

· 基础研究 ·

超声辐照载紫杉醇微泡对大鼠血管平滑肌细胞凋亡的影响

张萍¹, 高云华^{2*}, 刘平², 刘政², 谭开彬²

(¹重庆医科大学附属第二医院超声科, 重庆 400010; ²第三军医大学新桥医院超声科, 重庆 400037)

【摘要】目的 探讨超声辐照载紫杉醇微泡对大鼠血管平滑肌细胞(VSMCs)凋亡的影响及其作用机制。**方法** 将体外培养的大鼠胸主动脉VSMCs用血小板衍生生长因子-BB刺激后分组如下: 对照组(A组)、超声辐照+微泡组(B组)、超声辐照+载紫杉醇微泡组(C组)、单纯载紫杉醇微泡组(D组)和紫杉醇组(E组)。采用频率1MHz、声强0.3W/cm²的连续波超声辐照VSMCs 120s, 用流式细胞仪、Annexin V/PI染色和免疫细胞化学技术检测各组细胞周期、细胞凋亡以及凋亡相关蛋白表达的变化。**结果** 与A组比较, 各组S期细胞比例均显著降低($P < 0.01$), B组G₀/G₁期细胞比例显著增高($P < 0.01$), D组和E组G₂/M细胞比例显著增高($P < 0.01$), C组G₀/G₁期细胞比例和G₂/M细胞比例均显著增高($P < 0.01$)。与A组比较, B组和C组VSMCs凋亡率显著增高($P < 0.01$), Bax蛋白表达显著上调, 而Bcl-2蛋白表达则显著降低($P < 0.01$)。**结论** 超声辐照载紫杉醇微泡可诱导VSMCs凋亡, 其机制可能是微泡介导的超声空化效应, 致Bax蛋白表达上调及Bcl-2蛋白表达下调。

【关键词】 超声; 载紫杉醇微泡; 肌细胞, 平滑肌; 凋亡

【中图分类号】 R543

【文献标识码】 A

【DOI】 10.3724/SP.J.1264.2013.00113

Effect of paclitaxel-loaded microbubbles triggered with ultrasound irradiation on apoptosis of rat vascular smooth muscle cells

ZHANG Ping¹, GAO Yun-Hua^{2*}, LIU Ping², LIU Zheng², TAN Kai-Bin²

(¹Department of Ultrasonography, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China;

²Department of Ultrasonography, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of paclitaxel-loaded microbubbles (PLM) triggered with ultrasound irradiation on the apoptosis of rat vascular smooth muscle cells (VSMCs) and its mechanism. **Methods** Rat thoracic aortic VSMCs were treated by platelet derived growth factor-BB, and then randomly divided into five groups as follows: control group (group A), microbubbles combined with ultrasound irradiation group (group B), PLM combined with ultrasound irradiation group (group C), PLM treated group (group D), and paclitaxel treated group (group E). VSMCs from groups B and C were exposed to 1 MHz continuous wave ultrasound for 120s at intensity of 0.3W/cm². The cell cycle, apoptotic cells and the expression of Bax and Bcl-2 were detected by flow cytometry, AnnexinV/PI staining and immunocytochemical assay, respectively. **Results** Compared with group A, the number of the cells arrested at S phase was decreased significantly in other groups ($P < 0.01$). The percentage of the cells at G₀/G₁ phase was greatly increased in group B, that of G₂/M phase cells was increased remarkably in group D and E ($P < 0.01$), and those of G₀/G₁ phase cells and G₂/M phase cells were increased significantly in group C ($P < 0.01$). Apoptosis rate was significantly higher in group B and C than in group A ($P < 0.01$), while the expression of Bax was increased, and that of Bcl-2 decreased ($P < 0.01$). **Conclusion** Ultrasound triggered PLM induces rat VSMCs apoptosis, which might be due to upregulation of Bax and downregulation of Bcl-2 induced by microbubbles-mediated ultrasound cavitation.

