基础研究 文章编号:0253-3626(2009)06-0684-03

超声微泡介导双报告基因在椎间盘髓核中表达的研究

晏铮剑[1],邓忠良[1],罗进勇[2],赵迎泽[2],施 琼[2]

(1.重庆医科大学附属第二医院骨科,重庆 400014;2.重庆医科大学试验检验学教育部重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探索超声微泡能否介导外源性基因在椎间盘髓核中表达。方法:40 只 SD 大鼠被随机分为 4 组。第 1 组仅于髓核内注入含双报告基因的质粒;第 2 组为在第 1 组基础上加超声照射;第 3 组同时注入含双报告基因的质粒和微泡的混悬液;第 4 组为在第 3 组基础上加超声照射。每只大鼠未接受手术和照射的第 4、5 椎间盘作为对照。一周后处死大鼠取出全部椎间盘做荧光素酶检测。结果:第 4 组($96.7\times10^3\pm72.3\times10^3$)荧光素酶强度最高,与第 1 组($8.7\times10^3\pm7.2\times10^3$)、第 2 组($3.1\times10^3\pm2.4\times10^3$)、第 3 组($47.5\times10^3\pm43.3\times10^3$)比较,差异有统计学意义($P<0.01$)。结论:超声微泡介导的基因转染系统能促进外源基因在髓核中的高表达,为今后椎间盘病变的基因治疗提供了方法和依据。

【关键词】基因治疗;超声;微泡;椎间盘

【中国图书分类法分类号】R454.4 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-11-12

Transgene expression in intervertebral disc cells in vivo mediated by microbubble-enhanced ultrasound gene therapy

YAN Zheng-jian, et al

(*Department of Orthopaedics, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To evaluate the effect of ultrasound contrast agent on expression of plasmid in intervertebral disc of Sprague-Dawley rats. *Methods*: Forty adult Sprague-Dawley rats were studied. The rats were randomly divided into 4 groups. Two different reporter plasmid DNA encoding green fluorescent protein (GFP) and firefly luciferase were used. Plasmid DNA was mixed with ultrasonography contrast agent (microbubbles) and injected into coccygeal intervertebral discs of Sprague-Dawley rats. The ultrasound was irradiated on the surface of injected discs.Rats were killed 7 days after gene transduction.Harvested nucleus pulposus tissues were used to evaluate gene expression. The intact discs were used as a control. *Results*: Significant luciferase activity was observed in group 4;less in the other groups and none in the control. *Conclusion*: Ultrasound with microbubble contrast agent induced efficient gene transfer to interverbetebral disc of rats after local injection of plasmid.

【Key words】Gene therapy; Ultrasound; Microbubble; Intervertebral disc

椎间盘退变是一种临床上常见而又棘手的疾病。椎间盘退变的发展是不可逆的,一旦发生则难以逆转[1]。近年针对椎间盘疾病基因治疗的报道逐渐增多,并且将来极有可能成为治疗这一疾病最有效的手段。在以往研究中基因治疗所采用的载体多为病毒,然而病毒载体的潜在危险因素严重影响了该治疗方法的临床的应用和推广。本实验旨在探索一种新的非病毒载体—超声微泡在体内基因转染中的作用,并对相关的方法学进行初步的探讨。

作者介绍:晏铮剑(1980-),男,硕士,

研究方向:超声微泡在脊柱的运用。

通讯作者:邓忠良,男,教授,E-mail:deng7586@gmail.com。

1 材料与方法

1.1 动物准备

成年 Sprague-Dawley 大鼠 40 只,雌雄不限,8 周龄,体重 200~300 g,由重庆医科大学动物中心提供。用 3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)和地西泮(1 ml/kg)联合腹腔注射麻醉。固定四肢及尾巴,仰卧位。为使超声波能更好的进入髓核,采用手术暴露大鼠尾部第 2、3 椎间盘。

