维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2005)05－0636－04

超声辐照对血管平滑肌细胞增殖和凋亡的影响

张俊霞，黄 晶，王 新，唐艺加，唐海林，王志刚

(重庆医科大学附属第二医院心内科，重庆 400010)

【摘 要】目的：观察超声波辐照对培养的血管平滑肌细胞(VSMCs)增殖和凋亡的影响，筛选防止介入治疗后血管再狭窄的辐照参数，并探讨其机理。方法：单声源压电陶瓷超声辐照系统声强连续可调，台盼蓝排斥实验分析辐照后即刻细胞存活率；MTT 比色法描述辐照后 5 天 VSMCs 的生长动力学变化；BrdU 掺入法检测辐照对 VSMCs S 期 DNA 复制的影响；ELISA 法检测辐照后 VSMCs 凋亡情况。结果：1. 超声辐照对培养的 VSMCs 有直接杀伤作用，该作用随辐照强度和辐照时间的增加而增加，相同辐照强度和时间下，低频超声该作用更显著。2. 超声辐照组较对照组 VSMCs 生长曲线平缓，0.705MHz 组以 0.5W/cm^2，5min 辐照最为明显。3. BrdU 掺入法测定 S 期细胞增殖发现，0.705MHz，0.5W/cm^2，5min 辐照组 BrdU% 低于对照组(40.5%±6.8% vs 55.8%±3.3%，$P<0.05$)。4. 0.705MHz，0.5W/cm^2，5min 辐照的凋亡富积因子与阳性对照相比为 1.851±0.087 vs 1.924±0.074，$P=0.836$。结论：0.705MHz，0.5W/cm^2，5min 超声辐照在无明显杀伤细胞的情况下诱导培养的 VSMCs 凋亡，阻止 VSMCs S 期 DNA 复制，提示 USE 是一种潜在的治疗介入治疗后血管再狭窄的手段。

【关键词】血管平滑肌细胞；超声；增殖；凋亡

【中国图书分类法分类号】R45 【文献标识码】A 【收稿日期】2004－12－14

Proliferation inhibition and apoptosis induction of cultured vascular smooth muscle cells after ultrasound exposure

ZHANG Junxia, et al

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

【Abstract】*Objective*: To observe the effects of ultrasound exposure (USE) on proliferation and apotosis of vuscalur smooth muscle cells (VSMCs) and to screen out the optimum parameters of USE and (to) discuss its mechanism. *Methods*: Ultrasound device was made of mono－source of piezoelectric ceramics. Guided by the result of Trypan Blue cell count, the optimum exposure dosage was determined by MTT cell growth curve in 5 days. BrdU incorporation was used to show changes of S phase DNA synthesis after USE. Apoptosis was detected using ELISA 4 hours later after USE. *Results*: USE had direct cytotoxic effect on cultured VSMCs. The effect was intensified as the duration or intensity increased. At the same duration and intensity level, the effect was stronger in lower frequency group. Growth curves in 5 days were flattened in USE groups especially in 0.705MHz, 0.5w/cm^2, 5min exposure. BrdU% results indicated that with 0.705MHz, 0.5W/cm^2, 5min USE, BrdU% against control was 40.5±6.8% vs 55.8±3.3%, $P<0.05$. Cell Death Detection ELISA assay showed apoptosis enrichment factor in 0.705MHz, 0.5W/cm^2, 5min group comparing with positive control was 1.851±0.087 vs 1.924±0.074, $P=0.836$. *Conclusion*: After 0.705MHz, 0.5W/cm^2, 5min USE, VSMCs apoptosis was induced and S phase DNA synthesis decreased without obvious immediate cell death, which suggests USE had the potential as an anti－restenosis therapy.

【Key words】Vascular smooth muscle cells; Ultrasound; Proliferation; Apoptosis

血管再狭窄是影响当前介入治疗疗效的主要临床问题，VSMCs 增殖是其主要病理机制。超声波作为一种非电离能量形式，其研究鼻祖 Dognon[1] 曾经说过，象超声这样对惰性物质具有机械，热力学和化学三重效应的 物理因素不可能对生命体系没有显著的作用。本研究观察较低强度超声辐照对培养的 VSMCs 增殖和凋亡的影响，探讨超声波是否可能成为一种防止血管再狭窄的干预手段。

作者介绍：张俊霞(1977－)，硕士，住院医师，主要研究方向：介入心脏病学。

基金项目：国家自然科学基金(30040030)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1 材料与方法