【Key words】 ultrasound; paclitaxel-loaded microbubbles; vascular smooth muscle cells; apoptosis; rat

This work was supported by the Foundation of Medical Scientific Research of PLA (06MA185) and the Project of Scientific and Technological Research of Chongqing Education Commission (KJ110320).

血管再狭窄 (restenosis, RS) 是影响经皮冠状动脉介入 (percutaneous coronary intervention,

PCI) 治疗后远期疗效的主要问题。血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMCs) 的过度

收稿日期: 2012-12-10; 修回日期: 2012-12-30

基金项目: 全军医药卫生科研基金 (06MA185); 重庆市教委科学技术研究项目 (KJ110320)

通信作者: 高云华, Tel: 023-68755114, E-mail: xqgaoyh@yahoo.com.cn

增殖和PCI术后早期VSMCs凋亡相对不足是RS发生的主要机制。目前临床上采用的RS防治方法,包括血管内放射治疗和药物涂层支架等均不能完全解决这一难题。近年来,有关将超声靶向击破微泡技术引入超声治疗的研究进展十分迅速,利用微泡超声造影剂为载体携带药物,并借助超声空化的能量在靶区击破微泡,实现药物在局部的释放和渗透,提高局部药物浓度,达到靶向治疗的目的,将为临床防治RS开辟一种新型、无创、可重复的超声治疗方法^[1]。本研究在前期实验制备的载紫杉醇脂质微泡(paclitaxel-loaded liposome microbubbles, PLM)基础上,就超声辐照PLM对VSMCs凋亡的影响及机制进行初步研究,为超声辐照载药微泡防治血管RS的临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料与仪器

实验所用细胞为第三军医大学新桥医院超声科实验室原代培养并传代的大鼠胸主动脉VSMCs(第3~6代)。超声造影剂:(1)脂氟显由实验室自制,为包裹全氟丙烷气体的脂质微泡;(2)PLM按照文献[2]的方法制备,包封率为(95.00%±1.22%),载药量为(5.60%±0.11%),Co⁶⁰灭菌处理后待用。血小板衍生生长因子-BB(platelet derived growth factor-BB, PDGF-BB; Sigma公司);紫杉醇标准品(成都福德瑞化工厂);兔抗小鼠Bax单克隆抗体、兔抗小鼠Bcl-2单克隆抗体、免疫组化SP试剂盒(北京中山生物技术有限公司)。FACS calibur型流式细胞仪(美国Becton Dickinson公司);AnnexinV-FITC凋亡检测试剂盒(北京宝赛生物技术有限公司);超声治疗仪(TS-A型,北京天使科技有限公司);频率1MHz,功率范围0~2.2W/cm²,超声探头面积10cm²,分为连续波和脉冲波发射方式。

1.2 实验分组

将对数生长期的VSMCs无血清培养24h,用20μg/L PDGF-BB处理后,随机分为以下5组,每组6个样本。(1)对照组(A组);(2)超声+脂质微泡组(B组);(3)超声+PLM组(C组);(4)PLM组(D组);(5)紫杉醇组(E组)。微泡浓度为1.0×10⁹/L,C,D,E组中紫杉醇的浓度为10nmol/L。

1.3 超声辐照

将VSMCs以1×10⁸/L接种于6孔培养板,培养板置于37℃水浴中,将治疗头固定距离培养板底部

3mm处,功率设定为0.3W/cm²,连续波发射方式,辐照时间120s。其中A,D和E组进行超声假辐照。

1.4 流式细胞仪检测VSMCs细胞周期

各组VSMCs经处理后继续培养24h,然后进行细胞消化、离心,加入预冷95%乙醇(终浓度为70%),冰浴30min后离心,调节细胞密度为(10⁸~10⁹)/L,加入碘化丙啶,室温下避光染色30min,用流式细胞仪分析不同增殖周期细胞所占比例。

1.5 AnnexinV-FITC/PI双标染色检测细胞凋亡

各组VSMCs经处理后继续培养24h,用0.25%胰蛋白酶消化制成1×10⁸/L细胞悬液,离心后将细胞重悬于200μl结合缓冲液中,加入10μl AnnexinV-FITC和5μl碘化丙啶,避光室温反应15min,加入300μl结合缓冲液,用流式细胞仪以激发波长488nm进行检测。

