文章编号:1000-5404(2009)23-2323-04

论著

超声联合微泡造影剂携 p53 基因转染宫颈癌 HeLa 细胞的实验研究

唐 艳[1],熊正爱[1],李 攀[2],王志刚[2],董培婷[1] (重庆医科大学附属第二医院:[1]妇产科,[2]超声影像研究所,重庆 400010)

摘 要:目的 探讨超声联合微泡造影剂介导野生型 p53(wtp53)基因转染宫颈癌 HeLa 细胞的可行性、效率性及作用效果。**方法** 以前期实验所筛选的超声辐照参数(300 kHz ,0.5 W/cm^2, 30 s)为实验条件,将 HeLa 细胞分为质粒组(A 组)、质粒 + 超声组(B 组)、质粒 + 超声 + 微泡组(C 组)、质粒 + 脂质体组(D 组)、空白对照组(E 组),分别进行处理。转染 24 ~ 48 h 后,收集各组细胞,荧光显微镜观察细胞基因转染效率、RT-PCR 检测 p53 mRNA 表达,流式细胞仪检测细胞周期,MTT 检测细胞增殖抑制情况。**结果** 荧光显微镜下见 C、D 组均有较多绿色荧光蛋白表达的细胞(转染率分别为 14.15% 和 10.86%),B 组仅有极少的荧光细胞(0.81%);A 组和 E 组无荧光表达;RT-PCR 结果显示,C 组和 D 组均可见特异性 p53 电泳条带,C 组的电泳条带的光密度比值高于 D 组($P<0.05$);流式细胞仪测细胞周期显示,转染野生型 p53 基因能使细胞周期出现明显的 G_1 期阻滞,C、D 组与 E 组相比差异有显著性($P<0.05$);MTT 测定结果显示 C 组细胞生长明显受抑,且随时间的延长,抑制程度逐渐增强。**结论** 适当浓度的微泡和优化的超声辐照条件可增强基因转染效率,野生型 p53 基因能使 HeLa 细胞产生 G_1 期阻滞,抑制宫颈癌细胞生长。

关键词: 超声;微泡造影剂;宫颈癌;基因治疗
中图法分类号: R454.3; R73-36; R737.33 **文献标识码:** A

Experimental study of p53 plasmid transfected into HeLa cells by ultrasound microbubble intensifier

TANG Yan[1], XIONG Zheng-ai[1], LI Pan[2], WANG Zhi-gang[2], DONG Pei-ting[1] ([1] Department of Obstetrics and Gynecology, [2] Institute of Ultrasonography, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To explore the feasibility, efficiency and effect of wide-type p53 gene transfected into cervical cancer HeLa cells by ultrasound microbubble intensifier. **Methods** Based on the optimum parameter of ultrasound wave irradiation (0.5 W/cm^2, 30 s) selected in pre-experiment, HeLa cells were divided into 5 groups: (A) simple plasmid group, (B) plasmid-ultrasound group, (C) plasmid-ultrasound-microbubble group, (D) plasmid-liposome group, (E) blank control group. At 24-48h after transfection, the transfection efficiency was detected by fluorescence microscope, the mRNA expression of p53 was detected by RT-PCR, the cell cycle was detected by flow cytometry, and the inhibition rate of cells growth was detected by MTT assay. **Results** Fluorescence microscopy showed that the expression of green fluorescent protein in group C was higher than that in group Band group D ($P<0.05$), and there were no green fluorescent cells in group A and group E. RT-PCR confirmed that the specific p53 electrophoresis strips were seen in group C and group D. The optical density of the strip from group C was higher than that from group D ($P<0.05$). The cell cycles of transfected p53 cells arrested from G_1 to S phase and the growth of cells transfected with wtp53 gene were dramatically inhibited. The characteristic of cells in group C and D was quite different from that of group E ($P<0.05$). **Conclusion** The transfection efficiency of foreign p53 gene into HeLa cells can be enhanced by optimum ultrasound intensity and microbubble dosage. Wtp53 gene can get the cell cycle arrested in G_1 phase and inhibit the growth of HeLa cells.

