

❖ 实验研究

Transfection of enhanced green fluorescent protein gene into retina of rabbits induced by ultrasound-mediated microbubbles destruction

CHENG Juan, GU Sheng-li, XU Fei-yan, CHEN Ya-qing*
(Department of Ultrasound, Xinhua Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200092, China)

[Abstract] **Objective** To explore the efficiency, security and feasibility of enhanced green fluorescent protein (EGFP) transfected into retina of rabbits by means of applying ultrasound microbubbles for genetic carrier under different sound of intensity and microbubbles. **Methods** Thirty rabbits were randomly divided into 6 groups: Plasmid group (group A), plasmid+microbubble group (group B), plasmid+ultrasound group ① (group C), plasmid+ultrasound group ② (group D), plasmid+microbubble+ultrasound group ① (group E) and plasmid+microbubble+ultrasound group ② (group F). Microbubbles were combined with the naked plasmid pEGFP-C1 and followed the way of vein injection and 0.5, 1.0 W/cm² ultrasound-mediated microbubbles destruction. Seven days after gene transfection, the toxic effect of retina was evaluated by light microscope and electron microscope, and EGFP expression in the retina was observed under fluorescence microscope. **Results** No retina toxicity was found in the histopathology examination. A small amount of green fluorescence was seen in group A—D, while no statistical difference was found among the 4 groups (all $P > 0.05$). The fluorescence intensity of EGFP expression in group E and F were significantly higher than the other 4 groups (all $P < 0.05$), but no difference was found between group E and F (all $P > 0.05$). **Conclusion** The efficiency of EGFP expression in rabbit retina increases with the way of ultrasound-mediated microbubbles destruction.

[Key words] Microbubbles; Contrast media; Enhanced green fluorescent protein; Retina; Gene therapy

超声微泡造影剂介导 EGFP 对兔视网膜的转染效率

程 娟, 顾胜利, 徐斐燕, 陈亚青*
(上海交通大学医学院附属新华医院超声科, 上海 200092)

[摘要] **目的** 探讨在不同能量超声和一定剂量微泡作用下, 超声微泡造影剂介导下增强型绿色荧光蛋白(EGFP)质粒对兔视网膜转染的效率、安全性以及可行性。**方法** 将 30 只新西兰大白兔随机分为 6 组: 质粒组(A 组)、质粒+微泡组(B 组)、质粒+超声照射组①(C 组)、质粒+超声照射组②(D 组)、质粒+微泡+超声照射组①(E 组)、质粒+微泡+超声照射组②(F 组)。将 1 ml pEGFP-C1 质粒与 1 ml SonoVue 微泡造影剂混合, 由耳缘静脉注入, 分别用 0.5、1.0 W/cm² 超声波辐照眼球。转染 7 天后行视网膜光镜及透射电镜检查, 观察质粒、微泡及超声照射对视网膜有无损害, 并在荧光显微镜下观察 pEGFP-C1 质粒表达情况。**结果** 光镜及透射电镜结果显示质粒、微泡及超声照射对视网膜无损害。A~D 组均可见少量绿色荧光表达(P 均 > 0.05), E、F 组的荧光表达较强, 明显高于其他 4 组(P 均 < 0.05), E、F 组荧光强度差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。**结论** 在一定能量的超声照射下, 超声微泡造影剂能够提高携带 EGFP 质粒在兔视网膜的转染效率。

[关键词] 微泡; 造影剂; 增强型绿色荧光蛋白; 视网膜; 基因治疗

[作者简介] 程娟(1981—), 女, 河北保定人, 硕士, 主治医师。研究方向: 眼科、神经、肌肉超声诊断。E-mail: rainy1208@126.com

