

· 实验研究 ·

拟水平均匀设计法优化超声辐照微泡促人骨髓间充质干细胞分泌 SDF-1 的实验研究

李露 何芬 杨凤武 古静 徐亚丽

摘要 目的 采用拟水平均匀实验设计,筛选超声辐照微泡促人骨髓间充质干细胞分泌基质细胞衍生因子 1 (SDF-1)的最优影响因素组合。**方法** 选定超声辐照强度、超声辐照时间、微泡浓度 3 个因素,分别按超声辐照强度 0 (对照)、0.2、0.4、0.6、0.8 W/cm²,超声辐照时间 0 (对照)、20、30、40、60 s,微泡浓度 0 (对照)、10²、10⁴、10⁶、10⁸ 个/ml,每因素 5 个水平设计均匀设计表,根据均匀设计表 U₁₅(15⁵) 进行超声辐照,辐照后细胞继续培养 24 h,检测细胞存活率及细胞培养上清液中 SDF-1 浓度。以得到相对高的 SDF-1 浓度和相对低的细胞死亡率为目的,应用多元线性回归和逐步回归分析筛选最优影响因素组合,并对其进行验证。**结果** 根据回归分析结果,并综合考虑 3 个因素间关系后,确定超声辐照微泡促人骨髓间充质干细胞分泌 SDF-1 的最优影响因素组合为超声辐照强度 0.6 W/cm²,超声辐照时间 30 s,微泡浓度 10⁶ 个/ml;在此条件下超声辐照微泡后 SDF-1 分泌量达(551.67±40.88)pg/ml,细胞存活率达(88.51±4.03)%。**结论** 采用拟水平均匀设计法筛选出超声辐照微泡促人骨髓间充质干细胞分泌 SDF-1 和细胞存活率达到相对匹配的最优影响因素组合为超声辐照强度 0.6 W/cm²,超声辐照时间 30 s,微泡浓度 10⁶ 个/ml。

关键词 均匀设计;超声辐照;微泡;骨髓间充质干细胞;SDF-1

[中图分类号]R445.1

[文献标识码]A

Optimization of ultrasound-irradiated microbubbles to promote SDF-1 secretion from human bone marrow mesenchymal stem cells by quasi-horizontal uniform design: a experimental study

LI Lu, HE Fen, YANG Fengwu, GU Jing, XU Yali

Department of Ultrasound, Western Theater General Hospital of the PLA, Chengdu 610083, China

ABSTRACT Objective To investigate the optimal combination of microbubbles combined with ultrasound to promote the secretion of stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) from human bone marrow mesenchymal stem cells in a quasi-horizontal uniform experimental design.**Methods** Three factors of ultrasonic irradiation intensity, ultrasonic irradiation time and microbubble concentration were selected, and the ultrasonic irradiation intensity were 0 (control), 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 W/cm², and the irradiation time were 0 (control), 20, 30, 40, 60 s, and the microbubble concentrations were 0 (control), 10², 10⁴, 10⁶ and 10⁸ N/ml, respectively, the uniform design tables were designed at 5 levels for each factor. Ultrasonic irradiation was conducted according to uniform design table U₁₅(15⁵). Cells were cultured for 24 h after irradiation, the cell survival rate and SDF-1 concentration in cell culture supernatant were detected. In order to obtain relatively high SDF-1 concentration and relatively low cell mortality, multiple linear regression and stepwise regression analysis were used to determine the optimal ratio of parameters, and the optimized screening index parameters were verified.**Results** According to the results of regression analysis and considering the relationship among the three factors, the optimal parameter combination of ultrasound combined with microbubbles to promote SDF-1 secretion was determined as irradiation intensity 0.6 W/cm², irradiation time 30 s, microbubble concentration 10⁶ N/ml. Under these conditions, SDF-1 secretion was (551.67±40.88) pg/ml and cell survival rate was (88.51±4.03)%.**Conclusion** The optimal combination of microbubbles combined with ultrasound to promote SDF-1 secretion and cell

基金项目:重庆市自然科学基金项目(cstc2018jcyjAX0011)

作者单位:610083 成都市,中国人民解放军西部战区总医院超声诊断科(李露、何芬、杨凤武、古静);陆军军医大学第二附属医院超声科(徐亚丽)

通讯作者:徐亚丽,Email:xuyali1976@163.com

survival rate is selected by quasi-horizontal uniform design as irradiation intensity 0.6 W/cm², irradiation time 30 s and microbubble concentration 10⁶ N/ml.

