

Development of ultrasound microbubbles carrying genes for resist renal interstitial fibrosis

XIAO Huan, TANG Yi*

(Department of Ultrasound, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

[Abstract] With the improving of preparing technology of ultrasound microbubbles and the understanding of mechanism of renal fibrosis, ultrasound-microbubble-mediated gene therapy of renal fibrosis has got some success. Compared with other gene transfection, this method is more efficient and safe. In this article, the development of ultrasound microbubbles carrying genes for resist renal interstitial fibrosis were reviewed.

[Key words] Renal interstitial fibrosis; Ultrasonography; Microbubbles; Contrast media

超声微泡造影剂携基因抑制肾间质纤维化的研究进展

肖欢综述,唐毅*审校

(重庆医科大学附属儿童医院超声科,重庆 400014)

[摘要] 随着超声微泡造影剂制备技术的提高,以及对肾间质纤维化分子机制的进一步深入研究,微泡介导基因抑制肾间质纤维化已取得了一定成效,且比其他基因转染方法更为高效和安全。本文就超声微泡携相关基因抗肾间质纤维化的研究进展进行综述。

[关键词] 肾间质纤维化;超声检查;微泡;造影剂

[中图分类号] R692; R445.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-3289(2013)02-0310-04

肾间质纤维化是各种肾脏疾病慢性进展至终末期肾衰竭的共同通路,通过阻止或减慢这一过程的发生与发展,可以预防慢性肾衰竭的发生。微泡介导的基因治疗是近年新兴的基因转染技术^[1-3],随着其在肿瘤、心血管疾病中的成功应用,在肾间质纤维化的研究也取得了显著成效。本文就超声微泡携相关基因抗肾间质纤维化的研究进展进行综述。

1 超声微泡介导相关基因抗肾间质纤维化

1.1 超声微泡介导 Smads 抗肾间质纤维化 转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)上调细胞外基质(extracellular matrix, ECM)和介导间质细胞向肌成纤维细胞(myofibroblast, MyoFB)分化,

被认为是致纤维化病变中作用最主要、最强的细胞因子。TGF- β 通过多条信号转导途径实现肾间质纤维化,其中最重要的是 TGF- β /Smads 信号通路^[4]。细胞膜上存在两种 TGF- β 亚型受体,即 T β R I 和 T β R II。TGF- β 与 T β R II 结合后活化 T β R I, Smad2/3 与活化的 T β R I 结合而被激活,再与 Smad4 形成异多聚体,进入细胞核中,调节靶基因的转录,进而导致肾间质纤维化。目前,将 TGF- β 介导的 Smads 信号转导通路及下游效应介质(Smad7、Smad3 shRNA)作为治疗靶点进行特异性地抑制或阻断,已成为抗组织纤维化治疗的研究热点,同时也为超声微泡介导基因抗肾间质纤维化带来新的突破。

1.1.1 Smad7 作为 TGF- β /Smads 信号通路的一个下游信号分子,Smad7 对 TGF- β /Smads 的信号转导起着负向调控作用^[5]。作用机制:①竞争性地与活化的 T β R I 结合,阻止 Smad2/3 磷酸化^[6];②增加泛素介导的 T β R I 自身降解^[7];③募集生长抑制 DNA 损伤基因 34 和蛋白磷酸化的催化亚基至活化的 TGF- β

[作者简介] 肖欢(1988—),女,四川达州人,在读硕士。研究方向:小儿腹部超声。E-mail: huan106689210@163.com

[通讯作者] 唐毅,重庆医科大学附属儿童医院超声科,400014。

E-mail: tangyi6688@163.com

[收稿日期] 2012-09-20 **[修回日期]** 2012-11-20

I 型受体使其失活,从而反馈性地抑制 TGF- β /Smads 信号转导^[8]。此外,Smad7 还可降低纤维化标志物、晚期糖基化终产物、血管紧张素 II 的表达,而不引起其他不良反应。Chen 等^[9]研究显示,Smad7 可阻断依赖 NF- κ B 的炎症反应,减少 IL-1 β 、TNF α 、巨噬细胞等炎症因子和细胞的浸润,抑制炎症反应。

