

不同参数对超声辐照下细胞膜通透性影响的研究

项飞翔, 吕清, 谢明星, 周翔, 张艳容, 张丽, 王新房

【摘要】 目的:探讨不同参数条件下超声造影剂对正常肝细胞膜通透性的影响。**方法:**将用于诊断的超声辐照含全氟显微泡的 HL-7702 细胞悬液, 频率 2 MHz, 设置不同的辐照时间、机械指数、微泡浓度。辐照后观察大分子荧光物质进入细胞情况以检测“声致孔隙”作用。**结果:**随着辐照时间的延长, MI 的升高, 微泡浓度的增加, “声致孔隙”作用均有增加。**结论:**用于诊断的超声结合全氟显可诱导 HL-7702 细胞悬液发生“声致孔隙”作用, 辐照时间、机械指数、微泡浓度是其重要影响因素。

【关键词】 超声检查; 肝细胞; 细胞膜通透性; 时间

【中图分类号】 R445.1; R329.447 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-0313(2009)06-0671-03

Effects of Different Parameters on Hepatocyte Membrane Permeability under Microbubble Enhanced Ultrasound Exposure

XIANG Fei-xiang, XIE Ming-xing, ZHOU Xiang, et al. Department of Ultrasound, Union Hospital, Huazhong University of Science and Technology, Hubei Provincial Key Laboratory of Molecular Imaging, Wuhan 430022, P. R. China

【Abstract】 Objective: To investigate the effects of different parameters on hepatocyte membrane permeability under microbubble enhanced ultrasound exposure. **Methods:** Suspensions of HL-7702 were exposed to diagnostic ultrasound at frequency of 2MHz, with different exposure time, mechanical index (MI) and microbubble concentration. The uptake of fluorescein isothiocyanatedextran (FD500) by HL-7702 was observed, and the percentages of sonoporation cells were counted. **Results:** Sonoporation was increased with exposure time, MI and microbubble concentration. **Conclusion:** Sonoporation was observed in HL-7702 in the suspension with the addition of perfluoropropane-albumin microsphere exposed by diagnostic ultrasound, and could be affected by exposure time, MI and microbubble concentration.

【Key words】 Ultrasonography; Hepatocytes; Cell membrane permeability; Time

随着疾病的分子生物学机制研究的进展, 基因治疗为疾病提供了一个新的治疗方向, 如何将治疗基因有效地转染到靶细胞仍是目前研究的重点。多项研究表明超声可提高细胞膜的通透性, 从而增加细胞对大分子物质、脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid, DNA) 的摄取^[1,2]。本研究旨在探讨不同参数条件下超声造影剂对正常肝细胞 (HL-7702) 膜通透性的影响。

材料与方法

1. 材料与仪器

特制聚乙烯试管, 长 2.5 cm, 内径 0.9 cm, 容积 1.5 ml。HL-7702 细胞, 来源于正常成人肝细胞的细胞系, 购自武汉大学细胞典藏中心。异硫氰酸荧光素钠标记的右旋糖苷 (fluorescein isothiocyanate-dextran, FD 500) 购自美国 sigma 公司。Annexin V-FITC/PI

凋亡检测试剂盒, 购自晶美生物公司。全氟显, 由解放军第一军医大学南方医院提供, 为冻干人血白蛋白包裹全氟戊烷气体。仪器: 美国 ACUSON 公司 Sequoia 512, 4C1-S 探头, 频率 2~4 MHz。Nikon 80i 荧光显微镜; 激发波长 490 nm, 接收波长 530 nm。FACScalibur 型流式细胞仪, 购自美国 Becton Dickinson 公司, 采用 CellQuest 软件分析处理。

2. 实验方法

HL-7702 细胞培养于 25 cm² 培养瓶, 培养液为 RPMI 1640 (内含 10% 胎中血清、100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素), 在 5% CO₂、37 °C 培养箱内培养。

全氟显配制: 取 3 ml 磷酸盐缓冲液缓缓注入全氟显冻干粉剂中, 轻柔混匀, 静置备用, 用前轻轻振荡混匀。浓度为 1~2×10⁹ 微泡/ml, 微泡直径 2~6 μm。

