

· 综述 ·

超声联合微泡辅助干细胞移植治疗心肌梗死的研究进展

卞叶萍 童嘉毅 陈龙 宋佳贤

超声微泡最初只是在影像诊断领域作为超声对比剂,如今微泡在定向传递药物、基因、生物活性气体及辅助干细胞等治疗领域的应用越来越广泛^[1]。近来多项实验研究发现超声微泡在辅助干细胞移植治疗急性心肌梗死中表现出非常好的应用前景。超声辐照介导的微泡破坏,可以提高局部血管通透性、促进相关细胞因子的表达、增加梗死区域新生血管的形成,从而促进干细胞靶向归巢、改善心功能。本文对超声联合微泡在干细胞移植治疗急性心肌梗死中的研究进展做一综述。

超声联合微泡增效干细胞移植的研究

Imada 等^[2]首次利用参数为 1 MHz、2 W/cm² 的超声联合微泡干预骨髓来源的单个核细胞静脉移植治疗大鼠缺血后肢,结果发现超声联合微泡组缺血区血管新生显著增强,局部血流明显改善;在发现超声联合微泡干预可以增效干细胞移植治疗缺血骨骼肌后,研究者开始将目光转向缺血性心脏病,此后多项实验研究发现其辅助干细胞治疗心肌梗死也出现令人惊喜的结果。Zen 等^[3]用超声联合微泡介导内皮祖细胞移植治疗仓鼠缺血心肌,结果发现其能够促进内皮细胞黏附分子的表达,循环中干细胞通过黏附分子牢牢地吸附在损伤的血管内皮上,增加干细胞靶向心肌归巢数量,且超声微泡组毛细血管密度明显增加,心肌细胞密度增加,纤维化程度减轻,心脏血流灌注增加,心功能明显改善。童嘉毅等^[4]、徐琢等^[5]、李金鸽等^[6]在研究超声联合微泡对猪骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)心肌内移植归巢影响的实验中,利用超声联合微泡介导顺磁超氧化铁标记的 MSCs 冠脉内移植,磁共振扫描发现超声联合微泡组心梗区域总体低信号区较其它各组多,普鲁士蓝染色进一步提示归巢的 MSCs 数较其它组多,同时还发现超声微泡干预后能更加有效地促进缺血区毛细血管新生,改善缺血心肌的血供。而 Song 等^[7]在骨髓间充质干细胞移植治疗兔心肌梗死的过程中,观察到超声联合微泡组兔心肌梗死后心功能较空白对照组、单独超声及单独微泡组有明显改善,且毛细血管密度也增加,证实了超声联合微泡作用可以增效间充质干细胞移植效率并改善心功能。Ghanem 等^[8]在制备急性缺血再灌注大鼠模型后,给予高强度聚焦超声辐照联合微泡干预静脉移植 MSCs,并采用激光共聚焦显微镜观察 MSCs 整体及局部的迁移、内皮黏附、穿越内皮及侵入基膜的过程,结果发现,干预组心肌组织内 MSCs 数量多于非干预组,首次在体观察到 MSCs 穿越心肌内皮,证实高强度聚焦超声辐照微泡干预不仅增效了 MSCs

移植,且可促进其向缺血心肌局部的靶向归巢。Xu 等^[9]利用诊断超声作用于新西兰兔急性心肌梗死的心前区,观察到超声联合微泡介导 MSCs 移植组局部缺血心肌的 MSCs 数目较其它组增加;4 周后比较发现,毛细血管密度增加,增加了心肌血管新生,且抑制了心肌纤维化,显著改善心功能。

超声联合微泡增效干细胞移植机制的研究

一、超声联合微泡提高局部血管通透性

超声波具有热效应、机械效应和空化效应等生物学效应^[10]。空化作用就是超声波在液体中传播时,液体内部源性或外源性微气泡(空化核)在超声作用下发生振荡、膨胀、收缩及内爆等一系列动力学过程^[11]。外源性给予超声微泡可以增加空化核的数目、降低超声的空化阈值从而显著增强空化效应^[12]。空化效应产生高温、高压,同时产生冲击波,从而使内皮细胞间隙增宽以及细胞膜的通透性明显提高,甚至会使细胞膜发生暂时性可逆的小孔,导致微泡破裂周围组织的生物屏障的通透性增加^[13]。Skyba 等^[14]在 1998 年利用超声介导经股静脉注射的 Optison 微泡在大鼠骨骼肌进行局部破坏,结果发现局部直径 $\leq 7\ \mu\text{m}$ 的微血管发生了损伤,内皮细胞间隙增宽,红细胞外渗于组织间隙。李金鸽等^[6]在利用经冠状动脉移植干细胞治疗猪急性心肌梗死的实验中,发现超声联合微泡内皮细胞间隙增宽,从而使得经静脉移植的干细胞更易于迁移通过血管内皮间隙,归巢到缺血心肌组织,提高干细胞在心肌梗死区的靶向移植效率。Xu 等^[9]在利用间充质干细胞外周静脉移植治疗兔心肌梗死的研究中,也进一步证实了超声介导微泡破坏可促进靶向区血管的通透性,提高骨髓间质干细胞的移植效率。