早在 2003 年,Lan 等^[10]最先使用超声微泡,将 Smad7 基因转染至单侧输尿管梗阻(unilateral ureteral obstruction, UUO)的大鼠,发现微泡介导的基因转染效率高达 90%以上,治疗组大鼠 Smad7 表达显著升高,Smad2 和 Smad3 表达下降;肾间质中 MyoFB、I 型和 III 型胶原 mRNA 及蛋白质表达均下降;同时实验前、后其肾功能未见明显变化,但有效抑制了肾间质纤维化的发展。Hou 等^[11]通过切除大鼠 5/6 肾脏建立肾纤维化模型,利用微泡介导 Smad7 基因转染小鼠病变肾脏,发现肾组织 Smad2 和 Smad3 的活化受到明显抑制,24 h 尿蛋白、血清肌酐升高的程度也受到抑制,肾纤维化和血管硬化明显改善,从而证实微泡介导 Smad7 基因能有效抑制肾间质纤维化的进展。Ka 等^[12]将上述方法用于小鼠自身免疫性新月体性肾小球肾炎模型,发现肾纤维化和炎症反应显著减轻,肾小球新月体形成减少,小管间质增生以及肾功能的损伤亦受到抑制。Chung 等^[13]将该方法用于糖尿病肾病 UUO 大鼠模型,发现过度表达 Smad7 可抑制晚期糖基化终末产物诱导的大鼠肾小管上皮细胞结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)的产生,进而减缓肾间质纤维化的发展。

1.1.2 Smad3 反义寡核苷酸(Smad3 shRNA) 在 TGF- β /Smads 信号转导通路中,虽然 Smad2 和 Smad3 同时被激活,但其对基因转录的影响却不一样:Smad3 主要介导 TGF- β 所致的纤维化^[14-15],而 Smad2 通过抑制 TGF- β /Smad3 信号转导而起负向调节作用^[16]。TGF- β 不仅增强细胞外基质的合成,而且下调基质降解酶的活性和上调基质降解酶抑制剂的活性,其生物学途径均依赖于 Smad3。应用超声微泡系统介导 Smad3 shRNA,能通过局部下调肾脏固有细胞 Smad3 表达而抑制肾间质纤维化;与抗 TGF- β 或抗 TGF- β 受体方式阻断所有下游信号通路相比,其不良反应轻微,同时也克服了系统敲除对黏膜免疫力严重破坏的不足。

张东山等^[17]利用超声微泡携带 shSmad3 基因降解 Smad3,该研究将 UUO 大鼠随机分为假手术组、UUO 组、pSUPER-shNC(非特异性的反义寡核苷酸,

对照组)和 pSUPER-shSmad3(特异性的 Smad3 反义寡核苷酸组,治疗组),结果显示:①UUO 和对照组出现严重的肾小管萎缩、小管间质单核细胞浸染及纤维化,治疗组则明显减轻;②shRNA Smad3 能显著下调 Smad3 mRNA、蛋白表达水平及 p-Smad3 水平,而对 Smad2 mRNA、蛋白表达无显著差别;③治疗组能显著下调 I 型和 III 型胶原蛋白表达水平,从而证实了超声微泡介导 shRNA Smad3 转染能显著抑制 Smad3 的表达及活化,并显著减轻 UUO 大鼠肾间质纤维化。

1.2 超声微泡介导小分子 RNA(miRNA, miR)抗肾间质纤维化 miR 是一类存在于动植物基因组中的功能性非编码小分子 RNA,最近发现其在纤维化的发生、发展过程中起着重要作用。在肾病中,TGF- β 可以高表达 miR-192、miR-21、miR-377、miR-491-5p 和 miR-382,而低表达 miR-29、miR-200^[18]。体外实验^[19]显示,miR-192、miR-21、miR-377、miR-491-5p、miR-382 可使胶原蛋白增加、系膜细胞纤连蛋白增多,减少上皮细胞 E-钙黏素标志物等致纤维化因子;而 miR-29 和 miR-200 可阻止胶原蛋白的表达,阻止多条信号通路的转导(TGF- β /Smads, NF- κ B 和丝裂原活化蛋白激酶通路等)以及肾小管上皮细胞(tubular epithelial cell, TECs)向 MyoFB 的转化,从而抑制纤维化的发展。由此可见,miR 是 TGF- β 致肾间质纤维化中关键的调节因子,为肾间质纤维化的治疗提供了一个新的方向。

