

低强度超声辐照对人宫颈癌 HeLa 细胞凋亡及 Caspase-12 蛋白表达的影响*

秦娟¹, 宋国林², 王建三¹, 林虹¹, 刘卿¹, 陈锦云³, 王嫣^{3**}

(1. 贵阳市妇幼保健院 妇科, 贵州 贵阳 550003; 2. 贵州省中医药大学第二附属医院 重症医学科, 贵州 贵阳 550003; 3. 重庆医科大学 生物医学工程学院 省部共建国家重点实验室培育基地 - 重庆市超声医学工程重点实验室 重庆市生物医学工程学重点实验室, 重庆 400016)

[摘要] 目的: 探讨低强度超声辐照对人宫颈癌 HeLa 细胞凋亡及半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶-12 (Caspase-12) 蛋白表达的影响。方法: 采用低强度超声辐照人子宫颈癌 HeLa 细胞株, 于辐照后 6 及 24 h 时, Annexin V/PI 双染法检测 HeLa 细胞的凋亡率, 透射电子显微镜观察细胞的结构变化, Western blot 法测定细胞匀浆中 Caspase-12 蛋白表达水平, 免疫组织化学法检测 Caspase-12 蛋白在 HeLa 细胞中的阳性表达率。结果: 低强度超声辐照后 6 h 时 HeLa 细胞的凋亡率、细胞 Caspase-12 蛋白表达水平及 Caspase-12 蛋白在 HeLa 细胞中的阳性表达率显著高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 辐照后 24 h 时变化更显著, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 透射电子显微镜下可见, 辐照后 6 h 时 HeLa 细胞内开始出现凋亡小体, 24 h 时胞浆浓缩、内质网变疏松并与胞膜融合、形成空泡; 辐照后 6 h 及 24 h 时, Caspase-12 蛋白在 HeLa 细胞胞浆中表达、呈棕黄色颗粒, 但在对照组细胞中无表达。结论: 低强度超声辐照可以诱导人宫颈癌 HeLa 细胞凋亡, 并随着辐照后时间延长而增加, 其机制可能与相关凋亡蛋白 Caspase-12 表达水平上调有关。

[关键词] 超声多普勒, 低强度; 宫颈癌; HeLa 细胞; 细胞凋亡; 凋亡蛋白; 半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶-12; 免疫组织化学法

[中图分类号] R363.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)10-1161-06

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.10.009

Effect of Ultrasonic Irradiation with Low Intensity on Protein Expressions of Caspase 12 and Apoptosis of HeLa Cells

QIN Juan¹, SONG Guolin², WANG Jiansan¹, LIN Hong¹, LIU Qin¹, CHEN Jinyun³, WANG Yan³

(1. Department of Gynaecology, Guiyang Maternal and Child Health Hospital, Guiyang 550003, Guizhou, China; 2. Department of ICU, 2nd Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550003, Guizhou, China; 3. State Key Laboratory of Ultrasound Engineering in Medicine Co-Founded by Chongqing and the Ministry of Science and Technology, College of Biomedical Engineering, Chongqing Key Laboratory of Biomedical Engineering, Chongqing Collaborative Innovation Center for Minimally-invasive and Noninvasive Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of ultrasonic irradiation with low intensity on the protein expressions of Caspase 12 and apoptosis of HeLa cells. **Methods:** Human cervical cancer HeLa cells were cultured with ultrasonic irradiation of low intensity. Flow cytometry was used to detect the apoptosis rate in 6 and 24 hours after ultrasound irradiation. The structural changes of cells under ultrasound irradiation were observed by scanning electron microscope. The protein expression level of Caspase 12 in the cervical cancer cells was determined. **Results:** The apoptosis rate of HeLa cells 6

*[基金项目] 国家自然科学基金(81560287); 贵州省科技厅基金[黔科合 J 字(2013)2020]

** 通信作者 E-mail: wangyancq@cqmu.edu.cn

网络出版时间: 2019-10-22 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20191022.2308.009.html>

hours after ultrasound irradiation was significantly higher than that of the control group ($P < 0.05$). The apoptosis rate increased in 24 hours after surgery, significantly higher than that of the control group ($P < 0.01$). Apoptosis body in HeLa cells was induced in 6 hours after ultrasound irradiation. The expression of related apoptosis protein Caspase 12 was activated after ultrasound irradiation, compared with the control group ($P < 0.05$). The expression of Caspase 12 in 24 hours after irradiation increased significantly compared with the control group ($P < 0.01$). **Conclusion:** Low intensity ultrasound can induce apoptosis of HeLa cells and the apoptosis rate increases with the time of irradiation. Caspase 12 can be activated under ultrasound irradiation, and the expression of Caspase 12 increases with time of irradiation.

