

超声介导下不同浓度声诺维影响人脐静脉血管内皮细胞凋亡及活性的体外实验研究

In Vitro Studies on the Effect of Ultrasound-Mediated SonoVue in Different Concentrations on HUVEC Apoptosis and Activity

刘玉凤¹,任卫东²,唐力²,陈昕²,马春艳²,张莹³

LIU Yu-feng¹, REN Wei-dong², TANG Li², CHEN Xin², MA Chun-yan², ZHANG Ying³

(1.中国医科大学附属第四医院超声科,辽宁沈阳 110032; 2.中国医科大学附属第一医院心血管检查科,辽宁沈阳 110001; 3.中国医科大学实验技术中心,辽宁沈阳 110001)

(1. Department of Ultrasound, The Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang, Liaoning, 110032, China; 2. Department of Cardiovascular Function, First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang, Liaoning, 110001, China; 3. Experiment Technology Center of China Medical University, Shenyang, Liaoning, 110001, China)

摘要:为了探讨超声介导不同浓度微泡造影剂(MBCA)声诺维(SonoVue)对人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)凋亡及活性的影响,应用Annexin-v-FITC和PI双标记细胞凋亡检测试剂盒检测不同浓度SonoVue对HUVEC凋亡及活性的影响。结果在超声介导下,随着SonoVue浓度的增加,活细胞数呈减少趋势,早期凋亡、晚期凋亡和坏死细胞数呈增加趋势。超声介导下(超声能量一定时)不同浓度SonoVue对HUVEC有着不同的影响。

关键词:超声 微泡造影剂 人脐静脉血管内皮细胞

中图分类号: R54 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2009)02-0219-03

Abstract This is a study of the effects of ultrasound-mediated microbubble contrast agent (MBCA) - SonoVue in different concentrations on apoptosis and activity of Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC). HUVEC apoptosis and activity were detected with Annexin-v-FITC and PI paired labeled cell apoptosis detect agent kit in different concentrations Ultrasound-mediated SonoVue. with Ultrasound-mediated SonoVue, the higher concentration, the less quantity of viable cells and the more quantity of cell apoptosis and death. Ultrasound-mediated SonoVue of different concentrations exerts different effects on HUVEC.

Key words ultrasound, SonoVue, HUVEC

超声介导不同浓度微泡造影剂(MBCA)有可能成为基因治疗的一种安全、有效的载体,超声波对机体器官或组织的选择性辐照使得超声波介导MBCA作为基因或药物的载体具有了靶向性^[1]。超声介导MBCA可以对靶细胞产生一系列生物学效应,其中的空化效应可以使细胞膜通透性增加^[2,3]。MBCA可以降低空化阈值,增强空化效应,从而提高超声辐照

的基因转染率和表达^[4-6]。虽然用超声介导MBCA可以使基因的转染效率提高。然而,利用超声介导MBCA实现基因的定向转移这一技术同样也会对机体产生一定的有害的生物学效应^[3]。影响MBCA介导基因治疗效果的因素很多,超声能量、辐照时间、基因与微泡比例等诸多因素均可以对基因治疗产生影响^[3]。为了该项技术在临床安全、有效地应用,我们应用Annexin-v-FITC和PI双标记细胞凋亡检测试剂

收稿日期: 2008-11-17

作者简介: 刘玉凤(1962-),女,主任医师,主要从事心血管超声研究。

盒检测不同浓度声诺维 (SonoVue) 对人脐静脉血管内皮细胞 (HUVEC) 凋亡及活性的影响

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

研究对象: 人脐静脉血管内皮细胞株 (HUVEC) (南京凯基生物科技开发有限公司) 试剂: 胎牛血清 (FBS, Gibco 公司, 美国), 1640 培养液, 胰酶蛋白消化液, 青霉素, 链霉素, SonoVue MBCA (Bracco 公司, 意大利), Annexin-V-FITC 和 PI 双标记细胞凋亡检测试剂盒, PBS 液, 0.9% 生理盐水 实验器材: 单孔培养皿 (Corning 公司, 美国), 25ml 一次性培养瓶, 培养箱, 倒置显微镜 (IMS), 显微镜, 记数板, 离心机, 超声探头 (Philips ie33 S5-1, 频率 1~5 MHz, heart pen 档), 荧光显微镜 (FMS Olympus, IX71, 日本), 流式细胞仪 (FCM, FACS Calibur BD, 美国), 温度仪, 水浴箱

