文章编号:1000-5404(2009)24-2459-04

论著

超声微泡造影剂介导 pEGFP-N_1 质粒转染 HGFs 的实验研究

骆书美,张云燕,钟晓波,仲 琳 (重庆医科大学附属口腔医院牙体牙髓科,重庆 400015)

摘 要:目的 探讨超声破坏微泡介导 pEGFP-N_1 质粒转染人牙龈成纤维细胞的可行性、优化转染的条件及转染效率。**方法** 体外原代培养 HGFs。以 pEGFP-N_1 质粒为报告基因,微泡造影剂为载体,用超声辐照介导质粒 pEGFP-N_1 转染 HGFs。实验组分为质粒组、微泡+质粒组、超声+质粒组、超声+微泡+质粒组,超声+微泡+质粒组按不同的转染条件分成亚组。转染 48 h 后倒置荧光显微镜下观察 GFP 的表达,MTT 法检测 HGFs 活性。**结果** 超声微泡介导 pEGFP-N_1 质粒对 HGFs 的转染效率明显高于其他实验组($P<0.05$)。优化转染条件后,频率 300 KHz,声强 1.5 W/cm^2,连续波,辐照时间 60 s,微泡浓度 10%,质粒浓度 6.67 μg/ml 时,转染率较高。**结论** 在一定条件下,超声微泡造影剂能够促进外源基因对 HGFs 的转染。

关键词: 超声学;造影剂;人牙龈成纤维细胞;基因转染
中图法分类号: R322.41;R394-33;R394.3 **文献标识码:** A

Ultrasound-mediated microbubble destruction enhances GFP gene expression in human gingival fibroblasts cells *in vitro*

LUO Shu-mei, ZHANG Yun-yan, ZHONG Xiao-bo, ZHONG Lin (Department of Endodontics, Affiliated Hospital of Stomatology, Chongqing Medical University, Chongqing 400015, China)

Abstract: Objective To investigate whether ultrasound-mediated microbubble destruction can effectively deliver pEGFP-N_1 plasmid into human gingival fibroblasts (HGFs). Methods The primary cultured HGFs were divided into 4 groups, that is, plasmid, microbubble + plasmid, ultrasound + plasmid, and ultrasound + microbubble + plasmid groups. pEGFP-N_1 plasmid was used to transfect to HGFs as a gene marker with ultrasound-mediated microbubble destruction. The last group was further divided into subgroups to optimize the transfection conditions. After 48 h, phase-contrast fluorescent microscopy was employed to evaluate the expression of green fluorescent protein (GFP). The cell vitality was measured by the MTT assay. Results The transfection efficiency of the ultrasound + microbubble + plasmid group was higher than other experiment groups. Optimal gene expression was found when ultrasound was radiated at 1.5 W/cm^2 for 60 s, microbubble was at a concentration of 10% and plasmid was at a concentration of 6.67 μg/ml, and the transfection efficiency was highest under this condition. Conclusion Under specific conditions, ultrasound mediated microbubble destruction enhances the reporter gene transfection and expression in HGFs.

Key words: utrasonics; contrast media; human gingival fibroblasts; gene transfection

牙周病治疗的关键是牙周组织的再生,随着基因转移技术的发展和促生长因子研究的不断深入,牙龈成纤维细胞亦可能成为诱导牙周组织再生的种子细胞。近年来大量实验研究表明,超声辐照携目的基因的微泡造影剂可提高基因的转染效率,此方法较安全、简便、高效、具有一定的靶向性[1-4]。

本研究探讨了超声辐照微泡介导绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)基因转染人牙龈成纤维细胞(human gingival fibroblast, HGFs)的效率及可行性,为超声微泡造影剂技术在牙周再生治疗中的进一步研究打下基础。

作者简介:骆书美,女,四川省阿坝藏族羌族自治州人,藏族,硕士研究生,主要从事口腔内科方面研究。E-mail: beautylsm@163.com
通信作者:钟晓波,E-mail:zhongxb3151@sina.com
收稿日期:2009-01-21;修回日期:2009-03-09

