

超声联合微泡对卡铂化疗 A549 肺癌细胞凋亡影响的实验研究

李玥 蒋帅 杨希 龚思铭 何颖 曹军英 卓忠雄

摘要 目的 探讨超声联合微泡在卡铂化疗 A549 肺癌细胞凋亡中的作用。方法 将 A549 细胞依据不同处理方式分为对照组(未经任何处理)、US 组(仅使用超声辐照)、USMB 组(使用超声辐照联合微泡)、CBP 组(仅使用卡铂)、CBP+US 组(使用超声辐照+卡铂)、CBP+USMB 组(使用超声辐照联合微泡+卡铂),其中卡铂采用最适宜剂量 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$,超声辐照参数:声强 0.6 W/cm^2 ,辐照时间 60 s。处理后培养 24 h,每组分别消化、离心、收集细胞,加入 FITC 标记的 Annexin V、PI 室温避光 15 min,使用流式细胞术检测各组 A549 肺癌细胞早期凋亡率、晚期凋亡率、总凋亡率,并对检测结果进行比较。结果 A549 肺癌细胞总凋亡率由低到高依次为对照组、US 组、USMB 组、CBP 组、CBP+US 组、CBP+USMB 组,其中 CBP+USMB 组早期凋亡率、晚期凋亡率、总凋亡率与其余各组比较,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$);CBP+US 组与 CBP 组晚期凋亡率、总凋亡率比较,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。结论 超声联合微泡在卡铂化疗 A549 肺癌细胞凋亡中有协同作用。

关键词 超声辐照;微泡;凋亡;空化效应;卡铂;A549 肺癌细胞

[中图分类号]R445.1

[文献标识码]A

Experimental study on the effect of ultrasound combined with microbubbles on apoptosis of A549 cells treated with carboplatin

LI Yue, JIANG Shuai, YANG Xi, GONG Siming, HE Ying, CAO Junying, ZHUO Zhongxiong

Department of Ultrasound, General Hospital of Northern Theater Command, Shenyang 110016, China

ABSTRACT Objective To investigate the effect of ultrasound combined with microbubbles on apoptosis of A549 cells treated with carboplatin. **Methods** A549 cells were divided into control group (without any treatment), US group (ultrasonic irradiation only), USMB group (ultrasonic irradiation combined with microbubbles), CBP group (carboplatin only), CBP+US group (ultrasonic irradiation combined with carboplatin) and CBP+USMB group (ultrasonic irradiation combined with microbubbles and carboplatin) according to different treatment methods, in which carboplatin was used at an optimal dose of 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ultrasonic irradiation was used at the intensity of 0.6 W/cm^2 , and the irradiation time was 60 s. After 24 h of treatment, the cells in each group were detached, centrifuged and collected. FITC-labeled Annexin V and PI were added for 15 min. The early, late and total apoptosis rate of A549 cells were detected by flow cytometry, and the differences were compared. **Results** The total apoptosis rate of A549 cells from low to high was in the order of control group, US group, USMB group, CBP group, CBP+US group, CBP+USMB group. The early, late and total apoptosis rates of CBP+USMB group were significantly different compared with those of the rest groups (all $P < 0.01$). The late and total apoptosis rates between the CBP+US group and CBP group were significantly different (both $P < 0.01$). **Conclusion** Ultrasound combined with microbubbles play a synergistic role in carboplatin-induced apoptosis of A549 cells.

KEY WORDS Ultrasonic irradiation; Microbubbles; Apoptosis; Ultrasonic cavitation; Carboplatin; A549 cells

基金项目:国家自然科学基金项目(81371553)

作者单位:110016 沈阳市,北部战区总医院超声诊断科(李玥、曹军英);解放军 32170 部队(蒋帅);沙坪坝区人民医院超声医学科(杨希);

陆军军医大学第二附属医院超声科(龚思铭、何颖);贵黔国际总医院超声医学中心(卓忠雄)