[**Key words**] ultrasound, low intensity; cervical cancer; HeLa cells; apoptosis; apoptosis protein; Caspase 12; immunohistochemistry

宫颈癌是妇科最常见的恶性肿瘤,传统治疗方法以手术、化疗及放疗为主,但患者生存率仍不理想,且这些传统治疗方法对尚未生育的育龄妇女影响较大;因此,寻求无创治疗宫颈癌是目前全球的研究热点^[1-2]。目前,超声治疗被认为是目前肿瘤治疗的一种无创新方法^[3],已应用于慢性宫颈炎、宫颈上皮内瘤样病变,甚至宫颈癌^[4]。有研究发现,相比较于正常细胞,低强度超声更容易诱导肿瘤细胞凋亡,特别是恶性肿瘤细胞的凋亡更加明显^[5-7]。HeLa 肿瘤细胞株是宫颈癌细胞中具有代表性的人宫颈癌细胞,本研究采用低强度超声辐照对 HeLa 细胞进行照射、然后继续培养,于辐照后 6 h 及 24 h 时,采用 Annexin V/PI 双染法检测 HeLa 细胞的凋亡率,透射电子显微镜观察细胞的结构变化,Western blot 测定细胞匀浆中半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶-12 (Caspase-12) 蛋白表达水平,免疫组织化学法检测 Caspase-12 蛋白在 HeLa 细胞中的阳性表达率,探讨低强度超声对人宫颈癌 HeLa 细胞凋亡的影响及作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞株 人宫颈癌 HeLa 细胞株购自上海中乔新舟生物科技有限公司,细胞培养于含有 10% 胎牛血清及 1% 双抗的高糖 DMEM 培养液中,于 37 °C 5% CO₂ 培养箱中培养,每 2~3 d 传代 1 次,细胞密度约为 5×10^5 时进行后续实验。

1.1.2 主要仪器 超声辐照仪(重庆海扶公司生产,超声功率输出 0.5~5 W/cm²,可连续输出,频率 9~10 MHz,内置功率调节),细胞培养瓶及细

胞培养板购自美国 Costar 公司,倒置显微镜购自日本 OLYMPUS 公司,CO₂ 培养箱购自日本 Sanyo 公司,电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.1.3 主要试剂 高糖 DMEM 及胎牛血清均购自 Gibco 公司,CCK-8 检测试剂购自碧云天生物技术有限公司,双荧光素酶检测试剂盒购自 Promega 公司,Anti Caspase-12 和生物素标记的二抗、内参一抗、羊抗兔 IgG 等均购自美国 Abcam 公司,ECL 增强化学发光检测试剂盒购自美国 PIERCE 公司,2.5% 戊二醛溶液、1% 四氯化锇、丙酮等均购自北京化工厂。

1.2 方法

1.2.1 超声辐照 将对数生长期的细胞悬液调整浓度为 1×10^9 /L,每管 2 mL。辐照处理组:超声探头固定于细胞辐照仪器底部,将细胞悬液放置于细胞辐照装置内、频率 10 MHz、0.25 W/cm²,辐照 10 s。研究设立对照组(细胞进行假照,辐照时间、辐照方式同辐照处理组)。

1.2.2 细胞凋亡 采用 Annexin V/PI 双染法检测,将处于对数生长期的细胞,用筛选参数超声辐照后再置培养箱培养,于辐照后 6 及 12 h 收取细胞悬浮液,1 000 r/min 离心 5 min,丢弃上清液,加入 $1 \times$ Binding buffer 500 μ L、Annexin V-FITC 5 μ L 及 PI 10 μ L,轻轻混匀,室温、避光反应 15 min,1 h 内进行流式细胞仪检测。

