论著

文章编号:1000-5404(2010)24-2604-04

超声激活血卟啉促进新生大鼠心肌细胞凋亡

王均生,刘地川,黄 晶,吴泓权,童 欣 (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院心血管内科)

【摘要】 **目的** 观察超声激活血卟啉对新生SD大鼠心肌细胞的凋亡效应,并初步探讨其相关机制。**方法** 采用差速贴壁法培养原代新生SD大鼠心肌细胞,将其分为4组:超声(频率300 kHz,声强1.5 W/cm^2,辐照60 s)+血卟啉组(浓度20 μg/ml),超声组(频率300 kHz,声强1.5 W/cm^2,辐照60 s),血卟啉组(浓度20 μg/ml)和对照组。采用MTT法观察各处理因素对细胞的生长抑制情况;流式细胞仪膜连蛋白V-FITC/PI双染法检测细胞凋亡状况;免疫荧光细胞化学法鉴定细胞及检测Fas/FasL蛋白表达情况。**结果** MTT法测得24 h抑制率超声+血卟啉组显著高于其他各组($P<0.05$)。膜连蛋白V-FITC/PI双染法检测超声+血卟啉组细胞早期凋亡率明显高于其他各组($P<0.05$)。与其他各组相比,免疫荧光细胞化学法测定超声+血卟啉组Fas/FasL蛋白表达光密度值有明显增高($P<0.05$)。**结论** 超声激活血卟啉对心肌细胞有明显的凋亡效应,其可能与Fas/FasL蛋白表达增高有关。

【关键词】 声动力学;血卟啉;超声;凋亡
【中图法分类号】 R454.3;R363.27;R322.11 【文献标志码】 A

Ultrasound-activated hematoporphyrin promotes apoptosis of cardiomyocytes of neonatal rats

Wang Junsheng, Liu Dichuan, Huang Jing, Wu Hongquan, Tong Xin (Department of Cardiovascular Diseases, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the effect of ultrasound-activated hematoporphyrin on apoptosis of cardiomyocytes from neonatal SD rats and to explore the underlying mechanism. **Methods** The primary cultured cardiomyocytes from neonatal rats were randomly divided into 4 groups, ultrasound (frequency 300 kHz, sound intensity 1.5 W/cm^2, irradiation 60 s) plus hematoporphyrin (concentration 20 μg/ml), ultrasound (frequency 300 kHz, sound intensity 1.5 W/cm^2, irradiation 60 s), hematoporphyrin (concentration 20 μg/ml) and control group. The cell growth inhibitory effect of each group was observed by MTT assay. Apoptosis was measured by flow cytometry with Annexin V-FITC/PI staining. The expressions of Fas and FasL were identified by immunocytochemistry. **Results** The growth of the cultured cardiomyocytes of neonatal rats was significantly inhibited by hematoporphyrin combined with ultrasound at 24 h after treatment ($P<0.05$). The apoptotic rate of ultrasound plus hematoporphyrin group at early term was obviously higher than those of other groups by Annexin V-FITC/PI assay ($P<0.05$). Compared wtih other groups, hematoporphyrin combined with ultrasound apparently increased the level of Fas/FasL protein ($P<0.05$). **Conclusion** Ultrasound-activated hematoporphyrin enhances the apoptosis of cardiomyocytes of neonatal rats, which is possibly associated with higher expression of Fas/FasL protein.

【**Key words**】 sonodynamics; hematoporphyrin; ultrasound; apoptosis

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (30670870). Corresponding author: Liu Dichuan, Tel: 86-23-63693702, E-mail: LDC670220@163.com

声动力学疗法(sonodynamic therapy,SDT)是在光动力学疗法基础上发展起来的,利用超声和被称作声敏剂的特定化学物质的联合效应杀伤肿瘤,是一种具有前景的新的治疗方法[1]。SDT疗法在肿瘤治疗领域得到了广泛的研究,并证明有明显的抑制肿瘤效应[2],但其机制尚未明确。SDT疗法在抗血管成型术(percutaneous transluminal coronary angioplasty,PTCA)后再狭窄[3]和心肌消融等方面的研究显示其在心血管领域具有潜在的应用前景。本课题组前期研究了超