血管平滑肌细胞(VSMCs)购于全军呼吸内科研究所。超声辐照系统由重庆医科大学与信息产业部第 26 所共同研制。

1.1 辐照后即刻细胞存活率

频率分别为 0.705MHz, 2.17MHz, 5.70MHz 的超声探头,发放强度分别为 0.5w/cm^2, 1.0 w/cm^2, 2.0w/cm^2 的超声波。第一单元实验的辐照时间为 2min。第二单元实验根据存活率将辐照时间从 2min 不断向两端调整,尽量获得不引起细胞即刻大量死亡的辐照参数。

1.2 辐照后 VSMCs 生长曲线

以 VSMCs 活细胞数 2×10^3/孔接种,按 MTT 法绘制生长曲线。

1.3 辐照对 S 期 DNA 合成的影响

细胞接种后 72h, 加入 BrdU(终浓度为 10μmol/L)培养 8h,余步骤按 SP 免疫组化法进行。

1.4 辐照后 4h 凋亡情况

实验步骤按说明书(美国 Roche 公司 Cell Death Detection ELISA, 96test)进行。"空白对照"为孵育缓冲液,"阴性对照"为未经超声处理的 VSMCs,"阳性对照"为经高张溶液(10mmol/L Tris pH 7.4, 400 mmol/L NaCl, 5mmol/L $CaCl_2$, 10mmol/L $MgCl_2$)37℃孵育 4h 的 VSMCs。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 10.0 软件进行数据分析,Excel 作图,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示;采用方差分析,多个实验组与同一对照组之间比较用 Dunnett t 检验(q'检验); BrdU 免疫染色结果用组间 t 检验,$P<0.05$ 为有显著性差异。

2 结 果

2.1 超声辐照后即刻细胞存活率

2min 辐照时,0.705MHz 组 1.0W/cm^2,2.0W/cm^2 辐照及 2.170MHz 组 2.0W/cm^2 辐照对细胞的活力有影响,详见表 1。

因此在调整辐照时间后的细胞存活率实验中,对细胞活力有影响的参数组合辐照时间缩短至 0.5min,反之,辐照时间延长至 5min,详见表 2。

2.2 MTT 法测定 VSMCs 生长曲线

超声辐照组较对照组 VSMCs 生长曲线平缓,其中 0.705MHz 组以 0.5W/cm^2, 5min 辐照较为明显; 2.17MHz 组以 1.0W/cm^2,5min 较为明显;5.7MHz 组以 2.0W/cm^2,5min 较为明显,详见图 1,2,3。

表 1 2min 辐照后即刻细胞存活率($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

分组	辐照参数	存活率
超声辐照组	0.705 MHZ,0.5 W/cm^2	0.973±0.012
	0.705 MHZ,1.0 W/cm^2	0.873±0.035*
	0.705 MHZ,2.0 W/cm^2	0.420±0.026*
	2.170 MHZ, 0.5 W/cm^2	0.983±0.006
	2.170 MHZ,1.0 W/cm^2	0.980±0.020
	2.170 MHZ,2.0 W/cm^2	0.440±0.036*
	5.700 MHZ,0.5 W/cm^2	0.967±0.035
	5.700 MHZ,1.0 W/cm^2	0.963±0.006
	5.700 MHZ,2.0 W/cm^2	0.963±0.015
对照组	——	0.977±0.025

* $P<0.05$

表 2 调整辐照时间后的细胞存活率($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

分组	辐照参数	存活率
超声辐照组	0.705 MHZ,0.5 W/cm^2,5.0 min	0.977±0.021
	0.705 MHZ,1.0 W/cm^2,2.0 min	0.840±0.017*
	0.705 MHZ,2.0 W/cm^2,0.5min	0.570±0.040*
	2.170 MHZ,0.5 W/cm^2,5.0 min	0.977±0.025
	2.170 MHZ,1.0 W/cm^2,2.0 min	0.860±0.036*
	2.170 MHZ,2.0 W/cm^2,0.5 min	0.583±0.047*
	5.700 MHZ,0.5 W/cm^2,5.0 min	0.993±0.006
	5.700 MHZ,1.0 W/cm^2,5.0 min	0.820±0.085*
	5.700 MHZ,2.0 W/cm^2,5.0 min	0.577±0.021*
对照组	——	0.977±0.006

* $P<0.05$

表 3 ELISA(405nm)检测辐照后细胞凋亡

分 组	O.D实测值$_{(405nm)}$	O.D实测值-空白对照$_{(405nm)}$	富积因子
空白对照	0.054±0.005	—	—
阴性对照	0.130±0.004	0.076±0.004	—
阳性对照	0.198±0.009	0.144±0.006	1.924±0.074
A1*	0.194±0.006	0.140±0.006	1.851±0.087
A2	0.151±0.017	0.097±0.017	1.274±0.224
A3	0.148±0.004	0.094±0.004	1.237±0.058
B1	0.154±0.005	0.100±0.005	1.313±0.071
B2	0.162±0.009	0.108±0.009	1.426±0.124
B3	0.180±0.003	0.126±0.003	1.656±0.035