1.2 微泡制作

实验中所用的微泡为重庆医科大学超声影像学研究所自制的白蛋白氟碳声学造影剂,其浓度为 8.3×10^8 个/ml,微泡直径为(2.7 ± 0.8) μm。

1.3 试验仪器

URTG 1025 型超声基因转染仪(重庆医科大学超声影像

学研究所研制，超声能量 0.25~2.5 W/cm² 可调，频率为 1MHz），试验中的超声能量采用声强设为 2.0 W/cm²。荧光显微镜：NIKON（TE2000-U）。

1.4 质粒制备

pAdTrack-TO4-Luc 由美国芝加哥大学分子肿瘤实验室何通川教授馈赠。该质粒能同时表达绿色荧光蛋白（Green fluorescent protein，GFP）和萤火虫荧光素酶。质粒通过电转法转入大肠杆菌 DH5α，培养扩增后用 Fastifilter Endo-Free Plasmid Maxi Kit（Omega 公司）做质粒的大量抽提。

1.5 试验方法

1.5.1 动物试验方法 40 只大鼠被随机分为 4 组。第 1 组于 2、3 尾椎椎间盘的髓核内注入质粒 2 μl（1 μg/μl）；第 2 组注入相同质粒并加超声照射（2.0 W/cm² 间歇作用 60 s）；第 3 组同时注入质粒和超声微泡的混悬液；第 4 组在注入相同混悬液后加超声照射（2.0 W/cm² 间歇作用 60 s）。（图 1）每只大鼠未接受手术和照射的第 4、5 椎间盘的髓核组织作为对照。术后立即注入抗生素，缝合包扎伤口，放回笼中正常饲养。一周后处死大鼠取出第 2、3、4、5 椎间盘内的髓核组织做荧光素酶检测。

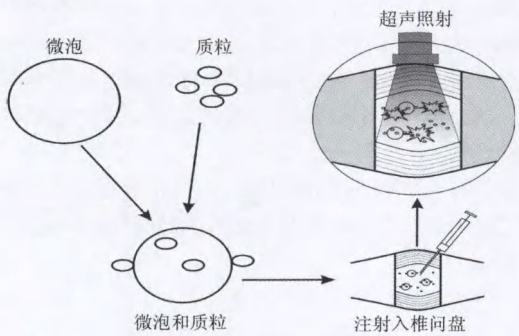


图 1 操作方法示意图

1.5.2 绿色荧光蛋白表达的观察 破坏椎间盘纤维环，取出髓核立即浸入 4%多聚甲醛，4℃过夜。用组织冰冻包埋剂（Tissue freezing medium，TFM）包埋组织块，然后做连续冰冻切片（10 μm/层），放置于载玻片上，在荧光显微镜下观察。

1.5.3 荧光素酶的定量检测 手术取出髓核浸泡于裂解缓冲液中，立即放置于液氮中冷冻储存。做荧光素酶检测时，取出放置室温下，将组织溶解产物 3 000 r/min 离心 30 min。后取上清液 20 μl 与 100 μl 荧光素酶测定试剂混合，通过发光测量计测定荧光素酶的活性。

