.基础研究.

超声微泡对骨髓间充质干细胞 CXC 类趋化因子 受体 4 表达的影响

陈龙 童嘉毅 沈祥波 下叶萍 徐艳娟 马根山

目的 探讨超声微泡(UM)对骨髓间充质干细胞(BMSCs)CXC 类趋化因子受体 4(CXCR4)表 【摘要】 达的影响及可能机制。方法 取雄性 SD 大鼠骨髓,将培养至第3代生长良好的 BMSCs 分为对照组、超声 (US)组、UM组、UM+过氧化氢酶组(UMC组)、UM+AMD3100组(UMA组)、UM+抗CXCR4抗体组(UMCX 组)。对照组不予特殊处理, US 组采用频率为1 MHz、强度为1 W/cm² 的 US 辐照 30 s, UM 组在 US 组基础上 加入微泡, UMC 组在 UM 组基础上加入过氧化氢酶, UMA 组在 UM 组基础上加入 AMD3100, UMCX 组在 UM 组基础上加入 CXCR4 抗体。采用 qPCR 和 Western blotting 技术测定对照组、US 组、UM 组及 UMC 组CXCR4 mRNA 的转录和蛋白表达水平;干预后即刻、5 min、15 min,在显微镜下观察经 Fluo-4/AM 标记的对照组、US 组、UM组 BMSCs 胞内荧光强度;采用迁移实验观察 6组 BMSCs 向基质衍生因子-1a(SDF-1a)的趋化能力。 结果 US组 BMSCs CXCR4 mRNA 转录和蛋白表达水平与对照组比较,差异无统计学意义(P>0.05),但均低 于 UM 组(P<0.05); UMC 组 BMSCs CXCR4 mRNA 转录和蛋白表达水平均较 UM 组低(P<0.05)。US 组细胞 内的荧光强度与对照组比较,差异无统计学意义(P>0.05),但均低于 UM 组(P<0.05)。US 组向SDF-1a的移 行细胞数(22.4±2.2)与对照组(20.5±2.3)比较,差异无统计学意义(P>0.05),但均少于 UM 组(53.1±3.8)(P< 0.05); UMC 组(35.2±3.1)、 UMA 组(32.5±2.8) 和 UMCX 组(30.7±2.9) 向 SDF-1α 的移行细胞数均较 UM 组减 少(P<0.05)。结论 UM 可以促进 BMSCs CXCR4 的转录和表达,增加 BMSCs 向 SDF-1α 的移行数,该效应可 能与钙离子的内流增加有关。

【关键词】 超声微泡; 骨髓间充质干细胞; CXCR4; 钙离子

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81070083;81070265);江苏省自然科学基金资助项目(BK2012338)

Effects of ultrasound-exposed microbubbles on CXC chemokine receptor 4 expression of bone marrow mesenchymal stem cells Chen Long^{*}, Tong Jiayi, Shen Xiangbo, Bian Yeping, Xu Yanjuan, Ma Genshan. ^{*} Cardiovascular Department, Zhongda Hospital, Southeast University. Nanjing 210009, China Corresponding author: Tong Jiayi, Email: jytong88@ aliyun.com

[Abstract] Objective To explore the effects of ultrasound-exposed microbubbles (UM) on the expression of CXC chemokine receptor 4 (CXCR4) in bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) and the mechanisms involved. Methods Mesenchymal stem cells were isolated from bone marrow taken from male Sprague-Dawley rats. They were divided into a control group, an ultrasound (US) group, an ultrasound-exposed microbubbles (UM) group, a UM plus catalase (UMC) group, a UM plus AMD3100 (UMA) group, and a UM plus anti-CXCR4 antibody (UMCX) group. The control group was not given any treatment. The US group was treated with 1 MHz ultrasound at 1 Watt per square centimetre for 30 seconds. The UM group was treated with ultrasound plus microbubbles. The UMC group was treated with catalase, microbubbles and ultrasound. The UMA group was treated with AMD3100, microbubbles and ultrasound. The UMCX group was treated with anti-CXCR4 antibody, microbubbles and ultrasound. The UMCX group was treated with anti-CXCR4 antibody, microbubbles and ultrasound. The UMCX group was treated with anti-CXCR4 antibody, microbubbles and ultrasound. The UMCX group was treated with anti-CXCR4 antibody, microbubbles and ultrasound. The UMCX group was treated with fluorescence intensities were observed in the cells labeled with Fluo-4/AM of the control group, US group and UM group under a fluorescence microscope. Migration assays were conducted to determine the chemotactic ability of the BMSCs with respect to stromal-derived factor- 1α (SDF- 1α) in all six groups. **Results** No significant differences were