通讯作者:卓忠雄, Email: zzx64120@163.com

据 2020 年国际癌症研究中心数据显示,我国已成为肺癌疾病负担最重的国家,肺癌发病率和死亡率逐年上升,分别占全球总病例的 37.0%、39.8%^[1]。我国肺癌临床诊疗指南(2021 版)^[2]针对可完整切除的 II A~II B 期非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)患者,推荐以铂类为基础的方案进行辅助化疗;针对 III A 期可手术的 NSCLC 患者,推荐术后含铂两药方案辅助化疗;针对 III 期不可切除的 NSCLC 患者,推荐以铂类为主的同步化疗方案或序贯化疗方案(均为 I 类推荐证据)。卡铂作为肺癌化疗方案一线药物,确保其抗肿瘤疗效并减少严重全身毒副作用一直是临床医学面临的难题。微泡作为无肝、肾毒性的超声对比增强剂,在超声辐照下可向肿瘤递送化学治疗剂,该方法称为声化疗^[3]。化疗过程中,超声联合微泡(ultrasound combined with microbubbles, USMB)可以开放生物膜屏障、辅助化疗药物进入肿瘤细胞,改善药物分布^[4-5]。本实验旨在探讨 USMB 在卡铂化疗 A549 肺癌细胞凋亡中的作用。

材料与方法

一、主要实验材料

1. 细胞及试剂:A549 肺癌细胞系(由陆军军医大学第二附属医院中心实验室提供);胎牛血清(澳大利亚 AusGeneX 公司),DMEM/F12 培养基(武汉普诺赛生命科技有限公司),青-链霉素(美国 GE Healthcare Life Sciences 公司)、胰酶(北京索莱宝科技有限公司),卡铂(昆明贵研药业有限公司)。SonoVue(意大利 Bracco 公司,2~5×10⁸个微泡/ml)。医用超声耦合剂(重庆安碧捷科技股份有限公司)。Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒(美国 BD Pharmingen 公司)。

2. 仪器:彩色多普勒超声诊断仪(Accusonic Plus-AP 170,澳大利亚 Metron 公司),901150 探头,面积 5 cm²,声强 0~3 W/cm²;流式细胞仪(Gallios,美国 Beckman Coulter 公司);离心机(5702 R,德国 Eppendorf 公司)。

二、主要实验方法

1. 细胞培养、传代及分组:A549 肺癌细胞采用 DMEM/F12 培养基(含 10% 胎牛血清、1% 青-链霉素)于 37℃、5% 二氧化碳孵箱中培养。待细胞贴壁生长融汇至 80%~85%,用 0.25% 胰酶(不含 EDTA)消化,行 1:3 传代培养。取对数生长期细胞,于 6 孔板中每孔配

置 5×10⁵ 个细胞悬液,设置 6 组:对照组(未经任何处理)、US 组(仅使用超声辐照)、USMB 组(使用超声辐照联合微泡)、CBP 组(仅使用卡铂)、CBP+US 组(使用超声辐照+卡铂)、CBP+USMB 组(使用超声辐照联合微泡+卡铂);其中卡铂均采用最适宜剂量 50 μg/ml^[6]。超声辐照方法:保持孔板水平,于每孔板底部涂耦合剂后进行超声辐照,每 15 s 水平转动探头 90°,避免探头各个区域能量差异所致辐照能量不均。超声辐照参数:声强 0.6 W/cm²,峰值负压 0.35 MPa,占空比 10%,中心频率 1 MHz,脉冲重复频率 100 Hz,辐照时间 1 min^[6]。SonoVue 微泡配制:加入 5 ml 注射用 0.9% 生理盐水振荡并完全溶解冻干物,制成六氟化硫微泡混悬液,使用血球计数板计数,加入培养基稀释至细胞与微泡数量比约 1:1。

2. 流式细胞术检测各组 A549 肺癌细胞凋亡率:各组处理后培养 24 h。收集上清液中的悬浮细胞,使用 PBS 漂洗 2 次,加入胰酶(不含 EDTA)消化细胞,轻柔吹打并收集细胞悬液,合并上清液与消化下的细胞悬液,离心 5 min(1000 r/min),使用 PBS 漂洗后再次离心 5 min(1000 r/min)重悬加入 EP 管,离心(1000 r/min, 5 min)去上清液,将细胞重新悬浮在 100 μl 结合缓冲液(约 1×10⁵ 个细胞),转至 5 ml 试管中,加入 5 μl FITC 标记的 Annexin V、5 μl PI 室温避光反应 15 min,加入 400 μl 结合缓冲液,在 1 h 内使用流式细胞仪检测各组 A549 肺癌细胞凋亡率;应用 Kaluza 分析软件(美国 Beckman Coulter 公司)分析其结果。其中,Annexin V(+)/PI(-)提示早期凋亡细胞;Annexin V(+)/PI(+)提示晚期凋亡细胞;总凋亡率=早期凋亡率+晚期凋亡率。各组均收集 3 个独立样本,取平均值。