[通讯作者] 陈亚青, 上海交通大学医学院附属新华医院超声科, 200092。E-mail: joychen1266@126.com

[收稿日期] 2012-05-17 [修回日期] 2012-08-02

[中图分类号] R-332; R445.1 [文献标识码] A [文章编号] 1003-3289(2012)10-1788-05

近年来,不少学者研究发现,在一定能量的超声波辐照下,超声微泡能增强基因转染率,因而这一新型基因载体越来越受到医学界的关注,尤其是在某些眼科疾病的基因治疗方面成为研究热点。目前对于不同剂量的超声波辐照眼球的安全性及有效性多进行细胞水平研究,直接用于动物眼球的研究尚不多。本研究以超声微泡造影剂为基因载体,探讨在不同能量超声和一定剂量微泡作用下,超声微泡造影剂介导下增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)质粒对兔视网膜转染的效率、安全性以及可行性。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器 健康成年新西兰白兔,雌雄不限,体质量 2.0~3.0 kg(购自上海交通大学医学院附属新华医院动物实验中心);增强型绿色荧光蛋白质粒 pEGFP-C1(上海交通大学医学院生化教研室惠赠);Bracco 微泡造影剂 SonoVue(注射用 SF₆ 微泡);pEGFP-C1 质粒抽提纯化试剂盒(Qiagen 公司);荧光显微镜(Nikon Eclipse 80i);CM120 透射电子显微镜;超声波治疗仪(LTD, US700),输出声强 0~2 W/cm²,探头频率 1 MHz;低温恒冷箱切片机(LEICA-1800,冻台温度控制为-20℃)。

1.2 制备 EGFP 质粒 携带 EGFP 基因的真核表达质粒 pEGFP-C1 经大肠杆菌扩增后,按质粒抽提试剂盒说明提取 EGFP 质粒,溶于磷酸盐缓冲液,紫外分光光度计检测其浓度为 1 mg/ml。提取纯化的 EGFP 酶切电泳鉴定,紫外分光光度计测定其浓度为 1 mg/ml,纯度符合实验要求。

1.3 微泡造影剂的制备 将微泡造影剂 SonoVue 微泡冻干粉加入 5 ml 注射用生理盐水,振荡后溶解呈乳白色液体。配制好的微泡混悬液气泡浓度为 8 μl/ml(每毫升 5×10⁸ 个微气泡)。

1.4 质粒和微泡造影剂的孵育 分别抽取质粒、微泡造影剂混悬液各 1 ml,轻轻混匀,4℃ 静置数分钟,使其互相黏附,稳定后吸取。

1.5 基因转染 将 30 只新西兰大白兔分为 6 组(每组 5 只,10 只眼球):A 组(质粒组):自耳缘静脉注入 1 ml EGFP 质粒;B 组(质粒+微泡组):注入 1 ml EGFP 质粒和 1 ml 微泡造影剂的混合液进行转染;C 组(质粒+超声照射组①):注入 1 ml EGFP 质粒,立即以 0.5 W/cm² 的超声波辐照兔眼球 60 s;D 组(质粒

+超声照射组②):注入 1 ml EGFP 质粒,立即以 1.0 W/cm² 的超声波辐照兔眼球 60 s;E 组(质粒+微泡+超声照射组①):加入 1 ml 质粒和 1 ml 微泡造影剂的混合液后,立即以 0.5 W/cm² 的超声波辐照兔眼球 60 s;F 组(质粒+微泡+超声照射组②):加入 1 ml 质粒和 1 ml 微泡造影剂的混合液后,立即以 1.0 W/cm² 的超声波辐照兔眼球 60 s。超声照射时,超声探头与皮肤间以耦合剂密闭。

注射质粒后第 7 天静脉注入空气处死兔,摘除眼球后,从距后极部视乳头 3~4 mm 处取视网膜组织,剪成若干 1 mm×1 mm×3 mm 的组织块,分别行光镜及电镜检查,并检测 EGFP 荧光表达。

1.6 光镜及透射电镜检查 光镜:中性福尔马林液固定,石蜡包埋,切片,行 HE 染色,于光镜下观察。电镜:浸泡于 4% 戊二醛固定 48 h,丙酮脱水,包埋,切片定位,于透射电镜下观察。

1.7 EGFP 荧光表达 将组织块固定后行冰冻切片,组织切片厚度为 5 μm。在荧光显微镜下于 490 nm 波长紫外光激发下观察视网膜色素上皮层组织荧光表达。每张切片随机取 5 个视野,每个视野取 3 个荧光强度最亮的区域进行比较,数据采集由 NIS-Elements BR(Nikon)软件完成。采用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析 6 组荧光强度。

1.8 统计学分析 采用 SPSS 14.0 统计软件包,各组荧光表达强度均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。对其中呈正态分布的计量资料采用单因素 ANOVA 检验,呈非正态分布的计量资料和计数资料各组比较采用 Kruskal-Wallis 检验,组间比较采用 Mann-Whitney 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 质粒及超声微泡造影剂对兔眼视网膜的作用 光镜下 6 组视网膜各层结构基本正常,光感受器细胞形态正常,无空泡样变性(图 1、2)。透射电镜下 6 组感光细胞内、外节结构正常,排列整齐;外节膜盘无断裂、缺损、排列紊乱,内节线粒体丰富;细胞器无肿胀、丢失、空泡样变等改变(图 3、4)。