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2016.03.001

作者单位:210009 南京,东南大学附属中大医院心内科(陈龙、童嘉毅、沈祥波、徐艳娟、马根山);江苏省级机关医院重 症医学科(卞叶萍);东南大学附属中大医院无锡分院(陈龙、马根山)

通信作者:童嘉毅,Email: jytong88@ aliyun.com

found in the levels of CXCR4 mRNA transcription and protein expression between the US and control groups (P>0.05), but the levels in those groups and the UMC group were lower than those observed in the UM group. Fluorescence intensity in the cells of the US group was not significantly different from that in the control group (P>0.05), but those levels were both significantly lower than that in the UM group (P<0.05). There was no significant difference in the number of cells migrating to the SDF-1 α between the US (22.4±2.2) and control group (20.5±2.3). However, the number of cells migrating to SDF-1 α in the UM group (53.1 ± 3.8) was significantly larger than that in the US group, the control group, the UMC group (35.2 ± 3.1), the UMA group (32.5 ± 2.8) and the UMCX group (30.7 ± 2.9) (P<0.05). **Conclusion** UM can increase mRNA transcription and the expression of CXCR4 protein in BMSCs, and promote BMSCs migration to SDF-1 α . This may in part be mediated by an increase in calcium influx.

[Key words] Ultrasound-exposed microbubbles; Bone marrow mesenchymal stem cells; CXCR4; Calcium ion Fund program:National Natural Science Foundation of China (grants 81070083 and 81070265); Jiangsu Province Natural Science Foundation (grant BK2012338)

近年来,超声微泡(ultrasound-exposed microbubbles,UM)被逐渐应用于心血管疾病的治疗领域^[1]。 本课题组前期研究发现,超声(ultrasound,US)经胸辐 照微泡可以促进骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells,BMSCs)向缺血心肌的靶向归 巢,改善心梗后心功能,提高 BMSCs 的移植效果^[2-3]。 Zhong 等^[4]和 Xu 等^[5]也得出类似结论。推测 UM 增 效 BMSCs 移植可能与局部毛细血管内皮间隙增宽等 因素有关^[1-5]。其具体机制及 UM 对 BMSCs 的直接生 物学作用尚需进一步研究。

基质细胞衍生因子-1α(stromal cell derived factor-1α,SDF-1α)/CXC 类趋化因子受体 4(chemokine CXC motif receptor 4,CXCR4)信号轴是采用 BMSCs 治疗急 性心肌梗死的关键^[6]。BMSCs 的 CXCR4 表达增加, 可以促进 BMSCs 归巢到局部缺血心肌,使局部毛细血 管密度增加,纤维化程度减轻,进一步改善梗死后心功 能^[68]。另有研究表明,BMSCs 胞内的钙离子浓度增 加,可使其自身 CXCR4 的表达水平增高^[9]。本研究 通过体外实验观察 UM 对 BMSCs CXCR4 表达的影响, 并探讨其中的可能机制,旨在为 UM 增效干细胞应用 于临床提供新的理论依据。

材料与方法

一、主要实验动物及试剂

选取雄性无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级 Sprague-Dawley(SD)大鼠 10 只,均由南京医 科大学实验动物中心提供,本实验经东南大学动物保 护和使用委员会批准后进行。主要试剂包括钙离子荧 光探针 Fluo-4/AM(美国 Invitrogen 公司产)、CXCR4 抗体(美国 Santa Cruz 公司产)、CXCR4 拮抗剂 AMD3100及 SDF-1α(美国 Sigma 公司产)、Trizol 试剂 (美国 Invitrogen 公司产)。

二、大鼠 BMSCs 体外分离、培养和鉴定 将体重约为 120 g 的雄性 SD 大鼠处死消毒后,剪 掉股骨和胫骨的骨骺端,采用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)冲出骨髓,加入装有等体积 Ficoll-Paque分离液的离心管,离心后吸出界面层细 胞,洗涤后进行培养和扩增^[10]。参照 Dominici等^[11] 提出的间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs) 鉴定标准,取培养至第3代生长良好的 BMSCs(数量 级为10⁶),分别加入单克隆抗体 CD34、CD45、CD29、 CD44,每管设独立阴性对照,避光于冰上孵育后,用 PBS 洗涤除去未结合抗体,采用流式细胞仪进行检测。

