

超声诱发成核提高 HepG2 细胞冷冻消融致死率研究

李维杰¹, 王宇婷¹, 刘宝林^{1,2}, 王建信³, 张海旭¹

(1. 上海理工大学 健康科学与工程学院, 上海 200093; 2. 上海市肿瘤能量治疗技术与器械协同创新中心, 上海 200093;
3. 上海原能细胞生物低温设备有限公司, 上海 201203)

摘要: 冷冻消融技术对于治疗实体肿瘤具有一定的效果, 但普遍存在降温效果有限、靶向杀伤效率不高等问题。为提高冷冻消融的疗效, 提出了将超声诱发成核用于冷冻消融的一种新的辅助手段, 研究了2种降温速率下不同诱发成核温度对细胞存活率的影响, 观察并记录了超声诱发成核后的胞外冰晶形态、胞内冰晶生成情况及复温后的细胞损伤情况。结果表明: 使用超声诱发成核辅助冷冻消融可以提高肿瘤细胞的致死率。慢速冷冻辅助成核组的效果最佳, 消融更为彻底, HepG2 细胞的存活率低至 $15.60\% \pm 2.60\%$ 。快速冷冻辅助成核时, 需要配合较低的诱发成核温度才能更好地杀伤细胞。设计开发具有超声诱发成核功能的冷冻消融器械具有实际意义。

关键词: 超声诱发成核; 冷冻消融; 细胞活力; 冰晶

中图分类号: R 318.52 **文献标志码:** A

Improving the lethality of cryoablation in HepG2 cells by using ultrasound-induced nucleation

LI Weijie¹, WANG Yuting¹, LIU Baolin^{1,2}, WANG Jianxin³, ZHANG Haixu¹

(1. School of Health Science and Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China;
2. Shanghai Co-innovation Center for Energy Therapy of Tumors, Shanghai 200093, China; 3. Shanghai Origincell Biological Cryo-Equipment Co., Ltd., Shanghai 201203, China)

Abstract: Cryoablation techniques are effective for the treatment of solid tumors, but generally suffer from the limited cooling effect and low target killing efficiency. To improve the efficacy, the use of ultrasound-induced nucleation was proposed as a new adjunct. The effects of different induced

收稿日期: 2023-02-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (51776130)

第一作者: 李维杰 (1983-), 男, 副教授. 研究方向: 低温生物医学、肿瘤能量治疗. E-mail: 13651731551@139.com

通信作者: 刘宝林 (1968-), 男, 教授. 研究方向: 生物样品低温保存、仪器研发等. E-mail: bliuk@163.com

引文格式: 李维杰, 王宇婷, 刘宝林, 等. 超声诱发成核提高 HepG2 细胞冷冻消融致死率研究[J]. 上海理工大学学报, 2024, 46(4): 400-406. DOI: 10.13255/j.cnki.jusst.20230222002

Citation: LI Weijie, WANG Yuting, LIU Baolin, et al. Improving the lethality of cryoablation in HepG2 cells by using ultrasound-induced nucleation[J]. Journal of University of Shanghai for Science and Technology, 2024, 46(4): 400-406.

nucleation temperatures on the cell viability at two cooling rates were investigated, and the morphology of extracellular ice crystals, intracellular ice crystal generation and cell damage after rewarming were observed and recorded. The results show that the use of ultrasound-induced nucleation as an adjunct to cryoablation can improve the lethality of tumor cells. The slow freezing group with ultrasound-induced nucleation have the best results with more complete ablation and lower cell viability of $15.60\%\pm2.60\%$. The rapid freezing group need to be coupled with a lower induced nucleation temperature to better kill the cells. The design and development of cryoablation devices with ultrasound-induced nucleation have practical implications.

