基础研究 文章编号：0253-3626(2010)02-0175-04

超声靶向微泡破坏对支持细胞的生物学效应研究

张 波[1]，张唯力[1]，林艳君[1]，王志刚[2]

（1. 重庆医科大学附属第二医院泌尿外科，重庆 400010；2. 重庆医科大学超声影像学研究所，重庆 400010）

【摘 要】目的：探讨超声靶向微泡破坏对体外培养大鼠支持细胞的影响。方法：分离与培养大鼠支持细胞，制作细胞悬液，添加 0.01 ml 微泡造影剂后即行超声辐照，超声辐照时间为 60 s，输出声强为 0.5 W/cm²，频率为 1 MHz，分别取照射后 5 min，2、6、12、24 h 作为分组时间点，在各时间点及进行波形蛋白免疫组化染色、测定细胞超氧化物歧化酶（Superoxide dismutase，SOD）、丙二醛（Malondialdehyde，MDA）以及细胞计数。结果：超声联合微泡可以降低支持细胞内波形蛋白的表达，引起细胞内早期 MDA 含量可逆性升高，SOD 活性下降，后期（24 h）MDA 含量恢复正常，SOD 活性升高，而支持细胞的存活不受影响。结论：超声靶向微泡破坏支持细胞的结构和功能引起可逆性损伤，通过降低支持细胞紧密连接蛋白的表达从而开放血睾丸屏障，继而影响生精细胞功能，为男性避孕的研究提供新的思路。

【关键词】超声微泡；波形蛋；SOD；MDA；男性避孕

【中国图书分类法分类号】R697.33 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-06-10

Biological effect of ultrasound-mediated microbubble destruction on sertoli cells

ZHANG bo, et al

(*Department of Urology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of ultrasound-mediated microbubble destruction on the Sertoli cells of rat testis in vitro. *Methods*: Sertoli cells were isolated and cultured from SD rat testis. After ultrasound contrast agent was added into cell suspension, ultrasound was performed for 60 s at the frequency of 1 MHz, and the intensity of 0.5 W/cm2. At the point of 5 min, 2, 6, 12, and 24 h after ultrasound performed, the expression of vimentin was detected by immunohistochemical staining, SOD, MDA in cell were detected and the cells were counted. *Results*: Ultrasound-mediated microbubble destruction decreased the expression of vimentin, increased MDA and decreased SOD at earlier time, but at later time (24 h), MDA became normal, SOD increased and had no effect on Sertoli cells' survival. *Conclusion*: Ultrasound-mediated microbubble destruction can cause damage on structure and function of Sertoli cells reversibly, which can provide a new method for the study of male contraception.

【Key words】Ultrasound-mediated microbubble; Vimentin; SOD; MDA; Male contraception

由于精子发生过程很复杂，研发新的、安全有效而且可逆的男性避孕药一直进展缓慢。支持细胞间和支持细胞与生精细胞间的连接及连接自身表达的相关蛋白等在形成血睾屏障、创造稳定的生精内环境及为生精细胞提供营养、激素和形态的支持等方面，扮演着重要的作用。目前避孕研究的热点之一是干扰支持细胞之间或支持细胞与生精细胞间的紧密连接，诱发未成熟生精细胞释放，干扰精子成熟过程而不影响精原细胞，从而达到可逆避孕的目的。因此，通过干预支持细胞间紧密连接蛋白的表达能够为男性避孕研究提供新的思路，既往研究证实超声破坏微泡造影剂具有增加细胞膜通透性，诱发细胞损伤[1]，破坏细胞间紧密连接等生物效应[2]。本实验以体外培养的支持细胞为实验对象，通过研究超声联合微泡对支持细胞紧密连接相关蛋白表达的影响和细胞代谢水平的改变，寻找研究男性避孕新的思路和方法，为研发新的、安全有效而且可逆的男性避孕药提供参考。

