

· 基础研究 ·

低频超声干预兔颈动脉粥样硬化斑块的研究

陈云波 李长清 宋琦 许川山 虞乐华

【摘要】目的 观察不同强度的体外低频低强度超声对颈动脉粥样硬化斑块中平滑肌细胞增殖和凋亡的影响。**方法** 将新西兰大白兔按照高脂饮食加空气干燥法建立颈动脉粥样硬化模型,随后随机分成正常对照组(对照组,6 只)和 4 个超声组(每组 6 只),4 个超声组根据超声的强度和频率分别为 A 组(0.5 W/cm^2 , 5 min/d)、B 组(0.5 W/cm^2 , 10 min/d)、C 组(1 W/cm^2 , 5 min/d)和 D 组(1 W/cm^2 , 10 min/d),超声作用每日 1 次,20 d 之后取颈动脉手术部位做病理切片。分别用增殖细胞核抗原(PCNA)染色和末端脱氧核糖核酸转移酶介导的脱氧三磷酸尿苷(dUTP)-生物素平移末端标记法(TUNEL)染色分析血管平滑肌细胞(VSMC)增殖和凋亡情况,并计算细胞增殖率(PCNA%)和细胞凋亡率(TUNEL%)。**结果** 各超声组颈动脉内膜内 PCNA 阳性细胞率较对照组有不同程度的减少,其中 B、C、D 组与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);各超声组颈动脉内膜中 TUNEL 阳性细胞率较对照组有不同程度增加,其中 B、C、D 组与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。B、C、D 组相互比较 PCNA% 和 TUNEL%,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 体外低频低强度(0.5 W/cm^2 , 10 min/d)超声具有明显诱导家兔颈动脉粥样硬化血管平滑肌细胞凋亡和抑制增殖的作用。

【关键词】 低频超声; 动脉粥样硬化; 平滑肌细胞; 凋亡; 细胞增殖

The effects of low frequency ultrasound on the proliferation and apoptosis of smooth muscle cells in carotid atherosclerosis CHEN Yun-bo*, LI Chang-qing, SONG Qi, XU Chuan-shan, YU Le-hua. * Department of Neurology, Centre of Rehabilitation and Physiotherapy, The Second Affiliated Hospital of ChongQing University of Medical Sciences, Chongqing 400010, China

【Abstract】Objective To investigate the effects of low frequency ultrasound (LFU) on the proliferation and apoptosis of smooth muscle cells (SMCs) in rabbits with carotid atherosclerosis (CA). **Methods** CA models were established in 30 New Zealand rabbits using a high fat diet and air-drying. They were randomly divided into a control group and four LFU groups: group A received 0.5 W/cm^2 LFU for 5 min/d, group B 0.5 W/cm^2 for 10 min/d, group C 1 W/cm^2 , 5 min/d, and group D 1 W/cm^2 , 10 min/d. The rabbits' carotid arteries were autopsied after 20 d of the LFU treatment. The expression of PCNA and TUNEL staining were used to explore the proliferation and apoptosis of SMCs, and the proliferation rates (PRs) and apoptosis rates (ARs) were calculated. **Results** Compared with the control group, the PRs in groups B, C and D were significantly lower, while the ARs in groups B, C and D were significantly higher. There was no significant difference in ARs or PRs among groups B, C and D. **Conclusion** LFU can induce SMC apoptosis and inhibit SMC proliferation in rabbits with CA.

【Key words】 Low frequency ultrasound; Atherosclerosis; Smooth muscle cells; Apoptosis; vascular smooth muscle cell proliferation

动脉粥样硬化的发病机制和病理生理过程很复杂,对其中的很多细节目前依然缺乏足够的认识,也存在很多争论。较为公认的发病过程是血管内皮损伤之后,血液成分(主要是脂质)沉积到内皮下形成脂质条纹,随后,中膜的平滑肌细胞增殖向内膜迁移,并分泌细胞外基质,形成纤维帽,部分平滑肌细胞吞噬脂质转变成泡沫细胞,最后坏死崩解形成脂