Keywords: *ultrasound-induced nucleation; cryoablation; cell viability; ice crystal*

冷冻消融是一种通过冻融过程破坏肿瘤细胞的物理消融方式，与常规手术切除相比，具有微创、疼痛小、出血少等优势，在实体瘤患者的治疗中发挥着越来越重要的作用。迄今为止，冷冻消融已被用于肝癌^[1]、乳腺癌^[2]和前列腺癌^[3]等的临床治疗中。然而，冷冻消融普遍存在降温效果有限、靶向杀伤效率不高问题，最终会导致肿瘤出现残留、转移和复发，治疗效果不佳。

为提高冷冻消融的疗效，众多学者开始研究低温复合治疗模式。目前已有研究将抗冻蛋白^[4-6]或纳米粒子^[7-9]加入冷冻消融过程中，尽管这些联合应用可以加剧冷冻消融对肿瘤细胞的杀伤，但抗冻蛋白的提取复杂、产量低，而纳米粒子的添加不可避免地会带来细胞毒性、载体的可降解性以及靶向性等问题^[10]。因此，寻找一种新的冷冻消融辅助手段迫在眉睫。近年来，超声波已成为一种新兴治疗手段，其在癌症的临床治疗中显示出独特的价值和优势。超声波在介质中传播时会引起空化效应、机械效应和热效应，可诱导细胞凋亡^[11-13]并增加细胞膜的通透性^[14-15]。低强度超声波除了可以直接用于临床治疗外，在药物生产中也发挥着巨大的作用^[16]。使用超声波可以促进原料结晶，并且显著影响晶体的粒径和分布，提高结晶的可重复性。除此之外，超声波也被应用于食品工业以提高冷冻食品的品质。它可以有效地增强冰核形成，控制冰晶大小与形状，同时还能改善传热传质以加速冷冻过程^[17]。尽管已经发现使用保护剂结合超声诱发成核可以提高细胞的保存效果^[18]，但未添加保护剂下的超声诱发成核效果还未被研究。

本文提出了一种将超声诱发成核用于冷冻消融的新方法，为达到提高肿瘤细胞致死率的目的，

研究了超声波辅助冷冻消融对肿瘤细胞即时存活率和再培养存活率的影响。通过低温显微系统，观察并记录了超声诱发成核后的胞外冰晶形态、胞内冰晶生成情况以及复温后的细胞损伤情况，探讨了冰晶形态与细胞损伤的微观结构关系，为未来进一步优化肿瘤冷冻消融提供了新方向。

1 材料和方法

1.1 试剂和材料

肝癌细胞 HepG2 (Procell CL-0103, 武汉普诺赛生命科技有限公司)，胎牛血清 (CAPRICORN 公司)，DMEM 培养基 (GIBCO 公司)，双抗 (GIBCO 公司)，胰蛋白酶 (TBD 公司)，PBS 缓冲液 (TBD 公司)，AO/PI (吖啶橙/碘化丙啶) 染色液 (Nexcelom Bioscience, CS2-0106-5 mL)。

T-25 培养瓶 (NEST 耐思)，50 mL 离心管 (NEST 耐思)，15 mL 离心管 (NEST 耐思)，1.2 mL 冻存管 (LABSELECT, CV-002-120-EX)，CCK-8 细胞计数试剂盒 (日本同仁, CK04)。

1.2 仪器和设备

全自动细胞计数仪 (BodBoge)，多功能读板仪 (美国 BioTek, Synergy H1)，手持超声波发生器 (爱尔创, UPT3)，程序降温仪 (英国 Planer, Kryo360-1.7)，机械超声波清洗机 (科玺世纪, KX-1730QT)。

1.3 细胞培养

HepG2 细胞在补充有体积分数为 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 DMEM 培养基中培养，置于 37 ℃、体积分数为 5% 的 CO₂ 培养箱内。取对数生长期的细胞用于实验，取细胞时先轻轻吸弃培养瓶里

的上清液，向瓶中加入 1 mL PBS 缓冲液，轻柔洗涤 2 次后吸弃 PBS 缓冲液，加入 1 mL 胰蛋白酶，培养瓶放入培养箱消化 3 min。在光学显微镜下见细胞形态已呈圆形，轻拍培养瓶一侧，细胞可与壁面完全脱离，添加 2 mL 完全培养基终止消化。用 1 mL 移液枪吸取培养液，轻柔、均匀地反复吹打培养瓶底壁，确保细胞脱离底壁全部进入溶液中，将细胞溶液以 1100 r/min 的转速离心 4 min 后重悬于培养基中待用。

1.4 细胞冷冻消融

取 1.2 mL 冻存管，分别加入 500 μ L HepG2 细胞悬液，保证每管内的细胞浓度为 5×10^5 个/mL，分为实验组和对照组。实验开始前，将对照组和实验组的冻存管分别夹在程序降温仪的递送管上，按设计的冻融程序设定好程序降温仪，启动仪器。对照组仅进行冷冻消融，而不进行超声诱发成核。