取对数生长期的 HL-7702 细胞制成单细胞悬液, 取 100 μl 加入等量 0.4% 台盼蓝染色检测细胞活力。将单细胞悬液分加入适量 FD 500 (最终浓度为 0.1 mg/ml), 细胞悬液最终浓度为 1×10⁶/ml。将细胞悬液及不同量全氟显溶液缓慢注入聚乙烯试管内加塞封口, 尽量不留可见空气气泡, 辐照前混匀各管混合液。

作者单位: 430022 武汉, 华中科技大学附属协和医院超声影像科, 湖北省分子影像重点实验室

作者简介: 项飞翔 (1977—), 女, 江西人, 博士, 主治医师, 主要从事超声影像诊断工作。

通讯作者: 吕清, E-mail: unionlq2003@yahoo.com.cn

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30872422)

超声辐照:聚乙烯水槽内注入新鲜制备的蒸馏水。水面没过超声探头及聚乙烯试管。水槽内面围以吸声材料。4C1-S 凸阵探头选择 Abdomen 条件,频率固定于 2 MHz,成像模式为 General,设置 MI 为 1.9。将试管及探头均水平放置于水槽中,水温保持 37 ℃,试管长轴与声束方向垂直,试管中心距探头表面中心 3.5 cm。试管尾端连接马达,使其沿长轴旋转,调节转速为 30 r/m。

实验分组:实验分为 3 部分,第一部分设置不同辐照时间,机械指数(mechanical index, MI)固定于 1.9,全氟显微泡/细胞数比值(bubble to cell ratio, B/C)固定为 100/1(即每管内含全氟显 100 μ l),对照组中同样加入全氟显微泡,置于水槽中,但不启动超声仪器。实验组分为 5 组,1~5 组超声辐照时间分别为 0.5、1、5、10 及 20 min。第二部分设置不同 MI, B/C 为 100/1,辐照时间为 10 min。对照组不进行超声辐照,实验组第 1 至 4 组均在超声场中辐照,其 MI 分别为 0.15、0.61、1.2、1.9。第三部分设置不同微泡浓度,设空白对照组、超声辐照组及不同浓度组。空白对照组不添加全氟显,不进行超声辐照。超声辐照组中不添加全氟显,在超声辐照场中辐照 10 min。不同浓度组根据 B/C 不同分为 1~6 组, B/C 分别为 1、5、10、50、100 及 200 (加入全氟显分别为 1、5、10、50、100 及 200 μ l),均在超声辐照场中辐照 10 min。以上实验均重复 6 次(n=6)。

FD 500 阳性细胞检测:辐照后,将细胞悬液转入离心管中 1000 r/m,离心 5 min,弃去上清液,以 PBS 洗涤 3 次,最后一次保留 100 μ l 作细胞涂片,立即置于荧光显微镜下观察,胞浆内见绿色荧光者为 FD 500 阳性细胞。各取 5 个 200 $\times$ 视野计算。

3. 统计方法

使用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。计量资料采用均数 $\pm$ 标准差表示,组间差异采用单因素方差分析。

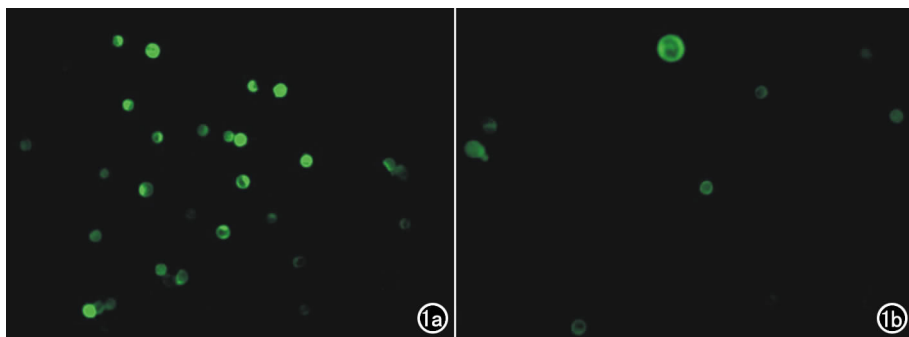


图 1 荧光染色。a) MI=1.9 组,胞浆内绿色荧光染色细胞较密集,荧光显影明亮;
b) MI=0.61 组,胞浆内绿色荧光染色细胞较稀疏(荧光显微镜, $\times 200$)。