KEY WORDS Uniform design; Ultrasonic irradiation; Microbubble; Mesenchymal stem cell; SDF-1

近年来,干细胞疗法作为新型治疗手段逐渐应用于多种疾病。其中,骨髓来源的间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)由于其取材较为容易、免疫原性较弱且具有分化为多种细胞的能力,成为研究的热点之一^[1],其治疗效果与移植入体内后到达靶组织的效率密切相关。基质细胞衍生因子1(stromal cell-derived factor-1, SDF-1)是最重要的趋化与归巢相关分子之一^[2],与其受体 CXCR4 趋化因子受体 4 一起作用,有助于 MSCs 向靶组织迁移归巢^[3],而提高靶区 SDF-1 浓度可促进更多的 MSCs 归巢。前期研究^[4]表明,超声辐照微泡可提高 MSCs 的移植效率及归巢能力,其机制可能为微泡增强的超声生物学效应可促使 MSCs 旁分泌 SDF-1,使靶区组织 SDF-1 含量增高^[5]。但关于超声辐照微泡促 MSCs 分泌 SDF-1 的参数优化方面的研究较少。本研究采用拟水平均匀实验设计法,选取超声辐照强度、超声辐照时间及微泡浓度 3 个实验参数,各设 5 个水平以筛选影响 MSCs 分泌 SDF-1 的最优因素组合。

材料与与方法

一、主要材料与仪器

人骨髓 MSCs 细胞株(美国 Sciencell 公司);干细胞完全培养基(广州赛业生物科技公司);0.25% EDTA-胰蛋白酶(美国 Hyclone 公司);人 SDF-1 ELISA 试剂盒(美国 R&D 公司);CCK-8 溶液(北京碧云天生物技术公司);造影剂“脂氟显”(陆军军医大学第二附属医院超声科实验室自制)为脂质膜包裹全氟丙烷气体的微泡,粒径 2~10 μm,其中 98% 小于 8 μm,微泡平均浓度约为 (7~8)×10⁹ 个/ml,使用前用生理盐水稀释至相应浓度;酶联免疫分析仪(F039300,澳大利亚 Tecan 公司);超声治疗仪(Accusonic Plus,澳大利亚 Metro Medical 公司),除辐照强度和辐照时间随实验调整外,超声发射频率固定为 1 MHz,占空比设为 10%。

二、主要实验方法

1. 细胞培养:将人骨髓 MSCs 细胞株用含 10% 胎牛血清的干细胞完全培养基在 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养,每 4~6 天传代 1 次。取对数生长期的细胞用 0.25% EDTA-胰蛋白酶消化,制成单细胞悬液后以每孔 1×10⁶ 的密度接种于六孔板中,每孔细胞悬液量约 2 ml,放于孵箱静置 6~8 h,待细胞完全贴壁后即可用于不同影响

因素条件下的超声辐照。

2. 实验设计与分组:采用双均数拟水平均匀实验设计,选定超声辐照强度、超声辐照时间、微泡浓度 3 个常见影响因素,每因素设 5 个水平,分别为:①超声辐照强度,即 0(对照)、0.2、0.4、0.6、0.8 W/cm²;②超声辐照时间,即 0(对照)、20、30、40、60 s;③微泡浓度,即 0(对照)、10²、10⁴、10⁶、10⁸ 个/ml。根据均匀设计表 U₁₅(15⁵) 安排的实验分组进行超声辐照,应用多元线性回归及逐步回归统计学方法分析,并综合考虑各因素间的关系,以相对高的 SDF-1 分泌量(上清液中 SDF-1 浓度)和相对低的细胞死亡率(MSCs 存活率)为目标,确定最优影响因素组合。然后分别按照超声辐照时间、超声辐照强度、微泡浓度 3 个因素进行验证,具体:①考察超声辐照强度,分为 0(对照)、0.2、0.4、0.6、0.8 W/cm²,此时超声辐照时间 30 s,微泡浓度 10⁶ 个/ml;②考察超声辐照时间,分为 0(对照)、20、30、40、60 s,此时超声辐照强度 0.6 W/cm²,微泡浓度 10⁶ 个/ml;③考察微泡浓度,分为 0(对照)、10²、10⁴、10⁶、10⁸ 个/ml,此时超声辐照时间 30 s,超声辐照强度 0.6 W/cm²。