质核心。平滑肌细胞的异常增殖是影响动脉粥样硬化病理过程的重要因素。近年来发现,一定强度超声能量能够影响细胞增殖和诱导细胞凋亡^[1,2]。低频段超声($< 100 \text{ kHz}$)具有比中频段超声($800 \sim 3\,000 \text{ kHz}$)穿透更深、空化作用更强等特性^[3],更有利于血栓消融,特别是 $20 \sim 40 \text{ kHz}$ ^[4] 超声,逐渐成为一些超声治疗研究的重要频段。本研究在国际公认的人体超声安全强度范围内,观察 20 kHz 超声对实验性兔颈动脉粥样硬化平滑肌细胞增殖和凋亡的影响,并探讨其作用机制。

作者单位:400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院神经内科(陈云波、李长清),康复理疗中心(宋琦、许川山、虞乐华)

通讯作者:虞乐华

材料与方法

一、实验动物与主要器材和试剂

健康新西兰大白兔 30 只,雌雄不拘,体重 3.0 ~ 3.5 kg,由第三军医大学实验动物中心提供;胆固醇(化学纯)由广州天马精细化工厂提供,批号 040810;实验用超声治疗仪(声强范围为 0 ~ 1 W/cm²,频率为 20 kHz)由重庆普及机电有限公司提供;抗兔增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)抗体由武汉博士德生物工程有限公司提供;末端脱氧核酸转移酶介导的 dUTP-生物素平末端标记法(Terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling, TUNEL)检测凋亡试剂盒由美国 Roche 公司提供。

二、实验动物分组

将 30 只大白兔分为对照组(6 只)和超声组(24 只),超声组的超声频率为 20 kHz,连续输出,根据超声的声强和作用时间又分为 4 个亚组(每组 6 只),分别为 A 组(声强为 0.5 W/cm²,每天作用时间为 5 min),B 组(声强为 0.5 W/cm²,每天作用时间为 10 min),C 组(声强为 1 W/cm²,每天作用时间为 5 min),D 组(声强为 1 W/cm²,每天作用时间为 10 min)。

三、兔颈动脉粥样硬化模型的建立^[5]

先给予普通兔饲料适应性喂养 10 d 后改为高脂饲料(79% 普通兔饲料 + 1% 胆固醇 + 10% 猪油 + 10% 蛋黄粉)喂养,每日 100 g。10 d 后行右侧颈动脉空气干燥术:动物经 25% 乌拉坦(1 g/kg 体重)静脉麻醉,颈部脱毛清洁消毒后,行颈正中切口,分离右侧颈总动脉,以临时动脉夹阻断气管甲状软骨水平约 2.5 cm 范围颈动脉的血流。4 1/2 号头皮针由近心端穿入阻断的血管,至远心端穿出,然后退回管腔内。抽吸干管腔内残余血液后,接上流量已调节到 250 ml/min 的医用氮气气流,历时 10 min 造成内皮干燥,然后管腔内重新充满生理盐水,放开临时动脉夹,恢复血流。以生理盐水敷料压迫穿刺点 10 min 止血,青霉素 50 万 U 冲洗手术区域,缝合皮肤创口并包扎。术后再给予高脂饮食喂养 40 d。开始高脂饮食之前以及高脂饮食 50 d 后,分别做右侧颈动脉彩色多普勒超声检查,发现有血流充盈缺损,明显斑块形成的大白兔即确认为入组动物。

四、体外超声干预

超声组大白兔用兔盒固定并脱去颈前区毛发,尽量暴露颈动脉体表投影范围,所有动物均取右侧颈动脉气管甲状软骨水平上下约 5 cm 范围,用移动法进行超声干预,同时用耦合剂保持超声探头与动物皮肤接

触良好,按 4 个亚组设定的条件分别给予超声 20 d。

五、取材和病理分析

超声组超声干预 20 d 之后处死所有动物,取右侧颈动脉手术部位做石蜡切片,HE 染色观察颈动脉病理变化,另外行 PCNA 染色和 TUNEL 染色,分析阳性细胞率。阳性细胞率的计算方法是:400 倍光镜下,每张切片取 5 个视野计数正常细胞和阳性增殖或凋亡细胞,阳性细胞率 = 平均染色阳性细胞核数/所有细胞核数 × 100%。

六、统计学分析

用 SPSS 12.0 软件进行统计学分析,所有数据均用($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、动物一般情况