1.6 免疫细胞化学法检测VSMCs中Bax和Bcl-2的表达

将处理好的细胞制成细胞悬液进行细胞爬片,4%多聚甲醛固定30min,用0.3% TritonX-100处理10min后,按SP免疫组化试剂盒操作说明进行免疫细胞化学染色,抗Bax抗体和Bcl-2抗体的工作浓度均为1:100。DAB显色后,苏木素复染,光镜下观察,并用Image pro plus 4.5图像分析软件进行定量分析。

1.7 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用SPSS13.0统计软件,多组均数比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),多样本均数之间两两比较用LSD-*t*检验,多样本率的比较用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组VSMCs细胞周期分布比较

与A组比较,其余各组VSMCs的S期细胞比例均显著降低($P < 0.01$),B组G₀/G₁期细胞比例显著增高($P < 0.01$),D组和E组G₂/M细胞比例显著增高($P < 0.01$),C组G₀/G₁期细胞比例和G₂/M细胞比例均显著增高($P < 0.01$;表1)。

2.2 各组VSMCs凋亡率比较

B组和C组VSMCs凋亡率均显著高于A组($P < 0.01$),但B组和C组之间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);D组和E组细胞凋亡率与A组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$;表2)。

表1 流式细胞仪分析各组VSMCs的细胞周期分布
Table 1 Analysis of VSMCs cell cycle by flow cytometry

(n = 6, %, $\bar{x} \pm s$)

细胞周期	A组	B组	C组	D组	E组
G ₀ /G ₁	54.19 ± 3.49	72.72 ± 3.78**	80.27 ± 3.74**	58.02 ± 5.27	56.27 ± 6.70
S	37.87 ± 5.34	20.36 ± 2.18**	4.17 ± 1.59**	15.94 ± 2.06**	13.08 ± 4.21**
G ₂ /M	8.58 ± 0.86	6.27 ± 0.95	16.33 ± 3.38**	27.16 ± 5.15**	29.32 ± 7.05**

VSMCs: 血管平滑肌细胞; A组: 对照组; B组: 超声+脂质微泡组; C组: 超声+载紫杉醇脂质微泡组; D组: 载紫杉醇脂质微泡组; E组: 紫杉醇组。与A组比较, **P < 0.01

表2 各组VSMCs凋亡率及Bax、Bcl-2蛋白表达的比较
Table 2 Apoptosis rate, expression of Bax and Bcl-2 of VSMCs

(n = 6, $\bar{x} \pm s$)

组别	凋亡率(%)	Bax(OD _{488nm})	Bcl-2(OD _{488nm})	Bax/Bcl-2
A组	2.10 ± 0.39	44.36 ± 4.68	65.62 ± 9.78	0.68 ± 0.09
B组	20.32 ± 3.04**	78.29 ± 10.66**	35.24 ± 2.04**	2.15 ± 0.13**
C组	23.53 ± 2.49**	76.91 ± 14.54**	36.72 ± 5.29**	2.22 ± 0.26**
D组	3.09 ± 0.33	47.43 ± 6.21	68.23 ± 9.16	0.70 ± 0.18
E组	4.16 ± 0.63	52.09 ± 10.42	63.03 ± 11.54	0.75 ± 0.21

VSMCs: 血管平滑肌细胞; A组: 对照组; B组: 超声+脂质微泡组; C组: 超声+载紫杉醇脂质微泡组; D组: 载紫杉醇脂质微泡组; E组: 紫杉醇组。与A组比较, **P < 0.01

2.3 各组VSMCs中Bax和Bcl-2的表达

各组细胞Bax表达比较, B组和C组显著高于A组 (P < 0.01); 但B组和C组之间比较, 差异无统计学意义 (P > 0.05); D组和E组与A组比较, 差异无统计学意义 (P > 0.05)。各组细胞Bcl-2表达比较, B组和C组显著低于A组 (P < 0.01); 但B组和C组之间比较, 差异无统计学意义 (P > 0.05); D组和E组与A组比较, 差异无统计学意义 (P > 0.05; 表2)。

