

基础研究

DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2012.05.003

超声联合紫杉醇微泡对卵巢癌细胞株 A2780/DDP 增殖和凋亡的影响

刘红霞¹, 常淑芳¹, 孙江川¹, 王志刚²

(重庆医科大学附属第二医院 1. 妇产科; 2. 超声影像研究所, 重庆 400010)

【摘要】目的:探讨超声联合紫杉醇微泡对人卵巢癌细胞 A2780/DDP 细胞的增殖和凋亡的影响。方法:将人卵巢癌细胞株 A2780/DDP 随机分为 5 组:对照组、紫杉醇组、紫杉醇 + 超声组、紫杉醇微泡组和紫杉醇微泡 + 超声组。采用噻唑蓝 (Methyl thiazolyl tetrazolium, MTT) 法检测作用 24、48 h 和 72 h 后卵巢癌细胞的增殖活性,并用 Hoechst 33258 和 TUNEL 染色法检测细胞凋亡情况。结果:MTT 法检测显示紫杉醇微泡 + 超声组 24、48 h 和 72 h 抑制率分别为 $(37.20 \pm 2.01)\%$ 、 $(51.60 \pm 2.10)\%$ 和 $(57.47 \pm 2.85)\%$,明显高于其他各处理组 ($P < 0.05$);Hoechst 33258 和 TUNEL 染色均显示紫杉醇微泡 + 超声组凋亡率最高,作用 24 h 后的凋亡率为 $(46.10 \pm 4.15)\%$,明显高于其余各组 ($P < 0.05$)。结论:超声联合紫杉醇微泡能明显抑制人卵巢癌细胞 A2780/DDP 的增殖和诱导其凋亡。

【关键词】紫杉醇微泡;卵巢癌;增殖;凋亡

【中国图书分类法分类号】R71

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-01-15

作者简介:刘红霞 (1986-),女,硕士,

研究方向:卵巢癌的基础与临床。

通信作者:常淑芳,女,副教授,Email:shfch2005@163.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (编号:30801228);重庆市

自然科学基金资助项目 (编号:CSTC,2008BB5405);

重庆市卫生局一般及重点资助项目 (编号:07-2-098、

2010-1-39、2010-1-6)。

很少有蛋白质水平上的表达。只有小部分 RT-PCR 结果阳性的肿瘤免疫染色为阳性。

总之,在分子水平上,100% 在 10 个 CT 基因中至少有 1 个存在。在本研究的髓母细胞瘤中,发现很多 CT 基因有 mRNA 水平的表达,却很少有蛋白水平的表达。CT 基因作为诊断髓母细胞瘤,仅提供诊断依据,能否作为确定基因,还需进一步研究论证。

参 考 文 献

- [1] Chou Y T, Liao P W, Lin M C, et al. Medulloblastoma presenting with pure word deafness; report of one case and review of literature [J]. *Pediatr Neonatol*, 2011, 52 (5): 290-293.
- [2] de Antonellis P, Medaglia C, Cusanelli E, et al. MiR-34a targeting of Notch ligand delta-like 1 impairs CD15⁺/CD133⁺ tumor-propagating cells and supports neural differentiation in medulloblastoma [J]. *PLoS One*, 2011, 6 (9): e24584.
- [3] Pfister S. Reliability of molecular tumour markers in children with medulloblastoma - an example from clinical practice [J]. *Z Evid Fortbild Qual Gesundheitsw*, 2011, 105 (7): 511-513.
- [4] Bayrakli F, Akgun B, Soylemez B, et al. Variation in the BRCA2 gene in a child with medulloblastoma and a family history of breast cancer [J]. *J Neurosurg Pediatr*, 2011, 8 (5): 476-478.
- [5] Priller M, Pöschl J, Abrão L, et al. Expression of FoxM1 is required for the proliferation of medulloblastoma cells and indicates worse survival of patients [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17 (21): 6791-6801.
- [6] Muzumdar D, Deshpande A, Kumar R, et al. Medulloblastoma in childhood-King Edward Memorial hospital surgical experience and review: Comparative analysis of the case series of 365 patients [J]. *J Pediatr Neurol*, 2011, 6 (s1): 78-85.
- [7] Hazin I, Dellatolas G, Garcia D, et al. Intellectual impairment after treatment for medulloblastoma and astrocytoma in childhood: the Brazilian experience [J]. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2011, 33 (7): 506-515.
- [8] Basu S, Gupta T, Jalali R, et al. Detecting bone marrow metastasis in cerebellar medulloblastoma: value of disease surveillance with FDG-PET in this setting [J]. *Indian J Cancer*, 2011, 48 (3): 373-374.
- [9] Mittal P. Magnetic resonance spectroscopy findings in non-enhancing desmoplastic medulloblastoma [J]. *Ann Indian Acad Neurol*, 2011, 14 (3): 200-202.
- [10] Padovani L, André N, Gentet J C, et al. Medulloblastoma [J]. *Eur J Cancer*, 2011, 47 (s 3): S338.