1.2.3 细胞微结构观察 调整细胞浓度为 1×10^8 /L,3 000 r/min 离心 3 min,丢弃上清液,2% 戊二醛固定后进行脱水。丢弃去残余脱水剂,室温下依次加入丙酮-EPON812 包埋剂、纯包埋剂进行完全包埋,切片、干燥后用醋酸双氧铀染色液室温下染色 10 min,铅染色液室温下染色 12 min,冲洗并用滤纸吸干,透射电子显微镜观察细胞结构。

1.2.4 细胞匀浆中 Caspase-12 蛋白水平 采用 Western blot 法检测,细胞裂解液提取细胞总蛋白质,BCA 法测定蛋白质浓度,进行 SDS-PAGE 分离蛋白质,将蛋白质转移到 PVDF 膜,5% 的脱脂牛奶封闭 2 h,在 4℃ 冰箱中使用一抗(稀释比例 100:1)孵育过夜,常温下使用辣根过氧化物酶标记的二抗孵 2 h,加入 ECL 曝光后进行半定量分析。

1.2.5 Caspase-12 蛋白阳性表达率 采用免疫组织化学法检测,制作细胞爬片、免疫组织化学染色前使用 0.5% Triton X-100、3% H₂O₂ 处理细胞,PBS 漂洗,一抗孵育(稀释比 1:100)4℃ 过夜(阴性对照用 PBS 液代替一抗),加入二抗工作液 37℃ 孵育 30 min(Envision 两步法),DAB 显色 10 min(避光,镜下观察至棕色)。

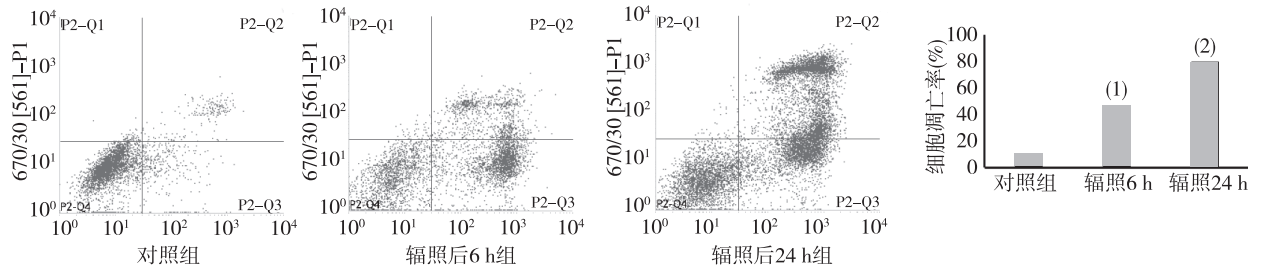
1.3 统计学分析

数据使用 SPSS 19 软件分析,计量资料用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两两比较采用 *t* 检验;计数资料用率(%)表示,数据比较采用 χ^2 检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞凋亡

Annexin V/PI 双染法结果显示:与对照组 HeLa 细胞凋亡率比较,辐照后 6 h 时 HeLa 细胞凋亡率(46%)明显增加,差异有统计学意义(*P* < 0.05);辐照后 24 h 时 HeLa 细胞凋亡率(80%)增加更明显,差异有统计学意义(*P* < 0.01)。图 1。