3. ELISA 法检测 SDF-1 含量:将人骨髓 MSCs 经超声辐照并继续培养 24 h 后,分别吸取每孔上清液作为样品。将不同浓度的 SDF-1 标准品和稀释后的各个样品加入酶标板内,按照人 SDF-1 ELISA 试剂盒说明书步骤依次操作,最后使用酶联免疫分析仪测定样品于 450 nm 光谱处的吸光度值,根据样品的吸光度值和稀释倍数检测样品浓度。

4. CCK-8 法评估细胞活性:将人骨髓 MSCs 经超声辐照并继续培养 24 h 后,收集各组人骨髓 MSCs 制成单细胞悬液,以每孔 2×10³ 的密度接种于 96 孔板中,每孔 100 μl,将未被超声辐照的人骨髓 MSCs 设为对照。将 96 孔板于孵箱静置 6~12 h 待细胞全部贴壁后,每孔加入 10 μl CCK-8 溶液。孵箱继续放置 2 h 后,设仅含有 100 μl 单纯细胞培养基的孔为空白对照孔,采用酶联免疫分析仪测量每个样品孔于 450 nm 光谱处的吸光度值,细胞存活率(%)= 样品孔吸光度值/空白对照孔的吸光度值×100%。

三、统计学处理

应用 SPSS 13.0 统计软件,参数筛选采用双指标拟水平均匀设计,应用多元线性回归分析及逐步回归分析筛选最优影响因素组合。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、优化SDF-1分泌的最优影响因素组合

通过双指标拟水平均匀实验设计优化超声辐照微泡促人骨髓MSCs分泌SDF-1的因素,按 $U_{15}(15^5)$ 均匀实验设计表设计,见表1。

表1 超声辐照参数筛选实验拟水平均匀设计表及实验结果

实验编号	因素			实验结果	
	超声辐照强度 (W/cm ²)	微泡浓度 (个/ml)	超声辐照时间(s)	SDF-1浓度 (pg/ml)	细胞存活率 (%)
1	0	10 ²	30	437.21	97.63
2	0	10 ⁴	60	469.33	98.27
3	0	10 ⁶	20	452.72	97.84
4	0.2	0	60	493.54	92.25
5	0.2	10 ²	20	447.41	91.33
6	0.2	10 ⁴	40	514.55	87.51
7	0.4	10 ⁸	20	551.26	65.31
8	0.4	0	40	522.79	91.86
9	0.4	10 ²	0	446.82	98.42
10	0.6	10 ⁶	40	620.32	83.56
11	0.6	10 ⁸	0	435.36	97.83
12	0.6	0	30	534.63	91.69
13	0.8	10 ⁴	0	465.27	97.22
14	0.8	10 ⁶	30	689.45	76.73
15	0.8	10 ⁸	60	581.34	49.27

应用多元线性回归分析,得到双指标的回归方程为:

$$\bar{y}_{SDF-1} = 384.529 + 187.737X_A - 2.372E - 7X_B + 0.851X_C \text{ (因}$$

素A:超声辐照强度;因素B:微泡浓度;因素C:超声辐照时间) (1)

$$\bar{y}_{存活率} = 109.392 - 19.322X_A - 1.791E - 7X_B - 0.342X_C \text{ (因}$$

素A:超声辐照强度;因素B:微泡浓度;因素C:超声辐照时间) (2)

两个回归方程对应的概率值 $P=0.003、0.014$,均小于0.05,总回归效果显著。偏回归效果检验显示,因素B(微泡浓度)对SDF-1分泌量的偏回归贡献不显著($P<0.05$),说明其对SDF-1分泌量的作用可由其他因素代替,故需进一步行逐步回归分析,得逐步回归方程为:

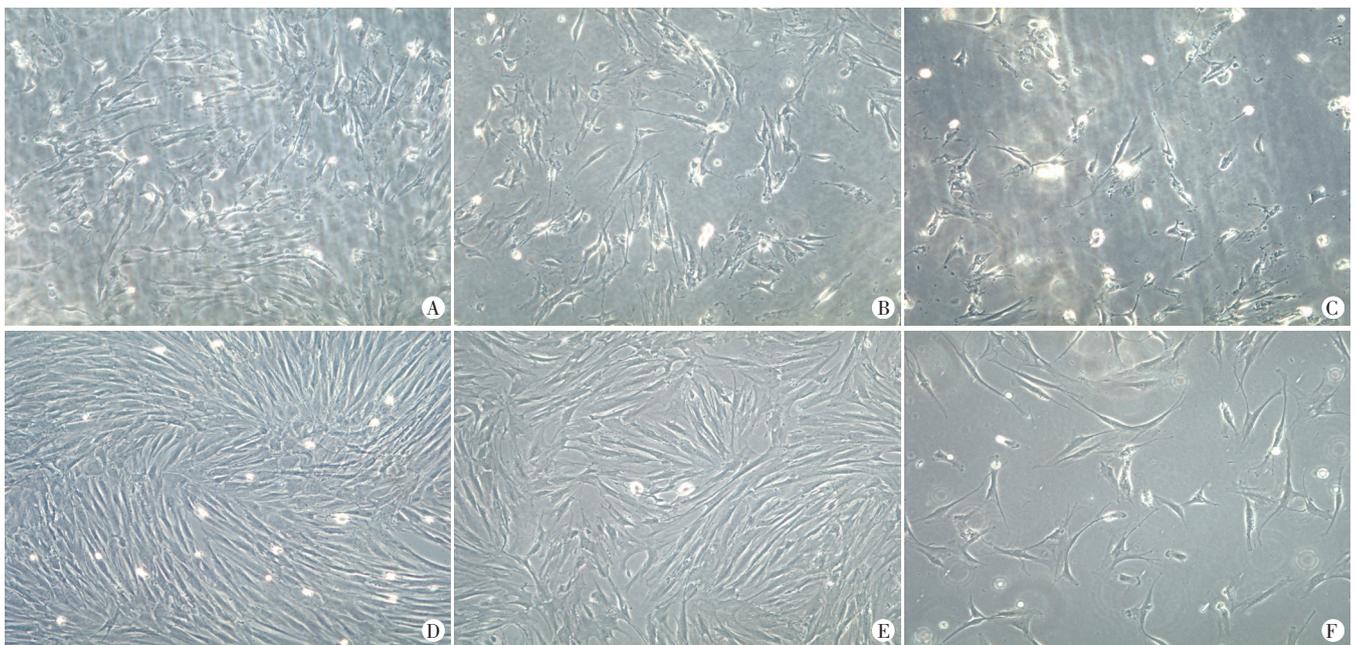
$$\bar{y}_{SDF-1} = 384.783 + 175.897X_A + 1.855X_C \text{ (因素A:超声辐照强度;因素C:超声辐照时间)} \text{ (3)}$$

方程对应的概率值 $P<0.05$,总回归效果显著。采用方程(2)、(3)对实验影响因素进行优化,并综合考虑各因素间关系后,最终确定最优影响因素组合为超声辐照强度0.6 W/cm²,超声辐照时间30 s,微泡浓度10⁶个/ml。

二、不同参数条件下SDF-1分泌量和人骨髓MSCs细胞存活率结果

1. 超声辐照后即刻,光镜下可见贴壁的人骨髓MSCs胞质回缩,细胞折光率增强,超声辐照强度加大时部分细胞甚至漂浮起来。放于孵箱静置培养24 h后,绝大部分人骨髓MSCs会重新贴壁生长,形态与正常细胞相比无明显差别。见图1。随着超声辐照强度增加,存活下来贴壁生长的人骨髓MSCs越来越少。

