

# 超声激活血卟啉杀伤癌细胞的扫描电镜观察

李 萌,刘全宏,齐 浩,张金选,张 坤,王 攀

(陕西师范大学 生命科学学院,陕西 西安 710062)

**摘要:**利用频率为 2 MHz,强度为  $0.9 \text{ W/cm}^2$  的超声(Ultrasound, US)激活血卟啉(Hematoporphyrin derivatives, HpD)对在体的腹水型艾氏腹水瘤细胞(Ehrlich Ascites Tumor, EAT)和 S180 (Sarcoma180, S180)细胞进行抑癌作用研究。通过扫描电子显微镜观察处理后细胞形态的变化,结果表明:超声激活血卟啉对艾氏腹水瘤细胞和 S180 细胞均有明显的杀伤效果,且通过对损伤不同形态的比较,得出 S180 细胞膜较艾氏腹水瘤细胞膜对于声动力疗法(Sonodynamic Therapy, SDT)更为敏感。

**关键词:**超声;血卟啉;艾氏腹水瘤

**中图分类号:**Q274 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-274 X (2003)02-0223-03

声动力疗法(Sonodynamic Therapy, SDT)是利用超声激活血卟啉产生的协同作用杀伤癌细胞。它是近年来提出的抗肿瘤理论和方法之一<sup>[1]</sup>。该疗法是利用超声(Ultrasound, US)能够穿透生物组织,激活癌细胞内富集并长时间滞留的光敏性物质血卟啉(Hematoporphyrin derivatives, HpD),引起肿瘤细胞的结构受损而杀伤癌细胞<sup>[2]</sup>。目前,国内外学者对于 SDT 的作用机制进行了研究<sup>[3~5]</sup>,提出单线态氧( $^1\text{O}_2$ )机制<sup>[6]</sup>、烷氧自由基理论<sup>[7]</sup>等,然而对于 SDT 杀伤癌细胞过程的形态学证据报道尚少。同时 SDT 对于不同肿瘤细胞的损伤是否不同亦不明确。因此,本实验利用扫描电镜观察频率为 2 MHz,强度为  $0.9 \text{ W/cm}^2$  的超声激活血卟啉处理后 S180 和艾氏腹水瘤(Ehrlich Ascites Tumor, EAT)细胞的表面膜形态变化,为 SDT 杀伤肿瘤细胞提供形态学证据并探讨两种癌细胞异同点,从而为 SDT 引发的膜损伤和临床应用积累资料。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

血卟啉由 Sigma 公司生产,用  $0.1 \text{ mol/L}$  磷酸

缓冲盐溶液(pH 7.2~7.4)使其避光溶解,终浓度为  $2.5 \text{ mg/mL}$ ,过滤、灭菌、分装、避光、 $-20^\circ\text{C}$  保存。EAT, S180 细胞株及实验用 MCR 系小白鼠(雌性,体重  $18\sim 22 \text{ g}$ )均由陕西中医药研究院实验动物中心提供。超声装置为陕西师范大学应用声学研究所研制,探头面积  $4.7 \text{ cm}^2$ 。

### 1.2 方 法

分别接种 S180 细胞和 EAT 细胞于小鼠腹腔 1 周后,将 S180 小鼠和 EAT 小鼠均随机分为对照组(CT)、血卟啉组(HpD)、超声组(US)和超声加血卟啉组(US+HpD)。CT 组不作任何处理,US 组和 US+HpD 组小鼠均腹部脱毛, HpD 组和 US+HpD 组小鼠由尾静脉注射血卟啉  $0.2 \text{ mL}$ ,使其终浓度为  $25 \text{ mg/kg}$ 。US 组和 US+HpD 组在超声处理前用 1% 硫喷妥钠适度麻醉,各组均随机挑选小鼠分别超声照射 120 s, 180 s 和 240 s。各试验组分别于声照后 1 h, 3 h, 6 h 抽取腹水,后续处理。

将抽取的腹水用生理盐水稀释,使肿瘤细胞悬液的细胞浓度达到  $1 \times 10^7 \text{ cells/mL}$ , 1% 戊二醛  $4^\circ\text{C}$  固定 30 min, 锇酸固定 1 h, 梯度酒精脱水, 乙酸异戊酯置换, 临界点干燥, 喷镀, 日立 S-570 扫描电镜下观察并照相。

收稿日期:2002-05-21

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870240);教育部“高等学校骨干教师资助计划”项目(2000)