Qin 等^[14]发现,在 UUO 小鼠模型中,随着肾间质纤维化的发展,miR-29 的表达逐渐降低;而对照组(敲除 Smad3 基因)miR-29 表达增高,且未出现肾间质纤维化,提示 miR-29 是 TGF- β /Smad3 介导肾间质纤维化信号通路的下游抑制因子;利用微泡介导 miR-29 基因转染小鼠左侧肾脏后,立即结扎同侧输尿管,在实验第 7 天,miR-29 基因表达明显高于对照组,该侧肾间质纤维化的发展受到阻止;在 UUO 肾间质纤维化模型中,用微泡介导 miR-29 基因转染病变小鼠肾脏,其肾间质细胞的坏死、I 型和 III 型胶原 mRNA 的表达及蛋白的集聚均较对照组减少,证实了微泡介导 miR-29 对于肾间质纤维化的治疗作用。

Zhong 等^[15]利用微泡介导 miR-21 shRNA 转染 UUO 小鼠肾脏模型,发现通过微泡介导 miR-21 shRNA 靶向降解 miR-21 基因的表达,可阻断 TGF- β 1/Smad3 信号转导通路,使 I 型胶原、纤连蛋白的表达以及 α -平滑肌细胞的聚集较对照组均降低,提示此方法可有效抑制肾间质纤维化的发展。

1.3 超声微泡介导 NF- κ B 基因抗肾间质纤维化

NF- κ B 是转录因子家族的重要成员,参与炎症细胞因子及趋化因子的产生、成纤维细胞的增生分化、ECM 交联及细胞凋亡等过程,其在肾脏疾病中的致炎及致纤维化的作用不容忽视。

NF- κ B 的顺式分子一寡脱氧核糖核苷酸(NF- κ B-decoy)可在体内和体外有效抑制主要炎症介质产生。Azuma 等^[20]利用 Optison(第二代脂质微泡造影剂)载 NF- κ B-decoy 转染同种异体肾移植大鼠模型的肾组织,结果显示移植肾组织结构和功能保持良好,NF- κ B 介导的细胞因子和黏附因子(如 IL1、诱生型一氧化氮合酶、单核细胞趋化蛋白 1、TNF 及细胞间黏附分子 1)表达均较低,动物存活期较对照组显著延长;而对照组肾组织明显破坏,伴大量炎症介质产生,动物 9 天后死亡。

目前尚鲜有超声微泡介导 NF- κ B-decoy 基因抑制肾间质纤维化的研究报道。炎症是慢性肾脏疾病的基本病理改变,也是肾纤维化的启动因素。Azuma 等^[20]的实验证实,超声微泡介导 NF- κ B-decoy 转染移植肾能有效控制炎症介质的产生,延长移植肾的存活期;利用超声微泡介导 NF- κ B-decoy 可以延缓肾间质纤维化的发展。

