

原卟啉 IX-声动力学疗法诱导 S180 肿瘤细胞的凋亡*

刘全宏** 王筱冰 王攀 张坤 汤薇 米娜 郝巧

陕西师范大学生命科学院, 西安 710062

摘要 采用频率为 2.2 MHz, 声强为 3 W/cm² 的低强度聚焦超声结合原卟啉 IX 对 S180 肿瘤细胞的损伤以及诱导细胞凋亡的发生进行研究, 并探讨其作用的分子机制。超声激活原卟啉 IX 作用于 S180 肿瘤细胞处理后, 不同时间段取材, 通过 Annexin V-PI 荧光双染观察凋亡细胞的形态学变化; 采用 TUNEL 末端标记法检测细胞凋亡的发生率; 利用间接免疫荧光技术和免疫细胞化学技术检测细胞内凋亡相关蛋白 Caspase-8、Caspase-3 以及死亡底物聚 ADP 核糖聚合酶 [poly (ADP-ribose) polymerase, PARP] 的表达活性变化。实验结果显示: 超声激活原卟啉 IX 可以诱导 S180 肿瘤细胞凋亡的发生, 并且凋亡细胞的比例随着取材时间的延迟明显增加; 免疫细胞化学染色表明声动力学处理显著增强了细胞内 Caspase-8 和 Caspase-3 的蛋白表达活性, 并且其活化程度分别于处理后 1 h 和 3 h 达到最高, 而死亡底物 PARP 也发生时间相关性剪切。研究表明, 超声结合原卟啉 IX 可以通过诱导细胞凋亡的方式发挥其抗肿瘤活性, 其作用的分子机制可能涉及到膜受体介导的 Caspase-8、Caspase-3 以及 PARP 依赖性的凋亡信号调节通路 [动物学报 53 (2): 303–314, 2007]。

关键词 聚焦超声 原卟啉 IX S180 细胞凋亡

Apoptosis on S180 tumor cells induced by ultrasonically-activated protoporphyrin IX *

LIU Quan-Hong**, WANG Xiao-Bing, WANG Pan, ZHANG Kun, TANG Wei, MI Na, HAO Qiao

College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, Shaanxi, China

Abstract The effects of protoporphyrin IX (ppIX) combined with focused ultrasound on cellular death (apoptosis) in S180 tumour cells were studied, and the mechanism responsible for induction of apoptosis was evaluated. An annexin V-PI apoptosis detecting kit was used to identify morphological changes in S180 cells at various times after treatment. The extent of apoptosis was analysed by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-digoxin nick and labeling (TUNEL) staining. Expression of apoptosis-related proteins (Caspase-3, Caspase-8 and poly ADP-ribose polymerase (PARP)) was determined by immunohistochemistry. Results indicated that apoptosis in S180 tumour cells can be induced by ultrasonically-activated protoporphyrin IX, and that the rate of apoptosis increased gradually over time, post-treatment. Activation of Caspase-8 and Caspase-3 were upregulated during apoptosis and PARP was cleaved to its active segment, in a time-dependent manner. These results indicate that sonochemically activated protoporphyrin IX may exert its anti-tumour activity by triggering apoptosis in S180 cells. The probable mechanism underlying this effect involves expression of Caspase-8, Caspase-3, and PARP cleaving actions, which are dependent upon membrane receptor activating pathways [Acta Zoologica Sinica 53 (2): 303–314, 2007].

Key words Focused ultrasound, Protoporphyrin IX, S180, Cell apoptosis

声动力学疗法 (Sonodynamic therapy, SDT) 是 建立在超声和一种化学物质 (声敏剂) 联合效应的

2006-09-07 收稿, 2006-11-26 接受

* 国家自然科学基金资助项目和陕西师范大学优秀博士论文资助项目 [This research was funded by the grants from the National Natural Science Foundation of China (No.39870240, 30270383) and the Excellent Doctor Project of Shaanxi Normal University]

** 通讯作者 (Corresponding author). E-mail: lshaof@snnu.edu.cn

© 2007 动物学报 Acta Zoologica Sinica

基础上, 通过将超声聚焦于肿瘤的特定位点, 化学激活与肿瘤具有亲和性的声敏剂分子, 产生活性氧自由基, 从而有针对性地杀伤肿瘤细胞 (Yumita et al., 1990)。由于声敏剂在肿瘤细胞中的特异性富集以及超声波照射的选择性聚焦 (Umemura et al., 1989, 2004; Feril et al., 2002), 并且对周围正常组织损伤较小, 因此, 声动力疗法的抗肿瘤效应应具有好的应用前景 (Yu et al., 2004; Rosenthal et al., 2004)。

目前, 声动力学疗法研究中涉及到的声敏剂已有多种, 包括卟啉类化合物 (Yumita and Umemura, 2004)、抗癌药物 (Mohamed et al., 2003)、抗炎症药物等 (Okada et al., 2002), 其中卟啉类化合物的应用最为广泛。原卟啉 IX (Protoporphyrin IX, PP IX) 是血卟啉衍生物 (Hematoporphyrin derivatives, HpD) 的一种有效成分, 是血红蛋白合成的前体。PP IX 在生物体内的合成起始于 δ -氨基乙酰丙酸 (5-Aminolevulinic acid, 5-ALA), 经过胞内一系列酶的作用, 最后在线粒体上生成 PP IX, 原卟啉 IX 与亚铁离子在亚铁螯合酶的作用下生成血红素。通常情况下, 肿瘤细胞中亚铁螯合酶的活性都比较低, 若体外加入一定量的 5-ALA 就会造成内源性 PP IX 在线粒体上的聚集 (Klinterberg et al., 1999; Ninomiya et al., 2001)。基于 5-ALA 产生内源性 PP IX 的光动力学疗法早已有其应用于临床的报道 (Brun and Sandberg, 1991), 但 PP IX 在声动力学疗法抗肿瘤研究方面还处于初级阶段。Umemura et al. (1996) 曾报道同等实验条件下超声结合外源性 PP IX 比血卟啉更能增强对 S180 实体瘤细胞的破坏以及对在体肿瘤的生长抑制作用。Kinoshita and Hynynen (2006) 比较了外源性 PP IX 和内源性 PP IX 在 SDT 抗肿瘤方面的作用效应, 结果表明了外源性 PP IX 可能比内源性 PP IX 更利于对细胞产生毒性作用。同时 PP IX 在正常细胞内代谢快, 避光时间短 (Brun and Sandberg, 1991), 因此在 SDT 抗肿瘤的研究中可作为一种良好的声敏剂。我们在超声结合血卟啉的研究中发现 SDT 可以通过直接杀伤和诱导细胞凋亡两种模式产生抗肿瘤效应 (Liu et al., 2003; 刘全宏等, 2003, 2005)。本研究在前期研究的基础上 (Liu et al., 2006), 以 PP IX 作为声敏剂, 筛选最佳的声照处理参数作用于 S180 肿瘤细胞, 处理后不同时间段取材, 通过 Annexin V-PI 荧光双染法观察处理后凋亡细胞的形态学变化, TUNEL 末端标记检测细胞凋亡的发生率, 利用间接免疫荧光技

术和免疫细胞化学技术检测细胞内凋亡相关蛋白 Caspase-8、Caspase-3 及其作用底物 PARP 的表达活性变化, 初步研究超声激活原卟啉 IX 诱导 S180 肿瘤细胞凋亡的发生, 并探讨其作用的分子机制, 为 SDT 抗肿瘤研究提供新的理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 原卟啉 IX 钠盐由 Sigma 公司提供, 用 0.01 mol/L PBS (pH=7.2-7.4) 避光溶解, 过滤除菌, 4℃ 避光保存。研究用抗体及试剂盒主要包括: Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒 (北京宝赛生物技术有限公司), 原位细胞凋亡检测试剂盒 TUNEL (POD) (美国罗氏公司), Caspase-8 和 Caspase-3 兔多克隆抗体 (Sigma 公司), Cleaved PARP 鼠单克隆抗体 (Cell Signaling 公司), FITC 标记山羊抗兔 IgG (Santa Cruz 公司), 过氧化物酶标记的链霉卵白素 (SP) 免疫组化试剂盒 (北京中山生物技术公司), 其它所用试剂均为分析纯。