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

超声基因转染治疗仪和超声微泡造影剂由重庆医科大学超声影像学研究所提供,胎牛血清系杭州四季青公司生产,质粒抽提试剂盒购自博迈德生物科技有限责任公司,胰蛋白酶和DMEM(高糖)及相关实验仪器由重庆医科大学生命科学研究院提供。大肠杆菌 DH5α、pEGFP-N_1 质粒由重庆医科大学附属第一医院神经内科徐鸣明博士惠赠。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞的原代培养 选取本院因正畸或阻生需拔除的牙齿,牙齿均无龋坏、尖周炎,牙龈无炎症、无增生。拔牙后立即放入装有含双抗(青霉素、链霉素)的无血清的 DMEM 培养液中。无菌条件下用 PBS 冲洗 3 遍,刮取牙颈部牙龈组织,将组织块剪碎,将剪碎的组织块均匀的贴附于培养瓶组织面,翻转培养瓶,滴入 2 ~ 4 ml 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基。将培养瓶放入孵箱内,5% CO_2、37 ℃、饱和湿度下培养 2 ~ 4 h 后,待贴壁牢固后翻转培养瓶继续培养。待细胞长至组织面 80%,开始传代。用 0.25% 的胰酶消化进行首次传代,传代比例为 1∶2。

1.2.2 HGFs 的鉴定 取第 3 代培养的 HGFs 细胞爬片,丙酮固定,吹干,采用 ABC 法运用抗波形丝蛋白多克隆抗体及抗细胞角蛋白多克隆抗体进行免疫细胞化学染色。

1.2.3 GFP 质粒的抽提及鉴定 携带 GFP 基因的真核表达质粒经大肠杆菌扩增后按抽提试剂盒说明提取 GFP 质粒。取少量质粒用 *Bam*HⅠ酶切,1% 琼脂糖电泳鉴定酶切结果。

1.2.4 微泡的制备 取装有冻干粉末状微泡的小瓶,辐照灭菌处理后,向瓶内加入 2 ml 无菌 PBS,充分振荡至冻干粉末完全溶解。

1.2.5 实验分组 按照不同的超声条件、微泡浓度和质粒浓度,将超声 + 微泡 + 质粒组分成 24 个组(按超声声强 0.5、1.0、1.5、2.0 W/cm^2,质粒浓度 3.33、6.67 μg/ml,微泡浓度 10%、20%、30%,三因素不同组合成 24 组)对 HGFs 进行转染,探讨出较合适的转染条件。并根据上述处理所得结果,实验组分为质粒组、微泡 + 质粒组、超声 + 质粒组、超声 + 微泡 + 质粒组。按实验分组对培养的 HGFs 进行转染;同时选转染率较高的参数组合,并用 MTT 检测各组对 HGFs 细胞生长活性的影响。每组设 5 个复孔,以排除实验的偶然性。

1.2.6 超声微泡介导 pEGFP-N_1 质粒对 HGFs 的转染 取 3 ~ 5 代的 HGFs 按 1.0×10^6/ml 浓度加入 24 孔培养板内,培养 24 h 后观察,待细胞生长状态良好,细胞覆盖培养板底部面积达 80% 以上时,更换培养液,按实验条件加入质粒,进行基因转染实验。超声仪探头经耦合剂作用于培养板底部,依次辐照每孔细胞,采用 300 kHz、一定的微泡浓度和超声强度处理细胞。

1.2.7 实验指标的选择与测定 ①观察 GFP 的表达情况:荧光显微镜下观察 GFP 表达,于转染 48 h 进行计数,取 10 个 200 倍的非重叠视野计算表达 GFP 的细胞数比例,取平均值计算转染率(转染细胞百分率 = 总绿染细胞数/总细胞数 × 100%)。②MTT 法检测超声微泡在较高转染率的转染条件下对 HGF 活力的影响。

1.3 统计学方法

采用单因素方差分析比较多组样本均数,用 SNK 检验两两比较,采用三因素析因分析方法比较声强、质粒浓度与微泡浓度在各水平的差异性。

2 结果

2.1 HGF_S 形态学观察及免疫细胞化学鉴定

倒置显微镜下牙龈成纤维细胞呈梭形,有 2 或 3 个细胞质突起,胞核圆形或椭圆形. 核仁清晰,呈典型的成纤维样细胞形态(图 1)。细胞免疫化学染色后在荧光显微镜下观察,抗波形蛋白染色呈阳性(图 2),抗角蛋白染色呈阴性,证实细胞来源于中胚层。

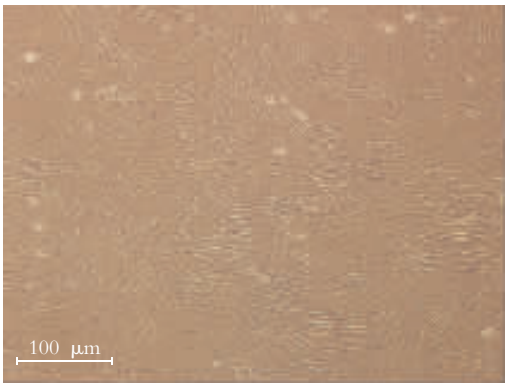


图 1 原代培养的 HGFs 形态学观察 (相差显微镜 ×100)



