

超声联合一氧化氮微泡对大鼠心肌组织的生物学效应

沈祥波¹, 魏芹¹, 童嘉毅^{1*}, 刘延红², 丁建东¹

(¹东南大学医学院, 江苏 南京 210009; ²盱眙县中医院, 江苏 盱眙 211700)

[摘要] **目的:**本研究旨在探讨超声联合一氧化氮(NO)微泡的作用对大鼠心肌组织局部基质衍生因子-1(SDF-1)的影响,及其对心肌组织作用的安全性。**方法:**将32只SPF级SD雄性大鼠随机分为4组,每组8只。第1、2、3组分别经尾静脉输入1ml的NO微泡、普通脂质微泡以及PBS,并采用频率为1MHz、强度为1W/cm²的超声辐照大鼠心前区,辐照时间为10min;第4组为空白对照组。4h后每组处死4只大鼠,留取心肌组织进行HE染色,观察局部的炎症反应情况;同时留取血清标本用于检测肌酸激酶(CK),乳酸脱氢酶(LDH)和肌钙蛋白I(TnI)的含量。1周后处死剩余大鼠,取心肌组织进行RT-PCR和Western blot分别检测SDF-1的基因及蛋白相对表达量。**结果:**辐照4h后留取心肌组织行HE染色显示各组均可见少量炎性细胞浸润,组间没有明显差异;血清学指标检测显示,第1组与第2组血清CK和LDH高于第3组和第4组,且差异有统计学意义($P < 0.05$);第1组血清TnI低于第2组,但高于第3组和第4组,且差异有统计学意义($P < 0.05$);辐照1周后留取的心肌组织行RT-PCR和Western blot分析结果均显示第1组SDF-1相对表达量最多,各组间进行两两比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:**超声联合NO微泡辐照大鼠心肌组织,与内含全氟显气体的普通脂质微泡一样,对心肌组织无明显破坏;但能使大鼠心肌组织SDF-1表达增加,其程度高于应用超声联合普通脂质微泡,因此,NO微泡应用于干细胞归巢将优于目前普通脂质微泡。

[关键词] 超声;微泡;一氧化氮;SDF-1;生物学效应

[中图分类号] R329.26

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)02-135-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20140202

Biologic effects of ultrasound-stimulated nitric oxide microbubbles on rat myocardium

Shen Xiangbo¹, Wei Qin¹, Tong Jiayi^{1*}, Liu Yanhong², Ding Jiandong¹

(¹Department Medical College, Southeast University, Nanjing 210009; ²Xuyi traditional Chinese medicine hospital, Xuyi 211700, China)

[Abstract] **Objective:** This study evaluated myocardium damage under the irradiation of ultrasound combined with homemade nitric oxide (NO) microbubbles. Furthermore, we intended to investigate the stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) expression in rat myocardium after the intervention of ultrasound combined with NO microbubbles. **Methods:** Thirty-two rats were divided into four groups randomly. Ultrasound (1MHz, 1W/cm²) was applied to the anterior chest for ten minutes in group one (US+NOMB), group two (US+MB) and group three (US+PBS), group four was set for contrast. Four rats were sacrificed in each group four hours later and myocardium was harvested for HE staining. Serum was also collected for myocardial enzyme testing. One week later, all rats were sacrificed, and RT-PCR and western blotting were performed for testing SDF-1 expression. **Results:** HE staining showed that there were no significant differences in pairwise comparison. Creatine kinase and lactic dehydrogenase were higher in the group one and the group two than those in the group three and group four ($P < 0.05$), but there was no significant difference between the group one and the group two ($P > 0.05$). Troponin I was lower in the group one than that in group two, but higher than those in the group three and group four ($P < 0.05$). RT-PCR and Western blotting demonstrated that the expression of SDF-1 was higher in the group one than that in the group two, group three and group four, and all the P values were less than 0.05. **Conclusion:** NO microbubble, as a novel microbubble, is safe for rat myocardium. Moreover, it can induce a higher SDF-1 expression than common lipidic microbubbles, which shows great potential for stem cells homing.

