

[文章编号] 1007-3949(2003)11-01-0027-04

• 实验研究 •

## 超声介导白蛋白微泡破裂法促进增强型绿色荧光蛋白 C3 基因在中国仓鼠卵巢细胞的表达

管晓翔<sup>1</sup>, 范乐明<sup>1</sup>, 陈 琪<sup>1</sup>, 酆明芳<sup>1</sup>, 李肖蓉<sup>2</sup>, 邵力正<sup>2</sup>

(1. 南京医科大学动脉粥样硬化研究中心, 江苏省南京市 210029;

2. 无锡市第一人民医院心内科, 江苏省无锡市 214002)

[关键词] 病理生理学; 超声加白蛋白微泡介导基因转化; 分子生物学实验; 绿色荧光蛋白 C3, 增强型; 中国仓鼠; 卵巢细胞; 基因表达

[摘要] 基因治疗的研究已取得不少进展, 但要成功地应用于临床仍存在许多困难, 安全、有效的基因载体及良好的靶向性就是其中最重要的难点之一。本研究根据超声介导白蛋白微泡破裂可以增加真核细胞膜对大分子(如 DNA)通透性的原理, 探讨一种新的转基因方法, 以便安全有效和定向地转移目的基因。实验中选择绿色荧光蛋白 C3 基因为标记基因, 以白蛋白微泡为载体, 用超声介导微泡破裂的方法在体外进行中国仓鼠卵巢细胞的基因转化, 同时以脂质体为对照, 激光共聚焦显微镜和流式细胞计数仪分别定性和定量观察细胞转化效率。台盼蓝染色观察细胞的活性。体外试验发现 0.8 MHz、1.0 W/cm<sup>2</sup>、10% 脉冲周期、60 s 超声介导 10% 白蛋白微泡破裂可以有效稳定转化增强的绿色荧光蛋白 C3 基因在中国仓鼠卵巢细胞表达, 平均转化阳性率可达 56.2%, 活性实验证明对细胞无毒副作用, 提示超声介导白蛋白微泡破裂法有应用于临床基因治疗的广阔前景。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### Ultrasound Mediated Microbubble Destruction Enhances the Enhanced Green Fluorescence Protein C3 Gene Expression in Chinese Hamster Ovary Cells in Vitro

GUAN Xiao Xiang<sup>1</sup>, FAN Le-Ming<sup>1</sup>, CHEN Qi<sup>1</sup>, LI Ming-Fang<sup>1</sup>, LI Xiao-Rong<sup>2</sup>, and SHAO Li-Zhen<sup>2</sup>

(1. Atherosclerosis Research Center, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China. 2. Cardiovascular Division, Wuxi No. 1 Hospital, Wuxi 214002, China)

[KEY WORDS] Ultrasound Albumin microbubble; Gene Delivery; Green Fluorescence Protein C3; Chinese Hamster; Ovary Cell

[ABSTRACT] **Aim** To develop a novel method to effectively deliver enhanced green fluorescence protein (EGFP) C3 into Chinese hamster ovary (CHO) cells in vitro by ultrasound-mediated microbubble destruction. **Methods** Expression of the EGFP C3 gene was quantified by laser confocal microscopy and FACS analysis. Cell viability was assayed by Trypan Blue staining. **Results** Ultrasound combined with microbubbles can enhance gene transfer in cultured cells, but the effect is vary according to the ultrasound condition and concentration of microbubble. Optimal gene expression occurred with microbubble at the concentration of 10% and ultrasound parameter at 0.8 MHz, 1.0 W/cm<sup>2</sup>, 10% duty cycle, 60 s. Under this condition, the transfection rate of EGFP C3 gene with ultrasound-mediated microbubble destruction method was similar to that of transfection with lipofectamine (56.2% ± 2.6% versus 60.8% ± 4.1%,  $P > 0.05$ ) and the relative fluorescence intensity of EGFP C3 gene was as high as that of transfection with lipofectamine (2035 ± 32 versus 2140 ± 28,  $P > 0.05$ ). Furthermore both albumin microbubble and ultrasound had no effect on cell viability. The cell viability were 94.1% ± 4.6% or 93.8% ± 3.1% when cultured with 10% albumin microbubble or under ultrasound at 0.8 MHz, 1.0 W/cm<sup>2</sup>, 10% duty cycle, 60 s respectively, which were no significantly difference compared with controls. **Conclusions** These results suggest a possible new strategy for ultrasound-mediated microbubble destruction method in gene therapy.

