

超声联合对比剂对内皮祖细胞一氧化氮生成的影响**◆

王秀珠¹, 范国峰², 童嘉毅³, 李 鹏³, 杨 芳⁴

Effect of ultrasound-combined contrast agents on the produce of nitric oxide from endothelial progenitor cells

Wang Xiu-zhu¹, Fan Guo-feng², Tong Jia-yi³, Li Peng³, Yang Fang⁴

Abstract

¹Department of Pharmacy, Southeast University Hospital, Nanjing 210018, Jiangsu Province, China; ²Nanjing Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China;

³Cardiovascular Research Institute of Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China; ⁴State Key Laboratory of Instruments and Materials, Southeast University, Nanjing 210018, Jiangsu Province, China

Wang Xiu-zhu, Pharmacist in charge, Department of Pharmacy, Southeast University Hospital, Nanjing 210018, Jiangsu Province, China

Correspondence to:
Fan Guo-feng,
Master, Attending physician, Nanjing Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China
fangufeng98@163.com

Supported by:
Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education in 2009, Ministry of Education, No. 20090092120059*; the National Natural Science Foundation of China in 2010, No. 81070265/H0222*

Received: 2011-05-14
Accepted: 2011-08-27

BACKGROUND: Animal studies have indicated ultrasound-combined contrast agents can significantly enhance the homing of bone marrow stem cells transplantation to treat myocardial infarction and improve heart function. But its mechanism is still unknown.

OBJECTIVE: To observe the effect of ultrasound-combined contrast agents on the nitric oxide (NO) production and pathway by endothelial progenitor cells (EPCs) *ex vivo*.

METHODS: Bone marrow EPCs of Chinese minipigs were extracted, separated and cultured *in vitro*. The EPCs were divided to three groups: control group, ultrasound group and ultrasound-combined contrast agents group. After intervention, the NO concentration in the supernatant of EPCs and nitrogen synthase (NOS) relative activity were measured by nitrate reduction and spectroscopy, respectively.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the control group, NO concentration in the supernatant of EPCs and NOS relative activity of EPCs were enhanced in the ultrasound-combined contrast agents group ($P < 0.05$), but no changed in ultrasound group ($P > 0.05$). Ultrasound-combined contrast agents increased the NO production in the solution containing L-arginine and hydrogen peroxide, but single ultrasound had no effect. Results suggested that ultrasound-combined contrast agents can increase NO generation by enhancing the NOS activity and non-enzymatic NO synthesis of EPCs. These may be one of the mechanisms of the ultrasound-combined contrast agents enhancing the effect of stem cells transplanted to treat myocardial infarction.

Wang XZ, Fan GF, Tong JY, Li P, Yang F. Effect of ultrasound-combined contrast agents on the produce of nitric oxide from endothelial progenitor cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(40): 7554-7557.
[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 已有动物实验证实超声联合对比剂能够显著增强骨髓干细胞心肌内归巢治疗心肌梗死，改善心功能。

目的: 体外观察超声联合对比剂对内皮祖细胞一氧化氮生成及产生途径的影响。

方法: 体外提取、分离和培养猪骨髓内皮祖细胞，随机分为对照组、超声组、超声对比剂组，干预后分别收集内皮祖细胞和上清液。采用硝酸还原法检测上清液一氧化氮水平，分光光度计检测内皮祖细胞一氧化氮合酶的相对活力。

结果与结论: 超声对比剂组内皮祖细胞上清液一氧化氮表达、内皮祖细胞诱导型一氧化氮合酶和结构型一氧化氮合酶活力均较对照组显著增加($P < 0.05$)；超声组一氧化氮水平无明显改变，各型一氧化氮合酶活力较对照组有下降趋势，但差异无显著性意义($P > 0.05$)；超声联合对比剂作用下，L-精氨酸和双氧水可反应生成一氧化氮，较对照组明显增加，而单纯超声无此促进作用。提示超声联合对比剂作用显著增强内皮祖细胞各亚型一氧化氮合酶活性，并可能同时促进内皮祖细胞一氧化氮非酶合成途径，是其增效骨髓干细胞治疗心肌梗死的机制之一。

