

❖ 实验研究

Ultrasound combined with cationic microbubbles enhanced in vitro gene transfer

ZHANG Qing-feng^{1,2}, WANG Zhi-gang^{1,2}, LI Pan^{1,2*}, ZHENG Yuan-yi^{1,2},
TIAN Ju^{1,2}, WANG Xing^{1,2}

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

[Abstract] **Objective** To observe the effects of ultrasound mediated destruction enhanced gene transfer with self-made cationic microbubbles comparing with common lipid microbubbles, so as to explore a more reliable and perfect gene vector. **Methods** Cationic lipid ultrasound microbubbles was prepared by mechanical oscillation with DC-cholesterol. Its physical properties and gene loading ability were detected. Microbubbles and plasmid DNA with HUVEC were divided into 6 groups, while radiation parameters were optimized. Cell viability of different concentration microbubbles was assessed. Expression of the enhanced green fluorescent protein was observed with fluorescent microscopy, and gene loading ability was detected with flow cytometry. The cell viability was measured using MTT assay. **Results** Regular shape and good dispersion were observed in self-made cationic microbubbles. The maximum ratio of loading gene of microbubbles was 39.7%. Between common lipid microbubbles and ultrasound mediated cationic microbubbles destruction, statistical differences were found. Decrease in viability of HUVEC was observed with increasing MB concentration. **Conclusion** The self-made cationic microbubbles have high gene loading ability, being able to enhance the efficiency of in vitro gene transfer.

[Key words] Ultrasound; Microbubbles; Contrast media; Gene transfer techniques

超声联合阳离子微泡造影剂体外增强基因转染

张清凤^{1,2}, 王志刚^{1,2}, 李攀^{1,2*}, 郑元义^{1,2}, 田菊^{1,2}, 王星^{1,2}

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

[摘要] **目的** 探讨超声介导自制阳离子微泡破坏、增强基因转染的效果, 并与普通脂质微泡对比, 寻找一种更可靠、完善的基因载体工具。 **方法** 采用水浴机械震荡法, 加入 DC-胆固醇制备阳离子微泡, 观察其物理特性并检测其体外载基因能力。将微泡和质粒 DNA 加入人脐静脉血管内皮细胞后分为 6 组, 观测不同微泡浓度对细胞存活率的影响, 应用荧光显微镜观察增强型绿色荧光蛋白的表达, 流式细胞仪检测基因转染率, MTT 法分析细胞存活率。 **结果** 自制阳离子微泡形态规整、分散度好, 最大载基因率为 39.7%。超声联合阳离子微泡能够增强基因转染, 与普通脂质微泡组相比差异有统计学意义; 随着微泡浓度增加, 细胞损伤增大。 **结论** 采用自制阳离子微泡可在体外实现较高效率的基因转染。

[关键词] 超声; 微泡; 造影剂; 基因转移技术

[中图分类号] R445.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-3289(2012)02-0211-05

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金项目(30900370、30900371)、国家自然科学基金面上项目(81071158)。

[作者简介] 张清凤(1986—), 女, 四川成都人, 在读硕士。研究方向: 超声微泡造影剂的基因治疗。E-mail: qingfengzhang518@126.com

[通讯作者] 李攀, 重庆医科大学超声影像学研究所, 重庆医科大学附属第二医院超声科, 400010。E-mail: cqlipan@163.com

[收稿日期] 2011-07-26 **[修回日期]** 2011-08-25

肿瘤的基因治疗是近年的研究热点,关键在于如何安全、高效地将外源基因导入细胞。转染率较理想的病毒载体存在免疫原性和致畸性,限制了其应用。超声介导微泡破坏、增强基因转染被认为是最具发展潜力的非病毒载体之一,能在体内、外增强多种细胞的基因转染^[1-2],但表面为非阳性电荷的微泡的转染率及体内靶向实验尚未完全攻克。有研究^[3]表明,带正电荷的微泡通过静电吸附作用与质粒 DNA 结合,通过血液循环达血管壁,在超声辐照范围内实现靶区的高效基因转染。本研究在前期实验成功制备新型阳离子微泡造影剂的基础上,观察阳离子微泡体外携带基因率及其转染人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)的效果。