1.4 超声微泡介导 CTGF 反义寡核苷酸抗肾间质纤维化

作为 TGF- β 1 的一个下游因子,CTGF 是近年来发现的一种新的致纤维化生长因子,广泛存在于多种人类组织中,尤以肾脏含量最高。黄云峰^[21]实验显示,CTGF 在正常对照组肾小管上皮细胞、肾小球及间质细胞中有非常微弱的阳性信号;而 UUO3d 及 UUO7d 组 CTGF 则明显分布于小管上皮细胞及增生的肾间质细胞,且间质的病变越重(梗阻时间越长),间质中 CTGF 的表达量越多,范围越广,进一步说明 CTGF 的表达上调是各种类型的肾脏疾病纤维化的共同表现。近年有利用 CTGF 反义寡核苷酸(antisense oligonucleotide nucleotide, ODN)干预 ECM 合成的报道。使用 CTGF ODN 转染的肾脏成纤维细胞中,TGF- β 1 刺激引起的纤维连接蛋白、I 型胶原 mRNA 和蛋白上调被显著减弱,说明 ODN 阻断 CTGF 介导的 TGF- β 1 引起的肾纤维化的改变,避免了在上游阻断 TGF- β 1 带来的不良反应。

黄云峰^[21]发现 UUO3d 及 UUO7d 可见明显阳性的 CTGF 及 IV 型胶原在肾小管及肾间质中表达,同时伴有肾小管的塌陷及萎缩;而对相应的 UUO 模型施加 ODN 干预时,其肾小管及肾间质 CTGF 及 IV 型胶

原阳性表达量较对应的 UUO 组明显减弱,证实通过超声辐照携基因的超声微泡造影剂能显著提高基因在肾组织的转染效率,是一种新的安全、有效的转染方法。

2 超声微泡造影剂介导基因转染的不足与展望

超声微泡可介导多种基因在肾脏高表达,延缓肾间质纤维化的进程;但该方法尚处于起步阶段,许多问题有待解决:①载体粒径过大:常规超声造影剂为微米级,粒径较大,很难穿过血管内皮细胞到达靶组织;近来液态氟碳的出现有望解决这一问题,其粒径介于数十纳米至 300 纳米之间,可以自由穿过血管内皮,且其稳定性较强,对压力、空气暴露、热、剪切力等不敏感,在体内的循环半衰期可达数小时;而纳米造影剂本身表面积相对较大,吸附能力强,具有良好的生物亲和性;②靶向性不足:为寻求更加高效、安全的肾脏基因转染,可在微泡表面连接特殊配体,与内皮细胞表面对应的配基(靶分子)相结合,选择性地聚集在病变肾组织;③安全性:不同的微泡外壳可能会引起机体的免疫反应,而不同的超声强度、超声辐照时间会对肾脏以及基因造成破坏作用,因此,要不断寻求适宜的微泡外壳材料,探索和优化超声变量在肾病中的应用。Soman 等^[22]探讨了超声辐照下液态氟碳纳米造影剂与靶细胞的相互作用,认为超声促进纳米造影剂药物传递主要通过与其直接作用而刺激脂质交换,而不是通过空化作用影响细胞膜,安全性更好。

总之,微泡载基因靶向抑制肾间质纤维化已成为目前发展的趋势,相信随着超声医学、分子生物学、物理学、化学以及材料学科的不断发展和新型研究仪器的开发应用,上述问题都将迎刃而解,为肾病患者带来新的希望。

[参考文献]

- [1] 吴作辉,白文坤,张吉臻,等.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.中国医学影像技术,2012,28(8):1460-1464.
- [2] 李文艳,汪朝霞,王志刚,等.体外实验观察微泡-阳离子纳米脂质体复合物促进 HGF 基因转染.中国医学影像技术,2012,28(7):1255-1258.
- [3] 王星,冉海涛.超声微泡造影剂在肿瘤基因治疗中的进展.中国介入影像与治疗学,2011,8(2):137-140.
- [4] Meng XM, Huang XR, Xiao J, et al. Diverse roles of TGF- β receptor II in renal fibrosis and inflammation in vivo and in vitro. J Pathol, 2012, 227(2):175-188.
- [5] Lan HY. Smad7 as a therapeutic agent for chronic kidney disease.

