

## ◆ 实验研究

## Dose-effect of human pancreatic carcinoma cell apoptosis induced by focused ultrasound with different radiation patterns

GUO Qian, JIANG Li-xin, HU Bing\*

(Department of Ultrasound in Medicine, the Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, Shanghai Institute of Ultrasound in Medicine, Shanghai 200233, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the optimal radiation pattern of focused ultrasound induced pancreatic carcinoma cell apoptosis. **Methods** The human pancreatic carcinoma cell line PaTu 8988t suspension was radiated by focused ultrasound using 5 dose groups with different radiation time parameters and patterns. Pulsed radiation pattern was used in groups 2 and 3, while continuous radiation pattern was used in group 4 and 5, group 1 was taken as the controls. The ratio of focused ultrasound induced cell apoptosis and cell death was tested with flow cytometer 24 h after ultrasound radiation. **Results** The maximum cell suspension temperature of 5 dose groups was 28.00°C, (42.20±2.17)°C, (50.80±0.84)°C, (55.80±2.17)°C and (65.20±3.11)°C, respectively (all  $P<0.05$ ). The cell apoptosis rate was (0.56±0.15)%, (1.28±0.16)%, (1.84±0.29)%, (5.74±1.15)% and (2.00±0.84)%, respectively for 5 dose groups, and the cell death rate was (3.28±0.59)%, (4.60±0.47)%, (8.64±2.69)%, (41.12±15.91)% and (49.70±8.02)%, respectively (all  $P<0.05$ ). **Conclusion** Using threshold thermal exposures of focused ultrasound radiation with continuous radiation pattern is able to acquire high ratio of cell apoptosis.

**[Key words]** High-intensity focused ultrasound ablation; Apoptosis; Pancreatic neoplasms; Radiation pattern

## 不同辐照模式聚焦超声诱导人胰腺癌细胞凋亡的量效关系

郭倩, 姜立新, 胡兵\*

(上海交通大学附属第六人民医院超声医学科  
上海超声医学研究所, 上海 200233)

**[摘要]** **目的** 探讨不同辐照模式聚焦超声诱导人胰腺癌细胞凋亡的最佳辐照方案。**方法** 对人胰腺癌细胞系 PaTu 8988t 细胞悬液进行聚焦超声辐照, 第 1 组为空白对照组, 第 2、3 组采用脉冲辐照模式, 第 4、5 组采用连续辐照模式, 各组辐照剂量通过改变辐照时间来改变。以流式细胞仪检测辐照后 24 h 肿瘤细胞凋亡率及细胞死亡率。**结果** 超声辐照后各组的细胞悬液最高温度分别为 28.00°C、(42.20±2.17)°C、(50.80±0.84)°C、(55.80±2.17)°C、(65.20±3.11)°C, 各組间差异均有统计学意义( $P$ 均 $<0.05$ )。各辐照组的细胞凋亡率为(0.56±0.15)%、(1.28±0.16)%、(1.84±0.29)%、(5.74±1.15)%、(2.00±0.84)%, 细胞死亡率为(3.28±0.59)%、(4.60±0.47)%、(8.64±2.69)%、(41.12±15.91)%、(49.70±8.02)%, 各組间差异均有统计学意义( $P$ 均 $<0.05$ )。**结论** 聚焦超声辐照剂量在接近热凝固温度阈值时, 采用连续辐照模式可获得较高的细胞凋亡率及细胞死亡率。

**[作者简介]** 郭倩(1981—), 女, 山东潍坊人, 在读博士。研究方向: 高强度聚焦超声的应用。E-mail: gqyt@yahoo.com.cn

**[通讯作者]** 胡兵, 上海交通大学附属第六人民医院超声医学科 上海超声医学研究所, 200233。E-mail: drhubing@163.com

**[收稿日期]** 2010-09-14 **[修回日期]** 2010-11-15

[关键词] 高强度聚焦超声消融; 细胞凋亡; 胰腺肿瘤; 辐照模式

[中图分类号] R735.9; R445.1 [文献标识码] A [文章编号] 1003-3289(2011)03-0479-04

作为一种新兴的物理治疗方法, 聚焦超声除可导致肿瘤组织凝固性坏死以外, 也可诱导细胞凋亡<sup>[1-2]</sup>。细胞凋亡是肿瘤形成及生长过程中的重要调控环节, 许多化学疗法及物理疗法均是通过诱导肿瘤细胞发生凋亡而达到治疗目的。在聚焦超声的临床应用中, 如何采用尽量小的辐照剂量, 在尽可能短的时间内最大程度诱导肿瘤细胞凋亡、遏制其增殖以获取最佳临床疗效, 尚需进一步研究。本文通过比较聚焦超声不同辐照模式(脉冲辐照模式与连续辐照模式)以及不同辐照剂量导致细胞凋亡及细胞死亡的比率, 以期获取最佳辐照方案。

