

# 低频超声对卵巢癌 COC1 细胞增殖和凋亡的影响

杨志宏,王智彪,于廷和

Influence of Low Frequency Ultrasound on Proliferation and Apoptosis of Human Ovarian COC1

YANG Zhi-hong, WANG Zhi-biao, YU Ting-he

Institute of Ultrasound Engineering in Medicine of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

**Abstract:** **Objective** To investigate the effect of low frequency ultrasound on proliferation and apoptosis of human ovarian cell line COC1. **Methods** The growth inhibitory effect of ultrasound exposure (0.24 MHz, 5.12 W/cm<sup>2</sup> × 5s) on COC1 cell was observed by MTT colorimetric assay; Cell apoptosis was analyzed using flow cytometry (FCM); Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-digoxin nick end labeling (TUNEL); Phase contrast light microscope and Electron microscope were applied to detect the morphological changes of COC1 cell. **Results** Sonication could obviously inhibit the proliferation of COC1 cell; The absorbance value (A<sub>570</sub>) of MTT significantly decreased at 12h, 24h, 36h and 48h after sonication as compared to control group; The apoptosis rate was found to reach (25.57 ± 4.68) % by FCM, and brown-colored positive apoptotic cells were observed with TUNEL method at 6h after sonication; Typical morphological changes of apoptosis such as apoptotic bodies were found under phase contrast light microscope and Transmission electron microscope. **Conclusion** The results suggest that low frequency ultrasound can suppress proliferation and induce apoptosis in vitro in human ovarian cell line COC1.

**Keywords:** Ultrasound; Apoptosis; COC1 cell

**摘要:** **目的** 观察低频超声对人卵巢癌 COC1 体外生长的影响。 **方法** 以低频超声 (频率 0.24 MHz, 剂量 5.12 W/cm<sup>2</sup> × 5s) 辐照 COC1 细胞, 采用 MTT 观察超声对 COC1 细胞增殖的抑制作用; 流式细胞仪 (FCM)、TUNEL 法和光、电镜检测细胞凋亡。 **结果** 超声波能够显著抑制卵巢癌 COC1 细胞增殖, 辐照后 12h、24h、36h 和 48h, 其 MTT 光吸收值与对照组相比显著降低; FCM 检测超声辐照后 6h 的 COC1 细胞凋亡率达 (25.57 ± 4.68) %; 同时 TUNEL 法观察到棕褐色着染的凋亡细胞; 相差显微镜及电镜下可见凋亡小体形成等典型形态学改变。 **结论** 低频超声辐照对人卵巢癌 COC1 细胞体外生长具有明显的抑制作用, 并可诱导其凋亡。

**关键词:** 超声; 细胞凋亡; COC1 细胞

中图分类号: R73-3; R737.31 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578 (2004) 05-0249-03

## 0 引言

超声治疗作为近年来兴起的非侵入性肿瘤治疗技术在肿瘤治疗中已显示应用前景, 高强度聚焦超声治疗实体肿瘤已进入临床<sup>[1]</sup>。超声在抗癌治疗应用的临床前研究涉及基因治疗、化疗增效、声动力治疗等, 超声对癌细胞的生物学效应与其空化 (cavitation) 作用有关<sup>[2]</sup>。近来, 超声空化机制诱导离体血液和淋

巴系统肿瘤细胞系凋亡的研究已有报道<sup>[3-5]</sup>。

由于目前尚无超声诱导实体肿瘤细胞株凋亡的研究报道, 本研究旨在探讨低频超声辐照对卵巢癌 COC1 细胞株增殖的影响, 为其在肿瘤治疗中应用提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

卵巢癌 COC1 细胞株为悬浮细胞, 源于分化较差的卵巢癌患者腹水, 中国医科院肿瘤所建株, 由中国典型培养物宝藏中心提供。MTT、碘化丙啶 (PI)

收稿日期: 2003-09-16; 修回日期: 2003-12-09  
基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30200060)  
作者单位: 400016 重庆医科大学医学超声工程研究所 (省部共建国家重点实验室)

