

[文章编号] 1000-1182(2009)01-0084-04

超声微泡破裂法促进骨形态发生蛋白-2 在小鼠骨骼肌表达的研究

孙钦峰¹ 杜芳² 徐岩¹ 杨丕山¹

(1.山东大学口腔医院 牙周科, 山东 济南 250012; 2.徐州医学院 口腔系, 江苏 徐州 221004)

[摘要] 目的 探讨超声微泡破裂法对基因重组人骨形态发生蛋白-2(rhBMP-2)质粒pIRES-rhBMP2-EGFP在小鼠骨骼肌的转染、表达的促进作用。方法 24只BALB/c小鼠随机分为4组, 每组6只。A组和B组选择右侧胫前肌为注射点, 其中A组注射质粒, B组注射质粒与微泡造影剂混合物后用超声辐照, 质粒注射量为30 μg; C组和D组选择右侧股四头肌为注射点, 其中C组注射质粒, D组注射质粒和微泡造影剂混合物后用超声辐照, 质粒注射量为100 μg。7 d后处死A组和B组小鼠, 取胫前肌在荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达情况; 14 d后处死C组和D组小鼠, 取股四头肌行免疫组化检测rhBMP-2表达情况。结果 7 d后B组阳性肌纤维百分率高于A组($P<0.05$); 14 d后, C组和D组都可检测到rhBMP-2的表达, 但D组rhBMP-2表达量比C组多。结论 超声介导微泡破裂法能增加外源性rhBMP-2基因在小鼠体内骨骼肌转染率和表达水平, 有望为牙周病的基因治疗提供一种新型方法。

[关键词] 超声; 微泡; 基因治疗; 人骨形态发生蛋白-2

[中图分类号] R782.2 **[文献标识码]** A

Ultrasound-mediated microbubble destruction enhances bone morphogenetic protein-2 gene expression in mouse skeletal muscles SUN Qin-feng¹, DU Fang², XU Yan¹, YANG Pi-shan¹. (1. Dept. of Periodontology, School of Stomatology, Shandong University, Jinan 250012, China; 2. Dept. of Stomatology, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221004, China)

[Abstract] **Objective** To explore whether ultrasound-mediated microbubble destruction can enhance the expression efficiency of plasmid pIRES-rhBMP2-EGFP for bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) in mice skeletal muscle. **Methods** Twenty four male BALB/c mice were divided into four groups. The naked plasmid was injected into the pretibial muscle or the quadriceps muscle(group A and group C) without ultrasound-mediated microbubble destruction method. Micobubbles with plasmid were injected into the pretibial muscle or the quadriceps muscle(group B and group D) with destructing micobubbles by ultrasound immediately. Twelve mice(group A and group B, 30 μg plasmid injected) were killed after 7 days and the tissue samples of the pretibial muscle were obtained to observe the expression of enhanced green fluorescence protein(EGFP) by inverted fluorescence microscope, gene transfection efficiencies were quantified by counting EGFP positive fibers on mice skeletal muscle. After 14 days, the other twelve mice(group C and group D, 100 μg plasmid injected) were killed and immunohistochemical technique was applied to detect the rhBMP-2 gene expression. **Results** The percentage of GFP-positive fibers was significantly lower in the group A than that in the group B. After 14 days, expression of rhBMP-2 was detected in cells and interstitial spaces in the group C and group D, and expression efficiency of rhBMP-2 in the group D was significantly higher than that in the group C. **Conclusion** Ultrasound-mediated microbubble destruction could enhance the transfection and expression efficiency of rhBMP-2 gene in skeletal muscle of mouse *in vivo*. It is a new gene therapy method for periodontal regeneration.

[Key words] ultrasound; microbubble; gene therapy; human bone morphogenetic protein-2

研究^[1-3]显示, 超声介导微泡破裂法能促进目的

基因安全而有效地定向转移, 增加外源性基因转染率和提高表达水平, 在基因治疗的领域展现出诱人的应用价值。骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)作为一种强效骨诱导因子, 在牙周组织再生和修复过程中具有重要的作用。本研究

[收稿日期] 2008-05-21; [修回日期] 2008-10-16

[基金项目] 山东省自然科学基金资助项目(Y2006C125)

