

· 基础研究 ·

低强度超声诱导人肝癌细胞系 SMMC-7721 细胞凋亡的体外研究

石明芳 刘邦忠 杨名珍 薛军 刘光华 王平 李蕴

【摘要】目的 观察低强度超声(LIPUS)对肝肿瘤细胞系 SMMC-7721 细胞凋亡的体外生物学效应,并探讨其可能的作用机制。**方法** 将体外培养的 SMMC-7721 细胞根据有无超声干预或超声作用强度分为空白对照组、0.5 W/cm² 超声干预组、1.3 W/cm² 超声干预组和 2.0 W/cm² 超声干预组。空白对照组切断电源给予假超声干预,0.5 W/cm² 超声干预组、1.3 W/cm² 超声干预组和 2.0 W/cm² 超声干预组则根据对应的强度进行超声干预。4 组细胞超声干预后孵育 6 h,分别采用流式细胞仪检测细胞凋亡、坏死情况及细胞周期改变,采用透射电镜观察微结构变化,采用 DNA 琼脂糖凝胶电泳实验检测 DNA 是否发生片段化,采用 Western-blot 法检测 Caspase-3 蛋白表达情况。**结果** 经 LIPUS 处理后 6 h,0.5 W/cm² 超声干预组、1.3 W/cm² 超声干预组和 2.0 W/cm² 超声干预组细胞凋亡率分别为 4.66%、8.99%、32.41%;且各组 G₂ 期(DNA 合成后期)细胞所占比例增加,G₁ 期(DNA 合成前期)细胞显著减少,分别与空白对照组同期比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。0.5 W/cm² 超声干预组、1.3 W/cm² 超声干预组和 2.0 W/cm² 超声干预组 Hoechst-染色和透射电镜下均可见明显细胞凋亡,且 DNA 琼脂糖凝胶电泳可见 DNA ladder,并于 6 h、9 h 时出现明显片段化。1.3 W/cm² 超声干预组和 2.0 W/cm² 超声干预组 Caspase-3 的表达明显增高,且与空白对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 低强度超声可通过多种效应抑制肝肿瘤细胞 SMMC-7721 增殖,诱导其凋亡,且对肿瘤细胞的诱导凋亡作用在一定范围内具有强度依赖性;促凋亡作用的机制可能与经线粒体通路特别是 Caspase-3 蛋白的活化有关。

【关键词】 低强度超声; 人肝癌细胞系 SMMC-7721; 抗癌效应; 细胞凋亡

Apoptosis of SMMC-7721 cells induced by the low-intensity pulsed ultrasound in vitro Shi Mingfang, Liu Bangzhong, Yang Mingzhen, Xue Jun, Liu Guanghua, Wang Ping, Li Yun. Department of Rehabilitation, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

Corresponding author: Liu Bangzhong, Email: liu.bangzhong@zs-hospital.sh.cn

【Abstract】Objective To explore whether the low-intensity pulsed ultrasound (LIPU) could induce apoptosis on SMMC-7721 cells and to explore the underlying mechanism. **Methods** The SMMC-7721 cells were randomly divided into 4 groups: a blank control group, which was subject to sham exposure to ultrasound, and 3 ultrasound intervention groups exposed to ultrasound at intensities of 0.5, 1.3 and 2.0 W/cm², respectively. Then they were incubated for 6 h. The cell apoptosis, necrosis and changes of cell cycles were measured using the flow cytometry. The transmission electron microscope (TEM) was used to observe microstructural changes in the cells. The agarose gel electrophoresis (AGE) was used to examine the DNA fragmentation, and Western-blotting was employed to assess the protein expression of caspase-3. **Results** The average cell apoptosis rate of the 3 intervention groups were 4.66%, 8.99% and 32.41%, respectively. The percentage of cells in G₂ phase increased significantly and those in G₁ phase decreased significantly in the 3 intervention groups compared to the blank control group at the same time points. In the intervention groups, significant cell apoptosis was observed under TEM, and DNA ladders was seen in AGE, with DNA fragments appearing obviously when cells were incubated for 6 h and 9 h after ultrasound exposure. In intervention groups subject to 1.3 and 2.0 W/cm² ultrasound exposure, the protein expression of caspase-3 was significantly higher than that of the control group. **Conclusion** LIPU can inhibit the proliferation and induce apoptosis of SMMC-7721 cells with a dose-dependent feature. The possible mechanism underlying the LIPU-induced cell apoptosis might be related to the activation of the mitochondria pathway, and especially the caspase-3 protein.