作者介绍：张 波（1980- ），男，硕士，

研究方向：前列腺疾病与男科疾病。

通讯作者：张唯力，男，教授，E-mail：66zwl@sina.com。

基金项目：重庆市卫生局医学科研项目资助（2008-2-222）

1 材料与方法

1.1 材料

脂质体超声微泡由重庆医科大学超声影像学研究所提供，其外壳为磷脂成分，内充全氟丙烷气体（C_3F_8），所制备出的微泡的粒径（2.19 ± 0.74）μm、表面电位（-15.72 ± 0.94）mV 及浓度（$3.28 \times 10^9 \pm 0.25 \times 10^9$）个 /ml。光镜下可见微泡粒径分布均匀，分散度好，微泡储存于 -20℃冰箱内。微泡造影剂破坏采用由该研究所自行研制的 GCZZ 型超声基因转染治

疗仪。超声波发射频率为 1 MHz，作用时间为间歇性，作用 5 s，间歇 5 s。实验动物为 16～22 日龄 SPF 级雄性 SD 大鼠，体重 100～120 g，由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 支持细胞的分离与培养 大鼠睾丸支持细胞原代培养，参照 Braghiroli L[3]的方法，略有改进。选用 16～22 日龄的 SD 雄性大鼠，颈椎脱臼法把大鼠处死，无菌操作取出睾丸，剥除睾丸被膜，眼科剪将组织剪碎成 1～2 mm^3 大小的碎块，加入 0.25%的胰蛋白酶孵箱中消化 30～60 min，见粘稠后终止，再加入 0.05% V 型胶原酶孵箱中消化 30～60 min。筛网过滤后加入培养液（DMEM/F12、L- 谷氨酰胺 3 mg/ml、20%胎牛血清、青霉素 100 U/ml、链霉素 100 U/ml），制成单细胞悬液，将细胞悬液接种在培养瓶（5 ml 细胞悬液 /100 ml 培养瓶），37℃，5%CO_2 孵箱中培养；培养 24 h 后，加入少量浓度为 20 mmol/L Tris-HCl 处理溶解生精细胞 3 min，再加入含血清的 DMEM/F12 培养基 5 ml/100 ml 培养瓶，备用。用含 10%胎牛血清培养液制作细胞悬液并培养，细胞生长达 80%融合度时消化传代重新制作细胞悬液，加入 24 孔培养板内，调整细胞数 1.5×10^5 个细胞 / 孔。行免疫组化检测的培养孔内事先置入无菌玻片。

1.2.2 实验方法和分组 将上述细胞悬液置入 37℃，5%CO_2 孵箱中培养 24 h 后即移往超声照射场进行辐照，每孔添加 0.01 ml 微泡造影剂，超声辐照时间为 60 s，输出声强为 0.5 W/cm^2，辐照完毕后，将细胞再移入培养箱再培养，分别取照射后 5 min，2、6、12、24 h 作为分组时间点，在各时间点及进行波形蛋白免疫组化染色、测定细胞 SOD，MDA 以及细胞计数。单纯超声辐照和空白对照作为对照组。每组设 3 个复孔，实验重复 3 次。免疫组化方法为：在各时间点上，将培养细胞予 PBS 洗 3 次，用 95%乙醇固定 20 min，取出细胞爬片。波形蛋白滴加小鼠抗大鼠一抗（1:300），除无需抗原修复外，其余步骤同组织切片免疫组化。不同时相点 MDA 及 SOD 的检测方法为：去除原培养液，用 PBS 洗 2 遍，每孔加入 0.1 mol/l PBS，0.05 mmol/l EDTA（pH 8.0）1 ml，再加入 1%TritonX 100 50 μl，将 24 孔培养板置振荡器振荡 1 min 使细胞溶解，于 4℃离心 1 h，取上清液按试剂盒说明书测定 MDA 含量、SOD 活性。计算方法根据标准品 OD 值绘制标准曲线，从标准曲线上查出待检标本中 MDA 含量及 SOD 活性。细胞计数方法为：滴加数滴胰酶消化 1 min，加入 0.4%台盼蓝染液在倒置显微镜下计数约 200 个细胞，计数存活细胞。

