基础研究 文章编号:0253-3626(2010)03-0350-04

超声微泡破碎技术促进人 MxA 基因在小鼠肝脏转染的实验研究

刘爱平[1],赵瑞秋[1],蔡丽君[1],周 方[1],冉海涛[2],任 红[3],许红梅[1]

(1.重庆医科大学儿童医院感染消化科,重庆 400012;2.重庆医科大学超声研究所,重庆 400016;3.重庆医科大学病毒性肝炎研究所,重庆 400010)

【摘 要】目的:观察静脉注射基因和微泡声学造影剂,同时经皮超声辐照肝脏的方式是否能增强外源 MxA 基因在小鼠肝脏中的定位表达,并探讨不同辐照参数对该基因表达的影响。方法:(1)不同转染方法对转染效率的影响:采用昆明小鼠 24 只,随机分为 4 组。分别为质粒转染组、微泡 + 质粒组、超声 + 质粒组和微泡 + 超声 + 质粒组。7 d 后分别取肝、心、脾、肾、肺和骨骼肌,采用间接免疫荧光法进行 MxA 蛋白的半定量检测。(2)不同辐照参数对基因表达的影响:采用昆明小鼠 20 只,随机分为 4 组。按转染不同超声辐照声强分为 0.25 W/cm² 组、0.5 W/cm² 组、0.75 W/cm² 组和 1.0 W/cm² 组。7 d 后分别取肝组织,采用间接免疫荧光法进行 MxA 蛋白的半定量检测。结果:(1)肝脏每高倍视野表达阳性细胞数在微泡 + 超声 + 质粒组最高,其次为超声 + 质粒组,再次为微泡 + 质粒组,表达最少的为质粒组;各组间两两比较,均有显著统计学差异($P<0.001$);超声 + 微泡 + 质粒组中检测发现,脾组织偶有 MxA 表达阳性细胞,其余各组仅在肝组织存在 MxA 表达。(2)肝脏每高倍视野表达阳性细胞数 0.5 W/cm² 组最高,其次为 0.75 W/cm² 组,再次为 1.0 W/cm² 组,0.25 W/cm² 组表达最少;各组间两两比较,均有显著统计学差异($P<0.001$)。结论:超声微泡破碎技术能显著增强外源 MxA 基因在小鼠肝脏中的靶向性表达;超声辐照频率不变的条件下,在一定范围内增加声强,能促进外源 MxA 基因在小鼠肝脏表达;当声强为 0.5 W/cm² 时,转染率最高;该技术生物安全性好,为肝脏疾病的基因治疗提供了一项高效、安全的转染技术。

【关键词】微泡声学造影剂;超声;基因转染;辐照参数

【中国图书分类法分类号】R454.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-03-05

Enhanced human MxA gene expression in mice liver by ultrasound and microbubble destruction technique

LIU Ai-ping, et al

(*Department of Infectious Diseases, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate whether expression of MxA gene could be enhanced by intravenous injection of gene and contrast agent with ultrasound wave irradiation in mice liver and to investigate the effects of different ultrasound parameters on gene expression. *Methods*: (1) Effect of different methods on transfection efficiency: 24 Kunming mice were randomly divided into 4 groups as plasmid group, plasmid and microbubble group, ultrasound and plasmid group, and plasmid, ultrasound and microbubble group. After 7 days, the lungs, hearts, spleens, kidneys, lungs and skeletal muscles were harvested and half quantization of MxA protein was detected with immunofluorescence technique. (2) Effects of different parameters on gene expression: 20 Kunming mice were randomly divided into 4 groups as 0.25 W/cm² group, 0.5 W/cm² group, 0.75 W/cm² group and 1.0 W/cm² group according to different ultrasound parameters. After 7 days, liver tissues were harvested for the half quantization of MxA by the same method described above. *Results*: (1) Number of liver cells with positive expression was the highest in plasmid, ultrasound and microbubble group, followed by ultrasound and plasmid group, plasmid and microbubble group, and plasmid group in order; There was significant statistical difference between either two groups ($P<0.001$). Positive expression of MxA was found in few spleen cells of plasmid, ultrasound and microbubble group while MxA positive expression cells were only found in livers of rest groups. (2) Number of liver cells with positive expression was the highest in 0.5W/cm² group, followed by 0.75 W/cm² group, 1.0 W/cm² and 0.25 W/cm² group in order; There was significant statistical difference between either two groups ($P<0.001$). *Conclusion*: Local expression of exogenous MxA gene in mice liver could be significantly enhanced by ultrasound and microbubble destruction technique. In a certain range, expression of human MxA gene in mice liver can be enhanced with increased intensity of sound. Transfection efficiency was the highest with the intensity as 0.5W/cm². The method may provide a safe and effective transfection method for genetic therapy of liver diseases.