[Key words] Ultrasound; Microbubble; Nitric oxide; stroma cell-derived factor-1; Biologic effects

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(02): 135-138]

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81070265);教育部高等学校博士学科点专项科研基金(20090092120059)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: jytong88@aliyun.com

近年来,随着对微泡造影剂研究的不断深入,人们已经逐渐认识到一定强度的超声辐照破坏微泡造影剂后能在局部组织产生一系列的生物学效应^[1]。最近多项研究表明^[2-4],超声辐照破坏微泡可促进骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)靶向归巢,增加干细胞移植治疗心肌梗死的效果。超声辐照破坏微泡后导致局部出现炎症反应,使相关的内源性细胞因子分泌增加,SDF-1/CXCR4轴是促进BMSCs向缺血心肌组织归巢最重要的生物轴之一^[5]。NO微泡是在普通微泡的基础上加以改进后的新型微泡造影剂,其核心为NO气体,是人体重要的第二信使。本研究旨在通过对比研究超声辐照NO微泡与普通脂质微泡后大鼠心肌组织局部炎症反应情况及基质衍生因子-1(SDF-1)表达量的变化,阐明应用超声联合新型NO微泡的可行性。

1 材料和方法

1.1 材料

32只SPF级SD雄性大鼠,体重250g左右[东南大学实验动物中心,实验动物使用许可证号为SYXK(苏)2010-0004]。采用2%戊巴比妥钠(0.15 ml/100 g)腹腔注射,麻醉后仰卧位固定于手术台上,同时脱去胸部毛发。

NO微泡与普通脂质微泡(江苏省生物材料与器件重点实验室,NO微泡平均直径3.85 μm,每个微泡NO浓度约为 1.33×10^{-9} mmol);超声波治疗仪BJS2DM-200B,频率为1MHz,强度为0.2~2.0 W/cm²可调。大鼠TnI ELISA试剂盒(F16994,上海西塘生物有限公司)。

1.2 方法

将32只SPF级SD大鼠随机分为4组,每组8只。第1组经尾静脉输入NO微泡造影剂1 ml(微泡浓度为 1×10^8 个/ml);第2组经尾静脉输入普通脂质微泡造影剂1 ml(微泡浓度为 1×10^8 个/ml);第3组经尾静脉输入1 mL PBS;第4组为空白对照组。输入完成后,第1、2、3组均采用频率为1 MHz,强度为1 W/cm²的超声辐照大鼠心前区,辐照时间为10 min,第4组不做任何处理。4 h后每组处死4只大鼠,留取心脏组织进行HE染色,观察局部的炎症反应情况;同时留取血清标本,采用N-乙酰半胱氨酸法测定血清CK含量,丙酮酸法测定血清LDH含量,酶联免疫吸附法测定血清TnI的含量。1周后,处死各组剩余大鼠,留取心肌组织进行RT-PCR

和Western blot分别检测SDF-1的基因及蛋白相对表达量。

1.3 统计学方法

所有定量测量指标均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,经过SPSS18.0软件进行处理,组间比较均采用SNK检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HE染色

辐照4 h后取的大鼠心肌组织标本行HE染色,光镜下各组均可见心肌细胞的排列基本整齐,仅有少量炎性细胞浸润,未见明显红细胞逸出及心肌纤维的损伤(图1)。

2.2 血清学检测指标

辐照4 h后留取大鼠血清标本,通过N-乙酰半胱氨酸法测定各组血清CK含量、丙酮酸法测定各组血清LDH含量以及酶联免疫吸附法测定各组血清TnI的含量。结果显示,血清CK和LDH含量在第1组与第2组高于第3组及第4组,且其差异具有统计学意义($P < 0.05$,表1);第1组与第2组之间、第3组与第4组之间差异不具有统计学意义($P > 0.05$);血清TnI含量第1组低于第2组,但高于第3组和第4组,且差异均具有统计学意义($P < 0.05$,表1)。

