

# 脂氟显微泡联合不同强度超声辐照兔 VX2 肿瘤对细胞黏附分子 1 表达的影响及意义

杨 希 蒋 帅 艾莉莎 李 玥 龚思铭 徐亚丽 卓忠雄 谢昭鹏

**摘 要** 目的 探讨细胞黏附分子 1(ICAM-1)在不同强度超声条件下联合脂氟显微泡辐照局部化疗兔 VX2 肿瘤组织中表达水平的变化及其意义。方法 选取经组织匀浆法于腹部皮下传代 VX2 肿瘤成功制作肿瘤模型的新西兰大白兔 20 只,随机均分为 4 组,其中 Control 组不进行任何处理;CPMs 组仅单纯瘤内注射卡铂缓释微球;S 2000 组注射卡铂缓释微球后使用西门子 S 2000 彩色多普勒超声诊断仪 4V1c 探头(声强  $0.185 \text{ W/cm}^2$ )联合脂氟显微泡辐照局部化疗肿瘤组织;AP 170 组注射卡铂缓释微球后使用 Accusonic Plus-AP 170 超声治疗仪(声强  $1.0 \text{ W/cm}^2$ )联合脂氟显微泡辐照局部化疗肿瘤组织。各实验组均行免疫组化半定量分析肿瘤组织积分光密度(IOD);Western blot 印迹法检测 ICAM-1 表达水平,并比较其差异。结果 Control 组、CPMs 组、S 2000 组及 AP 170 组瘤兔肿瘤组织的 IOD 分别为  $11\ 038.62 \pm 873.54$ 、 $12\ 953.44 \pm 771.91$ 、 $17\ 823.27 \pm 921.92$  及  $23\ 037.09 \pm 1175.46$ ,其中 AP 170 组 IOD 最高,与 S 2000 组、CPMs 组、Control 组比较差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。Control 组、CPMs 组、S 2000 组及 AP 170 组瘤兔肿瘤组织的 ICAM-1 蛋白表达量分别为  $0.1851 \pm 0.0295$ 、 $0.2543 \pm 0.0354$ 、 $0.4815 \pm 0.0391$  及  $0.6195 \pm 0.0452$ ,呈依次上升趋势,其中 AP 170 组、S 2000 组分别与 CPMs 组、Control 组比较,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ );S 2000 组与 AP 170 组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 强度较高的超声联合脂氟显微泡辐照使 ICAM-1 在肿瘤局部化疗微环境中呈高表达,对卡铂缓释微球介导的化疗药物在肿瘤细胞的增殖及转移等方面呈正反馈的影响。

**关键词** ICAM-1;超声;肿瘤;微泡;卡铂缓释微球;兔

[中图法分类号]R322;R445.1

[文献标识码]A

## Influence of different intensity ultrasonic irradiation combined with microbubbles on the ICAM-1 expression in rabbit VX2 tumor cells

YANG Xi, JIANG Shuai, AI Lisha, LI Yue, GONG Siming, XU Yali, ZHUO Zhongxiong, XIE Zhaopeng

Department of Ultrasound, the People's Hospital of Shapingba District, Chongqing 400030, China

**ABSTRACT Objective** To explore the changes of intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in rabbits VX2 tumor tissues treated by local chemotherapy under different ultrasonic irradiation combined with microbubbles. **Methods** Twenty New Zealand white rabbits that successfully produced tumor models by subcutaneously passaged VX2 tumors by tissue homogenization were selected, then divided into 4 groups: control group, without any treatment, CPMs group, only intratumoral injection of carboplatin microspheres, S 2000 group injected carboplatin sustained-release microspheres and used Siemens S 2000 color Doppler ultrasound diagnostic apparatus 4V1c probe (sound intensity  $0.185 \text{ W/cm}^2$ ) combined with lipid fluoride microbubbles to irradiate local chemotherapy tumor tissue, AP-170 group, after injection of carboplatin sustained-release microspheres, AP-170 ultrasound apparatus (sound intensity  $1.0 \text{ W/cm}^2$ ) was combined with lipid microbubbles to irradiate local chemotherapy tumor tissue. Immunohistochemistry and Western blot were performed to assess the integrated optical density (IOD) and ICAM-1 expression in tumor tissues after treatment. **Results** The IOD of tumor tissue in rabbits of control group, CPMs group, S 2000 group and AP-170 group were  $11\ 038.62 \pm 873.54$ ,  $12\ 953.44 \pm 771.91$ ,  $17\ 823.27 \pm 921.92$  and  $23\ 037.09 \pm 1175.46$ , respectively. The IOD of AP-170 group was the highest among the 4 groups, the difference were statistically significant compared with S 2000 group, CPMs group and control group (all  $P < 0.05$ ). The expression levels of ICAM-1 of control group, CPMs group,

