

· 综述 ·

超声治疗肿瘤的机制研究进展

杨名珍 刘邦忠

超声是指频率高于 20 kHz、能在连续性介质中传播的机械波。临床上超声不仅用于诊断疾病,也是康复理疗科常用的治疗手段,应用广泛,如治疗骨关节炎、炎症和感染、促进骨折愈合、软组织修复等。低频超声通常指频率在 20 kHz~1 MHz,相比高频超声(>3 MHz)具有通透性强、声能吸收少、对组织损伤小的特点。低强度超声通常是指强度<3 W/cm²的超声,与高能聚焦超声(high intensity focused ultrasound, HIFU)相比,低强度超声以其热损伤小、机械作用弱的优势常被用于治疗肿瘤。治疗用超声相关的生物学效应包括热效应、机械效应和空化效应,而低强度超声主要通过空化效应发挥作用。超声的空化效应分为非惯性空化(空泡的稳定震荡)和惯性空化(空泡增长与爆破)两种,非惯性空化会引起流体的运动,对周围组织产生剪切力和微射流;惯性空化会产生高温和冲击波,诱发压力梯度,使周围组织破裂,同时空泡爆破期间还会产生高活性物质如活性氧和自由基,会损伤细胞膜、蛋白质、核酸等维持细胞功能的大分子,导致细胞或周围组织的破坏。本文就超声治疗肿瘤的机制综述如下。

低强度超声抗肿瘤

近年来,随着超声生物学效应研究的深入,大量实验研究已揭示其在肿瘤治疗中具有较好的潜力。早期研究表明,正常细胞对低频超声具有相当好的抵抗力,而恶性肿瘤细胞却对其非常敏感,因此低频超声可以选择性地杀伤肿瘤细胞,而对周围正常组织无损害,这奠定了低频超声用于治疗肿瘤安全性的理论基础,使得低频低强度超声成为一种新的无损伤治疗方法^[1]。其机制研究主要集中在以下几方面。

一、抑制肿瘤生长增殖、促进肿瘤凋亡

早期 Biriukov 等^[2]对不同肿瘤分型的细胞进行超声处理,然后种植到大鼠体内,发现无论肿瘤类型如何,低频超声都会抑制肿瘤的生长。此后,有学者研究了低强度超声诱导凋亡、抑制肿瘤生长的分子机制。Feng 等^[3]研究了 1.2 MHz 超声在不同处理强度(1、2、3、5、10 W/cm²)、不同的照射时间(1、2、5 min)下引起肝癌细胞系 SMMC7721 凋亡的具体分子机制。认为低强度超声诱导凋亡的分子机制可能为:①B 淋巴细胞瘤-2 基因(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)家族、p53 参与的线粒体通路;②HO-1、Hsps 联合参与的氧化应激通路;③mitofilin 介导的线粒体内膜折叠引起的线粒体膜电位通路(mitochondrial membrane potential, MMP)。Hao 等^[4]对声动力学疗法(超声联合声敏剂)引起 C6 胶质瘤凋亡机制进行了体外研究,发现 Ca²⁺离子超载参与其中,在此过程中还伴有活性氧(reactive oxygen species,

ROS)释放、MMP 下降以及细胞色素 C 的释放,并且认为 Ca²⁺离子超载引起线粒体信号通路激活是声动力学疗法引起细胞凋亡的重要机制。Zhang 等^[5]发现低频低强度超声处理后的 C6 胶质瘤细胞中 caspase-3 表达增加,而 Bcl-2、survivin 表达下降。Feng 等^[6]发现低强度超声可以诱导胃癌细胞凋亡,且认为这种凋亡机制可能是与 caspase 相关的,内质网应激也参与其中。Wang 等^[7]研究发现,低强度超声可以增强肿瘤的自噬能力,破坏鼻咽癌细胞。