【基金项目】 国家自然科学基金资助面上项目(30670870)
【通信作者】 刘地川,电话:(023)63693702,E-mail:LDC670220@163.com

声激活血卟啉对活体兔心肌细胞凋亡和心功能影响，结果导致心肌凋亡和坏死[4]，但其机制还不清楚。本实验拟通过离体心肌进一步探讨超声激活血卟啉对心肌细胞凋亡效应，并从 Fas/FasL 细胞信号转导通路来探讨其机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

DMEM/F12 培养基、胎牛血清、小牛血清购自美国 Gibco 公司，胶原酶Ⅰ冻干粉针剂购自美国 Invitrogen 公司，血卟啉 H5518、MTT 试剂购自美国 Sigma 公司，兔多克隆 FasL 抗体、兔多克隆 FAS/Apo-1/CD95 抗体购自美国 ABGAB 公司，兔抗鼠 α-actin 抗体购自北京博奥森公司，羊抗兔 IgG-TRITC、羊抗兔 IgG-FITC 购自北京中杉金桥公司，酶标仪 ELX800，荧光正置显微镜 OLYMPUS-BX51，超声基因转染仪，由重庆医科大学超声研究所研制，频率 300 kHz，声强可调(0 ~ 2 W/cm^2)。

1.2 方法

1.2.1 新生 SD 大鼠心肌细胞的制备和培养[5] 用眼科剪剪断颈部处死出生 1 ~ 2 d 的 SD 大鼠(雌雄不拘，由重庆医科大学实验动物中心提供)，在超净工作台内无菌条件下迅速取出心脏组织，用无菌 PBS 清洗 3 遍。用眼科剪将心肌组织剪碎，再用无菌 PBS 清洗 1 遍，弃去上清液后，分别加入 0.125% 胰蛋白酶和 0.1% 胶原酶Ⅰ(自第 2 次消化开始加入)。37 ℃ 水浴轻微振荡消化 6 ~ 9 min，用无菌滴管将上清液转移至无菌离心管中，并以相同体积的含 10% 小牛血清的 DMEM/F12 培养基混匀终止消化(第 1 次消化后的上清液弃去)。如此重复消化 5 ~ 6 次使组织块完全消化。1 000 r/min 离心 7 min，弃去上清液，加入含 15% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基混匀细胞，移入培养瓶中。用差速贴壁法纯化心肌细胞，37 ℃ 5% CO_2 孵箱内培养 60 ~ 90 min 后，取上清液到另一培养瓶中，轻微吹打，然后转移至 6 孔板中，调整细胞浓度为 2.5×10^5/ml 并继续培养，隔 1 ~ 2 天换 1 次液。

1.2.2 心肌细胞鉴定 待细胞爬片长好后，用 PBS 清洗 2 次(3 min/次)，4% 多聚甲醛固定 20 min，0.1 mol/L PBS 洗 3 次(5 min/次)，5% 山羊血清封闭 15 min，加兔抗鼠 α-肌动蛋白抗体(4 ℃过夜)孵育 20 ~ 24 h 后，PBS 洗 3 次(5 min/次)，加羊抗兔 IgG-FITC 并 37 ℃避光孵育 40 min 后，PBS 洗 3 次(5 min/次)，荧光显微镜下观察并摄片。

1.2.3 实验分组及处理因素 将心肌细胞分为 4 组：超声 + 血卟啉组、超声组、血卟啉组和对照组。避光溶解血卟啉于 pH (7.4) 0.1 mol/L PBS 中，灭菌，调整浓度为 2.5 mg/ml，密闭避光保存于 -20.0 ℃冰箱中。其中超声 + 血卟啉组及血卟啉组加血卟啉时调整终浓度至 20 μg/ml，避光培养 50 min 后，将超声探头置入无菌橡胶套中，紧贴液面放入超声 + 血卟啉组和超声组，以 300 kHz，1.5 W/cm^2 辐照 60 s 后，4 组均换液并继续培养(超声 + 血卟啉组和血卟啉组在处理时均在避光条件下进行操作)。

1.2.4 心肌细胞生长抑制测定 调整细胞数为 2.5×10^5/ml，每孔 1 ml，接种于 6 孔培养板内，每组设 3 个平行孔。培养 60 h 后进行干预并继续培养 24 h。于实验结束前 4 h 加入 MTT 120 μl，继续培养 4 h 后弃上清，每孔加入 DMSO 1.5 ml，振荡 10 min 后转移至 24 孔板中，用酶标仪检测各孔的光密度值(波长为 490 ~ 630 nm)，计算抑制率。