2.2 EGFP 在兔眼视网膜的转染 荧光显微镜下肉眼观察可见 EGFP 在兔视网膜各层均有表达,且主要集中在视网膜色素上皮层;A~D 组荧光强度相对较弱,E、F 组荧光强度相对较强(图 5)。

2.3 EGFP 荧光表达强度分析 E、F 组荧光强度高

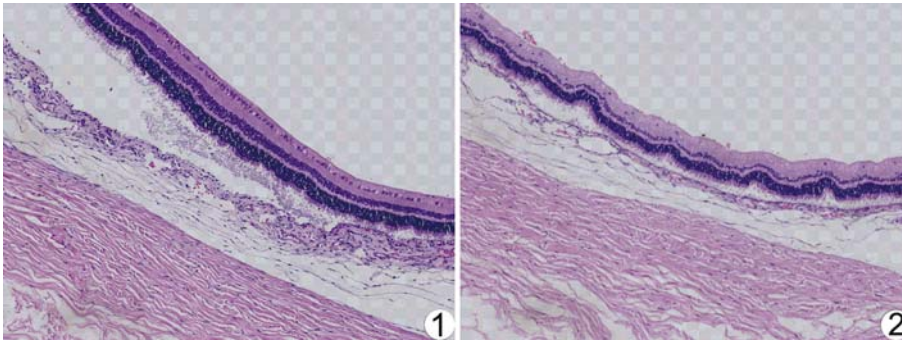


图 1 E 组兔眼视网膜正常结构病理图(HE, ×100) 图 2 F 组兔眼视网膜正常结构病理图(HE, ×100)

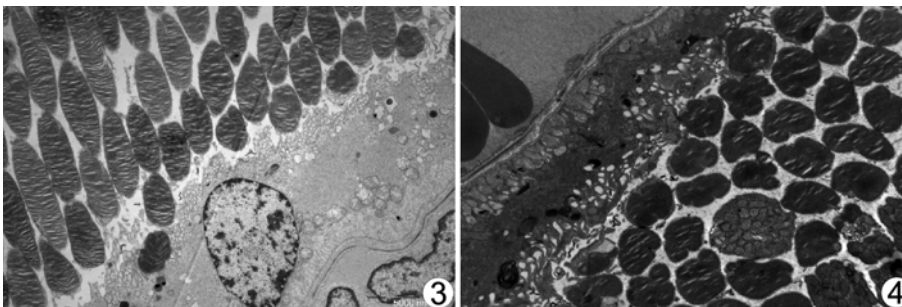


图 3 E 组兔眼视网膜透射电镜下光感受器内、外节正常结构(×9700) 图 4 F 组兔眼视网膜透射电镜下光感受器内、外节正常结构(×9700)

于与其他 4 组(P 均 < 0.05), 且 A~D 组间差异无统计学意义(P 均 > 0.05), E、F 组间差异无统计学意义(P 均 > 0.05 , 表 1)。

表 1 6 组视网膜色素上皮层 EGFP 荧光强度($\bar{x} \pm s$)

组别	n	荧光强度
A 组	10	35.37 ± 4.08
B 组	10	40.61 ± 12.08
C 组	10	42.89 ± 12.73
D 组	10	48.41 ± 14.15
E 组	10	125.56 ± 29.23*
F 组	10	121.39 ± 19.80*

注: * : 与 A~D 组比较, $P < 0.01$

3 讨论

用作基因治疗的载体大致可分为病毒载体和非病毒载体。病毒载体转染效率高, 能稳定持久地表达所携带的外源性基因(目的基因), 但无靶向性, 且存在免疫原性和致突变性, 会对机体组织造成损害; 而以脂质体等非病毒载体的方法则存在转染率低、在体内不能高水平表达、靶向性差等缺陷。作为一种新型的基因载体^[1], 微泡造影剂可弥补前两者的不足, 具有较高转染率、靶向性和安全性等特点, 越来越受到关注。