三、UM 预处理

取培养至第 3 代、约 70%融合状态的 BMSCs,将 其分为对照组、US 组、UM 组、UM+过氧化氢酶组 (UMC 组)、UM+AMD3100 组(UMA 组)、UM+抗 CXCR4抗体组(UMCX 组)。对照组不予特殊处理,US 组采用频率为 1 MHz、强度为 1 W/cm² 的 US 辐照 30 s;UM 组加入微泡(终浓度为 10^{6} /mL)后采用上述 参数的 US 辐照 30 s;UMC 组加入过氧化氢酶(终浓度 为1250 U/mL)和微泡(终浓度为 10^{6} /mL)后行上述参 数的 US 辐照 30 s;UMA 组加入 AMD3100(终浓度为 10 μ mmol/L)和微泡(终浓度为 10^{6} /mL)后行上述参 数的 US 辐照 30 s;UMC 组加入 CXCR4 抗体(终浓度 为1: 200)和微泡(终浓度为 10^{6} /mL)后行上述参 数 0 US 辐照 30 s;UMCX 组加入 CXCR4 抗体(终浓度 为1: 200)和微泡(终浓度为 10^{6} /mL)后行上述参数 的 US 辐照 30 s;UM 预处理 BMSCs 示意图,详见 图 1。



四、采用 qPCR 技术测定 BMSCs CXCR4 的 mRNA 水平

用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA, 逆转录采用 cDNA 合成试剂盒, 具体操作参照说明书完成。用美国 Bio-Rad公司产 MJ Mini Opticon 型实时 PCR 仪进行荧 光定量 PCR 扩增。结果由分析软件自动进行统计和 计算。引物序列: actin mRNA F 的序列为 5' GCTCGTCGTCGACAACGGCTC3', actin mRNA R 的序 列为 5' CAAACATGATCTGGGTCATCTTTTC3', PCR 产 物大小为 353 bp; CXCR4 mRNA F 的序列为 5' GGGCAATGGGTTGGTAATC3', CXCR4 mRNA R 的序 列为 5' ACAATGGCAAGGTAGCG3', PCR 产物大小为 257 bp。

五、采用 Western blotting 法测定 BMSCs CXCR4 的 蛋白表达水平

取等量的细胞裂解液(含细胞蛋白 70 μ g)上样行 电泳。电泳条件:浓缩胶恒压 80 V,约 30 min,分离胶 恒压 100 V,约 90 min。恒流 200 mA,电转移 100 min 至聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride, PVDF)。 于 5%脱脂奶粉封闭液中封闭(室温,4h),加入封闭液 和适量 CXCR4 抗体孵育过夜。用含 5%脱脂奶粉的 洗涤液(tris-buffered saline and tween, TBST)漂洗后, 将膜与辣根过氧化酶标记的二抗于室温下摇荡孵育 2 h,经 TBST 充分洗膜后,利用增强化学发光法(enhanced chemiluminescence, ECL)显色成像。相应蛋白 表达值=条带的灰度值/actin。

六、BMSCs 胞内钙离子浓度测定

按照 Fluo-4/AM 说明书进行操作。在 2 mL BMSCs (10⁶/mL) 悬液中加入 2 μL Fluo-4/AM (1 mmol/L)母液孵育 10 min,洗涤重悬后移入 24 孔 板,分为对照组、US 组和 UM 组进行干预。干预后即 刻、5 min、15 min,分别在荧光显微镜下观察细胞内荧 光强度,激发波长为 494 nm,发射波长为 516 nm。每 孔随机选择 6 个细胞观察并拍照,用 Image-Pro Plus 6.0版分析软件测定每个细胞的荧光强度值,以荧光强 度值作为BMSCs胞内的钙离子浓度。

七、迁移试验

向 Transwell 下室中加入含有 SDF-1α(终浓度为 100 ng/mL)的培养液 500 μL,向上室中加入 BMSCs 悬 液 200 μL(含细胞数约为 2×10⁴)。加入微泡并行 US 辐照后继续培养 24 h。取出小室,用棉签擦去上室内的细胞,用无水乙醇固定细胞 30 min,风干。用 0.1% 结晶紫染色 10 min,于倒置显微镜下观察。随机选取 10 个视野,进行细胞计数。