1.1.2 实验动物及细胞 S180 小鼠腹水瘤细胞系由中国医学科学院药物研究所引进, 陕西省中医药研究院实验动物中心提供。实验用 ICR 系小白鼠 (雌性, 体重 18-22 g) 也由陕西省中医药研究院实验动物中心提供。

1.1.3 超声装置与仪器 实验装置的功率放大器 (AG-1020) 为美国 T&C 公司产品, 超声换能器由陕西师范大学应用声学研究所研制。照射用试管为医用一次性薄壁采血管, 经测试不影响声透率。实验用超声介质为预冷的静置除汽蒸馏水, 避免声照处理过程中热效应的产生。

1.2 方法

接种 S180 肿瘤细胞于 ICR 系健康小白鼠腹腔一周左右, 收集腹水肿瘤细胞, 重悬于 0.01 mol/L PBS (pH=7.2-7.4), 调节细胞密度为 10^6 cells/ml, 分装于一次性医用采血管中 (0.5 ml/管)。将各管细胞随机分为对照组 (CT), 原卟啉 IX 组 (P), 超声组 (U), 超声结合原卟啉 IX 组 (UP)。其中 P 组和 UP 组每管分别加入一定量的原卟啉 IX 溶液, 使得终浓度为 120 μ mol/L, CT 组和 U 组则加入等量的 PBS, 37℃ 避光孵育 30 min, 然后 U 组和 UP 组在频率为 2.2 MHz, 强度为 3 W/cm² 的超声装置中声照处理 30 s。处理完毕后, 将 P 组和 UP 组细胞悬液中药物用 PBS 漂洗 3 次 (1 000 r/min), 然后各组细胞重悬于 RPMI1640 (10% 胎牛血清) 中, 37℃

孵育箱中继续避光培养, 分别于 0、1、3、5 h 取材, 进行后续实验处理。整个过程在红光下操作, 以避免日光对原卟啉 IX 的激发, 实验最低重复 3 次, 以确认结果的可靠性。

1.2.1 Annexin V-PI 荧光双染观察 处理后不同时间段取材, 按照试剂盒说明书操作步骤进行: 离心收集细胞, PBS 洗涤后, 调节细胞浓度为 1×10^6 cells/ml, 4℃ 离心 5 min (1 000 r/min), 弃上清, 加入 Annexin V-PI 染液, 混匀, 避光 4℃ 反应 30 min, 离心后取细胞沉淀涂片, Nikon 荧光显微镜下观察并通过显微数码成像系统进行图像采集和分析。

1.2.2 TUNEL 末端标记法检测细胞凋亡的发生率 原位末端标记 DNA 片断检测细胞凋亡, 具体实验方法严格按照试剂盒说明书操作, 分别设立阴性对照和阳性对照, 待反应完毕后, 加新鲜配制的 DAB 染液显色, 水洗, 常规梯度酒精脱水, 中性树胶封片。光学显微镜下随机选取 10 个高倍视野, 计数阳性细胞 (镜下细胞核呈棕黄色) 数和阴性细胞数, 并计算细胞凋亡发生率 [细胞凋亡率 = 阳性细胞数 / (阳性细胞数 + 阴性细胞数) $\times 100\%$]。

1.2.3 间接免疫荧光技术检测细胞内 Caspase-8、Caspase-3 蛋白表达活性变化 各实验组分别于超声处理后 0、1、3、5 h 取材, 常规细胞涂片, 4% 多聚甲醛 4℃ 固定 10 min, PBS 漂洗; 0.1% triton X-100 (0.01 mol/L PBS, pH = 7.2 - 7.4) 冰浴处理 5 min, 以增加细胞膜通透性, PBS 漂洗; 正常山羊血清 37℃ 封闭 1 h, 封闭非特异性结合位点; 分别滴加 Caspase-8 (1:500) 和 Caspase-3 (1:500) 兔多克隆抗体, 4℃ 孵育过夜, 阴性对照以 0.01 mol/L PBS 替代一抗; 加入 FITC 标记的羊抗兔 IgG (1:200), 37℃ 避光孵育 30 min, PBS 漂洗 3 次, 蒸馏水洗 1 次, 晾干, 甘油 - 碳酸钠缓冲液封片。

各组随机选取 10 个高倍视野, 利用荧光数码显微成像系统进行图像采集和分析, Image Pro-Plus5.0 图像分析软件测定各组照片的平均荧光强度值。

1.2.4 免疫细胞化学方法检测细胞内 PARP 的降解情况 各实验组分别于声照处理后不同时间段取材, 常规细胞涂片, 4% 多聚甲醛常温固定 10 min, PBS 漂洗; 0.3% H_2O_2 -甲醇常温下处理 45 min, 封闭内源性过氧化物酶, PBS 漂洗; 正常山羊血清于 37℃ 封闭 1 h, 封闭非特异性结合位点; 滴加 Cleaved-PARP (7C9) 鼠单克隆抗体 (1:400), 阴性

对照以 0.01 mol/L PBS 取代一抗, 4℃ 孵育过夜; 加入的二抗为生物素标记羊抗鼠 IgG, 37℃ 孵育 45 min, PBS 漂洗; 滴加辣根过氧化物酶标记的链酶卵白素工作液, 37℃ 孵育 45 min, PBS 漂洗, DAB 显色, 梯度酒精脱水, 中性树胶封片。

各组随机选取 10 个高倍视野, 利用显微数码成像系统进行图像采集和分析, 采用 Image Pro-Plus5.0 图像分析软件测定各组照片的平均光密度值。

1.2.5 统计学处理 利用 EXCEL 软件对实验数据进行单因素方差分析, 结果用 Mean \pm SD 表示, 采用 *t* 检验分析组间差异的显著性。

2 结果

2.1 Annexin V-PI 荧光双染结果观察

根据 Annexin V-PI 双荧光染色检测细胞凋亡的原理, 正常细胞不着色, 早期凋亡细胞呈单纯绿色荧光, 晚期凋亡细胞呈红色和绿色荧光, 而死细胞呈红色荧光。研究发现: CT 组和 P 组细胞几乎不着色, 偶尔有个别呈淡绿色荧光 (图版 I: 1), U 组和 UP 组对细胞的损伤随取材时间的延迟而逐渐加深, 表现在细胞染色数目增多和荧光着色强度增强, 并且同时间取材的 UP 组细胞凋亡比例显著高于 U 组。处理后即时取材的 U 组仅个别细胞染色 (图版 I: 2), UP 组可见部分细胞膜染成亮绿色荧光, 表现为早期凋亡细胞的特征 (图版 I: 3); 1 h 和 3 h 取材时, U 组细胞着色数目稍有增多, 红色荧光增强 (图版 I: 4、6), UP 组绿色荧光染色增多增强, 部分细胞核染成红色, 同时个别细胞膜起泡 (图版 I: 5、7); 5 h 取材时, U 组少量细胞绿色荧光变淡, 红色荧光逐渐加强 (图版 I: 8), UP 组细胞着色数目进一步增多, 部分细胞核呈强红色荧光, 部分细胞有形变, 呈现典型的凋亡晚期特征 (图版 I: 9)。

2.2 TUNEL 末端标记检测细胞凋亡的发生率

TUNEL 末端标记可在单个细胞水平上检测凋亡细胞, 并且该方法灵敏度高、简单快速, 凋亡细胞经 TUNEL 染色后核呈棕黄色。不同处理组的细胞凋亡率随时间的变化如图 1 所示, CT 组和 P 组肿瘤细胞凋亡率很低 (图版 II: 1), 并且随时间延迟无明显变化。而超声结合原卟啉 IX 作用于 S180 肿瘤细胞处理后, 细胞凋亡的数目随着取材时间的延迟明显增加 (图版 II: 3、5、7、9), 并且同一时间段取材时均显著大于单纯超声组 (图版 II: 2、

4、6、8) (0 h: 14.82% ± 4.67% vs 10.67% ± 3.32%, *P* < 0.05; 1 h: 21.20% ± 5.36% vs 15.73% ± 5.45%, *P* < 0.05; 3 h: 27.24% ± 6.52% vs 17.72% ± 4.92%, *P* < 0.01; 5 h: 33.52% ± 6.99% vs 24.77% ± 4.25%, *P* < 0.01)。

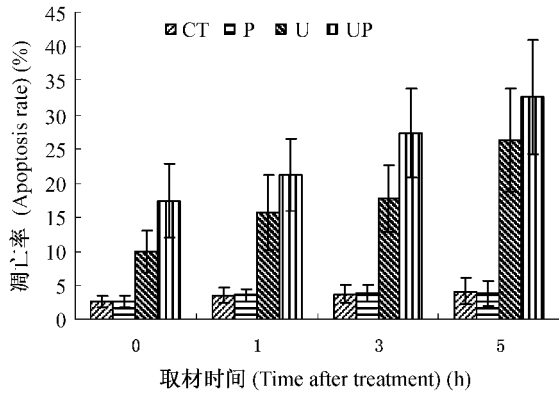


图1 不同处理组细胞凋亡率随时间变化

CT: 未处理组细胞。P: 单独原卟啉IX处理组。U: 单独超声处理组。UP: 超声结合原卟啉IX处理组。

Fig.1 Changes of apoptosis rate in four groups at different times after treatment

CT: control group with untreated intact cells. P: cells with 120 μmol/L PP IX alone. U: cells irradiated with ultrasound alone. UP: cells irradiated with ultrasound in the presence of 120 μmol/L PP IX.