1 材料与方 法

1.1 试剂与仪器 二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC, Sigma);二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC, Lipoid);聚乙二醇二硬脂酰磷脂酰乙胺(DSPE-PEG, Avanti)、 β -[N-(N', N'-二甲基胺乙基)胺基甲酰基]胆固醇(DC-Chol, Avanti)、全氟丙烷;本实验室构建的 pIRES2-EGFP;北京天根生化科技公司质粒大抽试剂盒;YJT 银汞胶囊调合器;微量紫外分光光度计(Thermo, NanoDrop ND-2000C);Malvern 表面电位测量仪(Zetasizer 3000HS);Olympus CKX41 倒置荧光显微镜;CGZZ 超声基因转染治疗仪、DFY 超声图像定量分析仪(重庆医科大学超声影像研究所)。

1.2 扩增纯化质粒 实验室保存的 pIRES2-EGFP 菌液经卡那霉素筛选后参照 TIANGEN 提纯扩增质粒,以分光光度仪测定光密度(optical density, OD)值,调整质粒浓度为 $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。

1.3 制备普通脂质微泡 将 DPPC、DSPE-PEG、甘油、磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)的混悬液 0.5 ml 置于 1.5 ml 的管形瓶中, 40°C 水浴 30 min ,高压充入全氟丙烷气体,振荡 60 s ,静置 5 min ,加 0.5 ml PBS 稀释,固定微泡浓度为 $4 \times 10^8/\text{ml}$,在光学显微镜下观察微泡的物理特性,并以 ^{60}Co γ 射线辐射灭菌待用。

1.4 制备载基因阳离子微泡 将 DSPC、DSPE-PEG、DC-Chol、甘油、PBS 混悬液 0.5 ml 按一定比例置于 1.5 ml 特制管形瓶中, 50°C 水浴 45 min , 4°C 冰箱冷却。再予 50°C 水浴 45 min ,高压换气充入全氟丙烷。振荡 60 s ,静置 5 min ,加入 0.5 ml PBS 稀释,固定微泡浓度为 $4 \times 10^8/\text{ml}$, ^{60}Co γ 射线辐射灭菌待转染用。将一定量 pEGFP 质粒 DNA 与阳离子微泡孵育

25 min ,轻摇驱散微泡,低速离心 5 min ,上层为质粒 DNA 与阳离子微泡复合体,下层为游离 DNA 量,可得载基因率=(投入基因量-游离基因量)/投入基因量 $\times 100\%$ 。弃下层液体,将 DNA 与阳离子微泡复合体重悬于 0.5 ml 的 PBS 中,浓度约为 $6 \times 10^7/\text{ml}$,加入少量 PI 染液,孵育 15 min 后离心低速漂洗 2 次,去游离荧光团,检流式测得 DNA 与阳离子微泡结合率。

1.5 实验分组及转染

1.5.1 当培养的 HUVEC 融合度为 $70\% \sim 80\%$ 时,用 0.25% 胰酶消化细胞,再用 3 ml 无血清无抗生素的 DMEM 重悬细胞,之后分为 6 组:①单纯质粒(P)组;②质粒+超声辐照(P+US)组,加入质粒 $2.5 \mu\text{g}$ 并行超声辐照;③质粒+普通脂质微泡(P+M⁻)组,加入质粒 $2.5 \mu\text{g}$ 与普通脂质微泡 $50 \mu\text{l}$;④质粒+普通脂质微泡+超声辐照(P+M⁻+US)组,加入质粒 $2.5 \mu\text{g}$ 与普通脂质微泡 $50 \mu\text{l}$,并行超声辐照;⑤质粒+阳离子微泡(P+M⁺)组,加入质粒 $2.5 \mu\text{g}$ 与阳离子微泡 $50 \mu\text{l}$;⑥质粒+阳离子微泡+超声辐照(P+M⁺+US)组,加入质粒 $2.5 \mu\text{g}$ 与阳离子微泡 $50 \mu\text{l}$,行超声辐照,将质粒 DNA、微泡与 $500 \mu\text{l}$ HUVEC 混合于 2 ml 的聚丙烯试管中,固定试管于去离子水槽内,并以低速旋转。将超声探头置于试管下方,距管底 5 mm 。辐照参数为前期研究的优化参数^[4],频率为 1 MHz ,声强为 $0.5 \text{ W}/\text{cm}^2$,时间 60 s 。辐照完毕后,将细胞转入 24 孔培养板中,孵箱内孵育 $6 \sim 8 \text{ h}$,换完全培养基,培养 $24 \sim 48 \text{ h}$ 后,观察转染率。