八、统计学方法

采用 SPSS 17.0 版统计学软件对数据进行处理,

计量资料采用(*x*±*s*)形式表示,两组之间比较采用 *t* 检 验,多组之间比较采用单因素方差分析,*P*<0.05表示 差异有统计学意义。

结 果

一、BMSCs 表面分子标记的鉴定

采用流式细胞仪检测 BMSCs 表面分子标记,培养 至第3代的大鼠 BMSCs CD44、CD29的阳性率分别为 99.34%、99.35%;CD34、CD45表达呈阴性,阳性率分 别为1.47%、1.56%。

二、UM 对 BMSCs CXCR4 mRNA 转录的影响

qPCR 结果显示, US 组 CXCR4 mRNA 的转录水平 与对照组比较,差异无统计学意义(P>0.05)。UM 组 CXCR4 mRNA 转录水平高于 US 组和对照组(P< 0.05), UMC 组 CXCR4 mRNA 的转录水平低于 UM 组 (P<0.05)。

三、UM 对 BMSCs CXCR4 蛋白表达水平的影响

Western blotting 结果显示, US 组 CXCR4 的蛋白 表达水平与对照组比较,差异无统计学意义(P> 0.05)。UM 组 CXCR4 的蛋白表达水平高于 US 组和 对照组(P<0.05), UMC 组 CXCR4 的蛋白表达水平低 于 UM 组(P<0.05)。详见图 2。



四、UM 对 BMSCs 胞内钙离子浓度的影响

荧光显微镜观察结果显示, US 组细胞在 US 干预 后即刻、5 min、15 min 的荧光强度与对照组比较,差异 无统计学意义(P>0.05),提示 US 干预不能显著增加 BMSCs 内的钙离子浓度。UM 组细胞在 UM 干预后即 刻、5 min 的荧光强度均高于 US 组和对照组(P< 0.05),提示 UM 可使 BMSCs 胞内的钙离子浓度增加。 随着时间推移,荧光强度迅速衰减,在干预后 15 min, UM 组细胞的荧光强度低于干预后即刻的荧光强度 (P<0.05),与 US 组和对照组比较,差异无统计学意义 (P<0.05)。详见图 3。

五、UM 对 BMSCs 向 SDF-1α 趋化的影响

体外迁移试验表明, US 组向 SDF-1α 的移行细胞数与对照组比较,差异无统计学意义(*P*>0.05)。 UM 组向 SDF-1α 的移行细胞数多于 US 组和对照组 (*P*<0.05)。UMC 组、UMA 组和 UMCX 组向 SDF-1α 的移行细胞数均较 UM 组减少(*P*<0.05)。详见 图 4。



注:a、b、c为对照组 BMSCs 干预后即刻、5 min、 15 min 的钙离子(Fluo-4/AM 荧光探针,×400);d、e、 f为 US 组 BMSCs 干预后即刻、5 min、15 min 的钙离 子(Fluo-4/AM 荧光探针,×400);g、h、i为 UM 组 BMSCs 干预后即刻、5 min、15 min 的钙离子(Fluo-4/ AM 荧光探针,×400)

图 3 BMSCs 胞内钙离子的荧光标记鉴定



注:a 为对照组向 SDF-1α 移行的细胞(结晶紫染色,×200);b 为 US 组向 SDF-1α 移行的细胞(结晶紫染色,×200);c 为 UM 组向 SDF-1α 移行的细胞(结晶紫染色,×200);d 为 UMC 组向 SDF-1α 移行的细胞(结晶紫染色,×200);e 为 UMA 组向 SDF-1α 移行的细胞(结晶紫染色,×200);f 为 UMCX 组向 SDF-1α 移行的细胞(结晶紫染色,×200)