2.3 S180 肿瘤细胞内 Caspase-8、Caspase-3 蛋白表达活性变化

根据间接免疫荧光观察和组间差异性的多重比

较结果显示: 处理后0 h取材, CT组(图版Ⅲ: 1; 图版Ⅳ: 1)和P组Caspase-8和Caspase-3的蛋白表达活性比较微弱, 而U组和UP组两种Caspase蛋白活性均明显上升(图版Ⅲ: 2、3; 图版Ⅳ: 2、3), 且UP组高于U组, 差异极显著(*P* < 0.01); 1 h取材时, 处理组(U和UP组)细胞内Caspase-8的平均荧光强度值较0 h有大幅度上升, 达到其活化过程的最高峰(图版Ⅲ: 4、5), 而Caspase-3的蛋白表达活性呈稳定上升趋势(图版Ⅳ: 4、5); 3 h取材时, 处理组细胞内Caspase-8的蛋白表达活性逐渐下降(图版Ⅲ: 6、7), 并且U组比UP组的下降幅度更快, 而Caspase-3的活化程度不断升高(图版Ⅳ: 6、7), UP组的平均荧光强度值达到最大, 并且极显著高于U组(*P* < 0.01); 5 h取材时, 各处理组细胞内Caspase-8和Caspase-3的活性水平均有不同程度的下降, 但此时UP组细胞内两种蛋白均还保持较高的活性(图版Ⅲ: 8、9; 图版Ⅳ: 8、9), 与U组相比差异极显著(*P* < 0.01)(表1)。同时两种Caspase蛋白表达活性的时滞效应分析结果也表明, CT组和P组的蛋白表达活性较低, 且随取材时间延迟无明显变化; 而U和UP处理组显著增强了Caspase-8和Caspase-3的蛋白表达活性, 其平均荧光强度值随时间变化均表现出先增加后下降的趋势(图2, 图3), 并且同一时间点的UP组平均荧光强度值均极显著高于其它三个实验组(平均荧光强度值表示阳性细胞蛋白表达活性

表1 各处理组不同时间段取材细胞内 Caspase-8、Caspase-3 平均荧光强度值变化

Table 1 Changes of means of fluorescence intensity of Caspase-8 and Caspase-3 at different time after treatment

组别 Groups	时间 Time	Time			
		0 h	1 h	3 h	5 h
Caspase-8	UP	70.00 ± 1.49 ^{***+△△}	86.62 ± 1.96 ^{***+△△}	75.52 ± 1.90 ^{***+△△}	73.84 ± 0.79 ^{***+△△}
	U	49.88 ± 2.60 [△]	66.03 ± 2.00 ^{++△△}	54.16 ± 2.52	50.01 ± 1.56
	P	47.41 ± 2.73	50.83 ± 0.49	50.84 ± 0.65	50.50 ± 0.26
	CT	42.06 ± 0.79	48.20 ± 1.24	49.10 ± 0.55	47.62 ± 3.10
Caspase-3	UP	44.96 ± 2.51 ^{***+△△}	47.48 ± 4.65 ^{***+△△}	58.88 ± 4.79 ^{***+△△}	56.33 ± 3.35 ^{***+△△}
	U	40.71 ± 2.87 ^{++△}	41.26 ± 2.93 ^{++△}	43.04 ± 1.16 ^{++△△}	41.15 ± 2.24 ^{++△△}
	P	36.15 ± 2.60	37.06 ± 1.87	37.85 ± 1.38	37.85 ± 2.17
	CT	37.65 ± 0.67	37.22 ± 1.90	36.16 ± 1.64	36.51 ± 2.07

与U相比: * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01; 与P相比: + *P* < 0.05, ++ *P* < 0.01; 与CT相比: △ *P* < 0.05, △△ *P* < 0.01。

CT: 未处理组细胞。P: 单独原卟啉IX处理组。U: 单独超声处理组。UP: 超声结合原卟啉IX处理组。

* *P* < 0.05, ** *P* < 0.01 compared with U group; + *P* < 0.05, ++ *P* < 0.01 compared with P group; △ *P* < 0.05, △△ *P* < 0.01 compared with CT group.

CT: Control group with untreated intact cells. P: Cells with 120 μmol/L PP IX alone. U: Cells irradiated with ultrasound alone. UP: Cells irradiated with ultrasound in the presence of 120 μmol/L PP IX.

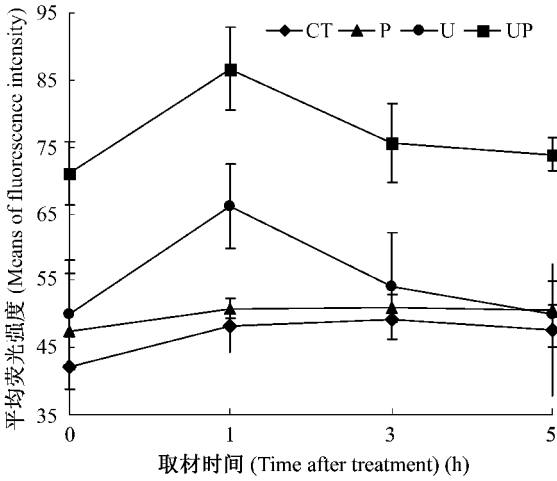


图 2 不同时间段取材各组细胞内 Caspase-8 蛋白的平均荧光强度值变化

CT: 未处理组细胞。P: 单独原卟啉Ⅸ处理组。U: 单独超声处理组。UP: 超声结合原卟啉Ⅸ处理组。

Fig.2 Changes in means of fluorescence intensity of Caspase-8 in four groups at different time after treatment

CT: control group with untreated intact cells. P: cells with 120 μmol/L PPⅨ alone. U: cells irradiated with ultrasound alone. UP: cells irradiated with ultrasound in the presence of 120 μmol/L PPⅨ.

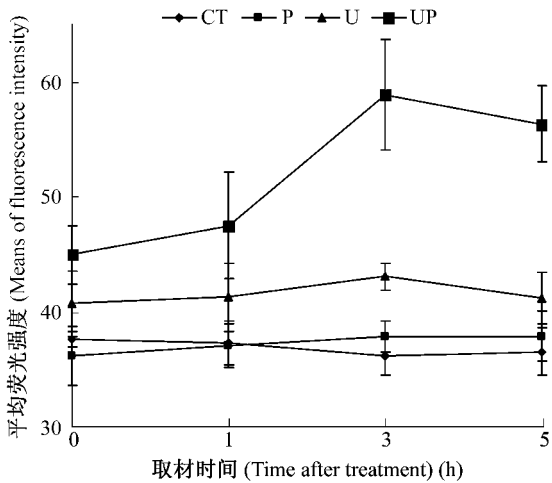


图 3 不同时间段取材各组细胞内 Caspase-3 蛋白的平均荧光强度值变化

CT: 未处理组细胞。P: 单独原卟啉Ⅸ处理组。U: 单独超声处理组。UP: 超声结合原卟啉Ⅸ处理组。

Fig.3 Changes in means of fluorescence intensity of Caspase-3 in four groups at different time after treatment

CT: control group with untreated intact cells. P: cells with 120 μmol/L PPⅨ alone. U: cells irradiated with ultrasound alone. UP: cells irradiated with ultrasound in the presence of 120 μmol/L PPⅨ.