1.3 统计学处理

平均光密度值以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，数据采用 SPSS13.0 统计软件进行单因素方差分析，$P\leq0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 波形蛋白表达及图像分析

波形蛋白反应产物位于细胞质。对照组，支持细胞波形蛋白阳性产物密集环绕于细胞核的周围，形成一层网状结构，少数可见棕黄色阳性产物贯穿细胞核。超声联合微泡处理后 5 min 可见反应产物表达比对照组明显减弱，并可见阳性产物排列紊乱，局部区域丝网状阳性产物可出现断裂、溶解。但随着作用后时间的延长，波形蛋白的表达量逐渐恢复（图 1、2、3、4、5、6）。各组波形蛋白阳性产物表达的平均光密度值变化及分析详见表 1。

2.2 各组细胞 SOD、MDA 值比较

超声 + 微泡处理后 5 min 即可出现 MDA 含量升高，与对照组比较，具有显著性差异（$P<0.05$），但处理后 24 h，MDA 含量与对照组比较无统计学差异（$P>0.05$），单纯超声处理组与对照组无统计学差异，而 SOD 活性的变化为开始有降低，随着时间延长，SOD 活性会在 6 h 后逐渐升高。不见时间点

表 1 超声靶向微泡破坏对原代培养支持细胞波形蛋白表达的影响（$\bar{x}\pm s$, $n=9$）

组别	波形蛋白
空白对照	0.949 ± 0.017
单纯超声	0.937 ± 0.019#
超声 + 微泡（5 min）	0.141 ± 0.009*
超声 + 微泡（2 h）	0.149 ± 0.006*
超声 + 微泡（6 h）	0.218 ± 0.007*
超声 + 微泡（12 h）	0.761 ± 0.012*
超声 + 微泡（24 h）	0.847 ± 0.011*

注：与空白对照组比较，#$P>0.05$，*$P<0.05$

表 2 不同时间点各组 MDA，SOD 表达的比较（$\bar{x}\pm s$, $n=9$）

组别	MDA(nmol/mg)	SOD(U/mg)
空白对照	3.05 ± 0.30	16.75 ± 0.29
单纯超声	3.11 ± 0.23#	15.14 ± 0.57#
超声 + 微泡（5 min）	9.15 ± 0.17*	11.37 ± 0.48*
超声 + 微泡（2 h）	13.25 ± 0.56*	12.54 ± 0.36*
超声 + 微泡（6 h）	14.05 ± 0.28*	13.79 ± 0.62*
超声 + 微泡（12 h）	9.47 ± 0.12*	14.33 ± 0.63*
超声 + 微泡（24 h）	3.75 ± 0.48#	16.02 ± 0.33#

注：与空白对照组比较，#$P>0.05$，*$P<0.05$

表 3 不同时间点细胞存活数比较($\bar{x} \pm s$,n=9)

组别	24 h	48 h
空白对照	190.05 ± 4.3	185.3 ± 4.1
单纯超声	188.11 ± 5.1#	187. 4 ± 3.5#
超声 + 微泡	189.11 ± 2.2#	183.1 ± 4.5#

注:与空白对照组比较,# P>0.05



图 1 对照组原代培养支持细胞波形蛋白免疫组化染色,矩形图为局部放大像 大图(免疫组化 × 200)矩形图(免疫组化 × 400)



图 2 超声 + 微泡处理支持细胞后 5 min 支持细胞波形蛋白免疫组化染色,矩形图为局部放大像 大图(免疫组化 × 200)矩形图(免疫组化 × 400)



图 3 超声 + 微泡处理支持细胞后 2 h 支持细胞波形蛋白免疫组化染色,矩形图为局部放大像 大图(免疫组化 × 200)矩形图(免疫组化 × 400)