二、超声联合微泡促进产生相关细胞因子

促进干细胞向心肌梗死区及周围部位的归巢是增效干细胞移植治疗心肌梗死的关键,趋化因子、生长因子及黏附分子是干细胞归巢过程中重要的相关因子。趋化因子中基质细胞衍生因子-1(stromal cell derived factor-1, SDF-1)及其受体(Cxc chemokine receptor 4, CXCR4)的 SDF-1/CXCR4 轴是促进 MSCs 向损伤组织归巢最重要的生物轴,组织损伤时局部受损组织 SDF-1 表达上调,使得表面表达 CXCR4 的 MSCs 向受损组织趋化归巢^[15]。而生长因子如肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)及受体的 HGF/c-met 轴、干细胞因子(stem cell factor, SCF)及受体的 SCF/c-kit 轴、粒细胞集落刺激因子、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、胰岛素样生长因子、血小板衍生因子(platelet-derived growth factor, PDGF)等均与 MSCs 的归巢相关^[16]。血管中流动的 MSCs 必须首先黏附于毛细血管才能穿过毛细血管进入受损靶器官,而 MSCs 表面表达的血管细胞黏附分子-1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)及 P-选择素等黏附分子则介导细胞之间及细胞与基质之间的黏附结合。已有许多研究发现,超声联合微泡干预可缺血心肌局部促进干细胞归巢的相关细胞因子表达上调,辅助

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2012.08.021

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81070265/H0222)高等学校博士学科点专项科研基金资助课题(20090092120059)

作者单位:210009 南京,东南大学医学院心血管病研究所(卞叶萍、陈龙、宋佳贤);东南大学附属中大医院心内科(童嘉毅)

通信作者:童嘉毅,Email:jytong88@yahoo.com.cn

循环中干细胞靶向归巢,从而增效移植。Imada 等^[2]研究发现,超声联合微泡干预后会激活 PDGF,并增加血管内皮细胞 P-选择素和细胞间黏附因子-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 表达,这些细胞因子在移植的单个核细胞与血管内皮层相接触过程归巢过程中起着重要作用。徐亚丽等^[17]发现,超声联合微泡干预后缺血区 SDF-1 及 VEGF 表达增加,推测可能是超声联合微泡作用后通过空化效应增加心血管通透性,且上调 SDF-1 及 VEGF 等表达,二者协同促进 MSCs 归巢和改善心肌梗死后的功能。Zen 等^[3]发现,超声联合微泡刺激了毛细血管 VCAM-1 及 ICAM-1 的表达,循环中干细胞通过黏附分子牢牢地吸附在损伤的血管内皮上,增加干细胞靶向心肌归巢数量,还发现缺血区域 VEGF 及碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF) 的表达也增加,通过促进血管新生来改善循环灌注。而 Zhong 等^[18]研究选择超声参数为 1 W/cm²、1 MHz,辐照心前区时间为 10 min,以 VEGF、SDF-1、VCAM-1 以及 IL-1b 作为评估局部微环境改变的主要指标,结果发现在超声联合微泡辅助 MSCs 治疗组较空白对照组 VEGF、SDF-1、VCAM-1 以及 IL-1b 表达明显增高,且显著增加了 MSCs 的靶向归巢,进一步证实了超声介导微泡破坏后引起局部心肌微环境的变化可能是增效 MSCs 移植治疗的主要原因。

