

◆ 实验研究

Ultrasonic microbubbles destruction combining endothelial progenitor cells for improvement of erectile function in rats with diabetic erectile dysfunction

WANG Ying-jun¹, WANG Zhi-gang^{2,3}, RAN Hai-tao^{2,3}, TANG Hai-lin^{2,3}, ZHANG Rong-qiu¹,
WANG Gao-neng¹, ZHANG Rong-gui¹, ZHANG Wei-li^{1*}

(1. Department of Urology; 3. Department of Ultrasonography, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China; 2. Institute of Ultrasound Imaging, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

[Abstract] **Objective** To explore the feasibility of improving the delivery of endothelial progenitor cells (EPCs) to cavernosum tissue for the treating rat diabetes-induced erectile dysfunction by using ultrasonic microbubble destruction. **Methods** EPCs were derived from mouse bone marrow in vitro. Fifty-four SD rats were successfully induced into models of diabetes mellitus induced erectile dysfunction (DMED) and were randomly divided into 3 groups, i. e. control group, EPCs group and 1.0 W/cm² ultrasound+microbubbles+EPCs (US+MB+EPCs) group. All the rats were sacrificed 7 days after EPCs implantation. The number of penile erections and erection rate were induced by apomorphine (APO), and the vascular density of 3 groups was recorded after HE staining. EPCs expression was detected using immunohistochemistry, and VEGF protein was respectively detected with Western blot. **Results** Penile erections, erection rate, vascular density and EPCs expression were the best in US+MB+EPCs group ($P < 0.05$). And the expression of VEGF protein in US+MB+EPCs group was higher than that in two other groups (all $P < 0.05$). **Conclusion** Combination of ultrasound microbubbles and EPCs can enhance the transfection efficiency and targeting of EPCs effectively, therefore improve the erectile function of DMED rats.

[Key words] Ultrasonic therapy; Microbubbles; Endothelial progenitor cells; Diabetes-induced erectile dysfunction

超声辐射微泡配合内皮祖细胞移植治疗糖尿病大鼠阴茎勃起功能障碍

王英俊¹, 王志刚^{2,3}, 冉海涛^{2,3}, 唐海林^{2,3}, 张荣秋¹, 王高能¹, 张荣贵¹, 张唯力^{1*}

(1. 重庆医科大学附属第二医院泌尿外科; 3. 超声科, 重庆 400010;
2. 重庆医科大学超声影像学研究所, 重庆 400010)

[摘要] **目的** 探讨超声微泡配合内皮祖细胞(EPCs)移植至海绵体组织治疗大鼠糖尿病阴茎勃起功能障碍的可行性。**方法** 体外培养、分离 EPCs。将 54 只成功建立糖尿病勃起功能障碍模型的 SD 大鼠随机分为空白对照组、EPCs 治疗组、1.0 W/cm² 超声+微泡+EPCs 组(US+MB+EPCs 治疗组)。EPCs 移植 7 天后,以脱水吗啡(APO)诱导实验检测大鼠阴茎勃起次数和勃起率,组织学观察阴茎海绵体,计数毛细血管数目,计算血管密度,免疫组化检测 EPCs 移植大鼠阴茎海绵体的情况,Western blot 检测 VEGF 蛋白的表达。**结果** US+MB+EPCs 治疗组勃起次数和勃起率、毛细血管密度、EPCs 染色强度的阳性指数均高于其他两组(P 均 < 0.05),且 VEGF 蛋白表达水平最高($P < 0.05$)。**结论** 超声微泡联

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(81130025)、中加健康研究合作计划项目(81110219)。

[作者简介] 王英俊(1980—),男,山东淄博人,在读博士。研究方向:泌尿男科疾病诊断及治疗。E-mail: wyj_0928@163.com

[通讯作者] 张唯力,重庆医科大学附属第二医院泌尿外科,400010。E-mail: 66zwl@sina.com

[收稿日期] 2012-01-10 **[修回日期]** 2012-04-08

合 EPCs 移植可提高 EPCs 的转染率和靶向性,改善糖尿病大鼠的阴茎勃起功能。

[关键词] 超声疗法;微泡;内皮祖细胞;糖尿病勃起功能障碍

[中图分类号] R-332; R445.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-3289(2012)08-1431-05