### 1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂 美国 Thermo Forma CO<sub>2</sub> 培养箱, Beckman Coulter 公司流式细胞分析仪, HY2900 型高强度聚焦超声治疗系统、HY2900 型温度测量仪及测温导丝由无锡海鹰电子医疗系统有限公司提供。HY2900 型高强度聚焦超声治疗系统采用凹球面自聚焦换能器, 工作频率 1.5 MHz。

主要试剂: RPMI-1640 培养基, 胰酶, 小牛血清 (GIBCO), 青-链霉素双抗 (Hyclone), Annexin V-AF 488/PI 双标记细胞凋亡检测试剂盒 (Invitrogen)。

1.2 细胞株和细胞培养 人胰腺癌细胞系 PaTu 8988t 由上海市第一人民医院王兴鹏教授馈赠。该细胞系由人胰腺癌肝转移灶分离, 生长方式为贴壁生长。PaTu 8988t 细胞培养于 RPMI-1640 培养基(含 10% 小牛血清, 100 U/ml 青霉素, 100 U/ml 链霉素), 置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 聚焦超声辐照及测温

当细胞接种 48 h 达对数生长期时, 消化并制成细胞悬液, 计数 2 × 10<sup>6</sup> 个细胞置于 1.5 ml 带盖聚乙烯离心管内, 用封口膜密封管口, 管盖中央置入测温导丝。于

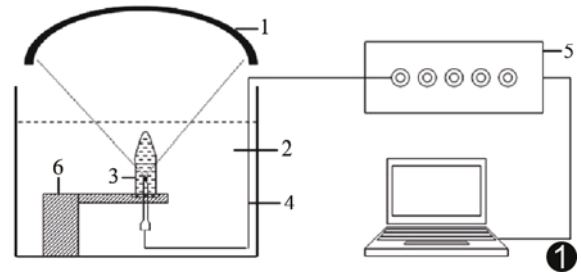


图 1 聚焦超声辐照方法示意图 (1: 聚焦超声换能器; 2: 脱气水; 3: 1.5 ml 带盖聚乙烯离心管, 其内为 PaTu 8988t 细胞悬液; 4: 测温导丝; 5: HY2900 温度测量仪; 6: 离心管固定支架)

室温下将离心管连同测温导丝倒置后垂直固定于支架上, 置于 25℃ 脱气水中(图 1)。聚焦超声辐照时, 为尽可能对细胞悬液均匀辐照, 将焦点定于离心管中心, 距其顶端 20 mm 处。将测温导丝尖端置于聚焦超声焦点处, 测量焦点处温升, 测温软件采样频率为 50 ~ 100 Hz。