细胞冷冻消融程序为：以 10 $^{\circ}$ C/min 或 50 $^{\circ}$ C/min 的降温速率从 20 $^{\circ}$ C 降温到超声诱发成核温度（-5，-7，-9，-11 $^{\circ}$ C），程序降温仪显示达到诱发成核温度并提示可进行诱发成核操作后，将递送管取出放入超声波清洗机内，开启超声 2 s，诱发成核。超声波频率 40 kHz，功率 120 W。超声诱发成核完成后将递送管迅速放回程序降温仪中，以原速率降温至 -20 $^{\circ}$ C，保持 5 min，再以 5 $^{\circ}$ C/min 的升温速率将温度升至 20 $^{\circ}$ C。

1.5 细胞存活率检测

采用 AO/PI 染色评估冻融后即时的 HepG2 细胞活力。用 10 μ L 移液枪吸取 10 μ L 冻融结束后的细胞悬液，避光加入 10 μ L AO/PI 染液，轻轻混匀。吸取 10 μ L 混合液到一次性计数板，细胞存活率由细胞计数仪直接读取。采用 CCK-8 法评估细胞经过冻融后继续培养 12，24，48 h 的细胞活力。将冻融完成后的不同组细胞以 1×10^4 cell/孔接种在 96 孔板上，分别于 37 $^{\circ}$ C、体积分数为 5% 的 CO₂ 培养箱内培养 12，24，48 h。培养完成后使用 CCK-8 试剂染色，在 450 nm 波长下测定每个孔的最终吸光度。

1.6 低温显微观察

低温显微实验之前的细胞准备与 1.3 小节描述的相同，装置示意图如图 1 所示。首先将样品坩埚放置于冷热台中央，用移液枪吸取 4 μ L 新鲜制备的 HepG2 细胞悬液并滴加到样品坩埚中，随后

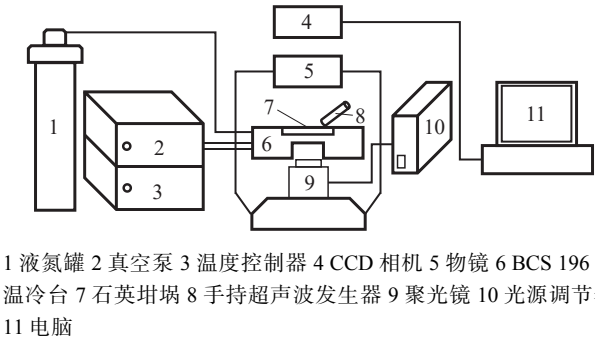


图 1 低温显微实验装置示意图

Fig.1 Schematic diagram of the cryomicroscopy experimental device

迅速盖上干净的盖玻片，将显微镜调节至视野清晰后启动设定好的冻融程序。诱发成核的实验操作步骤为：当达到所设定的诱发成核温度后，打开冷台顶部圆盖，使用超声波发生器尖端轻碰玻片边缘来诱发溶液中冰晶的形成，整个过程应做到快速且精确，并尽可能保证玻片不被移动。用 CCD 相机实时记录整个降温 and 复温过程，时间间隔为 1 s。

低温显微镜的冻融程序为：实验组细胞分别在 10 $^{\circ}$ C/min 和 50 $^{\circ}$ C/min 的降温速率下，从 20 $^{\circ}$ C 降温到所需温度（-5，-7，-9，-11 $^{\circ}$ C）后诱发成核，接着以原来的速率降温至 -20 $^{\circ}$ C 并保持 1 min，以 5 $^{\circ}$ C/min 升至室温。对照组细胞也分别以 10 $^{\circ}$ C/min 和 50 $^{\circ}$ C/min 的速率降温至 -20 $^{\circ}$ C 并保持 1 min，最后以 5 $^{\circ}$ C/min 升至室温。

1.7 数据处理

数据处理采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行，采用单因素方差分析，数据以平均数 $\pm$ 标准差的形式表示， $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 不同降温速率下超声诱发成核温度对细胞存活率的影响