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81371553)

作者单位:400030 重庆市沙坪坝区人民医院超声科(杨希);陆军军医大学第二附属医院超声科(蒋帅、李玥、龚思铭、徐亚丽、卓忠雄);深圳大学临床医学科学院(艾莉莎);重庆市中医院超声科(谢昭鹏)

通讯作者:卓忠雄, Email: zzx64120@163.com; 谢昭鹏, Email: xzhp2002@163.com

S 2000 group and AP-170 group were  $0.1851 \pm 0.0295$ ,  $0.2543 \pm 0.0354$ ,  $0.4815 \pm 0.0391$  and  $0.6195 \pm 0.0452$ , respectively, showing an upward trend. The difference between AP-170 group and S 2000 group was significantly higher than that of CPMs group and control group (all  $P < 0.05$ ), the difference between S 2000 group and AP-170 group was statistically significant ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion** Higher intensity of ultrasonic irradiation combined with microbubbles makes higher ICAM-1 expression in the local chemotherapy tumor microenvironment. In this condition, the chemotherapy drugs released by carboplatin sustained release microspheres would positively influence the proliferation and metastasis of tumor cells.

**KEY WORDS** Intercellular cell adhesion molecule -1; Ultrasound; Tumor; Microbubble; Carboplatin sustained release microspheres; Rabbit

细胞黏附分子 1(ICAM-1)是细胞表面的一种糖蛋白,其介导黏附反应在细胞免疫介导机制、肿瘤细胞的浸润和转移等多种生理、病理过程中均具有重要作用。前期实验<sup>[1]</sup>已证实超声联合脂氟显微泡辐照卡铂缓释微球对 VX2 肿瘤化疗疗效有一定促进作用。本实验拟采用脂氟显微泡联合不同强度超声对化疗后的肿瘤组织进行辐照,观察肿瘤细胞内 ICAM-1 分子水平的变化,旨在探讨 ICAM-1 表达在脂氟显微泡联合不同强度超声辐照局部化疗肿瘤组织中的意义。

## 材料与方法

### 一、实验动物

新西兰大白兔 20 只,均经组织匀浆法于腹部皮下传代 VX2 肿瘤成功制作成肿瘤模型,肿瘤直径 0.8~1.1 cm。所有实验动物来源于陆军军医大学动物实验中心,实验动物饲养、处死方法均经陆军军医大学实验动物福利伦理审查委员会审核,符合实验动物伦理及动物福利要求。

### 二、主要仪器与材料

使用西门子 S 2000 彩色多普勒超声诊断仪,9L4 和 4V1c 探头,频率 7.0~9.0 MHz 和 2.0~4.5 MHz; Accusonic Plus-AP 170 超声治疗仪,901150 探头(频率 1.0 MHz,占空比 20%,声强 1.0 W/cm<sup>2</sup>);电泳装置、电转装置及转膜槽(美国 Bio-Rad 公司);水囊;2%戊巴比妥钠溶液;8%硫化钠溶液;ICAM-1 抗体(北京 Bioss 公司,产品编号 bs-4615R);卡铂缓释微球(载药率 10.7%);脂氟显微造影剂(陆军军医大学第二附属医院超声科自制),微泡平均直径 2.13 μm,浓度  $7 \times 10^9$  个/ml;中杉 SP-9002,中杉 SP-9001,苏木精;上海 Tanon 5200 凝胶成像系统;鼎国 py-120 水平脱色摇床。

### 三、实验分组及方法

1. 分组:20 只建模成功的瘤兔随机分为空白对照组(Control 组)、单纯肿瘤内注射卡铂缓释微球组(CPMs 组)、S 2000 彩色多普勒超声诊断仪联合微泡造影剂+卡铂缓释微球组(S 2000 组),以及 AP 170 超声治疗仪

联合微泡造影剂+卡铂缓释微球组(AP 170 组),每组各 5 只。使用速眠新对瘤兔后腿内侧肌注(0.3 ml/kg)麻醉,9L4 超声探头测量瘤体大小,观察瘤体内部回声变化和血流信号情况。

