

# 超声辐射与微泡瞬时转染血管内皮细胞及其促血管生成的研究

汪迎晖 郭瑞强 周青 陈茜

**【摘要】** 目的 探讨超声辐射微泡技术将血管生成素-1 (Ang-1) 基因瞬时转染血管内皮细胞系 CRL-1730 后, Ang-1 的表达情况及迁移效应。方法 取对数生长期的血管内皮细胞 CRL-1730, 接种于 6 孔板, 分为空白对照组、Ang-1 组 (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )、微泡组 (微泡浓度 10%)、超声微泡组 (Ang-1 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 微泡浓度 10%, 超声辐射 30 s), 各组培养 6 h 换 10% 胎牛血清培养基, 培养至 24 h 收集细胞。采用 RT-PCR 法检测各组细胞 Ang-1 mRNA 表达水平, 采用 Western blot 法检测 Ang-1 蛋白表达水平, 选用 Transwell 法检测细胞迁移能力。结果 空白对照组、Ang-1 组、微泡组 Ang-1 mRNA 及蛋白表达比较, 差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 超声微泡组 Ang-1 mRNA 及蛋白表达均明显高于其余各组 ( $P < 0.05$ ), 且超声微泡组细胞迁移能力较其余组有明显提高 ( $P < 0.05$ )。结论 超声辐射微泡技术可将 Ang-1 基因瞬时转染入血管内皮细胞系 CRL-1730, 使表达 Ang-1 的血管内皮细胞具有更强的迁移能力。

**【关键词】** 微泡; 超声辐射; 血管生成素-1; 迁移

**Transient transfection of angiopoietin-1 into vascular endothelial cells by ultrasound combined with microbubbles** WANG Ying-hui\*, GUO Rui-qiang, ZHOU Qing, CHEN Qian. \* Department of Ultrasonography, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430071, China

Corresponding author: GUO Rui-qiang, Email: ruiqiangwhrm@hotmail.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the effects of ultrasound and microbubbles on transient transfection of angiopoietin-1 (Ang-1) into vascular endothelial CRL1730 cells and the effects of cell migration. **Methods** CRL1730 cells were divided into four groups: a control group (without any treatment), an Ang-1 group (with Ang-1 added only), a microbubble group (with only microbubbles added) and an ultrasound with microbubbles group (Ang-1, microbubbles and 1 MHz ultrasound irradiation for 30 s). All were cultivated for 24 h. The expression of Ang-1 mRNA and protein were measured using RT-PCR and Western blotting. The cells' migration ability was detected using the Transwell method. **Results** There was no difference in the expression of Ang-1 mRNA or protein among the control group, the Ang-1 group and the microbubbles group, but the expression of Ang-1 mRNA and protein was increased significantly in the ultrasound plus microbubbles group. Cell migration ability was also enhanced significantly in the ultrasound and microbubbles group compared with the other groups. **Conclusion** A combination of ultrasound and microbubbles might successfully transfect Ang-1 genes into vascular endothelial cells, and the migration ability of the transfected cells is also enhanced.

**【Key words】** Microbubbles; Ultrasound; Angiopoietin-1; Migration

血管生成素-1 (angiopoietin, Ang-1) 是一种重要的血管新生因子, 在血管生成后期维持新生血管的完整性与稳定性, 可以减轻血管的渗漏和炎症反应等, 在很多方面弥补血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的不足。本研究选择 Ang-1 基因为目的基因, 血管内皮细胞为靶细胞, 探讨超声辐射微泡技术体外转染血管内皮细胞产生的血管生成效应机

制, 为冠脉搭桥术同时进行超声辐射微泡定向基因转导治疗提供实验基础。

## 材料与方法

### 一、细胞与材料

Ang-1 基因的真核表达载体 eGFP-hAng-1 质粒, 由本课题组前期构建完成。DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Media)、胎牛血清购自美国 Gibco 公司, 引物由上海英骏生物技术公司合成, 各种工具酶均购自美国 Promega 公司。

### 二、CRL-1730 细胞培养

血管内皮细胞 CRL-1730 由武汉大学医学院惠

DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0254-1424. 2010. 08. 003

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30600141)

作者单位: 430060 武汉, 武汉大学人民医院超声影像科 (汪迎晖、郭瑞强、周青、陈茜); 武汉大学中南医院超声影像科 (汪迎晖)

通信作者: 郭瑞强, Email: ruiqiangwhrm@hotmail.com

赠,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养液于条件为 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱内培养。