和 RNA 酶均为 Sigma 公司产品。脱氧核苷酸末端转移酶原位标记 (TUNEL) 检测试剂盒为 Introgen 产品 (ApopTag Kit, Inter gen Com pany); Bio-Rad Model550 酶联免疫检测仪为美国 Bio-Rad 产品; FACSCalibur 流式细胞仪为美国 B-D 公司的产品。透射电镜 H-600 为日本日立公司产品; 超声辐照装置与以往报告中所采用的相同<sup>[6]</sup>, 由重庆医科大学医学超声工程研究所设计制造: 探头直径 8cm, 以透镜聚焦, 焦距 50~80mm, 采用  $5.12\text{W}/\text{cm}^2 \times 5\text{s}$  剂量辐照, 因已证实该剂量不导致培养的肿瘤细胞急性死亡<sup>[7]</sup>, 探头位于盛脱气生理盐水底部, 声波由下向上发出。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 卵巢癌 COC1 细胞用含 10% 灭活小牛血清的 PRMI-1640 培养液, 在含 5%  $\text{CO}_2$ 、37 条件下培养。当细胞接种 24 小时达对数生长期时, 调整细胞浓度为  $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7/\text{ml}$ , 取 1ml 细胞悬液放入聚乙烯试管固定于焦域内, 试管底部距探头 50mm 进行辐照, 对照组予以假照。

**1.2.2 COC1 细胞活性 MTT 检测** 调整超声辐照后的 COC1 细胞密度至  $5 \times 10^4/\text{ml}$ , 每孔 100 $\mu\text{l}$  分别接种于 4 块 96 孔板, 37 5%  $\text{CO}_2$  培养箱培养, 1~3 列作为对照组, 4~6 列为辐照组。辐照后 12h、24h、36h 和 48h、分别取一块 96 孔板做 MTT 染色, 用酶联免疫检测术在 570nm 波长下测定吸光度值  $A_{570}$ 。

**1.2.3 流式细胞术检测 DNA 含量** 超声辐照后的 COC1 细胞继续培养, 并于 6h、12h 和 24h, 取  $10^6$  细胞离心, PBS 洗涤, 沉淀 4 70% 酒精固定, RNA 酶孵育, PI 染色, 上机测定细胞周期分布和凋亡率; 用正常的 COC1 作为对照组。

**1.2.4 TUNEL 法检测凋亡细胞** 超声辐照后 6h, 离心涂片, 用 TUNEL 试剂盒检测凋亡细胞, 显微镜下观察并拍照。

**1.2.5 细胞形态学观察** 超声处理后 6h, 在培养情况下, 相差显微镜下观察; 并收集细胞 2.5% 戊二醛固定 2h, 制备透射电镜标本观察并拍照。

**1.2.6 数据处理** 采用  $t$  检验。

## 2 结果

**2.1 超声对 COC1 细胞生长的影响** 用 MTT 法检测超声辐照对细胞增殖的影响发现, 超声作用后 12h、24h、36h 和 48h COC1 细胞的吸光度值 ( $A_{570}$ ) 明显较对照组低 (图 1)。提示超声辐照抑制 COC1 细胞增殖。

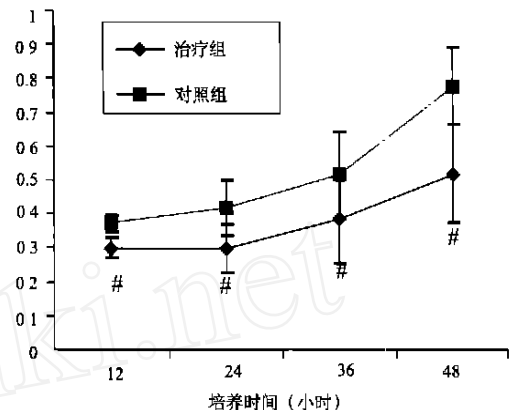


图 1 超声对 COC1 细胞增殖的影响

**2.2 超声对 COC1 细胞凋亡的诱导作用** 为了进一步探讨细胞增殖抑制是否与细胞凋亡有关, 用 FCM 检测 DNA 含量发现, 超声作用 COC1 细胞 6h、12h 和 24h 后, DNA 直方图上均出现低于  $G_1$  期二倍体含量的亚二倍体峰 (Hypodiploid peak, 亚  $G_1$  峰), 凋亡率在 6h 达到高峰 ( $25.57 \pm 4.68$ )%, 随后逐渐下降, 分别为 ( $21.7 \pm 4.59$ )% 和 ( $15.2 \pm 3.71$ )%。图 2 为 FCM 检测的超声作用后不同时间 COC1 细胞凋亡的分析图。以上结果提示超声辐照能够诱导 COC1 细胞凋亡。

