

两种携 B 类清道夫受体 I 超声造影剂的特性及对大鼠颈动脉造影的对比研究

刘芳 朱家安 黄云霞 李殿城 郭微 芮蒙杰 徐宇虹 胡兵

【摘要】 目的 对比研究六氟化硫微泡和全氟丙烷微泡的理化特性、携基因能力及在大鼠颈总动脉造影中的显影效果,旨在提供一种可动态实时监测的基因载体。方法 全氟丙烷和六氟化硫微泡均采用薄膜分散法制备,观察其形态、浓度、平均粒径及携 B 类清道夫受体 I (SR-B I)能力,并对比研究其在大鼠颈总动脉造影效果及持续时间。结果 全氟丙烷阳离子脂质体微泡的粒径范围为 0.712 ~ 5.56 μm ,平均粒径 1.312 μm ,浓度为 $(3.12 \pm 0.39) \times 10^9/\text{ml}$;六氟化硫阳离子脂质体微泡的粒径范围为 0.915 ~ 96.86 μm ,平均粒径 7.422 μm ,浓度为 $(7.43 \pm 0.28) \times 10^7/\text{ml}$ 。当 SR-B I 与这两种阳离子脂质体微泡的摩尔比为 1:3 时,微泡内 SR-B I 含量达到饱和。体内造影显示全氟丙烷微泡可快速充填颈总动脉管腔,持续时间达 180 s 以上。而六氟化硫微泡显影效果不明显。结论 与六氟化硫阳离子脂质体微泡相比,全氟丙烷阳离子脂质体微泡在体内造影有很好的显影效果,并且与 SR-B I 结合稳定,可望成为一种新型的载基因超声微泡造影剂。

【关键词】 造影剂; 颈动脉; 六氟化硫; 全氟丙烷

Comparative study on characteristics and enhanced ultrasonography of rat normal carotid artery of two ultrasound contrast agents loading SR-B I LIU Fang, ZHU Jia-an, HUANG Yun-xia, LI Dian-cheng, GUO Wei, RUI Meng-jie, XU Yu-hong, HU Bing. Department of Ultrasound, Shanghai Jiaotong University Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China

Corresponding author: ZHU Jia-an, Email: canzhujia@sina.com

【Abstract】 Objective To compare the characteristics and the SR-B I loading ability *in vitro* and to assess the enhancement effects on rat normal carotid artery of two kinds of lipid-coated cationic microbubbles (filled with perfluoropropane versus and sulphur hexafluoride). **Methods** Microbubbles filled with perfluoropropane and sulphur hexafluoride were prepared by film dispersion method. Its appearance, concentration, mean diameter, potential and the gene loading ability of the two kinds of microbubbles were detected. The enhancement effects and duration of the two kinds of microbubbles on rat normal carotid artery were compared. **Results** The mean diameter range of lipid-coated cationic microbubbles filled with perfluoropropane was 0.712-5.56 μm , the mean diameter was 1.312 μm and the concentration was $(3.12 \pm 0.39) \times 10^9/\text{ml}$. The mean diameter range of lipid-coated cationic microbubbles filled with sulphur hexafluoride was 0.915-96.86 μm , the mean diameter was 7.422 μm and the concentration was $(7.43 \pm 0.28) \times 10^7/\text{ml}$. The molar ratio between gene and lipid-coated cationic microbubble was 1:3. Contrast imaging showed that microbubbles filled with perfluoropropane could fill the normal carotid artery quickly, and the duration was 180 s. However, microbubbles filled with sulphur hexafluoride did not have the apparent effect of enhanced ultrasonography. **Conclusions** Compared with lipid-coated cationic microbubbles filled with sulphur hexafluoride, microbubbles filled with perfluoropropane have a satisfactory effect of enhanced ultrasonography. And it can load gene stably, which may become a new ultrasound contrast agent as a vehicle for encapsulating with genes.