2.3 RT-PCR测定SDF-1基因相对表达量

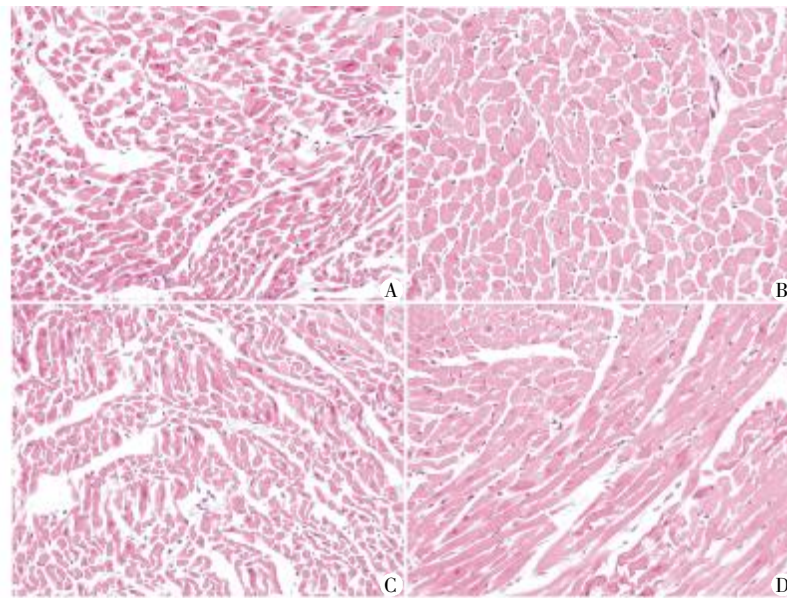
辐照1周后留取心肌组织行RT-PCR,结果显示,各组SDF-1相对表达量为 0.700 ± 0.018 、 0.650 ± 0.026 、 0.230 ± 0.024 、 0.020 ± 0.010 ,第1组分别与第2组、第3组以及第4组相比较,其SDF-1相对表达量最高,且差异均有统计学意义($P < 0.05$,图2)。

2.4 Western blot测定SDF-1蛋白相对表达量

辐照1周后留取心肌组织行Western blot检测,电泳结果显示第1组SDF-1条带表达最强,范围最大(图3)。定量分析结果显示,各组SDF-1相对表达量为 0.890 ± 0.024 、 0.780 ± 0.017 、 0.490 ± 0.024 、 0.220 ± 0.022 ,第1组分别与第2组、第3组以及第4组相比较,其SDF-1/β-actin阳性比值最大,且差异均有统计学意义($P < 0.05$,图3)。

3 讨论

心肌梗死作为临床上的一种常见病和多发病,严重威胁着人类的健康。尽管介入治疗和冠状动脉旁路移植术的开展使心肌梗死患者的生存率有了较大提高,但其远期预后并不是十分理想。近年来,随着分子生物学技术和细胞工程技术的发展以及对骨



超声频率为 1 MHz,强度为 1 W/cm²,A:超声+ NO 微泡组;B:超声+普通脂质微泡组;C:超声+PBS 组;D:空白对照组。各组均可见少量炎细胞浸润,未见红细胞逸出及心肌纤维损伤,各组间没有明显差异($P > 0.05$)。

图 1 超声联合微泡处理后大鼠心肌组织结构图(HE,×200)

Figure 1 The pathological changes in heart tissue under US combined with microbubbles(HE,×200)

表 1 各组血清 CK、LDH 及 TnI 含量比较

Table 1 Comparison of Level of CK, LDH and TnI among four groups

($\bar{x} \pm s$)

组别	CK(U/L)	LDH(U/L)	TnI(pg/ml)
第 1 组(超声+NO 微泡)	1791.0 ± 125.0 ^a	843.0 ± 69.3 ^a	596.676 ± 53.046 ^a
第 2 组(超声+脂质微泡)	1942.0 ± 86.4 ^a	936.0 ± 142.7 ^a	864.983 ± 79.006 ^b
第 3 组(超声+PBS)	1342.0 ± 90.9 ^b	637.0 ± 85.2 ^b	339.581 ± 60.097 ^c
第 4 组(空白对照组)	1193.5 ± 92.1 ^b	564.0 ± 85.6 ^b	274.579 ± 40.738 ^c