阴茎勃起功能障碍(erec-tile dysfunction, ED)是糖尿病患者常见的并发症之一,其发生率约为 35%~90%^[1-2],是非糖尿病患者发病率的 3 倍^[3]。采用 PDE5 抑制剂治疗糖尿病性阴茎勃起功能障碍(diabetes mellitus induced erectile dysfunction, DMED)效果并不理想,仅对 50%~60%的患者有效^[4]。随着干细胞治疗技术成为一种有前途的治疗 ED 的手段,国外学者以雄鼠为模型,用内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)植入治疗 DMED,取得了一定疗效^[5];但缺乏组织特异性和靶向性,干细胞转染率不高,影响了其临床应用。超声波破坏微泡技术是一种新型的无创性定位释放技术,可以提高干细胞的转染率^[6]。本实验应用超声辐照微泡技术配合 EPCs 植入,观察 DMED 大鼠勃起功能改善的情况,探讨治疗 DMED 的新途径。

1 材料与方法

1.1 实验动物 15 只 2 周龄 SD 大鼠(用于提取干细胞),体质量 15~18 g,中位体质量 16 g;健康 10 周龄雄性 SD 大鼠 60 只(用于建立 DMED 模型),体质量 190~230 g,平均(210±30)g;均由重庆医科大学实验动物中心提供[动物质量合格号:SYXK(渝)2007-0001]。

1.2 EPCs 的提取与培养 取 2 周龄 SD 大鼠,以 1%戊巴比妥钠麻醉,常规消毒,在超净台上取出双侧股骨,剔除表面肌肉和结缔组织,浸入培养皿中。剪掉股骨的两端,用 10 ml 注射器抽取 4℃ 预冷的 L-DMEM 4 ml 反复冲洗,至骨髓腔变白。将冲洗液收集在 4 个离心管中,加入 4 ml 聚蔗糖,3000 rpm 离心 20 min,小心吸取上下两层间的白色云雾状狭窄带,置于新的离心管中,加入 4 ml 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)充分混匀,3000 rpm 离心 20 min,弃上清液,再加入 4 ml PBS,充分混匀 3000 rpm 离心 5 min,弃上清液。向离心管中加入 3~4 ml PBS、EGM-2,轻轻吹打均匀,加入 50 ml 培养液,置于 37℃ 5%CO₂ 饱和湿度培养箱中培养。

1.3 建立 DMED 大鼠模型 健康 10 周龄雄性 SD 大鼠 60 只,适应性喂养 1 周后,停饲 12 h(不禁饮)。常规消毒皮肤,左下腹注射新鲜配置的 1%链脲佐菌素(STZ)溶液(65 mg/kg 体质量)。72 h 后断尾测随机

血糖,符合血糖高于 16.7 mmol/L 的大鼠继续饲养 14 周,再次断尾测随机血糖,并配置脱水吗啡(apomorphine, APO)溶液(APO 4 mg 溶于 0.5 kg 维生素 C 及生理盐水中),将 APO 溶液 100 μg/kg 注入大鼠颈部皮肤松软处,记录大鼠 30 min 内的勃起次数。共 54 只造模成功,血糖高于 7.2 mmol/L, APO 诱导实验阴性。

1.4 实验动物分组及处理方法

1.4.1 动物分组 将 54 只造模成功的 DMED 大鼠随机分为空白对照组、EPCs 治疗组和 1.0 W/cm² 超声+微泡+EPCs 治疗组(US+MB+EPCs 治疗组),每组 18 只。