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养

使用 10% FBS 的 1640 细胞培养液培养 HUVEC, 每 1~2d 换液 1 次, 每 3~4d 传代 1 次

1.2.2 MBCA (SonoVue) 的配制

1.68ml 注射用生理盐水 (0.9% NaCl) 加入 SonoVue 药瓶中 (每瓶含 SF₆59mg, 冻干粉 25mg), 剧烈震荡 20s 至瓶内药物混合均匀后备用 (此时 SonoVue 浓度为 50mg/ml, 以下称初 MBCA)

1.2.3 HUVEC 凋亡及活性检测

实验分组: 计细胞数, 将细胞浓度调至 $\times 10^6$ /ml, 将 1ml 细胞悬液接种于直径 35mm 单孔聚乙烯培养皿中。按照所加 MBCA (SonoVue) 浓度不同, 分为 A 组: 加初 MBCA, 每孔加 300 μ l; B 组: 将初 MBCA 稀释 2 倍 (SonoVue 浓度为 25mg/ml) 后, 每孔加 300 μ l; C 组: 将初 MBCA 稀释 3 倍 (SonoVue 浓度为 17mg/ml) 后, 每孔加 300 μ l; D 组: 将初 MBCA 稀释 4 倍 (SonoVue 浓度为 12.5mg/ml) 后, 每孔加 300 μ l; E 组: 对照组, 每孔加生理盐水 300 μ l 以上 5 个组每组重复 6 孔。

实验步骤: (1) 超声辐照: 培养皿固定于 37 $^{\circ}$ C 水浴箱水面, 探头距培养皿底部约 5mm 辐照条件: 超声机械指数 1.4, 辐照时间为 60s 照射后继续培养细胞 24h (2) 培养 24h 后, 用 0.25% 胰酶消化细胞, 制成细胞悬液 (3) 加 1ml 冷 PBS, 轻轻振荡使细胞悬浮 (4) 温度 4 $^{\circ}$ C, 离心, 1000rpm, 10min, 然后吸弃上清液 (5) 重复步骤 (3), (4), 共 2 次 (6) 将细胞重悬于 200 μ l Binding Buffer 液中 (7) 加入 10 μ l Annexin

V-FITC 和 3 μ l PI 轻轻混匀, 避光, 室温条件下反应 15min (8) 加入 300 μ l Binding Buffer 液, 然后用 FMS 观察加入不同浓度 MBCA, HUVEC 凋亡和坏死细胞的情况, FMS 下绿色细胞为早期凋亡细胞, 红色细胞为晚期凋亡和死亡细胞; 用 FCM 检测细胞凋亡和活性。

1.2.4 数据处理

实验中计量资料采用平均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。使用 SPSS 12.0 软件作方差分析, $P < 0.05$ 视为有统计学意义。

2 结果

不同浓度 MBCA SonoVue 对 HUVEC 凋亡及活性的影响 (表 1, 图 1) 超声介导初 MBCA (SonoVue) 时存活细胞百分比比较少, 晚期凋亡和坏死细胞百分比比较多; 初 MBCA (SonoVue) 稀释 2 倍时存活细胞百分比增多, 晚期凋亡和坏死细胞百分比减少, 较前者有明显差异 ($P < 0.01$); 初 MBCA (SonoVue) 稀释 3 倍时存活细胞百分比进一步增大, 晚期凋亡和坏死细胞百分比进一步变小, 且与初 MBCA (SonoVue) 或其稀释 2 倍时有明显差异 ($P < 0.01$); 初 MBCA 稀释 4 倍与稀释 3 倍时比较对细胞存活、晚期凋亡和坏死百分比无显著影响 ($P > 0.05$)。超声介导初 MBCA (SonoVue) 稀释 3 倍时, 早期凋亡细胞百分比明显减小, 且与初 MBCA (SonoVue) 或其稀释 2 倍时有明显差异 ($P < 0.01$); 初 MBCA (SonoVue) 稀释 4 倍时与初 MBCA (SonoVue) 稀释 3 倍时比较对早期凋亡细胞百分比无显著影响 ($P > 0.05$)。

