

声动力治疗诱导的肿瘤细胞死亡方式研究进展

范海霞, 吕岩红, 周 灵, 郑金华

(哈尔滨医科大学解剖学教研室, 黑龙江 哈尔滨 150081)

摘 要: 声动力治疗(SDT)是一种在体内、外均具有潜在治疗效果的肿瘤治疗措施。细胞死亡方式可分为程序性死亡和非程序性死亡。文章主要对 SDT 导致肿瘤细胞的死亡方式及可能的作用机制进行综述。

关键词: 声动力治疗; 肿瘤; 细胞死亡

中图分类号: R730 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2016)01-0070-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2016.01.B015

Research Progress in Modes of Tumor Cell Death Induced by Sonodynamic Therapy

FAN Hai-xia, LV Yan-hong, ZHOU Ling, et al.

(Department of Anatomy, Harbin Medical University, Harbin 150081, China)

Abstract: Sonodynamic therapy(SDT) is a potential cancer treatment modality that has been gaining support due to its effectiveness both *in vitro* and *in vivo* studies. Various modes of cell death are roughly divided into programmed cell death (PCD) and non-PCD. This article mainly reviews different cell death modes induced by SDT and the possible mechanism.

Subject words: sonodynamic therapy; neoplasms; cell death

声动力疗法(sonodynamic therapy, SDT)是在光动力疗法(photodynamic therapy, PDT)基础上发展起来的一种肿瘤治疗新理念,新方法。它利用超声的深部穿透及聚焦于特定肿瘤局部区域的能力,可选择性地杀伤局部原发和复发的肿瘤细胞,而对周围健康组织的损害较小^[1,2]。相关研究显示,超声能增强化学试剂(声敏剂)的细胞毒性,主要是通过超声作用所产生的物理效应(如热效应、机械效应和空化效应)和生化效应(如活性氧、羟自由基等),造成肿瘤细胞死亡(程序性如凋亡、自噬和非程序性如坏死)从而抑制肿瘤生长^[3,4]。利用超声激活声敏剂治疗恶性肿瘤的声动力疗法也成为超声治疗中发展迅速的

一个分支,在临床治疗方面具有较高的研究价值。

1 超声和声敏剂

1.1 超声

超声波是一种频率在 20kHz 以上的弹性机械波,它方向性好,穿透力强,易于获得较集中的声能。目前超声波在医学方面主要有两种用途:诊断性超声(多为 2~12MHz)^[5]和物理治疗性超声(多为 3~10MHz)^[6]。

1.2 声敏剂

声敏剂是一种对超声辐射具有增敏活性的分子物质,可被超声激活而产生协同效应。治疗中理想的声敏剂是要对周围健康组织毒性小而肿瘤组织、细胞具有较强的靶向选择性、超声增敏性,并可以迅速地体内排出等特点。目前最为常用的声敏剂多

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81272503);黑龙江省卫生厅科研项目(2011-211)

通讯作者: 郑金华,教授,博士生导师;哈尔滨医科大学基础学院解剖学教研室,黑龙江省哈尔滨市南岗区保健路 157 号(150081);E-mail: jhzheng@ems.hrbmu.edu.cn