经超声作用之后,大白兔未见有明显的行为异常,进食正常,肉眼观察超声作用局部无皮肤发红、破损,作用部位下方肌肉等组织无明显充血、损伤。

二、动脉模型建立情况

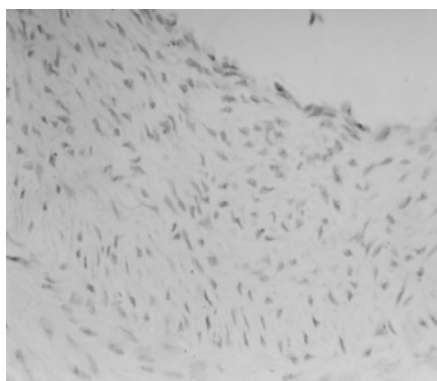
2 只大白兔在实施动脉干燥术时麻醉意外死亡,3 只动物在喂养高脂 50 d 之后经彩色多普勒超声检查见颈动脉管壁粗糙,但无明显的斑块形成,因此舍弃。其余大白兔手术处血管壁均呈现出不同程度的粗糙,彩色血流成像显示充盈缺损,出现蓝色信号湍流,有粥样斑块形成,斑块呈稍强回声,后方可见声影,血流在狭窄处明显加快,频谱形态异常。经补充数量后共 30 只大白兔入组。

三、病理组织学观察

颈动脉标本肉眼观察可见手术部位变粗、弯曲,质地变硬,纵向剖开后明显可见切面颜色呈乳白色,管壁变厚,斑块形成,管腔变细,各组均未见有血栓形成。HE 染色可见血管内膜增厚,管腔狭窄,部分中膜弹力纤维断裂失去连续性,大量平滑肌细胞向内膜迁移,增殖,部分在内膜基底部的平滑肌细胞吞噬脂质后转变成泡沫细胞,少数出现坏死。

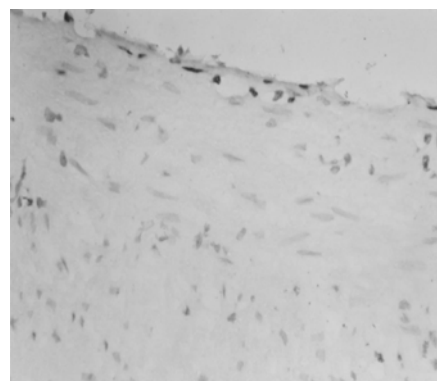
四、超声对粥样硬化血管平滑肌细胞增殖的影响

经 PCNA 染色苏木素复染后,各组内膜层可见大量核被染成褐色的阳性平滑肌细胞(图 1、图 2),尤以内膜基底部最为明显,对照组与 A、B、C、D 组的阳性细胞率分别为(53.4 ± 3.9)%, (50.1 ± 4.2)%, (47.6 ± 5.2)%, (47.5 ± 3.3)%, (46.9 ± 2.0)%(表 1),各超声组 PCNA 阳性细胞率较对照组减少,B 组、C 组及 D 组与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。B 组、C 组以及 D 组之间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。



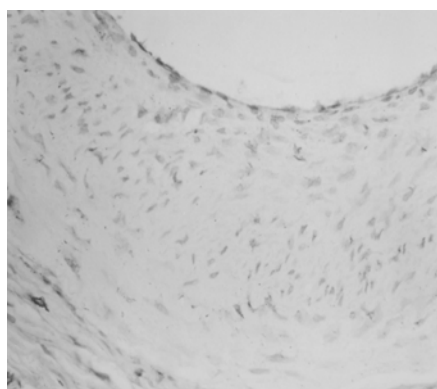
注:血管内膜层可见大量细胞核被染成黄褐色的平滑肌细胞

图1 对照组颈动脉(PCNA染色, ×400)



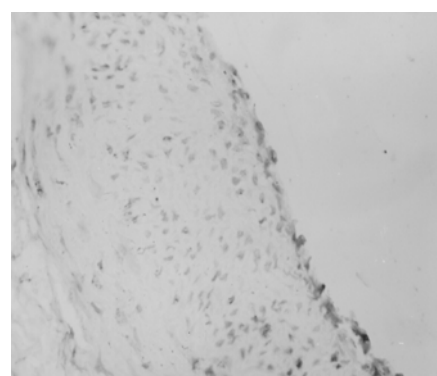
注:血管内膜层可见散在的核被染成深褐色的平滑肌细胞

图3 对照组颈动脉(TUNEL染色, ×400)



注:血管内膜中 PCNA 染色阳性的平滑肌细胞明显较对照组减少

图2 D组颈动脉(PCNA染色, ×400)