关键词: 超声；超声对比剂；内皮祖细胞；一氧化氮；一氧化氮合酶

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.40.033

王秀珠, 范国峰, 童嘉毅, 李鹏, 杨芳. 超声联合对比剂对内皮祖细胞一氧化氮生成的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(40):7554-7557. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

近年来，实验和临床研究提示干细胞移植治疗心肌梗死能够改善心功能，但治疗效果仍不肯定，甚至相互矛盾。课题组动物实验结果表明，超声联合对比剂能够显著增加猪骨髓干细胞归巢至局部梗死心肌的能力，远期心功能得到明显改善^[1-2]，并且对移植干细胞增殖、凋亡和细胞周期无不良影响^[3]。然而，超声对比剂增强移植干细胞靶向心肌归巢、改善心功能的具体机制仍不明确。实验体外观察超声联

合对比剂对内皮祖细胞生成一氧化氮的量及一氧化氮生成途径的影响，以了解其增效干细胞治疗的机制，从而更好的指导实验和临床研究。

1 材料和方法

设计: 体外观察实验。

时间与地点: 实验于2009-03/2011-03在东南大学心血管研究所完成。

材料: 雄性猪(中国小型猪)由东南大学实验动物中心提供。

主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
淋巴细胞分离液 Ficoll-Paque	天津灏洋生物公司
培养液 EGM-2	Cambrex
纤维连接蛋白(Fn)	Chemicon
Dil 标记乙酰化低密度脂蛋白 (Dil-acLDL)	Molecular Probe
FITC 标记荆豆凝集素 I (FITC-UEA- I)	Sigma
硝酸还原酶法测定一氧化氮试 剂盒, 一氧化氮合酶(nitrogen synthase, NOS)分型测定试 剂盒	南京建成生物工程研究所
含氟碳气体脂质体微泡	东南大学仪器与材料 国家重点实验室
荧光正立显微镜	Nikon
CZT-3 超声同步治疗仪	沈阳新乐康复医疗仪器厂
3722N 型可见分光光度计	上海精密科学仪器有限 公司

实验方法:

细胞分离、培养和鉴定：于雄性猪胫骨近端抽取骨髓约20 mL，加入Ficoll-Paque分离液，采用密度梯度离心法分离单个核细胞，以 $3 \times 10^5 \text{ L}^{-1}$ 的浓度，接种于铺有纤维连接蛋白的培养瓶中，培养液用EGM-2。培养至7 d左右行Dil-acLDL和FITC-UEA-I双染色，计数双阳性细胞为内皮祖细胞。

内皮祖细胞的分组和干预：培养细胞分为3组：对照组、超声组和超声对比剂组。实验前将培养的内皮祖细胞用胰酶消化，制成单细胞悬液，摇匀后以 $100 \mu\text{L}$ (约 $5 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 细胞)加入96孔培养板。对照组不做干预，超声组以频率1 MHz，输出功率 1 W/cm^2 ，持续辐照90 s；超声对比剂组加入 $5 \mu\text{L}$ 微泡(约 $2 \times 10^{11} \text{ L}^{-1}$)，以同样超声条件作用90 s。96孔培养板固定在保持 37°C 双蒸水水槽表面，超声探头垂直置于培养板下方约8 cm处，为避免超声波对邻近孔细胞的影响，隔孔接种细胞，每组8孔。干预后分别收集细胞和上清液。

内皮祖细胞生成一氧化氮和NOS活性的测定：应用一氧化氮试剂盒通过硝酸还原酶法检测内皮祖细胞上清液一氧化氮水平；应用NOS分型测定试剂盒测定内皮祖细胞细胞内结构型NOS(cNOS)和诱导型NOS(iNOS)的表达。

超声联合对比剂作用下一氧化氮非酶促生成：L-精氨酸和双氧水浓度按10:1比例加入96孔培养板，调整溶剂pH值在7.40左右，实验分组和干预条件与细胞实验相同，同样用硝酸还原法检测各组一氧化氮浓度。

