

【Abstract】 Objective To observe changes of the ultrastructure and the cell cycle of hepatoma cells exposed to ultrasound-mediated disruption. **Methods** Suspensions of Walker-256 hepatoma in vitro exposed to ultrasound disruption with the acoustic power output 0.22 W and the ultrasound frequency 42 kHz were observed by the scanning electron microscopy, the transmission electron microscopy and the flow cytometric analysis of DNA content. **Results** Cells after ultrasound disruption revealed by scanning electron microscopy exhibited ruptured membrane, disordered organellae and disrupted nucleus, showing typical severe destruction of the cells. Flow cytometric analysis of DNA content demonstrated an increased in the population of cells in the G₂ and M phases of the cell cycle but a decrease in number of cells in the S phase, suggesting an inhibition of the cell synthesis and an increased sensitivity to radiation. **Conclusions** Ultrasound disruption can destroy tumor cells effectively at the cellular level.

【Key Words】 Ultrasound-mediated disruption; Hepatic carcinoma; Tumor embolism of the portal vein

超声消融术治疗肝癌门静脉癌栓是门静脉癌栓微创治疗的新技术。我们已在体内、体外验证了超声消融术治疗门静脉癌栓的有效性和可行性^[1,2],本文通过超声消融术对癌细胞的超微结构和细胞周期变化的观察,进一步探讨超声消融杀伤癌细胞的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料 超声消融仪(42 kHz, 0.22 W, 0.4 mm 导丝)。日立 S-520 扫描电镜。日立 H800 透射电镜。日立 HCP-2 型临界点干燥仪。Eiko、IB-5 型溅射仪。LKB-1 型超薄切片机。流式细胞仪 FACSscan(BECTON DICKINSON)。RNA 酶(华美公司)。PI 染液(PI 100 μg/ml, TritonX-100 1.0%, NaCl 0.9%)。甲醇、钨酸、戊二醛、乙醇均为国产分析纯或优级纯。

1.2 方法

1.2.1 超声消融癌细胞扫描电镜观察 取培养细胞 Walker-256,稀释成 1.0×10^6 /ml,各取 1 ml 分装于 1.5 ml 的 Eppendorf 管中,然后用 0.4 mm 导丝的超声消融仪消融,消融时间分别为 0, 3, 7 min,再离心,用 PBS 溶液漂洗,1% 钨酸固定 1 h。乙醇系

列脱水。临界点干燥仪干燥。Eiko、IB-5 型溅射仪,离子镀膜约 7 min。扫描电镜观察。

1.2.2 超声消融癌细胞透射电镜观察 同上法,取 Walker-256 细胞 1.0×10^6 /ml,用 0.22 W 超声消融 0, 3, 7 min 后,离心,用 2.5% 戊二醛前固定和 1% 钨酸后固定,丙酮梯度脱水, Epon 812 环氧树脂包埋, LKB-1 型超薄切片机切片,醋酸铀和枸橼酸铅电子染色,透射电镜观察。

1.2.3 超声消融癌细胞后细胞周期变化测定 取 Walker-256 细胞 1.0×10^6 /ml,同上法用超声消融不同时间后, PBS 洗 2 遍, 1 000 r/min 离心,甲醇固定,冰浴 30 min,备测。又同法超声消融 5 min 后,将细胞移至 24 孔培养板中,再加入含 10% 小牛血清培养液 1.5 ml,置 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养,分别在 4, 8, 12, 24, 48 h 后收集细胞, PBS 洗 2 遍,离心,甲醇固定,冰浴 30 min,备测。上述实验重复 3 次。

细胞染色程序:将上述备测细胞离心 1 000 r/min 5 min,吸弃上清, PBS 洗 2 遍,加入 500 μl PI 染液及 500 μl RNA 酶,混匀,室温暗处放置 30 min, 1 h 内用流式细胞仪检测细胞周期变化。

2 结果

2.1 扫描电镜观察

在正常情况下, Walker - 256 癌细胞呈悬浮状, 形态完整, 大小均匀, 表面光滑饱满, 有少量的皱褶 (图 1)。经超声消融 3 min 后, 出现大量细胞碎片,