注:D组动脉内膜层中大量 TUNEL 染色阳性的平滑肌细胞,较对照组明显增加

图4 D组颈动脉(TUNEL染色, ×400)

表1 各组 PCNA 染色后的平滑肌细胞阳性率(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	PCNA 染色
对照组	6	53.4 ± 3.9
A组	6	50.1 ± 4.2
B组	6	47.6 ± 5.2 *
C组	6	47.5 ± 3.3 *
D组	6	46.9 ± 2.0 *

注:与对照组比较, * $P < 0.05$

表2 各组 TUNEL 染色后的平滑肌凋亡细胞阳性率(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	TUNEL 染色
对照组	6	34.8 ± 2.6
A组	6	36.4 ± 2.3
B组	6	39.4 ± 2.8 *
C组	6	39.5 ± 3.4 *
D组	6	40.1 ± 2.9 *

注:与对照组比较, * $P < 0.05$

五、超声对粥样硬化血管平滑肌细胞凋亡的影响

TUNEL 染色显示各组内膜层均可见细胞核被染成黄褐色的 TUNEL 阳性平滑肌细胞(图3、图4),各超声组 TUNEL 阳性细胞数较对照组都有不同程度增加,对照组与 A、B、C、D 组的 TUNEL 阳性细胞率分别为 $(34.8 \pm 2.6)\%$, $(36.4 \pm 2.3)\%$, $(39.4 \pm 2.8)\%$, $(39.5 \pm 3.4)\%$, $(40.1 \pm 2.9)\%$, B 组、C 组及 D 组与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。B 组、C 组及 D 组之间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表2。

讨 论

动脉粥样硬化是心脑血管病的重要危险因素和病因,其防治一直是研究的热点。在动脉粥样硬化的病

理生理变化过程中,血管平滑肌细胞的异常增殖是一个非常重要的环节。正常情况下,动脉内膜中只有极少数的平滑肌细胞,在多种因素(如血小板源性生长因子、氧化低密度脂蛋白)的直接或间接作用下,血管中膜的平滑肌细胞迁徙进入内膜并大量增殖,分泌细胞外基质,与内皮细胞、炎性细胞等形成复杂的相互关系网络^[1]。组织学观察表明,在动脉粥样硬化血管管壁中平滑肌细胞的异常增殖是造成血管壁增厚以及管腔狭窄的主要原因之一。有的研究者认为,抑制血管平滑肌细胞的增殖和诱导其凋亡是可能的干预靶点^[2]。

超声波具有机械作用、热效应以及特有的空化作用,超声波作用于机体后会产生一系列的生物学效应。

近年来发现,一定的超声能量能够影响细胞增殖和诱导细胞凋亡^[3,6]。不同强度的超声的效应不同,较低强度超声使 DNA 合成增加,促进细胞增殖;稍高强度超声使细胞膜和 DNA 损伤,抑制细胞增殖,促进细胞凋亡^[7]。增殖旺盛、异常增殖的组织细胞(如肿瘤细胞)对超声尤其敏感^[8]。实验证实,体外培养的平滑肌细胞在受到低强度超声作用后容易出现凋亡增加和增生受抑制,而同样条件的超声对血管内皮细胞影响则较小^[9]。有研究表明,在动物实验中,经超声波作用后血管支架置入后再狭窄的血管平滑肌细胞有凋亡增加和增殖减少的趋势^[10]。支架置入术后再狭窄也是同血管平滑肌细胞异常增殖密切相关的一种病理情况,这与动脉粥样硬化颇为相似。目前,低频低强度超声对动脉粥样硬化血管平滑肌细胞的生物学效应目前还很少有相关报道。在本研究发现,各组的颈动脉内膜层都出现明显的平滑肌细胞增殖和程度不同的凋亡现象,PCNA 阳性表达的细胞大都在接近内膜基底部。各超声组 PCNA 阳性细胞率较对照组都有不同程度降低,其中 B 组、C 组、D 组与对照组之间的差异有统计学意义($P < 0.05$)。血管平滑肌细胞凋亡率在对照组为 $(34.8 \pm 2.6)\%$,与文献报道人的粥样斑块中的情况接近。各超声组较对照组血管平滑肌细胞凋亡率有程度不同的增加,B、C、D 组与对照组的差异有统计学意义($P < 0.05$)。我们采用高脂饮食加空气干燥法建立了动物模型,该方法具有重复性好、操作简便、与生理情况的动脉粥样硬化病变接近的特点^[10]。另外,实验发现,B 组、C 组、D 组之间的 PCNA 阳性细胞率减少和血管平滑肌细胞凋亡率增加,相互比较差异无统计学意义,因此,我们认为, 0.5 W/cm^2 、 10 min/d 即达到 1 W/cm^2 、 10 min/d 的干预效果,这可能与本实验采用的强度范围比较窄,没有发现明显量效关系有关。

