

惰性气体微泡联合低频低强度超声辐照对人胰腺癌 PANC-1 细胞抑癌作用的实验研究

金婷婷 蒋天安 郑树森 王利英

摘要 **目的** 探讨惰性气体微泡联合低频低强度超声连续辐照对人胰腺癌 PANC-1 细胞的抑癌作用。**方法** 将对数生长且浓度为 1×10^6 /ml 的人胰腺癌 PANC-1 单细胞悬液按不同处理方法分成 4 组:空白对照组(加入 2.0 ml 人胰腺癌 PANC-1 单细胞悬液)、惰性气体微泡组(加入 1600 μ l 人胰腺癌 PANC-1 单细胞悬液和 400 μ l SonoVue 混悬液并充分混匀)、低频低强度超声组(加入 2.0 ml 人胰腺癌 PANC-1 单细胞悬液,再用声强 0.60 W/cm^2 、频率 1 MHz 的超声波连续辐照 60 s)和微泡+超声组(加入 1600 μ l 人胰腺癌 PANC-1 单细胞悬液和 400 μ l SonoVue 混悬液并充分混匀,再用声强 0.60 W/cm^2 、频率 1 MHz 的超声波连续辐照 60 s)。检测并比较各组细胞增殖活性和细胞凋亡率。**结果** 空白对照组、惰性气体微泡组、低频低强度超声组、微泡+超声组人胰腺癌 PANC-1 细胞增殖活性分别为 0.9356 ± 0.1652 、 1.1126 ± 0.0738 、 0.3236 ± 0.0126 、 0.1566 ± 0.0137 ,微泡+超声组细胞增殖活性均低于其余各组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。空白对照组、惰性气体微泡组、低频低强度超声组、微泡+超声组人胰腺癌 PANC-1 细胞凋亡率分别为 0.069 ± 0.007 、 0.033 ± 0.006 、 0.279 ± 0.016 、 0.678 ± 0.018 ,微泡+超声组细胞凋亡率均高于其余各组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。**结论** 惰性气体微泡联合低频低强度超声连续辐照能降低体外培养的人胰腺癌 PANC-1 细胞增殖,诱导细胞凋亡,具有明显的抑癌作用,为肿瘤治疗提供新的研究思路。

关键词 超声辐照,低频,低强度;惰性气体微泡;胰腺细胞;抑癌作用

[中图分类号]R445.1;R-331

[文献标识码]A

Experimental study on the anti-cancer effects of inert gas microbubbles combined with low frequency and intensity ultrasound on human pancreatic cancer PANC-1 cells

JIN Tingting, JIANG Tian'an, ZHENG Shusen, WANG Liying

Department of Ultrasound, Shaoxing Second Hospital, Zhejiang 312000, China

ABSTRACT **Objective** To investigate the anti-cancer effects of inert gas microbubbles combined with low frequency and intensity ultrasound irradiation on human pancreatic cancer PANC-1 cells.**Methods** The human pancreatic cancer PANC-1 single cell suspension with logarithmic growth and concentration of 1×10^6 /ml was divided into 4 groups. In the blank control group, 2.0 ml human pancreatic cancer PANC-1 single cell suspension was added. In the inert gas microbubble group, 1600 μ l human pancreatic cancer PANC-1 single cell suspension and 400 μ l SonoVue were added and fully mixed. In the low frequency and intensity ultrasound group, 2.0 ml human pancreatic cancer PANC-1 single cell suspension was added and then irradiated continuously for 60 s by low frequency and intensity ultrasound with sound intensity of 0.60 W/cm^2 and frequency of 1 MHz. In the microbubbles+ultrasound group, 1600 μ l human pancreatic cancer PANC-1 single cell suspension and 400 μ l SonoVue were added and fully mixed, and then irradiated continuously for 60 s by low frequency and intensity ultrasound with sound intensity of 0.60 W/cm^2 and frequency of 1 MHz. The proliferation activity and the apoptosis rate of cells in each group were detected.**Results** The proliferative activity of human pancreatic cancer PANC-1 cells in the blank control group, the inert gas

基金项目:绍兴市科技局科技计划项目(2018C30132)