图 4 UM 预处理对各组 BMSCs 向 SDF-1α 趋化的影响

讨 论

本课题组近期行荟萃分析显示,BMSCs移植可以 使急性心肌梗死患者的心功能在标准治疗的基础上得 到改善,但患者心功能的改善程度多为轻至中度,移植 疗效亟待进一步提高^[12]。既往研究发现,给心肌梗死 后猪经冠脉内注入微泡和 BMSCs,同时用 US 经胸辐照 (1 MHz、2 W/cm²,连续辐照 90 s)心肌梗死区,6 周后 发现与无 US 辐照组相比,US 辐照组心功能改善更为 明显,且心肌梗死区及边缘区归巢的 BMSCs 显著增 多,提示 UM 可以显著促进 BMSCs 向缺血心肌归巢^[2]。 近期本研究组还发现,US 联合一氧化氮微泡可以较普 通微泡进一步增加心梗后大鼠心肌局部的毛细血管密 度,改善梗死后心功能^[3]。Zhong 等^[4]建立狗的心梗 模型后,将干细胞经冠脉内注入,发现 UM 可以促进干 细胞向受损心肌的靶向归巢。Xu 等^[5]也得到相似的 结果。目前认为该效应可能是由于 UM 的声孔效应和 空化效应,使得局部毛细血管等微环境发生改变^[1-5]。 但其具体机制尤其是 UM 对 BMSCs 的直接生物学作用 尚不清楚。

本研究发现, UM 体外干预 BMSCs 后, 可以使 BMSCs CXCR4 的 mRNA 转录和蛋白表达水平增加,向 SDF-1α 的迁移也相应增加; 而 CXCR4 抗体和 CXCR4 特异性拮抗剂 AMD3100 (选择性抑制 SDF-1α 与 CXCR4结合)均可以抑制 BMSCs 的迁移,提示 CXCR4 至少部分介导了 UM 所致的 BMSCs 的迁移增加。 SDF-1/CXCR4 轴在介导干细胞向梗死心肌归巢的过 程中发挥着关键作用^[6]。Liang 等^[7]将基因转染后高 表达水平CXCR4的 BMSCs 移植于心梗大鼠,结果发现 该组与未转染CXCR4组相比,新生血管增加,梗死面积 减小,梗死后心功能和心室重构明显改善。既往研究 发现^[8],低氧预适应可增加心脏祖细胞的 CXCR4 表 达,移植于心梗小鼠后可进一步改善其梗死后心功能, 而 AMD3100 可抑制该获益,提示 SDF-1/CXCR4 可能 部分介导了干细胞向缺血心肌的归巢和修复作用。

研究发现,增加培养液中的钙离子浓度,可以使 BMSCs的CXCR4 基因转录和蛋白表达增加,使其向 SDF-1α的迁移增加,而钙敏感受体特异性抗体可抑制 该效应^[10]。Wu 等^[9]用氯化钙干预 BMSCs,发现在细 胞钙内流增加的同时,细胞的 CXCR4 表达增加,钙敏 感受体抗体亦可抑制此效应。上述研究结果提示钙离 子浓度与 BMSCs 的 CXCR4 表达水平密切相关。近年 来,有学者应用扫描电镜和原子力显微镜技术进行研 究,发现 UM 体外干预细胞后,其声流、微射流等均可 导致细胞表面物理孔的存在[13]。表面物理孔可导致 细胞内外的物质交换,从而引起多种生物学效应[13-15]。 本研究对钙离子在 UM 增加 CXCR4 表达中的作用进 行了探讨,结果发现 BMSCs 在 UM 的干预下,细胞内钙 离子浓度会随着时间的推移发生一过性增加,这一机 制可能部分介导了 UM 对 CXCR4 表达的促进作用。 Juffermans 等^[14]发现,用UM 干预原代培养的牛主动脉 内皮细胞,可以增加内皮细胞膜对钙离子的通透性,使 钙离子流入增加:而特异的钙通道阻滞剂可使得 UM 引 起的钙离子内流减少^[15]。Park 等^[16]也发现了相似的现 象,提示 UM 可以促使细胞内的钙离子浓度增加。另有 研究发现,细胞膜在 UM 作用下发生的通透性增加为一 过性,细胞膜通透性一般在 US 干预后 30 s 内恢复到干 预前状态,在此段时间内,细胞内钙离子浓度可持续增 加,随后细胞内的钙离子通过外溢、胞内钙池的摄入等 建立钙稳态,此过程约在3 min内完成^[13]。

此外, Juffermans 等^[17]的研究表明, UM 引起大鼠 心肌细胞内钙离子的浓度增加, 可能与 UM 引起的过 氧化氢产生增加有关。我们在实验中发现, 过氧化氢 酶可以抑制 UM 引起的 BMSCs CXCR4 mRNA 转录和 蛋白表达增加, 且能抑制 UM 引起的 BMSCs 向 SDF-1α 的趋化增加, 提示过氧化氢在 UM 促进 BMSCs 向缺血 心肌的归巢中可能起着一定的作用。

