

低强度超声波对辐射后血管内皮细胞影响的体外研究

李祥¹, 沈强², 匡代军¹

(中山大学 1. 附属第一医院黄埔院区口腔科, 2. 口腔医学院, 广东广州 510700)

摘要:【目的】探索低强度超声波对辐射后血管内皮细胞增殖功能和酪氨酸激酶膜受体(KDR)表达的作用。【方法】体外培养的第3代血管内皮细胞以 5×10^4 /孔的浓度接种于6孔板内,分别接受0、3、6、9 Gy 4个剂量⁶⁰Co射线的辐射,实验组接受低强度超声波的干预(功率:0.8 W/cm²,频率:1.6 mHz);对照组低强度超声波的功率设为0;检测细胞的增殖和KDR的表达。【结果】剂量为0、3、6 Gy时,第8天的细胞计数($\times 10^4$ /孔)实验组分别为:22.07 \pm 1.83、21.67 \pm 1.45、12.76 \pm 0.74,对照组分别为:20.08 \pm 0.49、8.44 \pm 1.48、4.76 \pm 0.13,实验组的细胞数明显增多($P < 0.05$);同时细胞融合时间也明显缩短;辐射剂量为0、3 Gy时,实验组KDR表达分别呈阳性和弱阳性,较对照组KDR表达均有所增强。【结论】低强度超声波对辐射后血管内皮细胞的增殖功能和KDR的表达均有提高作用。

关键词: 低强度超声波; 血管内皮细胞; 辐射; 酪氨酸激酶膜受体

中图分类号:R81

文献标识码:A

文章编号:1672-3554(2003)04-0382-04

In Vitro Study of the Effects of Low-Intensity Ultrasound on Vascular Endothelial Cells After Exposure to Irradiation

LI Xiang¹, SHEN Qiang², KUANG Dai-jun¹

(1. Department of Stomatology, Huangpu Division, The First Affiliated Hospital, 2. College of Stomatology, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510700, China)

Abstract: 【Objective】 To study the effects of low-intensity ultrasound (LIUS) on the proliferation of vascular endothelial cells (VEC) after exposure to irradiation and the expression of kinase domain receptor (KDR). 【Methods】 The third passage cells were plated at a density of 5×10^4 cells/well into six-well plates, and irradiated with 1.25 MeV γ -ray from a ⁶⁰Co source at the doses of 0, 3, 6, 9 Gy. The experimental group cells were insolated in 12, 24 hours after irradiation by LIUS (power: 0.8 W/cm², frequency: 1.6 mHz). The control group's power was 0. The proliferation of VEC and the expression of KDR were observed. 【Results】 When the irradiation dose was 0, 3, 6 Gy, the cell count ($\times 10^4$ /well) was 22.07 \pm 1.83, 21.67 \pm 1.45, 12.76 \pm 0.74 in the experimental group, and 20.08 \pm 0.49, 8.44 \pm 1.48, 4.76 \pm 0.13 in the control group, respectively. The number in the experimental group was higher than that in the control group ($P < 0.05$). LIUS had significant effect on increasing the expression of KDR in normal VEC received 0 or 3 Gy radiation. 【Conclusion】 LIUS can improve the growth of irradiated VEC and the expression of KDR in VEC.

Key words: low-intensity ultrasound; vascular endothelial cells; irradiation; kinase domain receptor

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2003, 24(4): 382 ~ 385]

颌骨放射性骨坏死 (osteoradionecrosis of jaws, ORNJ) 是头颈部恶性肿瘤放疗后常见的严重并发

收稿日期:2003-02-20

基金项目:广东省卫生厅基金资助项目(2001044)

作者简介:李祥(1971-),男,安徽蚌埠人,硕士,主治医师.

