文章编号:1000-5404(2011)03-0299-04

论著

心腔内超声辐照增加基因表达技术的安全性研究

袁侨英[1],黄 晶[2],司良毅[1],李兴升[2] (400038 重庆,第三军医大学西南医院老年科[1];400016 重庆,重庆医科大学附属第二医院超声影像研究所[2])

【摘要】 目的 建立一套包括经皮介入心肌内基因投递、心腔内超声辐照增强基因表达的技术体系,并探讨其安全性。**方法** 研制心腔内超声辐照导管(intracardiac ultrasound,US),经常规介入法置于活体犬左心室,并经导管中特制的微型针刺入心肌注射报告基因增强绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescence protein,EGFP)质粒;12月龄健康杂种犬12只,体质量15~20 kg,雌雄不拘,分为EGFP+US组、单纯EGFP组。在EGFP+US组,注射质粒500 μg后,心腔内超声辐照1 min(1 MHz、1 W/cm^2、60s)。单纯EGFP组仅注射质粒,继续饲养犬,测定照射前、照射过程中、照射后心肌酶谱变化,7 d后,测定心肌、肝、肾、肺脏、肌肉中EGFP mRNA及蛋白质表达,观察心肌及上述脏器的病理形态变化。**结果** 经超声导管成功实现了经皮心肌内注入EGFP质粒,心肌形态正常,心腔内超声辐照后明显增加EGFP基因在心肌表达,与单纯EGFP组相比,EGFP+US组EGFP mRNA表达增加6.5倍,蛋白表达增加3.4倍($P<0.01$)。心肌无损伤、出血,辐照前后心肌酶谱没有变化($P>0.05$)。光镜下肺脏、肝脏、肾脏形态无改变,也未见EGFP表达,心肌外未见质粒沉积。**结论** 心腔内超声辐照能增强裸质粒在活体心肌组织中转染表达,未见超声辐照对心脏的毒副作用,心腔内超声辐照增强基因表达安全有效。

【关键词】 心腔内超声;导管;基因表达;安全性
【中图法分类号】 R322.11;R394-33;R454.3 **【文献标志码】** A

Intracardiac ultrasound irradiation increases gene expression: A study of its safety

Yuan Qiaoying[1], Huang Jing[2], Si Liangyi[1], LI Xingsheng[2] ([1]Department of Geriatrics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China; [2]Institute of Ultrasound Imaging, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

【Abstract】 **Objective** To establish the safety of a novel ultrasound catheter system that can increase gene expression by delivering transendocardial and intracardiac ultrasound irradiation. **Methods** An intracardiac ultrasound (US) irradiation catheter was placed in the left ventricle of living dogs. Enhanced green fluorescence protein plasmids (EGFP) were injected into myocardium through a special miniature needle in the catheter. Twelve health hybrid dogs at the age of 12 months, weighing 15 – 20 kg, were divided into EGFP + US group and EGFP group. Dogs in EGFP + US group were injected with 500 μg EGFP and then underwent intracardiac US irradiation for 1 min (1 MHz, 1 W/cm^2). Dogs in EGFP group were injected with the same amount of EGFP. CK secretion was measured before, during and after irradiation. mRNA and protein expressions of EGFP in myocardium, liver, kidney and lung were detected on day 7 after irradiation to observe changes in their pathological morphology. **Results** EGFP were successfully injected into myocardium though an intracardiac US irradiation catheter. The mRNA and protein expression levels of EGFP were 6.5-fold and 3.4-fold higher in EGFP + US group than in EGFP group after irradiation ($P<0.01$). No injury, hemorrhage, and CK secretion were observed in myocardium after irradiation. No change occurred in morphology of myocardium, liver, kidney and lung. No expression and deposition of EGFP were detected out of myocardium. **Conclusion** Intracardiac US irradiation is a safe and effective procedure for increasing the expression of naked EGFP in myocardial tissue of living dogs with no toxic and side effects.