【Key words】 Low intensity ultrasound; SMMC-7721 cells; Anticancer effect; Apoptosis

目前,超声医学已从疾病的诊断向疾病的治疗方向扩展,主要涉及药物靶向、基因转录、增强高能超声热效应等,成为康复医学的一项重要治疗手段^[1]。近年来,国内外大量的实验研究将低强度超声(low-intensity pulsed ultrasound, LIPUS)应用于肿瘤治疗,取得了一定的进展^[1-3]。Kishimoto 等^[4]2012 年将 LIPUS 用于临床,对 1 例横纹瘤肌肉植骨重建术后 3 个月植骨处未愈合患者进行每天 20 min 的低强度超声治疗,治疗 6 个月后,其骨缝完全愈合,随访 2 年,局部无肿瘤复发。低强度超声是频率和强度均较低的超声波,具有波长长、声能吸收少、易穿透组织、局部损伤小等特点^[5]。因此低强度超声有望在肿瘤治疗及肿瘤患者疾病的康复中发挥重要作用。

肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是世界上多发恶性肿瘤之一,仅 2008 年全球就有 750 000 新发病例^[6]。乙肝病毒慢性感染、黄曲霉毒素中毒等因素导致中国肝癌发病率居高不下,病死率已达 20.37/100 000,居中国大陆地区肿瘤死亡率的第二位^[6-7]。HCC 及其多种并发症严重影响了患者的生命质量。目前,针对原发肝癌的治疗主要包括手术切除和放疗、化疗的单独或联合应用,而有关 LIPUS 对肝癌细胞的相关研究较少。本研究旨在观察体外 LIPUS 对肝肿瘤细胞系 SMMC-7721 细胞凋亡的生物学效应,并探讨其可能的机制。

材料和方法

一、实验材料

人肝癌细胞系 SMMC-7721 细胞由复旦大学附属中山医院肝癌研究所馈赠,改良的 Eagle 培养基(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM)培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、双抗(青霉素和链霉素)、胰蛋白酶、碘化丙啶(propidium iodide, PI)均购于美国 Gibco 公司, Hoechst 试剂盒、DNA ladder(DNA 梯状条带)抽提试剂盒及蛋白裂解缓冲液(RIPA Lysis Buffer)购于上海碧云天生物公司,异硫氰酸荧光素(Annexin V-fluorescein Isothiocyanate, Annexin V-FITC)试剂盒购于美国 Invitrogen 公司,兔抗 Caspase-3 一抗购于美国 CST 公司,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)一抗、异硫氰酸荧光素(fluorescein Isothiocyanate, FITC)标记的二抗均购于美国 Santa Cruz Biotechnology 公司, ECL 发光剂购于美国 Millipore 公司,荧光激活细胞筛选分析(fluorescence-activated cell sorting, FACS)流式细胞仪由美国 BD Biosciences 公司生产,荧光显微镜由日本 Olympus 公司生产,透射电镜由日本 Hitachi 公司生产,实验用超声治疗仪由英国 BTL 公司生产。

二、SMMC-7721 细胞培养及超声干预

将 SMMC-7721 细胞培养于含 10% FBS、1% 双抗(青霉素和链霉素)的 DMEM 培养基中,置于 37 ℃, 5% CO₂ 恒温孵育箱中,待细胞处于对数生长期时进行后续实验。

将上述 SMMC-7721 细胞接种于 6 孔板内,接种密度为 0.5×10^6 /ml,待细胞处于对数生长期,且细胞活力 > 95%,待满 80% ~ 90% 时将其分为空白对照组和 0.5 W/cm² 超声干预组、1.3 W/cm² 超声干预组、2.0 W/cm² 超声干预组。LIPUS 干预方法参照 Feril 等^[8]的实验,将超声探头(有效直径为 3 cm)垂直固定于 6 孔板底部(底面积 9.5 cm²),其间加用耦合剂填充以隔绝空气影响。超声处理频率均为 1 MHz,工作周期(duty cycle, DC)25%,干预时间为 1 min,空白对照组切断电源予以假超声干预。4 组细胞经 LIPUS 干预后均孵育 6 h,然后置于倒置显微镜下观察形态改变,每组设 3 个复孔。