二、增强化疗药物的抗癌作用

化疗药物发挥作用往往是因为耐药细胞株的存在以及靶向药物浓度低而受到限制。目前研究认为,低频低强度超声可以降低这种影响,提高化疗药物的抗癌作用。Zhan 等^[8]研究发现,低强度超声联合阿霉素治疗大大增加了阿霉素对肺癌的细胞毒作用。Yoshida 等^[9]发现,超声作用增加了阿霉素对淋巴瘤细胞 U937 的细胞毒性及凋亡诱导能力,并表明阿霉素的细胞毒性及凋亡诱导能力增加的可能机制是:①在声孔作用下,超声使阿霉素的吸收率增加;②超声使空化效应增强,而空化效应是阿霉素起效的必要条件。另外,超声还可以联合其他抗癌药物如阿糖胞苷^[10]、顺铂^[11]、西妥昔单抗^[12]以及中药黄芩素^[13]等增加其抗癌效果,其机制一方面是超声增加了化疗药物的吸收率,提高局部药物浓度,增强诱导肿瘤凋亡能力^[11-12];另一方面可能是降低了 P-gp 和多药耐药蛋白 1^[14]的表达水平。因此,超声在增强抗癌药物化疗效果上有很好的临床应用前景。

三、基因靶向治疗

超声波产生的液体射流和冲击波使微泡和空化泡爆裂,引起细胞膜通透,从而易化外源基因进入细胞,奠定了低频低强度超声促进基因靶向治疗的理论基础。Wang 等^[15]将质粒载体荷载目的基因与声敏剂结合,在超声作用下基因转染入肿瘤细胞的能力增强,转入后基因的表达增加,抗癌效果加强。实验中还观察到在这一过程中,微血管密度降低、肿瘤细胞发生了凋亡和生长抑制。纳米材料是一种小分子材料,作为载体荷载目的基因在超声作用下转染肿瘤细胞、发挥其抗癌作用的研究越来越多,Yoon 等^[16]、Zhou 等^[17]很多学者研究发现,纳米材料荷载目的基因转入靶肿瘤可提高其抗癌效果。

低强度超声提高组织通透性

低强度超声不仅可以抑制肿瘤的生长,促进其凋亡,以达到实现抗肿瘤的目的,还可以影响肿瘤血管的生成、增加肿瘤屏障的通透性,这是单纯超声及超声联合声敏剂能够诱导抗癌药物和目的基因转入肿瘤的机制之一。在脑肿瘤中存在血-肿瘤屏障(blood-tumor barrier, BTB),其限制了很多肿瘤治疗药物渗入大脑发挥作用。而研究发现,药物穿过这一屏障进入脑肿瘤中有两条途径:一条是细胞旁途径^[18],药物通过内皮细胞

间的紧密连接(tight junction, TJ),进入脑肿瘤;另外一条是跨细胞途径^[19],药物需经过内皮细胞从细胞顶端侧吸收转运跨越细胞,然后在细胞基底侧释放。药物通过 BTB 的转运方式大多取决于其物理化学性质,亲水性药物的吸收主要是通过细胞旁途径,而脂溶性药物、大分子及颗粒物质主要通过跨细胞途径转运。

一、破坏肿瘤血管

Shen 等^[20]研究低频超声(21 KHz、26 mW/cm²、40%工作周期、3 min)联合微泡对皮下前列腺癌裸小鼠的作用。经过 2 周的处理,结果显示肿瘤处的血流信号消失,肿瘤体积减小,HE 染色肿瘤细胞坏死,细胞核消失,实验组肿瘤细胞胞质中空泡增多,核周池空泡膨胀。血管内皮细胞连接紧密,血管腔可见,而实验组的血管阻塞。所以,低频超声联合微泡既导致荷瘤大鼠皮下肿瘤血管阻塞,又可抑制肿瘤生长。此外,Shen 还在另外两篇论文中研究了低频超声联合微泡对血管生长相关蛋白的影响,分别用不同频率低频超声联合微泡辐照兔肝癌细胞 VX₂(20 KHz、2 W/cm²、40%工作周期、5 min)^[21]和荷瘤裸鼠(21 KHz、26 mW/cm²、40%工作周期、3 min)^[22]。研究证实了低频超声联合微泡能导致血管阻塞,还能降低血管生长相关蛋白血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和环氧化酶-2 的表达水平,这可能就是超声抑制血管的原因。Wang 等^[23]用低频低强度超声联合微泡对前列腺癌 Du145 裸鼠进行处理,发现肿瘤生长受到抑制,在电子显微镜下观察到血管内皮破坏,微血管的密度及血管内皮生长因子降低,均表明超声能通过抑制肿瘤血管治疗肿瘤。