结 果

消化后悬浮 HL-7702 细胞呈圆形,台盼蓝试验细胞活性 $>95\%$ 。

FD 500 阳性细胞如图 1,各组 FD500 阳性细胞平均百分数见表 1~3。

表 1 不同辐照时间 FD500 阳性细胞百分比

时间	FD500 阳性
对照组	0.67 $\pm$ 0.47
30s	6.49 $\pm$ 1.78*
1min	6.39 $\pm$ 1.98*
5min	9.45 $\pm$ 2.71*▲
10min	17.1 $\pm$ 2.19*▲
20min	19.35 $\pm$ 2.09*

注:*与对照组比较差异有显著性意义($P<0.05$)。▲与上一组比较差异有显著性意义($P<0.05$)。

表 2 不同 MI FD500 阳性细胞百分比

MI	FD500 阳性
对照组	0.17 $\pm$ 0.28
0.15	5.05 $\pm$ 3.51*
0.61	5.15 $\pm$ 1.48*
1.2	10.65 $\pm$ 1.93*#
1.9	17.13 $\pm$ 2.07*#

注:*与对照组比较,差异有显著性意义($P<0.05$);#其余各组比较,差异有显著性意义($P<0.05$)。

表 3 不同微泡/细胞比值 FD500 阳性细胞百分比

微泡/细胞比值	FD500 阳性
空白对照	0.17 $\pm$ 0.24
超声辐照组	1.34 $\pm$ 0.42
1/1	3.43 $\pm$ 1.16
5/1	5.09 $\pm$ 1.71*☆
10/1	7.87 $\pm$ 3.28*☆
50/1	11.97 $\pm$ 3.75*☆▲
100/1	19.72 $\pm$ 4.81*☆▲
200/1	41.87 $\pm$ 5.03*☆▲

注:☆与空白对照组比较,差异有显著性意义($P<0.05$);*与超声辐照组比较,差异有显著性意义($P<0.05$);▲与上一组比较差异有显著性意义($P<0.05$)。

讨 论

超声造影剂可作为“空化核”增强空化效应的作用并降低超声空化阈值。因此,在诊断级超声辐照下,可出现“声致孔隙”(sonoporation)作用,细胞膜出现可修复性小孔,此时允许大分子物质进入细胞,促进药物及外源基因进入靶细胞。超声造影剂有望成为一种安全、简便、高效、具有一定靶向性的体内基因转染新方法,目前已在细胞实验及动物实验中取得良好的结果^[3,4]。

我国乙型肝炎的发病率高,而

对于乙型肝炎的治疗缺乏有效的方法。如果能将治疗药物或基因有效的转入肝细胞,可为乙型肝炎的治疗带来更为有效的手段^[5]。近年国内外有少量学者研究了超声作用下不同造影剂对于细胞的“声致孔隙”作用,但多局限于肿瘤细胞及生殖细胞,未见对于正常肝细胞的研究。本研究所用 HL-7702 细胞系为来源于正常成人肝细胞的细胞系,保留了不同于肝癌细胞的正常肝细胞的重要特征^[6]。

大分子荧光物质 FD 500 平均分子量约为 580,000,正常情况下不能进入细胞膜完整的细胞。细胞出现小孔时,FD500 可由小孔进入细胞,在胞浆中显示荧光。不少研究以 FD500 作为指示剂研究“声致孔隙”作用^[7]。

本研究结果表明辐照时间、机械指数、微泡数/细胞数均为影响超声“声致孔隙”作用的重要参数。辐照时间仅 30 s 时,也可诱导细胞发生声孔效应。这可能是因为触发声孔效应所需要的时间很短,仅为几个脉冲^[8]。随着辐照时间的延长,发生“声致孔隙”作用的细胞增加。机械指数 MI,是表示潜在空化生物效应的一个指示参数。当 MI 低至 0.15 时“声致孔隙”作用较对照组亦有显著意义;且随着 MI 的升高,声孔效应也随之增加。造影剂微泡增强超声诱导的“声致孔隙”作用也是有浓度依赖的,但在过低浓度(B/C 为 1)时并不引起明显的增强作用,在 $B/C \geq 5$ 时,微泡才表现出明显的增强作用。这可能是因为微泡浓度过低时,微泡与细胞之间距离远,超过了微泡破裂时生物作用的范围^[7]。在 B/C 为 10~200 时,其诱导的声孔效应随着浓度的升高有明显的升高。第三部分研究也表明,单纯的超声辐照对肝细胞膜的通透性无明显影响。