- ses. *Front Biosci*, 2008, 13:4984-4992.
- [6] Lan HY. TGF- β signaling in renal fibrosis and inflammation: Gene therapy using ultrasound-microbubble-mediated inducible Smad7. *Can Drug Dis Develop*, 2008, 38:609-619.
- [7] Inoue Y, Imamura T. Regulation of TGF- β family signaling by E3 ubiquitin ligases. *Cancer Sci*, 2008, 99(11):2107-2112.
- [8] Shi W, Sun C, He B, et al. GADD34-PPlc recruited by Smad7 dephosphorylates TGF-beta type I receptor. *J Cell Biol*, 2004, 164(2):291-300.
- [9] Chen HY, Huang XR, Wang W, et al. The protective role of Smad7 in diabetic kidney disease: Mechanism and therapeutic potential. *Diabetes*, 2010, 60(2):590-601.
- [10] Lan HY, Mu W, Tomita N, et al. Inhibition of renal fibrosis by gene transfer of inducible Smad7 using ultrasound- microbubble system in rat UUO model. *J Am Soc Nephrol*, 2003, 14(6): 1535-1548.
- [11] Hou CC, Wang W, Huang XR, et al. Ultrasound-microbubble-mediated gene transfer of inducible Smad7 blocks transforming growth factor- β signaling and fibrosis in rat remnant kidney. *Am J Pathol*, 2005, 166(3):761-771.
- [12] Ka SM, Huang XR, Lan HY, et al. Smad7 gene therapy ameliorates an autoimmune crescentic glomerulonephritis in mice. *J Am Soc Nephrol*, 2007, 18(6):1777-1788.
- [13] Chung AC, Zhang H, Kong YZ, et al. Advanced glycation end-products induce tubular CTGF via TGF- β independent Smad3 signaling. *J Am Soc Nephrol*, 2010, 21(2):249-260.
- [14] Qin W, Chung AC, Huang XR, et al. TGF- β /Smad3 signaling promotes renal fibrosis by inhibiting miR-29. *J Am Soc Nephrol*, 2011, 22(8):1462-1474.
- [15] Zhong X, Chung AC, Chen HY, et al. Smad3-mediated upregulation of miR-21 promotes renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol*, 2011, 22(9):1668-1681.
- [16] Meng XM, Huang XR, Chung AC, et al. Smad2 protects against TGF- β /Smad3 mediated renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol*, 2010, 12(9):1477-1487.
- [17] 张东山. 超声微泡介导 Smad3shRNA 局部下调 Smad3 对单侧输尿管梗阻大鼠肾间质纤维化的治疗作用. 长沙:中南大学, 2006.
- [18] Zhong X, Chung CK, Chen HY, et al. Smad3-mediated upregulation of miR-21 promotes renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol*, 2011, 22(9):1668-1681.
- [19] Wang B, Komers R, Carew R, et al. Suppression of microRNA-29 expression by TGF- β 1 promotes collagen expression and renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol*, 2012, 23(2):252-265.
- [20] Azuma H, Tomita N, Kaneda Y, et al. Transfection of NF- κ B-decoy oligodeoxynucleotides using efficient ultrasound mediated gene transfer into donor kidneys prolonged survival of rat renal allografts. *Gene Therapy*, 2003, 10(5):415-425.
- [21] 黄云峰. 超声微泡介导 cy5 荧光标记的 ODN 对 UUO 模型大鼠肾间质纤维化的影响. 长沙:中南大学, 2010.
- [22] Soman NR, Marsh JN, Hughes MS, et al. Acoustic activation of targeted liquid perfluorocarbon nanoparticles does not compromise endothelial integrity. *IEEE Trans Nanobioscience*, 2006, 5(2):69-75.

2012 年度中国科技论文统计结果发布

日前,在北京国际会议中心举行了“2012 中国科技论文统计结果发布会”。发布结果显示,《中国医学影像技术》杂志再创佳绩,其影响因子和综合评价总分,在 29 种军事医学与特种医学、医学影像学类期刊中均排名第一,其中,综合评价总分已连续三年居专业排名首位。今年本刊的综合评价总分排名,在 1998 种中国科技论文统计源核心期刊中位列第 42 位,这也是《中国医学影像技术》杂志综合评价总分排名的历史最好成绩。另外,本刊再次入选 2012 年“百种中国杰出学术期刊”。