2. 方法:①Control 组不进行特殊处理。②CPMs 组瘤兔麻醉后,计算出所需的卡铂缓释微球量(用量为 60 mg/cm<sup>3</sup>),并在超声引导下进行多方向、多点注射。③S 2000 组瘤兔麻醉后,计算出所需的卡铂缓释微球量(用量为 60 mg/cm<sup>3</sup>)并进行注射,然后经实验兔左侧耳缘静脉注入 2%戊巴比妥钠溶液(0.3 ml/kg),并以 2.0 ml 生理盐水追加注射。将 4V1c 超声探头(频率 4.5 MHz,机械指数 1.0,成像深度 6 cm,聚焦深度 3 cm)置于自制水囊上并调整深度使肿瘤位于焦点处,经耳缘静脉注入 0.1 ml/kg 的脂氟显微泡造影剂并以 2.0 ml 生理盐水追加注射,同时进行超声辐照(声强 0.185 W/cm<sup>2</sup>),辐照方式为间隔辐照,辐照 3 s,间隔 3 s,辐照时间 10 min。④AP170 组前期处理同 S 2000 组,但超声辐照使用 AP 170 超声治疗仪 901150 探头涂抹耦合剂后置于肿瘤区,辐照方式为直接辐照,时间为 10 min。

### 四、免疫组化和 Western blot 印迹法检查

各组瘤兔在实验结束 6 h 后于无菌条件下取 VX2 肿瘤组织,切成约 0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm 的小块,迅速分别放入 2 ml 无菌冻存管冻存于液氮保温瓶中,行免疫组化及 Western blot 印迹法进行相关分子学检测。

1. 免疫组化检查:参照 ICAM-1 抗体说明书进行。VX2 肿瘤组织 ICAM-1 免疫组化染色以胞膜及胞浆黄褐色、棕色为阳性表达;半定量分析使用 Version 6.0 IPP 分析软件,选择 HIS 模式下(色调 H=30,亮度 I=255,饱和度 S=220)阳性显色的方法,测算积分光密度(IOD)。

2. Western blot 印迹法:具体方法参考抗体说明书。使用 Gel-PRO ANALYZER 凝胶定量分析软件,对各组电泳带进行数据分析,测量 ICAM-1 蛋白表达量。

### 五、统计学处理

应用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,

采用单因素方差分析;组间两两比较采用 LSD 法。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

### 一、各组 ICAM-1 免疫组化结果比较

Control 组 IOD 为  $11\ 038.62 \pm 873.54$ , 肿瘤细胞染色仅见局部少量阳性表达, 大部分蓝色细胞核周边无阳性染色; CPMs 组 IOD 为  $12\ 953.44 \pm 771.91$ , 染色图片呈黄褐色区域较 Control 组少量增加, 肿瘤组织内见空泡形成; S 2000 组 IOD 为  $17\ 823.27 \pm 921.92$ , 染色图片可见部分胞浆呈棕色显示, 阳性表达较 Control 组、CPMs 组增强; AP 170 组 IOD 为  $23\ 037.09 \pm 1175.46$ ,

染色图片显示黄褐色阳性表达增高。其中 AP 170 组 IOD 最高, 与 S 2000 组、CPMs 组、Control 组比较差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。见图 1, 2。

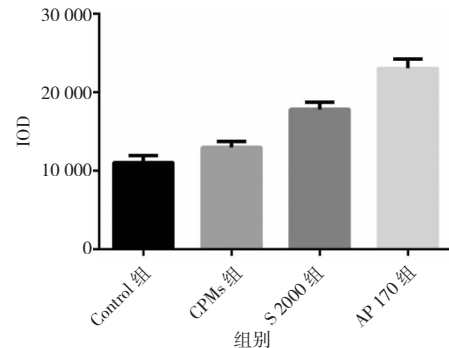
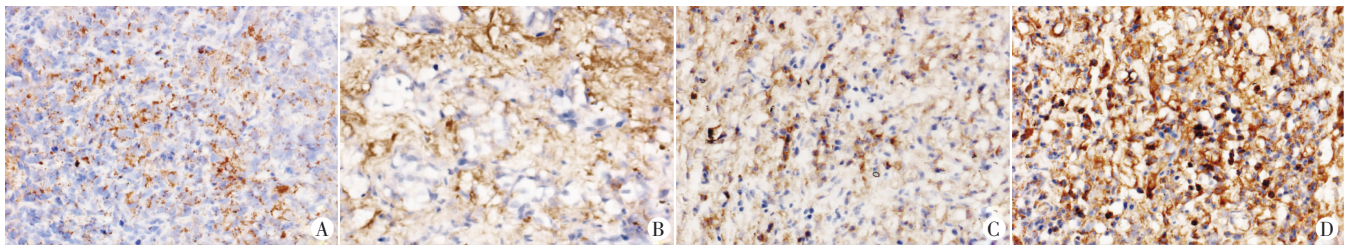