本研究结果提示,对人体安全的 20 kHz 连续输出, 0.5 W/cm^2 、 10 min/d 低频超声干预大白兔动脉区,可以诱导致动脉粥样硬化斑块平滑肌细胞增殖减少和凋亡增加,这为临床提供了一种抗动脉粥样硬化的新思路。

参 考 文 献

- 1 Ashush H, Rozenszajn LA, Blass M, et al. Apoptosis induction of human myeloid leukemia cells by ultrasound exposure. *Cancer Res*, 2000, 60: 1014-1020.
- 2 Reher P, Doan N, Bradnock B, et al. Therapeutic ultrasound for osteoradionecrosis: an in vitro comparison between 1 MHz and 45 kHz machines. *Eur J Cancer*, 1998, 34: 1962-1968.
- 3 孙星炯, 陈景藻. 低频超声的作用和研究前景. 国外医学. 物理医学与康复学分册, 2001, 21: 120-122.
- 4 刘丛, 程远, 于锐, 等. 低频超声对猪脑内血肿助溶作用的实验研究. *中国超声医学杂志*, 2005, 21: 81-84.
- 5 张磊, 陈国荣, 郑荣远, 等. 高脂饲料加空气干燥术建立兔颈动脉粥样硬化模型. *中国动脉硬化杂志*, 2001, 9: 155-158.
- 6 Nishikori T, Ochi M, Uchio Y. Effects of low-intensity pulsed ultrasound on proliferation and chondroitin sulfate synthesis of cultured chondrocytes embedded in Atelocollagen gel. *J Biomed Mater Res*, 2002, 59: 201-206.
- 7 Feril LB, Kondo T, Zhao QL, et al. Enhancement of hyperthermia-induced apoptosis by non-thermal effects of ultrasound. *Cancer Lett*, 2002, 178: 63-70.
- 8 Lawrie A, Briskin AF, Francis SE, et al. Ultrasound enhances reporter gene expression after transfection of vascular cells in vitro. *Circulation*, 1999, 99: 2617-2620.
- 9 王新, 黄晶, 唐艺加, 等. 超声辐照对大鼠颈总动脉损伤后细胞凋亡的影响. *临床超声医学杂志*, 2004, 6: 4-6.
- 10 Bennett MR, Evan GI, Schwartz SM, et al. Apoptosis of human vascular smooth cells derived from normal vessels and coronary atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*, 1995, 95: 2266-2274.

(修回日期: 2006-10-31)

(本文编辑: 松 明)

· 消息 ·

脊柱疾病康复评定和康复治疗技术培训班

为了推进我国脊柱疾病康复评定和治疗的水平,增强对国外该领域中的新知识和新技术的了解,北京大学第一医院物理医学康复科特别邀请了英国国家物理治疗学会常务委员、Glasgow 物理治疗及运动损伤医院院长 G. Smith 教授于 2007 年 3 月 25 ~ 30 日在北京举办脊柱疾病康复评定和康复治疗技术培训班。此次学习班将重点介绍颈、腰椎的临床检查方法和包括关节松动术在内的康复治疗新技术。学习班以理论授课、技术演示和实习指导相结合的方式,紧密联系临床,强调实用性。

学费及学分: 学费 950 元, 资料费 50 元, 食宿统一安排, 费用自理。考试合格者授予国家级 I 类继续教育学分 13 学分及结业证(带一张照片)。报到地点: 北京市西城区大红罗厂街 1 号北京大学第一医院第二住院部教学楼一层。通信地址: 回执请于 2007 年 3 月 10 日前寄到 100034 北京大学第一医院物理医学康复科 黄真收; Email: huangzhen6313@yahoo.com.cn; 电话: 010 - 66551122 转 2455 或 2457。若无第二轮通知, 请按时报到。

北京大学第一医院