### 三、载基因微泡的制备

微泡为意大利 Bracco 公司产品 SonoVue,直径约 2.5 μm,表面为磷脂成分,内部含六氟化硫气体(SF<sub>6</sub>)。按照厂家说明配制出 2 × 10<sup>8</sup> ~ 5 × 10<sup>8</sup> 个/ml 的微泡混悬液备用。将前期构建好的质粒与微泡混悬液混匀,于 4 °C 下静置 15 min,期间振荡数次保证质粒与微泡的充分接触和粘附。

### 四、分组与处理

取对数生长期 CRL-1730 细胞,胰酶消化细胞后加入新鲜培养液调整细胞浓度为 1 × 10<sup>6</sup> 个/ml,以 1 ml/孔接种于 6 孔培养板中培养。待细胞贴壁长至 80% 融合,换无血清培养基。实验分为 4 组:空白对照组(仅加入无血清培养基)、Ang-1 组(Ang-1 质粒 DNA 浓度为 10 μg/ml)、微泡组(微泡浓度为 10%)、超声微泡组(Ang-1 质粒 DNA 浓度为 10 μg/ml,微泡浓度为 10%,超声辐射 30s),各组终体积为 1 ml。

空白对照组、Ang-1 组、微泡组直接置于条件为 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱内培养,6 h 后换含 10% 胎牛血清的培养基,继续培养至 24 h 收集细胞。

将超声微泡组培养板置于水浴盆内,下垫海绵,保持培养板被水浸没稍许。应用重庆医科大学超声研究所提供的 UGT2007 型超声辐射仪,探头频率为 2 MHz,采用连续波,功率密度为 1.0 W/cm<sup>2</sup>。水浴盆、海绵垫、探头均先用紫外光照射 30 min,再将探头置于孔板内距板底部约 3 ~ 5 mm 处进行辐射,辐射时间 30 s。然后置于条件为 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱内培养,6 h 后换含 10% 胎牛血清的培养基,继续培养至 24 h 收集细胞。

### 五、Ang-1 mRNA 表达的检测

采用逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)半定量法检测 Ang-1 mRNA 的表达。取培养 24 h 的细胞,首先按试剂盒操作说明抽提总 RNA;逆转录 cDNA 合成严格按照 Revert Aid TM First Strand cDNA Synthesis Kit(MBI 公司)说明书进行操作;PCR 扩增体系 25 μl,包括 10 倍 PCR 缓冲液 2.5 μl、2.0 mmol/L dNTPs(dATP、dGTP、dCTP、dTTP)2.5 μl、MgCl<sub>2</sub> 1.5 μl、上游引物和下游引物(10 mmol/L)各 1.0 μl、DNA 模板 2 μl、TaqDNA 聚合酶 1.5 U,加 ddH<sub>2</sub>O 至总体积为 25 μl;Ang-1 片段大小为 1500 bp,上游引物为 5'-TGC CAT TAC CAG TCA GAG G-3',下游引物为 5'-CAA GCA TCA AAC CAC CAT C-3',总反应体系为 50 μl;反应条件为 95 °C 预变性 5 min,95 °C 变性 45 s,53 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 1 min,共进行 35 次循环,最后于 72 °C

延伸 7 min;扩增产物加上样缓冲液混匀后,取 10 μl 加入 1.5% 琼脂糖凝胶上样孔中,电压 100 V,电泳 30 min;用凝胶成像系统对显影后的条带灰度进行分析。内参为磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH),大小为 452 bp,引物序列为正义 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3',反义 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'。

### 六、Ang-1 蛋白表达的检测

采用 Western blot 法检测 Ang-1 蛋白的表达。取培养 24 h 的细胞,细胞裂解液裂解细胞后,用超声波细胞破碎仪冰浴下处理,至悬液变清,12 000 转/min 离心 10 min,获得总蛋白;取 25 μl 蛋白溶液,于 20 ~ 25 mA 恒流条件下在聚丙烯酰胺凝胶上电泳约 2.5 h,恒压 45 V,4 °C 转硝酸纤维素膜过夜;转膜结束后,将膜取出,用含 5% 的脱脂奶粉的 PBST(PBS + 0.2% Tween)封闭 2 h, PBST 漂洗膜 3 次,加一抗(兔抗人 1:1000),孵育 2 h; PBST 漂洗膜 3 次,加入相应的二抗(辣根过氧化物酶 HRP 标记羊抗兔 IgG 1:5000),孵育 40 min;弃去二抗, PBST 洗 3 ~ 4 次,将膜取出,用滤纸吸干;使用免疫印迹化学发光法 ECL 显影,将杂交膜置 1 ml ECL 显色液(溶液 A、溶液 B 各 0.5 ml)中,室温孵育 5 min;用滤纸蘸干杂交膜,在暗室压片,使用于凝胶成像系统对显影后的条带灰度进行分析。