收稿日期: 2015-01-16; **修回日期:** 2015-03-01

为血卟啉(HP)及其衍生物^[7]。

2 SDT 诱导肿瘤细胞的死亡方式及其作用机制

2.1 SDT 诱导肿瘤细胞程序性死亡

2.1.1 膜受体凋亡

许多研究显示,膜损伤的程度和细胞修复损伤的能力^[8]决定了细胞死亡的方式:可能是立即裂解、坏死或凋亡^[9]。Feril 等^[10]用频率为 1MHz,强度为 0.3W/cm²,占空比为 10%,脉冲重复频率为 100Hz 的声波处理人白血病 U937 细胞 1min,12h 后,可使细胞凋亡率高达 70%。这表明脉冲超声在特定超声参数下有诱导凋亡作为细胞的主要死亡方式的特点。这种情况可以用膜损伤和修复的理论来解释:超声条件足以诱导膜损伤,并且细胞膜有时间一定程度地去修复损伤,这样就避免了细胞溶解^[10]。在 SDT 处理小鼠骨肉瘤 S180 细胞时,Wang 等^[11]观察到细胞内活性氧和脂质过氧化明显增加,进而可改变生物膜和血清脂蛋白的结构。这表明细胞膜和磷脂在 SDT 处理过程中受损伤或降解时,可致游离脂肪酸(FFAs)被释放到细胞悬液中,进而影响细胞膜内外物质交换,造成一系列的物质改变,导致细胞凋亡。

2.1.2 线粒体凋亡

在 SDT 所诱导的肿瘤细胞内源性凋亡过程中,线粒体结构功能的改变具有重要作用^[12,13]。线粒体凋亡通路可被多种因子诱导活化,如发生发育、环境因子、细胞压力、DNA 破坏、热休克及营养缺乏^[14]。研究显示,用超声联合血卟啉单甲醚(HMME)处理人白血病 U937 细胞时,检测到 caspase-3 和 DNA 修复酶 PARP (poly ADP-ribose polymerase)在 mRNA 水平表达上升,抑制活性氧的产生,可部分阻止 SDT 所致的 caspase-3 的活化和 PARP 的裂解^[15]。Lv 等^[13]证实,活性氧可作为 SDT 诱导癌细胞线粒体凋亡途径的启动者。

Wang 等^[16]在对鼠白血病细胞 L-1210 研究时证实,原卟啉 IX(PpIX)与超声结合处理细胞 2~4h 后,通过扫描电镜观察到凋亡小体明显增多,线粒体释放到胞质中的细胞色素 C 增加;SDT 处理 6h 之后,磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine,PS)外翻,caspase-3 激活和染色质凝聚。线粒体凋亡通路的一个主要

特征是凋亡蛋白从线粒体膜间隙转移到胞浆中;这些蛋白包括细胞色素 C、耐热蛋白 A2、凋亡诱导因子 AIF 和核酸内切酶 G^[17,18]。而细胞色素 C 和 Bcl-2 家族的出现表明细胞确实发生了线粒体依赖的凋亡^[19]。

2.1.3 内质网应激

内质网是细胞内蛋白质合成的主要场所,同时也是 Ca²⁺的主要储存库。内质网对细胞凋亡的作用主要表现在两个方面:一是内质网对 Ca²⁺的调控(内质网内钙离子平衡的破坏可诱导 caspase-12 表达,进而剪切 caspase-3 而引发细胞凋亡);二是凋亡酶在内质网上的激活。Ca²⁺被认为是可调节细胞凋亡或坏死的第二信使。Dai 等^[20]在对大鼠 C6 胶质瘤细胞进行研究时证实,经 SDT 处理后,细胞内 Ca²⁺浓度和 ROS 水平明显上调。Feril 等^[21]也进一步证实 ROS 的产生和钙超载是 SDT 诱导细胞死亡的关键。可能作用机制是因 SDT 损伤了细胞膜的正常功能,引起 Ca²⁺内流,导致钙敏感通路如蛋白激酶 C 和 AMP 基因激活。另外,研究显示经 SDT 处理人白血病 U937 细胞后,可使细胞外环境内的 Ca²⁺内流,并指出其可能与 DNA 片段化有关,进而影响了线粒体功能^[22]。