自 1990 年首次开展临床的基因治疗以来<sup>[1]</sup>, 基

础医学和分子生物学的迅猛发展使我们对疾病的分子机制有了更多的了解, 同时也拓宽了基因治疗研究的领域。但是要将基因治疗成功地应用于临床仍存在许多困难。安全、有效的基因载体及良好的靶向性就是其中最主要的难点之一<sup>[2]</sup>。目前常用的基因转移体系都存在一些问题, 因此, 无毒副作用又具有靶向性的基因载体已成为基因治疗研究中的一个新的目标。最近研究发现白蛋白微泡可以作为

[收稿日期] 2002-09-29 [修回日期] 2003-01-19

[基金项目] 江苏省自然科学基金(BK2002028)资助。

[作者简介] 管晓翔, 男, 1972 年出生, 江苏省南通市人, 医学博士, 主要从事动脉硬化发生的分子机制的研究。范乐明, 男, 1940 年出生, 教授, 博士研究生导师, 主要从事动脉粥样硬化的病理生理学分子机制和基因治疗方面的研究, E-mail: lmfan@njmu.edu.cn。陈琪, 男, 1958 年出生, 奥地利 Graz 大学生物化学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事动脉粥样硬化发生的分子机制和信号转导方面的研究。

药物和遗传物质靶向载体<sup>[3]</sup>, 体外培养细胞试验表明白蛋白微泡在超声作用下可以增加外源基因转化率和表达水平<sup>[4,5]</sup>, 该方法有可能成为基因治疗研究中新的突破点<sup>[6]</sup>, 但相关研究在国内尚未见报道。本研究旨在探讨白蛋白微泡和超声破泡技术转化标记基因, 检测转化效率, 并探索有效表达标记基因所需表达载体剂量和超声强度及时间, 为临床开展高效、定向和无创的基因治疗提供可靠的理论根据和实践经验。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

25%人血白蛋白为德国拜尔公司产品; 脂质体 (lipofectamine) 及 DMEM/F12 细胞培养基为 GIBCO 公司产品; 质粒抽提试剂盒为 QIAGEN 公司产品; 增强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescence protein, EGFP) C3 标记质粒 EGFP-C3 为 CLONTECH 公司产品; 中国仓鼠卵巢 (Chinese hamster ovary, CHO) 细胞购于上海细胞生物研究所。

### 1.2 质粒抽提

EGFP-C3 质粒转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 卡那霉素筛选后挑选单克隆扩增, 参照 QIAGEN 抽提试剂盒说明书抽提纯化, 最后定量浓度为 1.0 g/L, 琼脂糖凝胶电泳鉴定相对分子质量为 4.7 kb。该质粒含有巨细胞病毒 (cytomegalovirus, CMV) 启动子调控的编码绿色荧光蛋白 cDNA 序列, 其表达产物可以在活细胞直接检测。

### 1.3 白蛋白微泡的制备和鉴定

采用文献[7]介绍的含微气泡液体的超声造影剂——声振葡萄糖白蛋白溶液。它是将含有 5% 人血白蛋白溶液用超声振动仪声振 20 s 并静置数分钟后生成。显微镜下观察微泡浓度须大于  $1.5 \times 10^{11}/L$ , 微泡直径须介于 2~4  $\mu m$ , 体外半衰期为 120 min。已定量的待转化 EGFP-C3 质粒加入制备好的白蛋白微泡中, 轻轻混匀, 4℃放置 2 h, 分层后, 吸取微泡—质粒混合物转化细胞。

