

• 短篇论著 •

低频超声辐照对前列腺癌细胞膜通透性影响的体外实验研究

吴作辉 白文坤 张吉臻 张跃力 申锸 胡兵

【摘要】 目的 探讨不同强度低频超声对前列腺癌细胞膜通透性的影响。**方法** 应用不同声强的低频超声辐照前列腺癌 PC-3 细胞悬液,超声辐照 5 min,占空比 20%。辐照后应用荧光显微镜检测 FD500 染色阳性率及细胞死亡率。**结果** 5 mW/cm² 组、20 mW/cm² 组及 80 mW/cm² 组中细胞 FD500 染色阳性率分别为 0.12 ± 0.04、0.37 ± 0.08、0.73 ± 0.05,各组间比较均有统计学差异($P < 0.05$),同时随着声强增加,细胞死亡率也逐渐增加。**结论** 低频超声能增加前列腺癌细胞膜通透性,其通透性与声强的强度有关。

【关键词】 超声处理; 细胞膜通透性; 细胞死亡; 前列腺癌细胞

细胞膜在细胞生命活动中有着重要而复杂的功能,其基本作用在于维持细胞内外环境的相对稳定,而其完整性、通透性等理化性质与细胞内外物质交换、信息传递、能量交换等功能有着密切的联系。如果人为改变细胞膜的通透性可使有益的物质进入、代谢产物的排出,使细胞朝着人们希望的方向生长,从而实现人工调控细胞的目的,对疾病的有效治疗具有十分重要的意义。超声产生的机械作用、空化效应、热效应能够改变细胞膜的通透性^[1-2],本研究以体外培养的人前列腺癌 PC-3 细胞为研究对象,初步探讨不同强度低频超声辐照对前列腺癌细胞膜的通透性的影响。

一、材料与与方法

1. 材料与仪器:人前列腺癌 PC-3 细胞(购自上海中科院生物研究所),DMEM 培养液(Gibco 公司,美国)、10% 胎牛血清(FBS)及 0.25% 胰酶(Invitrogen 公司,美国),异硫氰酸荧光素钠标记的右旋糖苷(FD500)、磷酸盐缓冲液(PBS)及台盼蓝(Sigma 公司,美国),超声治疗仪(型号:Fs-450,上海超声医学研究所定制),探头频率 21 kHz,发射连续波和脉冲波,输出声强和照射时间可变。

2. 实验方法:(1)细胞培养:人前列腺癌 PC-3 细胞培养于 25 cm² 培养瓶,培养液为 DMEM(内含 10% FBS,不含双抗),在 5% CO₂、37 °C 湿化培养箱中培养,取对数生长期的前列腺癌 PC-3 细胞用于实验。用 PBS 洗涤 2 次,0.25% 胰酶消化 1 ~ 2 min,加入含 10% FBS 的 DMEM 培养液终止消化,反复轻柔吹打制成单细胞悬液,调节细胞悬液浓度 $> 1 \times 10^5$ /ml。取 100 μl 重悬液加入等量台盼蓝染色 3 min 检测细胞活性。将等量的细胞悬液(2 ml)及等量的 FD500 溶液(80 μl)缓慢注入各组无菌的聚乙烯管内,加塞封口,用无菌的封口膜封口,尽量不留可见空气气泡,于超声辐照前轻柔摇匀细胞悬液。

(2)FD500 溶液配制:在 1 ml 的 PBS 中加入 25 mg FD500,充分溶解后放置于 4 °C 冰箱中避光保存备用。

(3)实验分组:根据声强不同分为 4 组,分别为对照组、5 mW/cm² 组、20 mW/cm² 组、80 mW/cm² 组。对照组仅添加 FD500,不进行超声辐照。以上各实验均重复 6 次。

(4)超声辐照:将超声探头固定于不锈钢支架上,辐射面垂直朝上,将有细胞悬液的聚乙烯管放置探头上,其间用耦合剂填充,以免中间留有气泡。超声探头直径 13 mm,超声辐照均在超声辐照场中进行,超声频率为 21 kHz,辐照 5 min,占空比 20%,整个过程避光操作。