【Key words】Ultrasound contrast agent; Ultrasound; Gene transfection; Irradiation parameter

作者介绍:刘爱平(1978-),女,硕士,研究方向:肝病研究。

通讯作者:许红梅,女,教授,E-mail:xuhongmwpx@yahoo.com。

MxA 蛋白具有广谱抗病毒活性，MxA 蛋白对布尼亚病毒、粘液病毒、副粘液病毒、乙肝病毒等都具有较强的抗病毒活性[1]。因此，MxA 基因有望成为乙肝治疗的目的基因。目前最有效的转移工具是腺病毒或腺相关病毒，均需经外周静脉导入，且在肝组织定向感染率较低。近年，有学者报道，微泡声学造影剂协同超声照射，能增强目的基因的表达。故本研究采用微泡声学造影剂，同时经皮超声辐照肝脏的方式，旨在探讨该方法转染人 MxA 基因到小鼠肝脏的转染效率、不同辐照参数对转染效率的影响及该方法的生物安全性。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

1.1.1 主要试剂 已成功构建的 MxA 真核表达质粒 pcDNA3.1-MxA[2]保存于重庆儿童医院儿研所，限制性内切酶 Not1、Xba1 购于 Takara 公司，PCR 引物由上海生物工程有限公司合成，PCR Amplification kit 和质粒大量抽提试剂盒购于天根公司，羊抗人 MxA 多抗购于 Santa 公司，荧光标记的兔抗羊二抗购于北京博奥森生物有限公司。脂质微泡造影剂由重庆医科大学超声研究所提供。

1.1.2 质粒抽提 将含有 MxA 质粒的大肠杆菌进行氨苄青霉素抗性筛选，挑选单克隆菌株扩增，参照 QIANGEN 质粒大提试剂盒说明进行质粒的抽提和纯化，经 *Not* Ⅰ、*Xba* Ⅰ双酶切鉴定和 PCR 鉴定，用紫外分光光度计定容至 1.0 mg/ml。

1.1.3 质粒与微泡混合液的配制 将 MxA 质粒溶液（质粒浓度 1.0 mg/ml）200 μl 加入 2 ml 脂质微泡造影剂（由重庆医科大学超声研究所提供，微泡浓度为 2.0×10^6 个 /ml），4℃孵育 4 h。该混合液中，微泡浓度为 2.0×10^6 个 /ml，每 0.2 ml 混合液中含 20 μg MxA 质粒。

1.1.4 超声辐照系统 为重庆医科大学超声研究所自行研制的 UGT1025 型超声基因转染仪，所发射声波为连续波，频率为 1.0 MHz，声强可调，分 0.25、0.5、0.75 和 1.0 W/cm² 几档。其技术参数经重庆市技术监督局检测。

1.1.5 试验动物 采用雄性昆明小白鼠，周龄 12 周，体重（20.0 ± 2.3）g（购于重庆医科大学动物实验中心）。

1.2 实验方法

1.2.1 不同转染方法促进 MxA 基因在小鼠肝脏表达的效率比较 采用雄性昆明小白鼠 24 只，随机分为 4 组，每组 6 只。以 3.5%水合氯醛腹腔注射麻醉，固定四肢，肝区体表脱毛。各组分别处理如下：生理盐水 + 质粒组：经尾静脉快速注射 0.2 ml 含 20 μg MxA 质粒的生理盐水溶液；质粒 + 微泡转染组：经尾静脉快速注射 0.2 ml 含 20 μg 质粒的微泡声学造影剂；超声 + 质粒转染组：经尾静脉快速注射 0.2 ml 含 20 μg 质粒的生理盐水溶液，同时采取频率为 1 MHz、声强为 0.5 W/cm² 的超声波经小白鼠体表肝区辐照 60 s，该超声探头每次发射 1 s，间断 1 s；超声 + 微泡 + 质粒转染组：经尾静脉快速注射 0.2 ml 含 20 μg 质粒的微泡声学造影剂，同时经小鼠肝区局部采用相同超声辐照 60 s。7 d 后用颈椎脱臼法处死小鼠，分别取肝、心、脾、肾、肺和骨骼肌，采用间接免疫荧光法进行 MxA 蛋白的半定量检测。随机选取 4~6 个不同视野，记录不同组织每高倍镜视野（×400）MxA 表达的阳性细胞数。