主要观察指标：硝酸还原法检测上清液一氧化氮水平，分光光度计检测内皮祖细胞NOS的相对活力。

统计学分析：由第一作者采用SPSS 14.0软件完成统计处理，实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，组间比较采用单因素方差分析(One Way ANOVA)，组间两两比较采用Student Newman Keuls (S-N-K)检验， $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 内皮祖细胞的鉴定结果 培养第7天，贴壁细胞形态以梭形为主，可见圆形及不规则形细胞。荧光显微镜下，细胞摄取Dil-acLDL后呈红色，FITC-UEA-I染色后呈绿色，双染色细胞的内皮祖细胞占90%以上，见图1。

¹东南大学医学院，江苏省南京市 210018；²南京中医药大学附属鼓楼医院急诊中心，江苏省南京市 210008；³东南大学心血管研究所，江苏省南京市 210009；⁴东南大学仪器与材料国家重点实验室，江苏省南京市 210018

王秀珠，女，1962年生，江苏省泰州市人，汉族，主管药师。

通讯作者：范国峰，硕士，主治医师，南京大学医学院附属鼓楼医院急诊中心，江苏省南京市 210008
fanguofeng98@163.com

中图分类号:R394.2
文献标识码:B
文章编号:1673-8225
(2011)10_0755_04

收稿日期: 2011-05-14
修回日期: 2011-08-27
(20110514006/WL·W)

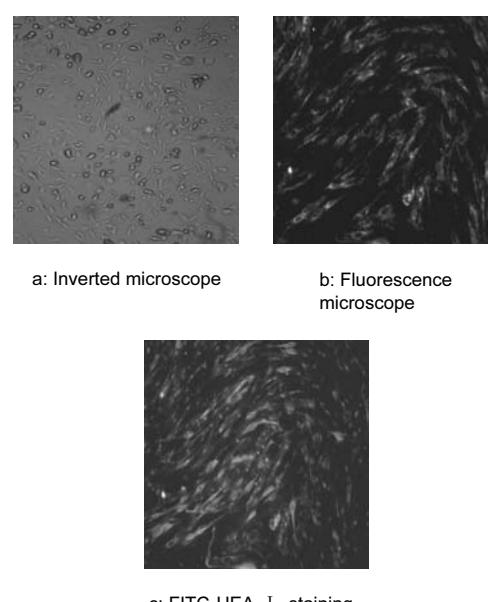


Figure 1 Morphology and identification of endothelial progenitor cells cultured for 7 d ($\times 400$)

图 1 培养第 7 天内皮祖细胞的形态及鉴定(×400)

2.2 超声联合对比剂对内皮祖细胞生成一氧化氮的影响 见表1。

表 1 各组内皮祖细胞上清液一氧化氮水平
 Table 1 Concentration of nitric oxide (NO) in the supernatant of endothelial progenitor cells ($\bar{x} \pm s$, $\mu\text{mol/L}$)

Group	NO
Ultrasound	70.43±9.52 ^a
Control	72.85±9.08 ^a
Ultrasound-combined contrast agents	88.70±8.78

^a $P < 0.05$, vs. ultrasound combined contrast agents group.

硝酸还原酶法检测内皮祖细胞干预后的上

清液, 结果表明: 与对照组和超声组相比, 超声对比剂组一氧化氮表达显著增加($P < 0.05$); 超声组与对照组相比, 差异无显著性意义($P > 0.05$)。

2.3 超声联合对比剂对内皮祖细胞各型NOS活力的影响 见表2。

表2 各组内皮祖细胞各型一氧化氮合酶的活性比较
Table 2 Comparison of nitric oxide synthase (NOS) activity in endothelial progenitor cells ($\bar{x} \pm s$, $\mu\text{kat/L}$)

Group	T-NOS	i-NOS	c-NOS
Ultrasound	130.19±13.67 ^a	87.52±8.34 ^a	42.68±5.00 ^a
Control	138.86±17.50 ^a	91.69±7.83 ^a	47.01±4.00 ^a
Ultrasound-combined contrast agents	260.05±21.00	180.20±15.84	79.68±6.00