【Key words】 intracardiac ultrasound irradiation; catheter; gene expression; safety

Corresponding author: Si Liangyi, E-mail address: siliangyi66@163.com

【通信作者】 司良毅,E-mail:siliangyi66@163.com

利用超声特有的生物效应促进基因转染表达已在基因治疗领域广泛应用[1-3]，但目前都是利用体外超声的辐照效应，对心腔内超声的辐照的治疗效应研究较少[4-5]。为此，我们研制了多功能超声导管，同时具有心肌内注射、心腔内超声辐照的功能。旨在利用介入技术，为心血管的基因治疗建立有效的基因导入、高效治疗一体化技术平台。而心腔内超声近距离辐照心肌组织，无声窗影响，有利于控制超声参数和能量范围，既实现超声增加目的基因在体内高效、稳定、可调控的表达，又避免了不适当的超声能量对人体的损害。因此，通过开展心腔内超声辐照犬心肌的动物实验，对其有效性、安全性进行全面评价十分重要。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

超声设备：心腔内超声辐照导管由重庆医科大学与中国电子科技集团公司二十六研究所共同研制：辐照导管为临床用介入心导管改制而成，顶端设置有微型超声辐照换能器，超声工作频率为4.3 MHz，经重庆市计量研究所测定声强为1 W/cm^2。以毛细钢管拉丝法研制成注射基因的柔韧微型针，外径0.3 mm，内径0.16 mm，微型针在导管内穿过并可随外导管弯曲。

其他试剂：RNA 抽提试剂盒购于上海华舜生物工程有限公司，RNA PCR Kit 及质粒抽提试剂盒均购于日本 TaKaRa 公司。EGFP 质粒由重庆医科大学儿童医院儿科研究所左云龙博士惠赠。

1.2 动物分组及实验方法

由重庆医科大学实验动物中心提供的健康杂种犬12只，体质量15~20 kg，雌雄不拘，随机数字法分为2组（$n=6$）：单纯 EGFP 裸质粒注射组（Enhanced Green Fluorecence Protein，EGFP 组）、EGFP + 超声辐照组（EGFP + US 组）。3% 的戊巴比妥钠（30 mg/ kg）腹腔麻醉犬，在 X 线引导下将介入超声导管经股动脉插管置入左心室腔，注射肝素 1×10^3 U，获取心肌 B 型二维超声图像，并在实时超声成像指导下，经导管尾部特制微型针刺入心肌 6 mm，2 组经微型针刺入心肌分 5 点注入 EGFP 质粒共 500 μg，每点 100 μg，EGFP 组仅注射 EGFP 质粒不行超声辐照，EGFP + US 组在注射 EGFP 质粒后即刻行超声辐照1 W/cm^2、1 min。术后取出超声导管，局部用强力胶布压迫继续饲养犬，1 周后留取动物心脏分析。

1.3 EGFP 质粒培养及抽提

转化 EGFP 质粒到预先制备的化学感受态 TG1 中，涂布在含有 100 g/ml 卡那霉素的 LB 平板上，将平板于 37 ℃倒置培养过夜，从平板上挑选单个独立菌落，加入 3 ml LB 液体培养基中，37 ℃振摇培养过夜，再倒入 500 ml LB 液体培养基中，37 ℃振摇培养过夜，收集菌液按照试剂盒说明书抽提质粒，纯化后电泳鉴定。

1.4 心肌形态学观察

解剖心脏大体观察有无心肌撕裂、穿孔、血肿，HE 染色、电镜观察心肌病理形态及微细结构的改变。

1.5 心肌组织总 RNA 提取和 mRNA 分离测定

按 RNA 抽提试剂盒操作步骤抽提 RNA，紫外分光法确定总 RNA 量和纯度，琼脂糖凝胶法鉴定 RNA 完整性。按照 PolyATtract mRNA Isolation System 分离纯化 mRNA。用上述相同方法提取纯化肝脏、肾脏、肺组织 mRNA。