根据超声辐照方式分为 5 组, 辐照剂量参数设置见表 1, 其中 T<sub>on</sub> 表示辐照时间, T<sub>off</sub> 表示辐照间歇时

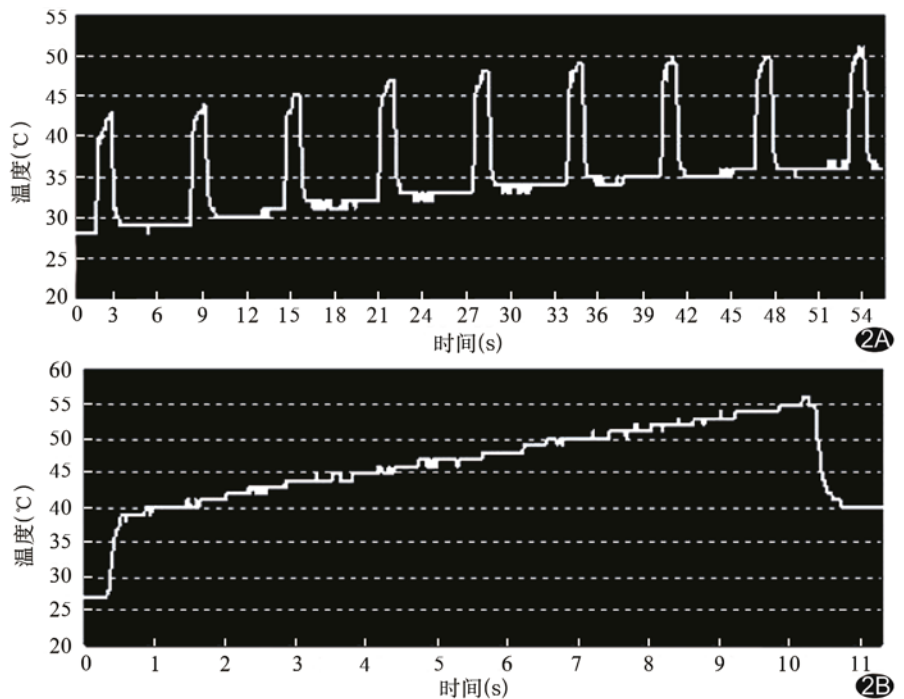


图 2 聚焦超声辐照 10 s, 不同辐照模式焦点处温度曲线图 A. 第 3 组脉冲辐照模式焦点处温度曲线图, 辐照参数设置 T<sub>on</sub> = 1000 ms, T<sub>off</sub> = 5000 ms, n = 10; B. 第 4 组连续辐照模式焦点处温度曲线图, 辐照参数设置 T<sub>on</sub> = 10 000 ms, n = 1

间,  $n$  表示单点辐照次数,  $P$  表示声辐射力法<sup>[3]</sup>测得的换能器输出声功率。第 1 组为空白对照组; 第 2、3 两组均采用脉冲辐照模式,  $T_{on} : T_{off} = 1 : 5$ , 单点辐照次数相同, 单次辐照时间第 3 组较第 2 组增加; 第 4、5 组均为连续辐照模式, 第 5 组较第 4 组辐照时间延长, 辐照剂量增大。第 3、4 组辐照总时间相同, 但辐照模式不同。每个剂量组重复测量 5 次。

表 1 聚焦超声辐照剂量参数设置

组别	$T_{on}$ (ms)	$T_{off}$ (ms)	$n$	$P$ (W)
第 1 组	0	0	0	0
第 2 组	200	1000	10	142.7
第 3 组	1000	5000	10	142.7
第 4 组	10 000	—	1	142.7
第 5 组	15 000	—	1	142.7

注:  $T_{on}$ : 辐照时间;  $T_{off}$ : 辐照间歇时间;  $n$ : 单点辐照次数;  $P$ : 声辐射力法测得的换能器输出声功率

1.3.2 流式细胞仪检测 辐照后将细胞接种于 25 cm<sup>2</sup> 细胞培养瓶内, 每瓶接种  $2 \times 10^5$  个细胞, 置于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养 24 h 后, 收集培养液内及贴壁生长细胞, 按试剂盒说明书操作, 加入 Annexin V-AF 488/PI 双标记细胞凋亡检测试剂后, 以流式细胞仪进行分析: Annexin V-AF 488(-)/PI(-) 为正常细胞; Annexin V-AF 488(+)/PI(-) 为凋亡细胞; Annexin V-AF 488(+)/PI(+ 为死亡细胞。计算细胞凋亡率及细胞死亡率, 细胞凋亡率 = 凋亡细胞数/总细胞数  $\times 100\%$ , 细胞死亡率 =  $(1 - \text{正常细胞数}/\text{总细胞数}) \times 100\%$ 。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 12.0 统计软件分析, 数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 对不同剂量组间的温度及温升以及各剂量组间的细胞凋亡率及细胞死亡率进行方差分析及组间两两比较,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 温度测量 聚焦超声辐照焦点处温度不同剂量组组间两两比较差异均有统计学意义 ( $P$  均  $< 0.05$ , 表 2)。第 2、3 组及第 4、5 组在相同的辐照模式下, 超声辐照时间越长, 细胞悬液内温升越显著。第 3、4 组辐照时间相同, 脉冲辐照模式导致的细胞悬液内温升较连续辐照模式低。采用脉冲辐照模式时, 细胞悬液内温度曲线呈脉冲式上升。采用连续辐照模式时, 细胞悬液内温度曲线呈逐步上升(图 2)。

2.2 细胞凋亡率及细胞死亡率测量 不同聚焦超声辐照剂量组细胞凋亡率及细胞死亡率的统计数据见表

3。各组两两比较结果显示各辐照剂量组之间的细胞凋亡率及细胞死亡率差异均有统计学意义 ( $P$  均  $< 0.05$ )。采用脉冲辐照模式时, 第 3 组较第 2 组辐照时间延长, 辐照剂量增大, 细胞凋亡率及细胞死亡率较高。细胞悬液内温度  $< 60^\circ\text{C}$  时, 相同声功率的超声辐照, 细胞凋亡率及细胞死亡率随辐照时间增加而增加。当采用连续辐照模式时, 第 5 组较第 4 组辐照时间延长, 但由于温升过高, 细胞热损伤后发生细胞死亡的比例升高, 细胞凋亡率降低(图 3)。

