

◆ 实验研究

Liposome enhanced transfection of pEGFP-N1 plasmid to prostate cancer cells in vitro with low frequency ultrasound combined with microbubbles

WU Zuo-hui^{1,2}, BAI Wen-kun¹, ZHANG Ji-zhen¹, HU Bing^{1*}

(1. Department of Ultrasound in Medicine, the Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China; 2. Department of Ultrasound, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the feasibility of liposome enhanced transfection of green fluorescent protein gene (pEGFP-N1) plasmid to prostate cancer cells with low frequency ultrasound combined with microbubbles, and to optimize the parameters of microbubbles concentration. **Methods** PC-3 prostate cancer cell suspension was divided into 8 groups, i. e. control group, ultrasound group, microbubbles group, microbubbles+ultrasound group, liposome group, microbubbles+liposome group, liposome+ultrasound group and ultrasound+microbubbles+liposome group. The ultrasound+microbubbles+liposome group was classified into 6 sub-groups; 0, 10%, 20%, 30%, 40%, and 50%, based on microbubbles volume concentration. The cell suspension was cultured in 12-well plates for 24 h after irradiation, and fluorescent microscopy was used to observe gene transfection and calculated the rate of gene transfection. **Results** Ultrasound+microbubbles+liposome group had the best efficiency, which was significantly different compared with the other groups (all $P < 0.05$), while 20% microbubbles concentration sub-group had the highest rate of gene transfection in the ultrasound+microbubbles+liposome group. **Conclusion** Low-frequency ultrasound in combination with microbubbles can significantly enhance liposome-mediated in vitro pEGFP-N1 gene transfection rate. For microbubbles concentration, 20% is the best.

[Key words] Ultrasonics; Microbubbles; Liposome; Prostate cancer cell; Gene transfer techniques

低频超声联合微泡造影剂增强脂质体介导 pEGFP-N1 基因转染体外前列腺癌细胞

吴作辉^{1,2}, 白文坤¹, 张吉臻¹, 胡兵^{1*}

(1. 上海交通大学附属第六人民医院超声医学科, 上海 200233;
2. 遵义医学院附属医院超声科, 贵州 遵义 563003)

[摘要] **目的** 探讨低频超声联合微泡造影剂增强脂质体介导增强型绿色荧光蛋白质粒(pEGFP-N1)转染前列腺癌细胞的可行性,并对超声微泡浓度参数进行优化。**方法** 将前列腺癌 PC-3 细胞悬液分为空白对照组、超声组、微泡组、微泡+超声组、脂质体组、脂质体+微泡组、脂质体+超声组、脂质体+微泡+超声组,其中脂质体+微泡+超声组根据微泡体积浓度不同分为(0、10%、20%、30%、40%和 50%)6 个亚组。经超声辐照,24 h 后用荧光显微镜观察细胞中基因表达情况,并用流式细胞仪检测转染率。**结果** 脂质体+微泡+超声组基因转染效率最高,与其他组比较差异均有统计学意义(P 均 < 0.05);在脂质体+微泡+超声亚组中,微泡浓度为 20%亚组基因转染率最高。**结论** 低频超声联合微泡能有效