图 4 超声 + 微泡处理支持细胞后 6 h 支持细胞波形蛋白免疫组化染色,矩形图为局部放大像 大图(免疫组化 × 200)矩形图(免疫组化 × 400)



图 5 超声 + 微泡处理支持细胞后 12 h 支持细胞波形蛋白免疫组化染色,矩形图为局部放大像 大图(免疫组化 × 200)矩形图(免疫组化 × 400)



图 6 超声 + 微泡处理支持细胞后 24 h 支持细胞波形蛋白免疫组化染色,矩形图为局部放大像 大图(免疫组化 × 200)矩形图(免疫组化 × 400)

MDA,SOD 比较见表 2。

2.3 不同时间点细胞存活数比较

不同时间点细胞存活数比较见表 3。

3 讨 论

支持细胞是生精上皮中唯一与生精细胞相接触的细胞，除对生精细胞起支持和营养作用外，还能分泌多种物质,这些物质在精子发生过程中起着重要的调控作用。另外支持相邻细胞形成的紧密连接构成血睾屏障,可阻止血液中很多有害物质进入生精小管以保护减数分裂后生精细胞不受外来毒物的侵袭[4]。精子的发生是在支持细胞调节下生精细胞程序分化的结果,任何影响支持细胞活性或功能的因素势必对精子发生产生影响。因此目前男性避孕研究热点之一是抑制

精子发生,通过干扰支持细胞之间或支持细胞与生精细胞间的紧密连接为靶点[5]。而支持细胞的骨架蛋白,在形成血睾屏障,创造稳定的生精内环境及为生精细胞提供营养、激素和形状的支持等方面,扮演着重要的作用。Aumuller 等[6]研究证实细胞骨架蛋白的分布对维持支持细胞一生精细胞联系的完整性有重要作用;Nieminen 等研究认为, 波形蛋白对细胞间的连接、跨膜转运及血睾丸屏障的渗透功能有重要作用[7]。如果波形蛋白丢失,将进一步导致相关细胞黏附分子基因表达的缺失。因此,任何影响细胞骨架蛋白表达及分布的因素会影响支特细胞的功能,进而干扰生精细胞的成熟。研究表明, 波形蛋白是支持细胞骨架蛋白中较为重要的一种蛋白,具有"锚定"支持细胞的作用,可能直接或间接的参与调节血睾屏障[8],促进支持细胞 - 生精细胞间的物质和信息交换,精子释放,以及支持细胞其它功能的发挥[9]。本研究结果发现,超声联合微泡可降低大鼠睾丸支持细胞波形蛋白表达,波形蛋白的表达随着超声作用时间延长,其表达强度呈逐渐下降趋势,说明波形蛋白是超声联合微泡作用的靶蛋白。由于波形蛋白与支持细胞的紧密连接密切相关,因此,我们的研究提示超声联合微泡可以可逆性开放血睾丸屏障,从而可能影响睾丸生精上皮的功能。