图 1 各组肿瘤组织免疫组织染色 IOD 对比图



A~D 分别为 Control 组、CPMs 组、S 2000 组及 AP 170 组。

图 2 各组肿瘤组织 ICAM-1 免疫组化染色图(SP 染色,  $\times 200$ )

### 二、各组 ICAM-1 蛋白表达情况比较

CPMs 组、S 2000 组及 AP 170 组肿瘤组织中, ICAM-1 蛋白表达量均较 Control 组升高。其中 Control 组 ICAM-1 蛋白表达量为  $0.1851 \pm 0.0295$ , 与 CPMs 组 ( $0.2543 \pm 0.0354$ ) 比较, 差异无统计学意义; AP 170 组 ICAM-1 蛋白表达量为  $0.6195 \pm 0.0452$ , 与 CPMs 组、Control 组比较, 差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ ); S 2000 组 ICAM-1 蛋白表达量为  $0.4815 \pm 0.0391$ , 与 CPMs 组、Control 组、AP 170 组比较, 差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。见图 3, 4。

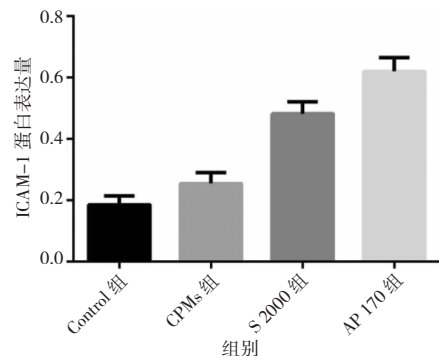


图 4 各组肿瘤组织 ICAM-1 蛋白表达量对比图

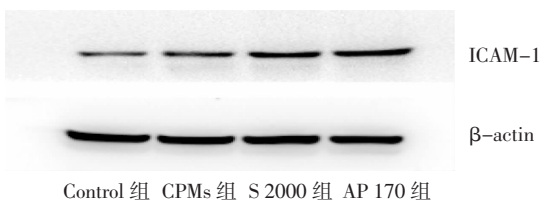


图 3 各组肿瘤组织 ICAM-1 Western blot 泳带结果

## 讨 论

肿瘤微环境是指肿瘤细胞产生和生活的内部环境, 其中不仅包括了肿瘤细胞本身, 同时还有其周围的胶质细胞、成纤维细胞、免疫细胞及炎症细胞等, 同时也包括附近区域内的细胞间质、微血管及浸润在其中的生物分子。ICAM-1 是一种分布于细胞表面的糖蛋

白, 位于内皮细胞顶端(或上皮细胞底外侧), 是白细胞通过内皮(或上皮)必需的屏障, 可以被细胞因子(TNF- $\alpha$ 、interleukin-1)和细菌脂多糖激活表达<sup>[2]</sup>。在细胞信号转导、细胞生长及移行, 免疫及炎症反应, 凝血及肿瘤的进展和转移等多种生理和病理过程中均具有重要作用<sup>[3]</sup>。超声靶向破坏微泡技术在肿瘤治疗学领域发展迅速, 其可以明显降低超声波在组织或器官引发空化效应的阈值, 而空化效应可以辅助多种药物分子, 目的基因进入肿瘤组织增强相应的生物学效应<sup>[4]</sup>。前期实验<sup>[1]</sup>已初步证实超声联合微泡辐照卡铂缓释微球对 VX2 肿瘤化疗效有一定促进作用, 本实验尝试进一步从肿瘤细胞分子水平来了解肿瘤内微环境的变化, 探讨 ICAM-1 在不同条件下肿瘤组织中的表达水平变化及意义。