作者简介:李 萌(1978-),女,陕西西安人,陕西师范大学硕士生,从事动物细胞学研究。

## 2 结果

### 2.1 S180 细胞的扫描电镜观察

对照组 S180 细胞呈圆球形,表面具有细密、丰富、形态较为尖锐的微绒毛(图版 1,a);HpD 组与 CT 组无明显差别,仅微绒毛数量稍有减少(图版 1,b);US 组细胞:在声照时间为 2 min 时,形态变化不明显,1 h 取材和 3 h 取材的细胞均与 HpD 组相似,仅少数表现出微绒毛减少、细胞收缩的现象(图版 1,c)。6 h 取材时,细胞受损程度加强,产生极度变形的细胞。US 组在声照为 3 min,1 h,3 h 取材与声照 2 min 相似,直至 6 h 取材时表面微绒毛锐减,同时出现大小不等的疣状突起(图版 1,d),受损细胞数量以及受损程度均表现出随取材时间推移而有所加深的现象。当声照时间增加至 4 min 时,细胞严重变形,表面多见片状突起组成的不规则沟回和瘤状突起(图版 1,e),具有突起和形变的细胞数量同样随取材时间推移增加。当声照处理 US+HpD 组细胞 2 min 时,表现出部分细胞破裂,多数细胞微绒毛显著减少,产生小疣状突起(图版 1,f),6 h 较 1 h 和 3 h 取材时的损伤现象明显。当处理时间延长至 3 min 时,细胞变形破损,1 h 和 3 h 取材的细胞表面变光滑并出现块状突起(图版 1,g),6 h 取材中,有些细胞局部表面呈现由嵴状或片状突起组成的片层状结构(图版 1,h)。处理 4 min,细胞极度受损,部分破损形成许多具有泡状突起的小体或细胞残片(图版 1,i)。

### 2.2 艾氏腹水瘤细胞的扫描电镜观察

对照组艾氏腹水瘤细胞亦呈圆球形,表面微绒毛丰富,但 S180 细胞的个体较小,微绒毛圆钝(图版 2,a);HpD 组与 CT 组相比,无明显差别,微绒毛减少的现象较 S180 为弱(图版 2,b)。US 组中:声照处理 2 min 时,1 h 和 3 h 取材中,细胞有轻微形变,并有些出现 S180 细胞中未见到的指状突起(图版 2,c)。6 h 取材中,一些细胞已有较严重的形变发生。声照时间延长至 3 min 时,其损伤程度与声照 2 min 时相近,同样表现出随取材时间的推迟,损伤加深,并有一些如同 S180 一般产生的疣状突起(图版 2,d)。声照为 4 min 组中,细胞变形较为严重,大部分细胞表面变得较为光滑且部分细胞局部表面已破裂(图版 2,e)。US+HpD 组中:声照处理 2 min,1 h 和 3 h 取材时,细胞表面微绒毛稍有减少,6 h 取材有

产生泡状突起的损伤表现(图版 2,f),但其损伤程度不及 S180 细胞。6 h 取材损伤细胞数量有所增加。声照处理 3 min 时,部分细胞出现较多的泡状突起,并且随取材时间的推移,3 h 和 6 h 一些细胞已严重变形(图版 2,g)。声照 4 min 时,1 h 和 3 h 取材,可见部分细胞膜破裂,形成较多球状小体(图版 2,h),6 h 取材时,大量细胞结构破坏,胞质丢失,仅存由部分生物膜形成的细胞结构碎片(图版 2,i)。

## 3 讨论

在腹水型 S180 瘤细胞的扫描电镜观察中,发现 HpD 对癌细胞有一定的影响,表现在部分癌细胞表面微绒毛减少。单纯超声随声照时间的增长,对细胞产生一定的损伤,而超声激活血卟啉的协同作用对细胞的损伤明显大于单纯超声。实验中观察到的细胞表面结构的变化就是癌细胞受损的显著性标志。其主要表现为微绒毛减少,形成各种不同形状的突起,以及胞膜破裂等。癌细胞的受损程度随着声照时间的延长以及取材时间的推移而加剧。

在对艾氏腹水瘤细胞的观察中,发现 HpD 对其影响较 S180 为弱。单纯超声对艾氏腹水瘤细胞具有一定影响,并随照射时间的延长而加剧。超声激活血卟啉的协同作用在此处同样表现明显,亦有随声照时间延长以及取材时间推移而加剧的现象。

S180 和艾氏腹水瘤细胞的损伤均可反映出 SDT 对肿瘤的抑制作用。它们的膜变化以及单线态氧( $^1O_2$ )、烷氧自由基的产生和脂质过氧化导致癌细胞膜系统产生不可逆的损伤<sup>[8,9]</sup>。同时,作为细胞扩大表面积、增强胞内外物质交流的微绒毛的减少亦是阻遏癌细胞恶性增殖的表征。在对两种癌细胞的观察中,均发现了损伤随取材时间推移而加剧,这与本室前期工作中发现的 SDT 损伤时滞效应吻合<sup>[10]</sup>。通过对两种腹水型癌细胞的受损形态观察,可发现艾氏腹水瘤细胞的受损程度在相同的处理条件下不及 S180 细胞显著。其表现在:微绒毛的减少不明显;当 US+HpD 作用 2 min 时,S180 便部分细胞出现破损,而 EAT 细胞则仅有变形出现;S180 细胞在 US+HpD 作用 4 min 时,膜的破损严重,细胞表面微绒毛消失,不规则突起伴随膜结构解体等膜受损现象,而 EAT 细胞则没有此类现象发生。这些差异是否由不同癌细胞的自身特性和对 SDT 法的敏感性差异引起,有待于进一步研究。