症,也是一临床难题。针对 ORNJ 的病因病理和临床特点, ORNJ 的治疗基本上是保守性的药物、高压氧、刮治术和外科手术切除。这些方法存在费用昂贵、治愈率有限以及影响口颌功能等缺陷^[1]。超声波在骨折、创伤、溃疡等方面的疗效早已被证实,但用于 ORNJ 的研究在国内外并不多见。本研究于 2000 年 9 月~2001 年 12 月通过体外实验探讨低强度超声波 (low-intensity ultrasound, LIUS) 对辐射后血管内皮细胞 (vascular endothelial cells, VEC) 的生物效应,为 LIUS 用于临床治疗 ORNJ 提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

牛胸主动脉(广州市奶牛研究所),低强度超声波仪(CZ-3型),KDR抗体(武汉博士德公司),FITC-IGG(华美公司),⁶⁰Co放疗机;型号为 Theraton 780C, SSD:80 cm。

1.2 方 法

1.2.1 血管内皮细胞的培养与分组 用酶消化法从新生小牛胸主动脉获取血管内皮细胞,行原代和继代培养。将第2代的细胞以 5×10^4 个/孔的浓度接种于6孔板内,形成第3代细胞。共取8板(48个孔),随机分成4组,每组2板;24 h后在室温下分别接受0、3、6、9 Gy 4个剂量⁶⁰Co γ 射线的辐射,辐射剂量率为:1.17 Gy/min。每板随机取3孔细胞于辐射12、24 h后用LIUS各干预一次;功率:0.8 W/cm²、频率:1.6 mHz、5 min/次;由LIUS干预的24孔细胞作为实验组。对照组为另24孔细胞(LIUS的功率设为0,其他条件均相同)。

1.2.2 内皮细胞繁殖的观测 用血平板计数法进行连续8 d的细胞计数;并记录细胞的融合时间。

1.2.3 KDR 表达的检测 在6孔板内放置载玻片,制作细胞爬片。用上述方法处理后,细胞爬片-20℃丙酮固定;滴加兔抗人KDR单抗(即用型),置37℃湿盒内30 min;滴加羊抗兔FITC-IGg二抗(效价1:10),置37℃湿盒内孵育30 min;缓冲甘油封片,荧光显微镜下观察及摄影。阳性对照为大肠癌阳性片;PBS代替一抗为阴性对照。

1.3 统计 分析

采用方差分析,取 $\alpha = 0.05$ 。

2 结 果

2.1 内皮细胞的计数及生长曲线

根据细胞计数的数值,以接种时间(d)为横坐标;细胞数为纵坐标绘制细胞生长曲线如图1图2,可见,细胞接种后的第1天,对照组辐射剂量为0 Gy时细胞也有一定的减少,但可很快恢复到原有水平。随着辐射剂量的增加,细胞数减少程度增加;3、6、9 Gy组与0 Gy组相比均有显著性差异($P < 0.01$)。在实验组中LIUS对VEC繁殖的促进作用不仅表现在0 Gy组,对3 Gy、6 Gy组的促增殖作用也是十分明显的;3 Gy组的细胞数完全能够恢复到正常水平(图2)。相同辐射剂量组细胞数比较,只有9 Gy剂量组无差异($P > 0.05$)。