1.6 统计分析

所有值都采用 $\bar{x} \pm s$ 来描述。实验组和对照组做 t 检验。

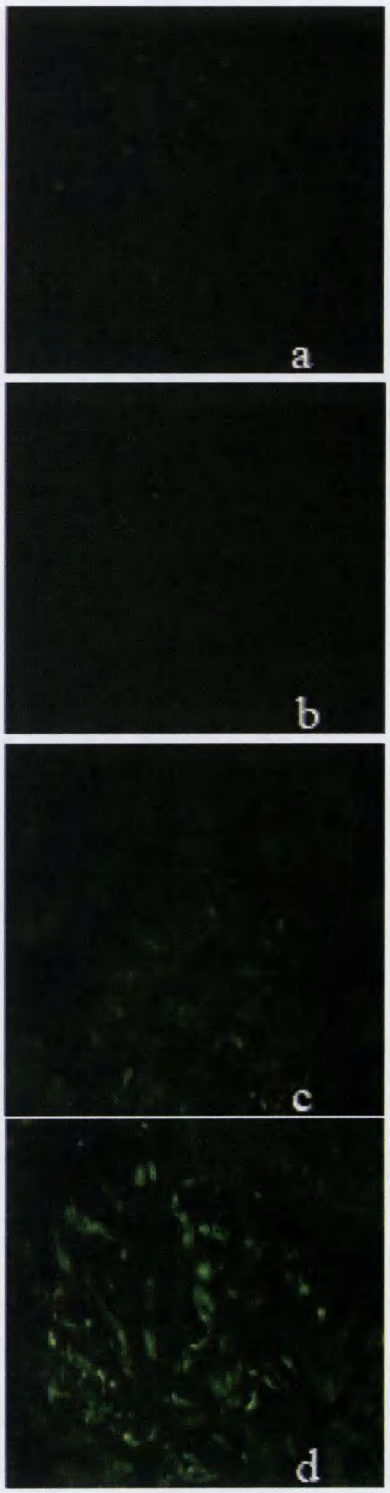
2 结 果

2.1 髓核组织中绿色荧光蛋白的表达

在注射了质粒的各组髓核组织中，我们都观察到了 GFP 阳性细胞的表达，而在对照组和外周的纤维环我们没有发现有相应的细胞（图 2）。

2.2 荧光素酶检测

荧光素酶检测显示 4 个试验组大鼠椎间盘均表现不同



a:为单纯质粒组；b:为质粒加超声照射组；c:为微泡加质粒组；d:为微泡加质粒加超声照射组

图 2 髓核组织中绿色荧光蛋白的表达

强度的荧光素酶活性表达，而对照组未检测到任何表达。第 3 组和第 4 组的荧光素酶活性明显高于其他 2 组，其值分别为单纯质粒注射组的 6 倍和 11 倍。相反单纯质粒注射同时加用超声照射组的荧光素酶活性最低，仅为单纯质粒注射组的一半。见表 1、图 3。

表 1 荧光素酶活性检测

分组	1 组	2 组	3 组	4 组	对照
	质粒	质粒 + 超声	质粒 + 微泡	质粒 + 超声 + 微泡	无
荧光素酶活性(RLU)	$8.7\times10^3\pm7.2\times10^3$	$3.1\times10^3\pm2.4\times10^3$	$47.5\times10^3\pm43.3\times10^3$	$96.7\times10^3\pm72.3\times10^3$	0

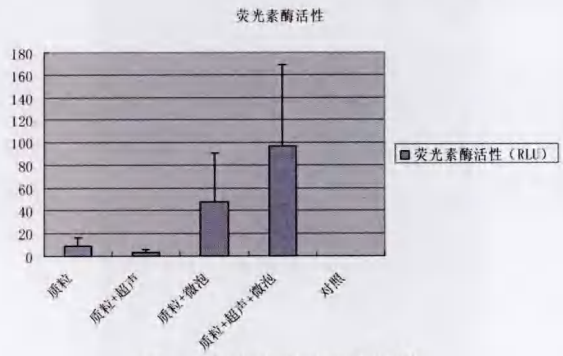


图 3 萤火虫荧光素酶活性

3 讨 论

90 年代初期，世界首例腺苷脱氨酶缺乏性重症免疫缺陷病的治疗获得了成功，同时也宣告了基因治疗在临床应用的开始。基因治疗是利用分子生物学手段将外源性目的基因转移到生物个体中，在分子水平改变细胞的功能，从而达到治疗目的[2]。目的基因转移的主要方法为载体导入法。载体可分为病毒载体和非病毒载体两大类。病毒载体转染率较高，能稳定持久的表达所携带的目的基因，但由于病毒的免疫原性、潜在致突变性和目的基因插入长度受限等问题而严重影响了其在临床的广泛应用。非病毒载体由于其安全性高、对目标基因长度无限制和易规模化制造等优点越来越受到人们的关注。但非病毒载体也存着转染率较低、靶向性差和不能持久表达等问题[3]，令其发展受限。随着技术的进步，近年来研究和开发出一种新的非病毒载体基因递送系统，即超声微泡介导的基因递送系统。超声波可聚焦于体内的特定部位，破坏携带有基因、蛋白或化学药物的微泡，从而实现靶向递送。超声微泡促进基因在组织中的转染主要是靠超声空化效应得以实现的。空化作用导致细胞膜产生暂时性外溢孔，为质粒的进入提供了通道。最开始“空化效应”这个词来源于对超声波的研究中。当微泡造影剂和超声波同时存在时，二者产生协同作用，使基因的转染效率大大提高。近年来已有用超声微泡介导外源性基因转染肝脏、心脏和肌肉等组织的报道[4,5]。体内和体外的多项试验都提示超声微泡对于外源性基因在上述组织中的表达有促进作用，同时还能减轻超声波对组织的损伤。但运用该方法研究椎间盘髓核细胞尚在起步阶段。