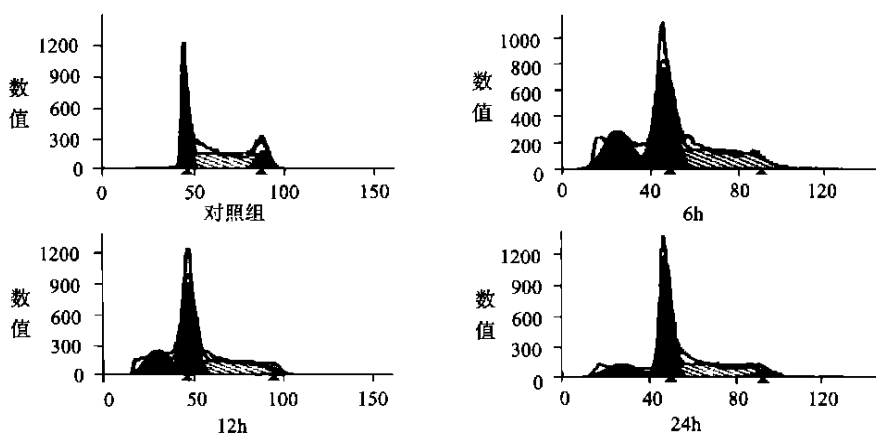


图 2 超声辐照后不同时间培养的 COC1 细胞流式细胞术检测分析

2.3 TUNEL 法检测凋亡细胞 细胞凋亡最明显的生化特征是核酸内切酶激活导致染色体 DNA 在核小体连接部位断裂,断链含有游离的 3' 羟基末端,用末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记,简称 TUNEL 法检测寡核苷酸片断发现,超声辐照 COC1 细胞后 6h,可见凋亡细胞核呈棕色或棕褐色着色,凋亡细胞变圆,体积缩小;而对照组着色细胞极少(图 3)。提示超声通过激活核酸内切酶导致 COC1 细胞凋亡。

2.4 细胞形态学观察 来自细胞内外的各种信号可诱导不同的细胞发生凋亡,但凋亡的不同类型细胞却呈现相同一致的特征性的形态改变,用倒置相差显微镜观察超声辐照后 6h 的 COC1 细胞发现,COCl 凋亡细胞胞膜出泡 (bledding) 和凋亡小体(图 4);电镜超微结构见染色质凝集分块,最后形成凋亡小体(图 5)。表明超声诱导 COC1 细胞凋亡呈现凋亡细胞相同一致的特征性改变。

### 3 讨论

细胞凋亡可以被多种生理、病理刺激所诱发,是细胞对所处环境某些特定信息的一种应答反应,涉及细胞信号传导及调控。细胞增殖失控和凋亡抑制是肿瘤发生的主要原因,凋亡诱导途径的缺陷导致肿瘤细胞生长失控。当细胞凋亡抵抗机制阻止携带 DNA 损伤的细胞凋亡时,就有助于肿瘤的形成,所以抵抗凋亡是肿瘤形成的基础。化疗主要是通过诱导细胞凋亡途径实现的<sup>[7]</sup>,因而诱导肿瘤细胞的凋亡就会抑制肿瘤的生长。

超声生物效应包括热、机械和空化机制。超声空化分为稳态空化和瞬态空化,稳态空化指媒介中气泡振动进入共振状态;瞬态空化指当声强较高时,在声波负压半周期内气泡迅速膨胀,随后被压缩至崩溃,在短时间内气泡温度可达数千度,压力高达几百个大气压,导致气泡内水蒸气裂解为 H 和 OH 自由基损伤细胞<sup>[8]</sup>。超声对辐照后存活细胞生物学效应包括细胞结构和功能改变<sup>[9]</sup>,如细胞膜通透性、细胞电泳迁移率,细胞膜表面形态改变;细胞骨架蛋白改变造成的细胞黏附迁移改变;伴随单链 DNA 断裂引起细胞生长抑制,以及细胞染色体断裂,姐妹染色体交换率的改变等<sup>[8]</sup>。