水平，平均荧光强度值越大则表达信号越强)。

2.4 不同处理后细胞内 PARP 降解片段的检测

采用 Image Pro-Plus5.0 图像分析软件对各组细胞的 Cleaved PARP 蛋白 (89 kD) 的平均光密度值进行分析测定。超声结合原卟啉Ⅸ处理后，细胞内死亡底物 PARP 的降解情况随时间变化的曲线见图 4，CT 组和 P 组细胞内 PARP 均保持完整的酶活性，随取材时间无显著性变化；U 组和 UP 组细胞内的 PARP 降解片断随时间延迟表现出先增加后稍有下降的趋势。平均光密度值表示阳性细胞蛋白表达活性水平，平均光密度值越大则表达信号越强。0 h 取材时，U 和 UP 组 (图版 V: 2、3) 细胞内 Cleaved PARP 的平均光密度值较 CT 组 (图版 V: 1) 均明显升高 (P < 0.05, P < 0.01)，但二者之间差异不显著 (P > 0.05)；1 h 时，处理组 (U 组和 UP 组) 细胞内 PARP 的活化程度达到最高 (图版 V: 4、5)，并且 UP 组平均光密度值极显著大于 U 组 (P < 0.01)；3 h 和 5 h 取材时，处理组细胞内 Cleaved PARP 蛋白的平均光密度值随时间变化下降趋势非常稳定 (图版 V: 6-9)，5 h 时 UP 组仍可检测到大量的 89 kD 的 PARP 片断，且与 U 组相比差异显著 (P < 0.05) (表 2)。

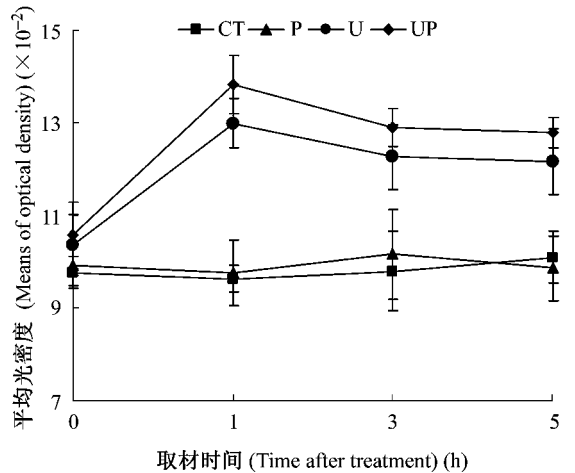


图 4 不同时间段取材各组细胞内 Cleaved PARP 蛋白的平均光密度值变化

CT: 未处理组细胞。P: 单独原卟啉Ⅸ处理组。U: 单独超声处理组。UP: 超声结合原卟啉Ⅸ处理组。

Fig.4 Changes in means of optical density of Cleaved PARP in four groups at different time after treatment

CT: control group with untreated intact cells. P: cells with 120 μmol/L PPⅨ alone. U: cells irradiated with ultrasound alone. UP: cells irradiated with ultrasound in the presence of 120 μmol/L PPⅨ.

表 2 不同时间段取材细胞内 Cleaved PARP 平均光密度值变化 ($\times 10^{-2}$)Table 2 Changes of means optical density ($\times 10^{-2}$) of Cleaved PARP at different time after treatment

组别 Groups		时间 Time			
		0 h	1 h	3 h	5 h
Cleaved PARP	UP	10.57 \pm 0.72 ^{+△△}	13.83 \pm 0.62 ^{**+++△△}	12.91 \pm 0.41 ^{*+++△△}	12.79 \pm 0.33 ^{**+++△△}
	U	10.36 \pm 0.66 [△]	12.99 \pm 0.53 ^{+++△△}	12.26 \pm 0.69 ^{+++△△}	12.16 \pm 0.71 ^{+++△△}
	P	9.92 \pm 0.42	9.75 \pm 0.70	10.16 \pm 0.97	9.86 \pm 0.70
	CT	9.77 \pm 0.44	9.63 \pm 0.29	9.80 \pm 0.87	10.10 \pm 0.56

与 U 相比: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 P 相比: + $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$; 与 CT 相比: △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$ 。

CT: 未处理组细胞。P: 单独原卟啉 IX 处理组。U: 单独超声处理组。UP: 超声结合原卟啉 IX 处理组。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with U group; + $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$ compared with P group; △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$ compared with CT group.

CT: Control group with untreated intact cells. P: Cells with 120 $\mu\text{mol/L}$ PPIX alone. U: Cells irradiated with ultrasound alone. UP: Cells irradiated with ultrasound in the presence of 120 $\mu\text{mol/L}$ PPIX.

3 讨论

近年来, 有研究表明超声的生物学效应可以诱导肿瘤细胞凋亡的发生。Lagueaux et al. (2002) 提出单纯低频超声处理可以引起人白血病细胞系 (k562、HL-60、K562、Nalm-60) 的凋亡, 并从蛋白分子水平检测到其凋亡的发生与细胞内活性氧含量相关。Firestein et al. (2003) 报道了超声对人恶性淋巴瘤细胞的凋亡机制依赖于线粒体途径的 Caspase 活化通路, 并且呈时间相关性变化。国内有学者研究了聚焦超声引发的卵巢癌细胞株 COC1 细胞凋亡与 Bcl-2/bax 基因表达相关 (杨志宏等, 2004)。而在超声的声动力学疗法研究中, 作者从形态学和细胞化学等方面证实了超声激活血卟啉可诱导艾氏腹水肿瘤细胞凋亡的发生, 并提出 SDT 有促进细胞死亡和诱导细胞凋亡两种模式的现象 (Liu et al., 2003), 在 2005 年又发现声化学诱导艾氏腹水瘤细胞凋亡的机制可能依赖于线粒体途径 (刘全宏等, 2005)。鉴于原卟啉 IX 与血卟啉的生物学特性不同以及它们在细胞内的分布代谢不同, 其杀伤和诱导肿瘤细胞凋亡的作用机制亦有所不同。前期报道血卟啉主要分布在胞浆, 经超声处理诱导细胞凋亡的发生可能依赖于线粒体途径。而本研究采用外源性原卟啉 IX 作为声敏剂, 初步探讨了原卟啉 IX 应用到声动力学疗法的研究中是否能够诱导细胞凋亡的发生以及膜受体介导的信号途径是否参与了 PPIX-SDT 诱导的细胞凋亡过程。

本研究在前期实验的基础上筛选了超声激活原卟啉 IX 作用于 S180 肿瘤细胞的最佳处理参数, 声照后不同时间段取材, 通过 Annexin V-PI 荧光双染的形态学观察和 TUNEL 的 DNA 片段化分析, 初步

推断 PPIX-SDT 具有诱导 S180 肿瘤细胞凋亡的发生。Annexin V-PI 双荧光标记发现: 超声结合原卟啉 IX 处理后, 取材时间的不同对细胞凋亡的影响不同, 0 h 取材即可检测到早期细胞凋亡的发生, 1 h 和 3 h 时细胞凋亡数目逐渐增多, 同时部分细胞出现大量的膜起泡现象, 5 h 时部分细胞核呈强红色荧光, 细胞形态发生改变, 表现出明显的凋亡晚期特征; 而同一时间段取材的单纯超声处理组, 细胞凋亡数目相对较少。TUNEL 检测反映了不同处理组的细胞凋亡率随时间的变化趋势, 表明了超声激活原卟啉 IX 诱导 S180 肿瘤细胞的凋亡具有时间依赖性。而免疫细胞化学染色证实的声动力学处理后细胞内 Caspase-8、Caspase-3 酶原的活化以及死亡底物 PARP 的降解情况, 又为探讨 PPIX-SDT 诱导细胞凋亡的作用机制提供了实验证据。本研究采用的活性抗体, 只识别被剪切后活化的 Caspase 亚基和 Cleaved PARP 片断 (89 kD), 不识别全长酶原和非活性亚基, 使得检测具有特异性和准确性。实验结果显示超声结合原卟啉 IX 处理显著增强了 Caspase-8、Caspase-3 的蛋白表达活性, 而且其下游的作用底物 PARP 也呈现时间依赖性降解, 说明 PPIX-SDT 诱导 S180 肿瘤细胞的凋亡可能与 Caspase 和 PARP 参与的信号通路相关。