作者单位:312000 浙江省绍兴市,绍兴第二医院医共体总院超声科(金婷婷、王利英);浙江大学医学院附属第一医院超声科(蒋天安),肝胆外科(郑树森)

通讯作者:王利英,Email:drwang88@qq.com

microbubble group, the low frequency and intensity ultrasound group and the microbubble+ultrasound group were 0.9356 ± 0.1652 , 1.1126 ± 0.0738 , 0.3236 ± 0.0126 and 0.1566 ± 0.0137 , respectively. The proliferative activity of the microbubble+ultrasound group was lower than that of the other groups, and the differences were statistically significant (all $P < 0.05$). The apoptosis rate of the blank control group, the inert gas microbubble group, the low frequency and intensity ultrasound group and the microbubble+ultrasound group were 0.069 ± 0.007 , 0.033 ± 0.006 , 0.279 ± 0.016 and 0.678 ± 0.018 , respectively. The apoptosis rate of microbubble+ultrasound group was higher than that of the other groups, and the differences were statistically significant (all $P < 0.05$). **Conclusion** Inert gas microbubbles combined with low frequency and intensity ultrasound irradiation can inhibit proliferation and induce apoptosis of human pancreatic cancer PANC-1 cells cultured in vitro, which provides a new research idea for tumor therapy.

KEY WORDS Ultrasonic irradiation, low frequency, low intensity; Inert gas microbubbles; Pancreatic cells; Carcinostasis

胰腺癌是消化系统常见的恶性肿瘤之一,发病率和死亡率呈逐年上升趋势,其致病因素目前尚未完全明确,患者临床症状隐匿不典型,恶性程度和侵袭性高,加之其表达多种耐药基因,对放疗、化疗均不敏感,预后极差,确诊后 5 年生存率仅 10%,严重威胁患者身体健康和生命^[1]。加强胰腺癌分子机制研究,提高治疗效果,延长患者生存时间,是目前亟待解决的问题。肿瘤的发生和发展是细胞凋亡与细胞增殖间动态平衡被破坏的结果,除放疗、化疗和手术治疗外,诱导细胞死亡已成为目前抗肿瘤治疗的研究热点。随着超声生物学效应的深入研究,超声治疗作为非侵入性的肿瘤治疗方法表现出良好的应用前景。低频低强度超声指频率 20 kHz~1 MHz、声强 $< 3 \text{ W/cm}^2$ 的超声波。近年来低频低强度超声辐照联合微泡造影剂在诱导肿瘤细胞凋亡、改变细胞通透性、开放生物屏障等方面取得了较好的成就,在肿瘤治疗上显示了较好的潜力^[2-3]。本实验旨在探讨惰性气体微泡联合低频低强度超声连续辐照对人胰腺癌 PANC-1 细胞的抑癌作用,为肿瘤治疗提供新的研究思路。

材料与方 法

一、主要实验材料及仪器

1. 主要实验材料:人胰腺癌 PANC-1 细胞株(中国科学院上海细胞与生物研究所细胞资源中心提供)。SonoVue 造影剂(意大利 Bracco 公司),为六氟化硫微泡冻干粉,直径为 2~5 μm ;0.9% 氯化钠溶液;特级胎牛血清(法国 Biowest 公司);RPMI 1640 液体培养基(美国 Hyclone 公司),规格 SH30809.01,含 L-谷氨酰胺,不含硝酸钙;0.25% 胰蛋白酶(美国 Gibco 公司);CCK-8 试剂盒(日本同仁化学研究所);Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(美国 BD 公司)。

2. 主要仪器:超声波治疗仪(ME740,梅特勒电子股份有限公司),由主机、超声探头、可拆卸的医用电源、供电电池组和连接线组成,探头直径 13 mm,头端呈平面圆形;分析型流式细胞仪(FACSCanto II,美国 BD 公司)。

二、实验方法

1. 细胞培养:先于 37.0℃、5% 二氧化碳湿化培养箱中将人胰腺癌 PANC-1 细胞用含 15% 特级胎牛血清的 RPMI 1640 液体培养基培养,每 2~3 d 传代 1 次。再用 0.25% 胰蛋白酶将对数生长期的人胰腺癌 PANC-1 细胞消化,收集细胞悬液,1200 r/min 离心 3 min,弃上清液,得到浓度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 的人胰腺癌 PANC-1 单细胞悬液。