1.2.2 不同声强超声辐射破碎脂质微泡促 MxA 基因在小鼠肝脏转染效率比较 采用雄性昆明小白鼠 20 只，随机分为 4 组，每组 5 只。以 3.5%水合氯醛腹腔注射麻醉，固定四肢，肝区体表脱毛。各组分别处理如下：各组均经尾静脉快速注射 0.2 ml 含 20 μg 质粒的微泡声学造影剂，同时采取频率为 1 MHz、声强分别为 0.25 W/cm²、0.5 W/cm²、0.75 W/cm² 和 1.0 W/cm² 的超声波经小白鼠体表肝区辐照 60 s。7 d 后用颈椎脱臼法处死小鼠，分别取肝组织，采用间接免疫荧光法进行 MxA 蛋白的半定量检测。记录不同组织每高倍镜视野（×400）MxA 表达的阳性细胞数。

1.2.3 间接免疫荧光法 步骤包括标本固定、包埋、切片、脱蜡、抗原修复、封闭、加一抗（羊抗人 MxA 多抗）4℃过夜、加荧光二抗（荧光标记的兔抗羊）、封片、荧光显微镜镜检。

1.3 统计学处理

所有数据以均数 ± 标准差表示，应用 SPSS 11.0 软件包进行统计分析。多组数据间的比较采用方差分析，两两比较采用 SNK 法。$P<0.05$（双侧）为有显著性差异的标准。

2 结 果

2.1 不同转染方法促进 MxA 基因在小鼠肝脏表达的效率比较

质粒转染组肝组织偶见 MxA 表达弱阳性细胞，阳性细胞数为（0.67 ± 0.82）个 /HP。质粒 + 微泡转染组肝组织偶见 MxA 表达阳性细胞，阳性细胞数为（2.50 ± 1.05）个 /HP。质粒 + 超声转染组肝组织可见少量 MxA 表达阳性细胞，阳性细胞数为（15.17 ± 2.31）个 /HP。质粒 + 微泡 + 超声转染组肝组织可见大量 MxA 表达阳性细胞，阳性细胞数为（93.83 ± 4.45）个 /HP（见表 1，图 1）。不同转染法的转染率比较，差异有显著统计学意义（$P<0.001$）。组间两两比较，各组间差异均有显著统计学意义（$P<0.001$）。

2.2 不同声强超声破碎脂质微泡促进 MxA 基因在小鼠肝脏转染效率比较

不同声强组转染率比较，差异有显著统计学意义（$P<0.001$）。组间两两比较，各组间差异均有显著统计学意义（$P<0.001$）。其中，肝脏每高倍视野表达阳性细胞数在声强 0.5 W/cm² 组最高；其次为声强 0.75 W/cm² 组；再次为声强 1.0 W/cm² 组；表达最少为声强 0.25W/cm² 组（见表 2，图 2）。

2.3 转染的靶向性和生物安全性分析

质粒 + 微泡 + 超声转染组脾组织偶有 MxA 表达阳性细胞，其余各组的心、脾、肾、肺、骨骼肌、脑和肠组织均未见 MxA 表达。

表 1 各实验组每高倍视野 MxA 基因阳性表达细胞数平均数（×400）

组别	每高倍视野阳性细胞数	MxA 基因转染率
质粒转染组	0.67 ± 0.82	0.48%
超声 + 微泡转染组	2.50 ± 1.05	1.47%
超声 + 质粒转染组	15.17 ± 2.31	8.73%
超声 + 微泡 + 质粒组	92.83 ± 4.45	52.25%

表 2 不同声强超声破碎脂质微泡促 MxA 基因在小鼠肝脏表达阳性细胞数（×400）

组别	每高倍视野阳性细胞数	MxA 基因转染率
声强 0.25 W/cm² 组	30.00 ± 2.55	16.53%
声强 0.5 W/cm² 组	95.40 ± 3.21	49.12%
声强 0.75 W/cm² 组	65.40 ± 3.05	33.43%
声强 1.0 W/cm² 组	50.40 ± 2.07	25.65%