(责任编辑:冉明会)

Effects of ultrasound plus Paclitaxel loaded microbubbles on the proliferation and apoptosis of ovarian carcinoma A2780/DDP cells

LIU Hongxia¹, CHANG Shufang¹, SUN Jiangchuan¹, WANG Zhigang²

(1. Department of Obstetrics and Gynecology; 2. Institute of Ultrasound and Image, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To evaluate the proliferative and apoptosis effects of Paclitaxel loaded microbubbles plus ultrasound on ovarian cancer A2780/DDP cell strain. **Methods:** A2780/DDP cell strain was randomly divided into five groups: control group, Paclitaxel group, Paclitaxel plus ultrasound irradiation group, microbubbles loaded with Paclitaxel group and microbubbles loaded with Paclitaxel plus ultrasound irradiation group. The proliferative activity of human ovarian carcinoma cell line A2780/DDP was measured by MTT assay at 24, 48 h and 72 h after the treatment and the apoptosis was analyzed by Hoechst 33258 and TUNEL staining methods. **Results:** Results from MTT showed that the inhibitory rate of Paclitaxel loaded microbubbles plus ultrasound irradiation group were $(37.20 \pm 2.01)\%$, $(51.60 \pm 2.10)\%$ and $(57.47 \pm 2.85)\%$ respectively at 24, 48 h and 72 h after the treatment, significantly higher than those in the other groups ($P < 0.05$). Results from Hoechst 33258 and TUNEL staining indicated that the apoptosis rate was $(46.10 \pm 4.15)\%$ in microbubbles loaded with Paclitaxel plus ultrasound irradiation group at 24 h after the treatment, obviously higher than those in the other groups ($P < 0.05$). **Conclusion:** Paclitaxel loaded microbubbles plus ultrasound irradiation can suppress the growth and induce the apoptosis of A2780/DDP cell.

【Key words】 Paclitaxel loaded microbubbles; ovarian cancer; proliferation; apoptosis

卵巢癌在女性常见恶性肿瘤中占第 5 位,其发病率随着年龄的增长而增加,随着老年社会的到来,卵巢癌的发病率将大大的增加^[1]。目前紫杉醇已作为卵巢癌的一线化疗药物,在临床上广泛应用,但由于紫杉醇辅料引起的过敏反应及药物自身对骨髓的抑制作用,限制了其大剂量应用。近年随着超声分子影像技术的发展,将化疗药物包载于微泡,并通过超声定向击碎,引起药物靶向释放,是一种新型的肿瘤靶向治疗。刘亚敏等^[2]采用流式细胞术检测发现超声联合紫杉醇微泡可诱导卵巢癌 SKOV3 细胞凋亡。Wu X 等^[3]在卵巢癌 SKOV3 皮下移植瘤模型的研究中发现,超声联合紫杉醇微泡可明显抑制移植瘤的生长,并减少肿瘤组织 VEGF 和 p53 的表达。但超声联合紫杉醇微泡对卵巢癌耐顺铂细胞株的作用目前尚未见文献报道。本实验通过体外培养人卵巢癌细胞 A2780/DDP,自制紫杉醇微泡,探讨超声联合紫杉醇微泡对人卵巢癌 A2780/DDP 细胞增殖和凋亡的影响,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

紫杉醇试剂(分子量 853.92,纯度 99%,成都元成生物公司),自制紫杉醇微泡[DPCC: DSPE: 紫杉醇 = 5: 2: 2,包封率为 87.7%,粒径为 $(1442.3 \pm 696.5) \text{ nm}$], RPMI1640 培养液(Hyclone),噻唑蓝(Methyl thiazolyl tetrazolium, MTT),二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)和碘化丙啶(Propidine iodide, PI)染料均购自美国 sigma 公司, TUNEL 凋亡检测试剂盒(美国 Roche 公司),超声基因转染治疗仪(由重庆医科大