1.4.2 处理方法 ①对空白对照组经尾静脉注射 1 ml 生理盐水;②对 EPCs 治疗组经尾静脉注射 EPCs,细胞量为 2×10⁶ 个(细胞浓度为 1×10⁷ 个/ml),生理盐水稀释至 1 ml;③对 US+MB+EPCs 治疗组经尾静脉注射超声微泡(重庆医科大学超声影像学研究所提供)0.5 ml 和 2×10⁶ 个细胞量的 EPCs 的混合溶液(生理盐水稀释至 1 ml)。利用 GC-ZZ 型超声基因转染仪(重庆医科大学超声影像学研究所研制)对阴茎海绵体部位进行辐照,参数:辐照强度 1.0 W/cm²,辐照频率 1 MHz,辐照时间 2 min(辐照 10 s,间隔 10 s)。注射 7 天后,以 3%戊巴比妥钠过量麻醉法处死动物,提取阴茎组织。

1.5 效果评价

1.5.1 测定大鼠阴茎勃起功能 参考 Heaton 等^[7]的方法,注射 7 天后,将动物放入灯光调暗的房间内,保持安静,适应 10 min 后,于颈后皮下注射 APO 溶液(100 μg/kg 体质量),持续观察 30 min,记录每只大鼠的勃起情况。判断标准:龟头充血或末端阴茎体露出为 1 次阴茎勃起。

1.5.2 阴茎海绵体的组织学观察 取标本石蜡切片行 HE 染色,并用兔抗大鼠 CD34 抗体做免疫组化,标记阴茎海绵体组织中的血管。每张切片随机选取 5 个视野,镜下计数毛细血管数目,计算血管密度。

1.5.3 免疫组化检测 EPCs 移植后的大鼠阴茎海绵体 取大鼠阴茎海绵体组织,固定后以石蜡包埋,切成 7 μm 厚的薄片,贴于干净载玻片上,于 58℃ 下烤 18 h,以二甲苯脱蜡。PBS 冲洗,加入 3% 过氧化氢作用

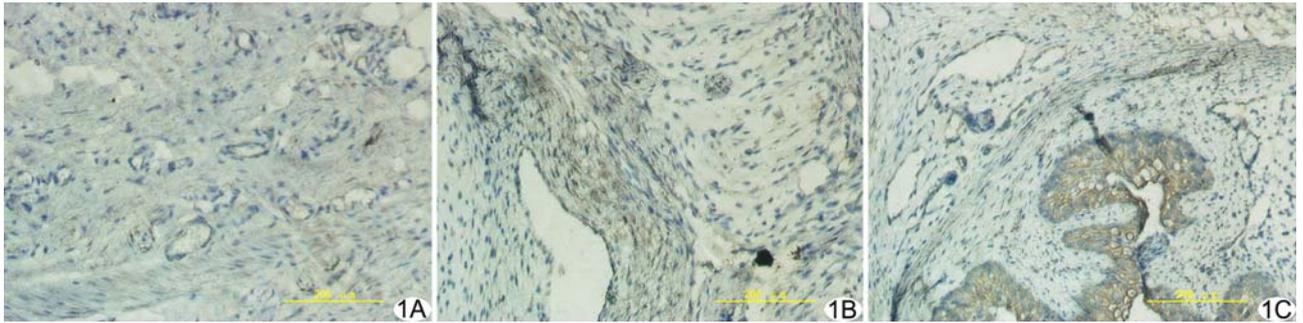


图 1 免疫组化检测 EPCs 移植后的大鼠阴茎海绵体 (×200) A. 空白对照组的大鼠阴茎海绵体; B. EPCs 治疗组的大鼠阴茎海绵体; C. US+MB+EPCs 治疗组的大鼠阴茎海绵体