3 讨论

目前PCI术后RS防治的研究热点集中于局部治疗, 主要针对血管损伤后过度修复所致的新生内膜增生。近年来多采用植入抗肿瘤药物洗脱支架 (drug eluting stent, DES), 显著降低了RS的发生率, 但并未完全解决RS的问题。首先, DES的远期疗效有待证实, 有报道DES植入术后出现迟发性支架内RS, 探究其原因, 可能是支架植入后引起持续存在的、程度较重的炎症反应, 在药物释放完、抑制增殖作用消失后, 促使内膜持续增生所致^[3,4]; 此外, 对于不适宜行支架植入术的病变血管, 如何有效防治RS的发生也是一个亟待解决的问题。因此, 寻找一种简便、安全、有效、持久的抑制新生内膜增生的方法就成为防治PCI术后RS的焦点。

超声造影剂药物传递系统作为一种新型、无创、高效、简便易普及的靶向药物传输技术是当今超声治疗学的重要进展, 其优势在于: (1) 可保持各种治疗性物质的活性和稳定性, 避免它们在血液循环中被破坏和降解; (2) 由于超声造影剂对超声波敏感的特点, 在靶区给予超声辐照, 可达到靶向

给药的目的, 增加局部的治疗效果并减少用药剂量; (3) 实时的超声造影图像能够帮助监控释药、治疗过程, 验证药物的活性^[5,6]。将超声造影剂药物传递系统运用于RS局部防治的研究正处于初步探索阶段, Kipshidze等^[7]报道以全氟丁烷微泡超声造影剂作为雷帕霉素的载体, 将其注入猪冠状动脉支架植入模型的体内, 结果发现, 治疗组支架植入段的血管组织有高浓度的雷帕霉素, 而且p27蛋白表达显著高于手术组, 组织形态学分析显示治疗组支架植入段血管内膜增生面积较手术组减少40%, 提示超声造影剂药物传递系统在防治PCI术后的RS中有潜在的应用前景。

紫杉醇是一种有丝分裂抑制剂, 能促进微管聚合并抑制其解聚, 从而形成大量非正常聚合的微管, 使纺锤体失去正常功能, 抑制细胞有丝分裂, 最终细胞停滞在G₂/M期。文献报道, 紫杉醇能诱导多种癌细胞的凋亡, 最初认为紫杉醇对微管系统的作用和将细胞阻滞于G₂/M期是其诱导凋亡的机制。随着研究的不断深入, 发现紫杉醇诱导细胞凋亡是多途径、多种方式的复杂过程, 细胞周期的阻断并不直接诱导凋亡^[8,9]。此外, 不同种类细胞、同一种细胞来源不同种属或不同环境下的细胞对紫杉醇反应性不同, 其原因可能与细胞内在的基因状态如p53、Bcl-2基因家族、c-myc等的表达水平有关, 也与细胞所处的环境如激素、细胞因子等水平有关, 并且其诱导凋亡的作用具有浓度依赖性^[10]。研究表明, 紫杉醇可对VSMCs的迁移和增殖有抑制作用, 从而抑制新生内膜的增生, 可用于介入治疗后RS的防治, 这种效应所需的紫杉醇血药浓度在纳摩尔水平,