图 2 显示了不同降温速率下诱发成核温度对 HepG2 细胞存活率的影响（**代表 $P<0.01$ ）。同各自对照组（未诱发成核，cryo）相比，实验组的细胞存活率均显著降低（ $P<0.01$ ），这说明使用超声诱发成核来辅助冷冻消融的确能提高 HepG2 细胞的致死率。当降温速率为 10 $^{\circ}$ C/min 时（图 2a），HepG2 细胞的存活率最高仅为 22.53 % $\pm$ 5.79%，在 -5 $\sim$ -11 $^{\circ}$ C 的温度范围内，诱发成核温度对细胞的存

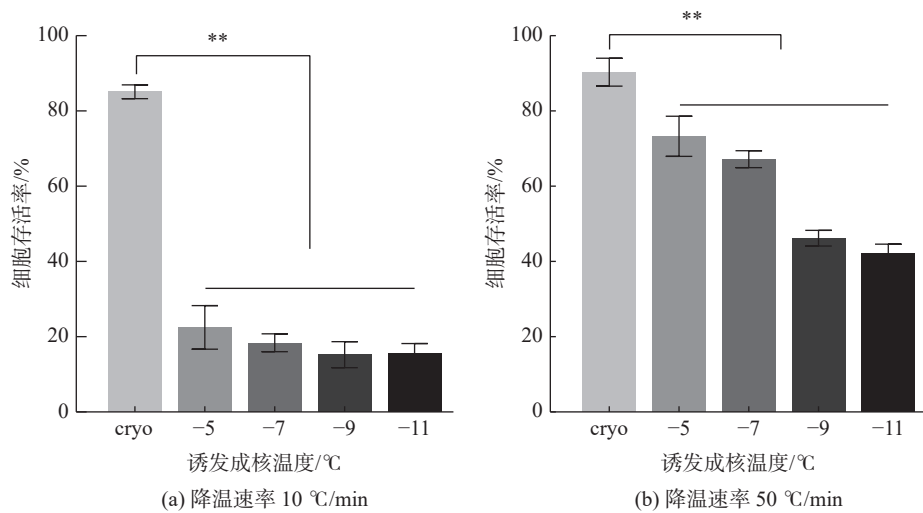


图 2 不同降温速率下诱发成核温度对肝癌细胞存活率的影响

Fig.2 Effect of ultrasound-induced nucleation temperature on the survival rate of HepG2 cells under different cooling rates

活率不产生显著影响 ($P>0.05$)。当降温速率提高到 50 °C/min 时(图 2b), 较高成核温度(-5 °C 和 -7 °C)的实验组之间没有统计学差异, HepG2 细胞的存活率最低为 $67.19\% \pm 2.24\%$, 较低成核温度(-9 °C 和 -11 °C)的实验组之间差异也不显著, 但 HepG2 细胞的存活率下降至最低为 $42.14\% \pm 2.45\%$, 细胞存活率明显受到诱发成核温度的影响。

当超声波作用于细胞溶液时, 可以显著提高传热与传质系数, 有利于快速去除结晶过程所释放的潜热, 因此可以有效地诱发晶核的形成。当细胞外形成冰晶后, 若降温速率较慢, 胞外冰晶将有充足的时间向胞内生长, 形成胞内冰晶, 从而导致细胞死亡; 若降温速率较快, 胞外冰晶则形成较少且来不及生长, 冰晶不能及时进入细胞内, 无法对细胞造成致命的打击。在较低的温度下诱发成核时, 由于过冷度较大, 生成的晶核临

界尺寸小, 溶液内部可以形成更多稳定的晶核, 因此会形成更为细密的胞外冰晶。这些胞外冰晶就更有可能会进入细胞内, 产生较好的杀伤效果。总的来说, 超声波诱发成核对于慢速冷冻组的杀伤效果更为显著。

2.2 不同降温速率下超声诱发成核对细胞培养存活率的影响

冷冻消融不彻底是造成肿瘤复发的重要因素, 因此验证消融后不同时间的细胞存活率显得尤为重要。CCK-8 法检测结果显示, 当降温速率为 10 °C/min(图 3a)时, 实验组细胞在培养 12, 24, 48 h 后都保持极低的存活率, 与对照组相比均有统计学差异 ($P<0.01$)。当降温速率为 50 °C/min(图 3b)时, 超声诱发成核温度为 -7 °C 的实验组细胞在培养 12, 24, 48 h 后均与对照组没有显著差异, 诱发成核温度为 -5 °C 的实验组在培养 48 h 后