2. 分组及处理方法:按处理方法不同分为 4 组。
①空白对照组:于试管内直接加入人胰腺癌 PANC-1 单细胞悬液 2.0 ml;
②惰性气体微泡组:用 5.4 ml 0.9% 氯化钠溶液稀释 SonoVue,充分振荡摇匀,制成混悬液备用;于试管内加入 1600 μl 人胰腺癌 PANC-1 单细胞悬液和 400 μl 制备好的 SonoVue 混悬液,充分混匀,使微泡浓度达到 20%;
③低频低强度超声组:于试管内加入 2.0 ml 人胰腺癌 PANC-1 单细胞悬液,试管底部均匀涂上超声耦合剂,置于超声探头上,应用低频低强度(1 MHz、 0.60 W/cm^2)超声波连续辐照 60 s;
④微泡+超声组:于试管内加入 1600 μl 人胰腺癌 PANC-1 单细胞悬液和 400 μl SonoVue 混悬液,充分混匀,使微泡浓度达到 20%;然后在试管底部均匀涂上超声耦合剂,置于超声探头上,应用低频低强度(1 MHz、 0.60 W/cm^2)超声波连续辐照 60 s。

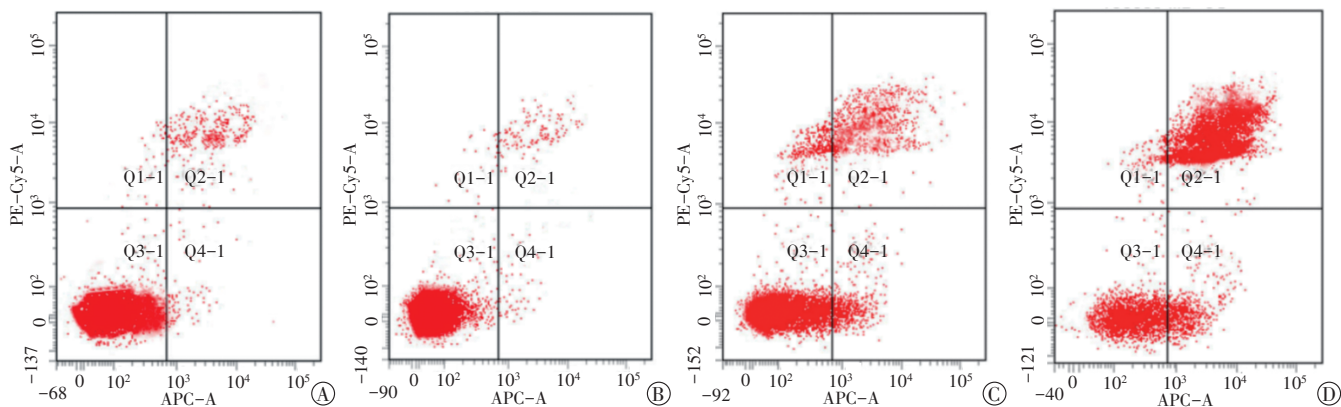
3. 检测细胞增殖活性:将已处理好的细胞接种到 96 孔板中,每孔约 100 μl 细胞悬液,置于 37.0℃、5% 二氧化碳培养箱内预培养 24 h。每孔分别加入 10 μl 细

胞计数试剂,轻拍培养板去除气泡,使其均匀混合,于培养箱中孵育3 h后,应用双波长法测定波长450 nm处的吸光度值(设定450~490 nm为检测波长,600~650 nm为参考波长)。细胞增殖活性以吸光度值表示。同一样本重复测量5次取平均值。

4. 检测细胞凋亡情况:将每组人胰腺癌PANC-1细胞浓度调整为 1×10^6 /ml,于 4°C 、1000 r/min、离心半径15 cm的离心机中离心5 min,弃上清液,将细胞重悬于200 μl 结合缓冲液中,加入5 μl Annexin V和5 μl PI混合,避光室温下反应15 min,然后应用分析型流式细胞仪分析各组细胞凋亡率。同一样本重复测量5次取平均值。

三、统计学处理

应用SPSS 10.0统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较采用SNK多重比较法,两两比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。