### 1.4 细胞培养及转化

中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞用含 10% 小牛血清 (FCS) DMEM/F12 培养基, 在 37℃、4% CO<sub>2</sub> 条件下培养。转化前 24 h, 以 0.125% 胰酶消化细胞,  $5 \times 10^5$  每孔浓度接种 6 孔板。试验分裸质粒组、脂质体组、白蛋白微泡或超声单独作用转化组、超声介导白蛋白微泡转化五组, 对用超声介导者又按不同功率和作用时间分成不同级别的小组。细胞长至约 60%

~70% 汇合度时转化: 弃去旧培养基, 每孔加 2 mL 完全培养基, 定量加入已制备的白蛋白微泡/质粒混合物 200  $\mu L$  (每孔含质粒 5  $\mu g$ ), 按实验设计要求在超声下破泡, 转化细胞在标准条件下培养 3 h 后给予更换新鲜培养基。脂质体转化参照说明书, 将 5  $\mu g$  质粒 DNA 和 10  $\mu L$  脂质体分别加入 100  $\mu L$  无 FCS 的 DMEM/F12 培养基中, 再将以上两种液体轻轻混匀, 室温静置 20 min, 摇匀后, 滴加至 6 孔板的每 1 孔, 然后补加 800  $\mu L$  的无 FCS 的 DMEM/F12 培养基, 标准条件下培养 4~6 h 后更换新鲜培养基。转化 48 h 后分析 EGFP-C3 基因的表达。

### 1.5 激光共聚焦显微镜定性观察细胞效率

转化细胞以  $1 \times 10^5$  的密度种于 6 孔板, 转化 48 h 后在激光共聚焦显微镜 (Axiovert, Zeiss) 下, 选择 488 nm 波长的激发光观察 EGFP-C3 的表达。

### 1.6 流式细胞计数仪定量分析转化基因的表达

细胞转化 48 h 后, 用 0.125% 胰酶消化离心收集, PBS 洗三次, 再用 PBS 重悬细胞, 细胞浓度约  $5 \times 10^8/L$ , 立即应用流式细胞计数仪 (FACS, Becton Dickinson) 获取  $1 \times 10^4$  个细胞, 定量分析 EGFP-C3 基因在 CHO 表达。

### 1.7 台盼蓝染色实验

为鉴定白蛋白微泡和超声对细胞活性的影响, 根据文献采用台盼蓝染色实验<sup>[8]</sup>, 按实验设计取不同终浓度的白蛋白微泡和不同的超声参数作用于细胞, 3 h 后给予换液, 48 h 后在显微镜下计数蓝染 (死) 和拒染 (活) 细胞, 拒染细胞的百分数代表细胞的活力。

### 1.8 统计学方法

每组实验均重复三次, 实验结果采用 SPSS10.0 统计软件进行处理,  $P < 0.05$  表示有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 白蛋白微泡破裂法最佳转化效率的参数选择

不同试验组细胞转化 48 h 后, 通过流式细胞计数仪比较不同超声参数对细胞转化效率的影响发现: 裸质粒组、白蛋白和超声单独作用转化组细胞均未有明显的绿色荧光蛋白表达, 而超声介导白蛋白微泡转化组细胞转化效率明显提高, 其中 10% 白蛋白微泡浓度和 0.8 MHz、1.0 W/cm<sup>2</sup>、10% 脉冲周期的超声强度下 EGFP-C3 基因在 CHO 细胞转化效率最高, 该组与其它任何转化组比较均有显著性差异, 应用流式细胞计数仪显示最高转化阳性率达到 56.2% (图 1A, Figure 1A)。为进一步阐明同一超声参