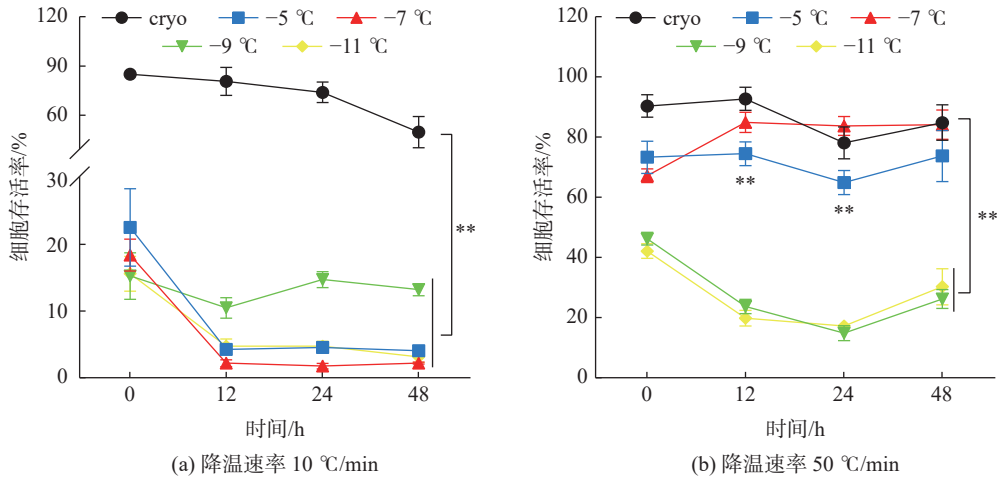


图 3 不同降温速率下诱发成核温度对 HepG2 细胞培养存活率的影响

Fig.3 Effect of ultrasound-induced nucleation temperature on the culture survival rate of HepG2 cells under different cooling rates

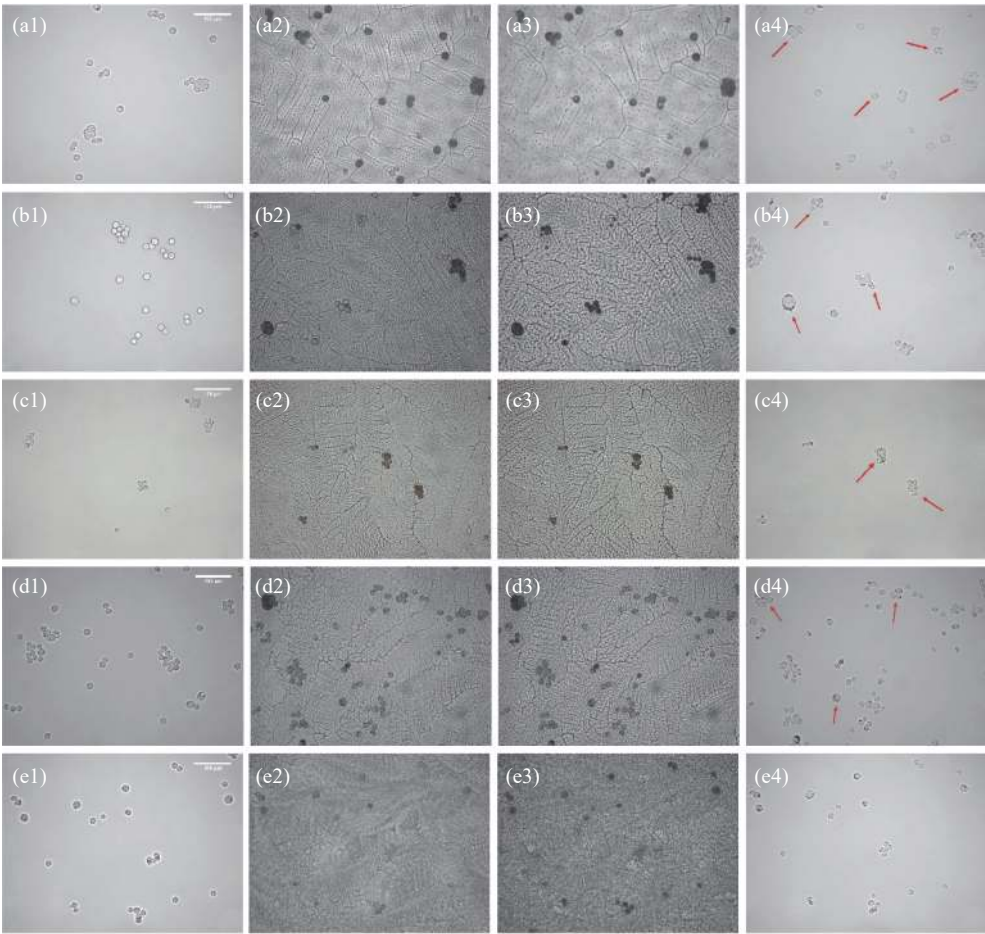
也失去了与对照组的差异，而在较低成核温度下（-9℃和-11℃）的实验组在每个时间节点与对照组之间均有统计学差异（ $P<0.01$ ）。这是由于快速冷冻组在高成核温度下形成的胞外冰晶大而疏，且没有足够的时间向胞内生长，因此无法产生致命的胞内冰晶损伤。综上，慢速冷冻组的杀伤效果最佳，而快速冷冻组在较高成核温度下进行的冷冻消融不彻底，容易造成肿瘤复发。