[基金项目] 上海市科学技术委员会重点项目(10JC1412600)。

[作者简介] 吴作辉(1974—),男,贵州锦屏人,硕士,主治医师。研究方向:超声诊断与治疗。E-mail: huizuwu@126.com

[通讯作者] 胡兵,上海交通大学附属第六人民医院超声医学科,200233。E-mail: binghuzz@263.net

[收稿日期] 2012-02-26 **[修回日期]** 2012-04-07

增强脂质体介导 pEGFP-N1 基因在体外前列腺癌细胞中的转染率, 20% 是体外基因转染前列腺癌细胞的佳微泡浓度。

[关键词] 超声学; 微泡; 脂质体; 前列腺癌细胞; 基因转移技术

[中图分类号] R445.1; Q782.4 [文献标识码] A [文章编号] 1003-3289(2012)08-1460-05

目前常用的基因转染方法有病毒性和非病毒性转染。病毒性转染的效率较高, 但存在免疫原性及安全性等问题^[1], 使非病毒性转染方法越来越受到重视。脂质体转染法是非病毒性转染中最常用的方法, 但具有转染率较低、无靶向性等缺点^[2]。寻找一种转染率高、靶向性较好的非病毒性转染方法已成为当前研究的重点和热点。研究^[3-4]发现超声微泡造影剂可作为新型的基因转染载体, 将携带有目的基因的微泡造影剂在靶组织内给予一定条件的超声辐照, 可明显提高局部组织、细胞的基因转染和表达。本研究采用低频超声联合微泡造影剂增强脂质体介导增强型绿色荧光蛋白质粒(pEGFP-N1)转染体外培养的前列腺癌 PC-3 细胞, 探讨其可行性及效率。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器 人前列腺癌 PC-3 细胞(购自上海

中科院生物研究所), DMEM 培养液(Gibco)、10% 胎牛血清(FBS, Invitrogen), SonoVue 超声微泡造影剂(Bracco), 脂质体 Lipofectamine 2000 及台盼蓝(Sigma), pEGFP-N1 质粒均由本院中心实验室馈赠。超声治疗仪(上海超声医学研究所定制), 探头频率为 21 kHz, 发射连续波和脉冲波, 输出声强和照射时间可变。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养及细胞悬液的配制 人前列腺癌 PC-3 细胞培养于含 10% FBS 的 DMEM 培养液中, 在 5% CO₂、37℃ 湿化培养箱内培养, 取对数生长期细胞进行消化, 以不含血清的 DMEM 制成单细胞悬液, 调节细胞悬液浓度 $>1 \times 10^5$ /ml。将细胞悬液分别按实验分组要求缓慢加入无菌聚乙烯管内, 按实验要求加入所有试剂后, 加塞封口, 用无菌封口膜封口, 尽量不