我们的初步研究结果提示:用于诊断的超声结合全氟显可诱导 HL-7702 细胞悬液发生“声致孔隙”作用,有望成为肝脏疾病基因治疗的手段之一。辐照时间、MI、微泡浓度是其重要影响因素,随着辐照时间的延长,MI 的升高,微泡浓度的增加,“声致孔隙”作用均有增加。

参考文献:

- [1] Zarnitsyn VG, Prausnitz MR. Physical Parameters Influencing Optimization of Ultrasound-mediated DNA Transfection[J]. *Ultrasound Med Biol*, 2004, 30(4): 527-538.
- [2] Miller DL, Song J. Tumor Growth Reduction and DNA Transfer by Cavitation-enhanced High-intensity Focused Ultrasound in Vivo[J]. *Ultrasound Med Biol*, 2003, 29(6): 887-893.
- [3] Nie F, Xu HX, Tang Q, et al. Microbubble-enhanced Ultrasound Exposure Improves Gene Transfer in Vascular Endothelial Cells [J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(46): 7508-7513.
- [4] Bekeredian R, Kuecherer HF, Kroll RD, et al. Ultrasound-targeted Microbubble Destruction Augments Protein Delivery into Testes[J]. *Urology*, 2007, 69(2): 386-389.
- [5] Shin D, Kim SI, Kim M, et al. Efficient Inhibition of Hepatitis B Virus Replication by Small Interfering RNAs Targeted to the Viral X Gene in mice[J]. *Virus Res*, 2006, 119(2): 146-153.
- [6] 叶秀珍,朱德厚,沈鼎五. 体外连续培养的成人肝细胞的超显微结构[J]. *实验生物学报*, 1980, 13(4): 361-365.
- [7] Ward M, Wu JR, Chiu JF. Experimental Study of the Effects of Optison Concentration on Sonoporation in Vitro[J]. *Ultrasound Med Biol*, 2000, 26(7): 1169-1175.
- [8] Pan H, Zhou Y, Izadnegahdar O, et al. Study of Sonoporation Dynamics Affected by Ultrasound Duty Cycle[J]. *Ultrasound Med Biol*, 2005, 31(6): 849-856.

(收稿日期:2009-01-21)

第 21 届国际肺癌筛查大会会议通知

“第 21 届国际肺癌筛查大会”定于 2009 年 10 月 23~25 日在中国珠海召开。本次会议由国际早期肺癌行动计划(international early lung cancer action program, I-ELCAP)主办,珠海市科协、中华医学会放射学会心胸学组、珠海市抗癌协会协办,中山大学附属第五医院承办。

I-ELCAP 是由美国 Cornell 大学医学院放射学 Claudia Henschke 教授领导的国际多中心多学科肺癌 CT 筛查研究协作组织,现有 10 多个国家的 58 家医院参加。会议主题是探索与肺癌筛查有关的各种学术问题。本次会议着重于:①肺癌筛查实施过程的诊断和治疗指南;②计算机辅助技术的应用关键;③如何使肺癌筛查效益最大化而降低其潜在危害;④采用新的手术方式或非手术技术治疗早期小肺癌的临床试验的可行性。欢迎国内放射科、胸外科、呼吸科、肿瘤科、病理科、流行病学等方面的专家出席会议,在具有国际水准的学习交流中有所收益,共同促进国内肺癌筛查临床多学科合作研究的开展。大会语言为英语。发放 I 类学分 6 分。会务费提前注册 800 元,现场注册 1000 元,交通住宿费用自理。

联系方式:519000 广东,珠海市梅华东路 52 号 中山大学附属第五医院放射科 柳学国 主任

E-mail: zhliuxug@pub. zhuhai. gd. cn 电话/传真: 0756-2528828