A: 空白对照组; B: 惰性气体微泡组; C: 低频低强度超声组; D: 微泡+超声组

图1 各组人胰腺癌PANC-1细胞凋亡率分析图

讨 论

肿瘤学认为,肿瘤细胞增殖失控和死亡抑制是肿瘤发生的主要原因,肿瘤细胞的死亡方式包括坏死、自噬和凋亡^[4-5]。其中凋亡被称为I型程序性细胞死亡;自噬被称为II型程序性细胞死亡,是广泛存在于真核细胞内的一种溶酶体依赖的降解途径。肿瘤细胞自噬的作用广泛,在肿瘤生长发育和迁移等方面具有重要作用^[5]。研究^[6]报道当细胞自噬活性超出正常水平时可转变为一种对抗细胞癌变的机制,过度自噬导致的细胞自噬性死亡可杀灭肿瘤细胞,从而达到抑癌效应。超声波可以杀灭肿瘤细胞,破坏肿瘤组织和间质,抑制肿瘤细胞增殖,主要机制为机械效应、热效应及空化效应;其中空化效应指超声波在液体中传播时,通过空化核震荡、膨胀、收缩、崩溃等一系列动力

结 果

一、各组人胰腺癌PANC-1细胞增殖活性比较

空白对照组、惰性气体微泡组、低频低强度超声组、微泡+超声组人胰腺癌PANC-1细胞增殖活性分别为 0.9356 ± 0.1652 、 1.1126 ± 0.0738 、 0.3236 ± 0.0126 、 0.1566 ± 0.0137 ,多组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。其中微泡+超声组细胞增殖活性均低于其余各组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。

二、各组人胰腺癌PANC-1细胞凋亡率比较

空白对照组、惰性气体微泡组、低频低强度超声组、微泡+超声组人胰腺癌PANC-1细胞凋亡率分别为 0.069 ± 0.007 、 0.033 ± 0.006 、 0.279 ± 0.016 、 0.678 ± 0.018 ,多组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。其中微泡+超声组细胞凋亡率均高于其余各组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。见图1。

学过程,产生的休克波使肿瘤细胞膜通透性增加,微血管破裂,内皮细胞间隙增大,并介导血管内皮层破坏,导致血管内微血栓形成,阻断恶性肿瘤组织的血供^[7]。目前超声治疗作为一种安全、无创、无辐射的治疗方式已广泛应用于肿瘤治疗。超声造影剂的微气泡可增强超声波的空化效应,近年来其在肿瘤治疗领域的研究有一定进展。研究^[8]报道超声造影剂在抗肿瘤血管作用、血脑屏障和血脊髓屏障开放、免疫疗法、诱导肿瘤细胞死亡、基因靶向治疗、药物输送等方面均有积极作用。目前最新的第二代超声造影剂主要有以SonoVue为代表的包裹惰性气体的脂质体,直径2~5 μm ,不溶于水,稳定性较好,在基础实验和临床研究中最为常用。

研究^[9]报道微泡造影剂联合低频低强度超声辐照可引起细胞膜和细胞内结构破坏、核内染色体中双螺

旋 DNA 和基因片段断裂,导致前列腺癌细胞、肝癌细胞、人白血病细胞等多种癌细胞死亡,具有明显的抑制癌细胞生长的作用,同时又可减少对正常组织和细胞的损伤。Hou 等^[10]报道微泡造影剂联合低频超声可影响肿瘤细胞的低氧反应,诱导细胞凋亡,抑制增殖,促进肿瘤细胞死亡。Yang 等^[11]报道低频超声联合微泡造影剂可促使肿瘤细胞凋亡加快,减少细胞增殖,抑制肿瘤生长和血管生成,使肿瘤迁移和侵袭能力明显减弱。本实验将惰性气体微泡与低频低强度超声联合作用于人胰腺癌 PANC-1 细胞,结果发现微泡+超声组细胞增殖活性均低于其余各组,细胞凋亡率均高于其余各组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),表明惰性气体微泡联合低频低强度超声可使人胰腺癌 PANC-1 细胞增殖活性大大减低,同时可诱导人胰腺癌 PANC-1 细胞凋亡。