本实验使用脂氟显微泡联合不同强度超声辐照局部化疗的肿瘤组织,结果发现,Control 组 ICAM-1 呈低水平表达,免疫组化染色显示 ICAM-1 IOD 为  $11\ 038.62 \pm 873.54$ , 蛋白表达量为  $0.1851 \pm 0.0295$ , 而 CPMs 组免疫组化 IOD 为  $12\ 953.44 \pm 771.91$ , 蛋白表达量为  $0.2543 \pm 0.0354$ , 较 Control 组稍增高,但差异无统计学意义。分析原因为注入卡铂缓释微球后,部分化疗药物释放刺激肿瘤细胞引起相关的防御炎症反应, ICAM-1 作为黏附分子参与调节机体免疫反应, 故其表达量相应升高,提示化疗药物对肿瘤组织细胞有一定影响。但卡铂缓释微球作为局部化疗药物进入瘤体后其释放药物过程较缓慢,因“突释效应”其首次释药峰值时间约 24 h, 而本实验观察时间为 6 h, 故两组比较差异无统计学意义。S 2000 组免疫组化染色 IOD 为  $17\ 823.27 \pm 921.92$ , 蛋白表达量为  $0.4815 \pm 0.0391$ , 与 Control 组比较差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。考虑原因为超声波击破脂氟显微泡产生大量的微射流, 导致管壁通透性增大、细胞呈损伤状态, 引起炎症反应<sup>[5-6]</sup>, 使 ICAM-1 表达量呈升高趋势。AP 170 组 ICAM-1 蛋白表达量最高, 免疫组化染色 IOD 为  $23\ 037.09 \pm 1175.46$ , 蛋白表达量为  $0.6195 \pm 0.0452$ , 与 CPMs 组、Control 组、S 2000 组比较差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。分析原因, 除了超声辐照脂氟显微泡爆破引起管壁细胞损伤、化疗药物释放引起肿瘤细胞免疫调节外, 空化作用在一定范围内会随着超声功率、微泡量的增加及辐照时间的延长而增高<sup>[7]</sup>。AP 170 组使用的辐照超声强度高于 S 2000 组, 考虑为 AP 170 组超声辐照力较 S 2000 组强, 从而引起细胞的损伤, 持续性的辐照引起肿瘤区域温度升高, 由于区域温度的升高进一步刺激炎症反应加强, ICAM-1 作为抗原细胞的辅助刺激因子发挥作用, 与其受体(白细胞功能相关抗原 1)结合, 受体在抗原提呈时在 T 细胞表面表达, 故 ICAM-1 在 AP 170 组表达水平高于其他组。

本实验有一定的不足:①本课题组前期实验研究<sup>[8]</sup>中有设计单纯超声辐照微泡组, 但其实验结果与对照

组比较差异无统计学意义; 笔者在前期预实验中也做过该分组, 实验结果与对照组比较差异无统计学意义, 故未加入本实验研究再进行讨论; ②超声辐照方式及辐照时间不同均会影响超声辐照强度大小, 本实验中 S 2000 组与 AP 170 组辐照参数并不完全相同, 有待后续实验进一步完善。

综上所述, 使用脂氟显微泡联合不同强度超声辐照局部化疗肿瘤组织, 强度较高的超声辐照使 ICAM-1 在肿瘤局部化疗微环境中呈高表达, 对卡铂缓释微球介导的化疗药物在肿瘤细胞的增殖及转移等方面呈正反馈的影响。肿瘤组织细胞在生长、浸润、转移及预后过程中, 相应的细胞分子呈不同的表达水平, ICAM-1 在肿瘤的诊断治疗和预后评估可作为相关参考指标。

#### 参考文献

- [1] 杨希, 蒋帅, 杨丹, 等. 诊断超声联合微泡辐照卡铂缓释微球对 VX2 皮下移植瘤疗效的初步探讨[J]. 中国超声医学杂志, 2016, 32(6): 547-550.
- [2] Hopkins AM, Baird AW, Nusrat A, et al. ICAM-1: targeted docking for exogenous as well as endogenous ligands[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2004, 56(6): 763-778.
- [3] 陈琪枫, 蔡清萍, 方晓明, 等. 体外模拟 CO 气腔对乳腺癌细胞 MMP-2 和黏附分子 VCAM-1、ICAM-1 表达的影响[J]. 中华内分泌外科杂志, 2015, 9(2): 125-128.
- [4] 许婷婷, 吴凤林. 超声激励微泡“空化效应”增敏肿瘤化疗现状与进展[J]. 临床超声医学杂志, 2012, 14(11): 756-758.
- [5] Li P, Zheng Y, Ran H, et al. Ultrasound triggered drug release from 10-hydroxycamptothecin-loaded phospholipid microbubbles for targeted tumor therapy in mice[J]. J Control Release, 2012, 162(2): 349-354.
- [6] Caskey CF, Hu X, Ferrara KW. Leveraging the power of ultrasound for therapeutic design and optimization[J]. J Control Release, 2011, 156(3): 279-306.
- [7] 张蔚, 白文坤, 寿文德, 等. 正交设计法优化低频超声联合微泡抑制小鼠前列腺癌细胞血管内皮生长因子表达的实验研究[J]. 临床超声医学杂志, 2015, 17(9): 577-581.
- [8] 王红卫. 超声辐照瘤内注射微泡的生物学效应及其对局部化疗增效作用研究[D]. 重庆: 第三军医大学, 2007.

(收稿日期: 2018-05-02)