表 2 不同辐照剂量组焦点处温升(°C)

组别	$T_{max}$	$\Delta T_{max}$	$\Delta T$
第 1 组	28.00	0	0
第 2 组	42.20 $\pm$ 2.17	14.80 $\pm$ 1.79	3.60 $\pm$ 0.54
第 3 组	50.80 $\pm$ 0.84	23.60 $\pm$ 1.14	9.80 $\pm$ 0.84
第 4 组	55.80 $\pm$ 2.17	28.80 $\pm$ 2.17	15.40 $\pm$ 4.98
第 5 组	65.20 $\pm$ 3.11	37.80 $\pm$ 2.77	17.40 $\pm$ 3.36

注:  $T_{max}$ : 超声辐照时焦点处达到的最高温度;  $\Delta T_{max}$ : 焦点处的最高温升;  $\Delta T$ : 超声辐照结束后测得的细胞悬液最终温升

表 3 不同辐照剂量组细胞凋亡率及细胞死亡率(%)

组别	细胞凋亡率	细胞死亡率
第 1 组	0.56 $\pm$ 0.15	3.28 $\pm$ 0.59
第 2 组	1.28 $\pm$ 0.16	4.60 $\pm$ 0.47
第 3 组	1.84 $\pm$ 0.29	8.64 $\pm$ 2.69
第 4 组	5.74 $\pm$ 1.15	41.12 $\pm$ 15.91
第 5 组	2.00 $\pm$ 0.84	49.70 $\pm$ 8.02

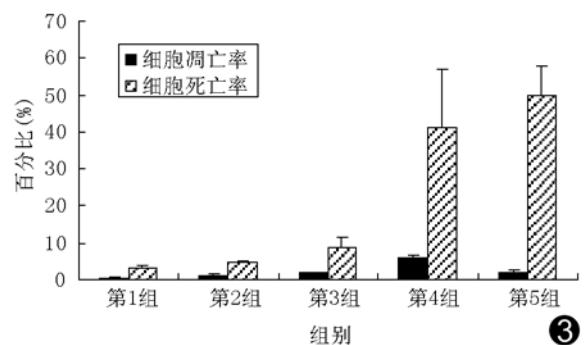


图 3 不同聚焦超声辐照剂量组细胞凋亡率及细胞死亡率

## 3 讨论

不同的聚焦超声辐照模式及辐照剂量对细胞产生不同的生物学效应<sup>[4]</sup>。Tian 等<sup>[5]</sup>采用 1 MHz 不同强度的聚焦超声连续辐照腹腔积液内的肿瘤细胞 10 min, 发现肿瘤细胞凋亡及坏死随超声辐照强度的增加而增加。Ashush 等<sup>[6]</sup>对聚焦超声诱导白血病细胞凋亡进行了研究, 采用频率为 750 kHz 脉冲式聚焦

超声,脉冲宽度为 50  $\mu\text{s}$ ,占空比为 1:25,发现声强 103.7  $\text{W}/\text{cm}^2$  辐照组细胞凋亡率较声强 22.4  $\text{W}/\text{cm}^2$  辐照组明显增高。由于既往研究多采用单一辐照模式且聚焦超声辐照系统以及辐照参数不同,不能直接针对不同辐照模式对细胞凋亡率的影响进行比较,亦无法判断何种辐照模式可以更有效地诱导细胞凋亡。

本研究以体外细胞为靶标,观察不同辐照模式及辐照时间造成细胞悬液温升的不同及其最终导致的细胞凋亡率及细胞死亡率。液体的导热系数较高,采用脉冲辐照模式时,聚焦超声的热能不易在局部聚集,而细胞热损伤程度与辐照后温度及其作用时间有关<sup>[7]</sup>。采用脉冲辐照模式时,由于离心管内细胞悬液的热量较易损失,焦点处温度在超声辐照时瞬间上升,辐照间歇期迅速下降,有效的细胞损伤温度作用时间较短,整个辐照过程中细胞悬液内温度上升比较缓慢,最终温升较低,造成细胞凋亡率及细胞死亡率较低。而采用连续辐照模式时,持续的超声辐照导致热能迅速积累,细胞悬液内温升较快,最终温升较高,达到有效温度后作用时间较长,诱导细胞凋亡的效果较好。对于不同的超声辐照模式,在辐照总时间相同时,连续辐照模式温升更高,可获得更高的细胞凋亡率以及细胞死亡率,肿瘤细胞杀伤效果更好。