30 min 灭活内源性过氧化物酶, 之后加入 5% 牛血清白蛋白作用 30 min 阻断非特异性抗原, 分别加入 Rabbit Anti-Brdu, Rabbit Anti-Vcam1, Rabbit Anti-ICAM-1/CD54/MALA-2, Rabbit Anti-V III Factor (北京博奥森生物科技有限公司), 并用牛血清白蛋白做空白对照。4℃ 过夜后滴加生物素化山羊抗兔 IgG, 作用 30 min 后滴加试剂 SA13C, 20 min 后以 DAB 显色剂显色, 阳性细胞胞浆呈现棕黄色。每个标本取 5 张切片, 以 6 孔细胞培养板进行观察, 每孔随机选 5 个视野, 采用 MS 细胞图像分析系统, 医学图像分析软件, 以阳性指数表示阳性强度。

1.5.4 Western blot 检测 VEGF 蛋白的表达 取大鼠阴茎海绵体组织, 在冰浴状态下弄碎, 提取组织蛋白, 用 Bradford 法测定上清液的蛋白浓度。抽取已定量蛋白溶液, 与缓冲液等量混合, 煮沸 5 min, 制备聚丙烯酰胺凝胶。将电泳条带转移至 PVDF 膜上。封闭所有非特异性抗原, 依次加入一抗, 孵育、洗涤、加二抗, 再孵育、洗涤。用碱性磷酸酶法显影, 用 Quantity One 软件定量分析各组 VEGF 蛋白的表达。

1.6 统计学处理 采用 PEMS 3.0 统计分析软件, 计量资料均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。对符合正态分布的数据采用方差分析进行组间两两比较, 以配对资料 *t* 检验进行组内比较; 对不符合正态分布的数据以及计数资料采用非参数检验。组间等级资料采用 Wilcoxon 秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 阴茎勃起功能 EPCs 治疗组 8 只大鼠有勃起现象, 勃起次数 (1.12 ± 0.37) 次, 勃起率 44.44% (8/18)。US+MB+EPCs 治疗组 15 只大鼠有勃起现象, 勃起次数 (2.16 ± 0.79) 次, 勃起率 83.33% (15/18)。空白对照组大鼠未见勃起现象。US+MB+EPCs 治疗组大鼠勃起次数和勃起率明显高于其他两组, 差异

均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。

2.2 组织学观察阴茎海绵体 US+MB+EPCs 治疗组大鼠阴茎海绵体组织中有大量新生毛细血管, 毛细血管密度为 (108.51 ± 15.70) 条/ mm^2 , 明显高于 EPCs 治疗组 $[(57.29 \pm 9.27)$ 条/ $\text{mm}^2]$ 和空白对照组 $[(10.21 \pm 5.73)$ 条/ $\text{mm}^2]$, 差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。

2.3 免疫组化检测 EPCs 移植大鼠阴茎海绵体 标本染色良好, 背景清楚。US+MB+EPCs 治疗组 EPCs 染色强度的阳性指数 (2.62 ± 0.78) 明显高于空白对照组 (0.22 ± 0.11) 和 EPCs 治疗组 (1.27 ± 0.36) , 差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05 , 图 1)。