### 七、血管内皮细胞迁移试验

取对数生长期细胞,按 1 × 10<sup>5</sup> 接种于 Transwell 孔板上室,加入 1 ml 无血清培养基,下室加入 1 ml 含 10% 胎牛血清的培养基,置 Transwell 孔板于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养 8h。将 Transwell 孔板上室取出,用棉棒将上室未迁移细胞擦去,甲醇固定 15 min,结晶紫染色后,切下膜,于显微镜下观察,每张膜取 3 个高倍镜视野计数迁移细胞数,计算平均值。

### 八、统计学分析

数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示。应用 SPSS 12.0 版分析软件进行数据统计,采用单因素多组资料的方差分析(One-Way ANOVA),进行 F 检验, P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 结 果

### 一、各组 CRL-1730 细胞光镜下表现

光镜下 CRL-1730 细胞呈长梭形,均匀贴壁生长。经超声辐射微泡处理后,细胞间隙增大,部分细胞轮廓消失,可见细胞分解呈碎片状。详见图 1。

### 二、各组 CRL-1730 细胞 Ang-1 mRNA 的表达

图 2 显示,空白对照组、Ang-1 组、微泡组均见少量 Ang-1 mRNA 表达,凝胶灰度比值分别为(1.48 ± 0.13)、(1.53 ± 0.22)和(1.45 ± 0.24),超声微泡组有

较多 Ang-1 mRNA 表达,凝胶灰度比值为(0.73 ± 0.09)。分析表明,超声微泡组 Ang-1 mRNA 表达明显增高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

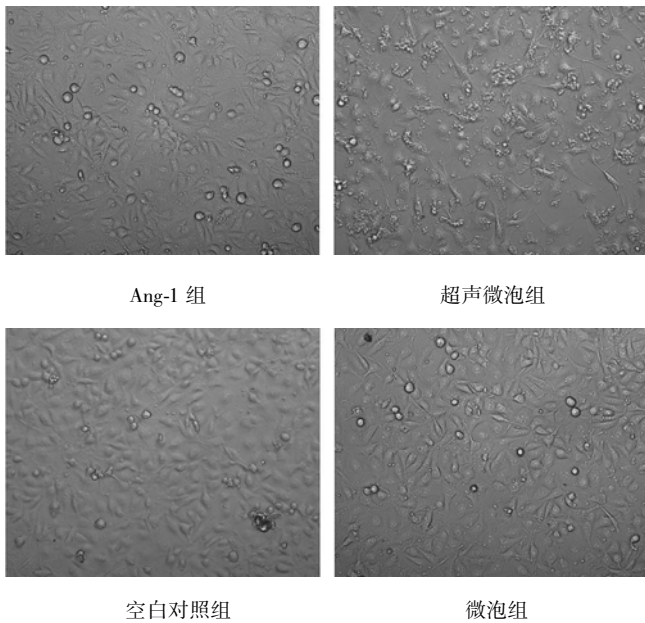
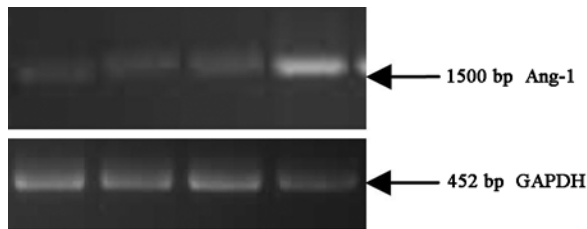


图 1 各组 CRL-1730 细胞光镜下观(×400)

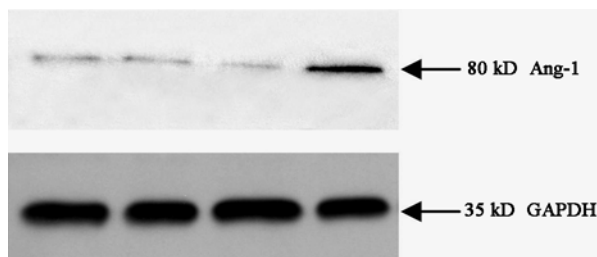


注:从左至右分别为空白对照组、Ang-1 组、微泡组、超声微泡组

图 2 各组细胞 Ang-1、GAPDH mRNA 的表达

### 三、各组 CRL-1730 细胞 Ang-1 蛋白的表达

图 3 显示,空白对照组、Ang-1 组、微泡组 Ang-1 蛋白条带灰度比值分别为(10.39 ± 1.23)、(10.45 ± 1.73)和(11.5 ± 1.97),差异无统计学意义( $P > 0.05$ );超声微泡组 Ang-1 蛋白表达明显增高,条带灰度比值为(1.55 ± 0.22),与其余各组相比,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