Key words: ultrasound; microbubble contrast agent; cervical cancer; gene therapy

基金项目:国家自然科学基金(30770566)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30770566)
作者简介:唐 艳,女,重庆市人,硕士研究生,主要从事妇科肿瘤方面的研究。E-mail: 455134807@qq.com
通信作者:熊正爱,电话:(023)63849057,E-mail: xiongzhengai@cqums.edu.cn
收稿日期:2009-04-20;**修回日期:**2009-05-13

宫颈癌是世界范围内最常见的女性生殖道恶性肿瘤之一,病死率占女性癌症死亡率的第2位。宫颈癌的发生与感染高危型HPV密切相关,而p53基因则是HPV致使宫颈癌发生发展的一个重要靶点[1]。因此,如果能将外源性p53基因成功转染入肿瘤组织就可逆转细胞的无限增殖,实现肿瘤的对因治疗。超声靶向破坏携基因微泡定位释放技术作为一种新型的无创性基因转移技术[2,3],可实现高效、安全、靶向的基因转染。本研究通过体外实验,探讨超声微泡转染外源性wtp53基因进入宫颈癌HeLa细胞的可行性、效率性,以及对细胞生物学行为方面的影响,以期为宫颈癌的基因治疗提供一种新思路。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

脂质微泡造影剂和CGZZ型超声基因转染治疗仪(重庆医科大学超声影像学研究所自制,频率300 kHz,声强范围0.25~2.5 W/cm^2),HeLa细胞株(李兰双博士惠赠),前期构建好的重组质粒pEGFP-N1-p53及质粒抽提试剂盒(Axygen公司)转染试剂Lipofectamine(Invitrogen公司),RT-PCR试剂盒(TaKaRa公司),p53引物(上海生工),胎牛血清和RPMI1640培养基(杭州四季青公司)。

1.2 方法

1.2.1 质粒的扩增及抽提 将已转入pEGFP-N1-p53质粒的感受态大肠杆菌接种于5 ml LB培养基中,37 ℃振荡培养过夜。大量扩增后,用Axygen公司的质粒抽提试剂盒按说明提取质粒。琼脂糖凝胶电泳进行鉴定,用紫外分光光度计测定浓度,并用双蒸水稀释调整浓度为0.1 μg/μl。

1.2.2 细胞的培养及分组转染 复苏细胞,将细胞置于含10%胎牛血清的RPMI1640培养基,37 ℃,5% CO_2的培养箱中培养。待细胞生长至对数生长期时,用0.25%的胰蛋白酶消化,调整细胞数,以2×10^5/ml,每孔2 ml接种于6孔板中。待细胞增至70%~80%时,更换不含血清、不含双抗的RPMI1640培养基,按处理因素分为以下5组进行转染,每组设3个复孔。质粒组,只加4 μg的质粒;质粒+超声组,加入4 μg的质粒,并用CGZZ型超声基因转染治疗仪(声强0.5 W/cm^2,时间30 s)进行超声辐照;质粒+超声+微泡造影剂组,加入质粒和微泡造影剂的混合液(含4 μg质粒和200 μl的微泡),超声强度与B组相同;质粒+脂质体组,加入质粒和脂质体的混合液(含4 μg质粒和12 μl脂质体);空白对照组,不作任何处理。转染后6 h更换含有血清和双抗的1640培养基,继续培养24~48 h。

1.2.3 荧光显微镜的观察、计数 转染后24~48 h,在荧光显微镜下观察EGFP的表达情况,以此反映质粒的转染情况(由于质粒pEGFP-N1-p53中含EGFP)。每组细胞高倍镜下随机选择9个视野计算表达EGFP的细胞数(阳性细胞数)和细胞总数,并计算转染率,每组计数3孔。