超声微泡造影剂的微气泡内含惰性气体, 能悬浮于液体中, 其外壳的成分可为人体白蛋白、脂类物质、棕榈酸和聚合物, 目的基因通过静电作用黏附于外壳表面或包裹于微泡内而与造影剂结合。超声微泡的作用机制如下: 携带基因的超声微泡造影剂经血液循环到达靶组织, 当一定强度的超声波辐射靶组织时, 微小气泡(空化核)爆破后产生“空化效应”以及“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, 甚至使细胞膜发生暂时性的、可逆的、相对无害的穿孔, 从而使质粒 DNA 易于进入细胞内, 实现并增强基因的转染和表达^[2-3]。目前对超声微泡造影剂介导的基因转染研究主要涉及心脏、肝脏、血管、肾脏、骨骼肌、神经系统等领域^[4-6], 包括基因治疗^[7]、溶栓治疗^[8]、抗肿瘤治疗等。

眼球是局部基因治疗的一个理想器官, 其血-眼屏障和全身循环相对独立; 同时, 眼球处于一个相对免疫赦免的状态, 使基因治疗在眼科疾病的治疗中受到广泛关注。一些学者开始将超声微泡造影剂引入眼科疾病的基因研究中, 目前主要集中在角膜和眼底疾病方面, 如角膜上皮细胞受损、脉络膜新生血管、慢性高血压导致视神经细胞损伤、视网膜母细胞瘤、如遗传性眼病视网膜色素变性、伴有新生血管形成的角膜移植、老年性黄斑变性和糖尿病性视网膜病变等^[9-11]。眼科基因治疗技术的关键是将外源性目的基因通过血-眼屏障转入相应的眼组织细胞内, 并能安全有效地表达。

已有不少学者从细胞分子学水平研究证实, 不同超声参数(如声强、照射时间)和超声造影剂浓度对基因转染可有不同影响, 且当超声强度及造影剂浓度达一定程度时, 可对细胞具有损伤作用^[12], 因此寻找最佳超声参数及超声造影剂浓度对提高安全性和基因转染率有重大意义。本组实验兔视网膜各层结构基本正常, 未见明显病理改变, 表明以 0.5 W/cm^2 和 1.0 W/cm^2 的超声波辐照兔眼球 60 s 未对视网膜造成损害; 另外, 经耳缘静脉注入 1 ml 质粒和 1 ml 微泡