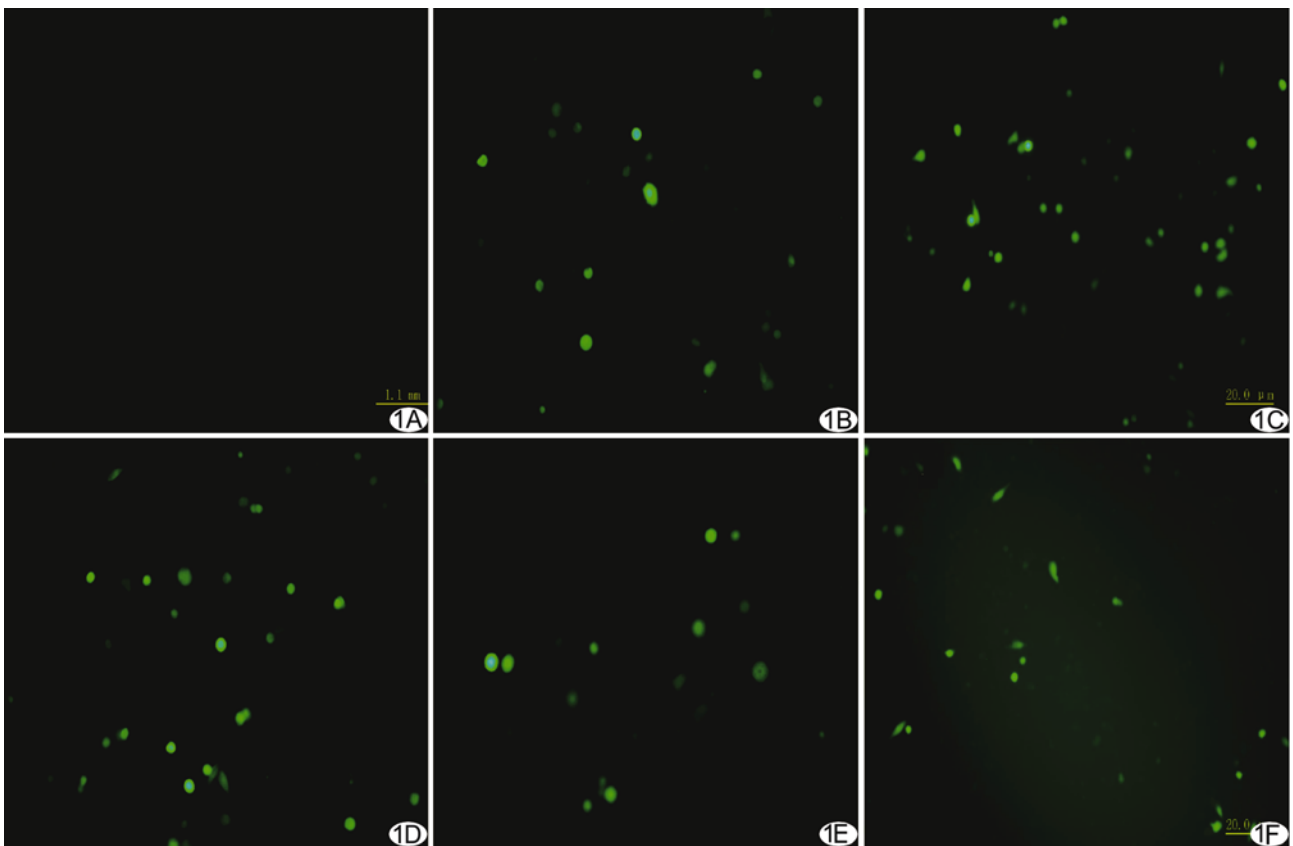


图 1 在脂质体+微泡+超声组中不同微泡浓度亚组及空白对照组 pEGFP-N1 转染情况($\times 200$) A. 空白对照组; B. 10% 亚组; C. 20% 亚组; D. 30% 亚组; E. 40% 亚组; F. 50% 亚组

留可见空气气泡。室温下静置 30 min,于超声辐照前轻柔摇匀各管细胞悬液。

1.2.2 实验分组 分为空白对照组、超声组、微泡组、微泡+超声组、脂质体组、脂质体+微泡组、脂质体+超声组、脂质体+微泡+超声组,共 8 组;其中脂质体+微泡+超声组根据微泡体积浓度分为 0 亚组、10%亚组、20%亚组、30%亚组、40%亚组、50%亚组,其余组微泡体积浓度均为 20%。向各组中均加入等量细胞悬液及质粒。以上实验均各重复 6 次。

1.2.3 超声辐照 将超声探头固定于不锈钢支架上,辐射面垂直朝上,将准备好的含有细胞悬液的聚乙烯管置于探头之上,其间用耦合剂填充。超声辐照声强为 46 mW/cm²,时间为 5 min,占空比 20%。

1.2.4 荧光显微镜观察细胞转染 pEGFP-N1 基因及检测转染率 超声辐照完毕后,立即将细胞悬液(保留 100 μl 细胞悬液留待随后检测细胞死亡率)转移到 12 孔培养板中,置于 5% CO₂,37℃ 湿化培养箱中孵育 4 h,然后换含 10% FBS 的 DMEM 培养液后继续培养 24 h。在荧光显微镜下观察细胞内绿色荧光蛋白表达情况并摄片保存,用流式细胞仪检测转染率。

1.2.5 荧光显微镜观察细胞台盼蓝染色情况及检测细胞死亡率 将保留的 100 μl 细胞液加入 100 μl 台盼蓝试剂中,3 min 后作细胞涂片,即刻置于荧光显微镜下,以普通模式观察细胞台盼蓝染色情况并摄片保存。在普通模式下胞浆及细胞核染色呈蓝色为死亡细胞,计算细胞死亡率:细胞死亡率=台盼蓝染色细胞数/总细胞数×100%。每组及亚组各取 5 个 200 倍视野进行观察和计算。

表 1 不同组别前列腺癌细胞 pEGFP-N1 基因转染率及死亡率(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	基因转染率	细胞死亡率
超声组	1.50±0.51*	2.12±0.43*
微泡组	0.32±0.55#	0.68±0.86#
微泡+超声组	3.85±0.55*#☆	3.43±0.31*#☆
脂质体组	9.65±1.20*#☆▲	2.38±0.45*#☆▲
脂质体+微泡组	8.90±0.83*#☆▲	2.55±0.31*#☆▲
脂质体+超声组	14.00±0.77*#☆▲◆	4.30±1.14*#☆▲◆
脂质体+微泡+超声组	20.30±1.17*#☆▲◆★	6.27±0.81*#☆▲◆★
空白对照组	0.32±0.49	0.35±0.54