大部分细胞形态欠完整, 表面凹陷、皱褶增多 (图 2)。消融 7 min 后, 除细胞碎片外, 几乎所有细胞形态失常, 细胞表面高低不平, 皱褶明显增多, 且膜上似出现许多小孔 (图 3)。提示超声消融可引起细胞形态明显改变。

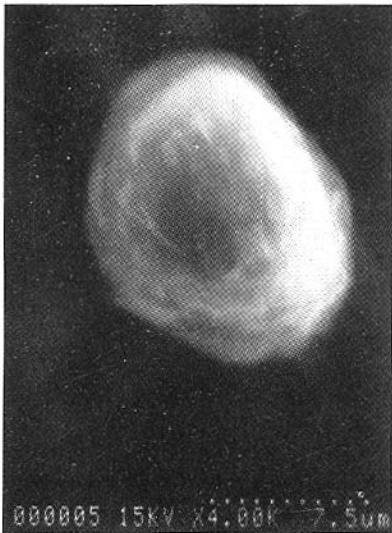


图 1 消融前扫描电镜观察, Walker - 256 癌细胞表面光滑饱满, 有少量皱褶 (×4000)

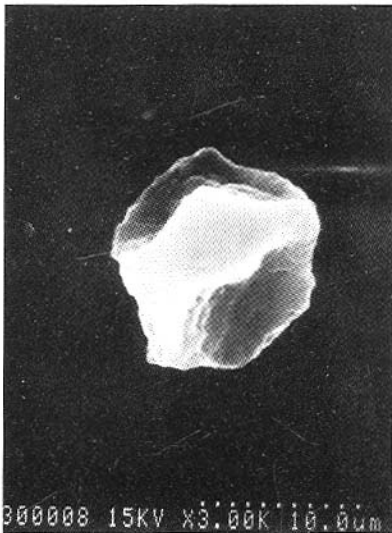


图 2 超声消融 (0.22 W) 3 min 后扫描电镜下 Walker - 256 癌细胞表面凹陷、皱褶增多 (×3000)

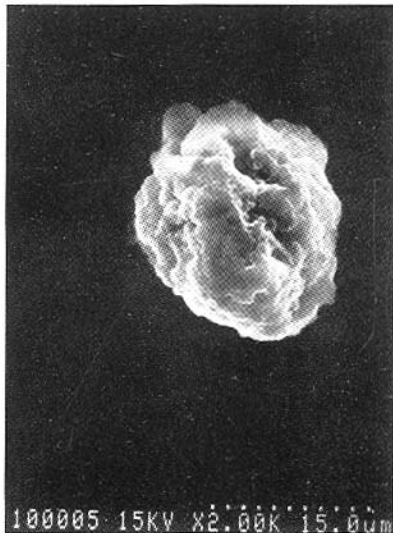


图 3 超声消融 (0.22 W) 7 min 后, 扫描电镜下 Walker - 256 癌细胞皱褶改变更加明显 (×2000)

2.2 透射电镜观察

未经处理的 Walker - 256 癌细胞超微结构见: 胞膜完整, 细胞器排列有序, 核大, 核仁明显, 核膜清晰 (图 4)。经超声消融 3 min 后, 见有大量的细胞碎片存在, 有的细胞胞膜破裂, 突起消失 (图 5)。线

粒体、核糖体和内质网紊乱不清, 有的核膜断裂。消融 7 min 后, 上述表现更加明显, 胞质内出现更多的空泡和电子沉淀物 (图 6)。提示细胞已受到更严重的损伤。