注:与对照组比较,⁽¹⁾*P* < 0.05, ⁽²⁾*P* < 0.01。

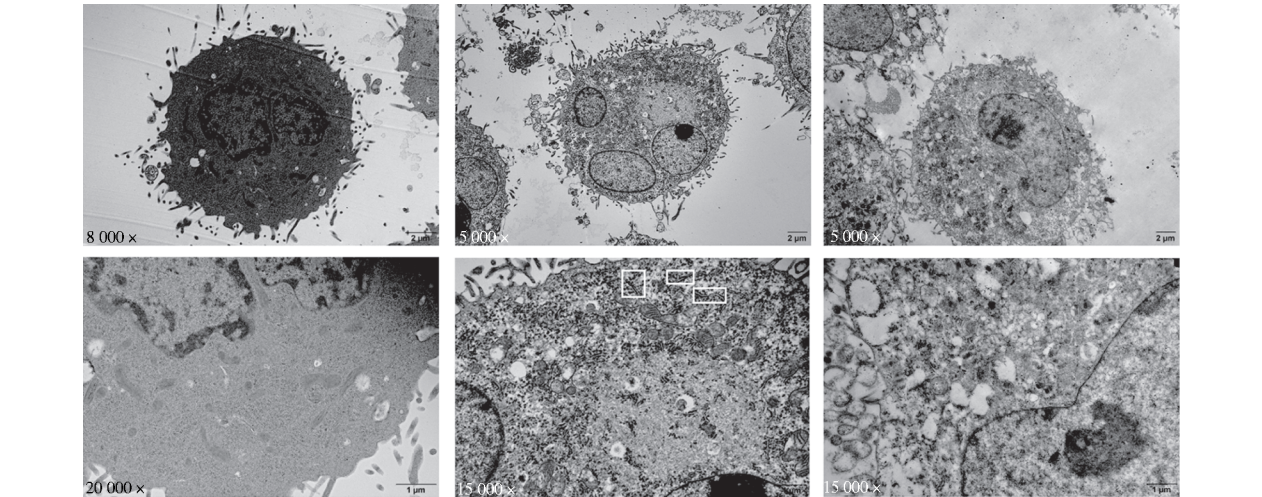
图 1 低强度超声辐照后 6 及 24 h 时 HeLa 细胞凋亡率(流式细胞术)

Fig. 1 Cell apoptosis rates in different time after LIFU treatment

2.2 细胞超微形态

电镜观察结果显示,与对照组(图 2A)比较,辐照后 6 h 时 HeLa 细胞染色质固缩并凝集成块、

出现凋亡小体(图 2B,白色小框),辐照后 24 h 时的 HeLa 细胞浆浓缩、内质网变疏松并与胞膜融合,形成空泡(图 2C)。



对照组 辐照 6 h 辐照 24 h

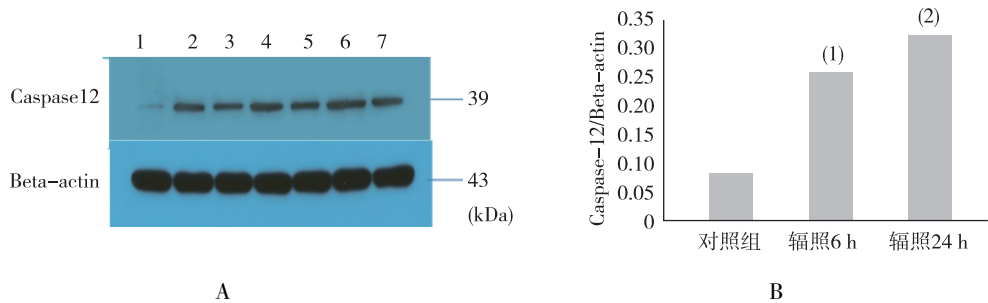
图 2 低强度超声辐照后 6 及 24 h 时 HeLa 细胞超微形态(透射电镜)

Fig. 2 Ultramorphology of cells in different time after LIFU treatment

2.3 细胞匀浆中 Caspase-12 蛋白表达

Western blot 结果显示,与对照组比较,辐照后 6 h 时 HeLa 细胞匀浆中 Caspase-12 蛋白表达水平

明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$);辐照后 24 h 时增加更明显,差异有统计学意义($P < 0.01$)。图 3。