数条件下, 超声作用时间对细胞转化效率的影响, 我们选择 0.8 MHz、1.0 W/cm<sup>2</sup>、10% 脉冲周期超声条件, 应用流式细胞计数仪比较 30 s、60 s 和 90 s 作用时间下细胞转化效率, 结果发现 EGFP-C3 基因表达的相对荧光强度分别为 562、2177、1106 (各组之间

比较  $P < 0.05$ , 图 1B, Figure 1B)。这就提示我们不同的超声条件对于外源基因表达效率有很大影响, 本实验条件下以 0.8 MHz、1.0 W/cm<sup>2</sup>、10% 脉冲周期超声作用 60 s 转化效率为最佳。

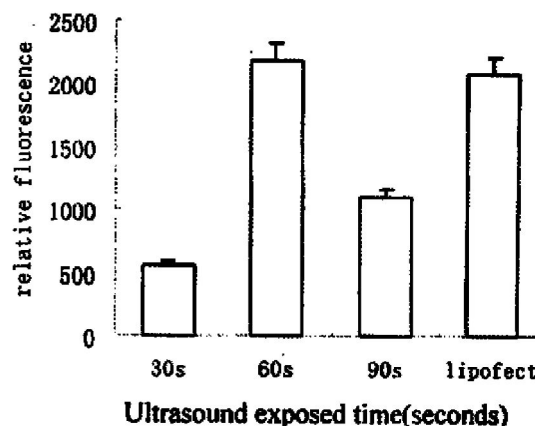
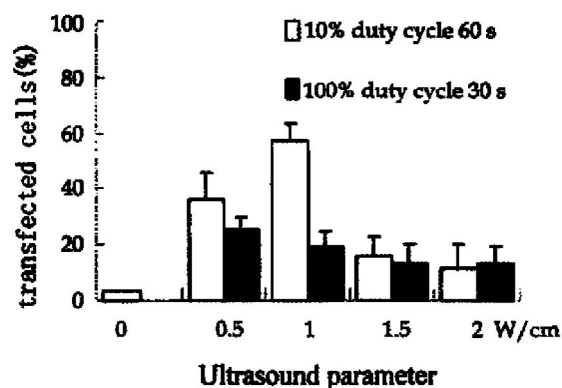


图 1. 流式细胞计数仪比较不同的超声强度(A) 和不同的超声作用时间(B) 对细胞转化效率的影响

Figure 1. Determination of EGFP-C3 gene expression by using FACS under different ultrasound parameters(A) and exposed time (B)

## 2.2 细胞转化阳性率和增强型绿色荧光蛋白 C3 基因表达水平的分析

选择以上最佳超声参数, 即 10% 白蛋白微泡在 0.8 MHz、1.0 W/cm<sup>2</sup>、10% 脉冲周期和 60 s 的超声条件下转化细胞, 应用激光共聚焦显微镜比较发现, 每个视野能表达绿色荧光的细胞的阳性率与脂质体转化法相似(图 2, Figure 2)。由于基因表达效率不仅与能表达绿色荧光的细胞阳性率有关, 而且与每个细胞转化外源基因的拷贝数(即荧光强度)有关, 而共聚焦显微镜只能对细胞表达荧光进行定性分析, 对于每个细胞的荧光强度却无法区分, 所以我们应用流式细胞计数仪定量分析 EGFP-C3 在转化细胞的表达水平。0.8 MHz、1.0 W/cm<sup>2</sup>、10% 脉冲周期和 60 s 的超声条件介导 10% 白蛋白微泡破裂法与脂质体法的转化效率比较, EGFP-C3 在 CHO 细胞平均转化阳性率分别为 56.2% ± 2.6% 和 60.8% ± 4.1% ( $P > 0.05$ ), 表达水平(即平均相对荧光强度)分别为 2035 ± 32 和 2140 ± 28 ( $P > 0.05$ )。