[作者简介] 孙钦峰(1967-), 男, 山东人, 副教授, 博士

[通讯作者] 杨丕山, Tel: 0531-88382368

在前期研究^[4]已证实超声微泡破裂法可以明显提高外源性基因bmp-2在体外NIH3T3细胞中的转染率和蛋白表达的基础上,将含增强型绿色荧光蛋白的重组bmp-2质粒pIRES-rhBMP2-EGFP转染小鼠后肢骨骼肌细胞内,研究微泡造影剂在超声作用下能否促进bmp-2基因在小鼠体内转染和表达,为探讨直接法基因治疗在牙周病防治中的应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和实验动物来源

pIRES-rhBMP2-EGFP真核表达载体由山东大学口腔医学院刘玉构建^[5]。超声造影剂声诺维(Bracco公司,意大利),质粒大提试剂盒(Promega公司,美国),SP免疫组化染色试剂盒、兔抗鼠BMP-2抗体(北京中山公司)。Gene Quant pro紫外/可见光分光光度仪(Biochrom公司,美国),LEICA1800低温恒冷箱切片(Leica公司,德国),OLYMPUS IX81全电动荧光倒置显微镜(Olympus公司,日本),超声波治疗仪(Greenham公司,英国)。健康雄性BALB/c小鼠24只,5~6周龄,20~25 g,清洁级,由山东大学实验动物中心提供。

1.2 质粒DNA的提取

pIRES-rhBMP2-EGFP质粒在大肠杆菌DH5 α 中扩增,经Promega抽提试剂盒说明书进行质粒DNA的抽提纯化,提取后建立SalI、NotI和XhoI、MluI这2个双酶切反应体系进行质粒DNA的鉴定,最后按2.0 g/L的质量浓度保存备用。

1.3 微泡的制备

声诺维为磷脂包裹的六氟化硫(SF₆),微泡平均直径2.5 μ m,90%的微泡直径低于6 μ m。使用前注入生理盐水5 mL和已定量的待转化的pIRES-rhBMP2-EGFP,并使质粒DNA终质量浓度为1 g/L。振荡混匀,孵育30 min。

1.4 基因转染

BALB/c小鼠用体积分数为1%的戊巴比妥钠按75 mg/kg的剂量腹腔麻醉,在温暖环境下操作。术区脱毛,用温生理盐水擦拭干净局部区域,用1 mL注射针将溶液注射到小鼠相应骨骼肌内。参考文献[6],本实验超声辐射条件为频率为1 MHz、机械指数为1.5 W/cm²、通断比为20%、作用时间为60 s。实验动物随机分为4组:A组和B组选择右侧胫前肌为注射点,C组和D组选择右侧股四头肌为注射点。

A组:注入15 μ L质粒与15 μ L生理盐水的混合溶液(共30 μ L);B组:注入15 μ L质粒与15 μ L超声微泡造影剂混合溶液(共30 μ L)后立即用超声辐照;C组:注入50 μ L质粒与50 μ L生理盐水的混合溶液

(共100 μ L);D组:注入50 μ L质粒与50 μ L超声微泡造影剂混合溶液(共100 μ L)后立即用超声辐照。

以上溶液均轻轻混匀后再进行注射,质粒DNA的终质量浓度均为1 g/L。即A组和B组质粒注射量为30 μ g,C组和D组质粒注射量为100 μ g。

pIRES-rhBMP2-EGFP质粒已被证明可在体外细胞内正确表达^[4]。由于胫前肌体积小,容易定位,因此在注射少量质粒后通过荧光显微镜观察绿色荧光蛋白的表达,便可得知pIRES-rhBMP2-EGFP能否在体内正确表达,同时也可初步探讨超声微泡破裂法能否提高基因转染率;股四头肌体积较大,可以通过注射多量质粒,检测BMP-2的表达情况,观察其能否出现生物学效应。

1.5 观察蛋白表达情况

7 d后将A组和B组小鼠断颈处死,切取右后肢整块胫前肌,并将新鲜组织立即置于恒冷箱切片机内冻结15 min,然后修整肌肉组织,包埋固定,进行冰冻切片,以间距90 μ m将肌组织横切为厚度10 μ m薄片。搜集所有冰冻切片,荧光倒置显微镜以100倍将每一切片随机观察10个视野,每只鼠选取绿色荧光蛋白(green fluorescence protein,GFP)表达量最多的切片进行计数,计算各组间表达GFP的肌纤维数占肌纤维总数的百分率。