三、Hoechst-染色试剂盒检测细胞凋亡

将无菌盖玻片置于六孔板中,接种细胞培养 24 h,4 组细胞均于超声作用后吸尽培养液加入固定液孵育 30 min,去固定液用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)洗两遍加入染色液染色 5 min,再用 PBS 洗 2 遍后将盖玻片置于滴有淬灭液的载玻片上,然后置于荧光显微镜下观察(激发波长为 350 nm,发射波长为 460 nm)。

四、流式细胞术检测细胞凋亡率

收集经超声干预后又孵育 6 h 的 4 组细胞,采用 PBS 重悬计数;取 5×10^5 个细胞加入 195 μl Annexin V-FITC 结合液重悬,加入 5 μl Annexin V-FITC 和 10 μl PI 混匀,室温避光孵育 15 min,采用流式细胞仪进行检测,Annexin V-FITC 为绿色荧光,PI 为红色荧光。

五、SMMC-7721 细胞周期检测

将经超声干预后又孵育 6 h 的 4 组细胞均置于 37 ℃, 5% CO₂ 恒温孵育箱中培养 6 h。收集细胞 1×10^6 个予 75% 冰乙醇固定, -20 ℃ 放置 24 h。离心弃去乙醇(离心半径 8 cm, 12 000 r/min 离心 10 min), PBS 清洗,加入 PI(10 mg/ml)染液 5 μl,室温下避光染色 30 min 后上样,采用 Modfit 3.0 版软件分析各组细胞生长周期情况。

六、透射电镜观察细胞微结构变化

收集 4 组细胞各 1×10^6 个,予 2.5% 戊二醛中充分固定过夜, PBS 洗 3 次,离心去上清(离心半径 8 cm, 12 000 r/min 离心 10 min);样品中加入 1% 锇酸固定 3 h, PBS 洗 3 次;脱水过程,样品逐一放置于 50%、70%、90% 的乙醇、90% 的乙醇和 90% 丙酮混合液(1:1)、90% 丙酮中浸泡各 15 ~ 20 min,脱水过程在

4℃条件下进行;样品置于纯丙酮+包埋液(1:2)室温下过夜,再置于纯包埋液中2~3h充分包埋;37℃烘箱内充分干燥后用超薄切片机将样品切成60nm薄片,用3%醋酸铀-枸橼酸铅进行双染色,透射电镜下观察拍片。

七、琼脂糖凝胶电泳检测 DNA ladder

4组细胞经超声干预后分别孵育3、6、9、12和18h,然后分别收集 1×10^6 个细胞中加入500μl添加了蛋白酶K的样品裂解液,充分裂解,50℃水浴消化过夜;加入500μl Tris 平衡苯酚充分混匀后4℃离心(离心半径8cm,12000r/min离心5min),保留水相先后用等体积平衡苯酚、氯仿再抽提一次,吸出300μl上清,加入10M 醋酸铵和600μl无水乙醇,-70℃冻存过夜后再次离心(4℃,离心半径8cm,12000r/min离心5min),弃上清,加入600μl 70%乙醇混匀后离心(离心半径8cm,12000r/min离心10min),弃上清,加入100μl TE 缓冲液溶解DNA。将各组抽提到的DNA样本用于1%琼脂糖凝胶电泳分析。

八、Western-blot 检测 Caspase-3 蛋白表达

采用蛋白裂解缓冲液分别裂解4组细胞抽提总蛋白;采用蛋白测定试剂盒(上海碧云天公司)测总蛋白浓度,以牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA)作为标准品,经分光光度计检测562nm处吸光度A值,绘制标准曲线后,根据各待测蛋白稀释孔的A562平均值确定出待测蛋白的浓度。将4组的蛋白样品调至相同浓度后按照每孔40μg含量上样,经10%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后转至PVDF膜上,5%脱脂牛奶封闭后加入一抗(工作浓度1:1000),孵育过夜后加入相应辣根过氧化物酶结合的二抗(工作浓度1:5000)。采用ECL化学发光试剂盒检测杂交信号,扫描成像并用Quantity One软件测量灰度值分析结果。