注:A 中 1 为对照组,2~4 为辐照后 6 h,5~7 为辐照后 24 h;与对照组比较,⁽¹⁾ $P < 0.05$,⁽²⁾ $P < 0.01$ 。

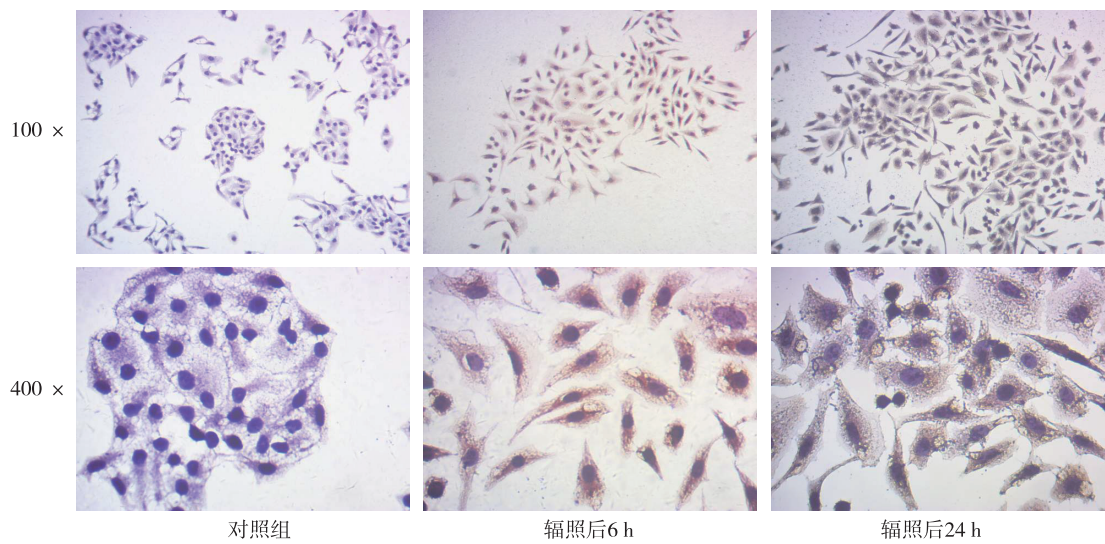
图 3 低强度超声辐照后 6 及 24 h 时 HeLa 细胞匀浆中 Caspase-12 蛋白表达(Western blot)

Fig. 3 Expression of caspase-12 protein in cells treated with LIFU

2.4 HeLa 细胞中 Caspase-12 蛋白阳性表达率

结果显示,Caspase-12 在对照组细胞中无表达;在人宫颈癌 HeLa 细胞中的表达主要定位于胞浆,辐照后 6 及 24 h 时 HeLa 细胞中 Caspase-12 呈

阳性表达,可见胞浆内充满棕黄色颗粒;与对照组比较,辐照后 6 时 HeLa 细胞中 Caspase-12 呈阳性表达率显著升高($P < 0.05$);辐照后 24 h 更明显,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见图 4。



注:与对照组比较,⁽¹⁾ $P < 0.05$,⁽²⁾ $P < 0.01$ 。

图 4 低强度超声辐照后 6 及 24 h 时 HeLa 细胞中 Caspase-12 蛋白阳性表达率(免疫组织化学)

Fig. 4 Expression of Caspase-12 protein in cells treated with LIFU

3 讨论

超声波是一种非电离能量,由于超声对生物组织细胞特有的理化作用,其研究前景广阔。研究表明,超声可通过多种起始途径及信号传导系统诱导多种组织细胞凋亡。超声治疗已成为当今抗肿瘤的研究热点。肿瘤细胞、病变组织、细胞较正常细胞对超声更为敏感^[8-11]。而近年来的研究发现诱导细胞凋亡是超声治疗肿瘤的重要生物学机制之一,其应用之一是采用低剂量超声^[12]。有研究报告低能量超声可以诱导肿瘤细胞凋亡^[13-15]。且研究表明低能量超声对不同肿瘤细胞的凋亡诱导时间与剂量有差别^[16]。

诱导细胞凋亡是肿瘤治疗的机制之一。细胞发生凋亡时,细胞膜出现膜外翻现象,细胞皱缩,核固缩及染色质凝集,核碎裂、凋亡小体形成等。现大多采用流式细胞术及投射电镜检测细胞凋亡^[13,16]。已有研究发现,不同频率、强度超声导致细胞对其有应答反应,可能与细胞信号的调控及传导有关。而低强度超声在诱导细胞凋亡、细胞通透性增加、细胞结果改变方面研究也逐渐引起重视。已证实低频低强度超声会因对细胞的空化效应,导致细胞骨架、细胞膜表面形态、甚至染色体改变,从而选择性杀伤肿瘤细胞^[17]。本研究结果显示,低强度超声可诱导宫颈癌细胞发生凋亡,在超声辐照 6 h,流式细胞术检测到凋亡率为 46%,投射电镜可见凋亡小体。并且随着时间延长,凋亡发生率达到 80% (24 h)。临床研究表明 CIN I 级患者经聚焦超声治疗后 3 个月,宫颈局部组织中 P16 和 Ki-67 的表达都降低,推测可能与凋亡有关^[18]。本研究结果提示低强度聚焦超声介导细胞凋亡,并且随着时间延长,导致细胞死亡。