2.3 不同降温速率下超声诱发成核的低温显微观察

2.3.1 降温速率为 10℃/min 时 HepG2 细胞的低温响应

当降温速率为 10℃/min 时，HepG2 细胞的低温显微图像如图 4 所示。图 4 中第 1 列为开始降温前细胞的图像，可见肝癌细胞状态良好，细胞膜均保持完整。在使用超声波诱发成核后（图 4（a2、b2、c2、d2）），胞外冰晶的生长速率很快，视野

内几乎一瞬间就布满冰晶，同时可观察到部分 HepG2 细胞内部变成黑色，说明此时有胞内冰晶的形成。图 4（e2）为对照组自发成核时生成的冰晶情况，胞外冰晶在 -15.8℃ 形成，并且在形成后迅速覆盖了全部细胞，但细胞内没有马上出现胞内冰晶，而是在 -20℃ 时才出现。从第 2 列的胞外冰晶形态可以看出，随着成核温度的降低，胞外冰晶分支数目明显增多，形态变得更加细密。从第 3 列可以看出，继续慢速冷冻至 -20℃ 并且平衡 1 min 后，各组中的胞外冰晶都有了更为明显的生长，且细胞内全部生成了胞内冰晶。复温后的实验组（图 4（a4、b4、c4、d4））较对照组（图 4（e4））中的细胞均表现出明显的损伤，细胞膜的边界变得模糊，难以辨认，如图中红色箭头所示。有些细胞在经历了这样的冷冻消融后失去了活性，但仍然会有一些 HepG2 细胞的细胞膜受损不严重，这样的细胞就可能会存活下来，造成肿瘤的复发



注：a~d 分别表示在 -5，-7，-9，-11℃ 超声诱发成核，e 为对照组，自发结晶；1~4 分别表示降温前、成核时、降温至 -20℃ 并保持 1 min 时、复温后