1.2.4 RT-PCR检测转染细胞p53 mRNA表达 按RT-PCR试剂盒说明书操作,以β-actin为内参,扩增产物经2%琼脂糖凝胶电泳,Quantity One图像分析软件分析。p53引物,正义链:5′-AGCATCTTATCCGAGTGGAAGGAA-3′,反义链:5′-TTATGGCGGGAGGTAGACTGACC-3′,产物长度568 bp;β-actin引物,正义链:5′-CAACTGGGACGACATGGAG-3′,反义链:5′-CATCTGCTGGAAGGTGGAC-3′,产物长度835 bp。由上海生工合成。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞周期 收集细胞并制成2×10^6/ml的单细胞悬液,1 000 r/min离心,弃上清,PBS洗涤后重悬细胞。再以70%乙醇固定,4 ℃过夜后再用PBS洗涤2次,加入100 pg/ml RNA酶37 ℃下消化30 min,PI避光染色30 min,流式细胞仪检测。

1.2.6 MTT法检测细胞增殖抑制情况 收集转染后细胞,调整细胞数为1×10^4/ml,接种于96孔板内,200 μl/孔,继续培养。分别于培养24、48、72、96 h后加入5 mg/ml的MTT液20 μl,继续培养4 h后,吸尽孔内的培养液,每孔加入200 μl的DMSO,振荡10 min,酶标仪490 nm处测定各孔吸光度值[D(490)]。计算细胞增殖抑制率。

细胞增殖抑制率(%)=1-[实验孔D(490)-空白调零孔D(490)]/[空白对照孔D(490)-空白调零孔D(490)]×100%

1.3 统计学处理

采用SAS统计软件,行正态检验和方差齐性检验后,计数资料行χ^2检验,计量资料行t检验和F检验。

2 结果

2.1 荧光显微镜观察细胞转染情况

在荧光显微镜高倍镜(×200)下观察,质粒+超声+微泡组、质粒+脂质体组2组细胞可见较多明亮的绿色荧光细胞,荧光主要位于细胞核内;质粒+超声组可见极少量的荧光细胞;质粒组和空白对照组几乎见不到荧光细胞。质粒+超声+微泡组转染率高于质粒+脂质体组($P<0.05$),而质粒+脂质体组的转染率明显高于质粒+超声组、质粒组($P<0.01$)。见表1。

表1 高倍镜下表达EGFP的细胞计数及转染率

组别	表达绿色荧光蛋白的细胞数(个,$\bar{x}\pm s$)	转染效率(%)
质粒组	2.67±0.58	0.29[b]
质粒+超声组	7.31±0.46	0.81[b]
质粒+超声+微泡组	127.33±17.27	14.15[a]
质粒+脂质体组	98.56±11.34	10.86

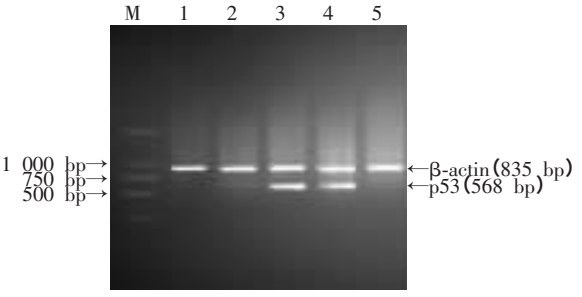
a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与质粒+脂质体组比较

2.2 RT-PCR检测细胞中p53 mRNA表达

各组细胞的扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后,均可观察到β-actin的电泳条带。质粒+超声+微泡组和质粒+脂质体组可见特异性的p53电泳条带,说明外源性p53基因通过超声微泡和脂质体为载体转入了细胞内,而其余各组未检测到相应电泳条带,即p53 mRNA表达阴性(图1)。以β-actin光密度值为对比,质粒+超声+微泡组p53 mRNA光密度比值大于质粒+脂质体组,差异显著($P<0.01$)。