三、统计学处理

应用 SPSS 26.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

各组 A549 肺癌细胞 24 h 凋亡率点阵图见图 1。检测 12 000 个细胞,其中右上象限示晚期凋亡细胞,右下象限示早期凋亡细胞,左下象限示正常细胞。

各组 A549 肺癌细胞凋亡率比较见表 1。A549 肺癌细胞总凋亡率由低到高依次为对照组、US 组、USMB 组、CBP 组、CBP+US 组、CBP+USMB 组;其中

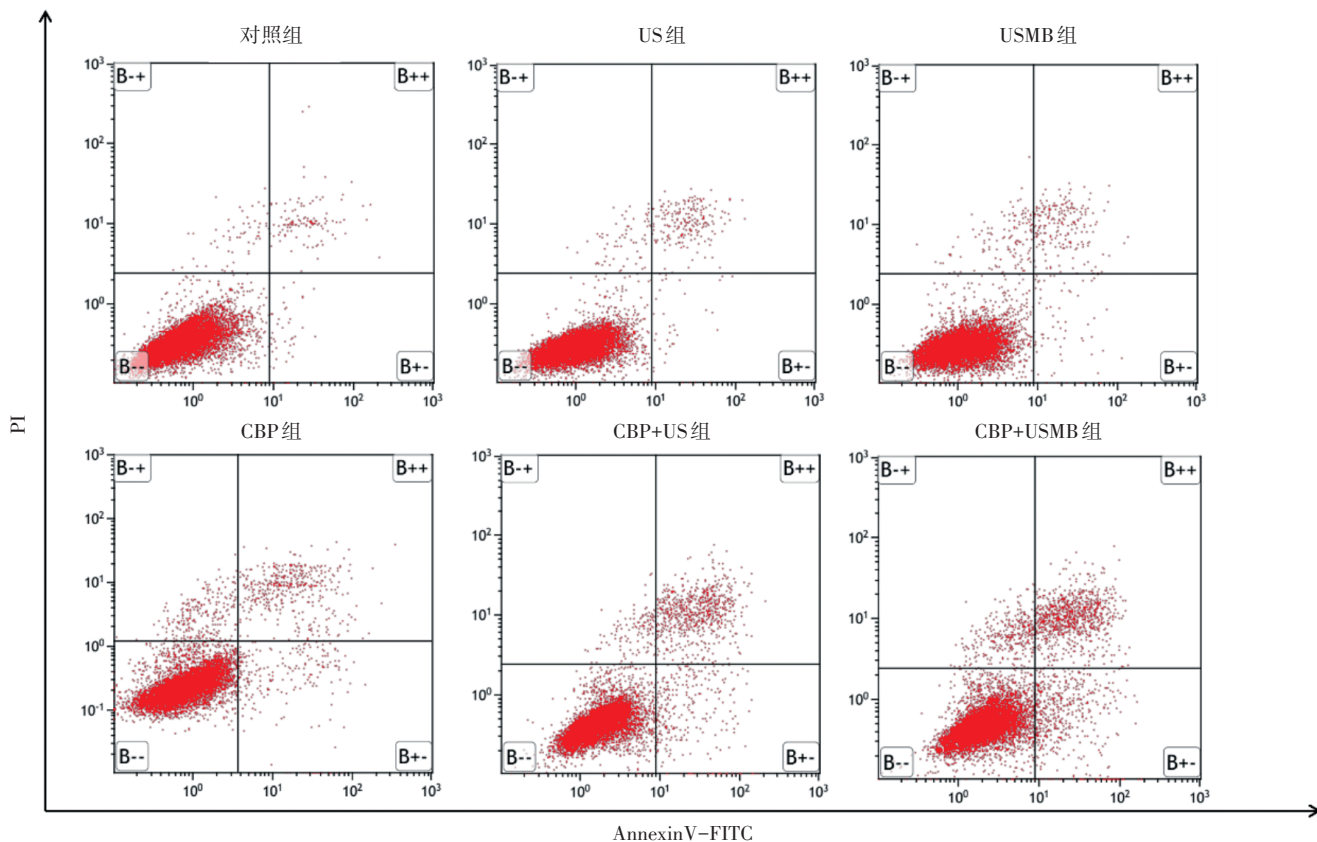


图1 流式细胞术检测各组A549肺癌细胞24 h凋亡率点阵图

CBP+USMB组早期凋亡率、晚期凋亡率、总凋亡率均最高,与其余各组比较差异均有统计学意义(均 $P<0.01$),CBP+US组与CBP组晚期凋亡率、总凋亡率比较,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)。CBP组早期凋亡率、晚期凋亡率、总凋亡率与对照组、US组、USMB组比较差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)。对照组、US组、USMB组早期凋亡率、晚期凋亡率、总凋亡率两两比较差异均无统计学意义。

表1 各组A549肺癌细胞凋亡率比较($\bar{x}\pm s$) %

组别	早期凋亡率	晚期凋亡率	总凋亡率
对照组	0.45±0.11 ^{#△}	1.34±0.49 ^{#*△}	1.79±0.59 ^{#*△}
US组	0.56±0.23 ^{#*△}	1.51±0.16 ^{#*△}	2.07±0.10 ^{#*△}
USMB组	0.65±0.26 ^{#*△}	1.94±0.21 ^{#*△}	2.59±0.28 ^{#*△}