2.1.4 类凋亡

类凋亡(paraptosis)与凋亡过程相类似,也是程序性死亡的一种,但又缺少凋亡的典型特征(如凋亡小体)。它是介于凋亡和坏死之间的一种细胞死亡方式。发生类凋亡时,细胞体积会变大,电镜下可看到大量线粒体和内质网肿胀形成的胞浆空泡^[23]。尽管受损伤的细胞通过抗损伤修复机制最终可以存活下来,但其中一些细胞也会通过凋亡或者坏死的方式死亡。凋亡的细胞在凋亡过程中任何的细胞膜破裂均有可能终止凋亡程序,并且通过溶解的方式杀死细胞。一些研究结果显示,包括超声介导的凋亡,其中的一些细胞就会以一种结合了凋亡(需要有蛋白质合成)和坏死(胞质空泡形成)特点的形式死亡,即非凋亡性程序化细胞死亡(也就是类凋亡)^[24]。Honda 等^[22]通过电子显微镜认为声处理后的细胞为“凋亡细胞”(即类凋亡),这也可用来解释上述胞质空泡现象。

2.1.5 SDT 与自噬

自噬是一种吞噬自身细胞质蛋白或细胞器的回收机制,在机体的发生发展和稳持体内平衡方面具

有重要作用。自噬在营养缺乏时可为蛋白质的合成提供必需的营养,也可降解错误折叠或聚合的蛋白以及受损的细胞器(例如内质网和线粒体)。另外,自噬除了与正常生理过程有关外,也与许多疾病有关如神经退行性变和癌症^[25]。自噬可以从形态学上区别于其他细胞死亡形式,即胞内出现双层膜自吞噬泡,吞噬泡内为胞质和细胞器,又称为自噬体。

Wang 等^[16]用 1 μ g/ml PpIX 和 1W/cm² 强度的超声处理鼠白血病 L1210 细胞,处理 0.5h 后即可检测到自噬小体以及脂蛋白 LC3-II 的表达上调。并且自噬泡的产生要早于细胞色素 C 的释放和染色质凝聚。该研究进一步证实,活性氧可调节细胞自噬、凋亡以及细胞最终的命运。在 SDT 治疗过程中,N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)的存在不仅可显著减少 LC3-II 的表达,也可抑制线粒体和自噬相关基因 5 (autophagy related genes 5, ATG5) 的共定位(需要自噬囊泡的形成),这进一步表明 SDT 所产生的自由基可促进自噬的产生^[16]。自噬被认为是 SDT 所诱导细胞死亡的机制之一^[26,27]。

2.2 SDT 诱导肿瘤细胞非程序性死亡

坏死是一种偶然或不受控制的细胞死亡方式(Ⅲ型细胞死亡),其是对严重缺氧或缺血性损伤的一种反应;坏死可致新陈代谢异常及伴随 ATP 的消耗^[28]。但越来越多的研究证实坏死可能启动特殊的作用机制,包括信号转导^[29]。细胞坏死的出现在特定情况下可能取决于细胞内信号转导的活化。

目前大多数的观点认为,大剂量的 SDT 可导致细胞的非程序性死亡,如高强度聚焦超声利用其高热效应,在瞬间使聚焦区的温度达到 65℃~100℃,导致靶区内的组织出现不可逆转的凝固性坏死^[32]。Song 等^[30]在对鼠胶质瘤模型研究时证实,血卟啉单甲醚(HMME)联合超声可诱导鼠胶质瘤出现坏死,延长小鼠生存。另外,Su 等^[31]的研究显示应用自噬抑制剂后,可增强 SDT 介导的白血病 K562 细胞坏死^[31]。

2.3 其他

研究证实 SDT 能够促进抗血管生成基因的活化,使肿瘤区域无法获得所必需的营养物质,进而呈现低氧、血管不成熟,最终导致凋亡发生^[33]。因此,SDT 联合血管损伤剂来治疗肿瘤具有较好的治疗前景。我们先前的研究也证实,SDT 可抑制人脐静脉内