既往文献^[12-13]报道惰性气体微泡联合低频低强度超声引起的癌细胞死亡与超声波频率、声强、辐照时间及微泡浓度均密切相关,即随着超声波频率增加,其空化作用增强,空化阈值降低,癌细胞凋亡增加;随着超声波声强升高,微泡与肿瘤单细胞悬液体积比增加及超声连续辐照时间延长,使癌细胞凋亡增加。张蔚等^[13]通过重复正交试验发现,微泡与肿瘤单细胞悬液体积比达到 20% 时可明显诱导肿瘤细胞凋亡,降低肿瘤细胞存活率,从而抑制肿瘤组织增殖、活化及浸润,发挥抗癌作用。本实验因条件有限,未进行重复正交试验,故未获得增加人胰腺癌 PANC-1 细胞整体凋亡率、抑制肿瘤组织增殖及活化的超声波频率、声强、辐照时间及微泡浓度的相应阈值。本课题组下一步将争取条件实现重复正交试验,获得上述参数的阈值,并建立兔 VX2 胰腺癌模型,探讨惰性气体微泡联合低频低强度超声连续辐照对胰腺癌动物模型的抑癌效果。

综上所述,惰性气体微泡联合低频低强度超声辐照能降低体外人胰腺癌 PANC-1 细胞增殖活性,诱导细胞凋亡,具有明显的抑癌作用,为临床肿瘤治疗提供了新的研究思路。

参考文献

[1] Tempero MA. NCCN Guidelines Updates: Pancreatic Cancer [J].

- J Natl Compr Canc Netw, 2019, 17(5): 603-605.
- [2] Shen Y, Pi Z, Yan F, et al. Enhanced delivery of paclitaxel liposomes using focused ultrasound with microbubbles for treating nude mice bearing intracranial glioblastoma xenografts [J]. Int J Nanomedicine, 2017, 12(8): 5613-5629.
- [3] Guo X, Guo S, Pan L, et al. Anti-microRNA-21/221 and microRNA-199a transfected by ultrasound microbubbles induces the apoptosis of human hepatoma HepG2 cells [J]. Oncol Lett, 2017, 13(5): 3669-3675.
- [4] Vicar T, Raudenska M, Gumulec J, et al. The quantitative-phase dynamics of apoptosis and lytic cell death [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 1566.
- [5] Sarosiek KA, Fraser C, Muthalagu N, et al. Developmental regulation of mitochondrial apoptosis by c-Myc governs age- and tissue-specific sensitivity to cancer therapeutics [J]. Cancer Cell, 2017, 31(1): 142-156.
- [6] Cao Y, Li Q, Liu L, et al. Modafinil protects hippocampal neurons by suppressing excessive autophagy and apoptosis in mice with sleep deprivation [J]. Br J Pharmacol, 2019, 176(9): 1282-1297.
- [7] Shen ZY, Liu C, Wu MF, et al. Spiral computed tomography evaluation of rabbit VX2 hepatic tumors treated with 20 kHz ultrasound and microbubbles [J]. Oncol Lett, 2017, 14(3): 3124-3130.
- [8] Wang LY, Zheng SS. Advances in low-frequency ultrasound combined with microbubbles in targeted tumor therapy [J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2019, 20(4): 291-299.
- [9] Bai WK, Zhang W, Hu B, et al. Liposome-mediated transfection of wild-type P53 DNA into human prostate cancer cells is improved by low-frequency ultrasound combined with microbubbles [J]. Oncol Lett, 2016, 11(6): 3829-3834.
- [10] Hou R, Xu Y, Lu Q, et al. Effect of low-frequency low-intensity ultrasound with microbubbles on prostate cancer hypoxia [J]. Tumour Biol, 2017, 39(10): 1010428317719275. doi: 10.1177/1010428317719275.
- [11] Yang Y, Bai W, Chen Y, et al. Low-frequency ultrasound-mediated microvessel disruption combined with docetaxel to treat prostate carcinoma xenografts in nude mice: a novel type of chemoembolization [J]. Oncol Lett, 2016, 12(2): 1011-1018.
- [12] 徐卫平, 申锴, 胡兵. 低频超声联合微泡影响前列腺癌 DU145 细胞血管内皮细胞生长因子表达的实验研究 [J]. 中华医学超声杂志(电子版), 2013, 10(12): 1027-1030.
- [13] 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.

(收稿日期: 2022-04-21)