(5)荧光显微镜检测前列腺癌细胞 FD500 染色阳性率及细胞死亡率:辐照完毕后,立即将细胞悬液转入离心管,在离心机中离心 1000 r/min,离心 5 min,弃去上清液,以 PBS 洗涤 3 次,立即置于荧光显微镜下观察并摄片保存,胞质内见绿色荧光者为 FD500 染色阳性细胞,并计算细胞 FD500 染色阳性率。最后取 100 μl 加入等量的台盼蓝染色 3 min 后做细胞涂片,立即置于荧光显微镜普通模式下观察并摄片保存,胞质及胞核内见蓝染细胞为死亡细胞,并计算细胞死亡率。细胞 FD500 染色阳性率 = 荧光染色阳性细胞数/总细胞数 × 100%。细胞死亡率 = 台盼蓝染色细胞数/总细胞数 × 100%。上述比率各取 5 个 200 倍高倍镜视野计算。

3. 统计学分析:使用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。细胞 FD500 染色阳性率及细胞死亡率均以百分率计算,采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较差异性采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

二、结果

1. 光学显微镜观察结果:体外培养前列腺癌 PC-3 细胞贴壁状态呈爬行生长,呈梭形,消化后悬浮的细胞呈圆形或椭圆形,台盼蓝试验细胞活性 $> 95\%$ 。见图 1。

2. 荧光显微镜观察细胞 FD500 染色结果及细胞死亡率:荧光显微镜观察:高倍镜下空白对照组仅个别视野见极少量的胞浆内呈绿色荧光,强度微弱,声强组均可见少量细胞内呈绿色荧光;普通显微镜观察:高倍镜下各组细胞均见蓝染细胞。细胞 FD500 染色阳性率及细胞死亡率统计结果见表 1 及图 2。

表 1 前列腺癌细胞 FD500 染色阳性率及细胞死亡率(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	FD500 染色阳性率	细胞死亡率
对照组	0.07 ± 0.08	0.35 ± 0.54
5 mW/cm ²	0.12 ± 0.04 ^a	1.48 ± 0.44 ^a
20 mW/cm ²	0.37 ± 0.08 ^{ab}	2.98 ± 0.60 ^{ab}
80 mW/cm ²	0.73 ± 0.05 ^{abc}	8.01 ± 0.83 ^{abc}

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与 5 mW/cm² 组比较,^b $P < 0.05$;与 20 mW/cm² 组比较,^c $P < 0.05$

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2012.14.068

基金项目:上海市科学技术委员会重点项目(10JC1412600)

作者单位:200233 上海交通大学附属第六人民医院超声医学科 上海超声研究所(吴作辉、白文坤、张吉臻、张跃力、申锸、胡兵);遵义医学院附属医院超声科(吴作辉)

通讯作者:胡兵,Email:binghuzz@263.net

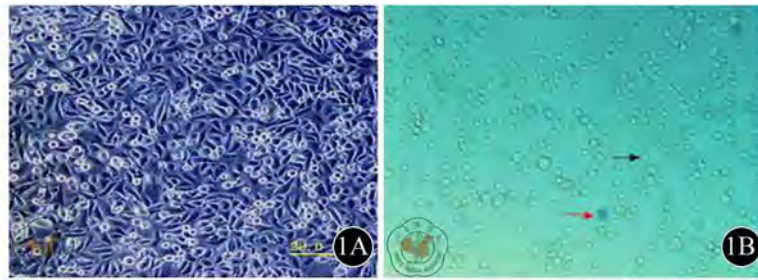


图1 贴壁细胞与细胞悬液。1A: 为细胞贴壁生长; 1B: 为细胞悬浮液台盼蓝染色情况, 红箭头所指为细胞被台盼蓝染色成蓝色, 黑箭头所指为正常细胞不被台盼蓝染色成蓝色, 细胞质透亮, 形态完整(×200)



图2 荧光显微镜下前列腺癌细胞FD500染色及细胞台盼蓝染色情况。2A: 声强20 mW/cm²组前列腺癌细胞染FD500呈弱绿色荧光; 2B: 80 mW/cm²组前列腺癌细胞染FD500呈较强的绿色荧光; 2C: 声强20 mW/cm²组, 仅见个别细胞呈蓝染; 2D: 声强80 mW/cm²组, 见少量的细胞呈蓝染(箭头所指)(×200)