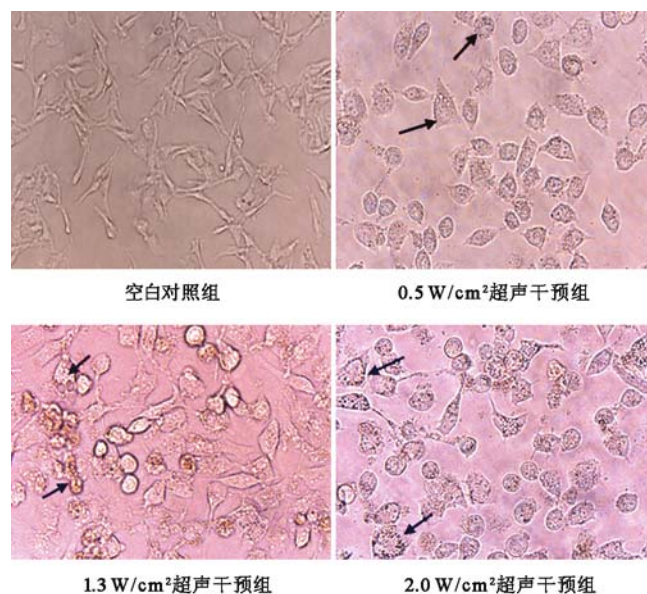
九、统计学分析

使用SPSS 17.0版统计学软件进行数据分析,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用t检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、倒置显微镜下 LIPUS 干预后细胞形态改变

经LIPUS干预后,倒置显微镜下可见空白对照组细胞贴壁良好,呈现典型的梭形结构,未见细胞悬浮;0.5W/cm²超声干预组、1.3W/cm²超声干预组和2.0W/cm²超声干预组细胞均呈现典型凋亡改变,部分细胞悬浮,且随着作用强度增大,悬浮细胞增多,1.3W/cm²超声干预组和2.0W/cm²超声干预组可见部分细胞碎片漂浮,部分细胞呈现椭圆形,胞内可见空泡、核碎片。详见图1。



注:箭头所指为细胞形态学改变

图1 LIPUS 干预后4组细胞形态学改变(免疫组化染色,×200)

二、Hoechst 染色试剂盒检测 LIPUS 干预后细胞形态改变

Hoechst 染色试验结果显示,荧光显微镜下空白对照组细胞的细胞核呈现正常的蓝色,染色及大小较一致;0.5W/cm²超声干预组、1.3W/cm²超声干预组和2.0W/cm²超声干预组可见明显细胞凋亡表现,形态改变,部分细胞核呈致密浓染或碎块状致密浓染,颜色发白,且随着超声作用强度的增大,凋亡细胞逐渐增多且明显。详见图2。

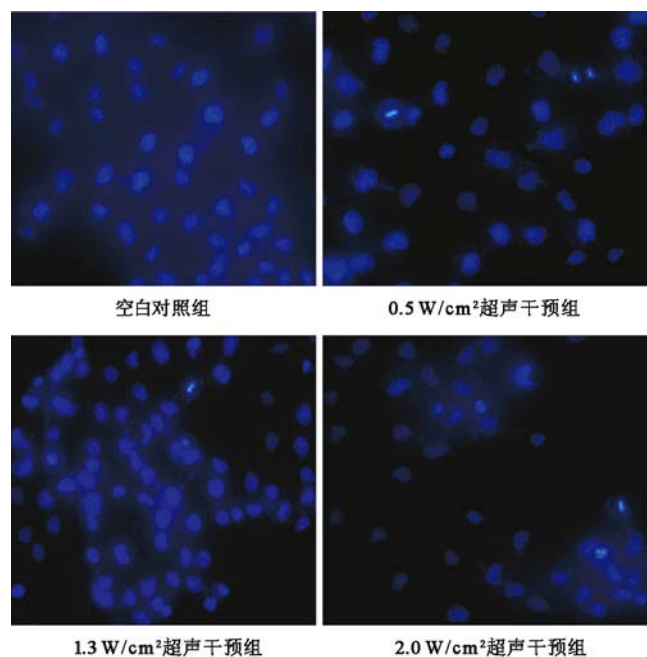
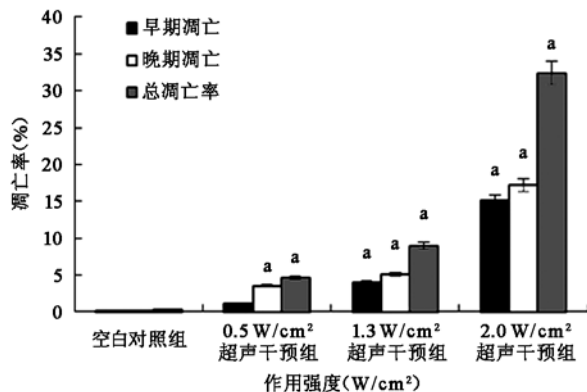