研究已经证实,微泡联合超声的生物学效应的产生同时会带来细胞或组织的损伤[10]。本研究中我们测定 MDA 及 SOD,自由基反应的稳定产物为 MDA,因此通过测定 MDA 含量来表明实验中是否发生了自由基的升高。需氧细胞在生理代谢过程中能产生活性氧类物质,但同时组织中也存在抗氧化防御系统, 这些活性氧类物质很快被代谢为无害的终末产物,使自由基的生成与清除达到相对的动态平衡。但如果自由基生成过多,超过防御能力,或者机体防御系统有障碍,平衡状态就会被破坏,导致自由基的大量积累,从而引起细胞损伤。抗自由基的主要酶是 SOD,SOD 能特异性清除超氧阴离子,保护组织免受氧自由基的损害。因此测定 MDA 的含量可以反映机体内脂质过氧化的程度,间接反映出自由基对组织细胞的损伤程度;SOD 是自由基清除剂,测定 SOD 的含量可以反映自由基的清除能力。本研究结果显示:超声作用后 5 min 即可引起细胞内 MDA 含量显著升高, 随着超声作用时间的延长,MDA 含量逐渐升高,6 h 时 MDA 含量达到高峰,12 h 时出现下降,超声作用后 24 h,细胞 MDA 含量降低,与对照组无差异,而 SOD 活性在超声作用后 5 min,2、6、12 h 均较对照组低,作用后 24 hSOD 活性与对照组活性无统计学差异,结果提示超声联合微泡对细胞造成的急性损伤为可逆的,与文献报道的超声破坏微泡引起上皮细胞可逆性"声穿孔"结果类似[11],进一步观察了超声作用后 24、48 h 的细胞存活数,结果发现超声作用后与对照组并无差异,结果提示超声破坏微泡对支持细胞造成的生物学效应不会引起支持细胞的死亡,间接提示上述的生物学效应是可逆的。

本研究通过超声辐照微泡破坏对体外培养支持细胞的生物学效应的观察,发现超声联合微泡可以降低支持细胞内波形蛋白的表达, 引起细胞内早期 MDA 含量可逆性升高,SOD 活性下降,后期(24 h)MDA 含量恢复正常,SOD 活性升高,而支持细胞的存活不受影响, 因此本研究结果提示超声联合微泡能够干预支持细胞间的紧密连接蛋白的表达,预示了超声联合微泡能够为男性避孕的研究提供新的思路和方法。

参 考 文 献

[1] 冉海涛,任 红,王志刚,等.超声波空化效应对体外培养细胞细胞膜作用的实验研究[J].中华超声影像学杂志,2003,12(8):499-501.

[2] 张 震,夏春意,刘云会,等.低频超声选择性开放血肿瘤屏障的实验性研究[J]. 中国超声医学杂志,2008,24(7):580-583.

[3] Braghiroli L,Silvestrini B,Sorrentino C,et al. Regulation of α2-Macroglobulin Expression in Rat Sertoli Cells and Hepatocytes by Germ Cells In Vitro[J]. Biol Reprod,1998, 59(1): 111-123.

[4] Yan H H,Mruk D D,Cheng C Y,et al.Junction restructuring and spermatogenesis: the biology, regulation, and implication in male contraceptive development[J].Curr Top Dev Biol,2008,80(4):57-92.

[5] Page ST,Amory JK,Bremner WJ,et al.Advances in male contraception[J].Endocr Rev, 2008,29(4):465-493.

[6] Aum ü ller G,Renneberq H,Schiemann PJ,et al. The role of apocrine released proteins in the post-testicular regulation of human sperm function.[J]. Adv Exp Med Biol,1997,4(24):193-219.

[7] Nieminen M,Henttinen T,Merinen M,et al.Vimentin function in lymphocyte adhesion and transcellular migration[J].Nat Cell Biol,2006,8(2):156-162.

[8] Myers M,Ebling FJ,Nwagwu M,et al.Atypical development of Sertoli cells and impairment of spermatogenesis in the hypogonadal (hpg) mouse [J]. J Anat,2005,207(6):797-811.

[9] Lui WY,Lee WM,Cheng CY,et al. Sertoli-Germ Cell Adherens Junction Dynamics in the Testis Are Regulated by RhoB GTPase via the ROCK/LIMK Signaling Pathway[J].Biol Reprod,2003,68(6):2189-2206.

[10] Ferrara K, Ultrasound microbubble contrast agents: fundamentals and application to gene and drug delivery[J].Annu Rev Biomed Eng, 2007,9(5):415-447.

[11] Tran TA, Roger S, Le Guennec JY,et al. Effect of ultrasound-activated microbubbles on the cell electrophysiological properties[J].Ultrasound Med Biol,2007,33(1):158-163.

(责任编辑:关蕴良)