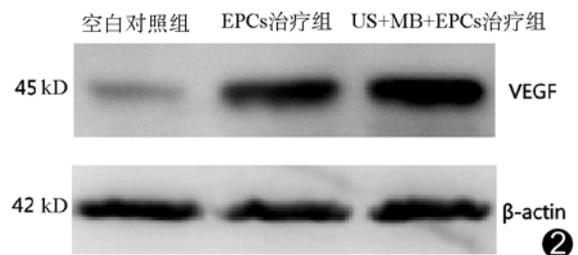


图 2 Western blot 检测大鼠阴茎 VEGF 蛋白的表达

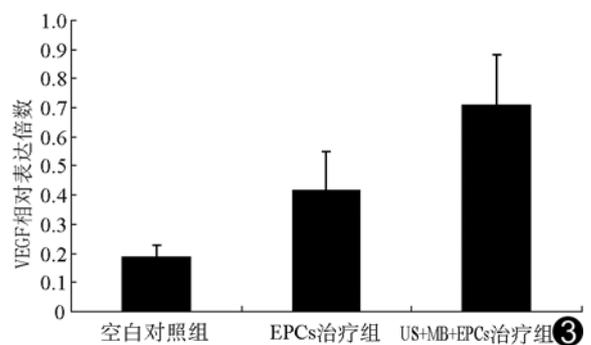


图 3 Western blot 定量检测各组大鼠阴茎组织中 VEGF 蛋白的表达

2.4 Western blot 检测 VEGF 蛋白的表达 Western blot 结果显示, 各组在 45 kD 处均可见特异性条带(图 2), 其中 US+MB+EPCs 治疗组的条带最为明显; 以 β -actin 作为内参, 采用 Quautity One 软件定量分析各组 VEGF 蛋白的表达, US+MB+EPCs 治疗组的蛋白水平明显高于其他 2 组 ($P < 0.05$, 图 3)。

3 讨论

DMED 是由多因素引起的, 病因涉及很多方面, 包括血管内皮系统损害、外周神经损害、内分泌功能紊乱以及患者心理原因等, 其中血管因素是引起 DMED 的重要原因。Simopoulos 等^[8]采用三维 CT 观察糖尿病兔阴茎海绵体组织结构情况, 发现海绵体动脉管腔狭窄, 同时血容量减少。血供减少导致海绵体组织缺血, 长期缺血可导平滑肌细胞减少, 白膜弹性蛋白和胶原成分增加, 海绵体纤维化加剧, 最终发生 ED。

EPCs 是血管内皮细胞的前体细胞, 能够诱导产生血管内皮细胞, 建立侧支循环系统, 恢复缺血组织或器官的血液供应。1997 年, Asahara 等首先从外周血中提取了骨髓来源的 EPCs。此后大量研究^[9]表明 EPCs 可以从胎肝、脐带血、骨髓和外周血的 CD14⁺、CD34⁺、CD133⁺ 的造血干细胞中分离培养出来。近年来, EPCs 主要用于研究血管因素造成的 ED。2010 年, Gou 等^[5]将 EPCs 注入 130 个 DMED 大鼠模型, 观察发现 EPCs 能改善大鼠勃起功能, 且大鼠血管内皮细胞增生, 新血管增多。本实验发现, US+MB+EPCs 治疗组在促进毛细血管新生中作用明显, 其效果明显强于 EPCs 治疗组和空白对照组。毛细血管再生有利于改善阴茎海绵体缺血状态, 增加平滑肌细胞数量, 遏制海绵体纤维化, 改善 ED。

超声微泡介导细胞转染可有效提高干细胞转染的靶向性和组织特异性。超声空化效应可能是超声微泡提高干细胞转染率的有效机制^[10], 可在瞬间产生“激震波”, 在细胞膜表面产生许多可逆性的小孔, 增加细胞膜的通透性, 从而提高干细胞的转染率。同时, 超声造影剂中含有直径约 2~4 μm 的含气微泡, 超声聚焦于特定组织时, 破坏微泡可以产生切剪力^[11], 促进干细胞靶向导入靶组织。本研究于治疗后进行电镜观察, 发现 US+MB+EPCs 治疗组大鼠阴茎海绵体组织仅有轻微出血和极少量炎性细胞浸润, 细胞膜完好, 细胞无明显坏死, 表明超声微泡技术是安全的, 且 US+MB+EPCs 治疗组的 EPCs 染色强度的阳性指数明显高于空白对照组和 EPCs 治疗组。VEGF 是促进血管新生的主要诱导因子之一^[12], 也是诱导 EPCs 细胞

系分化为成熟的内皮细胞的重要诱导因子^[13], 因此检测 VEGF 蛋白含量对观察 EPCs 的转染率及新血管再生具有十分重要的意义。本研究中 Western blot 结果提示 US+MB+EPCs 治疗组的条带最为明显, 即其蛋白水平明显高于其他组, 表明超声辐照微泡技术能够提高 EPCs 的转染率和靶向性, 而转染率和靶向性的提高有利于改善 DMED 大鼠的勃起功能。