## 2.3 细胞活力测定

外源性白蛋白微泡和超声对于细胞活力的影响是该技术应用于临床前首先要考虑的问题之一。本研究应用的低频脉冲超声, 与临床诊断用超声能量相同, 台盼蓝染色实验表明: 10% 白蛋白微泡及 0.8 MHz、1.0 W/cm<sup>2</sup>、10% 脉冲周期作用 60 s 对于 CHO 细胞活力无明显的影响(表 1 和表 2, Table 1 and Tar-

ble 2)。

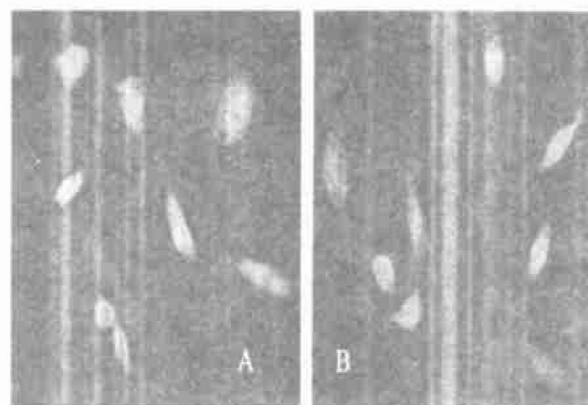


图 2. 激光共聚焦显微镜分析增强型绿色荧光蛋白 C3 在中国仓鼠卵巢巢细胞的表达 A 代表 0.8 MHz、1.0 W/cm<sup>2</sup>、10% 脉冲周期和 60 s 超声和 10% 白蛋白浓度介导的转化; B 代表脂质体法转化。

Figure 2. Analysis of the EGFP-C3 gene expression in CHO cells by using laser confocal microscopy A: Ultrasound-mediated microbubble destruction method, the ultrasound parameter of 0.8 MHz, 1.0 W/cm<sup>2</sup>、10% duty cycle 60 s, B: Lipofectamine method.

## 3 讨论

白蛋白微泡最初是作为一种心室的超声造影剂, 因其声阻不同于体液及周围组织故可在超声作用下显影。新近研究表明它可以将多聚体微球导入鼠骨骼肌<sup>[9]</sup>, 或把寡核苷酸导入狗的肾脏<sup>[10]</sup>。其可

表 1. 台盼蓝染色实验鉴定白蛋白微泡对细胞活性的影响  
Table 1. Trypan blue staining identification of cell viability of CHO cells treated with albumin microbubble ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

白蛋白浓度	细胞活性
对照	94.5% $\pm$ 3.1%
10%	94.1% $\pm$ 4.6%
20%	34.2% $\pm$ 5.0% <sup>a</sup>
30%	24.6% $\pm$ 2.0% <sup>a</sup>

a:  $P < 0.05$ , 与对照组比较。

表 2. 台盼蓝染色实验鉴定多普勒超声对细胞活性的影响  
Table 2. Trypan blue staining identification of cell viability of CHO cells treated with ultrasound ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

超声强度 (W/cm <sup>2</sup> )	细胞活性	
	10% 脉冲周期	100% 脉冲周期
对照	96.1% $\pm$ 2.4%	
0.5	92.8% $\pm$ 1.9%	91.7% $\pm$ 2.1%
1.0	93.8% $\pm$ 3.1%	88.7% $\pm$ 2.1%
1.5	92.6% $\pm$ 0.7%	78.3% $\pm$ 8.4% <sup>a</sup>
2.0	78.8% $\pm$ 4.3% <sup>a</sup>	57.2% $\pm$ 5.6% <sup>b</sup>