图2 4组细胞 Hoechst 33258 荧光染色形态(Hoechst 33258 荧光染色,×200)

三、LIPUS 干预对 SMMC-7721 细胞凋亡及细胞周期的影响

流式细胞术检测细胞凋亡结果显示,空白对照组仅有 0.24% annexin V-FITC 阳性细胞,而 0.5 W/cm² 超声干预组、1.3 W/cm² 超声干预组和 2.0 W/cm² 超声干预组凋亡细胞比例分别为 4.66%, 8.99% 和 32.41%, 凋亡细胞比例随超声作用强度的增加而上升,与空白对照组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。详见图 3。与空白对照组比较,0.5 W/cm² 超声干预组、1.3 W/cm² 超声干预组和 2.0 W/cm² 超声干预组滞留在 G₂ 期的细胞数量增加, G₁ 期细胞数量减少,分别与空白对照组同期比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),具体数据见表 1。



注:与空白对照组比较,^a $P < 0.05$

图 3 超声干预后又孵育 6 h 后 4 组细胞凋亡率比较示意图

表 1 4 组细胞各周期细胞凋亡率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	孔数	G ₁	S	G ₂
空白对照组	3	43.96 ± 2.16	8.20 ± 0.05	43.86 ± 3.68
0.5 W/cm ² 超声干预组	3	40.06 ± 0.52 ^a	8.50 ± 0.18	49.91 ± 1.97 ^a
1.3 W/cm ² 超声干预组	3	25.58 ± 1.19 ^a	9.36 ± 0.86 ^a	61.96 ± 2.09 ^a
2.0 W/cm ² 超声干预组	3	16.18 ± 0.26 ^a	8.69 ± 0.37 ^a	73.08 ± 4.17 ^a

注:与空白对照组同周期比较,^a $P < 0.05$

四、透射电镜下 LIPUS 干预后细胞的结构改变

透射电镜下可见,空白对照组细胞膜完整,细胞器结构正常,核仁明显,染色质均匀;0.5 W/cm² 超声干预组、1.3 W/cm² 超声干预组和 2.0 W/cm² 超声干预组细胞出现不同程度改变,主要表现为胞质疏松,胞内出现大小不一的空泡,部分细胞膜破裂,胞质崩解;还可见细胞凋亡改变,细胞皱缩,胞质浓缩、细胞核固缩、染色质边集呈团块状或新月状、细胞表面微绒毛减少甚至消失,且随超声作用强度增大,细胞结构的改变亦更为明显。详见图 4。

五、LIPUS 干预后 SMMC-7721 细胞 DNA ladder 表现

DNA 电泳显示,空白对照组仅见离点样孔不远的

基因组 DNA,0.5 W/cm² 超声干预组未出现明显的 DNA ladder,而 1.3 W/cm² 超声干预组和 2.0 W/cm² 超声干预组可见清晰的 DNA 梯带,且在孵育 6 h 和 9 h 后可见明显的 DNA 片段聚集。详见图 5 (以 1.3 W/cm² 超声干预组为例)。

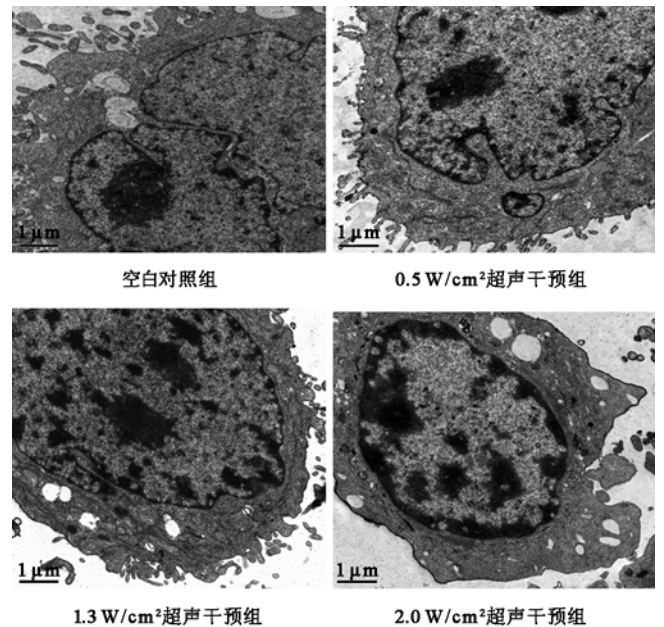


图 4 LIPUS 处理后透射电镜下 4 组细胞形态学改变 (醋酸铀-枸橼酸铅双染色, ×1000)