* $P>0.05$

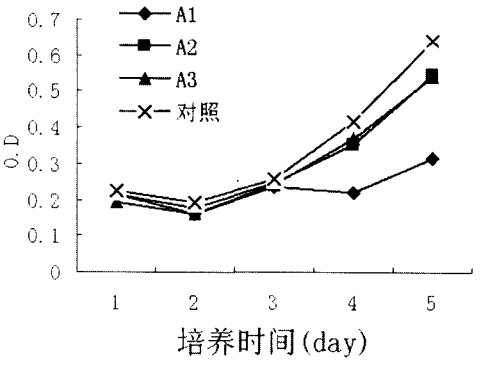


图 1 0.705MHz 超声辐照

维普资讯 http://www.cqvip.com

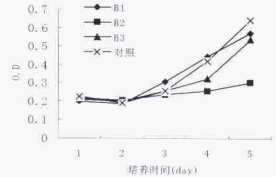


图 2 2.17MHz 超声辐照

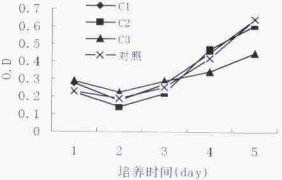


图 3 5.17MHz 超声辐照

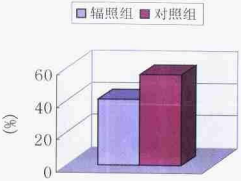


图 4 BrdU%



图 5 对照组 BrdU%(200×)

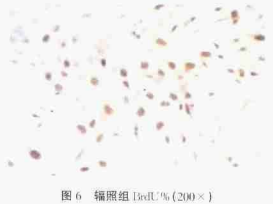


图 6 辐照组 BrdU%(200×)

2.3 BrdU 法检测辐照对 S 期 DNA 合成影响

0.705MHz,0.5W/cm^2,5min 辐照后细胞 S 期 DNA 复制减弱,实验组 BrdU 阳性率为 40.5±6.8%,对照组为 55.8±3.3%,$P<0.05$,详见图 4,5,6。

2.4 细胞凋亡 ELISA 检测不同剂量超声辐照后 4h VSMCs 凋亡情况

根据试剂盒说明,计算出各组的富积因子(实验组 OD 与空白组 OD 之差除以阴性对照组 OD 与空白组 OD 之差),A1 组的富积因子为 1.851±0.087,与阳性对照组 1.924±0.074 相比,$P=0.836>0.05$,差别无显著性,详见表 3。

3 讨 论

血管再狭窄是制约 PCI 术疗效的瓶颈问题,当前仍在进行的有望解决这一问题的实验和临床研究有:针对候选基因的基因治疗,同位素辐照,以及药物支架等。雷帕霉素洗脱支架在局部修复早期持续给药,实验及初期临床观察结果令人鼓舞,但在对其远期效果的观察中发现仍有支架周围(peri-stent)再狭窄的可能[2]。超声作为一种非电离能量形式,在导管室发放不需屏蔽,治疗性超声用于溶解血栓和剥离斑块时对人和动物血管壁无损害,而且可能导致血管舒张,减轻导管置入时血管痉挛。超声有助于药物投递和基因转染,可联合药物治疗。本研究着重观察的超声辐照对 VSMCs 增殖和凋亡的影响,辐照参数选择不当会引起细胞的即刻死亡,而不是本研究感兴趣的凋亡或细胞周期静止,并且细胞即刻死亡可能在活体水平引起血管运动失调和炎症反应,导致血栓形成,反而成为促进细胞增殖的不利因素。本研究首先是通过台盼蓝排斥实验测定超声辐照后即刻细胞的存活率,一方面尽量寻找不引起细胞大量死亡的安全的辐照参数,另一方面保证研

维普资讯 http://www.cqvip.com

究超声辐照远期生物效应时各实验组和对照组的活细胞数相等，而不是处理前活细胞数相等，因为超声辐照后各组的存活率是不同的，平衡各组的活细胞数后才具有可比性。

本实验用 MTT 生长曲线法描述超声辐照后细胞的生长过程，国外有用 MTT 比色法测定超声辐照膀胱移行细胞癌细胞系的报道，发现超声辐照后细胞生长缓慢，生长曲线平坦[3]。本研究发现超声辐照组较对照组 VSMCs 生长曲线平缓，其中 0.705MHz 组以 0.5W/cm^2，5min 辐照较为明显；2.17MHz 组以 1.0W/cm^2，5min 较为明显；5.7MHz 组以 2.0W/cm^2，5min 较为明显，但后两组对应的存活率与对照组相比差别有显著性，是不太安全的，故在后面 BrdU 掺入测 S 期细胞增殖的实验中仅检测了 0.705MHz，0.5W/cm^2，5min 辐照组。