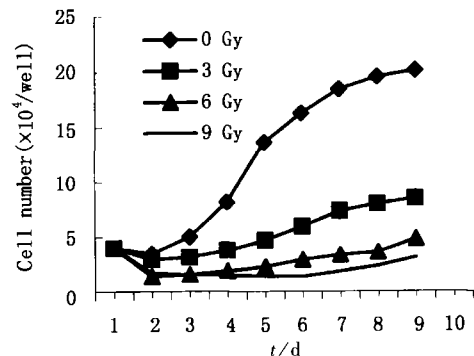


图1 对照组 VEC 生长曲线

Fig. 1 The VEC growth curve of the control group's

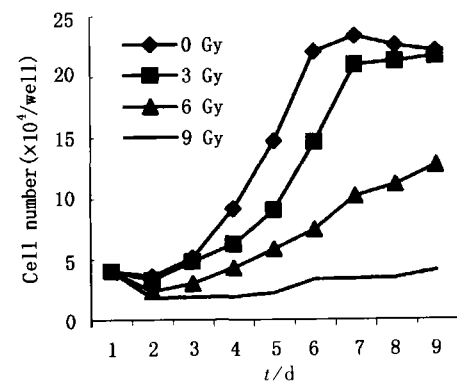


图2 实验组 VEC 生长曲线

Fig. 2 The VEC growth curve of the experimental group's

2.2 细胞融合时间

随着辐射剂量的增加,VEC的融合时间延长;LIUS干预后,VEC的融合时间有明显的缩短(表1, $P < 0.05$)。

表1 VEC的融合时间
Table 1 The time of VEC confluence

Groups	Doses			
	0 Gy	3 Gy	6 Gy	9 Gy
Control	8 d	15 d	25 d	> 4 week
Experimental	5 d	10 d	16 d	> 4 week

2.3 KDR 表达的检测

KDR 阳性片可见有大量的黄绿色荧光表达; 阴性对照组胞膜胞质内均无荧光表达。KDR 在正常体外培养的 VEC 呈弱阳性表达; 辐射后 VEC 的 KDR 呈阴性表达。实验组: 0 Gy 时 KDR 呈阳性表达; 3 Gy 时呈弱阳性; 6 Gy、9 Gy 时呈阴性表达(图 3~8)。

3 讨论

3.1 血管内皮细增殖的改变

用体外培养的方法来研究电离辐射对 VEC 的辐射效应是目前常用的手段之一。较大剂量的射线对 VEC 的增殖具有抑制作用, 且随着剂量的增加, 抑制作用越显著。在本研究中, 图 1 的结果与 Deyne 等^[2]的报道基本一致。超声波对体外培养细胞的促增殖作用是十分显著的, 但对辐射后 VEC 的生物效应研究的较少。不同条件下超声波对体外细胞的作用也大不相同。Deyne 等^[3]人使用 1 W/cm² 频率 1 MHz(1:4) 超声波的干预成纤维细胞悬液 30、60、90 s, 细胞有丝分裂指数既可达对照组的 3~4 倍; 但同时也发现有较多的细胞破解、死亡。而 P-Reher^[4]使用上述同样功率和频率的超声波干预成纤维细胞、成骨细胞 5 min, DNA 的合成率分别提高 37%、52%, 却未见细胞的脱壁、溶解和死亡的发生。不同功率、不同频率的超声波对不同细胞的作用均有差别。45 kHz 的超声波功率仅需 15 mW/cm² 和 50 mW/cm² 即可使成纤维细胞 DNA 的合成提高 52% 和 34%^[5]。

VEC 受到辐射后一定时间内, 可修复部分损伤, 如 DNA 单链在 1 h 内能够修复 90%; 亚致死性损伤一般在 12 h 内完成修复^[6]。为消除细胞自行恢复的影响, 我们在辐射后 12 h, 用 LIUS 对细胞进行第一次干预。正常 VEC 的融合时间(达到 95% 的面积)为 7~10 d; 4 Gy 时的融合时间约为 14 d; 6 Gy 时的融合时间在 20 d 左右; 当剂量大于 8 Gy 时细

胞在 4 周内不能融合^[2]。

细胞计数的实验(图 2)表明, LIUS 不但对辐射损伤较轻的 VEC 有促进作用, 提高细胞的恢复能力, 增强细胞的繁殖功能; 而且对辐射损伤较重的 VEC 也有一定的促增值效应。当辐射剂量高达 9 Gy 以上时, VEC 的损伤已十分严重, LIUS 已无法恢复。总体说来, LIUS 把 VEC 的增殖水平提高了一个层次。