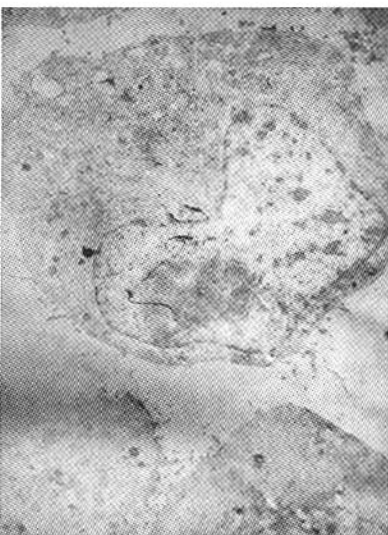


图 4 消融前 Walker - 256 癌细胞透射电镜观察, 胞膜完整, 核大, 核仁明显 (×3500)



图 5 超声消融 (0.22 W) 3 min 后, 透射电镜观察下 Walker - 256 癌细胞出现胞膜破裂 (×3500)

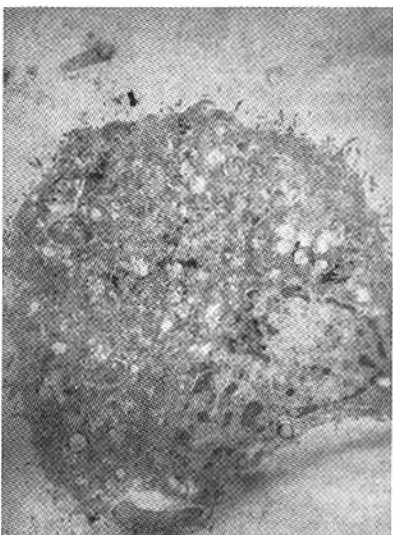


图 6 超声消融 (0.22 W) 7 min 后, 透射电镜观察下 Walker - 256 癌细胞核膜破裂, 胞质电子沉淀物增多 (×3500)

2.3 消融后细胞周期变化

消融剂量与 Walker - 256 细胞周期变化关系见

表 1, 可见随着消融剂量的逐渐增大 (时间延长), S 期细胞比例逐渐减少, 而 G₂ + M 期比例明显增加,

出现显著的 G₂ + M 期延搁。

表 1 消融时间与细胞周期不同细胞相的分布关系

%			
消融时间(min)	G ₀ + G ₁	S	G ₂ + M
0	47	37	15
1	47	36	17
3	50	30	20
5	51	18	31
7	46	17	37
10	43	17	40

$\chi^2 = 40.464$ $P = 0.000$

G₂ + M 期延搁的出现与消融后时间有关联 ,消融后 12 h 明显 ,24 h 最显著 ,48 h 又恢复到原来的水平。见表 2。

表 2 G₂ + M 期延搁构成与消融后时间关系

%			
消融后时间(h)	G ₀ + G ₁	S	G ₂ + M
0	38	41	21
4	27	50	23
8	22	50	28
12	44	12	44
24	7	48	45
48	40	40	20

$\chi^2 = 75.054$, $P = 0.000$

消融前细胞浓度与细胞周期无明显联系 ,不同的细胞浓度经同一剂量的超声消融后 ,细胞周期分布无显著性差异。见表 3。

表 3 细胞浓度与消融后细胞周期不同细胞相分布关系

%			
细胞浓度(10 ⁴ /ml)	G ₀ + G ₁	S	G ₂ + M
235	64	18	18
50	61	23	16
18	62	20	18

$\chi^2 = 0.852$ $P = 0.931$

3 讨论

超声波既是一种波动形式 ,又是一种能量形式。当其强度超过一定阈值时 ,就会产生诸如细胞溶解、DNA 降解及酶变性等生物效应。近 20 年来 ,超声生物效应的研究取得了长足的进步 ,已渗透到医学各个领域^[3]。

早在 1982 年 ,Liebeskind 等^[4]就发现诊断超声波(17 mW/cm² ,30 min)照射聚乙稀试管内的 Balb/c 3T3 细胞悬液可引起细胞胞体变锐 ,触角断裂或稀少 ,细胞表面微绒毛、皱褶明显增多 ,细胞骨架和运动功能失常 ,这种变化并可延续至细胞传代 10 代后。有趣的是 ,这些变化与 X 线(3 Gy)、紫外线(10 J/m² ,1 s)、或癌基因因子、致癌病毒作用后细胞表现有类似之处 ,认为这是细胞出现变异的一个不可逆的前期表现。另外 ,透射电镜观察发现细胞胞核内出现大量的周边染色质颗粒 ,胞浆内细丝或细管状物质增多 ,有的细胞出现了胞浆内容物涌入胞核的现象。这些结果和以后大量的实验均证