【Key words】 Contrast media; Carotid arteries; Sulphur hexafluoride; Perfluoropropane

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2012.13.048

基金项目: 国家自然科学基金(30970794);上海市自然科学基金(09ZR1424300)

作者单位: 200233 上海交通大学附属第六人民医院超声科(刘芳、朱家安、黄云霞、李殿城、胡兵);上海交通大学药学院(郭微、芮蒙杰、徐宇虹)

通讯作者: 朱家安, Email: canzhujia@sina.com

超声微泡造影剂作为一种新型基因载体,正广泛应用于心血管系统的研究。由于其安全、靶向性高,为介导基因治疗展现出广阔的应用前景^[1-3]。本实验通过对比研究全氟丙烷和六氟化硫制备的阳离子脂质体微泡的理化特性、携基因能力、在正常大鼠颈总动脉的造影效果及持续时间,旨在提供一种可动态实时监测的基因载体。

材料与amp;方法

1. 材料与仪器:二软脂酰卵磷脂(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DPPC)、1,2-二油烯氧基-3-三甲氨基丙烷(1,2-dioleoyl-3-trimethyl-ammonium-propane, DOTAP)和二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000 [1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-methoxy (polyethylene glycol)-2000, DSPE-PEG2000] (Avanti, 德国); QIAGEN plasmid Giga Kit (Promega, 美国); Malvern 激光粒径仪 (Malvern, 英国); Acuson Sequoia 512 超声诊断仪 (Siemens, 德国)。

2. 实验动物:健康成年雄性 SD (Sprague-Dawley) 大鼠 10 只, 体质量 250 ~ 300 g。4% 戊巴比妥钠按 1 ml/kg 体质量腹腔注射麻醉, 双侧颈部备皮。

3. 质粒抽提:将 B 类清道夫受体 I (SR-B I) 转化 DH5 α 大肠杆菌, 氨苄青霉素筛选后挑选单克隆扩增, 按照 QIAGEN plasmid Giga Kit 说明书抽提纯化质粒。紫外分光法测定 OD 值, 调整质粒浓度至 1 mg/ml。

4. 携 SR-B I 的阳离子脂质体微泡的制备:全氟丙烷及六氟化硫阳离子脂质体微泡的制备均采用薄膜分散法, DPPC、DOTAP 及 DSPE-PEG2000 以一定比例溶解于氯仿中, 悬蒸后制成的混悬液采用声振仪声振, 同时分别通入全氟丙烷和六氟化硫气体加压加盖, 手持试剂管剧烈震动 10 s, 即为所需的阳离子脂质体微泡。将 SR-B I 加入上述制备的微泡中轻轻摇晃, SR-B I 通过静电吸附作用结合到阳离子微泡的表面。

5. 微泡造影剂携基因能力及定位检测:采用琼脂糖凝胶电泳法, 将 SR-B I 分别以一定摩尔比加入到上述制备的两种阳离子脂质体微泡(2:1、1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8) 的原溶液中, 将不加脂质体微泡的空白质粒作为对照组, 取 15 μ l 混合产物上样。设置电压为 80 V, 电泳时间为 30 min。紫外灯下观察结果并照相。

6. 不同超声强度联合微泡造影剂对 DNA 的影响:分别向上述制备的造影剂 (15 μ l) 中加入质粒 DNA (SR-B I, 1 μ g), 将其溶于 500 μ l Opti-MEM 培养基中, 将空白质粒 DNA 作为对照组。超声参数设置如下:频率 1 MHz; 占空比 50%; 强度分别为 0、1.0、2.1 和 3.2 W/cm²; 时间 0 s、10 s 和 30 s。苯酚/氯仿去除多余的脂质体, 后进行琼脂糖凝胶电泳来判断质粒是否受超声和微泡降解^[4,6]。

7. SD 大鼠颈总动脉造影:常规成像模式下, 扫查双侧大鼠颈总动脉长轴, 经尾静脉 0.5 ml/kg 团注上述制备的两种造影剂, 尾随 0.5 ml/kg 生理盐水冲洗通道, 采集造影前后图像。

8. 统计学分析:采用 SPSS 16.0 统计分析软件进行统计分析, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组之间比较采用方差分析, 两两比较使用 SNK 法, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 阳离子脂质体微泡的物理性状:采用薄膜分散法制备的全氟丙烷阳离子脂质体微泡与六氟化硫阳离子脂质体微泡的平均粒径、pH 值及浓度比较见表 1, 图 1。

表 1 六氟化硫微泡与全氟丙烷微泡理化特性的比较

组别	平均粒径 (μ m)	粒径范围 (μ m)	浓度(/ml, $\bar{x} \pm s$)	pH
C3F8 微泡	1.312	0.712 ~ 5.56	(3.12 \pm 0.39) $\times 10^9$	7.45
SF6 微泡	7.422	0.915 ~ 96.86	(7.43 \pm 0.28) $\times 10^7$	7.45

