

低剂量脉冲超声波对培养细胞的生物学效应

孔璐, 杨红, 赵进顺

(东南大学公共卫生学院 江苏 南京 210009)

摘要: 目的 研究不同时间的低剂量脉冲超声波刺激对细胞增殖和细胞凋亡的影响。方法 采用 MTT 法测定成纤维细胞增殖情况, Annexin V 法测定成纤维细胞和肿瘤 MiaPaCa-2 细胞的凋亡情况。结果 (1) 在 MTT 法测定细胞活性中, 细胞培养液不含 FCS 时, 超声波刺激时间为 6 min、11 min 和 20 min 的剂量组, 其吸光光度值较对照组都有显著性增高, 且差异具有统计学意义 (均 $P < 0.01$), 其细胞增殖峰值在 11 min。细胞培养液含 5% FCS 时, 超声波刺激不同时间的剂量组的吸光光度值较对照组亦有显著性增高, 并具统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。 (2) 低剂量脉冲超声波刺激人皮肤成纤维细胞及肿瘤细胞超过一定时间后, 少量细胞开始出现凋亡, 且随着刺激时间的延长, 凋亡细胞数增多, 凋亡程度也逐渐加重。其中超声波刺激时间为 60 min、80 min 和 100 min 剂量组的细胞凋亡数与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。结论 短时间低剂量脉冲超声波刺激能促进细胞增殖, 超过一定时间则会抑制细胞生长, 甚至引起细胞凋亡。

关键词: 低剂量脉冲超声波; MTT 试验; Annexin V; 细胞增殖; 细胞凋亡

中图分类号: R312; Q253; Q255 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2005)01-0016-03

A study on biological effects of low intensity pulsed ultrasound on cultured cells

KONG Lu, YANG Hong, ZHAO Jin-shun

(School of Public Health, Southeast University, Nanjing 210009, China)

Abstract: **Objective** To study the biological effect of low-intensity pulsed ultrasound (LPU) on the cultured cell in vitro. **Method** The biological effects of LPU on the proliferation of human skin fibroblasts were determined by MTT assay. The cell apoptosis of human skin fibroblasts and MiaPaCa-2 cells was determined with Annexin V assay. **Result** (1) Optical absorption value of cell activity in MTT assay increased significantly in the cell culture with LPU treatment for 6, 11 and 20 minutes without FCS, as compared with the control group ($P < 0.01$), with a peak detected in the cell culture with LPU treatment for 11 minutes. Optical absorption value also increased in the cell culture with 5% FCS and statistical significance ($P < 0.05$, $P < 0.01$). (2) Cell proliferation was inhibited and cell apoptosis increased significantly in human skin fibroblasts and MiaPaCa-2 cells with LPU stimulation for more than 60 minutes ($P < 0.01$), as compared with the control group. **Conclusion** Stimulation with LPU could induce cell proliferation at a shorter time and could inhibit cell growth or even cause cell apoptosis in vitro at a longer time.

Key words: Low-intensity pulsed ultrasound; MTT assay; Annexin V; Cell proliferation; Cell apoptosis

低剂量脉冲超声波是一种使用频率和剂量较低的超声波。它采用脉冲式, 其传递给组织的机械压能量一般 $< 3 \text{ mg/cm}^2$, 不会引起组织致热效应, 从而避免了以往治疗用超声波的致热不良副作用^[1,2]。本课题旨在研究低剂量脉冲超声波刺激对体外培养细胞的生物学效应。用不同条件下的低剂量脉冲超声波刺激体外培养细胞, 采用 MTT 比色法观察细胞增殖效应情况, 用 Annexin V 法分别检测人皮肤成纤维细胞和胰腺癌细胞 (MiaPaCa-2) 的凋亡情况。从而为合理利用超声波的有利生物学效应, 防止不良作用, 增进人体健康提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试剂