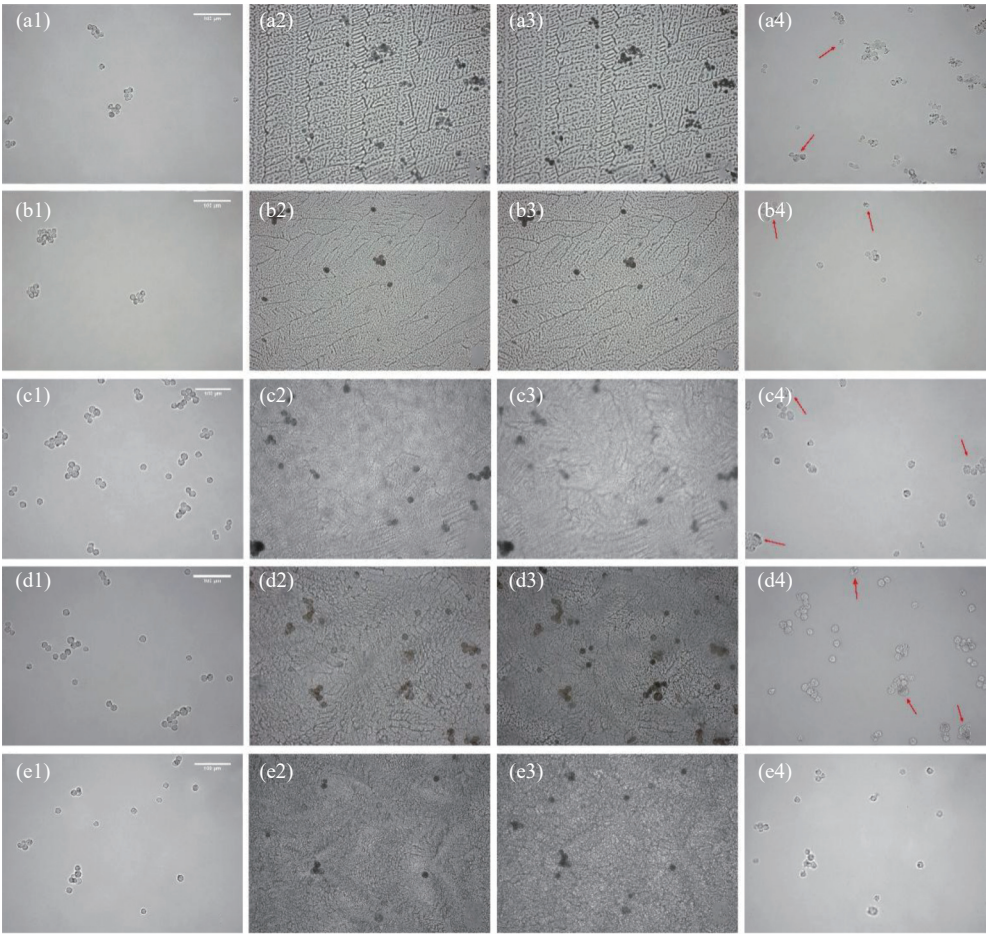
图 4 HepG2 细胞的低温显微图像（降温速率为 10℃/min）
Fig.4 Cryomicroscopy images of HepG2 cells (cooling rate:10℃/min)

和转移。实验组中直观的细胞损伤与细胞实验中较低的存活率相对应, 再次证明超声诱发成核辅助冷冻消融具有很好的效果。超声波的使用使细胞膜对于胞内冰晶的成核变得足够“活跃”, 而充分的胞内冰晶生长导致了更强的细胞损伤。

2.3.2 降温速率为 50 ℃/min 时 HepG2 细胞的低温响应

图 5 显示了降温速率为 50 ℃/min 时, HepG2 细胞的低温显微图像。当降温速率升高到 50 ℃/min

后, 胞外冰晶的形态呈现出与降温速率为 10 ℃/min 时一致的变化规律, 均为高成核温度条件下形成的胞外冰晶大而疏, 低成核温度下形成的胞外冰晶小而密, 并且均在形成胞外冰晶后立即观察到了胞内冰晶的形成。与对照组(图 5(e4))相比, 低成核温度(图 5(c4、d4))下细胞复温后的膜边界模糊, 且受损严重, 这样的现象对应了其在细胞实验中的低存活率, 而较高成核温度(图 5(a4、b4))下细胞的损伤则没有那么严重。



注: a~d 分别表示在-5、-7、-9、-11 ℃ 超声诱发成核, e 为对照组, 自发结晶; 4~4 分别表示降温前、成核时、降温至-20 ℃ 并保持 1 min 时、复温后

图 5 HepG2 细胞的低温显微图像(降温速率为 50℃/min)
Fig.5 Cryomicroscopy images of HepG2 cells (cooling rate 50 ℃/min)

3 结 论

为提高肿瘤细胞冷冻消融的杀伤效果, 本文创新性地引入超声诱发成核来提高冷冻消融的治疗结果, 得到如下结论:

a. 超声诱发成核辅助冷冻消融对细胞有更好的杀伤效果。当降温速率为 10℃/min 时, 超声诱发成核的细胞存活率最低为 $15.60\% \pm 2.60\%$, 不同