2. 微泡造影剂携基因能力:在一定范围内, 随着摩尔比的增加, 两种阳离子脂质体微泡携基因量逐渐增加, 当 SR-B I 与阳离子脂质体微泡的摩尔比为 1:3 时, 微泡内 DNA 含量达到饱和 (图 2)。

3. 不同超声强度联合微泡造影剂对 DNA 的影响:凝胶电泳结果显示在一定超声强度和时间内与两种阳离子脂质体微泡结合的 DNA 无明显改变 (图 3)。

4. 体内超声显影:全氟丙烷阳离子超声造影剂注入后管腔呈迅速增强的浓密云雾状亮光点回声 (图 4), 多普勒信号均显著增强, 频谱增宽, 显影时间可达 180 s 以上。六氟化硫阳离子超声造影剂注入后管腔显影不明显 (图 5)。

讨 论

超声联合微泡介导基因转染是近年来新兴起的一种基因转染技术, 微泡在超声辐照下产生的空化效应可使细胞膜通透性增加、微血管破裂、内皮间隙增宽。靶基因可通过破裂的微血管和内皮细胞间隙达组织细胞, 有效提高靶组织局部基因浓度^[7]。脂质体、蛋白质、表面活性剂是微泡常用的表面包被物质, 其中脂质体微泡的研究最为广泛, 可能由于脂质体有良好的稳定性和弹性^[8]。与人血白蛋白相比, 脂质无免疫原性, 无血液交叉感染的危险, 并且有文献报道, 在外观、大小、分布、浓度以及使用剂量几乎相同的情况下, 脂质体类造影剂对正常兔肾脏造影效果明显优于白蛋白类造影剂^[9]。但是一般的脂质体微泡作为基因载体, 存在载基因量不足、稳定性差、局部维持时间短等缺陷^[10]。本实验制备的阳离子脂质体微泡因其表面带正

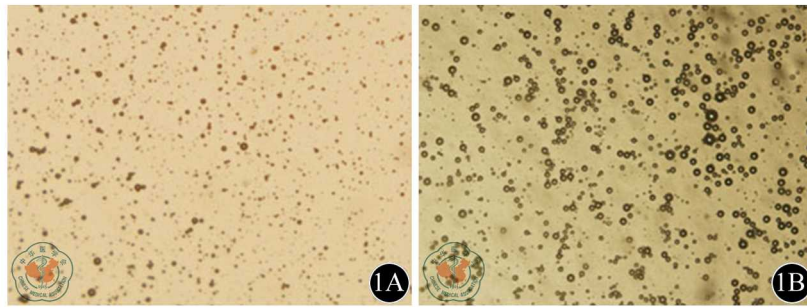


图1 全氟丙烷阳离子脂质体微泡与六氟化硫阳离子脂质体微泡,光镜下观察(×200)

1A: 全氟丙烷微泡; 1B: 六氟化硫微泡

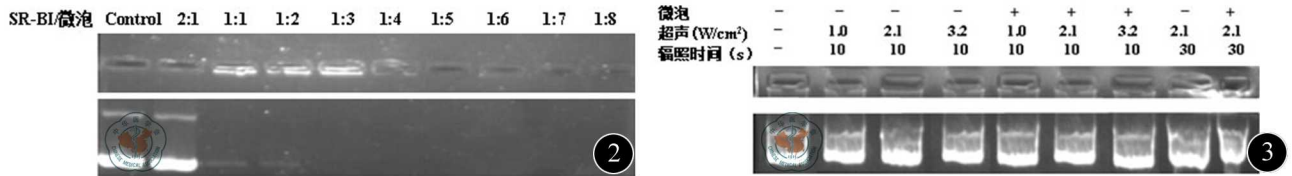


图2 凝胶电泳评价微泡携SR-B I的能力 当二者摩尔比达1:3时,刚好无条带跑出,上样孔经紫外灯照射发出荧光,此时微泡携DNA达到饱和;当二者摩尔比≥1:4时,上样孔经紫外灯照射无荧光 图3 凝胶电泳观察不同超声参数联合微泡对SR-B I的影响 不同的超声参数下联合微泡或单独作用于SR-B I,苯酚/氯仿去除多余的脂质体后进行琼脂糖凝胶电泳,各组条带均完整, DNA无降解改变