注:*,与空白对照组比较,#:与超声组比较,☆:与微泡组比较,▲:与微泡+超声组比较,◆:与脂质体组比较,★:与脂质体+微泡组比较,■:与脂质体+超声组比较,P<0.05

1.3 统计学方法 使用 SPSS 13.0 统计软件,计量资

料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析比较各组基因转染率及死亡率,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞 pEGFP-N1 基因转染率 转染 24 h 后,空白对照组及微泡组仅极少量细胞内可见微弱绿色荧光,超声组、微泡+超声组可见少量细胞呈绿色荧光,其他各组及亚组均见较多细胞内绿色荧光见图 1,统计结果见表 1、2,图 2。

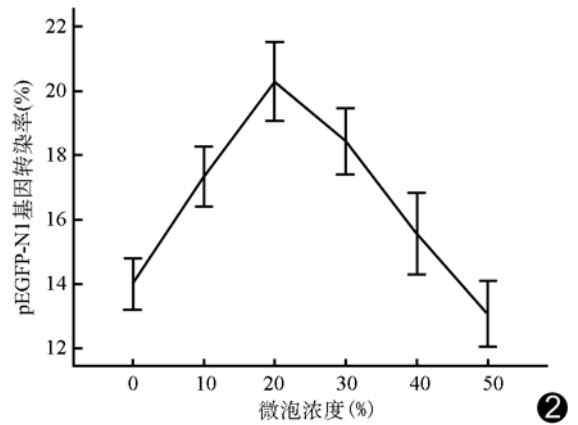


图 2 脂质体+微泡+超声各亚组的细胞转染率曲线图

表 2 脂质体+微泡+超声各亚组中前列腺癌细胞 pEGFP-N1 转染阳性率及细胞死亡率(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	基因转染阳性率	细胞死亡率
0 亚组	14.00±0.77*	4.30±1.14*
10%亚组	17.33±0.89*#	5.18±0.79*
20%亚组	20.30±1.17*#☆	6.27±0.81*
30%亚组	18.43±0.98*#☆	9.95±1.09*#☆▲
40%亚组	15.57±1.21*#☆◆	12.82±1.72*#☆▲
50%亚组	13.07±0.99*#☆▲△	16.33±2.35*#☆▲◆
空白对照组	0.31±0.49	0.35±0.54

注:*,与空白对照组比较,#:与 0%亚组比较,☆:与 10%亚组比较,▲:与 20%亚组比较,◆:与 30%亚组比较,△:与 40%亚组比较,P<0.05

2.2 荧光显微镜普通模式下观察台盼蓝染色结果 高倍镜下,在各组细胞中均可见蓝染细胞,不同组别及脂质体+超声+微泡各亚组前列腺癌细胞死亡情况统计结果见表 1、2,图 3。

3 讨论

癌症是严重威胁人类健康的重大疾病之一,目前尚不能彻底治愈。大量研究发现基因治疗肿瘤可能成为一种划时代的新型治疗方法,其关键在于如何安全、高效、靶向地将基因转移到靶组织细胞内并有效进行

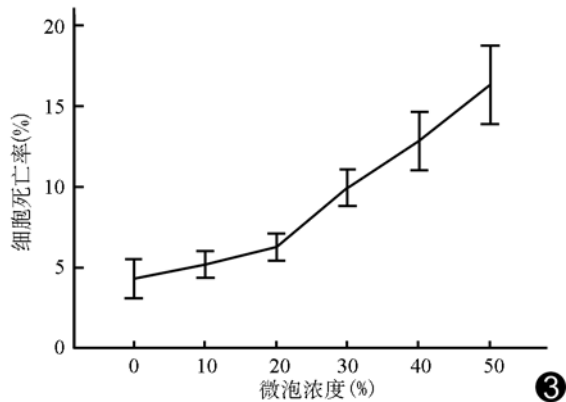


图3 脂质体+微泡+超声各亚组中在不同微泡浓度下的细胞死亡率曲线图

表达。超声辐照不仅可导致细胞膜穿孔,促进基因进入细胞,而且联合超声微泡造影剂可明显提高基因转染率及表达,其机制可能包括机械作用、热效应和空化效应等^[3-5]。低频低强度超声所产生的热效应近于可忽略,故其生物学效应主要为机械作用和空化效应。超声微泡造影剂可视为空化核,一定能量的超声辐照能够显著降低超声产生空化效应所需的能量阈值(空化阈),从而增强空化效应及声孔效应,导致局部毛细血管和邻近组织细胞膜的通透性增高,使目的基因更易进入组织细胞内或靶器官,有利于基因的转染和表达^[3-4]。