2.3　转染后各组细胞细胞周期检测结果

各组细胞转染野生型 p53 基因后,细胞周期的变化主要表现为 G_1 阻滞。与空白对照组相比,质粒 + 超声 + 微泡组和质粒 + 脂质体组进入 G_1 期的细胞明显增多,G_2 期的细胞明显减少($P<0.01$,$P<0.05$),即出现明显的 G_1 期阻滞;质粒 + 超声 + 微泡组与质粒 + 脂质体组相比无明显差异($P>0.05$),见表 2。



M: DNA 标准; 1:质粒组; 2:质粒 + 超声组; 3:质粒 + 超声 + 微泡组; 4:质粒 + 脂质体组; 5:空白对照组

图 1　不同转染方式对细胞 p53 mRNA 表达的影响

表 2　各组细胞处理后细胞周期分布(%)

组别	G_1	G_2	S
质粒组	68.42	11.48	20.10
质粒 + 超声组	69.92	1.77	28.31
质粒 + 超声 + 微泡组	83.33[a]	1.39[a]	15.28[a]
质粒 + 脂质体组	76.51[b]	1.33[b]	22.16[b]
空白对照组	66.17	11.86	21.97

a: $P<0.01$,b: $P<0.05$,与空白对照组比较

2.4　MTT 检测细胞增殖抑制情况

各实验组在转染后 24 h 内细胞增殖抑制率差异无统计学意义($P>0.05$);在转染后 48、72、96 h 内,各组细胞的增殖抑制率均有显著性差异($P<0.01$),其中质粒 + 超声 + 微泡组细胞受抑制的程度最明显,且随时间延长,抑制率逐渐增高(表 3)。

表 3　不同转染方式对细胞增殖抑制率的影响[$(\bar{x}\pm s)\%$]

组别	24 h	48 h	72 h	96 h
质粒组	10.96 ± 1.08	16.47 ± 2.89	18.90 ± 3.25	19.88 ± 4.11
质粒 + 超声组	15.05 ± 1.81	21.99 ± 4.04	28.56 ± 2.17	33.30 ± 3.07
质粒 + 超声 + 微泡组	15.63 ± 1.63	40.43 ± 5.05	50.95 ± 4.51	59.18 ± 2.33
质粒 + 脂质体组	17.20 ± 2.07	26.29 ± 5.24	46.42 ± 2.73	54.03 ± 4.16
P	>0.05	<0.01	<0.01	<0.01

3　讨论

随着分子生物学和基因技术的发展,基因治疗已成为许多肿瘤治疗的研究热点及方向。但一直以来,基因载体技术是基因转导和表达的关键,也是基因治疗的重点和瓶颈问题[4]。传统的非病毒载体转染效率较低;病毒载体虽转染效率高,但存在低安全性、高免疫源性和无靶向性等缺点[5]。这使得人们努力寻找一种既具安全性,同时又具较高转染效率的基因治疗技术。近年来,国内外学者研究发现超声微泡造影剂可作为一种新型的基因转染载体,将携带目的基因的微泡造影剂经静脉或局部注射后,在靶组织给予一定条件的超声照射,可明显提高局部组织细胞的基因转染和表达[6-8]。该载体技术介导基因转染的原理机制是:目的基因与微泡造影剂通过静电吸附作用黏附在一起,携带基因的微泡在一定强度的超声辐照作用下,微泡被瞬间击碎产生"空化效应"可使局部微循环细胞连接及靶细胞膜轻度可逆性损害,膜通透性增高,从而使细胞对基因的摄入增强,提高了转染率[9]。

然而,能否利用超声靶向破坏携基因微泡定位释放技术有效地治疗妇科肿瘤疾病还尚无确切依据,国内外已有学者开始了相关研究。早在 2002 年,国外就有学者将一定剂量 GFP 裸基因质粒和超声微泡混合注入实验组胎鼠的子宫内,并给予一定能量的超声辐照,而对照组胎鼠子宫内只注射相同剂量的 GFP 裸基因。结果显示,实验组比对照组的绿色荧光蛋白表达率增加了约 10^3 倍[10]。国内也有学者进行了超声微泡造影剂介导 PTEN 基因转染人卵巢癌细胞($SKOV_3$)的实验研究,在肿瘤细胞内加入 PTEN 基因质粒和微泡造影剂后,予以一定能量的超声照射,可明显增效基因转染,且 PTEN 基因可以通过抑制肿瘤细胞的侵袭力进而抑制卵巢肿瘤生长[11]。