1.5.2 基因的表达和转染率测定 转染 $24 \sim 48 \text{ h}$ 后,用倒置荧光显微镜观察增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)在 HUVEC 的表达;PBS 漂洗 2 次、 0.25% 胰酶消化细胞后,重悬于 0.5 ml 的 PBS 中,以流式细胞仪测出转染率。

1.6 细胞活性分析 采用 MTT 法分析不同组的细胞存活率。单独考察 P+M⁺+US 组中不同阳离子微泡浓度对细胞活力的影响。将 HUVEC 以每孔 1×10^4 个细胞接种于 96 孔板,过夜培养,弃上层培养基,每孔加入 $200 \mu\text{l}$ 无血清无抗生素的 DMEM,分组处理,每组三复孔。于 37°C 孵箱中孵育 24 h ,再向细胞中每孔加入 MTT $20 \mu\text{l}$ ($5 \text{ mg}/\text{ml}$),继续培养 4 h 后终止,吸走上清。加入 $150 \mu\text{l}$ 二甲基亚砷溶解蓝色结晶,振荡 10 min ,酶标仪 490 nm 处测定 OD 值,可得细胞活性=OD_{处理组}/OD_{对照组} $\times 100\%$ 。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件,采用单因素方差分析比较多组间均数,LED 法比较两组间均