^a $P < 0.05$, vs. ultrasound-combined contrast agents group

由表2可知, 超声组各型NOS活力较对照组均有所下降, 但差异无显著性意义($P > 0.05$); 而超声对比剂组i-NOS和c-NOS活力较对照组有显著性增加($P < 0.05$), 又以i-NOS增加更明显。

2.4 超声联合对比剂对一氧化氮非酶促生成的影响 见表3。

表3 各组非酶途径内皮祖细胞一氧化氮的表达
Table 3 Expression of non-enzymatic nitric oxide (NO) synthesis of endothelial progenitor cells ($\bar{x} \pm s$, $\mu\text{mol/L}$)

Group	NO
Ultrasound	8.70±0.92 ^a
Control	8.70±1.56 ^a
Ultrasound-combined contrast agents	13.04±1.28

^a $P < 0.05$, vs. ultrasound-combined contrast agents group

结果显示, 超声对比剂组一氧化氮表达较对照组和超声组显著增加($P < 0.05$), 而对照组与超声组相比, 差异无显著性意义($P > 0.05$), 提示非酶途径可能参与超声对比剂促内皮祖细胞生成一氧化氮。

3 讨论

已有实验报道, 一氧化氮能够在没有NOS催化作用下产生, 包括体内饮食或唾液中亚硝酸盐与胃酸反应, 体外L-精氨酸(10~20 mmol/L)和H₂O₂(10~50 mmol/L)反应均能生成一氧化氮^[4-5]。细胞内正常含有L-精氨酸, 超声介导微泡作用下细胞内能够生成H₂O₂^[6], 同时已有实验报道体外冲击波能够在较低H₂O₂浓度下使一氧化氮生成更快更多^[7]。据此, 推测超声联合对比剂可能通过非酶促途径进一步增加内皮祖细胞生成一氧化氮。实验中H₂O₂采用mmol水平, 因有文献提示双氧水在炎症反应时一过性升高至此水平^[8], 同时体外实验表明L-精氨酸和双氧水浓度比为10:1时, 一氧化氮产生量达最

大值。故实验中两者按此比例加入96孔培养板, 调整溶剂pH值在7.40左右, 实验分组和干预条件与细胞实验相同, 同样用硝酸还原法检测各组一氧化氮浓度。

目前认为, 移植干细胞治疗心肌梗死的关键, 是移植细胞到达心肌缺血区并存活, 进一步分化为心肌细胞或发挥旁分泌治疗作用。一氧化氮是体内活性气体分子, 有广泛生理病理作用, 包括调节血管舒张功能, 抗血小板聚集, 增加血管通透性, 促进血管新生, 调节其他促血管生长因子功能。体内一氧化氮由NOS催化L-精氨酸与氧分子经多步氧化还原反应生成。不同类型细胞中, 存在不同类型的NOS, 通过不同的信号转导机制产生一氧化氮。现已知NOS有3种类型, 广义的将其分为两种, 即构成型一氧化氮合酶(cNOS)和细胞因子诱导型(iNOS)。cNOS包括主要分布在内皮组织的eNOS和神经系统的nNOS, 合成基础一氧化氮, 调节生理功能。iNOS在静息细胞内不表达, 当细胞受到细胞因子或炎症刺激时, 催化合成非生理浓度的大量一氧化氮。

实验结果证实, 超声介导微泡作用下内皮祖细胞生成一氧化氮明显增加, 内皮祖细胞各亚型NOS活性均有所增强, 又以iNOS增加更明显。而且, 本实验在体外证实, 超声联合其对比剂能够显著增强一氧化氮非酶生成, 可能是其增加内皮祖细胞生成一氧化氮的机制之一, 但仍需细胞实验进一步证实。