抑制率 = [1 - (实验组平均光密度值/对照组平均光密度值)] × 100%

1.2.5 膜连蛋白 V-FITC /PI 双染法检测细胞早期凋亡率 细胞经处理 12 h 后，收集细胞，先用 4 ℃ PBS 洗 2 次，再用 100 μl 结合缓冲液重悬细胞，避光加入 5 μl FITC 标记的膜连蛋白 V 和 10 μl PI，混匀后避光孵育 15 min，反应管中加入 400 μl PBS，立即上流式细胞仪检测。

1.2.6 免疫荧光法比较 Fas/FasL 蛋白表达情况 细胞培养至第 4 天，进行处理 4 h 后，PBS 洗 2 次(3 min/次)，4% 多聚甲醛固定 20 min，0.1 mol/L PBS 洗 3 次(5 min/次)，5% 山羊血清封闭 15 min 后，细胞片分别加兔抗鼠 Fas 蛋白和 FasL 蛋白抗体孵育 20 ~ 24 h(4 ℃过夜)，PBS 洗 3 次(5 min/次)，加山羊抗兔 IgG-TRITC 并 37.0 ℃避光孵育 60 min 后，PBS 洗 3 次(5 min/次)，荧光显微镜下观察并摄片。

1.3 统计学分析

数据经 SPSS 16.0 统计软件处理，数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多个样本均数间比较用单因素方差分析，方差分析结果有统计学意义时，进一步做两两比较的 LSD t 检验。

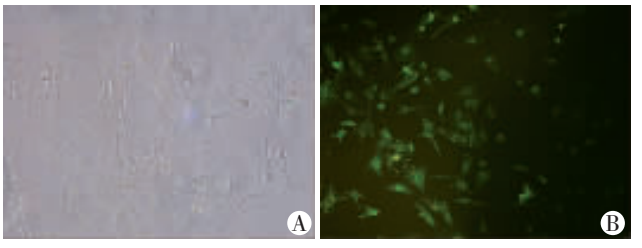
2 结果

2.1 心肌细胞培养及形态学观察

细胞培养至第 4 天，换液后经倒置显微镜观察心肌细胞形态多样，呈杆状、梭形、三角形、不规则形等(图 1A)。部分心肌细胞在贴壁后 24 ~ 48 h 开始出现规律性搏动。

2.2 心肌细胞免疫荧光细胞化学鉴定

90% 以上培养细胞 α-肌动蛋白抗体染色阳性(图 1B)。



A：倒置显微镜观察；B：α-actin 抗体免疫荧光观察

图 1 原代心肌细胞形态学观察及免疫细胞化学检测 (×200)

2.3 各组对 SD 乳鼠心肌细胞增殖的抑制作用

超声 + 血卟啉组对细胞增殖的抑制作用显著大于其他 3 组($P < 0.05$)；血卟啉组与对照组间的差异比较无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 各处理因素处理 24 h 后 MTT 检测光密度值及抑制率 ($n = 3$)

组别	光密度值	抑制率(%)
超声 + 血卟啉组	0.181 0 ± 0.008 0[a]	44.43
超声组	0.211 3 ± 0.007 4[a]	35.12
血卟啉组	0.312 3 ± 0.003 5	4.11
对照组	0.325 7 ± 0.008 6	0.00

a：$P < 0.05$，与其余 3 组比较

2.4　膜连蛋白 V-FITC/PI 双染法检测细胞早期凋亡率

超声+血卟啉组的早期细胞凋亡率最高，与其他各组间的差异具有统计学意义（$P<0.05$）；血卟啉组与对照组间的差异比较无统计学意义（$P>0.05$）。膜连蛋白 V-FITC/PI 染色将细胞分为4种属性，其中左上象限（Annexin V^-/PI^+）为机械损伤细胞；右上象限（Annexin V^+/PI^+）为晚期凋亡细胞和死亡细胞；左下象限（Annexin V^-/PI^-）为正常细胞；右下象限（Annexin V^+/PI^-）为早期凋亡细胞。各组细胞的早期凋亡率分别为：超声+血卟啉组（24.21±2.77）%；超声组（18.48±2.70）%；血卟啉组（11.06±2.03）%；对照组（7.71±0.66）%。超声+血卟啉组的早期细胞凋亡率最高，与其他各组间的差异具有统计学意义（$P<0.05$）；血卟啉组与对照组间的差异比较无统计学意义（$P>0.05$）（图2）。