## 参考文献:

- [1] UMEMURA S, YUNMITA N, NISHIGAKI R, *et al.* Sonochemical activation of hematoporphyrin: A potential modality for cancer treatment[J]. IEEE Ultrasonics Symposium, 1989, 9: 55-960.
- [2] YUMITA N, NISHIGAKI R, UMEMURA K, *et al.* Synergistic Effect of Ultrasound and Hematoporphyrin on Sarcoma180[J]. Jpn. J. Cancer Res, 1990, 81: 304-308.
- [3] WORTHINGTON A E, YHOMPSON J, RAUTH A M, *et al.* Mechanism of Ultrasound enhanced porphyrin cytotoxicity. Part I: A search for free radical effect[J]. Ultrasound Med Biol, 1997, 23 (7): 1 095-1 097.
- [4] HRISTOV P K, PETROV L A, RUSSANOV E M. Lipid peroxidation induced by ultrasonication in Ehrlich ascitic tumor cells[J]. Cancer Lett, 1997 Dec, 16, 121(1): 7-10.
- [5] TACHIBANAN K, TACHIBANAN S. Application of ultrasound energy as a new drug delivery system[J]. Nippon Yakurigaku Zasshi, 1999 Oct, 114 Suppl 1: 138-141.
- [6] UMEMURA S, YUMITA N, NISHIQAKI R, *et al.* Mechanism of Cell Damage by Ultrasound in Combination with Hematoporphyrin[J]. Jpn J Cancer Res, 1990, 81(9): 962-966.
- [7] JIN Z H, MIYOSHI N, ISHIGURD K, *et al.* Combination effect of photodynamic and sonodynamic therapy on experimental skin squamous cell carcinoma in C<sub>3</sub>H/HeN mice[J]. J Dermatol, 2000 May, 27(5): 294-306.
- [8] MIYOSHI N, LGARASHI T, RIESZ P. Evidence against singlet oxygen formation by sonolysis of aqueous oxygen-saturated solution of HpD and Rose Bengal[J]. Ultrasound Sonochem, 2000 Jul, 7(3): 121-124.
- [9] 齐 浩, 谭声江, 马玉英, 等. 不同频率聚焦超声与血卟啉对人体肿瘤细胞的协同作用. 中国科学(C 辑), 1998, 28(5): 477-480.
- [10] 孙世惠, 刘全宏, 齐 浩, 等. 低强度超声激活血卟啉对 S180 细胞的杀伤作用[J]. 西北大学学报(自然科学版), 2002, 32(2): 211-213.

(编辑 徐象平)

## The scanning electron microscope observation of two kinds cancer cells treated by ultrasound irritating HpD

LI Meng, LIU Quan-hong, QI Hao,

ZHANG Jin-xuan, ZHANG Kun, WANG Pan

(College of Life Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

**Abstract:** The antitumor effects of hematoporphyrin derivative (HpD) activated by ultrasound (US) was studied on Sarcoma180 (S180) and Ehrlich ascites tumor (EAT) cells through scanning electronic microscope. The results indicated that the synergia of US and HpD had remarkable antitumor effects on ascitic S180 and EAT cells. At the same time, the comparison between two ascitic tumor cells' images of injured membranae illustrated the S180 cells was more sensitive than EAT cells to HpD activated by US.

**Key words:** ultrasound (US); hematoporphyrin derivative (HpD); Ehrlich ascites tumor (EAT)

## 图版说明

图版 1 S180 细胞的扫描电镜观察(×5 000)

a. 对照组示正常癌细胞; b. HpD 组细胞结构示微绒毛稍有减少; c. US 组声照 2 min, 1 h 和 3 h 取材示微绒毛减少, 轻微形变; d. US 组声照 3 min, 6 h 取材示细胞出现疣状突起; e. US 组声照 4 min, 6 h 取材示瘤状突起; f. US+HpD 组声照 2 min, 1 h 和 3 h 取材示微绒毛极度减少, 形成疣状突起; g. US+HpD 组声照 3 min, 1 h 和 3 h 取材示细胞变光滑, 产生块状突起; h. US+HpD 组声照 3 min, 6 h 取材示细胞产生片层状结构; i. US+HpD 组声照 4 min, 3 h 取材示细胞形成残片

图版 2 EAT 细胞的扫描电镜观察(×5 000)

a. 对照组示正常癌细胞; b. HpD 组细胞示无明显变化; c. US 组声照 2 min, 1 h 和 3 h 取材示细胞轻微形变, 指状突起; d. US 组声照 3 min, 6 h 取材示细胞形成疣状突起; e. US 组声照 4 min, 示细胞变光滑; f. US+HpD 组声照 2 min, 6 h 取材示细胞泡状突起; g. US+HpD 组声照 3 min, 3 h 和 6 h 取材示细胞已严重变形; h. US+HpD 组声照 4 min, 1 h 和 3 h 取材示胞膜破裂, 形成众多球状碎块; i. US+HpD 组声照 4 min, 6 h 取材示内容物流失, 形成碎片