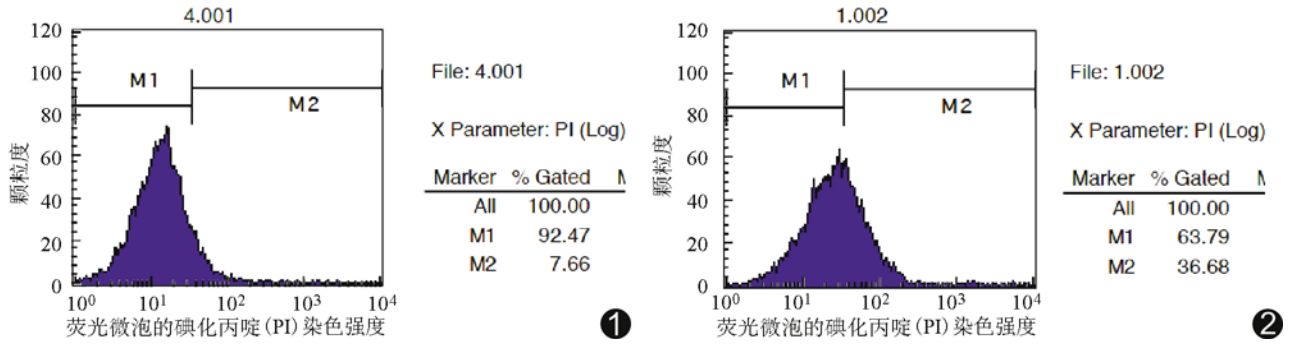


图 1 普通脂质微泡与经 PI 染色后质粒结合量化图 只有少量微泡结合质粒 DNA 图 2 阳离子微泡与经 PI 染色后质粒结合量化图 较多微泡结合质粒 DNA

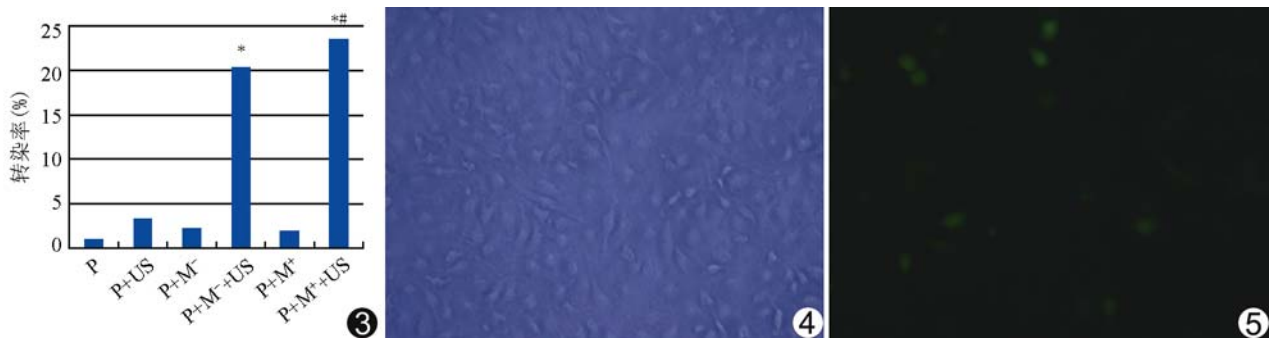


图 3 各组 HUVEC 细胞转染率比较的量化图 (*:与其余各组比较, $P < 0.05$; #:与 $P+M^-+US$ 组比较, $P < 0.05$) 图 4 光镜下 HUVEC 细胞($\times 200$) 图 5 $P+M^++US$ 组, 转染 48 h 后, 荧光显微镜下细胞发出绿色荧光($\times 200$)

数, 对方差不齐者采用 K 个独立样本检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 载基因量分析 阳离子微泡浓度为 4×10^8 /ml 时, 以一定梯度浓度加入质粒 DNA, 当质粒 DNA 浓度为 $40 \mu\text{g/ml}$ 、最大载基因率为 39.7% 时达到饱和。质粒 DNA 与普通脂质微泡及阳离子微泡结合率结果见图 1、2。

2.2 荧光显微镜下见 $P+M^-+US$ 组与 $P+M^++US$ 组荧光表达量高于其他组, 且 $P+M^++US$ 组高于 $P+M^-+US$ 组, 流式细胞仪检测各组转染率结果与荧光镜下观察结果基本一致, 差异具有统计学意义(图 3)。载基因阳离子微泡联合超声辐照 HUVEC 转染 48 h 后, EGFP 在 HUVEC 的表达情况镜下与流式细胞仪检测结果见图 4~6。

2.3 细胞活性分析 通过不同处理组 OD 值计算可以看出 $P+M^-+US$ 组及 $P+M^++US$ 组的细胞活性较其他组稍低, 但差异无统计学意义(图 7); 单纯考察 $P+M^++US$ 组, 在其他条件不变的情况下, 随微泡浓度增加, 细胞存活率逐渐降低(图 8)。

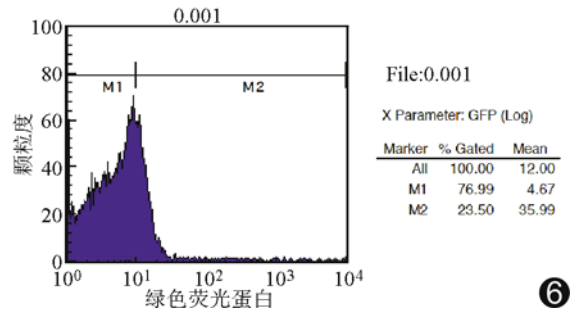


图 6 $P+M^++US$ 组 EGFP 转染 HUVEC 细胞 48 h 后转染率流式细胞仪检测图

3 讨论

质粒 DNA 与普通脂质微泡(中性电荷或负电荷)的基因转染已有报道^[5-7], 证实超声破坏微泡能在特定时间和空间上增强靶细胞或靶组织的基因转染; 而关于阳离子微泡与血管内皮细胞转染的研究较少。本实验采用水浴机械震荡法成功制备阳离子微泡, 稳定性好, 加入低毒性作用的 DC-Chol 作为原材料, 赋予表面阳性电荷, 充入氟碳气体后, 能够实现体内增强显影。Caracciolo 等^[8]报道了用 DC-Chol 制备阳离子脂质载体转染。带正电荷的阳离子微泡在体外通过静电