国内外大量文献报道应用低频、高强度超声进行体内外实验,在取得较高的基因转染率的同时细胞死亡率也较高,难于达到预期结果。近年来应用低频、低强度超声进行体内外实验受到关注,因其对组织细胞具有较好的渗透性而很少被组织吸收,且对细胞损伤小。张时君等^[5]应用超声辐照(1 MHz、声强为 1.5 W/cm^2 、占空比为20%),以20%微泡浓度联合脂质体介导 pEGFP-N1 基因体外转染乳腺癌细胞,发现超声微泡脂质体组基因转染率为 $(22.15 \pm 2.69)\%$,细胞生存率为 $(80.13 \pm 3.61)\%$ 。一般超声治疗仪声强在 $0.25 \sim 3.00 \text{ W/cm}^2$ 。本研究应用特制的超声治疗仪,声强为 46 mW/cm^2 ,所获基因转染率与文献报道相似^[5],但细胞损伤更低,细胞死亡率仅为 $(6.27 \pm 0.81)\%$,表明较低强度超声更适用于基因转染的实验研究。

本研究中脂质体+微泡+超声组基因转染率最高,一些国内外研究也有类似结果^[6-7]。其原因可能是:①脂质体与微泡结合形成的混合物具有较高的有效载荷基因、药物等微粒的效率,在超声的短暂作用

下,微泡大量破裂,包裹在混合物里面的微粒大量被释放出来,进入细胞内^[8-9];②微泡在超声作用下产生空化作用,微泡周围的脂质体破裂,包裹在脂质体里的物质被释放或储存在细胞和组织周围^[9-10]。本研究结果表明,超声联合微泡造影剂能明显增强脂质体介导 pEGFP-N1 基因体外转染前列腺癌细胞,是一种较理想的基因转染方法。

在脂质体+微泡体+超声各亚组中,随着微泡浓度增加,基因的转染阳性率也增加,当微泡浓度达到20%时,质粒 DNA 转染率显著提高,随后反而下降(图2)。这可能由于在相同的超声辐照条件下,不同声孔效应的产生有赖于超声微泡造影剂的浓度:超声微泡造影剂浓度低,即细胞与微泡间距离大,表现为可逆性声孔效应;超声微泡造影剂浓度增大,使细胞与微泡间距离减小,细胞膜上发生的声孔效应无法修复,即产生不可逆性声孔效应,导致细胞裂解死亡^[11]。图3所示细胞死亡率曲线可以更好地说明上述现象,在微泡浓度达20%之前,细胞死亡率很低,微泡达到20%之后细胞死亡率显著增加,表明在微泡浓度20%以前产生可逆性声孔效应,而在微泡浓度20%之后以不可逆性声孔效应为主。研究基因转染时,应选用转染率较高而细胞死亡率较低实验参数条件,以达到最佳的预期效果。本研究结果显示,20%可作为基因体外转染前列腺癌细胞实验的最佳微泡浓度,为今后基因转染前列腺癌细胞的超声实验参数优化研究提供了参考。

[参考文献]

- [1] Kaneda Y, Tabata Y. Non-viral vectors for Cancer therapy. *Cancer Sci*, 2006, 97(5):348-354.
- [2] Erika C. Second cancer case halts gene-therapy trials. *Nature*, 2003, 421(6921):305-305.
- [3] Yang H, Liu ZH, Liu YY, et al. Vascular gene transfer and drug delivery in vitro using low-frequency ultrasound and microbubbles. *Acta Pharmacol Sin*, 2010, 31(4):515-522.
- [4] Chen ZY, Liang K, Qiu RX, et al. Ultrasound- and liposome microbubble-mediated targeted gene transfer to cardiomyocytes in vivo accompanied by polyethylenimine. *J Ultrasound Med*, 2011, 30(9):1247-1258.
- [5] 张时君,李凤华,杜晶. 超声辐照 SonoVue 增强脂质体介导 pEGFP-N1 转染乳腺癌细胞. *中国医学影像技术*, 2009, 25(8):1343-1346.
- [6] Hauff P, Seemann S, Reszka R, et al. Evaluation of gas-filled microparticles and sonoporation as gene delivery system: Feasibil-

ity study in rodent tumor models. *Radiology*, 2005, 236(2):572-578.