图 2 HGFs 细胞波形蛋白染色阳性 (ABC ×200)

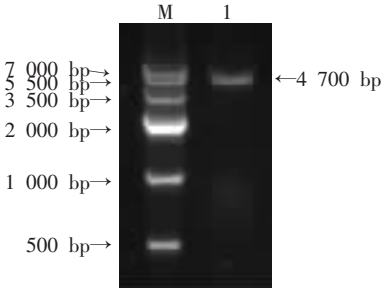
2.2 质粒 pEGFP-N_1 酶切鉴定

根据 pEGFP-N_1 图谱分析,该质粒含有单一的 *Bam*HⅠ酶切位点,全长为 4.7 kb。制备的质粒经 *Bam*HⅠ酶切后,电泳显示有 1 条单一的 4.7 kb 条带(图 3),故可验证所获质粒确为 pEGFP-N_1。

2.3 不同转染条件下,超声微泡介导 pEGFP-N_1 转染 HGFs 的转染效率

结果见表 1。三因素析因分析结果显示质粒浓度产生的效

应受超声声强的影响($F = 33.58$, $P < 0.01$),微泡浓度产生的效应受超声声强的影响($F = 191.08$, $P < 0.01$)。在声强为 1.5 W/cm^2、微泡浓度 10%、质粒浓度 6.67 μg/ml 时超声微泡介导的转染效率最高,与其他各组间差异有显著性($P < 0.05$)。提示超声频率 300 KHz、声强为 1.5 W/cm^2、辐照时间 60 s,微泡浓度 10%,质粒浓度 6.67 μg/ml 是超声微泡介导 pEGFP-N_1 转染 HGFs 的适宜参数。在此参数条件下,倒置荧光显微镜观察 GFP 基因转染人牙龈成纤维细胞形态,见图 4。



M: DNA 标准; 1: pEGFP-N_1 质粒酶切(*Bam*HⅠ)

图 3　质粒 pEGFP-N_1 酶切鉴定结果

表 1　不同转染条件下 GFP 对 HGFs 的平均转染率(%, $\bar{x} \pm s$)

质粒浓度	微泡浓度	超声声强 (W/cm^2)			
(μg/ml)	(%)	0.5	1	1.5	2
3.33	10	2.46 ± 0.17	4.47 ± 0.26	7.39 ± 0.20	7.03 ± 0.22
	20	2.34 ± 0.24	2.69 ± 0.14	5.76 ± 0.22	5.42 ± 0.18
	30	2.25 ± 0.11	2.52 ± 0.15	4.08 ± 0.24	3.95 ± 0.21
6.67	10	2.76 ± 0.16	4.56 ± 0.22	8.68 ± 0.16	8.44 ± 0.14
	20	2.31 ± 0.14	2.78 ± 0.12	5.35 ± 0.17	5.61 ± 0.17
	30	2.35 ± 0.12	2.62 ± 0.09	4.72 ± 0.13	5.01 ± 0.15

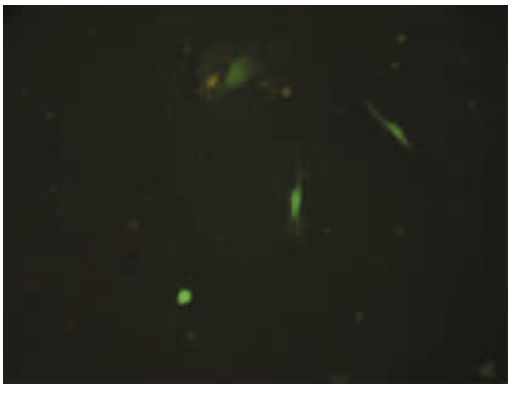


图 4　GFP 基因转染后人牙龈成纤维细胞形态观察
(倒置荧光显微镜 ×200)

2.4　在选定的超声参数条件下转染 HGFs 48 h 后的转染效率

结果见表 2,超声介导微泡在促进 pEGFP-N_1 对 HGFs 的转染时,超声 + 微泡 + 质粒组效果优于其他 3 组($P < 0.05$),超声 + 质粒 + 微泡组 HGFs 转染率与质粒组相比增加约 54 倍,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.5　MTT 检测结果