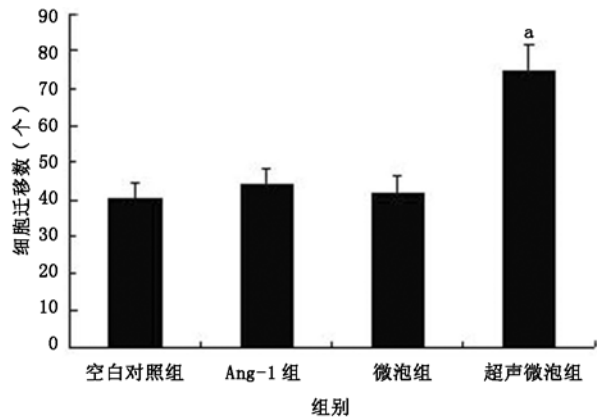


注:从左至右分别为空白对照组、Ang-1 组、微泡组、超声微泡组

图 3 各组细胞 Ang-1 蛋白的表达

### 四、各组 CRL-1730 细胞迁移能力的比较

空白对照组、Ang-1 组、微泡组细胞迁移数分别为(40.34 ± 4.16)、(44.00 ± 4.36)和(41.67 ± 4.73)个,各组两两比较,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ );超声微泡组细胞迁移数明显增加,为(74.67 ± 7.37)个,与其余各组相比,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图 4。



注:与其他各组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$

图 4 各组细胞迁移能力比较

## 讨 论

微泡是一种直径约几个微米的球形体,表面为脂质包膜,内含惰性气体。微泡技术的不断研发使其表面可携带大分子物质,并将分子导入人体组织、细胞,进而表达并发挥治疗功效。超声辐射微泡介导基因靶向传输,是一种高效、简便、易行的基因转导技术,可作为特定器官的靶向基因治疗手段。

国内外已有若干细胞系超声微泡瞬时转导外源性分子的报道。例如,Zhen 等<sup>[1]</sup>将短链 RNA 成功转染 HeLa 等 4 种细胞系;Watanabe 等<sup>[2]</sup>报道,连接顺铂的微泡在 1 MHz 的低强度超声辐射下对鼠结肠癌细胞的细胞毒性作用增强,并呈剂量依赖性;Lentacker 等<sup>[3]</sup>发现,连接脂质复合物的微泡在 1 MHz、2.0 W 的超声辐射下,脂质复合物能顺利进入黑色素瘤细胞;Wang 等<sup>[4,5]</sup>亦成功运用超声微泡将目的基因导入鼠神经胶质瘤细胞以及人胰腺癌细胞。综上,超声辐射微泡可将不同性质的外源性物质转入各类细胞中,但不同来源或种类的细胞,其生理状态以及对外源性基因的摄取能力不同,都会对基因转导产生不同程度的影响,故针对不同类型的靶细胞,转导方式及超声辐射参数设置也应有所不同。血管内皮是超声微泡辐射体内靶向基因转导的主要屏障,血液中的外源性基因、药物首先需要被内皮细胞摄取、吸收,穿越内皮屏障,才能进入相应组织细胞发挥治疗功效。如能将治疗基因在微泡介导超声辐射下成功转入血管内皮细胞,进一步表达并发挥其生物学效应,将是超声辐射微泡基

因治疗的实验及理论基础。

目前,已刊文献中鲜见超声辐射微泡转导血管内皮细胞系血管生成基因的实验报道。由于血管内皮细胞在基因表达、代谢状态等方面与其它细胞存在明显差异,且是体内靶向基因转导目标细胞,故超声辐射微泡能否转导血管内皮细胞亟待证实。

本研究成功应用 SonoVue 微泡联合超声辐射将 Ang-1 基因转导入血管内皮细胞 CRL-1730。CRL-1730 属血管内皮细胞系,具备血管内皮细胞的表型与生理特征。本研究采用 2 MHz 探头伸入培养基内对贴壁细胞直接短时辐射,功率密度  $1.0 \text{ W/cm}^2$ , 辐射后即刻显微镜下观察,发现大量微泡破裂,同时出现细胞毒效应,部分贴壁细胞分离、细胞间隙增大,少数细胞分解呈碎片状,并且随着辐射时间的延长,辐射功率的增大,细胞毒效应明显增强。本研究还发现辐射视野内细胞的细胞毒效应较辐射视野以外的细胞有明显增强,差异显著。本实验证实,超声功率密度为  $1.0 \text{ W/cm}^2$ , 辐射时间为 30 s 时,血管内皮细胞表达的 Ang-1 mRNA 及蛋白量均明显较其余组高,且细胞损失相对较少,说明血管内皮细胞与上述细胞具有相似的摄取 DNA 能力,应用超声辐射微泡技术可成功在体外向血管内皮细胞转导 Ang-1 基因,使得超声辐射微泡体内转导各种治疗基因及药物穿过血管内皮屏障成为可能,从而达到基因治疗的目的。