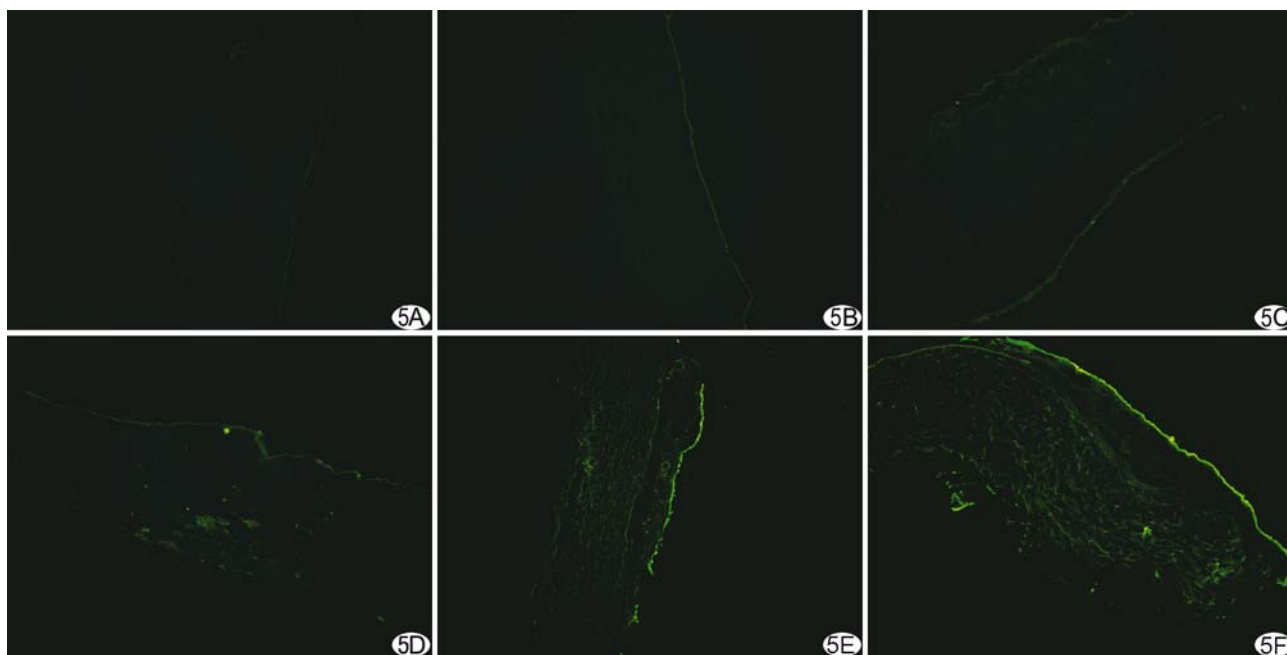


图 5 6 组荧光强度 A~F, 依次为 A~F 组

造影剂后,光镜及透射电镜检查结果显示视网膜各层结果正常,表明这是一种安全的转染方式。

已有研究显示超声照射联合微泡造影剂可以明显提高细胞的基因转染率^[13-14]。本研究发现,EGFP 在视网膜各层均有表达,但主要集中在视网膜色素上皮层表达,并且 E、F 组表达最强;提示无论是否有超声照射或微泡造影剂,EGFP 质粒均可通过血-眼屏障进入视网膜细胞中并表达,但其表达在超声照射联合微泡造影剂的作用下最强,表明两者联合能够有效提高质粒转染的效率。本研究还发现 0.5 W/cm^2 和 1.0 W/cm^2 超声照射组(E 组和 F 组)荧光表达强度差异无统计学意义,表明声强 0.5 、 1.0 W/cm^2 超声照射联合微泡造影剂均可安全有效地提高质粒的转染率,且两者的效果无明显差异,从而为某些眼科疾病的基因治疗提供新的方法和思路。

[参考文献]

- [1] 许燕,周希瑗,王志刚,等.超声微泡造影剂介导 EGFP 质粒转染大鼠视网膜的实验研究.中国医学影像技术,2007,23(2):188-190.
- [2] Unger EC, Hersh E, Vannan M, et al. Local drug and gene delivery through microbubbles. *Prog Cardiovasc Dis*, 2001,44(1):45-54.
- [3] Bull JL. The application of microbubbles for targeted drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*, 2007,4(5):475-493.
- [4] Wang ZG, Ling ZY, Ran HT, et al. Ultrasound-mediated microbubble destruction enhances VEGF gene delivery to the infarcted myocardium in rats. *Clin Imaging*, 2004,28(6):395-398.
- [5] Miyake Y, Ohmori K, Yoshida J, et al. Granulocyte colony-stimulating factor facilitates the angiogenesis induced by ultrasonic microbubble destruction. *Ultrasound Med Biol*, 2007,33(11):1796-1804.
- [6] Bekeredjian R, Bohris C, Hansen A, et al. Impact of microbubbles on shock wave-mediated DNA uptake in cells in vitro. *Ultrasound Med Biol*, 2007,33(5):743-750.
- [7] Pitt WG, Hussein GA, Staples BJ. Ultrasonic drug delivery—a general review. *Expert Opin Drug Deliv*, 2004,1(1):37-56.
- [8] Shaw GJ, Bavani N, Dhamija A, et al. Effect of mild hypothermia on the thrombolytic efficacy of 120 kHz ultrasound enhanced thrombolysis in an in-vitro human clot model. *Thromb Res*, 2006,117(5):603-608.
- [9] Ikeda Y, Yonemitsu Y, Miyazaki M, et al. Stable retinal gene expression in nonhuman primates via subretinal injection of SIVagm-based lentiviral vectors. *Hum Gene Ther*, 2009,20(6):573-579.
- [10] Li HL, Zheng XZ, Wang HP, et al. Ultrasound-targeted microbubble destruction enhances AAV-mediated gene transfection in human RPE cells in vitro and rat retina in vivo. *Gene Ther*, 2009,16(9):1146-1153.
- [11] Munemasa Y, Ahn JH, Kwong JM, et al. Redox proteins thioredoxin 1 and thioredoxin 2 support retinal ganglion cell survival in experimental glaucoma. *Gene Ther*, 2009,16(1):17-25.
- [12] 景香香,刘洁,杨炳昂,等.超声介导击破微泡增强型绿色荧光蛋白转染正常大鼠关节滑膜组织.中国医学影像技术,2011,27(12):2407-2409.

[13] Taniyama Y, Azuma J, Rakugi H, et al. Plasmid DNA-based gene transfer with ultrasound and microbubbles. *Curr Gene Ther*, 2011, 11(6):485-490.

[14] Omata D, Negishi Y, Hagiwara S, et al. Bubble liposomes and ultrasound promoted endosomal escape of TAT-PEG liposomes as gene delivery carriers. *Mol Pharm*, 2011, 8(6):2416-2423.