Caspase-3 作为 Caspase 级联反应的执行者, 位于细胞凋亡的下游, 其经典的调控途径主要有膜表面的死亡受体途径和线粒体引发的途径。在死亡受体途径中, 凋亡信号启动后, 通过膜受体系统诱导 Caspase-8 酶原自身激活, 活化的 Caspase-8 裂解下游的 Caspase-3 启动 Caspase 级联反应, 从而引发细胞凋亡 (Martin et al., 1998)。本实验结果表明超声激活原卟啉 IX 处理后 0 h 取材时 S180 肿瘤细胞内

Caspase-8 和 Caspase-3 的蛋白表达活性明显增强, 然后分别于 1 h 和 3 h 使其蛋白活化程度达到最高。由此推测 PP IX-SDT 可能通过膜受体通路首先活化细胞凋亡启动子 Caspase-8, 形成死亡诱导信号复合体之后再通过 Caspase 级联放大反应激活下游凋亡效应子 Caspase-3, 从而导致细胞凋亡的发生, 而 Caspase-3 又裂解其作用底物 PARP, 破坏相关结构功能体系, 从而完成细胞凋亡。

PARP 是一种非组蛋白染色体蛋白质, 在维持 DNA 完整性和稳定性方面有重要作用, 其催化活性主要依赖于 DNA 链的断裂, 在 DNA 损伤部位起着分子感受器的作用。当细胞发生凋亡、DNA 遭到损伤时, 必然会激活 PARP 对 DNA 进行损伤修复的信号传导, 干扰凋亡的发生。然而机体本身存在一种拮抗机制, PARP 的激活又必然会激发 Caspase 或通过其它蛋白酶导致其灭活水解, 以确保凋亡的顺利进行 (Li and Darzynkiewicz, 2000; Soldatenkov and Smulson, 2000)。PARP 的蛋白酶解被认为是细胞凋亡过程中的一个早期分子标志, 在非常早期的凋亡细胞中, 即细胞膜仍然完整和其它大的蛋白质分子仍未降解时, PARP 即可被特异性裂解为分子量为 89 kD 和 24 kD 的两个片段, 所以 PARP 片段可作为细胞凋亡早期既简单又敏感的检测指标。有实验证实若检测到 89 kD 的 PARP 片断就预示 Caspase-3 的活化, Caspase-3 裂解 PARP 是细胞凋亡的重要特征之一 (Duriez and Shah, 1997)。本实验采用 Cleaved PARP 单克隆抗体特异性识别 89 kD 的 PARP 片断, 同时也作为细胞凋亡早期的一个验证性指标。研究结果表明在超声激活原卟啉 IX 处理后 0 h 即可检测到 89 kD 的 PARP 片断, 处理后 1 h 细胞核内阳性染色颗粒显著性增强, 之后下降趋势特别缓慢, 这可能与文献报道细胞凋亡早期 PARP 被裂解后, 其片断可短暂地留在细胞核内, 并保存一定的活性, 但不参与 DNA 的修复具有相关性 (Barinaga, 1998)。

本研究从形态学观察、生化检测、凋亡相关蛋白活性检测等方面, 证明了超声激活原卟啉 IX 可通过诱导 S180 细胞凋亡的方式发挥其抗肿瘤活性, 同时还表现出一定的时间依赖性效应, 并初步阐明膜受体介导的信号途径参与了 PP IX-SDT 诱导的细胞凋亡过程, 但其详细的分子机制还有待进一步研究。

参考文献 (References)

AF Klinteberg C, Enejder AM, Wang I, Andersson-Engels S, Svanberg S,

- Svanberg K, 1999. Kinetic fluorescence studies of 5-aminolaevulinic acid-induced protoporphyrin IX accumulation in basal cell carcinomas. *J. Photochem. Photobiol. B* 49 (2-3): 120-128.
- Barinaga M, 1998. Death by dozens of cuts. *Science* 280 (5360): 32-34.
- Brun A, Sandberg S, 1991. Mechanisms of photosensitivity in porphyric patients with special emphasis on erythropoietic protoporphyria. *J. Photochem. Photobiol. B* 110 (4): 285-302.
- Duriez PJ, Shah GM, 1997. Cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase: a sensitive parameter to study cell death. *Biochem. Cell Biol.* 75 (4): 337-349.
- Feril LB, Kondo T, Umemura S, Tachibana K, Manalo AH, 2002. Sound waves and antineoplastic drugs: the possibility of an enhanced combined anticancer therapy. *J. Med. Ultrasonics* 29: 173-187.
- Firestein F, Rozenszajn LA, Shemesh-Darvish L, Elimelech R, Radnay J, Rosenschein U, 2003. Part III. Mitochondria as regulators of apoptosis: induction of apoptosis by ultrasound application in human malignant lymphoid cells: role of mitochondria-caspase pathway activation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1010: 163-166.
- Kinoshita M, Hynynen K, 2006. Mechanism of porphyrin-induced sonodynamic effect: possible role of hyperthermia. *Radiation Research* 165: 299-306.
- Lagneaux L, De-Meulenaer EC, Delforge A, Dejeneffe M, Massy M, Moerman C, Hannecart B, Canivet Y, Lepeltier MF, Bron D, 2002. Ultrasonic low-energy treatment: a novel approach to induce apoptosis in human leukemic cells. *Exp. Hematol.* 30 (11): 1293-1301.
- Li X, Darzynkiewicz Z, 2000. Cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase measured in situ in individual cells: relationship to DNA fragmentation and cell cycle position during apoptosis. *Exp. Cell Res.* 255 (1): 125-132.
- Liu QH, Sun SH, Xiao YP, Qi H, Shang ZY, Zhang JP, Zhang JX, Ren YH, Li M, Li Q, 2003. Study of cell killing on S180 by different intensity ultrasound activate hematoporphyrin derivatives. *Science in China (Series C)* 46 (3): 253-262.
- Liu QH, Wang P, Li M, Qi H, Shang ZY, Ren YH, Zhang K, Yao X, 2003. Apoptosis of Ehrlich ascites tumor cells by sonochemical-activated hematoporphyrin. *Acta Zool. Sinica* 49 (5): 620-628 (In Chinese).
- Liu QH, Liu SY, Qi H, Wang P, Tang W, Zhang K, Dai L, Shi XC, 2005. Preliminary study on the mechanism of apoptosis in Ehrlich ascites tumor cells by sonochemical activated hematoporphyrin. *Acta Zool. Sinica* 51 (6): 1073-1079 (In Chinese).
- Liu QH, Wang XB, Wang P, Qi H, Zhang K, Xiao LN, 2006. Sonodynamic effects of protoporphyrin IX disodium salt on isolated sarcoma 180 cells. *Ultrasonics*, 45 (1-4): 56-60.
- Martin DA, Siegel RM, Zheng LX, Lenardo MJ, 1998. Membrane oligomerization and cleavage activates the Caspase-8 (FLICE/MACH1) death signal. *J. Biol. Chem.* 273: 4345-4349.
- Mohamed MM, Mohamed MA, Fikry NM, 2003. Enhancement of antitumor effects of 5-fluorouracil combined with ultrasound on Ehrlich ascites tumor *in vivo*. *Ultrason. Med. Biol.* 29 (11): 1635-1643.
- Ninomiya Y, Itoh Y, Tajima S, Ishibashi A, 2001. *In vitro* and *in vivo* expression of protoporphyrin IX induced by lipophilic 5-aminolevulinic acid derivatives. *J. Dermatol. Sci.* 27 (2): 114-120.
- Okada K, Itoi E, Miyakoshi N, Nakajima M, Suzuki T, Nishida J, 2002. Enhanced antitumor effect of ultrasound in the presence of piroxicam in a mouse air pouch model. *Jpn. J. Cancer Res.* 93 (2): 216-222.
- Rosenthal L, Sostar JZ, Piesz P, 2004. Sonodynamic therapy-a review of the synergistic effects of drugs and ultrasound. *Ultrasonic Sonochemistry* 11: 349-363.
- Soldatenkov VA, Smulson M, 2000. Poly (ADP-ribose) polymerase in DNA damage-response pathway: implications for radiation oncology. *Int. J. Cancer.* 90 (2): 59-67.
- Umemura S, Yumita N, Nishifaki R, Umemura K, 1989. Sonochemical activation of hematoporphyrin: a potential modality for cancer treatment. *IEEE Ultrasonics Symposium* 9: 955-960.
- Umemura S, Kawabata K, Sugita N, Sasaki K, Yumita N, 2004. Sonodynamic approaches to tumor treatment. *International Congress Series* 1274: 164-168.