CBP组	1.84±0.08 [#]	2.86±0.84 ^{#*}	4.70±0.90 ^{#*}
CBP+US组	1.82±0.42 [#]	5.69±0.36 ^{#△}	7.51±0.74 ^{#△}
CBP+USMB组	3.39±0.92 ^{*△}	7.99±0.54 ^{*△}	11.39±0.54 ^{*△}

与CBP+USMB组比较, [#] $P<0.01$;与CBP+US组比较, ^{*} $P<0.01$;与CBP组比较, [△] $P<0.01$

讨 论

含铂类化疗方案是肺癌治疗的常用方法,如何促进铂类药物于肿瘤靶区局部充分释放、改善其在

瘤区的分布、减少全身毒副作用成为当前研究热点^[7]。Shen等^[8]采用USMB联合含铂类化疗方案治疗3例晚期恶性肿瘤患者,发现肝转移瘤、腹壁转移瘤直径缩小,患者疼痛症状减轻。超声靶向药物递送主要机制包括空化、声孔效应、声辐射力、声流;其中超声空化为液体介质中的气体核(微泡)经超声波作用后发生振荡、生长、破裂等一系列动力学过程。当微泡在细胞附近振荡时,对细胞产生的剪切力可诱导细胞膜瞬时穿孔,即声孔效应,为开放生物膜屏障提供暂时、可逆的时间窗,同时刺激细胞内吞作用,促进超声辐照区细胞的药物分子摄取。流体介质中的声辐射力及声流通过产生压力梯度,推动药物粒子在声波传播方向的递送^[9-10]。各机制相互作用产生一系列化学和机械效应,促进化疗药物穿透生物膜屏障。本实验旨在探讨USMB在卡铂化疗A549肺癌细胞凋亡中的作用。

抵抗细胞死亡为癌症的六大特征之一^[11],细胞凋亡属于程序性细胞死亡。本实验采用最适宜的超声辐照参数与卡铂剂量^[6]联合作用于A549肺癌细胞,结果显示CBP+USMB组、CBP+US组总凋亡率与CBP组及其余各组比较,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$),