2. 对优化筛选后的影响因素进行验证,超声辐照

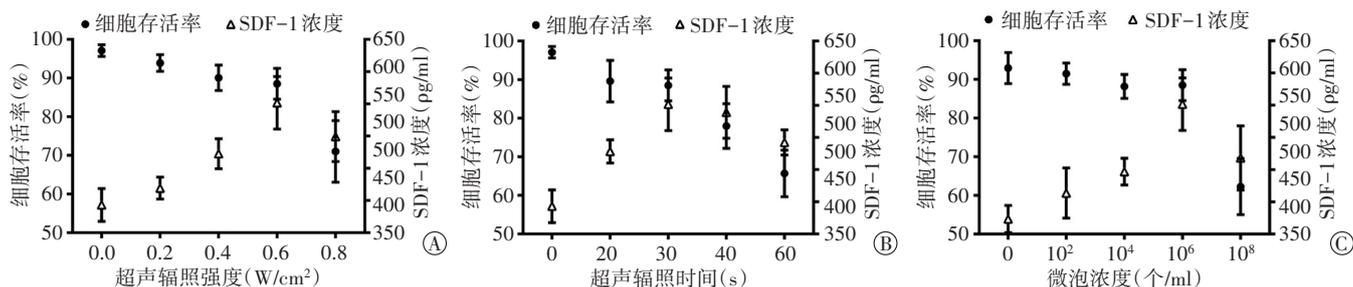


A~C: 超声辐照后即刻,辐照强度分别为0.2、0.6、0.8 W/cm²;D~F: 超声辐照后24 h,辐照强度分别为0.2、0.6、0.8 W/cm²

图1 人骨髓MSCs在微泡浓度10⁶个/ml、超声辐照时间30 s即刻及辐照后24 h不同超声辐照强度下的光镜图(×100)

强度、微泡浓度和超声辐照时间 3 个因素对 SDF-1 分泌量和人骨髓 MSCs 细胞存活率的影响见图 2。图 2A 显示,随着超声辐照强度的增强,SDF-1 浓度逐渐增大,辐照强度为 0.6 W/cm² 时,SDF-1 浓度达到峰值(551.67±40.88)pg/ml,当辐照强度继续增大至 0.8 W/cm²,SDF-1 浓度反而下降;同时,细胞存活率随着超声辐照强度的增加显著降低,辐照强度为 0.6 W/cm² 时,细胞存活率为(88.51±4.03)%,辐照强度继续增加至 0.8 W/cm² 时,细胞存活率下降至(71.02±7.97)%。图 2B 显示,SDF-1 浓度随超声辐照时间增加而增加,超声辐照强度为 0.6 W/cm² 时 SDF-1 浓度达到峰值,超声辐照时间

>30 s 时,SDF-1 浓度即开始下降,辐照时间为 60 s 时,SDF-1 浓度降至(492.47±19.64)pg/ml;另外,超声辐照时间越长,细胞存活率越低,辐照时间为 60 s 时降至(65.67±6.04)%。图 2C 显示,随着微泡浓度的增大,SDF-1 浓度也逐渐增大,于微泡浓度为 10⁶ 个/ml 时达到峰值,当微泡浓度增大至 10⁸ 个/ml,SDF-1 浓度下降至(468.16±49.91)pg/ml,同时细胞存活率也显著下降至(62.26±7.27)%。结果显示,当超声辐照强度为 0.6 W/cm²、超声辐照时间为 30 s、微泡浓度为 10⁶ 个/ml 时,SDF-1 分泌量和人骨髓 MSCs 细胞存活率可达到相对匹配的数值。



A: 不同超声辐照强度对 SDF-1 浓度和细胞存活率的影响; B: 不同超声辐照时间对 SDF-1 浓度和细胞存活率的影响; C: 不同微泡浓度对 SDF-1 浓度和细胞存活率的影响

图 2 不同影响因素条件下超声辐照微泡促人骨髓 MSCs 分泌 SDF-1 和细胞存活情况

讨 论

在医院临床和基础研究中经常接触到包含多因素、多水平双指标的实验,如交叉匹配各个因素和水平进行全面实验,不仅要花费大量的人力、物力,还需相当长的时间,显然是不实际的。正交设计法和均匀设计法均能在不影响实验效果的前提下,尽可能减少实验次数,前者的实验次数是后者实验次数的整数倍,故均匀设计法是一种更加高效、快速、经济的实验设计方法。本研究采用拟水平均匀设计超声辐照微泡后人骨髓 MSCs SDF-1 分泌量和 MSCs 细胞存活率的双指标实验,旨在探讨超声辐照微泡促人骨髓 MSCs 分泌 SDF-1 的最优条件。