- Umemura S, Kawabata K, Sasaki K, Yumit N, Umemura K, Nishigaki R, 1996. Recent advances in sonodynamic approach to cancer therapy. *Ultrasonics Sonochemistry* 3 (3): 187-191.
- Yang ZH, Wang ZB, Hu K, Wang Y, 2004. Effect of pulse focused ultrasound on apoptosis and Bcl-2/bax expression in human ovarian cell line COC1. *Chinese Journal of Medical Physics*. 21 (4): 207-210 (In Chinese).
- Yu T, Wang Z, Mason TJ, 2004. A review of research into the uses of low level ultrasound in cancer therapy. *Ultrason. Sonochem.* 11 (2): 95-103.
- Yumita N, Nishigaki R, Umemura K, Umemura S, 1990. Synergistic effect of ultrasound and hematoporphyrin on sarcoma 180. *Jpn. J. Cancer Res.* 81 (3): 304-308.
- Yumita N, Umemura S, 2004. Sonodynamic antitumour effect of

- chloroaluminum phthalocyanine tetrasulfonate on murine solid tumour. *J. Pharm. Pharmacol.* 56 (1): 85-90
- 刘全宏, 王攀, 李萌, 齐浩, 尚志远, 任耀辉, 张坤, 姚萧, 2003. 声化学激活血卟啉诱导艾氏腹水肿瘤细胞凋亡. *动物学报* 49 (5): 620-628.
- 刘全宏, 刘书媛, 齐浩, 王攀, 汤薇, 张坤, 代乐, 史秀超, 2005. 声化学诱导艾氏腹水瘤细胞凋亡机制初探. *动物学报* 51 (6): 1073-1079.
- 杨志宏, 王智彪, 胡凯, 王媛, 2004. 聚焦超声对卵巢癌细胞株 COC1 细胞凋亡和 Bcl/bax 基因表达的影响. *中国医学物理学杂志* 21 (4): 207-210.

图 版 说 明

图版 I AV-PI 双荧光染色观察

1. 对照组肿瘤细胞, 偶见个别淡绿色荧光。
2. 0 h 取材的单纯超声处理组, 仅个别细胞染色。
3. 0 h 取材的超声结合原卟啉 IX 处理组, 部分细胞膜染成亮绿色荧光。
4. 6. 1 h、3 h 取材的单纯超声处理组, 细胞着色数目稍有增多, 红色荧光增强。
5. 7. 1 h、3 h 取材的超声结合原卟啉 IX 处理组, 细胞绿色荧光染色增多增强, 部分细胞核染成红色, 同时个别细胞膜起泡。
8. 5 h 取材的单纯超声处理组, 细胞绿色荧光变淡, 红色荧光逐渐加强。
9. 5 h 取材的超声结合原卟啉 IX 处理组, 细胞着色数目进一步增多, 部分细胞核呈强红色荧光, 部分细胞有形变。

图版 II TUNEL 法检测不同处理组细胞凋亡率随时间变化

1. 对照组肿瘤细胞凋亡率很低。
- 2、4、6、8. 分别于 0 h、1 h、3 h、5 h 取材的单独超声处理组肿瘤细胞, 细胞凋亡率随取材时间的延迟不断增加。
- 3、5、7、9. 分别于 0 h、1 h、3 h、5 h 取材的超声结合原卟啉 IX 共同处理组肿瘤细胞, 细胞凋亡率随取材时间的延迟明显增加, 并且同一时间段取材时均显著大于单纯超声组。

图版 III 不同处理组 Caspase-8 蛋白的免疫荧光活性染色

1. 对照组肿瘤细胞, Caspase-8 蛋白表达活性微弱。
- 2、4. 0 h、1 h 取材的单独超声处理组肿瘤细胞, Caspase-8 蛋白表达活性逐渐增强。
- 3、5. 0 h、1 h 取材的超声结合原卟啉 IX 处理组肿瘤细胞, Caspase-8 蛋白表达活性显著增强。
- 6、8. 3 h、5 h 取材的单独超声处理组肿瘤细胞, Caspase-8 蛋白表达活性明显下降, 5 h 时与对照组无显著性差异。
- 7、9. 3 h、5 h 取材的超声结合原卟啉 IX 处理组肿瘤细胞, Caspase-8 蛋白表达活性稍有下降, 5 h 时仍极显著地高于其它三个实验组。

图版 IV 不同处理组 Caspase-3 蛋白的免疫荧光活性染色

1. 对照组肿瘤细胞, Caspase-3 蛋白表达活性微弱。
- 2、4、6. 0 h、1 h、3 h 取材的单独超声组肿瘤细胞, Caspase-3 蛋白表达活性缓慢增加。
- 3、5、7. 0 h、1 h、3 h 取材的超声结合原卟啉 IX 处理组肿瘤细胞, Caspase-3 蛋白表达活性显著增强。
8. 5 h 取材的单独超声处理组肿瘤细胞, Caspase-3 蛋白表达活性显著下降。
9. 5 h 取材的超声结合原卟啉 IX 处理组肿瘤细胞, Caspase-3 蛋白表达活性有所下降, 但仍处于较高水平, 其平均荧光强度值极显著大于单独超声处理组。

图版 V 不同处理组 Cleaved PARP 片断 (89 kD) 的免疫细胞化学染色

1. 对照组肿瘤细胞, 几乎检测不到 89 kD 的 PARP 片断。
- 2、4. 0 h、1 h 取材的单独超声处理组肿瘤细胞, Cleaved PARP 蛋白表达逐渐增多。
- 3、5. 0 h、1 h 取材的超声结合原卟啉 IX 处理组肿瘤细胞, Cleaved PARP 蛋白表达显著性增加。
- 6、8. 3 h、5 h 取材的单独超声处理组肿瘤细胞, Cleaved PARP 蛋白表达开始有所下降。
- 7、9. 3 h、5 h 取材的超声结合原卟啉 IX 处理组肿瘤细胞, Cleaved PARP 蛋白表达下降幅度很小, 其平均光密度值显著大于单纯超声处理组。

Explanation of Plates

Plate I Dual staining with Annexin V-PI

1. Tumor cells without any treatment, only little part of cell membrane with slight green staining.
2. Tumor cells 0 h after ultrasound treatment, individual cells was double stained.
3. Tumor cells 0 h after the treatment of ultrasound and protoporphyrin IX, some cells with bright green staining.
- 4, 6. Tumor cells 1 h and 3 h after ultrasound treatment, number of cell stained was increased, red fluorescence became brighter.
- 5, 7. Tumor cells 1 h and 3 h after the treatment of ultrasound and protoporphyrin IX, cells with green staining became more and stronger, some nuclei took on light red, and some bubble-like protrusion appeared on cell membrane.
8. Tumor cells 5 h after ultrasound treatment, green in cell membrane became lighter and red in nuclei became more stronger.
9. Tumor cells 5 h after the treatment of ultrasound and protoporphyrin IX, cell staining became more and more, some nuclei took on brighter red fluorescence, part of cells were deformed.

Plate II Changes of apoptosis rate in four groups at different time after treatment by TUNEL reaction

1. Tumor cells without any treatment, apoptosis rate was very low.
- 2, 4, 6, 8. Tumor cells 0 h, 1 h, 3 h and 5 h after ultrasound treatment, the cell apoptosis rate increased gradually.
- 3, 5, 7, 9. Tumor cells 0 h, 1 h, 3 h and 5 h after the treatment of ultrasound and protoporphyrin IX, the cell apoptosis rate was obviously increased, and which was significantly higher than ultrasound alone treatment cells at the same time.

Plate III Activities of Caspase-8 in different groups by immunofluorescence staining

1. Tumor cells without any treatment, weak expression of Caspase-8 protein.
- 2, 4. Tumor cells 0 h and 1 h after ultrasound treatment, the activity of Caspase-8 protein increased gradually.
- 3, 5. Tumor cells 0 h and 1 h after the treatment of ultrasound and protoporphyrin IX, the activity of Caspase-8 protein was significantly increased.
- 6, 8. Tumor cells 3 h and 5 h after ultrasound treatment, the activity of Caspase-8 protein was obviously decreased, which has no significant difference with control groups cells at 5 h after treatment.
- 7, 9. Tumor cells 3 h and 5 h after the treatment of ultrasound and protoporphyrin IX, the activity of Caspase-8 protein was slightly decreased, the means of fluorescence intensity in which was remarkably higher than any other three groups cells.