二、增加 BTB 通透性

Zhang^[24]等研究发现,低频超声能增加中枢神经系统肿瘤 C6 胶质瘤的血 BTB 通透性,在 mRNA 及蛋白质水平上均观察到了 BTB 中紧密连接相关蛋白的变化,认为其机制是改变了这一结构。Fan 等^[18]研究也发现紧密连接相关蛋白降低,认为低频超声是通过细胞旁途径改变 BTB 的通透性来治疗肿瘤。Xia 等^[19]还发现超声能通过跨细胞途径增强 BTB 通透性,认为酪氨酸激酶、质膜微囊结构蛋白 caveolin-1 和 caveolin-2 的磷酸化以及 caveolin-1 和 caveolin-2 上调参与了低频超声诱导的小泡介导细胞内吞作用。此外,还可以将低强度超声与扩血管药物如辛伐他汀^[25]联合改变 BTB 的通透性。

超声治疗对肿瘤侵袭转移的影响

一、HIFU 对肿瘤侵袭转移的影响

HIFU 由于其显著的热效应能使组织发生坏死,并作为一种外科方法用于治疗肿瘤。HIFU 中高振幅可以产生空化效应和热效应,而空化效应同时可能增加转移风险,这引起了越来越多的关注。研究发现,HIFU 处理后肿瘤可发生扩散^[26]。Hancock 等^[27]研究了 HIFU 对小鼠乳腺癌转移的影响,发现与未处理组比较,处理组中有较多小鼠有肺转移灶,且处理组中肺转移灶所占比例也更大,但这些差异都无统计学意义。此外,Xing 等^[28]HIFU 对黑色素瘤进行了处理,发现 HIFU 不会增加肿瘤转移风险,且可以发挥抗肿瘤免疫反应,且 HIFU 后 2 d 切除肿瘤产生的抗肿瘤免疫作用最强。而 Miller 等^[29]对诊断超声和高振幅超声引起肿瘤转移的潜能进行了比较分析,发现与诊断超声相比,高振幅超声无论是否联合声敏剂都增加了肿

瘤转移风险。Wu 等^[30]采用 HIFU 对肿瘤患者进行治疗,观察治疗前后体内循环肿瘤细胞的数量,结果表明 HIFU 不会增加肿瘤病人转移的风险。总体来说,目前 HIFU 能否增加肿瘤转移的风险仍然存在争论。

二、低强度超声对肿瘤侵袭转移的影响

超声可以通过提高组织的通透性,诱导更多的药物和基因转入肿瘤中。超声在改变组织通透性诱导治疗物质渗透的同时,是否能促进肿瘤细胞分散、引起转移的增加值得进一步探讨。有关低强度超声对肿瘤侵袭转移的研究较少。Wei 等^[31]用低强度超声联合微泡对前列腺癌细胞 PC-3 侵袭转移性进行了研究,认为超声联合微泡抑制了 PC-3 细胞的侵袭转移,并解释为这可能是通过降低金属基质蛋白酶-2、金属基质蛋白酶-9 水平,进而发挥作用。吴欢^[32]等也发现超声联合血咪啉单甲醚可降低乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 的增殖能力和侵袭能力。