可以推测, 体内血管局部一氧化氮浓度增加, 从而引起血管扩张, 血流速度减慢, 有利于内皮祖细胞边集。近期实验表明, 一氧化氮能够降解内皮层钙粘蛋白复合物, 激活金属蛋白酶9(MMP-9)降解细胞外基质, 使血管通透性增加, 促进内皮祖细胞游出血管, 在心肌组织间迁移^[9]。此外, 动物实验表明, 心肌局部一氧化氮生成增加, 能够增强大鼠心肌梗死区血管新生, 改善心肌纤维化和心功能, 提高生存率^[10-11]。

eNOS在内皮祖细胞迁移、分化形成微血管中也起重要作用。Sasaki等^[12]应用eNOS增强子AVE9488体外预处理内皮祖细胞, eNOS mRNA表达增加, 相应酶活性增强, 结果使干细胞迁移能力明显提高; 体内实验进一步表明上述预处理移植内皮祖细胞能够明显增加缺血后肢新生血管密度和血流灌注, 改善后肢运动功能。而且NOS活性对心肌缺血和再灌注损伤也有保护作用, 其机制可能与移植内皮祖细胞的eNOS、iNOS活性和分泌VEGF有关, 其中eNOS对一过性缺血, iNOS对慢性持续缺血有抗炎症作用^[13]。

综上所述, 超声(1 MHz, 1 W/cm², 90 s)联合对比剂作用能够增强内皮祖细胞的NOS活性, 影响一氧化氮非酶促生成, 增加一氧化氮生成, 可能对内皮祖细胞黏附、迁移、存活、增殖和分化各个环节的影响, 从而发挥增效干细胞治疗心肌梗死的作用。目前该作用的具体机制尚不明确, 仍需相关实验进一步深入研究。

4 参考文献

- [1] Tong JY, Ma GS, Feng Y, et al. Zhongguo Xinxueguanbing Yanjiu Zazhi. 2008;6(10):771-773.
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].中国心血管病研究杂志,2008,6(10):771-773.
- [2] Li JM, Tong JY, Feng Y, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu Yu Linchuang Kangfu. 2009;13(23):4421-4425.
李金鹤,童嘉毅,冯毅,等.超声辐射微泡增效骨髓间充质干细胞移植治疗心肌梗死[J].中国组织工程研究与临床康复,2009,13(23):4421-4425.
- [3] Fan GF, Feng Y, Tong JY, et al. Dongnan Daxue Xuebao: Yixueban. 2009;30(2):109-112.
范国峰,冯毅,童嘉毅,等.超声联合微泡对内皮祖细胞体外增殖、凋亡及细胞周期的影响[J].东南大学学报(医学版),2009,30(2):109-112.
- [4] Oldreive C, Rice-Evans C. The mechanisms for nitration and nitrotyrosine formation in vitro and in vivo: impact of diet. Free Radic Res. 2001;35(3):215-231.
- [5] Nagase S, Takemura K, Ueda A, et al. A novel nonenzymatic pathway for the generation of nitric oxide by the reaction of hydrogen peroxide and D- or L-arginine. Biochem Biophys Res Commun. 1997;233(1):150-153.
- [6] Juffermans LJ, Dijkmans PA, Musters RJ, et al. Transient permeabilization of cell membranes by ultrasound-exposed microbubbles is related to formation of hydrogen peroxide. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2006;291(4):H1595-H1601.
- [7] Gotte G, Amelio E, Russo S, et al. Short-time non-enzymatic nitric oxide synthesis from L-arginine and hydrogen peroxide induced by shock waves treatment. FEBS Lett. 2002;520(1-3):153-155.
- [8] Nathan CF, Root RK. Hydrogen peroxide release from mouse peritoneal macrophages: dependence on sequential activation and triggering. J Exp Med. 1977;146(6):1648-1662.
- [9] You D, Waeckel L, Ebrahimian TG, et al. Increase in vascular permeability and vasodilation are critical for proangiogenic effects of stem cell therapy. Circulation. 2006;114(4):328-338.
- [10] Landmesser U, Engberding N, Bahlmann FH, et al. Statin-induced improvement of endothelial progenitor cell mobilization, myocardial neovascularization, left ventricular function, and survival after experimental myocardial infarction requires endothelial nitric oxide synthase. Circulation. 2004;110(14):1933-1939.
- [11] Bulhak AA, Sjöquist PO, Xu CB, et al. Protection against myocardial ischaemia/reperfusion injury by PPAR-alpha activation is related to production of nitric oxide and endothelin-1. Basic Res Cardiol. 2006;101(3):244-252.