三、讨论

超声生物效应机制可能包括:机械作用、热效应和空化效应等^[14],对于低频低强度超声其所产生的热效应可忽略,其产生生物学效应的主要机制为机械作用和空化效应。超声的生物学效应使细胞膜的脂质双分子层结构发生改变,从而使细胞膜的通透性增加^[3],空化效应可导致周围组织的细胞膜被击穿,产生可逆或不可逆的小孔^[4]。Miller等^[5]发现,在超声的辐照下,细胞出现短暂可逆的“声孔”现象,细胞膜通透性短暂性增加,使得大分子物质能够进入细胞内。另外有些学者认为超声通过空化效应产生了大量活性氧的同时也使超氧化物歧化酶这一自由基清除剂的浓度降低,从而使活性氧的产生远远超过它的清除,导致高浓度的活性氧在细胞外积聚,而活性氧自由基可引发脂质过氧化连锁反应使细胞膜的完整性、通透性发生改变^[6-7]。

FD500为大分子荧光物质,平均分子量约为500 000,通常难以进入完整的细胞膜,也极少进入死亡细胞^[8],而在细胞膜出现小孔时,FD500通过小孔进入细胞内,在胞质中显示绿色荧光,常作为指示剂研究细胞膜的通透性^[9-10]。台盼蓝是一种阴离子型染料,不能透过正常完整的细胞膜,故活细胞不着色,但死亡细胞可使染料通过细胞膜进入细胞内,与解体的DNA结合,从而使死亡细胞着色呈现蓝色,人们通常将其作为检测细胞存活率和死亡率的指示剂。

本研究发现,随着声强从5 mW/cm²增加到80 mW/cm²,前列腺癌细胞FD500染色阳性率逐渐增加,组间比较具有显著性意义($P < 0.05$),表明随着声强的增加产生空化效应及声孔效应逐渐增加,但细胞FD500染色阳性率较低,这可能是FD500为大分子物质,超声辐照所产生的声孔效应,使细胞膜产生的声孔不足以达到使FD500分子通过,仅少部分声孔能使FD500分子进入细胞内。同时本研究发现随着声强的增加,细胞死亡率也逐渐增加,但在20 mW/cm²与80 mW/cm²之间细胞死亡率显著增加,这可能随着声强逐渐增加声孔效应也逐渐增加,开始产生的声孔效应以可逆性声孔效应为主,细胞死亡则较少,当达到一定声强后继续增加超声强度,则产生的声孔效应主要以不可逆性

声孔效应为主,细胞死亡则较多。因此本研究结果表明低频超声产生的空化效应及声孔效应能促进细胞膜的通透性,其产生的空化效应与声强强度相关,在一定的声强范围内以可逆性声孔效应为主,当超过一定范围则以不可逆性声孔效应为主。

参考文献

- [1] Sorace AG, Warram JM, Umphrey H, et al. Microbubble-mediated ultrasonic techniques for improved chemotherapeutic delivery in cancer. *J Drug Target*, 2012, 20:43-54.
- [2] Karshafian R, Bevan PD, Williams R, et al. Sonoporation by ultrasound-activated microbubble contrast agents: effect of acoustic exposure parameters on cell membrane permeability and cell viability. *Ultrasound Med Biol*, 2009, 35:847-860.
- [3] Ter Haar G. Therapeutic applications of ultrasound. *Prog Biophys Mol Biol*, 2007, 93:111-129.
- [4] 李晓东, 王志刚. 超声波空化效应的生物学机制. *临床超声医学杂志*, 2004, 6:40-41.
- [5] Miller DL, Quddus J. Sonoporation of monolayer cells by diagnostic ultrasound activation of contrast-agent gas bodies. *Ultrasound Med Biol*, 2000, 26:661-667.
- [6] Dijkmans PA, Juffermans LJ, Musters RJ, et al. Micmbubbles and ultrasound: from diagnosis to therapy. *Eur J Echocardiogr*, 2004, 5: 245-256.
- [7] Lionetti V, Fittipaldi A, Agostini S, et al. Enhanced caveolae-mediated endocytosis by diagnostic ultrasound in vitro. *Ultrasound Med Biol*, 2009, 35:136-143.
- [8] Miller DL, Quddus J. Lysis and sonoporation of epidermoid and phagocytic monolayer cells by diagnostic ultrasound activation of contrast agent gas bodies. *Ultrasound Med Biol*, 2001, 27:1107-1113.
- [9] 赵向宏, 王筱冰, 赵萍, 等. 超声激活原卟啉IX对S180肿瘤细胞膜功能的损伤研究. *中国生物医学工程学报*, 2010, 29:894-900.
- [10] Ward M, Wu JR, Chiu JF. Experimental study of the effects of Optison concentration on sonoporation in vitro. *Ultrasound Med Biol*, 2000, 26: 1169-1175.

(收稿日期:2012-02-16)

(本文编辑:张岚)