DMEM 培养基 (Gibco), 2 mmol/L 谷氨酰胺, 10%

小牛血清 (FCS), 100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素, 100 U/ml 青霉素, 0.25% 胰蛋白酶, 四甲基偶氮唑蓝 (MTT) (5 mg/ml PBS pH 7.4), 二甲亚砜 (DMSO), 4% 甲醛, TNT (+ Ca^{2+}) (tris-NaCl-Tween 20 buffer) 缓冲液, TNB (+ Ca^{2+}) (tris-NaCl-albumin buffer) 缓冲液, Annexin V (国外进口染料, 德国乌尔姆大学临床生化研究所赠送) [1:30 in TNB (+ Ca^{2+}) 缓冲液], streptavidin PE [1:50 in TNB (+ Ca^{2+}) 缓冲液], Bisbenzimidazole 染液 [1 mg bisbenzimidazole in 500 ml DNA (+ Ca^{2+}) 缓冲液, 避光], 800 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 。

1.2 细胞

人皮肤成纤维细胞 (取自健康男童外科包皮环切手术时的包皮, 约 1.5 cm^2 大小), MiaPaCa-2 细胞 (标准细胞株, 德国乌尔姆大学临床生化研究所赠送)。

1.3 仪器

fracture healing system-model 2A 型 6 孔培养板实验用低剂量脉冲超声波刺激仪 (美国 EXOGEN, 固定频率和

收稿日期: 2004-07-05; 修回日期: 2004-09-01

基金项目: 东南大学国家自然科学基金预研项目 (Y200325134)

作者简介: 孔璐 (1977-), 女, 河南信阳人, 医学硕士, 助教

强度 德国乌尔姆大学赠送), 频率 1.5 MHz, 强度 30 mW/cm², 重复频率 1 kHz, 输出方式为脉冲式, 脉宽 200 微秒, 使用时在输出末端涂上传导膏后贴在 6 孔培养板底部。CO₂ 培养箱 (NUAIR), 超净工作台 (SW-CJ-2F), 倒置显微镜 (日本 Olympus), 荧光显微镜 (日本 Nikon), 电热鼓风干燥箱 (NC101-1A), 超速离心机 (80-1), 电子天平 (MA 110), 酶标仪 (S/N 5810)。

1.4 实验方法

1.4.1 原代皮肤成纤维细胞培养方法 将外科包皮环切手术切下的皮肤组织块立即放入装有含 10%FCS 的 DMEM 培养液的无菌瓶内, 迅速带入实验室, 立即在净化工作台内进行操作。将皮肤组织块在 75% 的酒精中放置 3 min 进行消毒, 然后用 PBS 缓冲液漂洗 3 次。用眼科弯剪将皮下脂肪及血管等去除掉, 然后将皮肤组织块剪为 0.1~0.5 mm² 大小的组织块, 再用 PBS 漂洗 3 次。37 °C 水浴, 用 0.125% 的胰蛋白酶消化皮肤组织块 30 min, 每 5 min 摇晃一次。再用含 10%FCS 的 DMEM 培养液终止消化, 离心 1 000 r/min, 5 min, 弃上清。将组织块贴附于培养瓶内, 翻转培养瓶, 加少量含 20%FCS 的 DMEM 培养液, 放入 37 °C 恒温和 5%CO₂ 的培养箱中, 2 h 后再轻轻将培养瓶翻转过来, 使培养液慢慢浸没皮肤组织块。第三天用 10%FCS 的 DMEM 培养液换液, 以后每 5 d 用 10%FCS 的 DMEM 培养液换液一次。一周后可见皮肤组织块周围有细胞呈放射状长出。待细胞长满培养瓶, 用 0.25% 胰蛋白酶消化传代培养。