本实验在前期实验所筛选出的优化超声辐照参数(强度 0.5 W/cm^2,时间 30 s)和一定微泡浓度(10%)的条件下,通过不同方式介导重组质粒 pEGFP-N1-p53 转染宫颈癌 HeLa 细胞,观察了目的基因的转染效率,检测了 wtp53 基因是否对宫颈癌细胞的生长存在抑制作用和对细胞周期的影响。本实验结果显示,超声微泡介导的基因转染效率明显高于传统脂质体介导的转染和单纯超声作用的转染,而脂质体与单纯超声作用相比其转染效率亦有显著性差异。进一步采用流式细胞仪检测结果显示,超声微泡介导转染的 p53 基因可使 HeLa 细胞周期出现明显的 G_1 期阻滞。MTT 法结果也显示超声微泡处理后的细胞生长受到明显抑制,且随时间延长,与其余实验组相比抑制作用越明显。这就证明了超声微泡造影剂作为一种新型的基因转染载体,可达到较高的转染效率,且 wtp53 基因可通过影响 HeLa 细胞的细胞周期,从而抑制宫颈肿瘤(宫颈癌细胞)的生长。

事实上,超声微泡造影剂介导基因转染的影响因素很多,除超声参数外,微泡外壳和核心气体成分、微泡的大小和浓度、靶细胞的种类、基因的种类、载体种类等因素均有可能影响转染效率。目前该技术的研究主要涉及心血管、肝脏、中枢神经系统等领域,在妇科疾病方面的研究还处于起步阶段,需进一步研究。

参考文献：

[1] 崔 英，胥爱辉，蔡永娥，等. 人乳头瘤病毒(HPV)致宫颈癌的分子机制研究[J]. 现代肿瘤医学，2008，16(1)：143－145.

[2] Korpanty G, Chen S, Shohet R V, *et al*. Targeting of VEGF-mediated angiogenesis to rat myocardium using ultrasonic destruction of microbubbles[J]. Gene Ther, 2005, 12(17): 1305－1312.

[3] Vancraeynest D, Havaux X, Pouleur A C, *et al*. Myocardial delivery of colloid nanoparticles using ultrasound-targeted microbubble destruction[J]. Eur Heart J, 2006, 27(2): 237－245.

[4] Verma I M, Somia N. Gene therapy--promise, problems and prospects [J]. Nature, 1997, 389(6648): 239－242.

[5] Tomanin R, Scarpa M. Why do we need new gene therapy viral vectors? Characteristics, limitations and future perspectives of viral vector transduction[J]. Curr Gene Ther, 2004, 4(4): 357－372.

[6] Sonoda S, Tachibana K, Uchino E, *et al*. Gene transfer to corneal epithelium and keratocytes mediated by ultrasound with microbubbles[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006, 47(2): 558－564.

[7] Bekeredjian R, Bohris C, Hansen A, *et al*. Impact of microbubbles on shock wave-mediated DNA uptake in cells in vitro[J]. Ultrasound Med Biol, 2007, 33(5): 743－750.

[8] Shen Z P, Brayman A A, Chen L, *et al*. Ultrasound with microbubbles enhances gene expression of plasmid DNA in the liver via intraportal delivery[J]. Gene Ther, 2008, 15(16): 1147－1155.

[9] 王 佚，郭振华，金先庆，等. 超声微泡促腺病毒载体转染MDR1基因效率的体外实验研究[J]. 第三军医大学学报，2009，31(1)：67－70.

[10] Endoh M, Koilbuchi N, Sato M, *et al*. Fetal gene transfer by intrauterine injection with microbubble-enhanced ultrasound[J]. Mol Ther, 2002, 5(5 Pt 1): 501－508.