1.6 心肌 EGFP 基因表达的检测

采用 RT-PCR 方法。每份样品取等量 mRNA，逆转录合成 cDNA，然后按照分子克隆进行 PCR 扩增目的片段。反应总体积 30 μl，含 cDNA 200 ng，引物各 15 pmol，*Taq*DNA 聚合酶 2 U，10 × Buffer 3 μl，$MgCl_2$ 2 μl。扩增条件：预变性 94 ℃ 2 min；94 ℃ 30 s，55 ℃ 30 s，72 ℃ 2 min 共 35 个循环；最后 72 ℃延伸 5 min，产物长度为 401 bp。阴性对照不加目的 cDNA，其他反应条件一致。内参 β - actin 扩增条件相同，产物长度为 540 bp。PCR 在 PE-480 型热循环仪上完成。反应结束后取 PCR 产物5 μl 进行 2% 琼脂糖凝胶分离，并用 Gel Doc 2000 凝胶图像分析仪扫描，PCR 产物量以吸光度值 × 面积表示，目的片段与β-actin 吸光度比值（A）作为目的片段 mRNA 的相对含量。

1.7 心肌 EGFP 蛋白表达的检测

注射质粒部位心肌、注射周围心肌、右心室心肌 4 μm 厚的新鲜组织冰冻切片，以荧光显微镜检测报告基因绿色荧光蛋白质粒在心肌表达后荧光强度。每张切片任选 10 个视野进行面密度值统计分析，计算平均值，注射处心肌、右心肌、肝脏、肾脏、肺组织 8 μm 厚的新鲜组织冰冻切片，每张切片任选 10 个视野进行面密度值统计分析，计算平均值。

1.8 心肌酶谱结果

用日本 Hitachi 7170A 自动生化仪检测各组犬实验前、辐照过程中、试验结束后血液中的心肌酶谱变化。

1.9 心肌外组织病理学、EGFP 表达的检测

肝脏、肾脏、肺行 HE 染色，光镜下观察病理表现，采用 RT-PCR 方法分别检测肝脏、肾脏、肺组织 EGFP mRNA 表达，激光共聚焦显微镜观察上述脏器组织冰冻切片的荧光表达。

1.10 统计学处理

数值采用 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用 SAS 6.12 统计软件分析，两组间行 t 检验，多组间用方差分析作 q 检验。

2 结果

2.1 超声导管辐照安全性分析

所有动物均成活到实验结束，没有动物死亡，研制的超声导管经常规介入法顺利进入犬左心室腔，向心肌内注射基因、在心腔内发射超声辐照心肌的实验过程中犬生命体征平稳，无室性心律失常、心跳骤停等严重并发症；但超声导管内的微型注射针进入心肌内注射时，可发现室性早搏。超声频率为4.3 MHz，稳定无漂移，超声能量均匀环周发散，因探头置于心腔血液内，血循环很快将换能器的产热均匀分散，均匀辐照心肌。

2.2 心肌病理形态观察结果

肉眼观察大体组织效应：辐照后即刻处死动物发现心肌颜色、结构、形态无异常变化，无心肌烧灼损伤、穿孔、心壁内未见附壁血栓。HE 染色后光镜显示：2 组犬心肌组织均正常，无心肌细胞坏死及间质性纤维化，EGFP + US 组心肌组织轻微充血，但心肌纤维结构清楚，心肌细胞排列整齐，注射点周围心肌间质内有少量淋巴细胞浸润。

2.3 心肌超微结构观察结果

心腔内超声辐照后 EGFP + US 组犬心肌轻微充血，少量红

细胞溢出；透射电镜提示心肌细胞及线粒体膜的通透性增加，心肌细胞质内可见小空泡形成；线粒体变大变圆，无线粒体明显破坏，溶酶体存在；未见髓鞘板层样结构破坏、融合或撕裂，无溶酶体消失、轴突断裂等表现，EGFP组心肌超微结构完全正常。

2.4 心肌酶谱变化

从表1中可以看出，检测各组犬实验前、辐照过程中、试验结束、辐照后7 d心肌酶谱，发现2组犬自身前后比较无统计学差异。

表1 各组犬辐照前后不同时间点心肌酶谱比较（U/L，$n=4$）

组别	辐照前	辐照中	辐照结束	辐照后7 d
EGFP+超声辐照组	274±60	281±61	284±64	277±59
单纯EGFP裸质粒注射组	268±57	270±55	276±61	263±57

2.5 超声辐照增对EGFP基因表达的影响

心腔内超声明显提高EGFP基因和蛋白质在心肌内表达，图1可见2个组均表达400 bp的EGFP条带，与单纯EGFP注射组比较，EGFP+US组EGFP mRNA表达增加约6.5倍（$P<0.01$）。