当超声波辐照低浓度细胞悬液时,或使用较低的超声频率时,超声吸收系数较小,产生的热量和温升均接近于可忽略的程度,其产生的效应主要与空化机制有关,包括微声流 (microstreaming) 导致的黏滞应力和超声瞬态空化产生的自由基<sup>[2]</sup>。根据经验公式<sup>[10]</sup>,本研究所用的强度、频率、足以产生空化

效应,但不会引起温度升高。本研究表明超声能抑制 COC1 细胞增殖;超声辐照后 6h,FCM 检测发现凋亡率最高 (25.57 ± 4.68) %,以后逐渐降低;通过 TUNEL 法和光电镜技术观察发现超声作用 6h 后 COC1 呈现细胞凋亡的典型形态改变:凋亡细胞发泡 (bledding)、染色质浓缩和凋亡小体形成。这与 AshushH, HondaH 和 LagneauxL 的研究结果一致<sup>[3-5]</sup>,尽管所用的超声辐照条件和参数不同,提示人肿瘤细胞对超声损伤刺激反应的一致性。超声瞬态空化效应产生自由基和微声流粘滞应力,对细胞膜、细胞骨架的损伤及 DNA 单链断裂均可通过细胞信号传导,引起细胞凋亡,本研究超声诱导细胞凋亡的机制还需进一步研究。

本研究结果表明,低频超声具有诱导人卵巢癌细胞株 COC1 凋亡的作用,由于超声波在体外细胞悬液与体内组织所通过的介质不同,体外研究结果与体内研究可能存在一定的差异。本研究为低频超声诱导肿瘤细胞凋亡的在体 (InVivo) 实验研究提供了依据,将在以后的动物在体肿瘤研究中进一步证实,同时本研究也提示低频超声诱导肿瘤细胞凋亡在治疗实体肿瘤中应用的可能性。

(本文图 3、4、5 见封 2)

### 参考文献:

- [1] TerHaarGR, Hignintensity focused ultrasound for the treatment of tumors [J]. Echocardiography, 2001, 18 (4): 317-322.
- [2] RosenfeldE. Non-thermal non-cavitational effects of ultrasound [J]. Ultraschall Med, 2003, 24 (1): 40-44.
- [3] AshushH, RozenszajnLA, BlassM, et al. Apoptosis induction of human myeloid leukemia cells by ultrasound exposure [J]. Cancer Res, 2000, 60 (4): 1014-1022.
- [4] HondaH, ZhaoQL, KondoT. Effect of dissolved gases and anechoic contrast agent on apoptosis induced by ultrasound and its mechanism via the mitochondria-caspase pathway [J]. Ultrasound Med Biol, 2002, 28 (5): 673-682.
- [5] LagneauxL, deMeulenaerEC, DelforgeA, et al. Ultrasonic low-energy treatment: a novel approach to induce apoptosis in human leukemia cells [J]. Exp Hematol, 2002, 30 (11): 1293-1301.
- [6] 于廷和, 蔡汉钟, 王智彪, 等. 低频超声对卵巢癌细胞的生物学效应 [J]. 中华物理医学与康复杂志, 2000, 22 (4): 237-239.
- [7] KaufmannSH, EarnshawWC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy [J]. Exp Cell Res, 2000, 256 (1): 42-49.
- [8] 冯若, 王智彪. 实用超声治疗学 [M]. 第 1 版. 北京: 科学技术文献出版社, 2002. 30-35.
- [9] AlterA, RozenszajnLA, MillerHI, et al. Ultrasound inhibits the adhesion and migration of smooth muscle cells in vitro [J]. Ultrasound Med Biol, 1998, 24 (5): 711-721.
- [10] ClarkeRL, TerHaarGR. Temperature recorded during lesion formation by high-intensity focused ultrasound [J]. Ultrasound Med Biol, 1997, 23 (2): 299-306.