本研究发现 0.705MHz，0.5W/cm^2，5min 辐照组 BrdU 阳性率为 40.5±6.8%，对照组为 55.8±3.3%，$P<0.05$。Fitzgerald[4]曾报道在猪支架植入术后内膜增生模型中，超声治疗组给予 5min，700KHz 的超声辐照后 7 天观察，与对照组相比%BrdU 显著降低(24.1%±7.0 % vs31.2%±3.0% ，$P<0.05$)，28 天观察为 36%±24% vs44%±27%，$P<0.05$。Lawrie 等[5]用时差显微录象(高倍视野/2.4min 摄像 48h)观察超声辐照后 3h 起 VSMCs 有丝分裂情况，发现辐照组(0.4W/cm^2，1MHz，60s)较对照组和热处理组有丝分裂减弱。本实验得到的结果与文献报道基本一致。

凋亡和增殖的动态平衡决定细胞总量的多少。本实验发现 0.705MHz，0.5W/cm^2，5min 辐照的凋亡富积因子与阳性对照之比为 1.851±0.087 vs 1.924±0.074，($P=0.836$)，该剂量的细胞存活率为 0.977±0.021，与对照差别无显著性。并非辐照后细胞即刻存活率越低，发生凋亡的细胞数就越多，这可能与随超声辐照剂量增大，超声波使细胞发生即刻的坏死，而不是给细胞下达凋亡的自杀信号有关。

有关超声诱导细胞凋亡的报道很多，但以往报道的剂量都偏大，Vykhodtseva[6]报道用超声波(频率 1.7MHz，声强 70W/cm^2，辐照时间 30s)辐照兔大脑组织，辐照后 4h 有 9%±7%的脑细胞发生凋亡，48h 后凋亡数量达到 17%±9%，用测温仪同时测定辐照部位的温度变化情况发现组织温度升高达 43℃，认为与超声的热效应有关。也有报道认为声强＜1000W/cm^2，作用时间＜10s 的 HIFU 不会对细胞悬液产生升温效应，其效应机制以空化，机械效应为主[7]。在本实验所研究的超声参数范围内，未测到悬液温度升高，加之该剂量的超声辐照远离空化水平，故认为 VSMCs 凋亡与超声的机械效应有关。另有低强度超声辐照诱导白血病细胞系(K562，HL－60，KG1a，and Nalm－6)凋亡的报道，该实验使用的超声剂量更低，为 1.7MHz，7 mW/mL，20s，不足以产生空化和热效应[8]。本研究表明 0.705MHz，0.5W/cm^2，5min 超声辐照在无明显杀伤细胞的情况下诱导 VSMCs 凋亡，阻止 VSMCs S 期 DNA 复制，其机制可能和超声机械效应有关，提示 USE 是一种潜在的治疗血管增殖性疾病的手段。

参 考 文 献

[1] Dognon, P. Les ultrasonores et leurs applications[J]. Presses Universitaires de France.

[2] Antonio Colombo, Dejan Orlic, Goran Stankovic, et al. Preliminary observations regarding angiographic pattern of restenosis after rapamycin[J]. Eluting stent implantation circulation, 2003; 107(17): 2178－2180.

[3] Kastler EC, Chopin D, Vallancien G. The effects of focused extracorporeal pyrotherapy on a human bladder tumor cell line(647 V)[J]. The Journal of Urology, 1993; 149: 643－647.

[4] Fitzgerald PJ, Takagi A, Moore MP, et al. Intravascular sonotherapy decreases neointimal hyperplasia after stent implantation in swine[J]. Circulation, 2001(10); 103(14): 1828－1831.

[5] Lawrie A, Brisken AF, Francisp SH, et al. Ultrasound enhances reporter gene expression after transfection of vascular cells in vitro[J]. Circulation, 1999; 99: 2617－2620.

[6] Vykhodtseva N, Mcdannold N, Martin H, et al. Apoptosis in ultrasounddd produced threshold lesions in the rabbit brain[J]. Ultrasound Med Biol, 2001; 27(1): 111－117.

[7] Wu G, Yang GY, Qiao TV, et al. Inhibition effects of high intensity focused ultrasound in combination with cisplatin on human bladder cancer cell in vitro[J]. Chinese J Ultrasound Med, 2000; 16(5): 321－324.

[8] Lagneaux L, de Meulenaer EC, Delforge A, et al. Ultrasonic low－energy treatment: a novel approach to induce apoptosis in human leukemic cells[J]. Exp Hematol, 2002; 30(11): 1293－1301.