三、超声联合微泡促进梗死区血管新生

梗死区域的血管新生是一个非常复杂的过程,需要多种因子对其进行调控。现已发现的最重要的能促进血管新生的因子是 VEGF,其它促进血管新生的因子还有 bFGF、HGF、表皮生长因子、血管生成素-1、白细胞介素-8、PDGF 等^[19]。超声联合微泡促进梗死区血管新生主要通过直接引起炎症反应促进血管新生和介导外源基因转染促进血管新生来实现的^[20]。直接引起炎症反应促进血管新生,主要是通过超声空化效应使得局部血管破裂,内皮细胞间隙增宽,使得红细胞等血管内容物外渗并在局部产生炎症反应,所产生的炎症因子可促进局部组织血管新生。而微泡作为载体还能介导促血管生成的外源基因定向传递从而促进血管新生。Zhang 等^[21]研究发现,超声联合微泡干预导致缺血骨骼肌血管周围炎症反应,并促进炎症细胞产生 VEGF 等,从而推测这可能是超声联合微泡促进血管新生的主要机制。此后 Zen 等^[3]、Ghanem 等^[8]、Xu 等^[9]的研究发现,在超声联合微泡干预后 VEGF 表达都升高。Wang 等^[22]利用携带 VEGF 基因的微泡经静脉注射到急性心肌梗死兔的缺血心肌,在超声靶向介导微泡破坏后,梗死心区的 VEGF 表达明显上调,与对照组和无超声介导的携带 VEGF 基因微泡静注后比较,局部血管新生显著,心功能得到改善。除 VEGF 外,有多项研究也成功的应用超声造影剂这种新型的基因转移载体转载 bFGF^[23]、HGF^[24] 及 HIF-1 α ^[25] 等基因,将这些基因无创地转移至受损心肌,可明显提高目的基因的转染效率,促进缺血心肌血管再生,改善心肌缺血。

目前存在的问题及展望

目前的研究虽然发现超声联合微泡可以提高干细胞移植效率,但仍存在一系列问题。超声辐照介导的微泡破坏可能引起组织出血、血管内溶血、含气组织及器官损伤等不良反应,这些不良反应都与超声的机械参数密切相关。目前实验研究中对于超声参数,如频率、声压、声强、作用时间等标准尚未统一,因此

还需要大量系统地研究对微泡介导超声的相关超声参数进行优化,以求将不良反应降到最低而疗效最佳。对于超声微泡种类的选择及输注剂量目前也无统一标准,过大剂量的超声微泡可能会导致微栓塞,而过小剂量的微泡可能会导致辅助治疗效果不佳,因此微泡种类的选择及浓度的优化也是亟待解决的问题。此外,超声微泡增效干细胞移植的具体机制目前仍不明确,有待进一步研究。动物实验的研究结果证实超声联合微泡干预可以增效干细胞移植治疗急性心肌梗死,但由于目前具体机制尚不明确,且应用于人体的安全性、有效性等尚待进一步研究,因此距离临床应用还有一定距离。目前越来越多的研究发现,微泡可以作为载体靶向传递相关药物、基因增效干细胞移植治疗心肌梗死,相信随着多学科交叉融合的进一步深入,超声微泡造影剂必将在急性心肌梗死的治疗中发挥更大的作用,具有广阔的应用前景。

参 考 文 献

- [1] Kiessling F, Fokong S, Koczera P, et al. Ultrasound microbubbles for molecular diagnosis, therapy, and theranostics. *J Nucl Med*, 2012, 53: 345-348.
- [2] Imada T, Tatsumi T, Mori Y, et al. Targeted delivery of bone marrow mononuclear cells by ultrasound destruction of microbubbles induces both angiogenesis and arteriogenesis response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25: 2128-2134.
- [3] Zen K, Okigaki M, Hosokawa Y, et al. Myocardium-targeted delivery of endothelial progenitor cells by ultrasound-mediated microbubble destruction improves cardiac function via an angiogenic response. *J Mol Cell Cardiol*, 2006, 40: 799-809.
- [4] 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. *中国心血管病研究*, 2008, 6: 771-773.
- [5] 徐琢, 冯毅, 童嘉毅, 等. 超声微泡辅助干细胞移植治疗急性心肌梗死的实验研究. *东南大学学报(医学版)*, 2008, 27: 192-194.
- [6] 李金鸽, 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. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13: 4421-4425.
- [7] Song X, Zhu H, Jin L, et al. Ultrasound-mediated microbubble destruction enhances the efficacy of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation and cardiac function. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2009, 36: 267-271.
- [8] Ghanem A, Steingen C, Brenig F, et al. Focused ultrasound-induced stimulation of microbubbles augments site-targeted engraftment of mesenchymal stem cells after acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*, 2009, 47: 411-418.
- [9] Xu YL, Gao YH, Liu Z, et al. Myocardium-targeted transplantation of mesenchymal stem cells by diagnostic ultrasound-mediated microbubble destruction improves cardiac function in myocardial infarction of New Zealand rabbits. *Int J Cardiol*, 2010, 138: 182-195.
- [10] Miller DL, Averkiou MA, Brayman AA, et al. Bioeffects considerations for diagnostic ultrasound contrast agents. *J Ultrasound Med*, 2008, 27: 611-632.
- [11] Miller DL. Overview of experimental studies of biological effects of medical ultrasound caused by gas body activation and inertial cavitation. *Prog Biophys Mol Biol*, 2007, 93: 314-330.
- [12] Stride EP, Coussios CC. Cavitation and contrast: the use of bubbles in ultrasound imaging and therapy. *Proc Inst Mech Eng H*, 2010, 224:

- 171-191.
- [13] Li P, Cao LQ, Dou CY, et al. Impact of myocardial contrast echocardiography on vascular permeability: an in vivo dose response study of delivery mode, pressure amplitude and contrast dose. *Ultrasound Med Biol*, 2003, 29:1341-1349.
- [14] Skyba DM, Price RJ, Linka AZ, et al. Direct in vivo visualization of intravascular destruction of microbubbles by ultrasound and its local effects on tissue. *Circulation*, 1998, 98:290-293.
- [15] Ghadge SK, Mühlstedt S, Özcelik C, et al. SDF-1 α as a therapeutic stem cell homing factor in myocardial infarction. *Pharmacol Ther*, 2011, 129:97-108.
- [16] Lapidot T, Dar A, Kollet O, et al. How do stem cells find their way home? *Blood*, 2005, 106:1901-1910.
- [17] 徐亚丽, 高云华, 刘永亮, 等. 旁分泌效应联合超声生物学效应在 MSCs 归巢与修复缺血心肌的作用. *中国超声医学杂志*, 2009, 25: 920-924.
- [18] Zhong S, Shu S, Wang Z, et al. Enhanced homing of mesenchymal stem cells to the ischemic myocardium by ultrasound-targeted microbubble destruction. *Ultrasonics*, 2012, 52:281-286.
- [19] Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, 2011, 473:298-307.
- [20] 杨彦, 陈庆伟. 超声微泡在缺血性血管疾病诊断与治疗中的研究进展. *中华超声影像学杂志*, 2010, 19:1082-1084.
- [21] Zhang Q, Wang Z, Ran H, et al. Enhanced gene delivery into skeletal muscles with ultrasound and microbubble techniques. *Acad Radiol*, 2006, 13:363-367.
- [22] Wang ZG, Ling ZY, Ran HT, et al. Ultrasound-mediated microbubble destruction enhances VEGF gene delivery to the infarcted myocardium in rats. *Clin Imaging*, 2004, 28:395-398.
- [23] Chappell JC, Song J, Burke CW, et al. Targeted delivery of nanoparticles bearing fibroblast growth factor-2 by ultrasonic microbubble destruction for therapeutic arteriogenesis. *Small*, 2008, 4:1769-1777.
- [24] Li X, Wang Z, Ran H, et al. Experimental research on therapeutic angiogenesis induced by hepatocyte growth factor directed by ultrasound-targeted microbubble destruction in rats. *J Ultrasound Med*, 2008, 27: 453-460.
- [25] Xie J, Liao Y, Yang L, et al. Ultrasound molecular imaging of angiogenesis induced by mutant forms of hypoxia-inducible factor-1 α . *Cardiovasc Res*, 2011, 92:256-266.

(修回日期:2012-06-20)

(本文编辑:汪 玲)

· 消息 ·

国际物理医学与康复医学学会第七届世界大会 (ISPRM2013) 征文通知

由中华医学会、中国康复医学会、中华医学会物理医学与康复学分会、香港康复医学会共同承办的国际物理医学与康复医学学会第七届世界大会将于 2013 年 6 月 16 ~ 20 日在北京国家会议中心召开。现向全球公开征集会议报告论文。

征文要求:(1)未在国内外公开发刊物上发表、未在国际会议上宣读;(2)正文不超过 250 个英文词(不含题目、作者、单位);(3)标题大写,正文包括:Objective、Method、Results、Implications/Impact on Rehabilitation 四个部分;(4)投稿者以第一作者身份最多投稿 3 篇。(5)稿件语言:英语。

征文内容:物理与康复医学临床研究、物理与康复医学分子、细胞、器官功能和结构等生物学研究、康复学的生物医学与工程、康复的总体设计、人类功能学等相关领域。

投稿方式:本次大会只接收网上投稿,官方网站为 www.isprm2013.com,恕不接受电子邮件投稿。

稿件录用:会议录用稿件将在康复医学杂志(*Journal of Rehabilitation Medicine*)杂志增刊上刊登。

优秀论文:会议将评审出若干优秀论文,并在闭幕式上颁奖。如希望参加评奖,需在投稿时标注。

投稿截止时间:2013 年 1 月 15 日。

大会秘书处:中华医学会学术会务部陈晨,联系电话:010-85158148;E-mail: abstracts@isprm2013.org。

欢迎踊跃投稿、参会。

中华医学会学术会务部