

超声激活血卟啉对 S180 肿瘤细胞表面 EGFR 表达量的影响^{*}

米 娜 刘全宏 张小翠

(陕西师范大学生命科学院 西安 710062)

摘要 目的: 探讨超声激活血卟啉处理 S180 肿瘤细胞后膜表面 EGFR 表达量的变化。方法: 将腹水瘤细胞随机分为四组, U 组和 UH 组细胞分别于频率 1.8MHz、2.0W/cm² 的超声装置中照射 3min, 并分别在 1h、3h、5h 后取材, 应用免疫组化方法在光镜下观察 EGFR 的表达情况。结果: 1h、3h 取材, U 组和 UH 组平均光密度值明显低于 CT 组和 H 组, UH 组最低。而 5h 取材时, UH 组平均光密度值显著下降, 其它组基本无变化。结论: 提示在高频低强度处理下, 随着时间的延长, 超声激活 HpD 对 EGFR 的抑制作用增加, 显示可能是基因调控使 EGFR 表达下调, 从而使肿瘤细胞增殖减慢。

关键词: 声动力疗法; 血卟啉; 超声; EGFR

中图分类号: R445.1 **文献标识码:** A

Effect of ultrasound activating hematophorphyrin on the expression of EGFR in ascites S180 cell membrane

MI Na, LIU Quan-hong, ZHANG Xiao-cui

College of Life Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, Shaanxi, China

ABSTRACT Objective To study the change of expression of EGFR in ascites S180 cell membrane during the process of ultrasound activating hematophorphyrin. **Methods** After being divided into four groups in random(U, UH, CT and H group), the tumor cells of U and UH groups have been exposed to ultrasound at 1.80MHz and 2.0W/cm² for 3min by using HpD. After 1h, 3h and 5h, the tumor cells in the four groups were observed under optic microscope. **Results** EGFR in CT and H groups has a higher expression in S180 ascites cells after 1h and 3h exposed to ultrasound together with HpD. EGFR in UH group has a distinct decrease after 5h exposed to ultrasound together with HpD, while other three groups have no changes. **Conclusion:** High frequency and low intensity ultrasound activating hematophorphyrin could inhibit EGFR, slow down the multiplication of cancer cell, which suggests that gene may be involved in regulating the expression of EGFR in SDT.

Key words: Sonodynamic therapy(SDT); Hematophorphyrin; Ultrasound; EGFR

血卟啉是从血红蛋白中提取的有机光敏剂, 其本身无抗肿瘤效应, 但它可以在动物和人的多种肿瘤组织优先聚集, 易为声光辐射处理激活, 当它被声光激活后能产生强烈的抗肿瘤效应。1978 年, 美国的 Dougherty 等利用光激活 HpD (hematophorphyrin derivate, HpD) 治疗肿瘤, 这种方法被称为光动力学疗法, 简称 PDT (photodynamic treatment, PDT)^[1]。光动力学疗法在临床主要应用于人体表面浅层肿瘤的治疗。光在生物组织中的穿透能力差, 使其对深部肿瘤的治疗受到限制。1990 年, Yumita 等报道了超声联合血卟啉对小鼠移植肿瘤生长抑制的协同效应, 发现单用血卟啉无抑制作用, 单用超声仅有轻微抑制作用, 而两者联合则有明显的抑制效果, 并将之命名为声动力学疗法, 简称 SDT (sonodynamic therapy, SDT)^[2,3]。超声是一种弹性机械波, 其在生物组织中的穿透能力比激光强, 同时超声能够聚焦于特定部位。声动力疗法对于治疗肿瘤细胞有较强的针对性, 对正常组织无创伤, 组织穿透力强, 并且机体不产生耐受性, 可以反复多次治疗, 因而它对于治疗肿瘤, 特别是组织深层肿瘤有着较好的应用前景。

近年来, 各国学者对声动力疗法的作用机理开展了多学

科的研究工作, 并取得了一定的成果。有学者认为 SDT 杀死或抑制肿瘤细胞的部分机理是通过超声的热效应来实现的, 但是大量的实验结果提示, SDT 可能更主要地与超声激活聚集在癌组织的血卟啉产生单线态氧有关^[4~8]。单线态氧是一个亲电子性很强的氧化剂, 具有极强的氧化性, 它在癌组织中形成的过氧化物对癌细胞有很强的杀伤作用。除此之外, 亦有不少学者提出声致发光机制^[7,9], 认为超声波场可以产生直径为 1 微米的空化泡, 空化泡增长到一定大小后, 在极小空间内因崩溃而将集中起来的声场能量释放出来, 瞬间产生高温, 可达到几千 K, 同时放出光能, 激发 HP 或 HpD, 促使周围的水分子形成 $\cdot\text{H}$ 和 $\cdot\text{OH}$ 自由基, 这些自由基起到了杀死肿瘤细胞的作用。