综上所述,低强度超声通过抑制肿瘤增殖、促进其凋亡,破坏肿瘤血管、提高组织通透性,以达到抑制肿瘤生长增殖,实现抗肿瘤的目的。而低强度超声对肿瘤侵袭转移的影响至今仍不清楚,需要我们进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Lejbkiewicz F, Zwiran M, Salzberg S. The response of normal and malignant cells to ultrasound in vitro[J]. *Ultrasound Med Biol*, 1993, 19(1):75-82.
- [2] Biriukov I, Sheremet'Eva GF, Moiseev VS, et al. Effects of low-frequency ultrasound on tumors cells in experimental animals[J]. *Grudn Khir*, 1989, 1(3):64-69.
- [3] Feng Y, Tian Z, Wan M. Bioeffects of low-intensity ultrasound in vitro: apoptosis, protein profile alteration, and potential molecular mechanism[J]. *J Ultrasound Med*, 2010, 29(6):963-974.
- [4] Hao D, Song Y, Che Z, et al. Calcium overload and in vitro apoptosis of the C6 glioma cells mediated by sonodynamic therapy (hematoporphyrin monomethyl ether and ultrasound)[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2014, 70(2):1445-1452. DOI:10.1007/s12013-014-0081-7.
- [5] Zhang Z, Chen J, Chen L, et al. Low frequency and intensity ultrasound induces apoptosis of brain glioma in rats mediated by caspase-3, Bcl-2, and survivin[J]. *Brain Res*, 2012, 1473(9):25-34. DOI:10.1016/j.brainres.2012.06.047.
- [6] Feng Y, Tian Z, Wan M, et al. Low intensity ultrasound-induced apoptosis in human gastric carcinoma cells[J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(31):4873-4879.
- [7] 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.
- [8] Zhan X, Wang Y, Lai B. Killing effect of low intensity ultrasound on human lung cancer cells in vitro[J]. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*, 2000, 3(6):455-457. DOI:10.3779/j.issn.1009-3419.2000.06.16.
- [9] Yoshida T, Kondo T, Ogawa R, et al. Combination of doxorubicin and low-intensity ultrasound causes a synergistic enhancement in cell killing and an additive enhancement in apoptosis induction in human lymphoma U937 cells[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2008, 61(4):559-567.
- [10] Tachibana K, Uchida T, Tamura K, et al. Enhanced cytotoxic effect of Ara-C by low intensity ultrasound to HL-60 cells[J]. *Cancer Lett*,