表 1 超声介导不同浓度 SonoVue 对 HUVEC 存活、凋亡及坏死率的影响

Table 1 Ultrasound-mediated SonoVue in different concentrations exerts different effects on the viability, apoptosis and death of HUVEC

组别 Group	例数 No	存活细胞 百分比 Viable cell (%) ($\bar{x} \pm s$)	早期凋亡 百分比 Early apoptosis (%) ($\bar{x} \pm s$)	晚期凋亡和 坏死百分比 Late apoptosis death (%) ($\bar{x} \pm s$)
A	6	76.33 \pm 2.12	5.97 \pm 0.79	10.86 \pm 1.77
B	6	80.48 \pm 2.50 [#]	5.52 \pm 0.55	7.37 \pm 1.8 [#]
C	6	89.71 \pm 1.32 [#]	2.29 \pm 0.38 [#]	4.72 \pm 0.61 [#]
D	6	90.41 \pm 1.48	2.00 \pm 0.15	4.16 \pm 0.29
E (CK)	6	91.28 \pm 1.48	1.93 \pm 0.68	3.37 \pm 0.83

与上一组比较 $P < 0.01$ # Compared with previous group $P < 0.01$

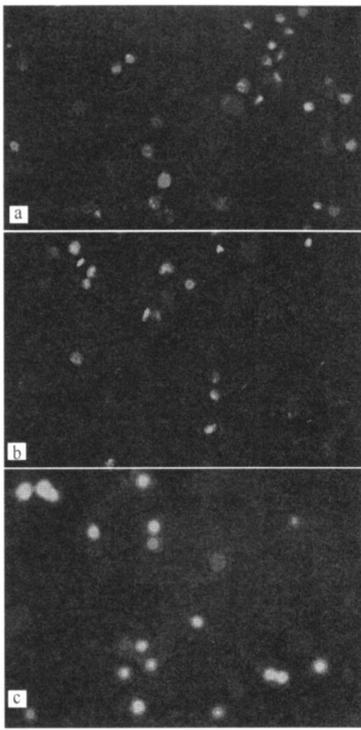


图1 凋亡和坏死细胞的FMS($\times 100$)

Fig. 1 FMS picture of apoptosis and dead cells($\times 100$)

a. 50mg/ml; b. 25mg/ml; c. 17mg/ml.

■ : 晚期凋亡或死亡细胞; ■ : 早期凋亡细胞。

■ : Late apoptosis and dead cell; ■ : Early apoptosis.

3 讨论

本研究应用超声介导 MBCA 是因为它的理化性质能够产生特有的生物学效应, 超声声能的热效应和声空化效应是两个主要的方面, 尤其是以声空化效应为主。

超声不仅可以使细胞膜通透性增加, 而且破坏微泡后可以使其凋亡和坏死^[7-9]。目前认为空化效应是主要机制, 空化效应是指液体中的微小气泡核在超声波作用下被激化, 表现为泡核的振荡、膨胀、收缩及崩溃等一系列动力学过程, 这一过程可以把声场能量高度集中于极小的空化泡内, 并在空化泡快速闭合的瞬间产生放电、发光、高温、高压、高能量、冲击波、微射流及微聚变等物理和化学效应。目前应用的超声 MBCA 为内含不同气体的微气泡, 超声 MBCA 内含的微气泡能增强空化效应并降低空化效应的阈值^[10, 11]。近年来的研究表明, 超声辐照可以使组织和液体内存在的微气泡发生空化效应, 在该过程中, 周围组织的细胞壁和细胞膜被击穿, 产生可逆或不可逆的小孔, 从而提高了细胞膜的通透性, 促进基因等进入细胞, 增强了基因在细胞内的转染和表达^[12, 13]。