Atypical infiltrative pulmonary tuberculosis: Case report 不典型浸润型肺结核 1 例

马二奎¹, 梁宇霆², 王军委³

(1. 北京市房山区第一医院影像科, 北京 102400; 2. 北京友谊医院影像科, 北京 100050;
3. 郑州市金水区总医院 CT 室, 河南 郑州 450003)

[Key words] Tuberculosis, pulmonary; Positron-emission tomography; Tomography, X-ray computed

[关键词] 结核, 肺的; 正电子发射型体层摄影术; 体层摄影术, X 线计算机

[中图分类号] R521; R817.4 [文献标识码] B [文章编号] 1003-3289(2012)10-1792-01

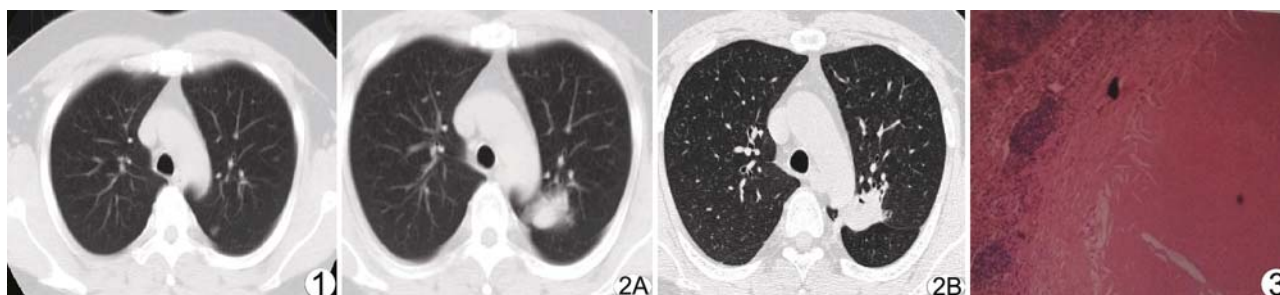


图 1 2008 年 6 月 CT 图像 左肺上叶尖后段可见淡片状高密度灶, 边缘模糊不清, 密度较均匀 图 2 2011 年 6 月 CT 图像 平扫(A)及高分辨率 CT(B)示左肺上叶尖后段团块状病变, 其内可见“空泡征”, 后缘膨胀生长, 与胸膜关系密切 图 3 病理图 左肺上叶浸润型肺结核, 肺组织内见播散灶(HE, ×10)

患者男, 42 岁, 主因“无诱因咳嗽、咳痰”就诊, 痰量较少, 白色泡沫样, 无其他不适。3 年前患者因糖尿病住院, 检出左肺上叶病变(图 1), 无明显胸部症状, 予以随访观察。胸部 CT 示左肺上叶尖后段团块状病变, 较 3 年前明显增大(图 2)。PET/CT: 左肺上叶病变葡萄糖代谢异常增高, 累及胸膜, 符合恶性肿瘤表现。行 CT 引导下经皮肺穿刺活检术, 病理检查考虑为肺母细胞瘤, 免疫组化: Ki-67(25%~50% 阳性), SMA(间质+), TTF-1(+), Vim(间质+)。术前临床诊断: 左肺上叶恶性占位, 可能侵及胸膜。行左肺上叶切除术, 术中见病变未侵及胸

膜。术后病理: 左肺上叶浸润型肺结核, 肺组织内见播散灶, 支气管肺门淋巴结呈组织增生及肉芽肿性炎(图 3)。

讨论 浸润型肺结核是继发性肺结核中最常见的类型, 多见于成人, 临床常表现为低热、乏力、盗汗等结核中毒症状, 发生干酪性肺炎时可表现为高热; 其特殊影像学表现为空洞样病变及其周围或下叶的播散灶, 呈散在分布的腺泡结节, 可融合呈肺段或肺叶。本例临床症状仅为咳嗽、咳痰, 影像学表现为左肺上叶尖后段团块灶, 周围未见明显播散灶, 但病变体积较 3 年前明显增大, 因此术前高度疑为恶性病变。本例提示, 对于典型的浸润型肺结核, 根据临床及影像学表现, 结合实验室检查、痰查结核菌等不难诊断; 而当影像学表现不典型、尤其是病变呈团块状且周围无明显播散灶时, 则需与肺癌、炎性肉芽肿等相鉴别。

[作者简介] 马二奎(1981—), 男, 河北保定人, 在读硕士, 主治医师。

E-mail: maerkui@yahoo. cn

[收稿日期] 2012-06-28 [修回日期] 2012-07-12