总之,UM 干预 BMSCs 的过程是一个复杂的物理 化学过程,可能涉及到多种因素和机制。本研究发现, UM 可能通过增加 BMSCs 内的钙离子浓度,进而促进 其 CXCR4 表达,从而增加 BMSCs 向缺血组织的归巢, 这一结果为 UM 增效干细胞应用于临床提供了新的理 论依据。

参考文献

- Unger E, Porter T, Lindner J, et al. Cardiovascular drug delivery with ultrasound and microbubbles [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2014, 72(1): 110-126. DOI:10.1016/j.addr.2014.01.012.
- [2] 李金鹆,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. DOI:10.3969/j.issn.1673-8225.2009.23.003

- [3] 卞叶萍,童嘉毅,沈祥波,等. 超声联合一氧化氮微泡介导间充质 干细胞移植对心肌梗死大鼠心功能的影响[J]. 中华物理医学与 康复杂志,2013,35(7):523-526. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2013.07.004
- [4] Zhong S, Shu S, Wang Z, et al. Enhanced homing of mesenchymal stem cells to the ischemic myocardium by ultrasound-targeted microbubble destruction [J]. Ultrasonics, 2012, 52(2): 281-286. DOI: 10.1016/j.ultras.2011.08.013.
- [5] 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[J]. Int J Cardiol, 2010, 138(2):182-195. DOI: 10. 1016/j.ijcard.2009.03.071.
- $[\,6\,]$ Wen J, Zhang JQ, Huang W, et al. SDF-1 α and CXCR4 as the rapeutic targets in cardiovascular disease [J]. Am J Cardiovasc Dis, 2012, 2 (1):20-28.
- Liang J, Huang W, Yu X, et al. Suicide gene reveals the myocardial neovascularization role of mesenchymal stem cells overexpressing CX-CR4 (MSC(CXCR4)) [J]. PLoS One, 2012, 7(9):46158. DOI: 10.1371/journal.pone.0046158.
- [8] Yan F, Yao Y, Chen L, et al. Hypoxic preconditioning improves survival of cardiac progenitor cells: role of stromal cell derived factor-1α-CXCR4 axis[J]. PLoS One, 2012, 7(7):e37948. DOI: 10.1371/ journal.pone.0037948.
- [9] Wu Q, Shao H, Darwin ED, et al. Extracellular calcium increases CXCR4 expression on bone marrow-derived cells and enhances proangiogenesis therapy [J]. J Cell Mol Med, 2009, 13 (9B): 3764-3773. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2009.00691.x.
- [10] 陈龙,童嘉毅,沈祥波,等. 钙离子对骨髓间充质干细胞 CXCR4 表达的影响[J].江苏医药,2013,39(7):754-756.
- [11] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement[J].Cytotherapy,2006,8(4):315-317.
- [12] Chen L, Tong JY, Jin H, et al. Long-term effects of bone marrow-derived cells transplantation in patients with acute myocardial infarction: a meta-analysis[J]. Chin Med J (Engl), 2013,126(2):353-360.
- [13] Hassan MA, Campbell P, Kondo T. The role of ca(2+) in ultrasoundelicited bioeffects: Progress, perspectives and prospects[J]. Drug Discov Today, 2010, 15 (21-22): 892-906. DOI: 10.1016/j. drudis. 2010.08.005.
- [14] Juffermans LJ, van Dijk A, Jongenelen CA, et al. Ultrasound and microbubble-induced intra- and intercellular bioeffects in primary endothelial cells [J]. Ultrasound Med Biol, 2009, 35 (11): 1917-1927. DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2009.06.1091.
- [15] Meijering BD, Juffermans LJ, van Wamel A, et al. Ultrasound and microbubble-targeted delivery of macromolecules is regulated by induction of endocytosis and pore formation [J]. Circ Res, 2009,104(5):679-687. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.108.183806.
- [16] Park J, Fan Z, Deng CX. Effects of shear stress cultivation on cell membrane disruption and intracellular calcium concentration in sonoporation of endothelial cells [J]. J Biomech, 2011, 44 (1): 164-169. DOI: 10.1016/j.jbiomech.2010.09.003.
- [17] Juffermans LJ, Dijkmans PA, Musters RJ, et al. Transient permeabilization of cell membranes by ultrasound-exposed microbubbles is related to formation of hydrogen peroxide [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006, 291(4): 1595-1601.

(修回日期:2016-02-20) (本文编辑:凌 琛)