学超声影像学研究所自行研制, UGT1025 型,声强可调),自动酶联检测仪(基因有限公司, ELx800 型),流式细胞仪(美国 BD 公司, FACS Vantage SE)和倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.2 细胞系与培养

将消化或者复苏的 A2780/DDP 细胞(华中科技大学同济医学院协和医院王泽华教授馈赠)以 40%~50% 的浓度种到培养瓶中,培养于含有 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基中,在 37℃、5% CO₂ 及饱和湿度条件的恒温培养箱内常规传代培养,适时更换培养液,取对数生长期细胞进行实验。

1.3 实验方法

实验分为 I 组对照组、II 组紫杉醇组、III 组紫杉醇联合超声组、IV 组紫杉醇微泡组和 V 组紫杉醇微泡联合超声组。用 DMSO 溶解紫杉醇,然后用培养基稀释至 0.25 μg/ml (DMSO 浓度小于 0.5%,对细胞几乎没有影响^[4]),根据紫杉醇微泡包封率得出所需要的紫杉醇微泡量,使各处理组紫杉醇浓度相同。超声强度为 0.5 W/cm²,连续作用 30 s(预实验得出该超声作用方式对细胞几乎没有影响)。

1.3.1 MTT 法检查各实验组对 A2780/DDP 细胞增殖的影响 将细胞制备成细胞悬液,进行不同因素处理,将处理后细胞种入 96 孔板,8 000/孔,每组设置 5 个复孔,设置阴性对照组,空白对照组,继续孵育 24, 48 h 和 72 h 后,加 5 mg/ml MTT 溶液 20 μl,继续孵育 4 h,测试结束前加入 200 μl DMSO,在摇床上振荡 10 min,待结晶溶解后置入自动酶联检测仪,于 490 nm 处测每孔吸光度值,计算抑制率(抑制率(IR)(%) = [空白对照组吸光度(Absorbance, A)值 - 用药组 A 值/空白对照组 A 值])。实验重复 3 次。

1.3.2 Hoechst 33258 染色检测细胞凋亡 将细胞制备成细胞悬液,调整细胞终浓度为 2.5×10^5 个/ml,取直径为 35 mm 的盖玻片将其置于 6 孔板中,每孔接种 2×10^5 个处理后细胞。细胞继续培养 24 h,吸尽培养基,加 0.5 ml 固定液,固定

2 h, 去除固定液, 用 PBS 清洗 3 次, 每次 5 min, 将细胞在室温下用 1 $\mu\text{mol/L}$ Hoechst 33258 染液作用 15 min, PBS 再次清洗 3 次, 每次 5 min, 用 1 280 \times 1 280 像素的数字式照相机照相。在 200 倍荧光显微镜下观察细胞形态学改变, 细胞核染色深或细胞核形态发生改变的细胞, 即为凋亡细胞。

1.3.3 TUNEL 法检测细胞凋亡率 取对数生长期细胞, 传代于置有盖玻片的培养皿中, 常规培养 24 h, 换为无血清培养液, 进行不同因素处理, 继续培养 24 h 后, 用 4% 多聚甲醛固定 20 min, 严格按试剂盒说明书步骤进行操作。以不加 TdT 酶作为阴性对照, 细胞核染成棕黄色的为凋亡阳性细胞。在 400 倍显微镜下计数细胞数, 每张片随机选择 5 个视野。光镜下观察细胞凋亡情况。光镜下计算凋亡率, 计算方法: 取 5 个高倍镜视野, 分别计数总细胞数和凋亡细胞数, 凋亡率 = 凋亡细胞数/总细胞数 \times 100%。

1.4 统计学处理

实验数据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS13.0 版统计软件包, 方差分析 SNK- q 检验进行分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞抑制率

紫杉醇对 A2780/DDP 细胞的抑制率随着时间的延长逐渐增加, 而紫杉醇微泡联合超声组抑制率最大, 24、48 h 和 72 h 分别为 (37.20 \pm 2.01)%、(51.60 \pm 2.10)% 和 (57.47 \pm 2.85)%, 与其余各组相同时间点比较, P 均小于 0.05。