两组间字母相同表示组间无统计学差异,两组间字母不同表示组间有统计学差异。

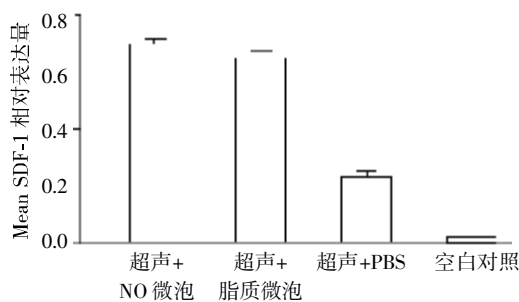


图 2 RT-PCR 检测各组 SDF-1 基因相对表达量

Figure 2 The expression of SDF-1 gene in four groups using PCR

髓间充质干细胞研究的深入,已有越来越多的研究表明通过移植技术将骨髓间充质干细胞植入受损的心肌组织中并使其增殖分化再生,以替代坏死心肌,改善心脏功能,可到达治疗心肌梗死的目的^[6]。

然而,尽管大量研究表明干细胞移植治疗心肌梗死是安全可行的,但其治疗效果一直不够理想,其对心肌梗死后左室射血分数改善仅 5%左右,长期疗效仍存在争议。要想达到治疗效果,前提和关键在于干细胞要归巢到受损心肌,在受损心肌局部存

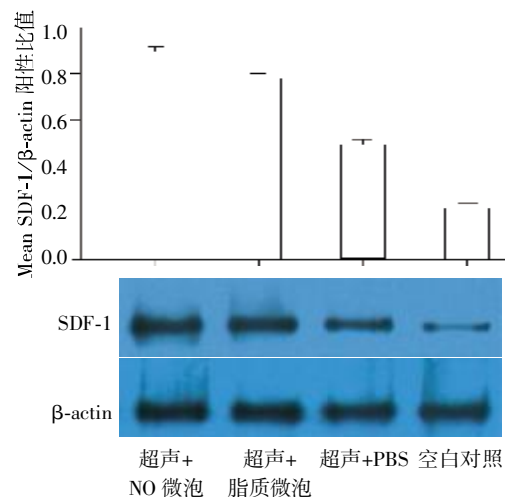


图 3 Western-blot 检测各组 SDF-1 蛋白相对表达量

Figure 3 The using Western-bolt expression of SDF-1 protein in four all groups

活并分化为功能细胞。目前的移植手段效率低下,其中最重要的原因是移植后的干细胞仅很少部分归巢到心脏组织中,大部分经血液循环和淋巴引流分布到了肺、脾和肝器官中,从而影响干细胞的治

疗效果。

近年来,随着超声医学的发展,超声不仅仅用于临床诊断,在治疗方面也显示一定的益处。在超声的作用,微泡造影剂可携带基因、药物、细胞因子等进行靶向传递,从而达到治疗的目的。超声辐照破坏微泡技术应用于干细胞移植时^[7],这一效应可使受辐照的局部组织发生轻微的炎症反应,使相关的内源性细胞因子的分泌增加,从而提高干细胞移植治疗的效率。在这些分泌的内源性细胞因子中,SDF-1/CXCR4 显得尤为重要,它被认为是促进 BMSCs 向缺血心肌组织归巢最重要的生物轴。利用局部释放的 SDF-1 和 BMSCs 表面表达的 CXCR4 相互作用,调节移植细胞的靶向运动。通过调节 SDF-1 和 CXCR4 的表达,调控移植干细胞的迁移,就成为 BMSCs 移植治疗缺血性心脏病的关键。基于以上原因,本实验旨在寻求一种能促进心肌局部组织高效表达 SDF-1 的方法,从而为干细胞移植治疗心肌梗死提供良好的基础条件。