APO 诱导实验是一种常用的检测大鼠勃起功能的方法, 操作简单, 也比较直接和客观。本研究发现, US+MB+EPCs 治疗组大鼠勃起明显, 在勃起次数和勃起率上均优于 EPCs 治疗组和空白对照组。

综上所述, 超声微泡技术是一种安全有效的干细胞移植手段, 可以增强 EPCs 的转染率和靶向性, 改善 DMED 大鼠的阴茎勃起功能。

[参考文献]

- [1] Cho NH, Ahn CW, Park JY, et al. Prevalence of erectile dysfunction in Korean men with type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med*, 2006, 23(2):198-203.
- [2] Malavige LS, Jayaratne SD, Kathirarachchi ST, et al. Erectile dysfunction among men with diabetes is strongly associated with premature ejaculation and reduced libido. *J Sex Med*, 2008, 5(9): 2125-2134.
- [3] Feldman HA, Goldstein I, Hatzichristou DG, et al. Impotence and its medical and psychosocial correlates: Results of the Massachusetts Male Aging Study. *J Urol*, 1994, 151(1):54-61.
- [4] Kendirci M, Gur S, Sikka SC. Gene therapy for erectile dysfunction. *Front Biosci*, 2005, 10(10):2758-2769.
- [5] Gou X, He WY, Xiao MZ, et al. Transplantation of endothelial progenitor cells transfected with VEGF165 to restore erectile function in diabetic rats. *Asian J Androl*, 2011, 13(2):332-338.
- [6] Suzuki J, Ogawa M, Takayama K, et al. Ultrasound-microbubble-mediated intercellular adhesion molecule-1 small interfering ribonucleic acid transfection attenuates neointimal formation after arterial injury in mice. *J Am Coll Cardiol*, 2010, 55(9):904-913.
- [7] Heaton JP, Varrin SJ, Morales A. The characterization of a bioassay of erectile function in a rat model. *J Urol*, 1991, 145(5): 1099-1102.
- [8] Simopoulos DN, Gibbons SJ, Malysz J, et al. Corporeal structural and vascular micro architecture with X-ray micro computerized tomography in normal and diabetic rabbits: Histopathological correlation. *J Urol*, 2001, 165(5):1776-1782.
- [9] Francis S. Endothelial progenitor cells and coronary artery disease. *Heart*, 2004, 90(6):591-592.
- [10] 陈智毅, 谢明星, 王新房, 等. 超声介导微泡破裂增强体外基因转染的方法学研究. *中国医学影像技术*, 2008, 24(9):1337-1340.
- [11] Brujan EA, Ikeda T, Matsumoto Y. Jet formation and shock

wave emission during collapse of ultrasound-induced cavitation bubbles and their role in the therapeutic applications of high-intensity focused ultrasound. *Phys Med Biol*. 2005, 50(20):4797-4809.

[12] Hanjaya-Putra D, Yee J, Ceci D, et al. Vascular endothelial growth factor and substrate mechanics regulate in vitro tubulo-

genesis of endothelial progenitor cells. *J Cell Mol Med*, 2010, 14(10):2436-2447.

[13] Young PP, Hofling AA, Sands MS. VEGF increases engraftment of bone marrow-derived endothelial progenitor cells (EPCs) into vasculature of newborn murine recipients. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(18):11951-11956.

Meningioma on the skull base, jugular fossa and parotid deep lobe: Case report

颅底、颈静脉窝和腮腺深叶脑膜瘤 1 例

刘 渊¹, 张啸波², 肖越勇²

(1. 中国人民解放军第 302 医院放射科, 北京 100039; 2. 中国人民解放军总医院放射科, 北京 100853)

[Key words] Meningioma; Skull base; Jugular fossa; Parotid gland; Magnetic resonance imaging