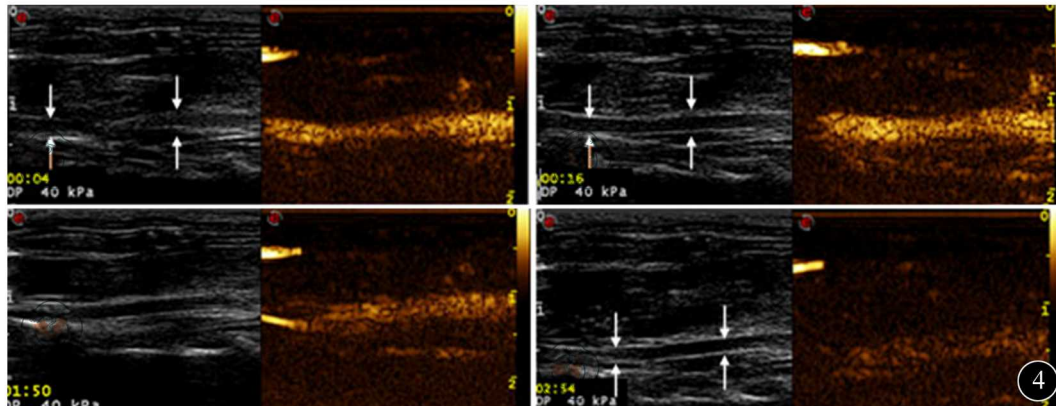


图4 SD大鼠尾静脉团注全氟丙烷微泡后大鼠颈总动脉造影增强声像图,箭头示颈总动脉

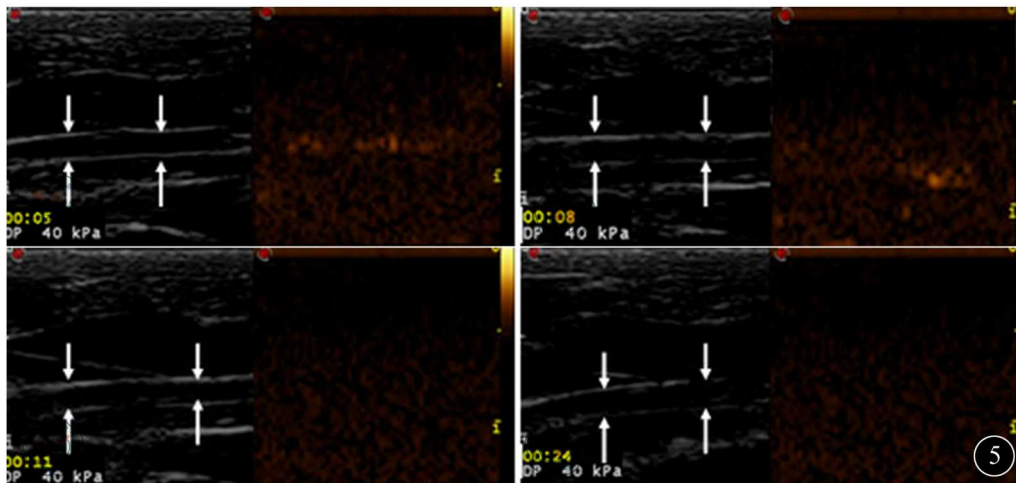


图5 SD大鼠尾静脉团注六氟化硫微泡后大鼠颈总动脉造影增强声像图,箭头示颈总动脉

电,可通过静电吸附作用与带负电的质粒 DNA 相互结合,从而达到载基因的目的^[11-13],与单纯机械震荡法将微泡与 DNA 结合相比更加稳定。本研究发现,随着

DNA 含量增大,两种阳离子脂质体微泡携基因的量逐渐增加,当 SR-B I 与其摩尔比为 1:3 时微泡内 DNA 含量达到饱和。同时,我们分析了不同超声强度和辐照

时间对 SR-B I 的影响,结果证实 DNA 无明显改变,为体内基因转染提供了初步的实验数据。

全氟丙烷作为微泡的填充气体,因其在水或血液中的溶解度和扩散率非常低,可延长体内循环时间。同时,我们在微泡中加入了 DSPE-PEG2000,同样具有延长体内循环时间的作用^[8]。与六氟化硫微泡比较发现,全氟丙烷制备的阳离子脂质体微泡平均粒径小,体积均匀,分布一致。体内造影显示全氟丙烷制备的微泡可显著增强大鼠颈总动脉强度和彩色多普勒信号,且造影时间较长,可持续 180 s 以上。而六氟化硫制备的造影剂颈总动脉显影不明显。可能的原因一方面微泡体积过大,大于 8 μm 的微泡无法通过肺循环^[2],其次,由于微泡在液体中的稳定性与微泡的体积有关,微泡体积越大,在血液中的稳定性越差。因此全氟丙烷制备的微泡较六氟化硫性质稳定、显影效果好,进入体内循环的微泡数量多,体内持续时间长,在满足理想造影剂基本要求的基础上,还可有效并稳定地携带基因,实现了实时、动态的观察基因载体在体内分布的情况。