方程(2)中,因素 A(超声辐照强度)、B(微泡浓度)、C(超声辐照时间)系数均为负值,具有阻碍细胞存活的作用,说明取低值有利于细胞存活,适宜范围内应取下限值;方程(3)中,因素 A、C 系数均为正值,具有促进 SDF-1 分泌的作用,说明高值有利于 SDF-1 分泌,适宜范围内应取上限值,因素 B 不包含于方程(3)中,说明不同的因素 B 取值对 SDF-1 分泌无明显的影响作用,可作为常量。综合分析,因素 A 对促 SDF-1 分泌与细胞存活率有相反作用的影响,且对促 SDF-1 分泌的影响更大,故取较中间值大一点的数值,即 0.6 W/cm²;因素 C

对促 SDF-1 分泌与细胞存活率也有相反作用的影响且影响力类似,故取中间值 30 s;因素 B 对促 SDF-1 分泌无影响,对细胞存活率有影响,宜取低值,但由于方程(2)中因素 B 的系数为 -1.791E-7, B 的取值范围为 0~10⁶ 个/ml,实际上对细胞存活的影响均微小,仅当因素 B 的取值达到 10⁸ 个/ml 时,对细胞存活率才有显著的阻碍作用,考虑到实际操作的准确性(微泡浓度越低操作误差越大),因素 B 取 10⁶ 个/ml。所以,根据方程(2)、(3),综合考虑促 SDF-1 分泌量和高的细胞存活率的最优影响因素组合为:超声辐照强度 0.6 W/cm²,微泡浓度 10⁶ 个/ml,超声辐照时间 30 s。

研究^[6-7]表明,超声辐照微泡虽可促使人骨髓 MSCs 分泌 SDF-1,但随着超声辐照强度、辐照时间的增加,其辐照能量也不断增强,超过一定阈值后,细胞就会溶解和死亡。超声微泡造影剂注入体内后,作为空化核可以大大降低超声生物学效应(主要是空化效应)的阈值,使空化效应强度显著增加。在离体实验^[8]中,当细胞周围存在大量空化核(如微泡造影剂)时,微泡增强的超声空化效应也可对被辐照细胞造成不可逆的损伤。所以,需要找到超声辐照时间、辐照强度和微泡数量/浓度的最优组合,希望在保证较多的 MSCs 存活的前提下,超声辐照微泡能有效促进其分泌更多的 SDF-1。本研究结果提示,超声辐照强度、超声辐照时

间或微泡浓度超过一定阈值后,大量的人骨髓MSCs会因辐照能量过高或空化核浓度过大而死亡,导致相应的SDF-1分泌量也减少。本研究采用均匀设计法和回归分析的统计学方法筛选出体外超声辐照微泡促人骨髓MSCs分泌SDF-1的最优影响因素组合,即超声辐照强度 0.6 W/cm^2 ,超声辐照时间 30 s ,微泡浓度 10^6 个/ml。使用该最优组合时人骨髓MSCs的存活率为 $(88.51\pm 4.03)\%$,同时SDF-1分泌量显著增加,达 $(551.67\pm 40.88)\mu\text{g/ml}$ 。当然,超声辐照微泡作用于动物或人体时,涉及的相关超声作用因素更多,优化筛选过程也会更加复杂,需后续实验研究的进一步探讨。

综上所述,采用拟水平均匀设计法筛选出超声辐照微泡促人骨髓MSCs分泌SDF-1和细胞存活率达到相对匹配的最优影响因素组合为:超声辐照强度 0.6 W/cm^2 ,超声辐照时间 30 s ,微泡浓度 10^6 个/ml。

参考文献

- [1] Wang KX, Cui WW, Yang X, et al. Mesenchymal stem cells for mitigating radiotherapy side effects[J]. Cells, 2021, 10(2): 294.
[2] Zhang H, Li X, Li J, et al. SDF-1 mediates mesenchymal stem cell

recruitment and migration via the SDF-1/CXCR4 axis in bone defect [J]. J Bone Miner Metab, 2021, 39(2): 126-138.