皮细胞(HUVECs)的生长、小管形成及血管新生,从而抑制肿瘤的生长^[34]。

上述所提到的细胞死亡方式也仅仅是 SDT 所诱导的几种细胞死亡方式。也许还存在其他死亡方式如胀亡、细胞有丝分裂灾难^[35]、凋亡坏死并存和自裂等。

3 结 语

SDT 通过热效应、空化效应、机械效应和声孔效应等生物学效应可引起细胞程序性和非程序性细胞死亡,进而通过破坏细胞器、细胞膜或损伤血管结构而引起细胞内 caspase-3 释放增加、Bcl-2 分泌受阻、活性氧增多、钙超载、Fas 与配体 FasL 结合异常、脂质过氧化、营养缺乏及血管新生受阻,最终致细胞凋亡、自噬和坏死。然而细胞对 SDT 的应答受到细胞种类、相关基因及代谢能力的影响,同时实验条件、超声辐射量、声敏剂类型及其在细胞内的定位也决定了细胞死亡方式。因此,正确理解 SDT 会引起何种细胞应答,可以为 SDT 在临床上的应用提供新的方向,如开发与 SDT 有协同作用的新靶点药物,这将会是肿瘤治疗史的一大进步。

参考文献:

- [1] Rosenthal I, Sostaric JZ, Riesz P. Sonodynamic therapy—a review of the synergistic effects of drugs and ultrasound [J]. *Ultrason Sonochem*, 2004, 1(6): 349–363.
- [2] Shibaguchi H, Tsuru H, Kuroki M, et al. Sonodynamic cancer therapy: a non-invasive and repeatable approach using low-intensity ultrasound with a sonosensitizer [J]. *Anticancer Res*, 2011, 31(7): 2425–2429.
- [3] Wang P, Wang X, Zhang K, et al. The spectroscopy analyses of PpIX by ultrasound irradiation and its sonotoxicity in vitro [J]. *Ultrasonics*, 2013, 53(5): 935–942.
- [4] Li Y, Su X, Wang X, et al. Cytotoxic effect of protoporphyrin IX to human Leukemia U937 cells under ultrasonic irradiation [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 33(4): 1186–1196.
- [5] Peric P. The role of diagnostic ultrasound of hands and feet in the patients with rheumatoid arthritis [J]. *Reumatizam*, 2014, 61(2): 43–54.
- [6] Liu Y, Wei X, Kuang Y, et al. Ultrasound treatment for accelerating fracture healing of the distal radius. A control study [J]. *Acta Cir Bras*, 2014, 29(11): 765–770.
- [7] Kuroki M, Hachimine K, Abe H, et al. Sonodynamic ther-