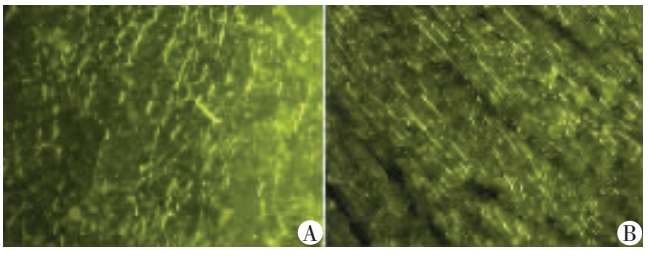


1：标准；2：阴性对照；3：EGFP+US组；4：EGFP组

图1 RT-PCR检测心腔内超声辐照心肌后EGFP mRNA的表达

2.6 超声辐照对EGFP蛋白表达的影响

心腔内超声辐照明显提高EGFP蛋白质在心肌内表达，图2可见2个组均表达绿色荧光，EGFP+US组EGFP的荧光强度明显更高，与单纯EGFP注射组比较，EGFP+US组EGFP蛋白表达增加，荧光强度增加约3.4倍（$P<0.01$）。



A：EGFP+US组；B：EGFP组

图2 激光共聚焦显微镜下观察心腔内超声辐照心肌后EGFP荧光蛋白表达（×40）

2.7 其他组织病理形态、质粒表达情况

肝脏、肾脏、肺行HE染色均无异常病理表现，采用RT-PCR方法分别检测肝脏、肾脏、肺组织未发现EGFP mRNA表达，激光共聚焦显微镜观察上述脏器的冰冻切片无荧光表达，表明质粒未在其他器官沉积。

3 讨论

建立安全有效的基因载体和导入方法是基因治疗的关键技术[6-9]。利用发展迅速的介入技术、超声辐照增加基因表达的技术[1-2,10-13]（intracardiac echocardiography），结合自身的超声导管研制经验[14]，将超声辐照换能器和心肌内微型注射针同时安装于介入导管顶端，形成同时具有心肌内注射、心腔内超声辐照的功能。研制的超声导管可进入左心室系统，并在实时超声成像引导及监测下，指导附带的微型针对心肌组织实施基因注射，之后发射声能辐照心肌，促进裸质粒转染表达，但作为一个全新的方法和技术体系，需要对其安全性作了全面细致的研究，使其真正达到安全、实用、可行的要求。

首先，系统本身的安全性分析：研制的多功能超声导管外观和操控性能类似于射频消融所用的可操控导管，有严格的尺寸要求，可到达大血管、左右心室腔内，符合一般介入导管的要求，其头端设置有一个超声换能器，用于心腔内发射声能，导管中有0.4 mm的孔道，顶端有侧孔，容许导引钢丝和微型注射针穿过，有匹配主机控制超声导管发射的能量。

所用的可控制微型针直径0.3 mm，注射速率高（50 μl/s），角度和长度可控制，控制微型针投送的部位和深浅。导管可转动、由辐照换能器多角度发射声能辐照心肌，使多个部位（如心脏深部、后下壁）心肌组织均可被投递基因及辐照，因无声窗影响，可减少辐照能量。克服临床实际中不同体质、病情患者（如肺气肿患者心脏图像的质量明显差）声窗条件的影响。超声能量均匀发散，因换能器浸于心腔血液内，血循环很快将换能器的产热均匀分散，安全，不会损伤心肌。检测发现，心肌经辐照后解剖大体观察、病理形态均无异常改变，心肌无出血、仅在注射针孔处见少许炎细胞浸润，其他器官无质粒分布沉积，无明显副作用，安全、稳定、高效。

基因直接以裸露DNA的形式转移有以下优点[15]：质粒可以携带较长的外源基因；不与宿主细胞染色体整合，不引起基因突变，不具有感染性和免疫原性，可重复注射；质粒构建简单，在分裂及未分裂细胞中均能表达。但致命缺点是转染效率较低。我们在试验中发现，心腔内超声辐照增加裸质粒转染表达，而所有操作在一个介入导管上完成，可减少介入次数和操作时间，提高效率。

总之，该系统充分利用超声照射产生的空化等生物物理效应增加裸质粒在活体心肌组织中转染表达，为解决基因治疗安全性、效应性、投递途径存在的问题奠定了基础，发展了安全高效的基因导入和治疗系统。

参考文献：

[1] Bekeredjian A, Grayburn P A, Shohet R V. Use of ultrasound contrast agents for gene or drug delivery in cardiovascular medicine[J]. J Am Coll Cardiol, 2005, 45(3): 329-335.