目前,微泡辅助干细胞移植报道中多数研究使用的微泡造影剂为内含全氟化碳气体、外壳为白蛋白或者脂质的普通商品化微泡,对于增加干细胞移植治疗的效果并不显著。而 NO 微泡是一种全新的微泡造影剂,其内含 NO 气体,是人体重要的第二信使,能在局部产生多种生物学效应。本研究所使用的 NO 微泡由江苏省生物材料与器件重点实验室提供,具有较好的稳定性。另外,本课题组前期的体外试验表明,超声辐照破坏 NO 微泡在一定浓度范围内对 BMSCs 的增殖、凋亡以及细胞周期没有显著影响^[8]。而 NO 微泡对心脏微环境的安全性及生物学效应目前还未见报道。根据相关研究,本实验采用频率为 1 MHz,强度为 1 W/cm² 的超声进行体内干预实验。在 HE 染色切片中仅能见到少量的炎症细胞浸润,并未见明显红细胞逸出及心肌纤维损伤,这说明用 1 W/cm² 的超声强度干预对大鼠心肌组织是安全的。通过比较超声微泡组与超声 PBS 组以及空白对照组的 CK、LDH 和 TnI 的含量,发现使用超声联合微泡能引起大鼠血液中 CK、LDH 和 TnI 的升高,这意味着超声联合微泡能引起局部组织发生轻微反应。通过比较超声普通脂质微泡组与超声 NO 微泡组的血清 TnI 的含量,结果发现使用超声 NO 微泡组血清 TnI 的含量较超声普通微泡组低,提示新型 NO 微泡对于大鼠心肌组织的影响弱于传统的普通脂质微泡造影剂;RT-PCR 和 Western blot 测

定大鼠心肌 SDF-1 的相对表达量则进一步证实了在超声联合 NO 微泡组 SDF-1 表达最高,这对于应用 NO 微泡代替普通脂质微泡来介导干细胞的归巢研究提供了强有力的支持。

总之,移植的干细胞数量与心脏功能的改善程度呈线性增长关系^[9]。所以,移植效率的高低成为干细胞移植治疗能否成功的关键之一。通过本实验的研究证明,在合适的干预强度下,超声联合 NO 微泡对于心肌组织是安全的、并能诱导局部心肌组织产生更多的 SDF-1,这对促进干细胞的归巢有至关重要的意义。NO 微泡造影剂作为一种新型的微泡造影剂,在促进干细胞归巢方面,较之目前普通微泡可能具有更大的优势。在下一步实验中,我们将开展 NO 微泡介导内皮祖细胞归巢缺血心肌效应与机制的动物实验,进一步探索 NO 微泡在干细胞领域的应用价值。

[参考文献]

- [1] 凌智瑜,王志刚,冉海涛,等. 超声微泡造影剂对心肌组织毛细血管通透性的影响实验研究[J]. 中国超声医学杂志,2004,20(5):327-330
- [2] 童嘉毅,马根山,冯毅,等. 超声波促骨髓间充质干细胞心肌内归巢的实验研究[J]. 中国心血管病研究,2008,6(10):771-773
- [3] 李金鸽,童嘉毅,冯毅,等. 超声辐照微泡增效骨髓间充质干细胞移植治疗心肌梗死[J]. 中国组织工程与临床康复,2009,13(23):4421-4425
- [4] Ghanem A,Steingen C,Brenig F,et al. Focused ultrasound-induced stimulation of microbubbles augments site-targeted engraftment of mesenchymal stem cells after acute myocardial infarction [J]. J Mol Cell Cardiol, 2009,47(3):411-418
- [5] Santhosh K,Ghadge,Silke Mühlstedt,et al. SDF-1 α as a therapeutic stem cell homing factor in myocardial infarction[J]. Pharmacology Ther,2011,192(1):97-108
- [6] Orlic D,Hill JM,Arai AE. Stem cells for myocardial regeneration[J]. Circ Res,2001,91(12):92-102
- [7] 白园园,修建成,宾建平,等. 超声靶向破坏微泡介导骨髓间充质干细胞移植促进大鼠血管新生[J]. 中国医学影像技术,2009,25(6):942-944
- [8] 卞叶萍,李鹏,童嘉毅,等. 超声联合一氧化氮微泡体外干预骨髓间充质干细胞安全性探讨[J]. 江苏医药,2012,38(5):498-499
- [9] Vincent FM,Segers,Richard TL. Stem-cell therapy for cardiac disease[J]. Nature,2008,451(7181):937-942

[收稿日期] 2013-06-29