3.2 LIUS 对 KDR 表达的作用

KDR 作为血管内皮细胞生长因子 (Vascular endothelial grow factor, VEGF) 的高亲和力受体之一, 属 III 型酪氨酸激酶膜受体。KDR 在正常组织中主要表达于 VEC 和造血干细胞, 在更新缓慢的 VEC 中低表达, 其主要功能与 VEC 的分化、增殖有关。电离辐射降低 VEC 表面抗原的表达已被证实, 如: CD4、CD8、HLA-ABC 等^[7]。但有关电离辐射对 KDR 表达的影响报道并不多见。Rose 等^[8]进行的体外研究发现基底膜糖蛋白 laminin-1(层粘连蛋白-1), 对 KDR 的辐射损伤具有保护作用, 当有 laminin-1 存在时, KDR 在 VEC 的表达提高 2.5 倍。此发现间接说明电离辐射对 VEC 表达 KDR 在体内外是有差别的。Kato 等^[9]人发现 VEGF 在抑制电离辐射诱导 VEC 凋亡的作用中, 辐射前加入 VEGF 比辐射后加入的抑制效果要大的多; 推测可能是由于电离辐射降低了 KDR 的表达或是 KDR 的结合位点活性下降, 从而使得 VEGF 的促增殖作用减弱。

在本研究中 KDR 在正常 VEC 呈弱阳性表达, 细胞表面只呈现较少的黄绿色荧光; 辐射后的 VEC 均无 KDR 的表达; 经 LIUS 干预后 KDR 的表达有所变化。LIUS 不但对正常 VEC 的 KDR 表达有促进作用, 对低剂量辐射后 VEC 的 KDR 表达也有一定的作用。LIUS 增强 KDR 表达的机理并无报道。一般来说 VEC 表达 KDR 的增强, 是由 VEGF 表达增强直接诱导产生的。LIUS 可增强成纤维细胞分泌 VEGF、BFGF 等细胞因子; 对 VEC 是否有相同的作用, 以及与 KDR 的表达增强是否有相关性有待进一步的研究。

总之 LIUS 不但可以促进正常 VEC 的增殖, 而且对辐射后受损的 VEC 也有较强的促增殖作用。但这一作用还要取决于细胞所损的严重程度, 或者说是辐射剂量的大小。对未受致命损伤的细胞, LIUS 可以明显提高其增殖; 而当细胞受到严重的

致命损伤时, LIUS 的促增殖作用减弱。同时 LIUS 还可显著提高 KDR 在 VEC 的表达, 即使细胞受到一定的辐射损伤时, 此作用也不会完全消失。这为我们进一步的体内实验和临床治疗研究提供了理论基础和实验依据。

(本文图 3 ~ 8 见封 4. Fig. 3 ~ 8 shown in back cover)

参考文献:

[1] Maier A, Gaggl A, Klemen H, *et al.* Review of devere osteoradionecrosis treated by surgery alone or surgery with postoperative hyperbaric oxygenation[J]. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 2000, 38(3) : 173

[2] Bertrand O F, Mongrain R, Thorin E, *et al.* *In vitro* response of human and porcine vascular cells exposed to high dose-rate γ -irradiation[J]. *Int J Radiat Biol*, 2000, 76(7): 999.

[3] DeDeyne P G, Kirsch-Volders M. *In vitro* effects of therapeutic ultrasound on the nucleus of human fibroblasts [J]. *Physical Therapy*, 1995, 75(7): 629.

[4] Reher P, Doan N, Brandnock B, *et al.* Therapeutic ultrasound for osteoradionecrosis; an *in vitro* comparison

between 1mHz and 45kHz machines[J]. *Eur J Cancer*, 1998, 34(12): 1962.

[5] Robertson V J, Ward A R. Subaqueous ultrasound: 45kHz and 1MHz machines compared[J]. *Arch Phys Med Rehabil*, 1995, 76(6): 569.

[6] 夏寿萱. 放射生物学[M]. 北京:军事医学科学出版社, 1998. 58.