表 1 MTT 法检测各种处理因素对 A2780/DDP 细胞生长抑制率及其比较分析
Tab.1 Comparative analysis on the inhibitory effects of different treatments on the proliferation of A2780/DDP cell line measured by MTT assay

| 实验分组 | 24 h | 48 h | 72 h |
|-----------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 紫杉醇 | 16.23 \pm 1.65 [#] | 18.03 \pm 0.15 [#] | 28.50 \pm 1.40 [#] |
| 紫杉醇联合超声 | 21.83 \pm 0.81 [#] | 26.57 \pm 1.46 [#] | 29.90 \pm 1.25 [#] |
| 紫杉醇微泡 | 10.40 \pm 1.83 [#] | 12.43 \pm 1.27 [#] | 16.87 \pm 1.56 [#] |
| 紫杉醇微泡联合超声 | 37.20 \pm 2.01 | 51.60 \pm 2.10 | 57.47 \pm 2.85 |

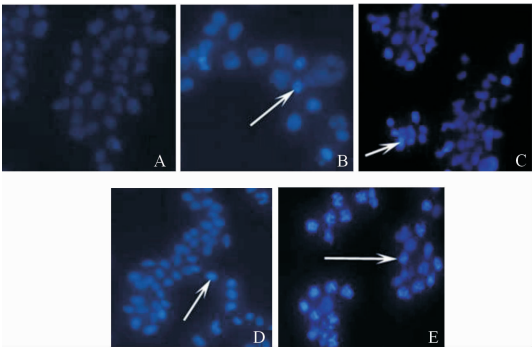
注: #, 与紫杉醇微泡联合超声作用相同时间段相比, $P < 0.05$

2.2 Hoechst 33258 染色

不同因素作用 24 h 后, 进行 Hoechst 33258 染色, 从图 1 可以看出, 对照组细胞核呈均匀染色; 紫杉醇微泡组少许细胞染色加深, 呈折缝样; 紫杉醇组和紫杉醇联合超声组可见部分染色质浓缩状态, 大部分细胞染色加深; 紫杉醇微泡联合超声和靶向紫杉醇微泡联合超声组可见细胞核碎片。

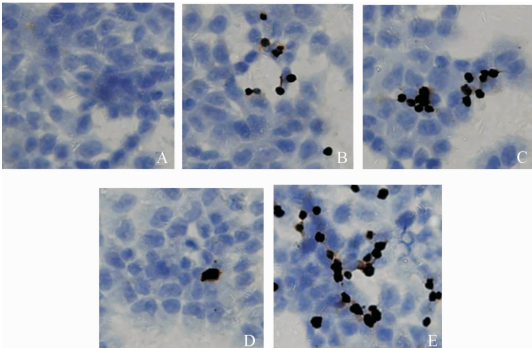
2.3 TUNEL 法检测细胞中晚期凋亡率

光镜下细胞核呈棕黄色染色为凋亡细胞, 并呈现出典型的凋亡细胞形态学改变, 卵巢癌 A2780/DDP 细胞变小、变圆、核固缩, 而正常细胞的胞核蓝染 (如图 2)。各组细胞凋亡率如表 2 所示, 紫杉醇微泡联合超声组凋亡率为 (46.10 \pm 4.15)%, 明显高于其余各组 ($P < 0.05$)。



注: “ \rightarrow ”表示细胞核发生改变的细胞 (A. 对照组; B. 紫杉醇组; C. 紫杉醇 + 超声组; D. 紫杉醇微泡组; E. 紫杉醇微泡 + 超声组)

图 1 不同因素处理 24 h 后 Hoechst 33258 染色 (200 \times)
Fig.1 Hoechst 33258 staining at 24 h after different treatments (200 \times)



A. 对照组; B. 紫杉醇组; C. 紫杉醇 + 超声组; D. 紫杉醇微泡组; E. 紫杉醇微泡 + 超声组

图 2 TUNEL 染色检测卵巢癌细胞凋亡率 (400 \times)

Fig.2 Apoptosis rate of ovarian cancer cell detected by TUNEL staining (400 \times)