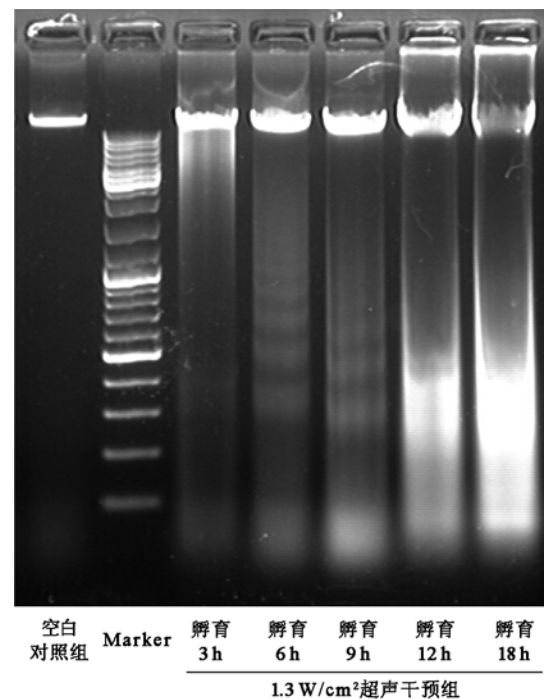
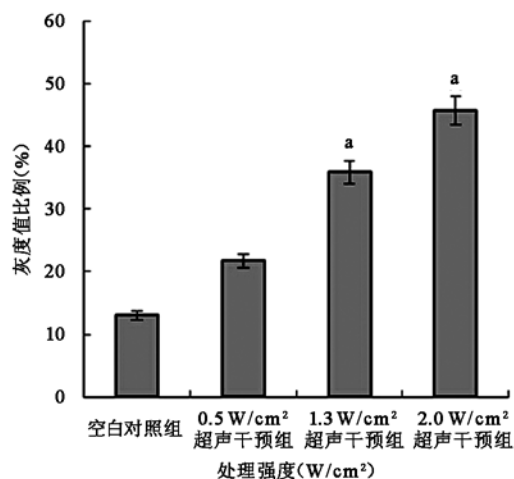


图 5 空白对照组和 1.3 W/cm² 超声干预组 DNA 琼脂糖凝胶电泳图

六、LIPUS 干预对 Caspase-3 蛋白表达的影响

通过 Western-blot 检测发现,0.5 W/cm² 超声干预组、1.3 W/cm² 超声干预组和 2.0 W/cm² 超声干预组

可见 Caspase-3 蛋白表达明显活化,且随着 LIPUS 作用强度的增加, Caspase-3 蛋白表达量也随之增加, 1.3 W/cm² 超声干预组和 2.0 W/cm² 超声干预组的 Caspase-3 蛋白表达量与空白对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。详见图 6。



注:与空白对照组比较,^a $P < 0.05$

图 6 LIPUS 干预对 Caspase-3 蛋白表达的影响

讨 论

细胞凋亡是近年来基础理论研究的热点课题,其在肿瘤形成的不同阶段均具有十分重要的作用,诱导肿瘤细胞凋亡从而治疗肿瘤无疑是抗癌的新思路。细胞凋亡可被多种生物和理化因素诱导而启动,目前认为,低强度超声诱导细胞凋亡的机制主要包括:(1)空化效应——在超声波的作用下,空化效应导致液体中产生 $\cdot\text{OH}$ 、 $\cdot\text{OOH}$ 、 $\cdot\text{H}$ 等自由基以及 H_2O_2 和 H_2 等物质,这些物质在诱导酶的失活、脂质体的解聚以及细胞杀伤中发挥重要作用;同时,超声降低了超氧化物歧化酶的活力,并削弱其清除活性氧自由基的能力^[9],最终诱导聚合物的降解和细胞凋亡。LIPUS 能够改变细胞膜的结构使其产生瞬时小孔,大分子物质可借此进入细胞内而发挥作用。利用这一特性能够增加抗癌药物渗透或将质粒 DNA 整合入靶细胞内,被用于肿瘤治疗^[10]。(2)机械效应——超声传播过程中介质质点交替压缩与伸张构成了压力变化,即使是低强度的超声波,都可使介质点进入震动状态,从而增强液态介质的质点运动,加速质量传递作用。通过机械作用,不仅能使细胞膜发生透化、破坏细胞间连接,同时能够促进肿瘤细胞 DNA 的损伤^[11]、改变骨架基础蛋白从而破坏细胞骨架^[12],最终发挥促细胞凋亡作用。