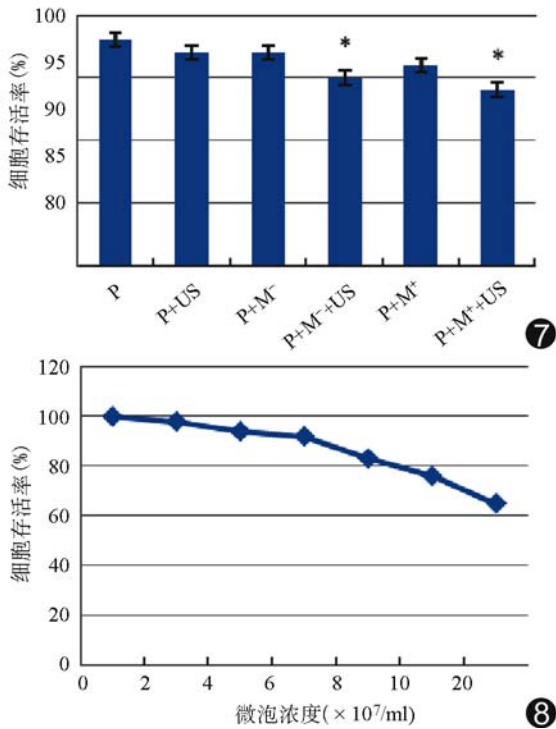


图 7 MTT 法分析各处理组间细胞存活率比较的柱形图 (*: 与其余各组比较, P>0.05) 图 8 单独考察 P+M⁺+US 组, 随微泡浓度增加, 细胞存活率逐渐降低

与质粒 DNA 吸附结合, 可测得其载基因率; 经染色流式细胞仪检测, 进一步证实其与普通脂质微泡明显不同。由于这种静电吸附作用, 两者形成复合体, 将 DNA 浓缩更有利于基因转染, 且复合体若带微弱正电, 可与表面为负电荷的细胞结合黏附, 进一步促进基因转染^[9]。虽然 P+US+M⁻ 组在体外转染率并不低, 但在体内复杂环境中, 无载体作用的质粒 DNA 很难到达血管壁发挥作用, 且要达到高浓度的游离质粒是不可能也不安全的。因此, 将质粒 DNA 与阳离子微泡结合成为实现体内高效基因转染的关键, 并可以通过表面修饰实现靶向转染。

在超声介导微泡破坏转染过程中, 寻找能够保证高转染率和低细胞死亡率的新的方法成为迫切需要, 也是研究这项技术的新目标。研究^[10]发现超声介导微泡破坏作用的瓶颈问题是细胞死亡随着转染率增加而增加, 这与声能和微泡浓度相关。本组以前期实验室研究中细胞损伤最小为准选择超声辐照参数, 实验中发现, 随着微泡浓度增加, 细胞死亡率也增加, 故选用载基因能力较高时的微泡浓度寻找到相对平衡点。细胞死亡主要是一种物理解体, 导致这一现象的关键是微泡大幅度振动后产生的空化效应, 微泡在超声能

量作用下压缩与膨胀, 最终导致壳破碎, 这种能量可能正是导致邻近细胞损伤的原因之一^[11]。

本研究的不足之处在于未比较不同微泡浓度的转染率, 但前期研究已发现高或过低的微泡浓度都不能实现有效的基因转染。体外基因转染中用塑料培养皿及孔板作转染会产生驻波, 而驻波效应可能会严重干扰声孔作用及细胞的存活力^[12-13], 因此本研究采用聚丙烯管混悬液进行细胞转染, 以减少这种驻波效应。在后续研究中将尝试运用 OPTICELL 培养系进行转染。