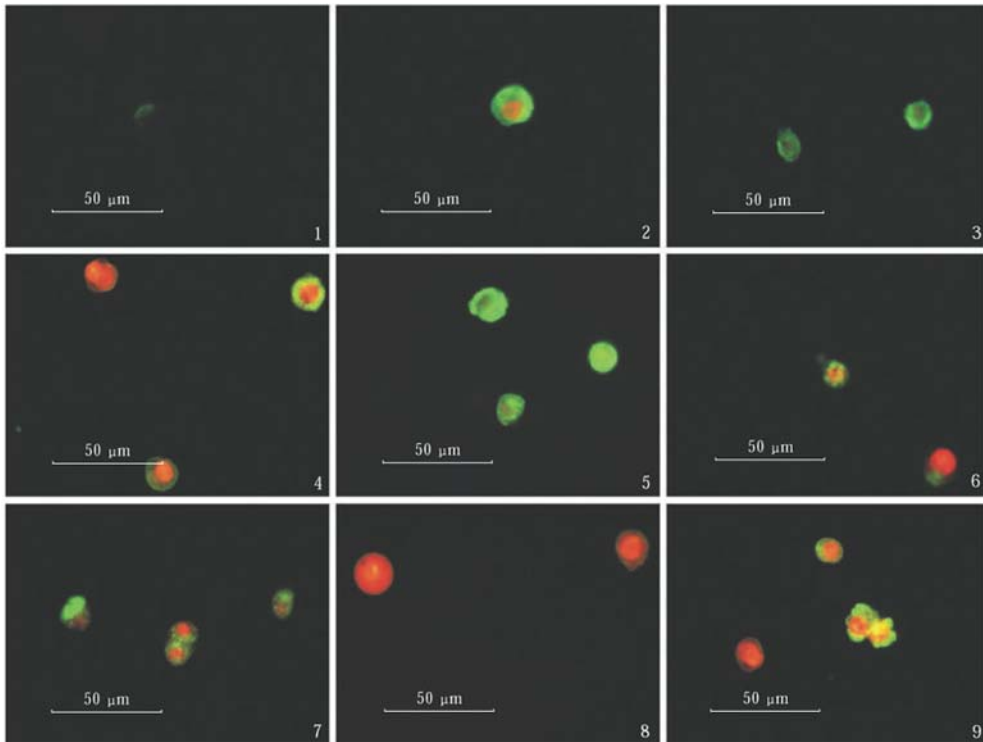
Plate IV Activities of Caspase-3 in different groups by immunofluorescence staining

1. Tumor cells without any treatment, weak expression of Caspase-3 protein.
- 2, 4, 6. Tumor cells 0 h, 1 h and 3 h after ultrasound treatment, the activity of Caspase-3 protein increased gradually.
- 3, 5, 7. Tumor cells 0 h, 1 h and 3 h after the treatment of ultrasound and protoporphyrin IX, the activity of Caspase-3 protein was significantly increased.
8. Tumor cells 5 h after ultrasound treatment, the activity of Caspase-3 protein was apparently decreased.
9. Tumor cells 5 h after the treatment of ultrasound and protoporphyrin IX, the activity of Caspase-3 protein was slightly decreased, but it was also sustained at a relative higher level, the means of fluorescence intensity in which was remarkably higher than ultrasound alone group cells.

Plate V Expression of Cleaved PARP in different groups by immunocytochemistry staining

1. Tumor cells without any treatment, very weak expression of Cleaved PARP protein.
- 2, 4. Tumor cells 0 h and 1 h after ultrasound treatment, Cleaved PARP protein starts expressing gradually.
- 3, 5. Tumor cells 0 h and 1 h after the treatment of ultrasound and protoporphyrin IX, the expression of Cleaved PARP protein was significantly increased.
- 6, 8. Tumor cells 3 h and 5 h after ultrasound treatment, the expression of Cleaved PARP protein was decreased.
- 7, 9. Tumor cells 3 h and 5 h after the treatment of ultrasound and protoporphyrin IX, the expression of Cleaved PARP protein was decreased at a relative small range, the means of optical density of Cleaved PARP in which was significantly higher than ultrasound alone group cells.

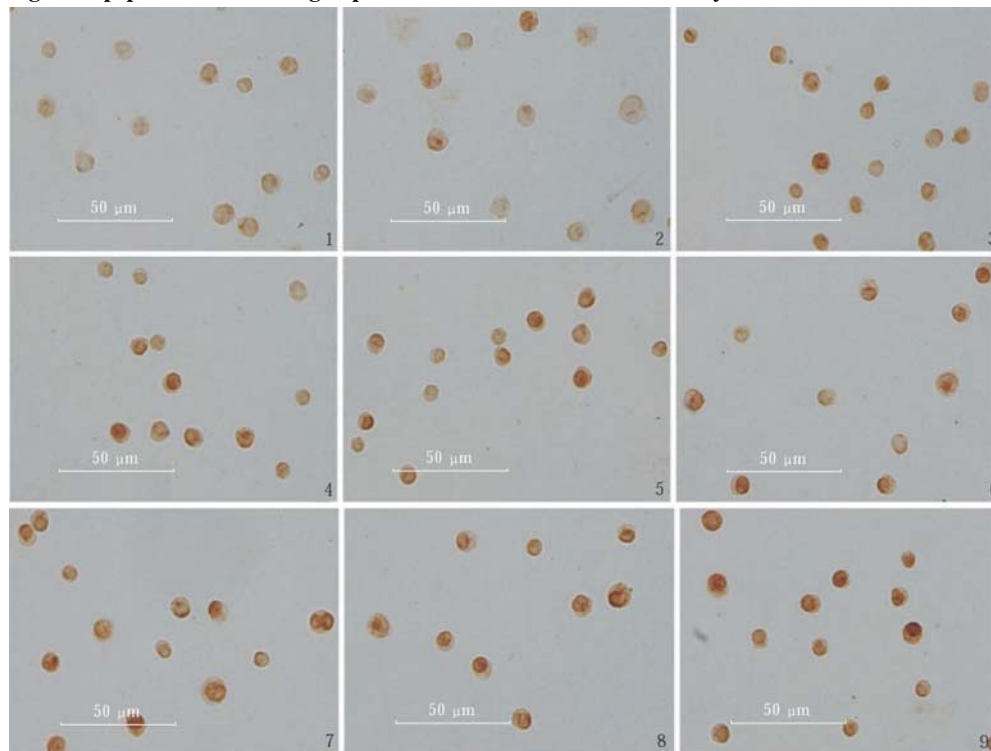
图版 I AV-PI 双荧光染色观察 Plate I Dual staining with Annexin V-PI



图版 II TUNEL 法检测不同处理组细胞凋亡率随时间变化

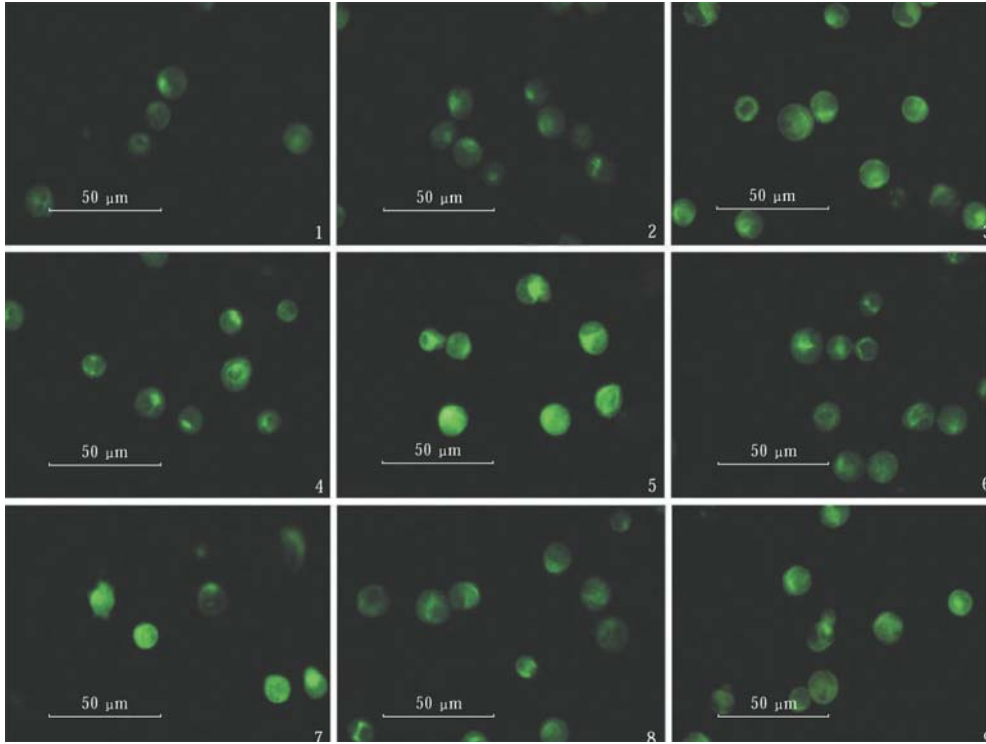
图版 I、II

Plate II Changes of apoptosis rate in four groups at different time after treatment by TUNEL reaction