表 2 TUNEL 法检测卵巢癌细胞凋亡率及其比较分析
Tab.2 Comparative analysis on the apoptosis rate of ovarian cancer cell detected by TUNEL staining

| 实验分组 | 凋亡率 ($\bar{x} \pm s$) % |
|-----------|-------------------------------|
| 对照组 | 3.40 \pm 1.19 [#] |
| 紫杉醇 | 17.46 \pm 2.36 [#] |
| 紫杉醇联合超声 | 24.10 \pm 2.46 [#] |
| 紫杉醇微泡 | 5.58 \pm 1.56 [#] |
| 紫杉醇微泡联合超声 | 46.10 \pm 4.15 |

注: #, 与紫杉醇微泡联合超声组凋亡率相比, $P < 0.05$

3 讨论

卵巢癌起病隐匿, 早期诊断困难, 约 75% 的患者诊断时已处于晚期。对晚期卵巢癌治疗极为棘手, 肿瘤减灭术后以铂类联合紫杉醇的多疗程化疗是卵巢癌的推荐治疗方案。遗憾的是该方案不是对所有卵巢癌患者都是可行的, 据研究报道超过 1/3 的卵巢癌新发病例由于药物的毒性、患者的年龄、一般状况以及合并症等不能接受以铂类与紫杉醇为基础的联合化疗方案^[5]。此外, 由于肿瘤细胞的异质

性,有 20%~30% 的卵巢癌患者对铂类与紫杉醇联合治疗不敏感,即使对上述化疗方案敏感的患者,约 75% 的卵巢癌患者平均在治疗后 18~28 个月内复发^[6]。如何进一步提高化疗药物紫杉醇的疗效,减少副作用及耐药的产生是有待解决的问题。紫杉醇新剂型如紫杉醇脂质体^[7]、紫杉醇聚合胶束^[8]、紫杉醇纳米胶囊和纳米微粒^[9]在一定程度上提高紫杉醇疗效,并减少副反应,但作用有限。近年随着超声生物学效应的研究深入,利用超声对生物组织的空化效应增加化疗药物对肿瘤细胞的杀伤,并逆转肿瘤耐药药物,其机理主要是超声增加细胞膜的通透性,促进肿瘤细胞对药物的摄取^[10]。A2780/DDP 是利用顺铂体外诱导 A2780 细胞形成的耐顺铂细胞株, Tsunetoh S 等^[11]证明拓扑替康可诱导耐顺铂的 A2780 细胞发生凋亡,但 A2780/DDP 对紫杉醇的敏感性目前尚未见文献报道。本研究发现单纯紫杉醇可抑制 A2780/DDP 细胞生长,诱导细胞凋亡,其作用 24、48 h 和 72 h 后的细胞抑制率为 $(16.23 \pm 1.65)\%$ 、 $(18.03 \pm 0.15)\%$ 和 $(28.50 \pm 1.40)\%$,凋亡率为 $(17.46 \pm 2.36)\%$,与对照组比较,差异有统计学意义,提示单纯紫杉醇虽对耐顺铂细胞株有一定作用,但作用有限,需联合其他手段以增加疗效。

紫杉醇是一种脂溶性药物,易于包载于脂质中,本研究采用乳化法合成包载紫杉醇的微泡,其粒径较均匀,平均粒径为 $(1\,442.3 \pm 696.5)$ nm,药物包封率达 87.7%,且研究发现紫杉醇微泡对 A2780/DDP 细胞没有明显的抑制作用,表明微泡稳定性好,药物渗漏率低。当紫杉醇微泡联合超声作用后,抑制率明显增加,作用 24、48 h 和 72 h 后抑制率分别为 $(37.20 \pm 2.01)\%$ 、 $(51.60 \pm 2.10)\%$ 和 $(57.47 \pm 2.85)\%$,与其他各组相同时间点进行比较, P 值均小于 0.05。这与刘亚敏等^[2]的研究结果有差异,可能是由于我们所选用的紫杉醇原料、卵巢癌细胞株和紫杉醇药物浓度不同有关。

细胞凋亡是死亡信号诱发的细胞程序性死亡过程,是细胞生理性死亡的普遍形式,即凋亡过程中核片段化,细胞核皱缩,最终形成许多细胞凋亡小体,被其他细胞吞噬的过程。Hochst 33258 染料能与细胞的 DNA 结合,从而呈现出蓝色的荧光,凋亡细胞由于细胞核呈致密状或呈碎块状而呈现出高亮度的蓝色荧光,而正常细胞染色质均匀,则呈现出均匀且较弱的蓝色荧光,因此可以通过细胞核染色情况来反映细胞的凋亡情况。从本实验结果可以看出,超声联合紫杉醇微泡组细胞大多数为圆形,蓝色荧光最强,并且出现了核碎片,间接表明该组大多数细胞发生了凋亡;在本实验研究中,通过 TUNEL 凋亡检测法发现,对卵巢癌 A2780/DDP 进行不同因素处理