明 ,一定强度的超声波(一般 > 100 mW/cm²)均可引起离体或活体细胞不同程度的损伤^[3,5]。在本实验中 ,我们采用的超声剂量(42 kHz ,0.22 W)实际上已远远大于临床诊断超声波能量 ,因此很容易观察到细胞形态的改变及细胞内损伤的特征 ,这种破坏效应随着剂量的增大而增大 ,而且具有不可逆性 ,这对治疗门静脉癌栓而言是相当有用的 ,它可直接杀伤大部分癌细胞 ,使之失去繁殖或再生的能力。

从作用机制来说 ,利用超声波来消融门静脉内癌栓是比较适宜的。低频率高强度超声波对细胞所产生的生物效应主要是超声波的空化效应和力学效应。力学效应^[3]是指细胞在声场中瞬间内(如 1 s 内)将受到将近 100 万次从正 2.4 atm 到负 2.4 atm 声压的来回振动 ,另外还要受到辐射压力、辐射扭力及声流和微声流的影响 ,细胞或组织结构在这样剧烈变化的环境中 ,不免使其状态、功能及生理过程受到严重损坏 ,这有利于癌栓的溶解粉碎 ,同时其癌细胞又受到即刻致命的打击 ,起到两全齐美的功效。另一方面 ,空化效应本身也可产生微声流促使细胞溶解 ,而且还可产生 H 和 OH 等自由基 ,导致细胞受到更严重的损伤^[6]。

处在不同周期中的细胞对超声波照射具有不同的敏感性。在本实验中 ,我们发现 ,随着超声剂量的加大 ,S 期细胞的比例下降 ,而 G₂ + M 期细胞增多 ,这说明这时细胞 DNA 合成已受到抑制。G₂ + M 期出现了延搁 ,这种延搁在消融后 12 h 最明显 ,24 h 达顶峰。这一结果类似于肿瘤的放射线照射治疗^[7] ,说明超声消融也有某种放射线作用效应。而 G₂ 期细胞据认为对放射线具有高度的放射敏感性 ,同时选择针对 G₂ 期细胞的放疗或化疗 ,是结合超声消融术一种有效的综合治疗模式 ,这种模式有待今后更进一步地深入研究。

参考文献

1 程树群 ,吴孟超 ,崔贞福 ,等. 超声消融术治疗肝癌门静脉癌栓的实验研究. 中华普通外科杂志 2000 ,15 :24 - 26.

2 程树群 ,吴孟超 ,陈 汉 ,等. 超声消融术结合化疗对肝癌细胞的杀伤作用研究. 中华肝胆外科杂志 ,1999 ,5 :20 - 23.

3 冯 若 ,汪荫荣. 超声治疗学. 中国医药科技出版社 ,1994. 38.

4 Liebeskind D ,Padawer J ,Wolley R ,et al. Diagnostic ultrasound : time - lapse and transmission electron microscopic studies of cells insonated in vitro. Br J Cancer ,1982 ,45(5) :176 - 186.

5 Russo P ,Mies C ,Huryk R ,et al. Histopathologic and ultrastructural correlates of tumor growth suppression by high energy shock waves. J Urol ,1987 ,137 :338 - 341.

6 Siegel RJ ,DonMichael TA ,Fishbein MC ,et al. In vivo ultrasound arterial recanalization of atherosclerotic total occlusions. J Am Coll Cardiol ,1990 ,15 :345 - 348.

7 曹世龙 ,姚伟强 ,于尔幸 ,等. 照射后裸鼠人体肝癌细胞在细胞周期中进展的变化. 中华肿瘤杂志 ,1990 ,12 :12 - 13.