试验中我们使用的质粒含有两种报告基因的片段，即能在组织中表达 GFP 和萤火虫荧光素酶两种蛋白。GFP 的检测能在直观上判断转染的成败及范围。而后者则能进行定量分析。和以往其他作者在动物体内进行超声微泡介导外源性基因转染的研究相似，我们的试验也提示超声微泡能提高报告基因在髓核细胞的转染效率。

本研究结果显示在没有超声照射的情况下，超声微泡竟也能促进基因在组织中的转染，并且还拥有如此高的转染效率，其中的机制尚无相关文献报导。我们推测可能和以下原因有关[6]：超声微泡促进外源基因转染的主要生物学机制是超声波引起的空化效应。然而在自然界中除了超声波，其他类似的力量只要能促进液体中微泡破裂的，同样也能引起类似的效应。另外，椎间盘的特殊结构可能在这一过程中起到一定的作用。椎间盘中的髓核被上下终板和周围的纤维环紧密的包围着，其内部一直保持着正压。当微量注射器向椎间盘内注入质粒和微泡的混合液时，其内的压力进一步增大，而这可能就成为促进微泡破裂并产生空化效应的第二个原因。但单纯质粒加超声照射的第 2 组为何出现最低的荧光素酶表达，有待进一步研究。

椎间盘中髓核是人体内最大的无血管结构，同时也是体内最大的免疫豁免组织[7,8]。注入其内的质粒和微泡不会进入血液系统，故不能影响相邻节段的椎间盘。因此，试验中我们选用同一只大鼠未接受手术和超声波照射的尾 4、5 椎间盘作为对照，结果显示这些椎间盘中既无绿色荧光蛋白的表达，也未检测到荧光素酶活性，再次证实髓核的这种特殊生理结构。

由于时间和相关试剂的限制，本试验没有进一步研究如何优化治疗条件避免超声波对靶组织的损伤等问题，尚待进一步研究。

参 考 文 献

[1] 胡有谷. 腰椎间盘突出症[M]. 第 3 版. 北京：人民卫生出版社，2004. 9.

[2] Salypongse AN, Billiar TR, Edington H.Gene therapy and tissueengineering[J]. Hlin Plast Surg, 1999, 26:663- 676.

[3] 童荣生，徐孝麟.基因转移载体的研究进展[J]. 中国医药，2004,13(3): 33 - 36.

[4] Unger EC, Porter T, Culp W, et al.Therapeutic applications of lipid-coated microbubbles[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2004, 56(9):1297-1314.

[5] Frenkel PA, Chen S, Thai T, et al. DNA-loaded albumin microbubbles enhance ult resound-mediated t ransfection in vit ro. Ult rasound Med Biol, 2002, 28(6):817-822.

[6] QL Lu, H-D Liang , Partridge T, et al. Microbubble ultrasound improves the efficiency of gene transduction in skeletal muscle in vivo with reduced tissue damage [J]. Gene Therapy, 2003, 10(5):396-405.

[7] Tripathy SK, Black HB, Goldwasser E, et al. Immune responses to transgene-encoded proteins limit the stability of gene expression after injection of replication-defective adenovirus vectors[J]. Nat Med, 1996, (5):545-550.

[8] Yang Y, Nunes FA, Berencsi K, et al. Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(10): 4407-4411.

（责任编辑：关蕴良）