本研究结果表明, 在超声介导下不同浓度

MBCA (SonoVue) 对 HUVEC 凋亡及活性的影响不同。随着 SonoVue 浓度的增加, 活细胞百分比呈减少趋势, 早期凋亡细胞百分比、晚期凋亡和坏死细胞百分比呈增加趋势。这说明, 超声介导微泡有加速导致细胞凋亡和死亡的作用。在本实验中, SonoVue 的浓度为 17mg/ml 及 12.5mg/ml 组早期凋亡、晚期凋亡和死亡细胞百分比比较其以上组均有明显的减小; 而 17mg/ml 及 12.5mg/ml 组之间早期凋亡、晚期凋亡和死亡细胞百分比比较无显著差别。因此, 在进一步研究 MBCA (SonoVue) 对 HUVEC 细胞膜作用的实验中 MBCA (SonoVue) 所采用的适宜浓度应为 17mg/ml 而 SonoVue 浓度为 12.5mg/ml 时, MBCA SonoVue 离细胞距离较大, 理论上空化效应的效果较前者差。当应用低于 17mg/ml 浓度的造影剂时, 可否产生有效的生物学效应; 以及能产生最佳的生物学效应并且产生最小负损伤的超声微泡造影剂的剂量为多少, 有待于进一步研究。

在相同的超声辐照条件下, MBCA 浓度低则微泡与细胞距离大, 表现为可以修复性声孔效应; MBCA 浓度增大使微泡与细胞间距减小, 使细胞膜上发生的声孔无法修复, 为致死性声孔效应。可能的原因是: 当 MBCA 浓度增大, 微泡与细胞间距减小, 超声介导 MBCA 产生空化效应时, 细胞所承受的冲击波、微射流大所致。

本研究结果表明, 当 MBCA (SonoVue) 浓度为 50mg/ml 时, HUVEC 早期凋亡百分比为 5.97% ± 0.79%; 晚期凋亡和坏死细胞百分比为 10.86% ± 1.77%, 均较其它组的相应值高, 说明随着 MBCA 浓度的增加, HUVEC 凋亡、死亡的细胞百分比增大。本结果提示对富血供的恶性肿瘤治疗时, 输入一定浓度的 MBCA, 用适量的超声能量辐照肿瘤部位, 可以导致肿瘤细胞的死亡, 从而为肿瘤治疗提供一种简便有效的方法。

参考文献:

- [1] Korpany G, Chen S, Shoheit RV, et al. Targeting of VEGF-mediated angiogenesis to rat myocardium using ultrasonic destruction of microbubbles [J]. Gene Ther, 2005, 12(17): 1305-1312.
- [2] Danno M A, Dyson M, Young S R, et al. The significance of membrane changes in the safe and effective use of therapeutic and diagnostic ultrasound [J]. Phys Med Biol, 1989, 34(11): 1543-1552.
- [3] Koch S, Pohl P, Cobet U, et al. Ultrasound enhancement of liposome-mediated cell transfection is caused by cavitation effects [J]. Ultrasound Med Biol, 2000, 26(5): 897-903.