[7] Asahara T, Krasinski K, Chen D. Circulating endothelial progenitor cells in perpheral blood incorporate into re-endothelialization after vascular injury[J]. *Circulation*, 1997, 96 I: 725.

[8] Rose R W, Grant D S, O'Hara M D, *et al.* The role of laminin-1 in the modulation of radiation damage in endothelial cells and differentiation[J]. *Radiat Res*, 1999, 152(1): 14.

[9] Katoh O, Tauchi H, Kawaishi K, *et al.* Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation[J]. *Cancer Res*, 1995, 55(23): 5687.

(编辑 刘清海)



(上接第 346 页 from page 346)

指标, 并可为临床治疗措施的制定提供参考。

参考文献:

[1] Roesler J M, Livingston E H, Srivatsan E, *et al.* Deletion of p15 (MTS2) in the head and neck squamous cell carcinomas [J]. *J Surg Res*, 1998, 77 (1): 50.

[2] Zhao Y, Zhang S, Fu B, *et al.* Abnormalities of tumor suppressor gene p16 and p15 in primary maxillofacial squamous cell carcinomas [J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 1999, 112 (1): 26.

[3] Shintani S, Nakahara Y, Mihara M, *et al.* Inactivation of the p14 (ARF), p15 (INK4B) and p16 (INK4A) genes is a frequent event in human oral squamous cell carcinomas [J]. *Oral Oncol*, 2001, 37 (6): 498.

[4] Geradts J, Kratzke R A, Niehans G A, *et al.* Immunohistochemical detection of the cyclin-dependent kinase inhibitor 2 / multiple tumor suppressor gene 1 (CDKN2/MTS1) product p16INK4A in archival human solid tumors: correlation with retinoblastoma protein expression [J]. *Cancer Res*, 1995, 55 (24): 6006.

[5] Warner B J, Blain S W, Seoane J, *et al.* Myc down-regulation by transforming growth factor-beta required for activation of the p15 (INK4b) G (1) arrest pathway [J]. *Mol Cell Biol*, 1999, 19 (9): 5913.

[6] Kiyota A, Shintani S, Mihara M, *et al.* Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody 225 upregulates p27(KIP1) and p15(INK4B) and induces G1 arrest in oral squamous carcinoma cell lines[J]. *Oncology*, 2002, 63 (1): 92.

[7] Peng B, Fleming J B, Breslin T, *et al.* Suppression of tumorigenesis and induction of p15(ink4b) by Smad4/DPC4 in human pancreatic cancer cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8 (11): 3628.

[8] 张 弘, 柳惠图, 石法武. p15^{INK4b}/MTS2 对人肝癌细胞增殖的影响及其机理的初步分析 [J]. *科学通报*, 2000, 45(5):521.

[9] Staller P, Peukert K, Kiermaier A, *et al.* Repression of p15^{INK4b} expression by Myc through association with Miz-1 [J]. *Nat Cell Biol*, 2001, 3(4): 392.

(编辑 刘清海)