2.5　免疫荧光法比较 Fas/FasL 蛋白表达情况

超声+血卟啉组 Fas/FasL 蛋白表达显著高于其他3组（$P<0.05$），血卟啉和对照组间的差异无统计学意义（$P>0.05$）（表2，图3，图4）。

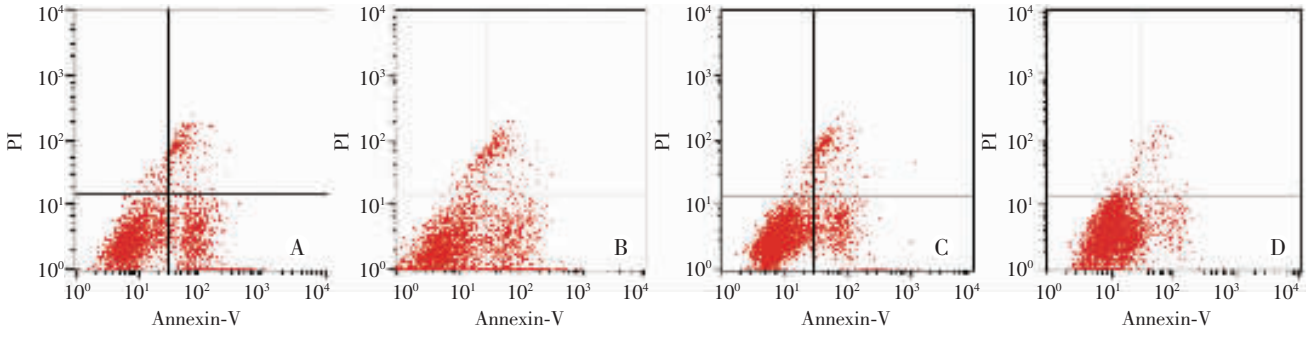
表2　各处理因素处理后 FAS/FASL 蛋白表达比较（$n=5, \bar{x}\pm s$）

组别	FAS 蛋白表达	FASL 蛋白表达
超声+血卟啉组	0.081±0.003[a]	0.080±0.002[a]
超声组	0.061±0.006[a]	0.062±0.004[a]
血卟啉组	0.050±0.004	0.036±0.005
对照组	0.045±0.004	0.034±0.002

a：$P<0.05$，与其余3组比较

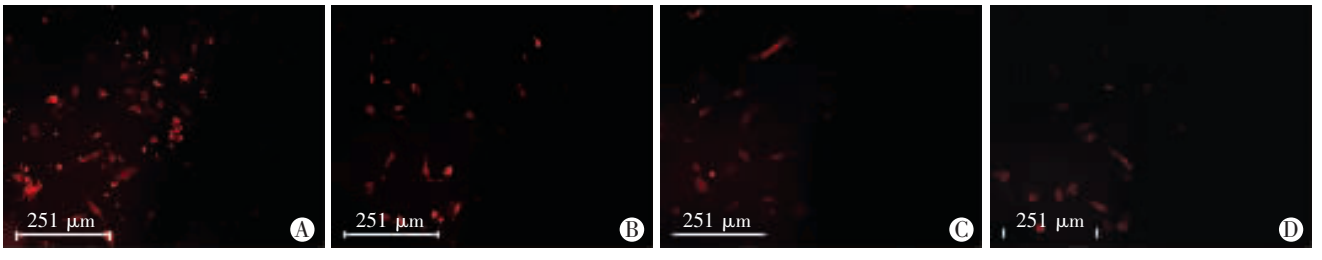
3　讨论

细胞内外的凋亡诱导因素通过各种受体作用于细胞后，形成与细胞有关的信使物质如 Ca^{2+}、cAMP/PKA、神经酰胺、Fas 蛋白/Fas 配体信号等，然后通过胞内的信号转导途径启动凋亡相关基因，在各种凋亡酶类和相关物质作用下，磷脂酰丝氨酸暴露，细胞膜空化，凋亡蛋白酶活化，染色质凝聚，DNA 片段化[6]。超声波对生物组织具有较强的穿透能力，可利用其热效