根据 2.3 处理结果,选定转染率较高的参数组合,共 8 组。重复上述实验,并 MTT 法检测各组细胞的活力。分组情况与各组细胞活力见表 3。结果显示第④、⑥、⑧组与对照组存在显著性差异($P < 0.05$),说明第④、⑥、⑧组的参数下细胞活力较低;超声微泡中转染率较高的第⑤组与第⑥组间亦存在显著性差异($P < 0.05$)。

表 2　声强为 1.5 W/cm^2,微泡浓度 10 %,质粒浓度 6.67 μg/ml 时各组的转染率　($\bar{x} \pm s$)

组别	转染率(%)
质粒组	0.159 ± 0.008
超声 + 质粒组	0.314 ± 0.020
微泡 + 质粒组	0.213 ± 0.062
超声 + 微泡 + 质粒组	8.604 ± 0.338[a]

a: $P < 0.05$,与其他 3 组比较

表 3　各组 HGFs 细胞的活力

组别	质粒浓度 (μg/ml)	微泡浓度(%)	超声声强 (W/cm^2)	D(492)值
第①组	3.33	10	1.5	0.376 ± 0.034
第②组	3.33	10	2.0	0.326 ± 0.085
第③组	3.33	20	1.5	0.349 ± 0.037
第④组	3.33	20	2.0	0.279 ± 0.025[a]
第⑤组	6.67	10	1.5	0.375 ± 0.031
第⑥组	6.67	10	2.0	0.297 ± 0.039[a]
第⑦组	6.67	20	1.5	0.363 ± 0.036
第⑧组	6.67	20	2.0	0.292 ± 0.057[a]
对照组	6.67	0	0	0.397 ± 0.050

a: $P < 0.05$,与对照组比较

3　讨论

HGFs 是牙周组织的组成成分,在牙周组织的形成与再生、完整性的维持和功能的实施中起重要作用。牙龈成纤维细胞具有与牙周膜细胞均来源于中胚层,在形态学和生长特性上缺乏显著的差异,目前牙周膜细胞被视为牙周组织工程的首选种子细胞,然而其在体外培养的成功率低,大大限制了其在牙周组织工程中的应用;而 HGFs 来源丰富,容易获得,还具有很强的生长繁殖能力,虽然在 ALP、Ⅰ、Ⅲ型胶原和 BMP 的表达方面,HGFs 不如牙周膜细胞[5];但研究表明已从中分离出成骨细胞表型,在适当的刺激(如 BMP2)作用下,可表达较高 ALP 活性、合成 OC 并形成体外矿化结节,还能表达骨相关大分子物质以及 BMP 信号转到相关的基因产物,因此牙龈成纤维细胞可能也具有一定的成骨能力,可能作为牙周组织工程的种子细胞[6-9]。

GFP 是一种用于检测细胞基因表达和蛋白定位的常用报告分子。1994 年 Chalfic 等从研究维多利亚水母(Aequorea victoria)发光现象中分离纯化出 GFP 基

因,可以在蓝光或紫光的激发下产生绿色荧光,而不需要添加任何底物,其性质稳定、无种属特异性,检测方便,可用荧光显微镜、流式细胞仪或显微成像技术方便地在活细胞中检测,对活细胞无害,可在荧光显微镜下直接观察。EGFP 是一系列野生型 GFP 突变体的一种,较 GFP 荧光更明亮,在哺乳动物细胞内表达更高,已被广泛应用到分子生物学的各个领域。pEGFP-N_1 是其中一型真核表达载体。

超声破坏携带基因的微泡造影剂与裸质粒相比,可提高基因的转染效率,从几倍到数千倍不等[1-3]。本实验结果发现,与单纯超声质粒组相比,超声微泡质粒组 HGFs 转染率增加约 54 倍。HGFs 基因转染效率与很多因素有关,细胞本身的特性是其中之一。培养的 HGFs 活性及成熟度均会影响转染效率,活性好、代谢活跃、生长良好的 HGFs 基因转染率较高。本实验中原代培养的 HGFs 转染率较其他靶细胞(如肿瘤细胞)相对较低,可能与 HGFs 为人体正常细胞,其吞噬、增殖能力都较低有关。

为研究超声微泡介导 GFP 基因转染 HGFs 的最佳条件,本实验选择的频率是所用的超声基因转染治疗仪固有频率,超声强度为仪器的 4 个可调强度,根据相关资料[9-11]并结合本实验具体情况,选择辐照时间为 60 s 并设定微泡浓度梯度和 2 个质粒浓度。因此,在超声仪频率为 300 kHz,声强分别为 0.5、1.0、1.5、2.0 W/cm^2,辐照时间 60 s;微泡浓度分别为 10%、20%、30%;质粒浓度分别为 3.33、6.67 μg/ml 的条件下,筛选较适合的转染条件。在上述指标中,通过筛选发现声强 1.5 W/cm^2、连续波辐照时间 60 s、微泡浓度 10%、质粒浓度 6.67 μg/ml 时转染效率最高,与其他各组在统计学上有显著性差异($P<0.05$)。