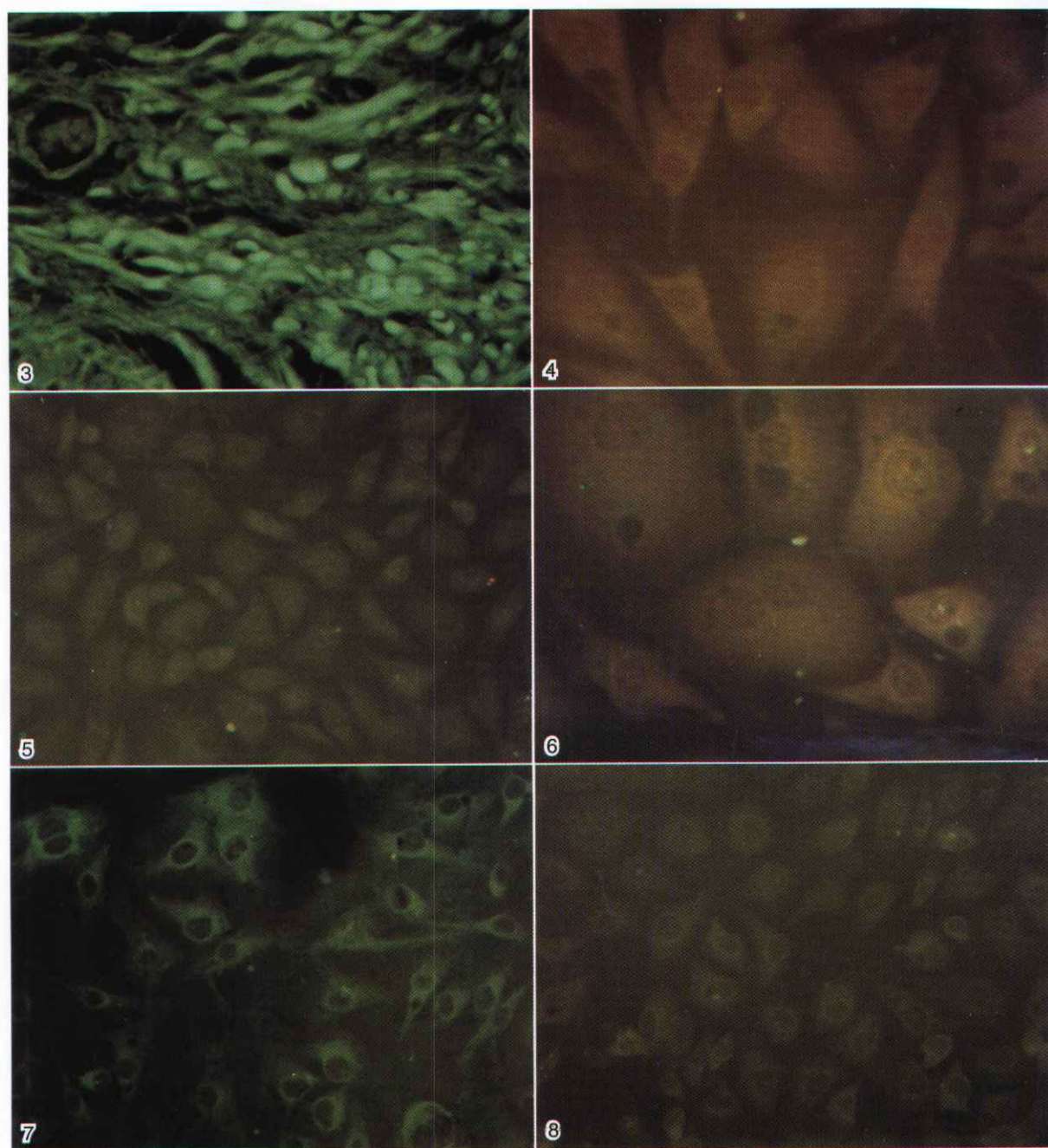


图 3 大肠癌阳性片 KDR 的表达 (免疫荧光法 $\times 100$)

图 4 KDR 的阴性片 ($\times 400$)

图 5 KDR 在正常 VEC 的表达 ($\times 100$)

图 6 对照组 3 Gy 时 KDR 的表达 ($\times 400$)

图 7 实验组 0 Gy 时 KDR 的表达 ($\times 100$)

图 8 实验组 3 Gy 时 KDR 的表达 ($\times 100$)

Fig. 3 The positive expression of KDR in colon cancer (immunofluorescent $\times 100$)

Fig. 4 The negative expression of KDR ($\times 400$)

Fig. 5 The expression of KDR in normal VEC ($\times 100$)

Fig. 6 The expression of KDR in irradiated VEC with 3 Gy ($\times 400$)

Fig. 7 The expression of KDR in experimental group with 0 Gy ($\times 100$)

Fig. 8 The expression of KDR in experimental group with 3 Gy ($\times 100$)