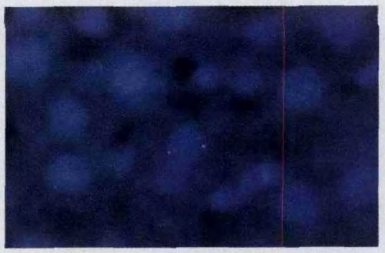
A. 单纯质粒转染组：小鼠肝组织极少见 MxA 表达阳性细胞



B. 质粒 + 微泡转染组：小鼠肝组织偶见 MxA 表达阳性细胞



C. 质粒 + 超声转染组：小鼠肝组织可见少量 MxA 表达阳性细胞

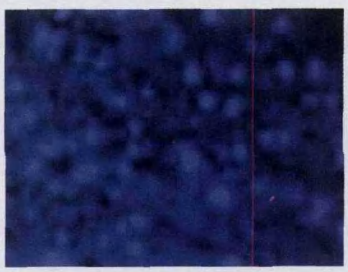


D. 质粒 + 超声 + 微泡转染组：小鼠肝组织可见大量 MxA 表达阳性细胞

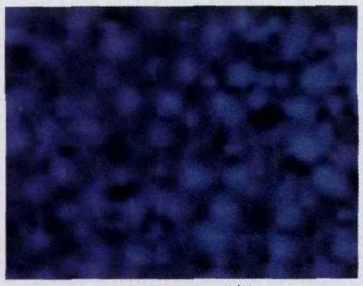
图 1 不同转染方法 MxA 基因在小鼠肝脏的表达（×400）



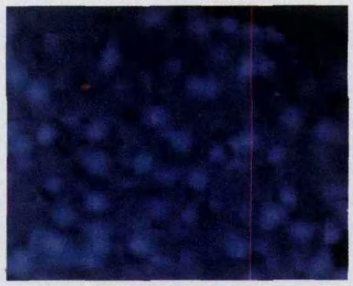
A. 0.25 W/cm² 组



B. 0.5 W/cm² 组



C. 0.75 W/cm² 组



D. 1.0 W/cm² 组

图 2 不同声强下 MxA 基因在小鼠肝脏的表达（×100）

3 讨 论

基因治疗的关键和瓶颈问题是如何提高基因治疗的高效性、安全性和靶向性。目前的载体中病毒载体转染效率高，但具有致突变性和免疫原性等潜在威胁，质粒和脂质体毒性低而转染效率低。目前的基因转染方法有直接注射法，电穿孔法等，有损伤性。近几年有报导证实超声微泡破碎技术能有效增强基因转染效率。用超声微泡进行基因治疗最早报导于 2000 年。Mark 在体外实验中发现，单纯超声照射能小幅度增强目的基因在上皮细胞和血管平滑肌细胞表达，加上微泡造影剂后，转染效率增加了 1 000 倍[3]。

本研究显示，质粒转染组偶见 MxA 表达弱阳性细胞。质粒 + 微泡转染组肝组织偶见 MxA 表达阳性细胞。超声 + 质粒转染组可见少量 MxA 表达阳性细胞。超声 + 微泡 + 质粒转染组肝组织可见大量 MxA 表达阳性细胞。

该研究结果提示，应用外源人 MxA 基因能在昆明小白鼠体内成功表达 MxA 蛋白。各种转染方法相比，质粒转染组效率最低。其原因可能与 2 个因素有关：(1)质粒转染法的靶向性差，经静脉注射的质粒，能达到靶器官的量少；(2)质粒载体不稳定，容易被体内的核酸酶破坏。质粒 + 微泡转染组转染率高于质粒组，说明微泡造影剂能促进转染。这与国外学者的实验结果一致，但具体机制尚不清楚。超声 + 质粒组转染率高于前两组，证明超声对基因转染有促进作用。该结果与 Mark 的结果一致。Mark 在体外实验中发现，单纯超声照射能小幅度增强目的基因在上皮细胞和血管平滑肌细胞转染[3]。Unger 的实验也报道超声本身也能上调外源基因的表达[4]。其可能的机制为：超声辐照的能量使靶器官的毛细血管和细胞膜通透性增加，从而增加外源基因的摄入。超声 + 微泡 + 质粒转染组能显著增强 MxA 基因在肝脏表达。也与国内外多数学者的研究结果一致。

超声和微泡促进基因转染的机制尚不十分清楚。目前大多数观点认为，超声本身有促进基因转染的作用，超声微泡可加强这一作用，而空化作用可能是其中的主要机制[5]。含有微泡的造影剂在超声作用下不断压缩和膨胀，在低声压时，微泡产生对称性压缩和膨胀，呈线性背向散射；在高声压时，微泡产生非对称性压缩和膨胀，呈非线性背向散射[6]。微泡作为空化核可以降低空化效应的阈值。超声波和微泡造影剂相互作用，其产生的空化效应和机械效应可使细胞膜通透性增加，并使直径小于 7 μm 的微血管破裂，内皮细胞间隙增宽，从而使靶基因通过破裂的微血管和内皮细胞间隙进入组织细胞内[7]。