本研究结果显示, SMMC-7721 细胞经 LIPUS 干预处理后,光镜下可见细胞悬浮,胞内出现空泡,随着 LIPUS 干预强度增大,悬浮液中细胞碎片也随之增多;

透射电镜下可见 SMMC-7721 细胞形态发生明显凋亡改变,部分细胞膜破裂、胞质疏松、胞内出现空泡。该结果提示,低强度超声可引发 SMMC-7721 细胞膜表面形态变化、降低细胞膜通透性、改变胞内结构。除此之外,通过自由基攻击和机械性损伤,肿瘤细胞核也会出现相应变化。本研究显示,通过 Hoechst-染色可见 3 组超声作用组的细胞明显核质浓染或碎块状致密浓染,提示经 LIPUS 干预后, SMMC-7721 细胞核发生结构改变。本课题组进一步采用透射电镜观察核内微结构,发现 3 组超声作用组核固缩、染色质边集、凋亡细胞基质呈较高电子密度、凋亡小体形成,细胞呈现典型凋亡改变,提示 LIPUS 具有诱导 SMMC-7721 细胞凋亡的作用。

凋亡是生物体在其生长、机体防御、衰老和大剂量放射物暴露下保证机体组织内环境稳定的一种生物学过程,是以细胞核膜的变化和染色质的浓缩起始,继之表现为 DNA 断裂^[13]。本研究通过 DNA 琼脂糖凝胶电泳观察到, 3 组超声作用组 DNA 片段化加深,完整的 DNA 减少,且超声作用强度增加至 2.0 W/cm² 时, DNA ladder 最为明显。有研究指出, DNA 单链断裂可通过细胞信号传导诱导细胞凋亡^[14],而 LIPUS 是否可通过某种信号通路传导进而诱导细胞凋亡还需进一步探索。

目前,国内外鲜见关于 LIPUS 对 SMMC-7721 细胞周期影响的报道。本研究中, 3 组超声作用组 G₁ 期细胞比例随着 LIPUS 作用强度的增大而下降, G₂ 期则随 LIPUS 作用强度的增大而升高,与空白对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。据此认为,低强度超声可引起 SMMC-7721 细胞周期改变,诱导更多的肿瘤细胞生长停滞与 G₂ 期,影响 SMMC-7721 细胞 DNA 合成和复制,最终抑制肿瘤细胞分裂增殖。

既往的研究从一定程度上证实了 LIPUS 可降低某些肿瘤细胞的活性并诱导凋亡^[15-17],本课题组通过多种方法观察了 4 组细胞的形态结构改变,从多方面证实 LIPUS 可诱导肝肿瘤细胞系 SMMC-7721 细胞凋亡。在此基础上,通过比较不同强度下调亡细胞数、细胞周期变化及 DNA ladder 的表现,本课题组发现,随着 LIPUS 作用强度的增大,在一定范围内促细胞凋亡的效应也随之增强,具有一定的超声强度依赖性。

细胞凋亡是机体为了维持自身的稳态而发生的程序性调控死亡过程。细胞凋亡可以通过两种基本途径来启动,包括线粒体(内源性)途径和死亡受体(外源性)途径。前者主要是通过应力信号的刺激导致细胞色素 C (Cyte C) 从线粒体膜释放,后者则是通过切割前体 Caspase-3,形成活化的 Caspase-3,进一步切割不

同的底物,以放大蛋白酶的级联反应信号,最终诱导细胞凋亡^[18-20]。

本研究结果发现,1.3 W/cm² 超声干预组和 2.0 W/cm² 超声干预组的 Caspase-3 蛋白表达量与空白对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。虽然 LIPUS 诱导细胞凋亡的具体机制目前并不清楚,但肿瘤细胞微结构的改变^[21]和线粒体膜电位的降低^[22]仍可以提示,线粒体的损伤在 LIPUS 诱导细胞凋亡中具有关键作用,线粒体可能是最先受累的细胞器。因此推测,LIPUS 诱导 SMMC-7721 细胞凋亡是从胞膜和线粒体膜的损伤开始触发的,即 LIPUS 首先作用于线粒体,改变线粒体膜电位,活化位于线粒体膜上的促凋亡蛋白 Bax;而后者可促进 Cyte C 的释放,抑制抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,活化 Caspase-3,通过线粒体途径最终诱导凋亡^[23]。