综上所述, 目前关于超声激活血卟啉抗癌机制的研究多集中在理化因子的作用分析。根据最新资料报道, 声动力学有其细胞分子生物学机制^[10~13]。本文选择 S180 细胞表皮生长因子受体(EGFR)作为检测蛋白, 研究了不同处理对其表达的影响, 为探讨超声激活血卟啉抗癌的细胞分子生物学机制积累资料。

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 39870240; No. 30270383)

作者简介: 米娜(1983—), 女, 回族, 新疆吐鲁番人, 硕士研究生, 主要从事超声抗癌和肿瘤相关蛋白质组学研究。

作者通讯: 刘全宏, E-mail: lshaof@snnu.edu.cn

(收稿日期: 2006-04-24 接受日期: 2006-07-10)

1 材料与方法

1.1 材料

实验动物为昆明系小白鼠，体重 18~22g，雌性。瘤株为 S180 腹水瘤细胞，由陕西中医药研究院实验动物中心提供。实验所用血卟啉衍生物为单羟乙基单乙烯基卟啉 (SIGMA 公司)，用 0.1M PBS (pH7.2~7.4) 避光溶解，终浓度 2.5mg/ml 灭菌、分装、-20℃ 避光保存。实验所用一抗购自美国 Santa Cruz 公司，SP 试剂盒购自北京中杉生物工程公司，其它试剂均为国产分析纯。实验装置的功率放大器 (AG 1020) 为美国 T&C 公司产品，超声装置为陕西师范大学声学研究所研制，探头面积为 4.7cm²。

1.2 方法

1.2.1 接种: S180 腹水瘤细胞于 6 只小鼠腹腔 1 周后，随机取 3 只小鼠，抽取腹水细胞，分别置于医用薄壁试管，加入 RPMI1640+10% 小牛血清培养基中，于 37℃ 孵箱培养，实验时用生理盐水调整细胞浓度至 2×10⁶ 个/ml。每只小鼠抽取的腹水细胞分为 12 管，分为四组，分别为对照组 (CT)、血卟啉组 (H)、超声组 (U) 和超声加血卟啉组 (UH)，每组三管，每管 0.5ml 细胞悬液。H 组和 UH 组每管中加入血卟啉 4μl，使其终浓度为 0.01mg/ml，37℃ CO₂ 孵箱孵育，45min 后 U 组和 UH 组分别在频率为 1.8MHz，强度为 2W/cm² 的超声装置中声照处理 3min，各实验组分别于声照后 1h、3h、5h 取材，常规细胞涂片。

1.2.2 免疫组织化学染色: 以 SP 法进行免疫组织化学染色：细胞涂片固定后加 3% 过氧化氢处理 15min，除去内源性酶，PBS 洗 3 次，加正常动物血清 30min 以减少非特异性染色，加 EGFR 一抗 4℃ 过夜，PBS 代替一抗作为阴性对照。SP 染色按试剂盒说明进行，DAB 显色，梯度酒精脱水，中性树胶封固盖片。

1.2.3 阳性结果观察: 各组随机选取 10 个高倍视野，利用数码显微成像系统进行图像采集和分析。Image Pro-Plus5.0 图像分析软件测定各组照片的平均光密度 OD 值 (0~255) (用平均光密度表示阳性细胞表达强度，平均光密度值越大则表达越强)。组间 t 检验显示组间差异。

2 结果

由表中数据可以看出，超声激活血卟啉处理 1h 后，UH 组、U 组平均光密度值明显低于 CT 组、H 组，且 UH 组平均光密度值低于 U 组，经组间 t 检验，UH 组与其它组差异极显著 (p<0.01)；超声激活血卟啉处理 3h 后，UH 组平均光密度值小幅度下降，CT 组、H 组基本无变化，U 组平均光密度下降，经组间 t 检验，UH 组与 U 组差异显著 (P<0.05)；UH 组与 CT 组、H 组差异极显著 (p<0.01)；超声激活血卟啉处理 5h 后，UH 组平均光密度值下降，其它组基本无变化，UH 组与其它组差异极显著 (p<0.01) (表 1)。由图可知，UH 组、U 组平均光密度值明显低于 H 组和 CT 组，随时间延长 U 组、UH 组变化显著 (图 1)。

表 1 EGFR 在超声处理 1h、3h、5h 后平均光密度值比较 (×10⁻²)
Table 1 Mean optical density of EGFR after 1h, 3h and 5h of treatment (×10⁻²)