1.4.2 MTT 方法观察细胞增殖情况 (1) 选指数生长期 5 代皮肤成纤维细胞消化, 接种于 6 孔培养板中, 密度为 1×10⁵/ml, 2 ml/孔。(2) 细胞培养 24 h 后, 更换成不同成分的细胞培养液 (不含 FCS 及含 5%FCS), 低剂量脉冲超声波刺激 (US), 时间分别为 0, 5, 10, 15, 30, 45 min, 每剂量组设 3 个重复孔。(3) 再培养 24 h, 倒置显微镜观察细胞形态。然后去除培养液, 每孔加含 10%FCS 的 DMEM 培养液 2 ml 和 200 μl MTT。(4) 4 h 后, 去除培养液, 加 DMSO 2 ml/孔, 充分混匀, 移至 96 孔板中, 200 μl/孔。(5) 酶标仪上测 OD_{570nm} 值。

1.4.3 Annexin V 方法测定细胞凋亡 (1) 将盖玻片 (2.5 cm×2.5 cm) 放入 6 孔板中, 每孔一个。皮肤成纤维细胞或 MiaPaCa-2 肿瘤细胞接种于 6 孔板, 密度 1×10⁵/ml, 2 ml/孔, 细胞生长在盖玻片上。用含 10%FCS 的 DMEM 培养液培养。(2) 低剂量脉冲超声波刺激, 时间分别为 0, 45, 60, 80, 100 min, 同时设阳性对照组 (2 000 μmol/L H₂O₂, 2 h)。每剂量组设 3 个重复孔。(3) 培养 2 h, 倒置显微镜观察细胞形态。然后去除 DMEM

培养液, 4% 甲醛固定 1 h。取出盖玻片, 用硅胶把盖玻片粘贴在载玻片上。(4) 用 TNT (+Ca²⁺) 缓冲液洗细胞 2 次。TNB(+Ca²⁺) 缓冲液孵育 45 min。(5) Annexin V 孵育 1 h。(6) Streptavidin PE 孵育 1 h。(7) Bisbenzamide 染液室温下染 15 min。(8) TNT (+Ca²⁺) 缓冲液冲洗, 双蒸水洗, 空气干燥。(9) 荧光显微镜观察 Annexin V 阳性细胞。

2 结果

2.1 低剂量脉冲超声波刺激对人皮肤成纤维细胞增殖的影响

测定低剂量脉冲超声波刺激不同时间后对人皮肤成纤维细胞生长的影响。细胞培养液分别不含 FCS 及含 5%FCS。对照组不接受低剂量脉冲超声波刺激。为防止系统误差, 每剂量组各作 3 个平行孔, 每孔均测 3 个值。本实验结果显示, 低剂量脉冲超声波刺激能促进人皮肤成纤维细胞增殖, 其增殖情况与超声波的刺激时间有关。受低剂量脉冲超声波刺激的各剂量组细胞较对照细胞的增殖率均有升高, 其中用不含 FCS 的 DMEM 培养液培养时, 超声波刺激时间为 6 min、11 min 和 20 min 的剂量组与对照组比较差异有统计学意义 (均 $P < 0.01$), 其峰值在 11 min; 而用含 5%FCS 的 DMEM 培养液培养时, 超声波刺激时间为 6 min、11 min 和 20 min 的剂量组与对照组比较差异亦有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.05$), 峰值也在 11 min。见表 1。

表 1 低剂量脉冲超声波不同刺激时间组
人成纤维细胞吸光光度值 (570 nm)

US 刺激 时间 (min)	孔数	不含 FCS 细胞培养液		含 5%FCS 细胞培养液	
		OD 值均数 ($\bar{x} \pm s$)	相对增殖率 (%)	OD 值均数 ($\bar{x} \pm s$)	相对增殖率 (%)
0	3	0.243±0.096	—	0.298±0.0221	—
3	3	0.309±0.090	27.16	0.338±0.0387	20.13
6	3	0.391±0.077**	60.91	0.432±0.0417*	44.97
11	3	0.489±0.072**	101.23	0.556±0.0354**	86.58
20	3	0.407±0.034**	67.49	0.439±0.0350*	48.31
30	3	0.253±0.058	4.12	0.306±0.0852	2.68