[2] Bekeredjian R, Chen S, Frenkel P A, *et al*. Ultrasound-targeted microbubble destruction can repeatedly direct highly specific plasmid ex-

pression to the heart[J]. Cirulation, 2003, 108(8): 1022-1026.
[3] Chappell J C, Song J, Klibanov A L, *et al*. Ultrasonic microbubble destruction stimulates therapeutic arteriogenesis *via* the CD18-dependent recruitment of bone marrow-derived cells[J]. Arterioscler Throm Vasc Biol, 2008, 28(6): 1117-1122.
[4] Duvshani-Eshet M, Adam D, Machluf M. The effects of albumin-coated microbubbles in DNA delivery mediated by therapeutic ultrasound [J]. J Control Release, 2006, 112(2): 156-166.
[5] Guo D P, Li X Y, Sun P, *et al*. Ultrasound-targeted microbubble destruction improves the low density lipoprotein receptor gene expression in HepG2 cells[J]. Biochem Bioph Res Commun, 2006, 343(2): 470-474.
[6] Miyake Y, Ohmori K, Yoshida J, *et al*. Granulocyte colony-stimulating factor facilitates the angiogenesis induced by ultrasonic microbubble destruction[J]. Ultrasound Med Biol, 2007, 133(11): 1796-1804.
[7] Li X, Wang Z, Ran H, *et al*. Experimental research on therapeutic angiogenesis induced by hepatocyte growth factor directed by ultrasound-targeted microbubble destruction in rats[J]. J Ultrasound Med, 2008, 27(3): 453-460.
[8] 袁侨英, 黄晶, 李学军, 等. 犬缺血心肌注射肝细胞生长因子致血管新生的效应[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(13): 1452-1455.
[9] Li T, Tachibana K, Kuroki M, *et al*. Gene transfer with echo-enhanced contrast agents: comparison between Albunex, Optison, and Levovist in mice--initial results[J]. Radiology, 2003, 229 (2): 423-428.
[10] Sasano T, Kikuchi K, McDonald A D, *et al*. Targeted high-efficiency, homogeneous myocardial gene transfer[J]. J Mol Cell Cardiol, 2007, 42(5): 954-961.
[11] Mayer C R, Geis N A, Katus H A, *et al*. Ultrasound targeted microbubble destruction for drug and gene delivery[J]. Expert Opin Drug Deliv, 2008, 5(10): 1121-1138.
[12] Olea F D, Vera-Janavel G, Cuniberti L, *et al*. Repeated, but not single, VEGF gene transfer affords protection against ischemic muscle lesions in rabbits with hindlimb ischemia[J]. Gene Ther, 2009, 16(6): 716-723.
[13] Vale P R, Losordo D W, Milliken C E, *et al*. Randomized, single-blind, placebo-controlled pilot study of catheter-based myocardial gene transfer for therapeutic angiogenesis using left ventricular electromechanical mapping in patients with chronic myocardial ischemia[J]. Circulation, 2001, 103(17): 2138-2143.
[14] 袁侨英, 黄晶, 朱正伟, 等. 导管超声辐照犬心肌组织的生物效应[J]. 重庆大学学报: 自然科学版, 2007, 30(1): 120-122, 128.
[15] Markkanen J E, Rissanen T T, Kivela A, *et al*. Growth factor-induced therapeutic angiogenesis and arteriogenesis in the heart--gene therapy[J]. Cardiovasc Res, 2005, 65(3): 656-664.