表明 USMB 可协同卡铂诱导 A549 肺癌细胞凋亡。其可能机制有:①USMB、超声引发一系列化学效应(如超声、USMB 与卡铂可协同诱导 A549 肺癌细胞内源性钙释放,钙超载为 A549 肺癌细胞凋亡的可能机制^[12]),诱导 A549 肺癌细胞凋亡;②超声空化、声孔效应、声辐射力、声流等产生一系列机械效应,作用于细胞膜屏障,增加了卡铂药物递送效能;③化学效应与机械效应协同诱导 A549 肺癌细胞凋亡。本实验中 CBP+USMB 组早期凋亡率、晚期凋亡率、总凋亡率均最高,与其余各组比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$),原因可能为 CBP+USMB 组 SonoVue 微泡的物理特性使其成为理想空化核,降低了稳态空化的阈值。在较低声强下,微泡发生稳态空化并形成微流,从而促进微泡及粒子位移,对相邻细胞产生剪切力,增加细胞膜通透性,增加卡铂药物递送并协同诱导 A549 肺癌细胞凋亡。Cao 等^[13]研究发现 USMB 组 AsPC-1 胰腺癌细胞凋亡率增高,与 US 组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);而本实验中 USMB 组、US 组、对照组早期凋亡率、晚期凋亡率、总凋亡率两两比较差异均无统计学意义,原因可能为该超声辐照条件下,USMB 产生的空化效应较弱,无法直接诱导 A549 肺癌细胞凋亡。本实验 CBP+US 组早期凋亡率与 CBP 组比较差异无统计学意义,但晚期凋亡率及总凋亡率比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$);而本课题组前期实验^[6]显示两组细胞存活率比较差异有统计学意义,表明 CBP+US 组可抑制 A549 肺癌细胞活性,但未明显诱导细胞凋亡,未联合微泡的 CBP+US 组产生的空化效应及卡铂药物递送效能较 CBP+USMB 组低,有待进一步优化参数以调控其诱导细胞早期凋亡。

本实验的局限性:仅使用流式细胞术检测各组 A549 肺癌细胞凋亡率,实验方法单一、数据不够充分,今后将进一步优化超声参数,进行体外及动物实验,检测肿瘤凋亡信号通路相关蛋白表达水平,探讨超声、USMB 联合化疗药物诱导肿瘤凋亡的分子机制、微泡声学行为与促进药物递送之间的关系,拟实现药物的超声控释与局部靶向释放。

综上所述,USMB 在卡铂化疗 A549 肺癌细胞凋亡中有协同作用。

参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] 中华医学会肿瘤学分会,中华医学会杂志社.中华医学会肿瘤学分会肺癌临床诊疗指南(2021版)[J].中华肿瘤杂志,2021,43(6): 591-621.
- [3] Lammertink BH, Bos C, Deckers R, et al. Sonochemotherapy: from bench to bedside[J]. Front Pharmacol, 2015, 6(1): 138.
- [4] 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.
- [5] Deprez J, Lajoie G, Engelen Y, et al. Opening doors with ultrasound and microbubbles: beating biological barriers to promote drug delivery[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2021, 172(1): 9-36.
- [6] 李玥,龚思铭,蒋帅,等.超声联合微泡辅助卡铂抑制体外人肺癌 A549 细胞活性的适宜剂量和能量参数研究[J].临床超声医学杂志, 2018, 20(10): 649-653.
- [7] 李玥.超声联合微泡对 A549 肺癌细胞卡铂化疗微环境中 Ca^{2+} 稳态影响的实验研究[D].重庆:陆军军医大学,2019.
- [8] Shen Z, Shao J, Zhang J, et al. Ultrasound cavitation enhanced chemotherapy: in vivo research and clinical application[J]. Exp Biol Med (Maywood). 2020, 245(14): 1200-1212.
- [9] Lu S, Zhao P, Deng Y, et al. Mechanistic insights and therapeutic delivery through micro/nanobubble-assisted ultrasound[J]. Pharmaceutics, 2022, 14(3): 480.
- [10] Delaney LJ, Isguven S, Eisenbrey JR, et al. Making waves: how ultrasound-targeted drug delivery is changing pharmaceutical approaches[J]. Mater Adv, 2022, 3(7): 323-334.
- [11] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. Cell, 2011, 144(5): 646-674.
- [12] 李玥,龚思铭,蒋帅,等.超声联合微泡对 A549 肺癌细胞卡铂化疗微环境中 Ca^{2+} 稳态的影响[J].中华超声影像学杂志, 2019, 28(2): 166-172.
- [13] Cao J, Hu C, Zhou H, et al. Microbubble-mediated cavitation promotes apoptosis and suppresses invasion in AsPC-1 cells [J]. Ultrasound Med Biol, 2021, 47(2): 323-333.

(收稿日期:2022-12-14)