与对照组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 下表同。

由表 1 看出, 在培养液不含小牛血清, 即细胞在培养所必需的生长因子缺乏的环境下培养时仍能正常生长。由于不含 FCS 细胞培养液的对照组的 OD 值偏低, 受低剂量脉冲超声波刺激后的各剂量组的 OD 值虽没有含 FCS 细胞培养液的各剂量组的 OD 值高, 但其相对增殖率却较高。同时也说明了低剂量脉冲超声波刺激能促进细胞产生生长因子。

2.2 低剂量脉冲超声波对人成纤维细胞及肿瘤细胞凋亡的影响

低剂量脉冲超声波刺激达到一定时间 (60 min) 后, 可以引起皮肤成纤维细胞和肿瘤细胞的凋亡, 其凋亡数量和程度与超声波的刺激时间有关, 刺激时间越长, 凋亡细胞数越多, 其凋亡程度也越严重。见表 2。

表 2 低剂量脉冲超声波不同刺激时间组

成纤维细胞、肿瘤细胞凋亡情况

US 刺激 时间 (min)	平行 孔	细胞总数 (个)	成纤维细胞		肿瘤细胞	
			凋亡细胞 总数(个)	凋亡细胞百 分率($\bar{x} \pm s$)	凋亡细胞 总数(个)	凋亡细胞百 分率($\bar{x} \pm s$)
0	3	1 000 $\times$ 3	26	8.7 $\pm$ 5.69	19	6.3 $\pm$ 4.93
45	3	1 000 $\times$ 3	33	11.0 $\pm$ 2.65	21	7.0 $\pm$ 2.65
60	3	1 000 $\times$ 3	51*	17.0 $\pm$ 4.58*	54*	18.0 $\pm$ 2.65*
80	3	1 000 $\times$ 3	197*	82.3 $\pm$ 5.86*	132*	44.0 $\pm$ 8.00*
100	3	1 000 $\times$ 3	322*	107.3 $\pm$ 8.14*	276*	92.0 $\pm$ 6.24*

注: 凋亡细胞百分率为三平行孔的凋亡细胞均值所占总细胞数的百分率。

3 讨论

低剂量脉冲超声波是一种使用频率为 1~3 MHz、剂量为 30 mW/cm² 左右的超声波。尽管这种波传递给组织的能量不大, 但研究提示, 其有利的非致热性细胞生物学效应却不可忽视^[3]。Xavier 和 Duarte 等最早于 1983 年研究了低剂量脉冲超声波在骨不连合中的临床治疗作用, 报道治愈率可达 68%。1994 年 Heckman 等^[4]采用双盲试验法, 对 67 位闭合式或一级开放性胫骨体骨折的病人应用低剂量脉冲超声波 (1.5 MHz, 30 mW/cm²) 治疗。结果表明, 与对照组比较, 骨折的临床恢复时间显著性缩减。上述研究结果说明, 一旦低剂量脉冲超声波的生物学效应得以确证, 将为临床创口的加速愈合及难愈性骨不连合等诸多疾病的治疗带来极大的帮助。

本文研究结果显示, 低剂量脉冲超声波刺激在一定时间内能促进细胞增殖, 细胞增殖随刺激时间延长而增

加。在刺激 15 min 时细胞增殖达到高峰; 而刺激时间超过 60 min 后, 细胞生长反而受到抑制, 甚至出现了细胞凋亡率的增多, 刺激时间越长, 凋亡细胞数越多, 凋亡程度也越严重。这种发现可以给临床治疗肿瘤提供一定的参考。