在相同的声强和微泡浓度下,质粒浓度 6.67 μg/ml 与质粒浓度 3.33 μg/ml 的实验组存在显著性差异($P<0.05$),质粒浓度 6.67 μg/ml 时转染率较高,可能是质粒浓度较高与微泡结合的量相对多,从而微泡破裂时进入细胞的质粒增多。选择转染率较高的几组作 MTT 检测,单纯质粒组作对照组。MTT 结果显示,声强为 1.5 W/cm^2 的实验组与对照组的细胞活性无显著性差异($P>0.05$);声强为 2.0 W/cm^2 的实验组与对照组的细胞活性存在显著性差异($P<0.05$),可能由于超声强度太大,达到一定的强度时,对细胞的损害大。声强 1.5 W/cm^2,微泡浓度分别为 10%、20%,两组间对细胞活性影响无显著性差异($P>0.05$),而两组的转染率存在显著性差异($P<0.05$),微泡浓度 10% 比微泡浓度 20% 的转染率高,可能是由于较高浓度的微泡,对细胞的活性亦有一定的影响[12];声强与微泡浓度之间存在显著交互作用,可能导致适宜的微泡浓度和声强产生较高的转染效率。

本实验结果说明,在低频率、较高声强的条件下,超声微泡造影剂介导的基因转染能提高基因转染效率,为进一步实验提供了依据,且其对细胞活性影响小,有望成为一种安全、简便、有效的基因转染方法。

参考文献:

[1] 周希瑗, 邓 鑫, 王志刚. 超声微泡介导 EGFP 质粒转染视网膜母细胞瘤细胞与传统转染方法效率对比[J]. 中国超声医学杂志, 2006, 22(8): 564-566.

[2] Nishida K, Doita M, Takada T, *et al*. Sustained transgene expression in intervertebral disc cells *in vivo* mediated by microbubble-enhanced ultrasound gene therapy[J]. Spine, 2006, 31(13): 1415-1419.

[3] Taniyama Y, Tachibana K, Hiraoka K, *et al*. Local delivery of plasmid DNA into rat carotid artery using ultrasound[J]. Circulation, 2002, 105(10): 1233-1239.

[4] 唐 艳, 熊正爱, 李 攀, 等. 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[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(23): 2323-2326.

[5] 王 琨, 许彦枝, 朱曚曚. 人牙周膜细胞和牙龈成纤维细胞生物学活性的研究[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2008, 18(6): 304-307.

[6] Carnes D L, Maeder C L, Graves D T. Cells with osteoblastic phenotypes can be explanted from human gingiva and periodontal ligament[J]. J Periodontol, 1997, 68(7): 701-707.

[7] Rutherford R B, Moalli M, Franceschi R T, *et al*. Bone morphogenetic protein-transduced human fibroblasts convert to osteoblasts and form bone *in vivo*[J]. Tissue Eng, 2002, 8(3): 441-452.

[8] Murphy M G, Mailhot J, Borke J, *et al*. The effects of rhBMP-2 on human osteosarcoma cells and human gingival fibroblasts *in vitro*[J]. J Oral Implantol, 2001, 27(1): 16-24.

[9] Yang Y Y, Tsai H-F, Lu S C, *et al*. Regulation of tissue inhibitors of metalloproteinase-1 gene expression by cytokines in human gingival fibroblasts[J]. J Endod, 2002, 28(12): 803-805.

[10] 王 斌, 贾新秋, 赵岐刚, 等. 超声微泡造影剂促进 GFP 质粒转染卵巢癌细胞的实验研究[J]. 现代妇产科进展, 2007, 16(10): 733-735.

[11] 李 伟, 刘 苏, 王志刚. 超声微泡介导绿色荧光蛋白基因在视网膜神经节细胞表达的实验研究[J]. 中华超声影像学杂志, 2007, 16(4): 353-356.

[12] Koch S, Pohl P, Cobet U, *et al*. Ultrasound enhancement of liposome-mediated cell transfection is caused by cavitation effects[J]. Ultrasound Med Biol, 2000, 26(5): 897-903.

(编辑 邓强庭)