组别	1h	3h	5h
UH	5.511±0.835 **++△△	5.208±0.565 *++△△	4.934±0.377 *++△△
U	9.525±0.658	7.023±0.469 ++△△	6.713±0.477 ++△△
H	10.231±1.026	10.034±0.620	10.078±0.485
CT	9.845±0.481	9.998±0.1363	10.107±0.794

注：所有数据表示为平均值±标准差，其中，*与 U 比较 P<0.05；**与 U 比较 P<0.01；++与 H 比较 P<0.05；+++与 H 比较 P<0.01；△与 CT 比较 P<0.05；△△与 CT 比较 P<0.01

Notes: All the data are mean values ± standard deviation, among which, * compared with U, p<0.05; ** compared with U, p<0.01; + compared with H, P<0.05; ++ compared with H, P<0.01; comparing △ with CT, P<0.05; comparing △△ with CT, P<0.01.

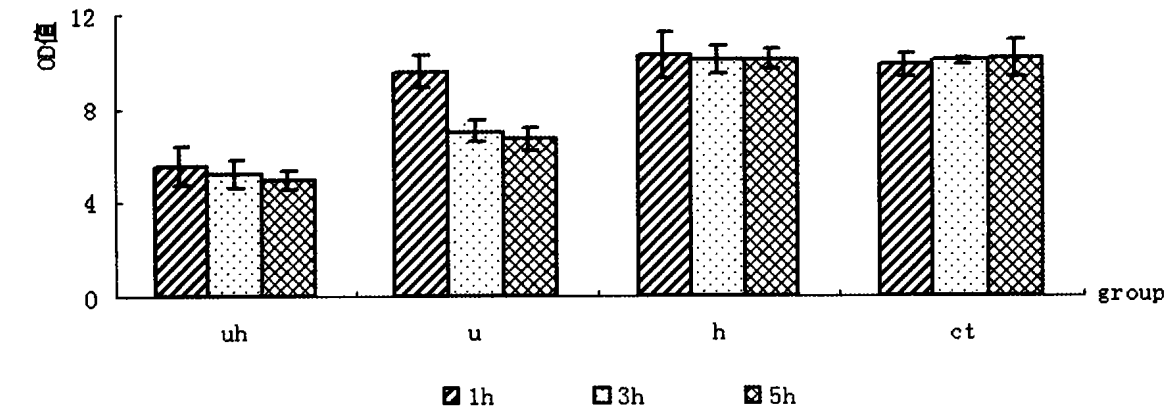


图 1 EGFR 在超声处理 1h、3h、5h 后平均光密度值比较 (×10⁻²)

Fig. 1 Mean optical density of EGFR in the four groups after 1h, 3h and 5h of treatment (×10⁻²)

3 结论

EGFR 是一种跨膜糖蛋白, 具有酪氨酸激酶活性, 由原癌基因 *c-erbB-1* 所编码, 是 *erbB* 受体家族之一, 广泛分布于分裂增殖活跃的组织。其结构分为 3 个区域, 伸向膜外与 EGF 识别并结合的氨基端区域, 位于细胞膜中间单链的 α -螺旋跨膜区以及具有酪氨酸激酶活性的细胞质内的羧基端区域。大量的研究表明, 在多种肿瘤组织中存在 EGFR 高表达。表皮生长因子(EGF)与其受体(EGFR)结合成 EGF-EGFR 复合物, 直接参与、启动和调控细胞增殖的基因, 其中包括 *c-fos*、*c-myc*、*c-jun* 等重要编码基因, 以及与生长调节有关的重要蛋白基因, 再通过基因表达使细胞分裂增殖^[14~19]。

本研究结果表明, 超声激活 HpD 对 EGFR 的表达量及活性产生明显的影响, 使其表达量下降及其活性受到抑制。因此抑制了由 EGFR 介导的促肿瘤增殖的路径, 减缓肿瘤的生长速度, 起到一定抑癌作用。EGFR 表达量的下降, 提示可能是损伤信号使 *c-erbB-1* 基因的转录被抑制, 从而使 EGFR 表达下调, 最终使细胞增殖减慢且表现一定的时滞效应。而 EGFR 活性下降, 则表明了超声激活血卟啉对膜受体蛋白的直接损伤, 其结果亦导致肿瘤细胞增殖受阻。