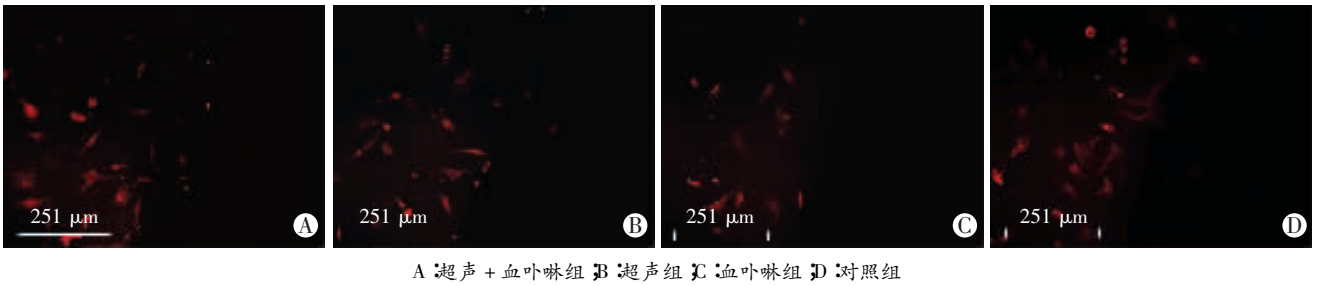
A：超声+血卟啉组　B：超声组　C：血卟啉组　D：对照组

图2　流式细胞仪膜连蛋白 V-FITC/PI 双染法检测各组心肌细胞分类



A：超声+血卟啉组　B：超声组　C：血卟啉组　D：对照组

图3　免疫荧光细胞化学法检测各组心肌细胞内 Fas 蛋白表达



A：超声+血卟啉组　B：超声组　C：血卟啉组　D：对照组

图4　免疫荧光细胞化学法检测各组心肌细胞内 FasL 蛋白表达

应、机械效应、空化效应等物理效应阻抑细胞增、诱导细胞凋亡。超声亦可激活光敏剂等在内的其他特定化学物质产生比单纯超声更加明显的生物学效应[7]。这一现象最早由日本学者 Yumita 等发现，并被定义为声动力学疗法，它是在光动力学疗法基础上发展起来的。光动力学疗法在肿瘤治疗方面得到广泛应用，也有相关文献报道其有杀伤肿瘤作用[8]；声动力学疗法在肿瘤治疗和心肌消融方面等的研究证明 SDT 疗法也具有潜在的应用前景，但其机制还未明确。Yumita 等[9]用超声联合 ATX-S10 干预 Sarcoma 180 细胞实验结果提示活性氧的产生在 SDT 致细胞损害中起着主要的作用；Wang 等[10]用 SDT 处理 S180 细胞的实验表明超声激活血卟啉可能通过 Fas 信号转导途径诱导细胞凋亡；Dai 等[11]用超声结合血卟啉处理神经胶质瘤 C6 细胞实验推测线粒体信号路径可能在 SDT 致细胞凋亡机制中起着重要的作用。

本实验通过 MTT 法测定超声激活血卟啉组致培养心肌细胞的生长抑制率高于单纯超声组（$P<0.05$），血卟啉组和对照组间差异比较无统计学意义（$P>0.05$）；Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞早期凋亡率表明：超声 + 血卟啉组致心肌细胞凋亡效应高于单纯超声组（$P<0.05$），血卟啉组和对照组间差异比较无统计学意义（$P>0.05$），提示 SDT 有明显的致心肌细胞损伤作用。本实验进一步应用免疫荧光细胞化学法测得超声 + 血卟啉组较其他 3 组 Fas/FasL 蛋白表达有明显增高（$P<0.05$），血卟啉组和对照组间差异比较无统计学意义（$P>0.05$），提示超声 + 血卟啉及单纯超声使心肌细胞凋亡增加，而超声 + 血卟啉使心肌细胞凋亡增加更加明显。Fas 蛋白是一种跨膜蛋白受体，属于肿瘤坏死因子受体，FasL 蛋白也属于肿瘤坏死因子家族的Ⅱ型跨膜蛋白；超声激活血卟啉致心肌细胞表面 Fas/FasL 蛋白表达明显增高，Fas 和 Fasl 蛋白结合，通过胞内信号转导途径启动凋亡相关基因，诱导细胞凋亡，这可能是 SDT 有明显的致心肌细胞损伤作用的机制之一。由于声动力学机制复杂，可能与声强、频率、辐照时间及方式等声动力学参数以及声敏剂种类有关，而我们使用低频超声（300 kHz）激活心肌细胞来研究 SDT 的效应及相关机制，这使我们的研究存在一定的局限性。