本实验将 Ang-1 基因转导入血管内皮细胞 CRL-1730 后,发现 Ang-1 对细胞的迁移能力有促进作用,提示转染 Ang-1 的内皮细胞可通过诱导血管内皮细胞出芽,趋化血管周围的支持细胞聚集形成新生毛细血管管样结构<sup>[6]</sup>,进而在体内发挥促血管生成作用。Ang-1 能够通过两条路径发挥作用,第一条是经典途径,即 Ang-1 与细胞膜上受体结合,激活细胞内第二信使系统如蛋白激酶 B/Akt 通路;第二条是核转位途径<sup>[7]</sup>,即 Ang-1 通过胞膜内吞进入细胞,并在胞浆内

多种酶协助下进入细胞核,发挥其 RNase 活性,参与对目标 RNA 的修饰,发挥血管生成效应。微泡联合超声辐射可通过“空化效应”和“声孔效应”使细胞膜的通透性增高,对 Ang-1 分子暂时性开放,进入细胞内后随即通过核转位途径发挥促血管生成作用。

总之,本研究通过摸索微泡超声转染方法,将血管生成基因成功转染入血管内皮细胞,发挥其促血管生成作用,为超声辐射微泡定向转染促血管生成基因治疗的临床新思路提供了基础实验依据。

#### 参 考 文 献

- [1] Chen Z, Liang K, Liu J, et al. Enhancement of surviving gene downregulation and cell apoptosis by a novel combination: liposome microbubbles and ultrasound exposure. *J Med Oncol*, 2009, 26: 491-500.
- [2] Watanabe Y, Aoi A, Horie S, et al. Low-intensity ultrasound and microbubbles enhance the antitumor effect of cisplatin. *Cancer Sci*, 2008, 99: 2525-2531.
- [3] Lentacker I, Wang N, Vandenbroucke RE, et al. Ultrasound exposure of lipoplex loaded microbubbles facilitates direct cytoplasmic entry of the lipoplexes. *Mol Pharm*, 2009, 6: 457-467.
- [4] Wang JF, Wu CJ, Zhang CM, et al. Ultrasound-mediated microbubble destruction facilitates gene transfection in rat C6 glioma cells. *Mol Biol Rep*, 2009, 36: 1263-1267.
- [5] Wang JF, Wang JB, Chen H, et al. Ultrasound-mediated microbubble destruction enhances gene transfection in pancreatic cancer cells. *Adv Ther*, 2008, 25: 412-421.
- [6] Nakatsu MN, Sainson RC, Aoto JN, et al. Angiogenic sprouting and capillary lumen formation modeled by human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) in fibrin gels: the role of fibroblasts and Angiopoietin-1. *Microvasc Res*, 2003, 66: 102-112.
- [7] Kim HM, Kang DK, Kim HY, et al. Angiogenin-induced protein kinase B/Akt activation is necessary for angiogenesis but is independent of nuclear translocation of angiogenin in HUVE cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 352: 509-513.

(修回日期: 2010-06-20)

(本文编辑: 吴 倩)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 《中华物理医学与康复杂志》投稿途径

最近常有作者致电编辑部询问投稿事宜,现正式告知如下:

本刊投稿途径有纸质稿件投稿和网络投稿两种,请任选一种,切勿重复投稿。

1. 网络投稿:请登陆本刊网站 [www.cjpmr.cn](http://www.cjpmr.cn),进入“作者投稿”通道,按步骤操作即可顺利投稿。不熟悉投稿操作方法的作者请查询主页上“投稿指南”,有详细说明。

2. 纸质稿件投稿:需通过邮局寄送一式三份打印稿,并请同时附上单位介绍信,电子稿件通过 email 发送至编辑部电子信箱。审稿费务必通过邮局汇款。

为提高稿件处理效率,也方便作者随时查询稿件情况,推荐作者采用网络投稿方式踊跃投稿。不熟悉电脑操作的作者建议采用纸质稿件投稿。