[7] Zhang C, Zhang X, Liu C, et al. Expression of endostatin mediated by a novel non-viral delivery system inhibits human umbilical vein endothelial cells in vitro. *Mol Biol Rep*, 2010, 37(4):1755-1762.

[8] Klivanov AL, Shevchenko TI, Raju BI, et al. Ultrasound-triggered release of materials entrapped in microbubble-liposome constructs: A tool for targeted drug delivery. *J Control Release*, 2010, 148(1):13-17.

[9] Lentacker I, Geers B, Demeester J, et al. Design and evaluation of doxorubicin-containing microbubbles for ultrasound-triggered doxorubicin delivery: Cytotoxicity and mechanisms involved. *Mol Ther*, 2010, 18(1):101-108.

[10] Philippe M, Sascha H. Controlled vesicle deformation and lysis by single oscillating bubbles. *Nature*, 2003, 423 (6936): 153-156.

[11] Lionetti V, Fittipaldi A, Agostini S, et al. Enhanced caveolae-mediated endocytosis by diagnostic ultrasound in vitro. *Ultrasound Med Biol*, 2009, 35(1):136-143.

Prenatal ultrasonography in diagnosis of fetal descending aorta aneurysm: Case report

产前超声诊断胎儿降主动脉瘤 1 例

王贤明¹, 张文君¹, 贺 贇¹, 王山龙²

(1. 湖北医药学院附属太和医院超声影像科, 湖北 十堰 442000; 2. 丹江口市六里坪铁路医院彩超室, 湖北 十堰 441916)

[Key words] Ultrasonography, prenatal; Fetus; Descending aorta; Aneurysm

[关键词] 超声检查, 产前; 胎儿; 降主动脉; 动脉瘤

[中图分类号] R714. 5; R540. 45 [文献标识码] B [文章编号] 1003-3289(2012)08-1464-01



图 1 胎儿降主动脉瘤 A. 超声声像图显示降主动脉左锁骨下动脉旁瘤样结构; B. CDFI 显示瘤体内红蓝血流信号; C. 能量多普勒显示瘤体内血流完全充盈

孕妇, 30 岁, 孕 2 产 1, 平素体健, 无近亲结婚史及遗传性疾病, 无明显化学药品及放射线接触史; 因当地医院发现胎儿异常来我院接受检查。超声: 胎儿双顶径 88 mm(孕 35⁺⁴周), 头围 321 mm(孕 36⁺²周), 股骨长 68 mm(孕 36⁺⁴周), 均符合孕周; 于胎儿主动脉弓长轴切面见紧邻左锁骨下动脉旁约 11 mm × 9 mm 瘤样肿块向外突起, 与降主动脉相通(图 1A); CDFI 及能量多普勒显示其内有红蓝血流信号进出并完全充盈肿块(图

1B、C)。超声提示: 晚孕, 头位, 单活胎; 胎儿降主动脉瘤。3 天后行引产, 因家属拒绝而未行尸检。

讨论 胎儿降主动脉瘤临床较少见, 产前超声报道鲜见。动脉瘤的诱因包括动脉粥样硬化、创伤、细菌性感染和动脉中层坏死等, 本例病因不明。在成人, 降主动脉瘤多发生在降主动脉近段、左锁骨下动脉的远侧, 瘤体压迫左主支气管可导致呼吸困难, 压迫左侧喉返神经则可出现声音嘶哑等; 其常见并发症为血栓形成, 若血栓脱落, 可能导致动脉栓塞而威胁生命, 患者也可因瘤体破裂、出血而致死; CTA 可清晰显示瘤体部位、大小及与周边结构的时空关系。对于胎儿而言, 彩色多普勒超声是确诊本病的最佳方法。

[作者简介] 王贤明(1976—), 男, 四川资阳人, 本科, 主治医师、讲师。
E-mail: bressanon2799@yahoo.com.cn

[收稿日期] 2012-04-20 [修回日期] 2012-05-25