大约是抗肿瘤效应所需的血药浓度的百分之一至千分之一^[11]。

我们前期的研究发现,一定能量的超声联合脂质微泡不仅可抑制PDGF-BB所致的VSMCs增殖,还可诱导VSMCs凋亡,并证实微泡介导的超声空化效应是其主要作用机制^[12]。此外,超声辐照载紫杉醇微泡对VSMCs增殖的抑制作用明显强于单用紫杉醇或超声辐照空白微泡,提示超声辐照下载紫杉醇微泡的破裂不仅通过可以产生的空化效应来抑制VSMCs增殖,而且由于空化效应本身可导致细胞膜通透性增加,促使微泡释放出来的紫杉醇更多地进入VSMCs内发挥作用。本研究在前期实验的基础上,观察超声辐照PLM对处于增殖状态的VSMCs凋亡的影响。结果显示,超声辐照PLM和超声辐照空白微泡均可显著增加于VSMCs的凋亡率,而且两组细胞凋亡率差异无统计学意义;而仅用含相同紫杉醇浓度的PLM或紫杉醇溶液作用于VSMCs而不施以超声辐照,虽然G₂/M期的细胞比例显著增高,但细胞凋亡率无显著变化。说明PLM和紫杉醇虽然能将VSMCs阻滞在G₂/M期,但并不能诱导细胞凋亡,其原因可能是紫杉醇浓度较低,不足以致细胞凋亡。由此可见,超声辐照PLM诱导VSMCs凋亡的作用主要是通过微泡介导的超声空化实现的。

细胞凋亡是一个可调节的动态过程,受一系列凋亡相关基因的调控,其中Bcl-2和Bax是一对正负凋亡调节基因。Bcl-2表达上调可特异性抑制细胞凋亡,细胞存在的周期并不影响其作用的发挥;而Bax过度表达则能促进细胞发生凋亡,故Bax/Bcl-2的比值决定细胞是否凋亡。我们的研究发现,超声辐照PLM和超声辐照空白脂质微泡均可使VSMCs的Bcl-2蛋白表达下调和Bax蛋白表达上调,Bax/Bcl-2比值增高,提示微泡介导的超声空化效应可能通过有效增高Bax/Bcl-2比值这一途径来诱导VSMCs凋亡。

【参考文献】

- [1] Bull JL. The application of microbubbles for targeted drug delivery[J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2007, 4(5): 475-493.
- [2] 朱梅,刘政,张萍,等.比较两种制备载紫杉醇

超声微泡的方法[J]. *中国医学影像技术*, 2009, 25(7): 1148-1151.

- [3] Byrne RA, Joner M, Tada T, *et al.* Restenosis in bare metal and drug-eluting stents: distinct mechanistic insights from histopathology and optical intravascular imaging[J]. *Minerva Cardioangiol*, 2012, 60(5): 473-489.
- [4] Douglas JS Jr. Drug-eluting stent restenosis: a need for new technology[J]. *JACC Cardiovasc Interv*, 2012, 5(7): 738-740.
- [5] Geis NA, Katus HA, Bekeredjian R. Microbubbles as a vehicle for gene and drug delivery: current clinical implications and future perspectives[J]. *Curr Pharm Des*, 2012, 18(15): 2166-2183.
- [6] Stride EP, Coussios CC. Cavitation and contrast: the use of bubbles in ultrasound imaging and therapy[J]. *Proc Inst Mech Eng H*, 2010, 224(2): 171-191.
- [7] Kipshidze NN, Porter TR, Dangas G, *et al.* Novel site-specific systemic delivery of Rapamycin with perfluorobutane gas microbubble carrier reduced neointimal formation in a porcine coronary restenosis model[J]. *Catheter Cardiovasc Interv*, 2005, 64(3): 389-394.
- [8] Milross CG, Mason KA, Hunter NR, *et al.* Relationship of mitotic arrest and apoptosis to antitumor effect of paclitaxel[J]. *J Natl Cancer Inst*, 1996, 88(18): 1308-1314.
- [9] Asakuma J, Sumitomo M, Asano, *et al.* Selective Akt inactivation and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand sensitization of renal cancer cells by low concentrations of paclitaxel[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(6): 1365-1370.
- [10] McGrogan BT, Gilmartin B, Carney DN, *et al.* Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1785(2): 96-132.
- [11] Kim DW, Kwon JS, Kim YJ, *et al.* Novel oral formulation of paclitaxel inhibits neointimal hyperplasia in a rat carotid artery injury model[J]. *Circulation*, 2004, 109(12): 1558-1563.
- [12] 张萍,高云华,刘平,等.超声造影剂对血管平滑肌细胞增殖、迁移和凋亡的影响[J]. *临床超声医学杂志*, 2005, 7(5): 289-292.

(编辑:胡晓晖)