Caspase 家族是细胞发生凋亡的常见通路,而既往研究明确的是 Caspase-12 参与执行细胞凋亡步骤中是起主要作用的分子^[19]。超声刺激能使人宫颈癌细胞株存活率下降,既往对其机制的研究主要集中在依赖于 Caspase 的凋亡^[20]。本研究中超声处理后用免疫组织化学和 Western blot 法检测凋亡相关蛋白 Caspase-12 表达,结果发现,Caspase-12 表达随时间延长呈增加趋势,提示 Caspase-12 介导的凋亡信号可能参与了低强度超声辐照过程。这些结果暗示 Caspase-12 被低强度超声辐照激活。然而,低强度超声辐照激活 Caspase-12 的具体机制

尚不清楚。

超声对细胞的超声——生物学效应包括热效应和非热效应。非热效应包括声机械效应效应,超声空化、声化学效应^[21-22]。既往研究已证实改变低强度超声的各种物理参数(频率、时间及强度)会影响受辐射细胞的结果,不同的超声辐照参数下对于不同的肿瘤细胞,发生的效应不同^[23-24]。有学者认为低能量超声诱导肿瘤细胞凋亡发生的机制可能与空化效应和机械效应有关^[3,11]。本研究采用低强度超声对细胞产生非热生物学效应诱导细胞凋亡,与既往研究一致。但低强度超声波作用的相关分子信号和关键蛋白质,诱导细胞凋亡的生理生化机制的仍然是难以捉摸的。考虑超声作为外界刺激,可能与低强度超声辐照激活宫颈癌细胞产生应激反应有关,继而启动细胞凋亡机制。目前还不清楚超声诱导细胞凋亡的具体途径。有研究报道,低强度超声诱导的细胞凋亡通路被认为是与线粒体途径有关^[25]。因此,课题组下一步工作将考虑研究低强度超声诱导宫颈癌细胞凋亡的相关途径。

综上,本研究发现低强度超声辐照可以诱导人宫颈癌 HeLa 细胞细胞凋亡,并通过激活 Caspase-12 表达增加,促进宫颈癌细胞凋亡。但对于超声诱导的宫颈癌细胞凋亡的深入分子机制,还需要进一步的分析,阐明低强度超声反应影响的分子信号通路。

4 参考文献

- [1] SCHOLZ C, WEISSENBACHER T, FRIESE K, et al. Cervical cancer-minimally invasive treatment [J]. MMW Fortschr Med, 2010,152(43):36-37.
- [2] KROKIDIS M E, KITROU P, SPILIOPOULOS S, et al. Image-guided minimally invasive treatment for small renal cell carcinoma [J]. Insights Imaging, 2018,9(3):385-390.
- [3] FERIL L B, KONDO T, CUI Z G, 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.
- [4] 付贞花,汪炼,凌玲,等. 宫颈上皮内瘤样病变 I 级经聚焦超声治疗前后局部 P16、Ki-67 基因及 Fas 表达的变化 [J]. 中国介入影像与治疗学, 2016,(4):230-233.
- [5] NING Z, ZHU Z, WANG H, et al. High-intensity focused ultrasound enhances the effect of bufalin by inducing ap-