本研究结果显示, 自制阳离子微泡在一定浓度下与优化质粒 DNA 结合, 能够实现较高的基因转染率, 且对细胞无明显毒性作用, 有望成为更有效的非病毒载体。

[参考文献]

- [1] 景香香, 王志刚. 超声造影剂靶向性作用机制的研究进展. 临床超声医学杂志, 2003, 5(6): 359-360.
- [2] Suzuki R, Maruyama K. Effective in vitro and in vivo gene delivery by the combination of liposomal bubbles (bubble liposomes) and ultrasound exposure. Methods Mol Biol, 2010, 605: 473-486.
- [3] Phillips LC, Klivanov AL, Bowles DK, et al. Focused in vivo delivery of plasmid DNA to the porcine vascular wall via intravascular ultrasound destruction of microbubbles. J Vasc Res, 2010, 47(3): 270-274.
- [4] 苏琳, 王志刚, 李兴升, 等. 超声辐照微泡声学造影剂增强脂质体介导肝细胞基因转染的体外实验研究. 中国超声医学杂志, 2007, 23(10): 721-723.
- [5] Suzuki R, Takizawa T, Negishi Y, et al. Effective gene delivery with novel liposomal bubbles and ultrasonic destruction technology. Int J Pharm, 2008, 354(1-2): 49-55.
- [6] 汪国忠, 胡申江, 郑哲岚, 等. 载基因微泡介导 β-galactosidase 质粒转染心肌细胞的对照研究. 中华超声影像学杂志, 2004, 13(11): 857-862.
- [7] 张云燕, 李有强, 骆书美, 等. 超声微泡介导 pEGFP-N1 质粒转染人牙周膜成纤维细胞的实验研究. 中国医学影像技术, 2009, 25(5): 745-748.
- [8] Caracciolo G, Callipo L, De Sanctis SC, et al. Surface adsorption of protein corona controls the cell internalization mechanism of DC-Chol-DOPE/DNA lipoplexes in serum. Biochim Biophys Acta, 2010, 1798(3): 536-543.
- [9] Christiansen JP, French BA, Klivanov AL, et al. Targeted tissue transfection with ultrasound destruction of plasmid-bearing cationic microbubbles. Ultrasound Med Biol, 2003, 29(12): 1759-1767.
- [10] Karshafian R, Bevan PD, Williams R, et al. Sonoporation by ultrasound-activated microbubble contrast agents: Effect of a-

coustic exposure parameters on cell membrane permeability and cell viability. *Ultrasound Med Biol*, 2009, 35(5):847-860.

- [11] Rahim AA, Taylor SL, Bush NL, et al. Spatial and acoustic pressure dependence of microbubble-mediated gene delivery targeted using focused ultrasound. *J Gene Med*, 2006, 8(11):1347-1357.

- [12] Feril LB Jr, Ogawa R, Tachibana K, et al. Optimized ultrasound-mediated gene transfection in cancer cells. *Cancer Sci*, 2006, 97(10):1111-1114.

- [13] Tsai KC, Fang SY, Yang SJ, et al. Time dependency of ultrasound-facilitated gene transfection. *J Gene Med*, 2009, 11(8):729-736.

Poland syndrome: Case Report Poland 综合征 1 例

毛 巍, 李永华, 张洪社, 刘国红

(河北省涿州市医院影像科, 河北 涿州 072750)

[Key words] Poland syndrome; Thoracic deformity; Finger deformity [关键词] Poland 综合征; 胸廓畸形; 手指畸形
[中图分类号] R682; R814.42 [文献标识码] B [文章编号] 1003-3289(2012)02-0215-01