SR-B I 是广泛表达于肝脏、产类固醇组织、小肠刷状缘、动脉粥样硬化病变部位的一类清道夫受体,具有特异的脂质转运功能,能介导胆固醇酯的选择性吸收,与 HDL 一起对于动脉粥样硬化性心血管疾病的发生起保护性作用^[14-15]。基因治疗动脉粥样硬化已成为心血管系统领域的一大研究热点。今后我们的研究重点将是应用超声联合微泡技术携 SR-B I 基因治疗动脉粥样硬化的疗效评价。

综上所述,全氟丙烷制备的阳离子脂质体微泡造影剂可长时间地对 SD 大鼠颈总动脉有增强效果,并且有良好的携基因能力,为动脉粥样硬化的基因治疗提供了较好的实验基础。

参 考 文 献

[1] Mayer CR, Bekeredjian R. Ultrasonic gene and drug delivery to the

cardiovascular system. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60:1177-1192.

- [2] Suzuki R, Oda Y, Utoguchi N, et al. Progress in the development of ultrasound-mediated gene delivery systems utilizing nano- and microbubbles. *J Control Release*, 2011, 149:36-41.
- [3] Shoros V. Response of contrast agents to ultrasound. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60:1117-1136.
- [4] Suzuki R, Takizawa T, Negishi Y, et al. Gene delivery by combination of novel liposomal bubbles with perfluoropropane and ultrasound. *J Control Release*, 2007, 117:130-136.
- [5] Christiansen JP, French BA, Klivanov AL, et al. Targeted tissue transfection with ultrasound destruction of plasmid-bearing cationic microbubbles. *Ultrasound Med Biol*, 2003, 29:1759-1767.
- [6] Deshpande MC, Prausnitz MR. Synergistic effect of ultrasound and PEI on DNA transfection in vitro. *J Control Release*, 2007, 118:126-135.
- [7] Brujan EA. The role of cavitation microjets in the therapeutic applications of ultrasound. *Ultrasound Med Biol*, 2004, 30:381-387.
- [8] Unger EC, Porter T, Culp W, et al. Therapeutic applications of lipid-coated microbubbles. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004, 56:1291-1314.
- [9] 谭开彬, 高云华, 刘平, 等. 两种自制超声造影剂对正常兔肾脏灰阶造影的对比研究. *第三军医大学学报*, 2003, 25:1431-1433.
- [10] Liu P, Wang X, Zhou S, et al. Effects of a novel ultrasound contrast agent with long persistence on right ventricular pressure: Comparison with SonoVue. *Ultrasonics*, 2011, 51:210-214.
- [11] Phillips LC, Klivanov AL, Wamhoff BR, et al. Targeted gene transfection from microbubbles into vascular smooth muscle cells using focused, ultrasound-mediated delivery. *Ultrasound Med Biol*, 2010, 36:1470-1480.
- [12] Borden MA, Caskey CF, Little E, et al. DNA and polylysine adsorption and multilayer construction onto cationic lipid-coated microbubbles. *Langmuir*, 2007, 23:9401-9408.
- [13] Tlaxca JL, Anderson CR, Klivanov AL, et al. Analysis of in vitro transfection by sonoporation using cationic and neutral microbubbles. *Ultrasound Med Biol*, 2010, 36:1907-1918.
- [14] Wehinger A, Tancevski I, Seiler R, et al. Influence of aspirin on SR-B I expression in human carotid plaques. *Atherosclerosis*, 2009, 206:234-238.
- [15] Hong SC, Zhao SP, Wu ZH. Effect of probucol on HDL metabolism and class B type I scavenger receptor (SR-B I) expression in the liver of hypercholesterolemic rabbits. *Int J Cardiol*, 2007, 115:29-35.

(收稿日期:2012-02-10)

(本文编辑:张岚)

刘芳,朱家安,黄云霞,等. 两种携 B 类清道夫受体 I 超声造影剂的特性及对大鼠颈动脉造影的对比研究[J/CD]. *中华临床医师杂志:电子版*, 2012, 6(13):3623-3626.