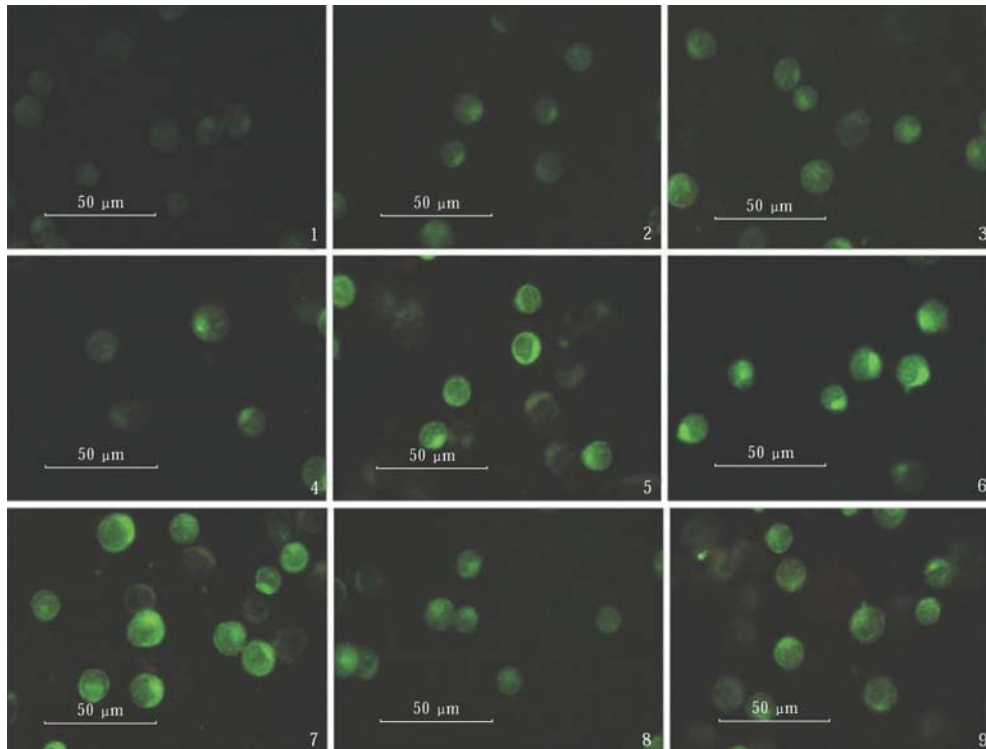
图版 III 不同处理组 Caspase-8 蛋白的免疫荧光活性染色

Plate III Activities of Caspase-8 in different groups by immunofluorescence staining



图版 IV 不同处理组 Caspase-3 蛋白的免疫荧光活性染色

Plate IV Activities of Caspase-3 in different groups by immunofluorescence staining



刘全宏等：原卟啉Ⅸ-声动力学疗法诱导 S180 肿瘤细胞的凋亡

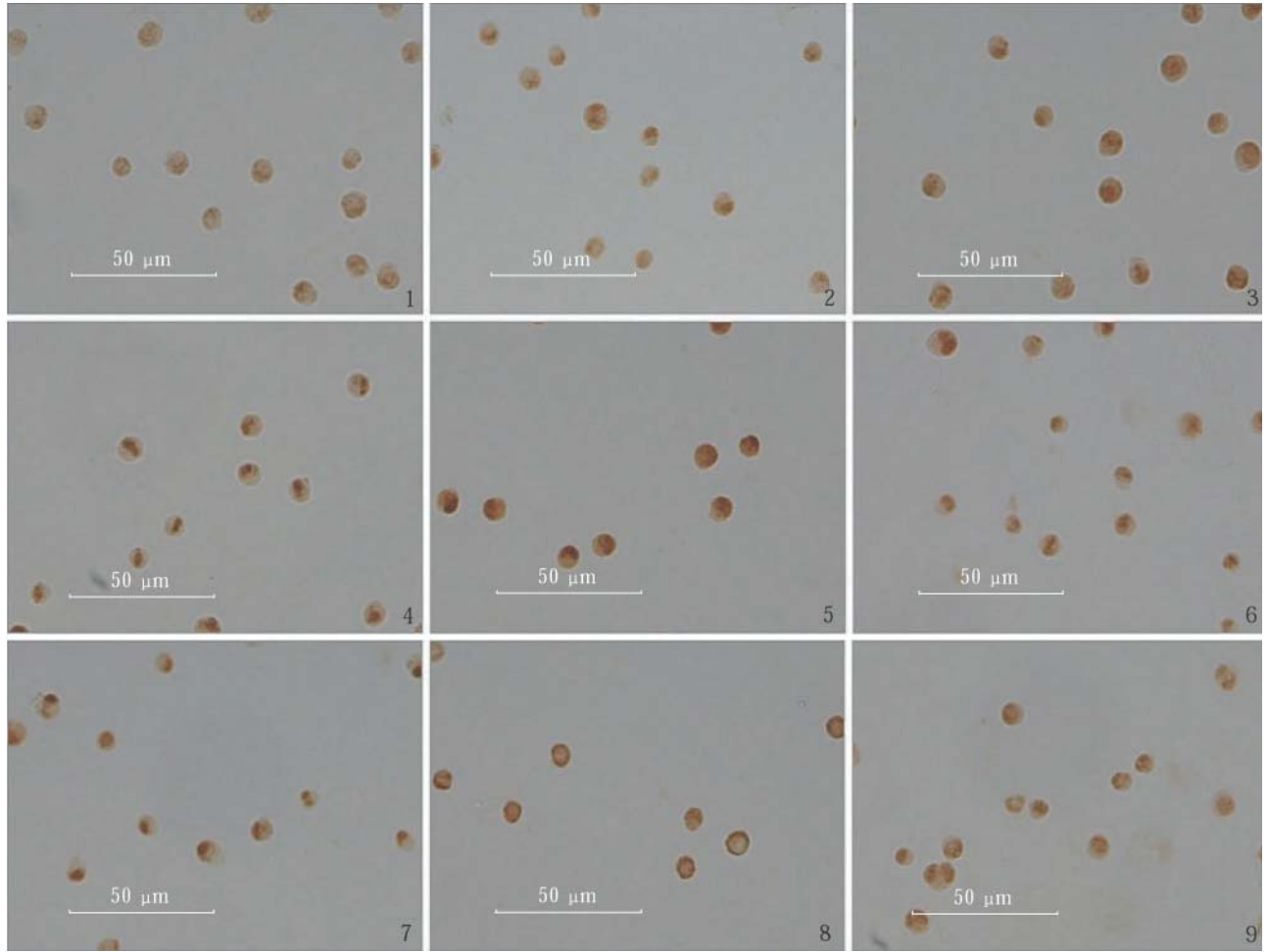
图版 V

LIU Quan-Hong et al. : Apoptosis on S180 tumor cells induced by ultrasonically-activated protoporphyrin IX

Plate V

图版 V 不同处理组 Cleaved PARP 片断 (89 kD) 的免疫细胞化学染色

Plate V Expression of Cleaved PARP in different groups by immunocytochemistry staining



图版说明见文后 (Explanation at the end of the text)