由于超声微泡破碎技术在基因治疗中具有广阔的应用前景，国内外学者在这方面开展了大量研究。其中，超声辐照参数的选择尤为重要，如何选择最佳的超声辐照条件是许多学者致力研究的课题。尽管目前有关于治疗条件优化的报道，但因缺乏系统性，其优化参数未得到共识。国内外的大多数体外实验显示[8]，采用低频超声辐照，在一定范围内，随着机械指数的增加，转染率提高；超过一定范围，随着机械指数增加，细胞活性会下降，从而使转染效率降低。

在本试验中，我们对超声强度进行了筛选，实验结果显示，采用频率为 1 MHz、声强为 0.5 W/ cm² 时，MxA 基因在小鼠肝脏表达最高，其次为 0.75 W/ cm² 组、再次为 1.0 W/ cm² 组，转染效率最低的为 0.25 W/cm² 组。该实验结果证实，当超声辐照频率和微泡浓度不变的情况下，增加声强可以促进外源基因在小鼠肝脏表达；但超过一定范围，外源基因的表达效率随着声强的增加，反而出现下降。分析其原因可能为：超声辐照指数增强，微泡破碎产生的冲击波增强，细胞膜通透性增加，从而使微泡携带的质粒更多的进入靶细胞；但随着超声辐照指数增强，空化作用对细胞膜及周围组织毛细血管的损伤增加，靶细胞活性下降，因此目的基因表达反而降低。

基因治疗除了关注转染效率，还需要关注其安全性和靶向性。超声微泡破碎技术通过利用超声波在特定的时间和空间击碎靶组织的微泡，可以间接达到靶向治疗的效果。本实验观察到脾脏中存在 MxA 表达阳性细胞，分析原因为：由于脾脏具有大量的毛细血管，给药方式为静脉注射，且基因的用药量大，故部分 MxA 基因可能滞留于脾脏中。因此，免疫荧光检测发现脾脏偶有表达阳性细胞。

本实验采用国内首次合成的含人 MxA 的质粒载体，经试验证明能在哺乳动物表达 MxA 蛋白。MxA 蛋白具有广谱抗病毒活性，MxA 蛋白对布尼亚病毒、粘液病毒、副粘液病毒、乙肝病毒等都具有敏感的抗病毒活性[1]。MxA 基因在小鼠肝脏定位转染的成功、最佳转染参数的筛选结果，均为下一步乙肝小鼠的基因治疗奠定了基础。

本研究尚有诸多问题需要探讨，如受体细胞与目的基因的特点、DNA 与质体微泡的质量比、有无增强空化作用的的其他因素、如何将微泡与基因高效结合和如何解决超声辐射对靶组织损伤等。

参 考 文 献

[1] Hailer O, Kochs G. Interferon-induced Mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity[J]. Traffle, 2002, 3(10): 710-714.

[2] 黄 琴，赵瑞秋，刘爱平，等. 人 MxA 基因重组真核载体的构建及鉴定[J].重庆医科大学学报，2008，33(2)：152-153.

[3] Borden M A, Kruse D E, Caskey C F, et al. Influence of lipid shell physicochemical properties on ultrasound-induced microbubble destruction[J]. Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control, 2005, 52(11): 1992-2002.

[4] Unger E C, Hersh E, Vannan M, et al. Local drug and gene delivery through microbubbles[J]. Prog Cardivasc Dis, 2001, 44: 45-54.

[5] McVeigh, Elliot R. Emerging imaging techniques [J]. Am Heart Assoc, 2006, 98: 879-886.

[6] Ward A C, Dowthwaite G P, Pitsillides A A. Hyaluronan in joint cavitaion[J]. Biochem Soc Trans, 1999, 27(2): 128-135.

[7] 王志刚. 超声微泡造影剂在疾病诊断与治疗中的研究进展[J]. 中国医学影像技术，2005，21(8)：1148-1150.

[8] Chen S, Shohet R V, Bekeredjian R, et al. Optimization of ultrasound parameters for cardiac gene delivery of adenoviral or plasmid deoxyribonucleic acid by ultrasound targeted microbubble destruction [J]. Am Coll Cardiol, 2003, 42: 301-308.

(责任编辑：冉明会)