- [12] Sasaki K, Heeschen C, Aicher A, et al. Ex vivo pretreatment of bone marrow mononuclear cells with endothelial NO synthase enhancer AV-E9488 enhances their functional activity for cell therapy. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(39):14537-14541.
- [13] Li M, Nishimura H, Iwakura A, et al. Endothelial progenitor cells are rapidly recruited to myocardium and mediate protective effect of ischemic preconditioning via "imported" nitric oxide synthase activity. Circulation. 2005;111(9):1114-1120.

来自本文课题的更多信息—

基金资助: 教育部 2009 年度高等学校博士学科点专项科研基金(20090092120059): 超声联合微泡介导内皮祖细胞心肌内归巢效应及其机制研究; 2010 年度国家自然科学基金(81070265/H0222): 应用超声微泡促进内皮祖细胞心肌内归巢的机制研究。

作者贡献: 第一作者进行实验设计, 实验实施为全部作者, 实验评估为通讯作者, 资料收集为第三作者, 通讯作者成文, 第一作者审校, 第一作者对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理批准: 实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部 2006 年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准。

本文创新性: 实验通过体外观察超声联合对比剂对内皮祖细胞一氧化氮生成及产生途径的影响, 发现超声联合对比剂作用显著增强内皮祖细胞各亚型一氧化氮合酶活性, 并可能同时促进内皮祖细胞一氧化氮非酶合成途径, 是其增效骨髓干细胞治疗心肌梗死的机制之一。



ISSN 1673-8225 CN 21-1539/R 2011 年版权归《中国组织工程研究与临床康复》杂志社所有

本刊已出版的“脂肪干细胞研究”热点文章题录②: 学术部

血管内皮细胞和脂肪干细胞体外联合培养细胞的增殖
王福科, 刘流, 何晓光, 等.

2010;14(32):6001-6005

[关键词]增殖; 联合培养; 体外; 血管内皮细胞;
脂肪干细胞; 干细胞
[基金]国家自然科学基金(30960388); 云南科技

厅联合专项基金资助项目(2007C0007R); 昆明
医学院博士创新基金项目(KM2007D03)

脂质体介导人骨形态发生蛋白2基因转染对兔
脂肪干细胞生长增殖的影响
安荣泽, 刘凡凡, 王兆杰, 等.

2010;14(23):4199-4202

[关键词]骨形态发生蛋白; 脂肪干细胞; 脂质体;
转染; 生长增殖
[基金]贵州省科技厅资助项目(黔科通NY字

[2006]62-2); 珠海市医学重点专科建设基金资
助(珠卫[2008]80)

脂肪干细胞的免疫学性质
韩长杰, 杨向群, 张传森

2010;14(27):5095-5098

[关键词]脂肪干细胞; 免疫原性; 免疫调节; 体
内移植; 排斥
[基金]国家自然科学基金组织工程窦房结的构

建及基础研究(30970737); 上海市自然科学重
点基金(08441900600)

免脂肪干细胞体外构建组织工程软骨: 负载胰
岛素样生长因子1基因的作用

张传辉, 杨军, 李建军, 等.

2010;14(28):5131-5135

[关键词]胰岛素样生长因子1; 软骨组织工程;
脂肪间充质干细胞; 软骨细胞; 基因转染
[基金]国家自然科学基金资助项目(30772216)

天然可降解脱钙骨基质材料复合脂肪干细胞的
三维培养

唐少锋, 李朝翠, 刘承杏

2010;14(12):2101-2105

[关键词]脱钙骨基质; 脂肪源性干细胞; 组织工
程; 培养; 生物材料
[基金]解放军成都军区昆明总医院院管课题资

助项目(YG2009016)