1.6 免疫组化染色图像采集分析

C组和D组于第14天取右侧股四头肌,4%多聚甲醛固定,石蜡包埋,切片,常规脱蜡至水,行免疫组化SP法染色,光学显微镜下观察。以PBS代替一抗作阴性对照。BMP-2蛋白表达阳性信号为棕褐色。采用DT2000图像分析系统分别对免疫组化染色切片进行计量分析。从每张切片中选取一有代表性的区域,系统随机选取5个高倍视野,分别计算光密度值(optical density,OD)和积分光密度值(integrated optical density,IOD),免疫组化染色信号越强,光密度值和积分光密度值越高,均呈正向关系。

1.7 统计学分析

数据采用SPSS 13.0分析,各组间阳性肌纤维百分率比较用 χ^2 检验。免疫组化染色图像分析结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较用两样本 t 检验。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

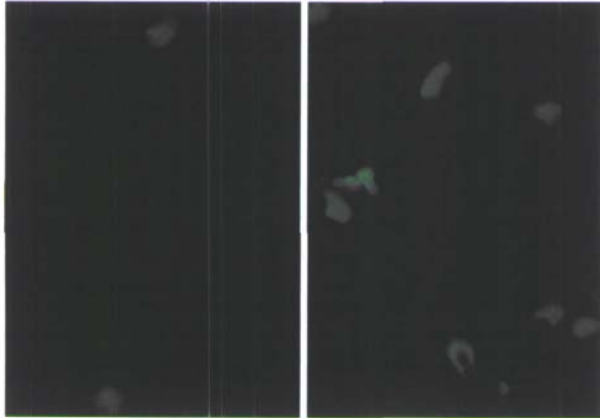
2.1 大量提取质粒pIRES-rhBMP2-EGFP电泳结果

pIRES-rhBMP2-EGFP用SalI和NotI双酶切后,得到7.3 kb的大片段和733 bp的小片段;pIRES-rhBMP2-EGFP用XhoI和MluI双酶切后,得到6.8 kb的大片段和1.2 kb的小片段,琼脂糖凝胶电泳均符

合预期结果。

2.2 小鼠胫前肌基因转染后的荧光观察

将小鼠胫前肌冰冻切片置于荧光倒置显微镜下观察并进行肌纤维荧光计数,结果显示A组有少量GFP表达,肌纤维荧光表达百分率为0.81%;B组有较多的GFP表达,肌纤维荧光表达百分率为9.06%,且部分肌纤维绿色荧光较明亮(图1),二者差异有统计学意义($P<0.05$)。



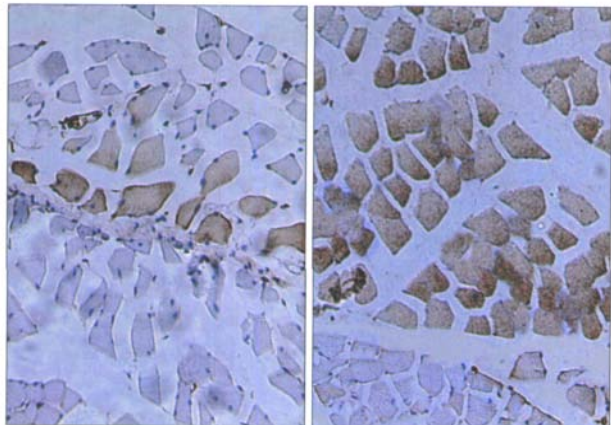
左: 15 μ L质粒和生理盐水组(A组); 右: 15 μ L质粒和超声微泡造影剂组(B组)

图 1 质粒pIRES-rhBMP2-EGFP转染7 d后GFP表达情况 荧光倒置显微镜 $\times 100$

Fig 1 Expression of GFP observed seven days after pIRES-rhBMP2-EGFP transfected inverted fluorescence microscope $\times 100$

2.3 BMP-2在小鼠股四头肌内的表达

免疫组化染色结果显示:D组小鼠骨骼肌细胞质和细胞间质内观察到着色显著的褐色颗粒,C组BMP-2表达量较少,可见少量浅棕色的阳性信号(图2)。将图像定量分析系统测得的数据进行分析得出:C组和D组的光密度值及积分光密度值的差异均有统计学意义($P<0.05$,表1)。



左: 50 μ L质粒和生理盐水组(C组); 右: 50 μ L质粒和超声微泡造影剂组(D组)