(收稿 2010-09-28 修回 2010-11-15)
(编辑 栾 嘉)

(上接298页)

2 讨论

大脑后动脉P2段动脉瘤[2]的临床特点:①常见于青年,平均年龄约38岁。②巨大动脉瘤多见,常伴有血栓形成。③颅内出血较颈内动脉系统动脉瘤少。④侧支循环丰富,患者多能耐受P2段动脉的阻断。

DSA是诊断颅内动脉瘤的金标准,可显示载瘤动脉与动脉瘤的关系。近年来,三维CT血管造影(3D-CTA)也用于颅内动脉瘤的诊断,其经济、简便、无创,可显示颅骨与动脉瘤的关系,但3D-CTA无法分清血流方向。郑超等[3]认为:3D-CTA在诊断颅内动脉瘤方面有较高的敏感度、特异度和准确性。

大脑后动脉瘤毗邻解剖结构复杂,穿支血管多,手术难度大,手术入路的选择对动脉瘤的良好显露和准确夹闭极为重要[4]。P2段脉瘤的手术入路取决于动脉瘤的大小、与载瘤动脉的关系以及动脉瘤在P2段的具体位置,包括动脉瘤所在位置的前后和高低。颞下入路是处理P2段动脉瘤的经典入路[1,4-5],其优点是操作简单,抬起颞叶后可直接处理动脉瘤,缺点是需牵拉颞叶,造成颞叶的牵拉性损伤和Labbe静脉断裂。本组2例患者均以颞下入路暴露动脉瘤,效果满意。

脑脊液引流对颞下入路很重要,宜选择麻醉后腰穿置管,最大限度减少牵拉脑组织,本组2例患者选择麻醉后腰穿置管获得满意暴露。P2段动脉瘤常位于脚间池和环池,紧邻脉络裂并被海马旁回包绕,术中应注意防止滑车神经的损伤[4]。大脑后动脉瘤因侧支吻合较好,可行瘤体切除术,一般不会出现永久性神经功能缺失。对于难以行动脉瘤颈夹闭并保证载瘤动脉通畅的情况下,阻断P2段载瘤动脉后,切除动脉瘤是可供选择的方法,可解除对脑干和脑神经的压迫。本组2例患者都行动脉瘤体切除术,术后虽有偏瘫,但经过治疗后都有好转。

术中应减少血管的牵拉刺激,若临时阻断载瘤动脉,应缩短时间,勿损伤或夹闭重要穿通支,因夹闭穿通支导致的神经功能障碍常是不可逆的[6]。迟发性血管痉挛是最严重的并发症,夹闭动脉瘤后,以尼莫地平林格氏液(1 ml∶10 ml)局部灌洗术野,并以TCD观测动脉瘤、瘤颈及脑干方向穿通支,以防夹闭。术后用尼莫地平2 mg/h (即0.5 μg/kg·min)持续泵入7~14 d,后改为口服(60 mg,每天6次)持续1周,同时升高血压、扩容、稀释血液以预防迟发性脑缺血的发生。本组2例患者术后有肢体偏瘫,经扩血管、功能锻炼、高压氧治疗2周后好转。

参考文献:

[1] Zhitao J, Yibao W, Anhua W, *et al*. Microsurgical subtemporal approach to aneurysms on the P(2) segment of the posterior cerebral artery[J]. Neurol India, 2010, 58(2): 242-247.
[2] 张志文, 李安民, 闫润民, 等. 显微手术切除P2段巨大动脉瘤[J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2005, 4(1): 20-23.
[3] 郑超, 吴海涛, 周荣福, 等. 3D-CT血管造影与2D-数字血管造影对颅内动脉瘤诊断的对比分析[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(9): 937, 942.
[4] 许政, 张世明, 徐峰, 等. 显微外科手术治疗颅内后循环动脉瘤(附21例分析)[J]. 中国临床神经外科杂志, 2009, 14(6): 327-329, 336.
[5] 景治涛, 班允超, 欧绍武, 等. 颞下入路显微外科治疗大脑后动脉P2段动脉瘤[J]. 中华神经外科杂志, 2009, 25(10): 908-910.
[6] 许百男, 姜金利, 孙正辉, 等. 颅内后循环动脉瘤的手术治疗(附35例分析)[J]. 中国微侵袭神经外科杂志, 2007, 12(5): 202-204.

(收稿 2010-08-28 修回 2010-10-06)
(编辑 王 红)