(下转第 224 页 Continue on page 224)

利用广西科学院信息网自行设计网页,网页上及时出版、发布主要内容及重要信息,除了宣传介绍杂志以外,还增加了过刊查询系统,极大地方便了作者、读者的查询,加快了编辑部与作者、读者的交流与联系。在提高刊物知名度和办刊质量的同时,还能让科技成果在较短时间内传播世界各地。

过去的已经成为过去,今后我们继续以严谨的科学态度、艰苦奋斗的工作作风,为提高出版质量,满足广大读者的多元化需求作出不懈的努力,充分发挥科技期刊的科学性、创新性、实用性和导向性作用。作为科技新知识的载体,《广西科学》愿意面对新的机遇与挑战,愿意为广西的世纪宏图加砖添瓦,决心紧跟时代的步伐,不断开拓进取,树立精品意识,精心编纂,谱写壮丽的科技新史。

参考文献:

[1] 潘学燕,郭柏寿,杨继民.拓宽稿源渠道提高期刊质量:《西北农业学报》稿源状况及建设的思考[J].编辑学报,

2002,14(2): 130-131.
 [2] 蔡鸿程.作者编辑实用手册[M].北京:中国标准出版社,2004:73-75.
 [3] 宇文高峰,黎文丽.重视选题优化选题办出精品期刊[J].编辑学报,2005,17(1):23-24.
 [4] 辛明红,张淑敏,王燕萍,等.选题组稿与创办精品科技期刊[J].编辑学报,2005,17(2):97-98.
 [5] 王青.科技期刊稿源的优化控制[J].编辑学报,2004,16(1):20-21.
 [6] 雷琪.科技期刊质量管理应加强技术加工[J].编辑学报,2008,20(3):209-211.
 [7] 秦毅.对办好学术期刊若干问题的思考[J].云南社会科学,2005(1):1-3,21.
 [8] 邓大玉,黄天放.关于我国科技期刊人才培养的几点思考[J].广西师范学院学报,2008,25(4):97-100.
 [9] 邓大玉.科技期刊编辑部的稿件管理方法[J].编辑学报,2008,19(5):371-372.

(责任编辑:尹 闯)

(上接第 22 页 Continue from page 221)

[4] Frenkel P A, Chen S, Thai T, et al. DN A- loaded albumin microbubbles enhance ultrasound-mediated transfection in vitro[J]. Ultrasound Med Biol, 2002, 28(6): 817-822.
 [5] Shohet R V, Chen S, Zhou Y T, et al. Echocardiographic destruction of albumin microbubbles directs gene delivery to the myocardium [J]. Circulation, 2000, 101(22): 2554-2556.
 [6] Bekeredjian R, Chen S, Frenkel P A, et al. Ultrasound-targeted microbubble destruction can repeatedly direct highly specific plasmid expression to the heart [J]. Circulation, 2003, 108(8): 1022-1026.
 [7] Qian Z, Sangers RD, Pitt WG. Investigations of the mechanism of the biocoustic effect [J]. J Biomed Mater Res, 1999, 44(2): 198-205.
 [8] Miller D L, Quddus J. Sonoporation of monolayer cells by diagnostic ultrasound activation of contrast agent gas bodies[J]. Ultrasound Med Biol, 2000, 26(40): 661-667.
 [9] Miller D L, Don C, Song J. DN A transfer and cell killing in epidermoid cells by diagnostic ultrasound activation of

contrast agent gas bodies in vitro [J]. Ultrasound Med Biol, 2003, 29(4): 601-607.
 [10] Tachibana K, Tachibana S. Albumin microbubble echocontrast material as an enhancer for ultrasound thrombolysis [J]. Circulation, 1995, 92(5): 1148-1150.
 [11] Greenleaf W J, Boslender M F, Sarkar G, et al. Artificial cavitation nuclei significantly enhance acoustically induced cell transfection [J]. Ultrasound Med Biol, 1998, 24(4): 587-595.
 [12] Echheimer M, Boylan J, Parker S, et al. Translation of mammalian cells with plasmid DN A by scrape loading and sonication loading [J]. Proc Nat Acad Sci, 1987, 84(23): 8463-8467.
 [13] Wyber J A, Andrews J, Demanuele A. The use of sonication for the efficient delivery of plasmid DN A into cells [J]. Pharm Res, 1997, 14(6): 750-756

(责任编辑:邓大玉)