- 2000,149(1-2):189-194.
- [11] Watanabe Y, Aoi A, Horie S, et al. Low-intensity ultrasound and microbubbles enhance the antitumor effect of cisplatin[J]. *Cancer Sci*, 2008,99(12):2525-2531.DOI:10.1111/j.1349-7006.2008.00989.x.
- [12] Masui T, Ota I, Kanno M, et al. Low-intensity ultrasound enhances the anticancer activity of cetuximab in human head and neck cancer cells[J]. *Exp Ther Med*, 2013,5(1):11-16.
- [13] Li H, Fan H, Wang Z, et al. Potentiation of scutellarin on human tongue carcinoma xenograft by low-intensity ultrasound[J]. *PLoS One*, 2013,8(3):e59473.DOI: 10.1371/journal.pone.0059473.
- [14] Zhang Z, Xu K, Bi Y, et al. Low intensity ultrasound promotes the sensitivity of rat brain glioma to Doxorubicin by down-regulating the expressions of p-glucoprotein and multidrug resistance protein 1 in vitro and in vivo[J]. *PLoS One*, 2013,8(8):70685.DOI:10.1371/journal.pone.0070685.
- [15] Wang XL, Zhao XY, Li S, et al. A novel plasmid and SonoVue formulation plus ultrasound sonication for effective gene delivery in nude mice[J]. *Life Sci*, 2013,93(16):536-542.DOI:10.1016/j.lfs.2013.08.015.
- [16] Yoon YI, Kwon YS, Cho HS, et al. Ultrasound-mediated gene and drug delivery using a microbubble-liposome particle system[J]. *Theranostics*, 2014,4(11):1133-1144.
- [17] Zhou QL, Chen ZY, Wang YX, et al. Ultrasound-mediated local drug and gene delivery using nanocarriers[J]. *Biomed Res Int*, 2014,8(17):963891.
- [18] Fan L, Liu Y, Ying H, et al. Increasing of blood-tumor barrier permeability through paracellular pathway by low-frequency ultrasound irradiation in vitro[J]. *J Mol Neurosci*, 2011,43(3):541-548.DOI:10.1007/s12031-010-9479-x.
- [19] Xia CY, Liu YH, Wang P, et al. Low-frequency ultrasound irradiation increases blood-tumor barrier permeability by transcellular pathway in a rat glioma model[J]. *J Mol Neurosci*, 2012,48(1):281-290.DOI:10.1007/s12031-012-9770-0.
- [20] Shen ZY, Shen E, Diao XH, et al. Inhibitory effects of subcutaneous tumors in nude mice mediated by low-frequency ultrasound and microbubbles[J]. *Oncol Lett*, 2014,7(5):1385-1390.
- [21] Shen ZY, Xia GL, Wu MF, et al. The effects of low-frequency ultrasound and microbubbles on rabbit hepatic tumors[J]. *Exp Biol Med* (Maywood), 2014,239(6):747-757.
- [22] Shen ZY, Shen E, Zhang JZ, et al. Effects of low-frequency ultrasound and microbubbles on angiogenesis-associated proteins in subcutaneous tumors of nude mice[J]. *Oncol Rep*, 2013,30(2):842-850.DOI: 10.3892/or.2013.2492.
- [23] Wang Y, Hu B, Diao X, et al. Antitumor effect of microbubbles enhanced by low frequency ultrasound cavitation on prostate carcinoma xenografts in nude mice[J]. *Exp Ther Med*, 2012,3(2):187-191.
- [24] Zhang Z, Xue Y, Liu Y, et al. Additive effect of low-frequency ultrasound and endothelial monocyte-activating polypeptide II on blood-tumor barrier in rats with brain glioma[J]. *Neurosci Lett*, 2010,481(1):21-25.DOI: 10.1016/j.neulet.2010.06.042.
- [25] Xu WP, Shen E, Bai WK, et al. Enhanced antitumor effects of low-frequency ultrasound and microbubbles in combination with simvastatin by downregulating caveolin-1 in prostatic DU145 cells[J]. *Oncol Lett*, 2014,7(6):2142-2148.
- [26] Fry FJ, Johnson LK. Tumor irradiation with intense ultrasound[J]. *Ultrasound Med Biol*, 1978,4(4):337-341.
- [27] Hancock H, Dreher MR, Crawford N, et al. Evaluation of pulsed high intensity focused ultrasound exposures on metastasis in a murine model[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2009,26(7):729-738.DOI:10.1007/s10585-009-9272-9.
- [28] Xing Y, Lu X, Pua E C, et al. The effect of high intensity focused ultrasound treatment on metastases in a murine melanoma model[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008,375(4):645-650.DOI:10.1016/j.bbrc.2008.08.072.
- [29] Miller DL, Dou C. The potential for enhancement of mouse melanoma metastasis by diagnostic and high-amplitude ultrasound[J]. *Ultrasound Med Biol*, 2006,32(7):1097-1101.
- [30] Wu F, Wang ZB, Jin CB, et al. Circulating tumor cells in patients with solid malignancy treated by high-intensity focused ultrasound[J]. *Ultrasound Med Biol*, 2004,30(4):511-517.
- [31] Wei C, Bai WK, Wang Y, et al. Combined treatment of PC-3 cells with ultrasound and microbubbles suppresses invasion and migration[J]. *Oncol Lett*, 2014,8(3):1372-1376.
- [32] 吴欢, 许晓琳, 智慧, 等. 声动力学治疗对 MDA-MB-231 细胞增殖及侵袭能力的影响[J]. *中国医学影像技术*, 2014,30(2):180-184.

(修回日期:2017-09-12)

(本文编辑:凌 琛)