在聚焦超声辐照过程中,热效应导致的组织温度急剧升高会造成组织凝固性坏死,而当组织温升在消融温度阈值以下时,则会产生细胞凋亡。Vykhodtseva 等<sup>[8]</sup>应用聚焦超声辐照新西兰大白兔脑组织,致组织升温到接近发生凝固性坏死阈值时,发现超声辐照引起兔脑组织细胞内形成 DNA 碎片,并形成凋亡小体。1999 年,Heisterkamp 等的研究显示 50~60 $^{\circ}\text{C}$  温度可在短时间(<3 min)内导致细胞死亡,为组织热消融的温度阈值。Hilger 等<sup>[9]</sup>采用细胞悬液进行热损伤的研究,发现细胞达到热消融的温度阈值为 55~60 $^{\circ}\text{C}$ 。Kennedy 等<sup>[10]</sup>认为高强度聚焦超声辐照后温度达到 56 $^{\circ}\text{C}$ 、持续 1 s 是导致组织损伤的临界点。本研究对不同温升的聚焦超声剂量组导致的细胞凋亡及细胞死亡比率进行研究,发现随着聚焦超声剂量的增加,细胞悬液内最高温度达到 60 $^{\circ}\text{C}$  以上时,细胞死亡率最高,但其中细胞坏死率明显增加,而细胞凋亡率降低。最高温度在 60 $^{\circ}\text{C}$  以下的 3 组不同辐照组中,细胞凋亡率以及细胞死亡率随温度的升高而增加,其中以第 4 组细胞凋亡率最高且约 50% 细胞死亡。在辐照

后温度接近热凝固温度阈值时,可在达到较高的细胞死亡率的情况下最大程度地诱导细胞凋亡。

本研究通过改变辐照模式以及不同的辐照时间来形成不同的超声辐照剂量组,结果表明,在辐照剂量使细胞悬液温度接近热凝固温度阈值时,可以满足在较高的细胞死亡率的情况下,造成最大程度的细胞凋亡。在不同辐照模式之间,连续辐照模式能够在更短的时间内造成较高的细胞凋亡率。

由于本研究系在体外细胞悬液内进行,细胞悬液具有一定的流动性,且导热系数与活体组织不同,本辐照方案是否可在活体组织中最大程度诱导肿瘤细胞凋亡,尚待进一步研究。

### [参考文献]

- [1] Feril LB Jr, Kondo T, Zhao QL, et al. Enhancement of ultrasound-induced apoptosis and cell lysis by echo-contrast agents. *Ultrasound Med Biol*, 2003, 29(2):331-337.
- [2] Lagneaux L, De Meulenaer EC, Delforge A, et al. Ultrasonic low-energy treatment: a novel approach to induce apoptosis in human leukemic cells. *Exp Hematol*, 2002, 30(11):1293-1301.
- [3] Shou W, Huang X, Duan S, et al. Acoustic power measurement of high intensity focused ultrasound in medicine based on radiation force. *Ultrasonics*, 2006, 44(Suppl 1):e17-e20.
- [4] 王锦惠,刘立民,魏濬,等.不同频率诊断超声对小鼠早孕胚胎组织细胞凋亡影响的对比研究. *中国医学影像技术*, 2003, 19(10): 1270-1271.
- [5] Tian ZM, Wan MX, Lu MZ, et al. The alteration of protein profile of Walker 256 carinosarcoma cells during the apoptotic process induced by ultrasound. *Ultrasound Med Biol*, 2005, 31(1): 121-128.
- [6] Ashush H, Rozenszajn LA, Blass M, et al. Apoptosis induction of human myeloid leukemic cells by ultrasound exposure. *Cancer Res*, 2000, 60(4):1014-1020.
- [7] Duck F. Acoustic dose and acoustic dose rate. *Ultrasound Med Biol*, 2009, 35(10):1679-1685.
- [8] Vykhodtseva N, McDannold N, Martin H, et al. Apoptosis in ultrasound-produced threshold lesions in the rabbit brain. *Ultrasound Med Biol*, 2001, 27(1):111-117.
- [9] Hilger I, Rapp A, Greulich KO, et al. Assessment of DNA damage in target tumor cells after thermoablation in mice. *Radiology*, 2005, 237(2):500-506.
- [10] Kennedy JE, Ter Haar GR, Cranston D. High intensity focused ultrasound: surgery of the future? *Br J Radiol*, 2003, 76(909): 590-599.