[关键词] 脑膜瘤; 颅底; 颈静脉窝; 腮腺; 磁共振成像

[中图分类号] R739.45; R445 [文献标识码] B [文章编号] 1003-3289(2012)08-1435-01

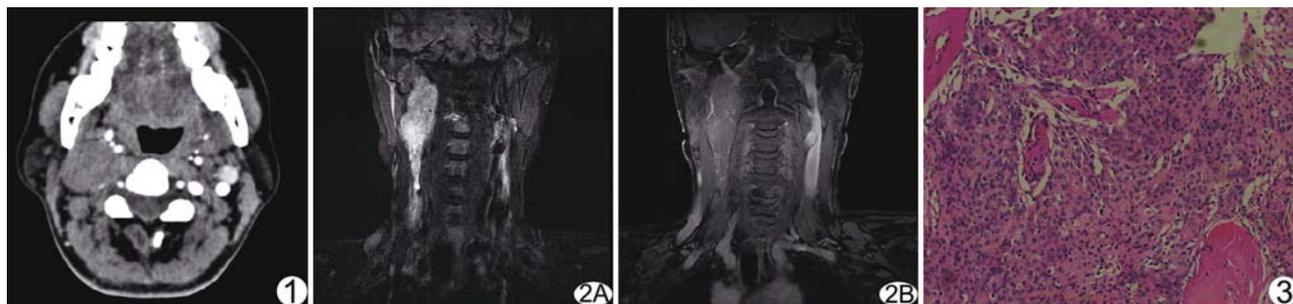


图 1 脑膜瘤的轴位 CT 图像 右侧颈静脉孔区软组织肿块, 邻近血管受压移位 图 2 脑膜瘤的冠状位 MRI A. STIR 图像示病变呈梭形, 边界清晰, T2WI 呈稍高信号; B. 增强图像示病变轻度不均匀强化 图 3 病理图示内皮型脑膜瘤(HE, ×100)

患者女, 51 岁, 发现右颈部无痛性肿物 15 天。体格检查: 颌面部左右不对称, 右耳后颈部肿胀, 可触及 6 cm × 4 cm × 4 cm 条索状肿块, 质地中等, 无触压痛, 与皮肤无明显粘连; 皮肤颜色正常, 皮温不高。脑血管 CT 增强+三维重建: 考虑右侧颈静脉血栓形成(图 1)。颈部 MR 平扫+增强: 右侧颈动脉分叉外后方异常信号, 考虑为良性肿瘤, 神经源性肿瘤可能性大(图 2)。行颅底颈部巨大肿瘤切除术, 术中见肿物位于茎突内侧、胸锁乳突肌前内侧, 包膜完整, 包绕部分副神经, 迷走神经位于颈内动脉与肿物之间。病理诊断:(颅底、颈静脉窝和腮腺深叶)内皮型脑膜瘤, WHO I 级(图 3); 免疫组化: CD34(-),

EMA(+), Ki-67(+), 孕激素受体(+), S-100(-), Vim(+).

讨论 颈静脉孔区脑膜瘤起源于颈静脉球周围的蛛网膜绒毛, 包绕邻近颅神经, 向颞骨、颈椎及后颅窝生长; 发病率低, 迄今为止文献报道的颈静脉孔区脑膜瘤不足 100 例。脑膜瘤的典型 CT 表现为均匀高密度肿瘤, 边界清楚, 增强后明显均匀强化; MR 表现为 T1WI、T2WI 等信号, 增强后明显均匀强化, 可见脑膜尾征。颈静脉孔区是颈静脉球瘤及神经源性肿瘤的好发部位。颈静脉球瘤 MRI 常可见盐胡椒征; 神经源性肿瘤 T1WI 呈低或等信号, T2WI 呈高信号, 可为圆形或者梭形, 多有囊变, 强化不均匀。本例影像学表现缺乏特异性, 临床无颈静脉综合征表现, 诊断困难, 提示对于发生于颈静脉孔区、尤其是无该部位好发肿瘤典型征象的占位性病变, 应考虑到脑膜瘤的可能。

[作者简介] 刘渊(1987-), 男, 山西临汾人, 本科, 医师。

E-mail: liuyuan282_ok@163.com

[收稿日期] 2012-04-01 [修回日期] 2012-04-15