图 2 质粒pIRES-rhBMP2-EGFP转染14 d后BMP-2表达情况 SP $\times 100$

Fig 2 Expression of BMP-2 observed fourteen days after pIRES-rhBMP2-EGFP transfected SP $\times 100$

表 1 质粒pIRES-rhBMP2-EGFP转染14 d后BMP-2表达的OD和IOD值($n=6, \bar{x}\pm s$)

Tab 1 The OD and IOD values of BMP-2 expression 14 days after pIRES-rhBMP2-EGFP transfected($n=6, \bar{x}\pm s$)

组别	光密度值	积分光密度值($\times 10^3$)
C组	0.234 5 \pm 0.035 5	15.679 8 \pm 2.187 0
D组	1.733 3 \pm 0.209 9*	57.395 5 \pm 16.115 4*

注: *C组与D组比较, $P<0.05$

3 讨论

牙周组织破坏后如何获得再生一直是口腔领域研究的重点和难点^[7]。近年来将外源性生长因子应用于再生治疗的研究层出不穷,BMP-2因其独特的性质引起学界的重视。研究^[8]表明,BMP-2可以促进调控牙周再生细胞的基因表达和细胞功能,从而可以促进牙周组织的再生。但是牙周组织的特点决定了局部应用外源性生长因子既很难达到所要求的浓度,又极易被体液稀释流失^[9],而且在一定程度上还有促进细菌繁殖的可能。因此通过转基因方式诱导表达分泌型生长因子,很有可能成为一种新型的临床治疗手段。

将DNA导入宿主的方法和途径是多种多样的,其中裸质粒直接注射法是公认的一种既简便又有效的方法,并且安全性高,被认为是基因治疗的一个重要发展方向。但是质粒的转染效率较低,所以寻找提高质粒转染效率的方法是当前基因治疗研究的热点之一。最近,国内外学者研究发现超声微泡造影剂可作为一种新型的体内基因转染载体,在一定条件的超声照射下能促进目的基因安全而有效地定向转移,增加外源性基因的转化率和表达水平,该方法有可能成为基因治疗研究中新的突破点^[10-11]。

关于超声微泡在基因转染中的作用机制,一般认为,在超声波的作用下含有气体的微泡造影剂不断地压缩和膨胀,产生“空化效应”,且微泡造影剂能降低超声波的空化阈值,增强空化效应。当超声波声能达到一定强度时可导致微泡破裂,一方面可使微泡所携带的基因得以释放,另一方面可引起细胞膜孔形成,从而促进基因进入细胞内^[12-13]。

本研究初次尝试采用超声微泡破裂法将含增强型绿色荧光蛋白的重组BMP-2质粒pIRES-rhBMP2-EGFP进行小鼠后肢骨骼肌体内转染,以探讨微泡造影剂在超声作用下能否促进bmp-2基因在小鼠体内表达,这有助于确定利用超声微泡破裂法进行bmp-2基因直接治疗的可行性,并为此法在牙周组织再生中的应用奠定基础。本实验结果发现,质粒注射

后7 d, 单纯质粒组和质粒加微泡加超声组在荧光倒置显微镜下均观察到绿色荧光蛋白表达, 但后者阳性肌纤维百分率明显高于前者($P<0.05$); 14 d后, 免疫组化分析显示BMP-2表达量在质粒加微泡加超声组多于单纯质粒组表达量, 亦证明超声介导微泡破裂法能增加外源性基因的转化率和表达水平。然而, 本实验在基因导入的局部未发现新骨形成, 推测所用的超声参数可能不是与设计最相匹配, 以致于BMP-2表达水平不是很高, 或是与表达产物活性较低有关, 具体原因还有待进一步探究。所以根据不同设计寻求最优化的实验条件也是以后所要研究的方向。

[参考文献]