超声波对组织有较强的穿透能力，高强度聚焦超声能有效破坏靶组织而对超声束所经过的路径和靶区周围正常组织无损伤[12]，具有无侵入性[13]，并且声动力疗法较单纯超声波具有更明显的致细胞凋亡效应。利用这一效应可能为心血管疾病临床治疗提供一种新方法，但目前 SDT 机制未明，声动力学参数有待优化。随着对声动力学机制的深入研究和对声动力学参数的优化，相信在不久的将来，声动力学疗法会在心血管疾病的诊疗方面具有更好的应用前景。

参考文献：

[1] Milowska K. Ultrasound--mechanisms of action and application in sonodynamic therapy[J]. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2007, 61: 338 - 349.

[2] Rosenthal I, Sostaric J Z, Riesz P. Sonodynamic therapy--a review of the synergistic effects of drugs and ultrasound[J]. Ultrason Sonochem, 2004, 11(6): 349 - 363.

[3] Arakawa K, Hagisawa K, Kusano H, *et al*. Sonodynamic therapy decreased neointimal hyperplasia after stenting in the rabbit iliac artery [J]. Circulation, 2002, 105(2): 149 - 151.

[4] 李文章，黄晶，刘地川，等. 超声激活血卟啉对活体兔心肌细胞凋亡和心功能影响的实验研究[J]. 中国超声医学杂志，2009，25(4)：344 - 347.

[5] 徐叔云. 药理实验方法学[M]. 第 3 版. 北京：人民卫生出版社，2002：567 - 569.

[6] Assuncao-Guimaraes C, Linden R. Programmed cell deaths. Appotosis and alternative deathstyles [J]. Eur J Biochem, 2004, 271 (9): 1638 - 1650.

[7] Li J H, Song D Y, Xu Y G, *et al*. *In vitro* study of haematoporphyrin monomethyl ether-mediated sonodynamic effects on C6 glioma cells [J]. Neurol Sci, 2008, 29(4): 229 - 235.

[8] 杨镇洲，张云嵩，李梦侠，等. 血卟啉衍生物介导的光动力疗法对人肺腺癌细胞杀伤效应的实验研究[J]. 第三军医大学学报，2010，32(5)：494 - 496.

[9] Yumita N, Sakata I, Nakajima S, et al. Ultrasonically induced cell damage and active oxygen generation by 4-formloximeetylidene-3-hydroxyl-2-vinyl-deuterio-porphyny (IX)-6-7-diaspartic acid: on the mechanism of sonodynamic activation [J]. Biochim Biophys Acta, 2003, 1620(1/3): 179 - 184.

[10] Wang X B, Liu Q H, Wang P, *et al*. Enhancement of apoptosis by sonodynamic therapy with protoporphyrin IX in isolate sarcoma 180 cells[J]. Cancer Biother Radiopharm, 2008, 23(2): 238 - 246.

[11] Dai S, Hu S, Wu C. Apoptotic effect of sonodynamic therapy mediated by hematoporphyrin monomethyl ether on C6 glioma cells *in vitro* [J]. Acta Neurochir (Wien), 2009, 151(12): 1655 - 1661.

[12] 霍钢，李九州，郑履平，等. 高强度聚焦超声损伤离体恶性胶质瘤的研究[J]. 第三军医大学学报，2006，28(11)：1229 - 1230.

[13] Martin E, Jeanmonod D, Morel A, *et al*. High-intensity focused ultrasound for noninvasive functional neurosurgery [J]. Ann Neurol, 2009, 66(6): 858 - 861.

（收稿：2010-10-09 修回：2010-11-19）

（编辑 汪勤俭）