后,细胞均发生了不同程度的凋亡,紫杉醇微泡联合超声组凋亡最明显,作用 24 h 后凋亡率为 $(46.10 \pm 4.15)\%$,明显高于其余各组。

上述研究结果表明,超声联合紫杉醇脂质微泡可抑制耐顺铂的卵巢癌细胞株增殖,并诱导其凋亡,由于实验所选用的超声参数对细胞的生长几乎没有影响,所以可以推测上述增殖抑制及凋亡诱导作用主要与微泡增加了超声空化效应阈值,导致细胞膜的通透性增加,有利于紫杉醇进入肿瘤细胞内部发挥作用有关。下一步的研究可针对卵巢癌细胞特异性受体设计具有体内寻靶功能的载药纳米级微泡,使其易于通过血管屏障,以达到卵巢癌靶向诊断及治疗的目的。

参 考 文 献

- [1] Geay J F, Touzet S, Delva R, et al. Carboplatin/cyclophosphamide or carboplatin/paclitaxel in elderly patients with advanced ovarian cancer? a analysis of two consecutive trials from the group d'investigateurs nationaux pour l'etude des cancers ovariens[J]. Ann oncol, 2007, 18(2): 256-262.
- [2] 刘亚敏, 孙江川, 常淑芳, 等. 超声破坏紫杉醇微泡对卵巢癌细胞株 SKOV3 的抑制增殖及诱导凋亡作用[J]. 中国超声医学杂志, 2007, 23(5): 340-342.
- [3] Liu Y M, Sun J C, Chang S F, et al. Ultrasound destructing paclitaxel loaded microbubbles for proliferation inhibition and apoptosis induction of ovarian carcinoma SKOV3[J]. Chinese J Ultrasound Med, 2007, 23(5): 340-342.
- [4] Wu X, Wang Z G, Zhang Y, et al. Treatment of xenografted ovarian carcinoma using paclitaxel-loaded ultrasound microbubbles[J]. Acad Radiol, 2008, 15(12): 1574-1579.
- [5] Wang T H, Wang H S, Soong Y K. Paclitaxel-induced cell death: where the cell cycle and apoptosis come together[J]. Cancer, 2000, 88(11): 2619-2628.
- [6] McNally O M, Delaney E, Petty R D, et al. Is optimal first-line chemotherapy deliverable in all newly diagnosed ovarian cancers? A population-based study[J]. Br J Cancer, 2003, 89(6): 966-967.
- [7] Bookman M A, McGuire W P, Kilpatrick D, et al. Carboplatin and paclitaxel in ovarian carcinoma[J]. J Clin Oncol, 1996, 14(6): 1895-1902.
- [8] Utreja P, Jain S, Tiwary A K. Localized delivery of paclitaxel using elastic liposomes: formulation development and evaluation[J]. Drug Deliv, 2011, 18(5): 367-376.
- [9] Wang T, Petrenko V A, Torchilin V P. Paclitaxel-loaded polymeric micelles modified with MCF-7 cell-specific phage protein: enhanced binding to target cancer cells and increased cytotoxicity[J]. Mol Pharm, 2010, 7(4): 1007-1014.
- [10] Hureau J, Lagarce F, Gagnadoux F, et al. Toxicological study and efficacy of blank and paclitaxel-loaded lipid nanocapsules after i. v. administration in mice[J]. Pharmaceutical Research (Dordrecht), 2009, 27(3): 421-430.
- [11] Yu T H, Huang X L, Hu K, et al. Treatment of transplanted adriamycin-resistant ovarian cancers in mice by combination of adriamycin and ultrasound exposure[J]. Ultrason Sonochem, 2004, 11(5): 287-291.
- [12] Tsunetoh S, Terai Y, Sasaki H, et al. Topotecan as a molecular targeting agent which blocks the Akt and VEGF cascade in platinum-resistant ovarian cancers[J]. Cancer Biol Ther, 2010, 10(11): 1137-1146.

(责任编辑: 冉明会)