- [1] Miller DL, Song J. Tumor growth reduction and DNA transfer by cavitation-enhanced high-intensity focused ultrasound *in vivo* [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2003, 29(6) 887-893.
- [2] Taniyama Y, Tachibana K, Hiraoka K, et al. Development of safe and efficient novel nonviral gene transfer using ultrasound: Enhancement of transfection efficiency of naked plasmid DNA in skeletal muscle[J]. *Gene Ther*, 2002, 9(6) 372-380.
- [3] Nishida K, Doita M, Takada T, et al. Sustained transgene expression in intervertebral disc cells *in vivo* mediated by microbubble-enhanced ultrasound gene therapy[J]. *Spine*, 2006, 31(13) :1415-1419.
- [4] 孙钦峰, 刘玉, 杨丕山, 等. 超声介导微泡破裂法促进外源性基因在小鼠NIH3T3细胞中的表达[J]. *华西口腔医学杂志*, 2008, 26(2) :198-200.
SUN Qin-feng, LIU Yu, YANG Pi-shan, et al. Ultrasound-mediated microbubble destruction enhances exogenous gene expression in NIH3T3 cells *in vitro*[J]. *West China J Stomatol*, 2008, 26(2) :198-200.
- [5] 刘玉, 孙钦峰, 杨丕山, 等. 含增强型绿色荧光蛋白rhBMP-2基因真核表达载体的构建[J]. *上海口腔医学*, 2007, 16(6) :627-631.
LIU Yu, SUN Qin-feng, YANG Pi-shan, et al. Construction of a eukaryotic expression vector containing the enhanced green fluorescence protein and the recombinant human bone morphogenetic protein-2[J]. *Shanghai J Stomatol*, 2007, 16(6) :627-631.
- [6] 宫琳, 王志刚, 冉海涛, 等. 超声微泡造影剂介导小鼠骨髓基因转染实验研究[J]. *中国医学影像技术*, 2004, 20(3) 346-348.
GONG Lin, WANG Zhi-gang, RAN Hai-tao, et al. Microbubble mediating plasmid DNA transfection into mouse skeletal muscle by using ultrasound[J]. *Chin J Med Imaging Technol*, 2004, 20(3) 346-348.
- [7] 丁佩惠, 陈丽俐. 基因治疗在牙周组织再生中的应用[J]. *国际口腔医学杂志*, 2007, 34(2) 97-99.
DING Pei-hui, CHEN Li-li. Periodontal regeneration by gene therapy[J]. *Int J Stomatol*, 2007, 34(2) 97-99.
- [8] King GN, Hughes FJ. Bone morphogenetic protein-2 stimulates cell recruitment and cementogenesis during early wound healing [J]. *J Clin Periodontol*, 2001, 28(5) :465-475.
- [9] Taba M Jr, Jin Q, Sugai JV, et al. Current concepts in periodontal bioengineering[J]. *Orthod Craniofac Res*, 2005, 8(4) 292-302.
- [10] Guo H, Leung JC, Chan LY, et al. Ultrasound-contrast agent mediated naked gene delivery in the peritoneal cavity of adult rat[J]. *Gene Ther*, 2007, 14(24) :1712-1720.
- [11] Chen S, Ding JH, Bekerredjian R, et al. Efficient gene delivery to pancreatic islets with ultrasonic microbubble destruction technology[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(22) :8469-8474.
- [12] Newman CM, Bettinger T. Gene therapy progress and prospects: Ultrasound for gene transfer[J]. *Gene Ther*, 2007, 14(6) :465-475.
- [13] Dijkmans PA, Juffermans LJ, Musters RJ, et al. Microbubbles and ultrasound: From diagnosis to therapy[J]. *Eur J Echocardiogr*, 2004, 5(4) 245-256.

(本文编辑 汤亚玲)

《修复前外科与义齿和义颌修复》出版

由胡敏、丁仲鹑、田慧颖等教授编写的《修复前外科与义齿和义颌修复》已由科学出版社出版。本书内容主要包括口腔颌面部修复的解剖学基础、口腔颌面部修复的生物力学基础、为口腔颌面部修复准备的牙髓和牙周手术、口腔组织的修整手术、牙槽嵴增高术、种植外科、为口腔颌面部修复准备的颌骨缺损修复以及特殊的修复前外科, 如正颌外科、赈复体的制作和计算机辅助修复前外科等。同时, 本书还简要介绍了修复前外科的进展和修复前外科概念的变化, 是一部内容全面、新颖、临床实用的修复前外科专著, 可供口腔修复科、口腔颌面外科、头颈外科、整形外科、耳鼻喉科和眼科等学科医师参考。

各地新华书店和医学专业店有售, 定价78.00元。邮购电话: 010-64034601, E-mail: wenxiaoping@mail.sciencep.com。地址: 100717 北京市东黄城根北街16号 科学出版社 温晓萍(请在汇款附言注明购书的书名、册数、联系电话、是否要发票等)。

科学出版社