- optosis in pancreatic cancer cells[J]. *Onco Targets Ther*, 2019,12(12):1161-1170.
- [6] GUO X, GUO S, PAN L, et al. Anti-microRNA-21/221 and microRNA-199a transfected by ultrasound microbubbles induces the apoptosis of human hepatoma HepG2 cells[J]. *Oncol Lett*, 2017,13(5):3669-3675.
- [7] SALIEV T, FERIL L B, OGAWA K, et al. Induction of apoptosis in U937 cells by using a combination of bortezomib and low-intensity ultrasound[J]. *Med Sci Monit*, 2016,22(22):5049-5057.
- [8] POFF J A, ALLEN C T, TRAUGHER B, et al. Pulsed high-intensity focused ultrasound enhances apoptosis and growth inhibition of squamous cell carcinoma xenografts with proteasome inhibitor bortezomib [J]. *Radiology*, 2008,248(2):485-491.
- [9] 王萍, 夏新蜀, 王志刚. 低强度超声联合光敏剂对癌细胞的杀伤作用[J]. *激光杂志*, 2009,30(4):75-76.
- [10] LI H X, ZHENG J H, JI L, et al. Effects of low-intensity ultrasound combined with low-dose carboplatin in an orthotopic hamster model of tongue cancer: A preclinical study[J]. *Oncol Rep*, 2018,2(13):1-9.
- [11] YU T, BAI J, HU K, et al. The effect of free radical scavenger and antioxidant on the increase in intracellular adriamycin accumulation induced by ultrasound[J]. *Ultrason Sonochem*, 2003,10(1):33-35.
- [12] 杨志宏, 王智彪, 胡凯, 等. 聚焦超声对卵巢癌细胞株 COC1 细胞凋亡和 Bcl-2/bax 基因表达的影响[J]. *中国医学物理学杂志*, 2004,21(4):207-210.
- [13] 吴晓辉, 陶裕川, 汪峰, 等. 低强度超声联合微泡的声空化效应介导大鼠 C₆ 胶质瘤细胞凋亡的研究[J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2014,43(1):6-11.
- [14] 张震, 戚勋, 徐克, 等. 低强度超声逆转胶质瘤 ABCG2 表达的实验研究[J]. *中国医科大学学报*, 2013,42(6):488-492.
- [15] 邱日想, 王燕莉, 陈洋娣, 等. 低强度超声联合托泊替康诱导人肝癌细胞凋亡的研究[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2012,17(12):1384-1388.
- [16] 崔海东, 吕岩红, 曹斌, 等. 低强度超声联合原卟啉 IX 诱导人舌鳞癌 SAS 细胞凋亡作用的研究[J]. *口腔医学研究*, 2011,27(7):580-582.
- [17] 林艳端, 申铿, 白文坤, 等. 低频低功率超声联合微泡对 DU145 细胞及 PC3 细胞早期凋亡的影响[J]. *临床超声医学杂志*, 2014,16(1):1-4.
- [18] 曾宇鹏, 谢席胜. 高尿酸对肾小管上皮细胞 HK-2 增殖、凋亡的影响及其机制研究[J]. *实用医学杂志*, 2018,34(24):4042-4045.
- [19] 何金玲, 燕子, 曾先燕, 等. 机械创伤升高大鼠心肌细胞凋亡蛋白表达[J]. *基础医学与临床*, 2019,39(1):16-21.
- [20] 牛陵川, 邹文兵, 张炼, 等. 乳腺癌高强度聚焦超声消融后残留肿瘤增殖能力的变化[J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2010,30(2):200-203;207.
- [21] WILLIAM D, O'BRIEN J R. Ultrasound-biophysics mechanisms[J]. *Prog Biophys Mol Bio*, 2007,93(1-3):212-255.
- [22] FENG Y, TIAN Z, WAN M. Bio-effects of low intensity ultrasound in vitro: apoptosis, protein profile alteration and potential molecular mechanism [J]. *J Ultrasound Med*, 2010,29(6):963-974.
- [23] YU T, BAI J, HUK, et al. The effect of free radical scavenger and antioxidant on the increase in intracellular adriamycin accumulation induced by ultrasound [J]. *Ultrason Sonochem*, 2003,10(1):33-35.
- [24] YU T, HU K, BAI J, et al. Reversal of adriamycin resistance in ovarian carcinoma cell line by combination of verapamil and low-level ultrasound [J]. *Ultrason Sonochem*, 2003,10(1):37-40.
- [25] 崔海东, 吕岩红, 曹斌, 等. 低强度超声联合原卟啉 IX 诱导人舌鳞癌 SAS 细胞凋亡作用的研究[J]. *口腔医学研究*, 2011,27(7):580-582.

(2019-06-28 收稿, 2019-09-28 修回)

中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 丁廷森