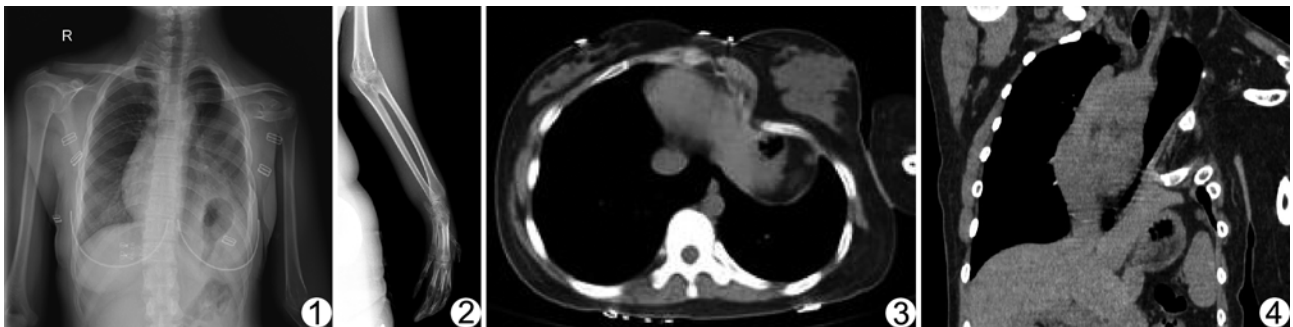


图 1 左肺中下野密度增高, 膈面及肋膈角显示不清, 胃泡上移至胸腔内; 左侧第 1 肋骨缺如, 胸锁关节下移; 锁骨远端、肩关节、肩胛骨及肱骨发育不良 图 2 上肢骨骼纤细, 腕骨及部分指间关节融合 图 3 左侧胸廓畸形, 前胸壁内陷; 纵隔、气管稍右移; 左侧胸大肌、胸小肌、前锯肌及第 2~4 肋软骨缺损; 左侧乳腺发育尚可 图 4 CT 冠状位重建示左侧胸廓畸形, 左侧膈肌连续完整并上移

患者女, 21 岁, 因“左胸膈疝 6 年”就诊。查体: 左侧胸廓前壁塌陷, 左上肢发育不全。胸部正位及左上肢正位 X 线片: 左肺中下野密度增高, 膈面及肋膈角显示不清, 胃泡上移至胸腔内; 左侧第 1 肋骨缺如, 胸锁关节下移, 锁骨远端、肩关节、肩胛骨及肱骨发育不良, 肢体纤细; 腕骨及部分指间关节融合(图 1、2)。CT: 左侧胸廓畸形, 纵隔、气管稍右移; 左侧胸大肌、胸小肌、前锯肌及第 2~4 肋软骨缺损, 局部前胸壁内陷; 左侧乳腺发育尚可; 左侧膈肌连续完整并上移(图 3、4)。诊断: 左侧胸廓及上肢畸形, Poland 综合征。

讨论 Poland 综合征又称为胸大肌缺损、短指并指综合征, 1841 年由 Poland 首先发现, 发病率为 1/100 000~1/7000, 男女比例为 2.5 : 1, 上肢畸形左、右发病率为 1 : 3。本例为女

性, 上肢畸形发生于左侧, 实属罕见。胚胎发育第 6~8 周是上肢胚芽发育期, 此期间内一侧锁骨下动脉或某一支出现发育缺陷时, 会导致其动脉支配区域内的肋骨、乳房及上肢等组织器官形成障碍。本病的病变程度差异较大, 轻者可仅有胸大肌部分缺损, 严重者会出现程度不同的胸大肌、胸小肌、前锯肌, 以及背阔肌、腹外斜肌、肋骨等发育不良。女性患者常存在乳房发育不良, 可从轻度发育不全到完全缺如, 但本例患者左侧乳房发育基本正常。手部畸形主要表现为不同类型的并指、短指、缺指、2~4 指中节指骨缺损、手指深浅屈腱融合、腕骨融合、尺桡骨融合等, 以并指最常见, 约占全部手腕畸形的 6%~13.5%, 个别可伴耳廓畸形、半椎体、脊柱侧凸、肾畸形、隐睾等。治疗主要以局部形态的修复与整形为原则。

Poland 综合征罕见, 但根据患者胸廓内陷及上肢畸形, 结合先天性发育病史, 不难作出正确诊断。

[作者简介] 毛巍(1949—), 男, 江苏南京人, 大专, 副主任医师。

E-mail: mao_cui@yeah.net

[收稿日期] 2011-10-10 [修回日期] 2011-10-28