[11] 王 斌，傅艺兵，李晓翠，等. 超声造影剂介导PTEN基因影响卵巢癌侵袭的实验研究[J]. 中华超声影像学杂志，2006，15(1)：58－60.

（编辑 王小寒）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2009)23-2326-01

142例哮喘患儿严重程度与血清总IgE水平、过敏原特异性IgE的关系研究

潘开宇[1]，徐 峰[2]，刘 军[2]（浙江省杭州市萧山第一人民医院：[1]儿科，[2]检验科，杭州 萧山 311201）

支气管哮喘是儿科常见的变态反应性疾病，其发病机制复杂。目前认为是由多种细胞和细胞组分共同参与的气道慢性炎症性疾病，血清总IgE水平与哮喘的严重程度和气道高反应性相关。而在各种触发因素中，吸入及食物过敏原起着重要的作用[1]。我科对142例哮喘患儿，在全自动化学发光免疫分析仪中直接进行总IgE定量测定，使用免疫印迹法测定过敏原特异性IgE，了解哮喘患儿的病情严重度与血清总IgE水平、过敏原特异性IgE的关系，以指导临床防治哮喘，现报告如下。

1 资料与方法

1.1 对象

选取2007年9月至2008年12月我院儿科病房收治的142例1～10岁哮喘患儿，均符合儿童哮喘诊断标准。其中男性94例，女性48例。据儿童哮喘严重程度分级标准[2]，将142例患儿分为间歇发作组（$n=46$）、轻度组（$n=68$）、中度组（$n=19$）、重度组（$n=9$）。各组年龄、性别比较均无统计学差异（$P>0.05$）。

1.2 仪器与试剂

总IgE测定：德国Bayer Healthcare；过敏原特异性IgE测定：德国全自动敏筛仪。总IgE测定：ReadyPack® 主试剂包；过敏原特异性IgE测定：AllergyScreen试剂盒。

作者简介：潘开宇，女，浙江省杭州市人，博士研究生，副主任医师，主要从事儿科感染性疾病的分子生物学方面的研究，发表论文15篇。电话：(0571)82003626，E-mail：pkyzgk@126.com

收稿日期：2009-09-01；修回日期：2009-09-29

1.3 方法

总IgE测定：患儿入院后按常规静脉穿刺采集血液样品3 ml，离心前使样品充分凝结。在全自动化学发光免疫分析仪中直接加载标本进行总IgE定量测定。过敏原特异性IgE测定：3 ml血液经分离血清，稀释，加样孵育，反复冲洗、加样孵育，加入底物，流水冲洗，终止底物酶反应，完全干燥后，专用阅读仪读数或比色卡比色。总IgE直接定量测定：严格按说明书操作完成后得各标本定量结果；过敏原特异性IgE测定：血清sIgE标准为<0.35阴性，≥0.35为阳性。

1.4 统计学处理

采用SPSS 13.0统计软件，总IgE水平比较采用t检验；过敏原IgE阳性种类采用χ^2检验。

2 结果

2.1 4组患儿血清总IgE定量结果

4组患儿血清总IgE定量结果分别为：间歇发作期$(256.34\pm99.50)\times10^3$ U/L，轻度组$(326.08\pm96.50)\times10^3$ U/L；中度组$(406.91\pm153.05)\times10^3$ U/L，重度组$(601.61\pm109.93)\times10^3$ U/L。总IgE定量水平重度组与中度组相比差异显著（$t=3.41$，$P<0.01$）；中度组与轻度组相比较差异显著（$t=2.81$，$P<0.01$）；轻度组与间歇发作组相比较差异显著（$t=3.74$，$P<0.01$）。

2.2 4组患儿过敏原测定结果

4组患儿几种过敏原测定阳性结果见表1。各组患儿检出过敏原种类差异显著（$\chi^2=66.98$，$P<0.01$）。

（下转2329页）