[编辑: 周永红; 校对: 刘红武]

## 低频超声对卵巢癌 COC1 细胞增殖和凋亡的影响

(正文见 249 页)

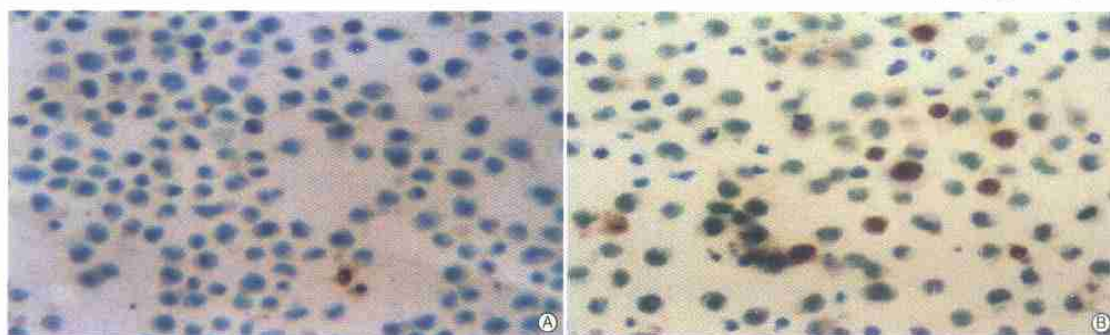


图3 TUNEL 方法检测超声辐照后 6h 诱导的 COC1 细胞凋亡

A: 正常 COC1 细胞( $\times 200$ ); B: 超声照射后 6h 的 COC1 细胞呈现棕色或棕褐色着色( $\times 200$ )

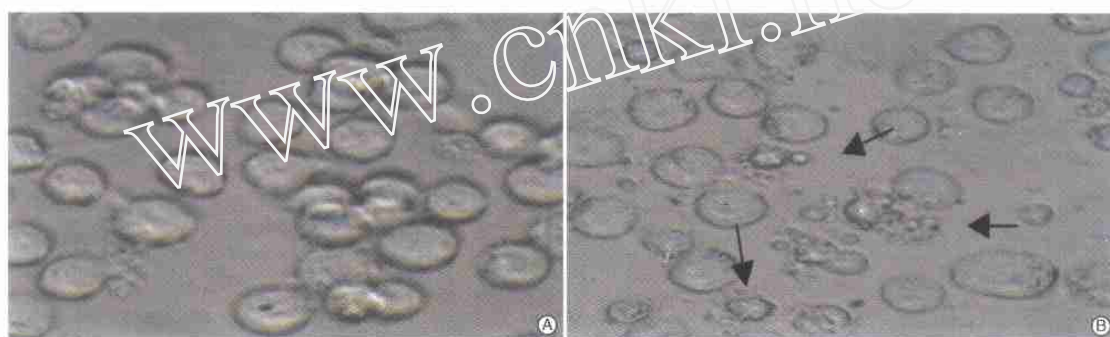


图4 超声辐照 6h 后相差显微镜下观察 COC1 细胞

A: 正常 COC1 细胞( $\times 400$ ); B: 凋亡的 COC1 细胞呈现细胞膜出泡和凋亡小体( $\times 400$ )

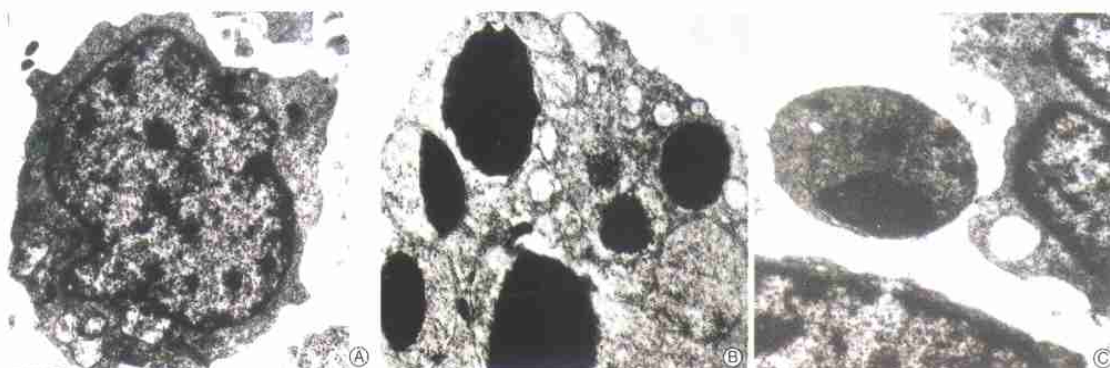


图5 超声辐照 6h 后, 透射电镜下观察 COC1 细胞超微结构

A: 正常 COC1 细胞( $\times 12\,000$ ); B, C: 凋亡的 COC1 细胞呈现染色质浓缩(B,  $\times 12\,000$ )和凋亡小体(C,  $\times 15\,000$ )