综上所述,低强度超声可抑制肝肿瘤细胞系 SMMC-7721 细胞的增殖及活性,诱导肿瘤细胞凋亡,且超声对肿瘤细胞的杀伤效应与其作用强度呈相关性,可随作用强度的增大而增强;线粒体通路特别是 Caspase-3 蛋白的活化在 LIPUS 诱导细胞凋亡中发挥了重要作用。

参 考 文 献

- [1] Nomikou N, Fowley C, Byrne NM, et al. Microbubble-sonosensitizer conjugates as therapeutics in sonodynamic therapy[J]. Chem Commun, 2012, 48(67): 8332-8334.
- [2] McCaughan B, Rouanet C, Fowley C, et al. Enhanced ROS production and cell death through combined photo- and sono-activation of conventional photosensitising drugs[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2011, 21(19): 5750-5752.
- [3] Nomikou N, Mchale AP. Exploiting ultrasound-mediated effects in delivering targeted, site-specific cancer therapy[J]. Cancer Lett, 2010, 296(2): 133-143.
- [4] Kishimoto K, Fujioka H, Akisue T, et al. Reconstruction of the elbow joint with extracorporeal irradiated bone graft associated with low intensity pulsed ultrasound in malignant soft tissue tumor[J]. J Shoulder Elbow Surg, 2012, 21(4): e1-e4.
- [5] 王文平,孙江川,常淑芳. 低强度超声的临床应用进展[J]. 重庆医学, 2008, 37(24): 2842-2844.
- [6] Ferlay J, Shin H, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008[J]. Int J Cancer, 2010, 127(12): 2893-2917.
- [7] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.
- [8] Feril LB, Cui ZG, Zhao QL, 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.
- [9] 房良华,姜藻,顾晓怡. 低频超声联合微泡剂对肝癌细胞 SMMC-7721 的生物学效应[J]. 东南大学学报(医学版), 2008, 27(04): 264-267.
- [10] Park D, Park H, Seo J, et al. Sonophoresis in transdermal drug delivery[J]. Ultrasonics, 2014, 54(1): 56-65.
- [11] 翟宝进,伍烽,邵泽勇,等. 人肝癌多药耐药细胞株的建立及超声波诱导凋亡的研究[J]. 中华肝脏病杂志, 2004, 12(02): 40-43.
- [12] Hrazdira I, Skorpikova J, Dolnikova M. Ultrasonically induced alterations of cultured tumour cells[J]. Eur J Ultrasound, 1998, 8(1): 43-49.
- [13] Kaufmann SH, Earnshaw WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy[J]. Exp Cell Res, 2000, 256(1): 42-49.
- [14] Clement GT, White PJ, Hynynen K. Enhanced ultrasound transmission through the human skull using shear mode conversion[J]. J Acoust Soc Am, 2004, 115(3): 1356-1364.
- [15] Danno D, Kanno M, Fujimoto S, et al. Effects of ultrasound on apoptosis induced by anti-CD20 antibody in CD20-positive B lymphoma cells[J]. Ultrason Sonochem, 2008, 15(4): 463-471.
- [16] 吴作辉,白文坤,张吉臻,等. 低频超声辐照对前列腺癌细胞膜通透性影响的体外实验研究[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2012, 6(14): 4091-4092.
- [17] 房良华,姜藻,钱梦霖. 低频超声联合微泡剂诱导肝癌细胞凋亡的实验研究[J]. 临床肿瘤学杂志, 2011, 16(06): 510-513.
- [18] Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy[J]. Oncogene, 2006, 25(34): 4798-4811.
- [19] Qin Y, Vanden HT, Wojcik K, et al. Caspase-dependent cytochrome c release and cell death in chick cardiomyocytes after simulated ischemia-reperfusion[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004, 286(6): H2280-H2286.
- [20] Song R, Zhou Z, Kim PK, et al. Carbon monoxide promotes Fas/CD95-induced apoptosis in Jurkat cells[J]. J Biol Chem, 2004, 279(43): 44327-44334.
- [21] 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.
- [22] Feril LJ, 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.
- [23] 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.

(修回日期:2015-06-14)

(本文编辑:阮仕衡)