参考文献

- [1] Dougherty T J, Kaufman J E, Goldfarb A, et al. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors[J]. *Cancer Research*, 1978, 38(8):2628-2635
- [2] Yumita N, Nishigaki R, Umemura K, et al. Synergistic effect of ultrasound and hematoporphyrin on sarcoma 180. *Jpn. J. Cancer Res.*, Mar 1990, 81(3):304-308
- [3] Yumita N, Nishigaki R, Umemura K, et al. Hematoporphyrin as a sensitizer of cell-damaging effect of ultrasound. *Jpn. J. Cancer Res.*, 1989 80(3):219-222
- [4] Miyoshi N, Misik V, Fukuda M, et al. Effect of gallium porphyrin ana-

logue ATX-70 on nitroxide formation from a cyclic secondary amine by ultrasound on the mechanism of sonodynamic activation[J]. *Radiat Res*, 1995 143(2):194-202

- [5] Misik V, Riesz P. Free radical intermediates in sonodynamic therapy[J]. *Ann NY Acad. Sci*, 2000, 899:335-348
- [6] Halliwell B, Gutteridge J. M. C. Role of free radical and catalytic metal ions in human disease: An overview[A]. In: *Methods in Enzymology* [M]. San' Diego, CA: Academic Press. Vol. 186 Part B. L. Packer & A. N. Glazer, Eds.: 1-85
- [7] Miyoshi N, Riesz I. Evidence against singlet oxygen formation by sonolysis of aqueous oxygen-saturated solutions of Hematoporphyrin and rose bengal. The mechanism of sonodynamic therapy[J]. *Ultrasonic Sonochemistry*, 2000, 7(3):121-124
- [8] Worthington A E, Thompson J, Rauth A M, et al. Mechanism of ultrasound enhanced porphyrin cytotoxicity. Part I: A search for free radical effects[J]. *Ultrasound Med. Biol.*, 1997, 23(7):1095-1105
- [9] Jeffers R, Feng R Q, Fowlkes J B, et al. Dimethyl formamide as an enhancer of cavitation-induced cell lysis in vitro[J]. *J Acoust Soc Am*, 1995, 97(1):669-676
- [10] 刘全宏, 王攀, 李萌, 等. 声化学激活血卟啉诱导艾氏腹水肿瘤细胞凋亡[J]. *动物学报*, 2003 49(5):620-628
- [11] 刘全宏, 孙世惠, 肖娅萍. 超声激活血卟啉对 S180 细胞杀伤作用及形态学研究[J]. *中国科学*, 2002, 32(5):454-462
- [12] 齐浩, 谭声江, 马玉英, 等. 不同频率聚焦超声与血卟啉对人体肿瘤细胞的协同作用[J]. *中国科学(C 辑)*, 1998, 28(5):477-480
- [13] 刘全宏, 王攀, 李萌, 等. 声化学激活血卟啉诱导艾氏腹水肿瘤细胞凋亡[J]. *动物学报*, 2003 49(5):620-628
- [14] 谭玉梅, 范立青, 卢光琇. 表皮生长因子受体(EGFR)的细胞内信号转导[J]. *生命科学研究*, 2002, 6(1):29-33
- [15] 高艳景, 刘晔. 表皮生长因子受体与肿瘤治疗研究进展[J]. *国外医学肿瘤学分册*, 1994, 26(2):74-75
- [16] 唐剑英. 表皮生长因子受体家族信号转导与肿瘤治疗[J]. *国外医学肿瘤学分册*, 2002, 29(2):95-97

(上接第 6 页)

参考文献

- [1] Carl W Dieffenbach, Gabriela S Dveksler. PCR primer: A Laboratory Manual[M]. 2nd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003:73
- [2] J. 萨姆布鲁克, DW. 拉塞尔著. 黄培堂等译. 分子克隆实验指南[M]. 第三版. 北京: 科学出版社, 2001:98-105
- [3] Clark J.M. Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases[J]. *Nucl Acids Res*, 1998 16(2):9677-9686
- [4] 唐晔盛, 李英, 朱静等. 菌落 PCR 在大规模基因组测序中的应用[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2002, 29(2):316-318

- [5] Michael Kleined, Kirsten Schellenberg, Klaus Ritter. Efficient Extraction of Viral DNA and Viral RNA by the Chemagic Viral DNA/ RNA Kit Allows Sensitive Detection of Cytomegalovirus, Hepatitis B Virus, and Hepatitis G Virus by PCR[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, 11(52):5273-5274
- [6] Michael P Busch. Should HBV DNA NAT replace HBsAg and / or anti-HBe screening of blood donors[J]. *Transfusion Clinique et Biologique*, 2004, 11:26-32
- [7] Susan L. Stramer, Sally Caglioti, D.M.Strong. 美国和加拿大供血的核酸扩增检测[J]. *国外医学输血及血液学分册*, 2001(24)6:538-539
- [8] 周新, 涂植光. 临床生物化学和生物化学检验[M]. 第三版. 北京: 人民卫生出版社, 2003:246