- apy of cancer using novel sonosensitizers [J]. *Anticancer Res*, 2007, 27(6A):3673–3677.
- [8] McNeil PL, Terasaki M. Coping with the inevitable: how cells repair a torn surface membrane [J]. *Nat Cell Biol*, 2001, 3(5):E124–E129.
 - [9] Feril LB Jr, Kondo T. Biological effects of low intensity ultrasound: the mechanism involved, and its implications on therapy and on biosafety of ultrasound [J]. *J Radiat Res*, 2004, 45(4):479–489.
 - [10] Feril LB Jr, Kondo T, Cui ZG, et al. Apoptosis induced by the sonomechanical effects of low intensity pulsed ultrasound in a human leukemia cell line [J]. *Cancer Lett*, 2005, 221(2):145–152.
 - [11] Wang XB, Liu QH, Wang P, et al. Study of cell killing effect on S180 by ultrasound activating protoporphyrin IX [J]. *Ultrasonics*, 2008, 48(2):135–140.
 - [12] Wang H, Wang X, Zhang S, et al. Sinoporphyrin sodium, a novel sensitizer, triggers mitochondrial-dependent apoptosis in ECA-109 cells via production of reactive oxygen species [J]. *Int J Nanomed*, 2014, 9:3077–3090.
 - [13] Lv Y, Fang M, Zheng J, et al. Low-intensity ultrasound combined with 5-aminolevulinic acid administration in the treatment of human tongue squamous carcinoma [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2012, 30(2):321–333.
 - [14] Tait SW, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11(9):621–632.
 - [15] Su X, Wang P, Wang X, et al. Apoptosis of U937 cells induced by hematoporphyrin monomethylether-mediated sonodynamic action [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2013, 28(3):207–217.
 - [16] Wang X, Wang P, Zhang K, et al. Initiation of autophagy and apoptosis by sonodynamic therapy in murine leukemia L1210 cells [J]. *Toxicol In Vitro*, 2013, 27(4):1247–1259.
 - [17] Degterev A, Yuan J. Expansion and evolution of cell death programmes [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9(5):378–390.
 - [18] Youle RJ, Strasser A. The Bcl-2 protein family: opposing activities that mediate cell death [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9(1):47–59.
 - [19] Mroz P, Yaroslavsky A, Kharkwal GB, et al. Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer [J]. *Cancers (Basel)*, 2011, 3(2):2516–2539.
 - [20] Dai S, Hu S, Wu C. Apoptotic effect of sonodynamic therapy mediated by hematoporphyrin monomethylether on C6 glioma cells in vitro [J]. *Acta Neurochir (Wien)*, 2009, 151(12):1655–1661.
 - [21] Feril LB, Tachibana K, Ikeda-Dantsuji Y, et al. Therapeutic potential of low-intensity ultrasound (part 2): biomolecular effects, sonotransfection, and sonopermeabilization [J]. *J Med Ultrason*, 2008, 35(4):161–167.
 - [22] Honda H, Kondo T, Zhao QL, et al. Role of intracellular calcium ions and reactive oxygen species in apoptosis induced by ultrasound [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2004, 30(5):683–692.
 - [23] Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, et al. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition [J]. *Oncogene*, 2004, 23(16):2825–2837.
 - [24] Feril LB, Tachibana K, Ogawa K, et al. Therapeutic potential of low-intensity ultrasound (part 1): thermal and sonomechanical effects [J]. *J Med Ultrason*, 2008, 35(4):153–160.
 - [25] Duffy A, Le J, Sausville E, et al. Autophagy modulation: a target for cancer treatment development [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2015, 75(3):439–447.
 - [26] Wang S, Hu Z, Wang X, et al. 5-aminolevulinic acid-mediated sonodynamic therapy reverses macrophage and dendritic cell passivity in murine melanoma xenografts [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2014, 40(9):2125–2133.
 - [27] Wang P, Leung AW, Xu C. Low-intensity ultrasound-induced cellular destruction and autophagy of nasopharyngeal carcinoma cells [J]. *Exp Ther Med*, 2011, 2(5):849–852.
 - [28] Galluzzi L, Vanden Berghe T, Vanlangenakker N, et al. Programmed necrosis from molecules to health and disease [J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2011, 289:1–35.
 - [29] Christofferson DE, Yuan J. Necroptosis as an alternative form of programmed cell death [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2010, 22(2):263–268.
 - [30] Song D, Yue W, Li Z, et al. Study of the mechanism of sonodynamic therapy in a rat glioma model [J]. *Oncol Targets Ther*, 2014, 7:1801–1810.
 - [31] Su X, Wang P, Yang S, et al. Sonodynamic therapy induces the interplay between apoptosis and autophagy in K562 cells through ROS [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2015, 60:82–92.
 - [32] Shek SY, Yeung CK, Chan JC, et al. Efficacy of high-intensity focused ultrasonography for noninvasive body sculpting in Chinese patients [J]. *Lasers Surg Med*, 2014, 46(4):263–269.
 - [33] Bai WK, Shen E, Hu B. The induction of the apoptosis of cancer cell by sonodynamic therapy: a review [J]. *Chin J Cancer Res*, 2012, 24(4):368–373.
 - [34] Gao Z, Zheng J, Yang B, et al. Sonodynamic therapy inhibits angiogenesis and tumor growth in a xenograft mouse model [J]. *Cancer Lett*, 2013, 335(1):93–99.
 - [35] Molz L, Booher R, Young P, et al. Cdc2 and the regulation of mitosis: six interacting mcs genes [J]. *Genetics*, 1989, 122(4):773–782.