- [3] Tian XQ, Yang YJ, Li Q, et al. Combined therapy with atorvastatin and atorvastatin-pretreated mesenchymal stem cells enhances cardiac performance after acute myocardial infarction by activating SDF-1/CXCR4 axis[J]. Am J Transl Res, 2019, 11(7): 4214-4231.
[4] Sun Z, Xie Y, Lee RJ, et al. Myocardium-targeted transplantation of PHD2 shRNA-modified bone mesenchymal stem cells through ultrasound-targeted microbubble destruction protects the heart from acute myocardial infarction[J]. Theranostics, 2020, 10(11): 4967-4982.
[5] Li L, Wu SZ, Liu Z, et al. Ultrasound-targeted microbubble destruction improves the migration and homing of mesenchymal stem cells after myocardial infarction by upregulating SDF-1/CXCR4: a pilot study[J]. Stem Cells Int, 2015, 2015(1): 691310.
[6] Qu N, Shi D, Shang M, et al. Breast cancer cell line phenotype affects sonoporation efficiency under optimal ultrasound microbubble conditions[J]. Med Sci Monit, 2018, 14(24): 9054-9062.
[7] 孙月,朱桂敏,杨莉红,等.超声微泡破坏技术不同辐照强度对兔心肌的生物学效应研究[J].中国超声医学杂志,2019,35(2):171-174.
[8] Li PJ, Gao YH, Liu Z, et al. DNA transfection of bone marrow stromal cells using microbubble-mediated ultrasound and polyethylenimine: an in vitro study[J]. Cell Biochem Biophys, 2012, 66(3): 775-786.

(收稿日期:2021-04-29)

· 病例报道 ·

Echocardiographic diagnosis of anomalous origin of left coronary artery from pulmonary artery: a case report

超声心动图诊断左冠状动脉异常起源于肺动脉1例

姜述怡 王丽红

[中图法分类号]R540.45;R714.252

[文献标识码]B

患儿女,3个月9d。因拒奶、呼吸急促半天入院。体格检查:体温 37.9°C ,心率 190 次/min,血压 $71/36\text{ mm Hg}$ ($1\text{ mm Hg}=0.133\text{ kPa}$),血氧分压 60% ;吸气性“三凹征”阳性,听诊双肺呼吸音粗,可闻及散在湿啰音,心浊音界向左下扩大,心音低钝,可闻及奔马律,心前区可闻及II~III期/6级杂音。胸片提示:心影增大。超声心动图检查:左房室内径增大;左室整体收缩功能减弱;室间隔与左室后壁呈同向运动;二尖瓣腱索、瓣膜、乳头肌回声增强,彩色多普勒探及二尖瓣中度反流;左冠状动脉主干内径纤细,宽约 1.2 mm (图1),左前降支内径宽约 1.7 mm ,左回旋支内径宽约 1.3 mm ,右冠状动脉主干内径明显增宽,约 2.9 mm (图2),主动脉左冠状动脉窦未探及左冠状动脉开口,左冠状动脉内为逆向灌注血流(图3)。超声心动图提示:①冠状动脉异常起源,起源于肺动脉?②左房室腔扩大伴二尖瓣中量反流;③左室收缩功能减低。后于外院行冠状动脉造影检查显示:左

侧冠状动脉内径宽约 1.0 mm ,来源于肺动脉。

讨论:冠状动脉异常起源于肺动脉,是一种非常罕见的冠状动脉先天性异常疾病,是由于胚胎发育过程中冠状动脉芽向主动脉瓣窦融合失败所致,以左冠状动脉较为常见,被称为Bland-White-Garland综合征,发病率约占三十万分之一^[1]。新生儿时期由于肺动脉压力较高,有效灌注压满足左冠状动脉对心肌的血供,随着肺动脉压逐渐下降,左、右冠状动脉间需建立侧支循环维持左冠状动脉对左心肌的血供,当左、右冠状动脉间未建立或极少建立侧支循环时,患儿会出现左室扩大、左心收缩功能降低等一系列心肌缺血的非特异性征象,常表现为不明原因的气促、多汗、拒奶、哭闹不安、面色苍白等。若不及时治疗,约90%患儿会于出生后1年内死于因缺血性左室功能障碍造成的心力衰竭^[2]。

(下转第815页)