本研究测定细胞增殖所采用的 MTT 法的原理是活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶作用于 MTT, 使之变成深紫色产物。该方法不需要染色、洗板、固定、干燥、裂解细胞等, 操作步骤简便, 操作时间短, 方法易掌握, 检测试剂费用低^[4]。而应用 Annexin V 法测细胞凋亡的机制则是检测凋亡细胞的“膜外化”, 此“膜外化”是细胞膜上的磷脂酰丝氨酸 (PS) 由胞膜内侧转移到胞膜外侧引起, 是细胞凋亡的早期表现。Annexin V 法是目前检测细胞凋亡的最敏感可靠的方法^[5]。本实验所用的低剂量脉冲超声波发生仪所发射的是固定频率和剂量的超声波, 但对于我国外科将来应用低剂量脉冲超声波治疗骨折及难愈性骨不连合等诸多疾病时, 建议应同时考虑剂量和刺激时间等因素。

参考文献:

- [1] Ryaby JJ, Bachner EJ. Low intensity pulsed ultrasound increases calcium incorporation in both differentiating cartilage and bone cell cultures [J]. Trans Orthop Res Soc, 1989, 14: 15.
- [2] Hedman JD, Ryaby JP, McCabe J, et al. Acceleration of tibial fracture healing by non-invasive, low-intensity pulsed ultrasound [J]. J Bone joint Surg Am, 1994, 76 (1): 26-34.
- [3] 孔璐, 赵进顺. 低剂量脉冲式超声波的生物学效应研究概况 [J]. 中国公共卫生, 2002, 18 (12): 1515-1516.
- [4] 陈杰, 曹雅明, 刘军, 等. 细胞毒性试验测定麻痹性贝毒素的检测方法 [J]. 中国公共卫生, 2001, 17 (11): 994-995.
- [5] 彭黎明, 江虹, Chris Bradley. 细胞凋亡和继发性坏死的 Annexin 法定量检测 [J]. 华西医科大学学报, 2001, 32 (4): 602-604.

(上接第 15 页) 流时, 线粒体钙含量也不能立即恢复^[3]。

本研究在离体骨骼肌培养条件下, 在 3 mmol/L Ca²⁺ 培养液培养 2 h 乳酸含量牵拉组较对照组有显著增加, 说明线粒体供能有所减少, 糖酵解增加以迅速提供能量; 而在其他实验中未见乳酸有显著变化。Armstrong 在相似条件下离体培养比目鱼肌 2 h, 发现 ATP、肌酐及乳酸含量均未发生显著变化, 认为肌细胞内 Ca²⁺ 浓度增加不是由于能量代谢障碍所致^[1]。我们认为能量代谢障碍可能发生在钙平衡紊乱之后。在本实验条件下, 细胞能量供应可能尚能满足需要, 线粒体聚钙尚未到引起能量代谢障碍的程度, 因此 Na⁺-K⁺-ATP 酶和 Ca²⁺-ATP 酶活性未发生明显变化, 提示钙泵功能正常, 胞浆 Ca²⁺

泵出障碍在胞内钙平衡紊乱发生过程中 (至少在早期) 不起主要作用。

参考文献:

- [1] Armstrong RB, Duan G, Delp MD, et al. Elevations in rat soleus muscle [Ca²⁺] with passive stretch [J]. J Appl Physiol, 1993, 74: 2990-2996.
- [2] Duan G, Delp MD, Hayes DA, et al. Rat skeletal muscle mitochondrial [Ca²⁺] and injury from downhill walking [J]. J Appl Physiol, 1990, 68: 1241-1251.
- [3] 田野, 王义润, 杨锡让, 等. 运动性骨骼肌结构、机能变化的机制研究——II. 力竭运动对线粒体钙代谢水平的影响 [J]. 中国运动医学杂志, 1993, 12: 31-33.
- [4] 徐雷, 杨磊. 静态负荷对大鼠离体骨骼肌生化指标的影响 [J]. 中国职业医学, 2001, 28 (3): 8-10.
- [5] 田野, 何其华, 罗爱民, 等. 运动性骨骼肌疲劳亚细胞机制探讨 [J]. 中国应用生理学杂志, 1994, 10: 238-240.