诱发成核温度间无统计学差异($P>0.05$)。当降温速率为 50℃/min 时, 需要配合较低的成核温度才能达到更理想的杀伤效果, 细胞存活率最低为 $42.14\% \pm 2.45\%$ 。

b. 慢速冷冻组的冷冻消融效果最佳, HepG2 细胞在培养 12, 24, 48 h 后均保持极低的存活率, 而快速冷冻组在较高成核温度下进行的冷冻消融不彻底, 容易造成肿瘤复发。

c. 较高成核温度下形成的胞外冰晶大而疏, 较低成核温度下形成的胞外冰晶小而密。超声波使细胞膜对于胞内冰晶的成核变得足够“活跃”。当降温速率较慢时, 胞外冰晶有足够的时间向细胞内生长, 这导致了更强的细胞损伤。当降温速率较快时, 降温时间较短, 冰晶不能及时进入胞内, 只有在低成核温度下形成更细小的胞外冰晶时, 才有可能进入细胞内并产生良好的杀伤效果。

d. 设计开发具有超声诱发成核功能的冷冻消融器械具有实际意义。

参考文献:

- [1] KIM R, KANG T W, CHA D I, et al. Percutaneous cryoablation for perivascular hepatocellular carcinoma: therapeutic efficacy and vascular complications[J]. *European Radiology*, 2019, 29(2): 654–662.
- [2] MANENTI G, PERRETTA T, GASPARI E, et al. Percutaneous local ablation of unifocal subclinical breast cancer: clinical experience and preliminary results of cryotherapy[J]. *European Radiology*, 2011, 21(11): 2344–2353.
- [3] COOPERBERG M R, BROERING J M, CARROLL P R. Time trends and local variation in primary treatment of localized prostate cancer[J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2010, 28(7): 1117–1123.
- [4] KOUSHAFAR H, PHAM L, LEE C, et al. Chemical adjuvant cryosurgery with antifreeze proteins[J]. *Journal of Surgical Oncology*, 1997, 66(2): 114–121.
- [5] KOUSHAFAR H, RUBINSKY B. Effect of antifreeze proteins on frozen primary prostatic adenocarcinoma cells[J]. *Urology*, 1997, 49(3): 421–425.
- [6] PHAM L, DAHIYA R, RUBINSKY B. An *in vivo* study of antifreeze protein adjuvant cryosurgery[J]. *Cryobiology*, 1999, 38(2): 169–175.
- [7] SHENOI M M, SHAH N B, GRIFFIN R J, et al. Nanoparticle preconditioning for enhanced thermal therapies in cancer[J]. *Nanomedicine*, 2011, 6(3): 545–563.
- [8] HOU Y, SUN Z Q, RAO W, et al. Nanoparticle-mediated cryosurgery for tumor therapy[J]. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2018, 14(2): 493–506.
- [9] HOU Y, ZHANG P J, WANG D W, et al. Liquid metal hybrid platform-mediated ice–fire dual noninvasive conformable melanoma therapy[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2020, 12(25): 27984–27993.
- [10] 刘士榕, 梁萍. 纳米技术在肿瘤热消融领域的研究进展[J]. *解放军医学院学报*, 2015, 36(5): 514–517.
- [11] FERIL L B, KONDO T. Biological effects of low intensity ultrasound: the mechanism involved, and its implications on therapy and on biosafety of ultrasound[J]. *Journal of Radiation Research*, 2004, 45(4): 479–489.
- [12] FERIL JR L B, KONDO T. Major factors involved in the inhibition of ultrasound-induced free radical production and cell killing by pre-sonication incubation or by high cell density[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2005, 12(5): 353–357.
- [13] TACHIBANA K, FERIL JR L B, IKEDA-DANTSUJI Y. Sonodynamic therapy[J]. *Ultrasonics*, 2008, 48(4): 253–259.
- [14] HUANG C Y, ZHANG H, BAI R D. Advances in ultrasound-targeted microbubble-mediated gene therapy for liver fibrosis[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2017, 7(4): 447–452.
- [15] QIN P, HAN T, YU A C H, et al. Mechanistic understanding the bioeffects of ultrasound-driven microbubbles to enhance macromolecule delivery[J]. *Journal of Controlled Release*, 2018, 272: 169–181.
- [16] DE LOS SANTOS CASTILLO-PEINADO L, LUQUE DE CASTRO M D. The role of ultrasound in pharmaceutical production: sonocrystallization[J]. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2016, 68(10): 1249–1267.
- [17] CHENG X F, ZHANG M, XU B G, et al. The principles of ultrasound and its application in freezing related processes of food materials: a review[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2015, 27: 576–585.
- [18] 李维杰, 宋立勇, 刘宝林, 等. 超声波植冰对 L-02 肝细胞低温保存的影响[J]. *制冷学报*, 2021, 42(4): 158–166.

(编辑: 董 伟)