a:  $P < 0.05$ , b:  $P < 0.01$ , 与对照组比较。

能的机理尚未完全阐明,有推测超声所致微泡破裂产生的震荡可促进 DNA 分子穿透内皮细胞的细胞膜;同时向细胞内传送的震荡波可促进 DNA 从内吞泡逸出并进入细胞核<sup>[8]</sup>。这些研究结果提示,超声-白蛋白微泡主要是通过物理作用大大提高对血管细胞的转导效率。因此,超声参数是细胞转化效率的重要条件,优化超声参数才有可能提高转化效率和应用于临床基因治疗。本实验发现在 10% 白蛋白微泡浓度,超声 0.8 MHz、1.0 W/cm<sup>2</sup>、10% 脉冲周期和 60 s 条件下,EGFPC3 在 CHO 的表达效率最高,多次不同的实验获得相似的结果。由于本实验所使用的超声能量与临床诊断所用水平相近,又经台盼蓝实验证实 0.8 MHz、1.0 W/cm<sup>2</sup>、10% 脉冲周期和 60 s 以及 10% 白蛋白微泡对 CHO 细胞活力无明显影响。因而可以认为本实验建立的超声介导白蛋白微泡破裂法可以安全、有效和稳定转化外源基因在真核细胞表达,该结论与国外许多学者的研究一致<sup>[4,5,11]</sup>。

除了安全、有效以外,载体的靶向性也是临床进行基因治疗所必须要考虑的问题。超声可聚焦于体内几乎所有部位相对小的区域,可令已进入血液循环的白蛋白微泡在指定部位“爆破”释放所携带基

因,由微泡爆裂产生的震荡可增加真核细胞的通透性,有利于 DNA 分子穿透<sup>[12]</sup>,超声的能量以及微泡破裂时向细胞内传送的震荡波还可促进 DNA 从细胞的内吞泡逸出并进入细胞核,大大提高基因转导和表达的效率;有报道超声本身也能上调外源基因的表达<sup>[3]</sup>,因此本法使定向性基因转移成为可能。在动物实验中,Shohet 等<sup>[13]</sup>将含报告基因半乳糖苷酶基因的重组腺病毒载体(AdCMV- $\beta$ -Gal)注入大鼠静脉,并在心脏部位施以超声,结果  $\beta$ -Gal 在心肌获得高效表达,其效率比单用腺病毒载体的对照组高 10 倍,首次证明超声/白蛋白微泡技术能高效地将外源基因送达体内特定部位。目前正在研究运用该方法将治疗用目的基因定向诱导至心肌细胞表达,为加快超声介导的微泡破裂基因转移法在临床的应用提供更多更快的理论基础和实践技术。

#### [参考文献]

- [1] Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, Fleisher T, Clerici M, et al. T-lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: Initial trial results after 4 years. *Science*, 1995, **270**: 475-480
- [2] Verna IM, Somina N. Gene therapy: promises, problems and prospects. *Nature*, 1997, **389**: 239-242
- [3] Unger EC, Hersh E, Vannan M, Matsunaga TO, McCreery T. Local drug and gene delivery through microbubbles. *Prog Cardiovasc Dis*, 2001, **44** (1): 45-54
- [4] Lawrie A, Briskin AF, Francis SE, Taylor DI, Chamberlain J, Crossman DC, et al. Ultrasound enhances reporter gene expression after transfection of vascular cells in vitro. *Circulation*, 1999, **99**: 2 616-620
- [5] Bao S, Thrall BD, Miller DL. Transfection of a reporter plasmid into cultured cells by sonoporation in vitro. *Ultrasound Med Biol*, 1997, **23**: 953-959
- [6] Newman CM, Lawrie A, Briskin AF, Cumberland DC. Ultrasound gene therapy: on the road from concept to reality. *Echocardiography*, 2001, **18** (4): 339-347
- [7] Zhang D, Gong XF, Liu JH, Shao LZ, Li XR, Zhang QL. The experimental, investigation of ultrasound in properties for a sonicated contrast agent and it's application biomedicine. *Ultrasound Med Biol*, 2000, **26** (2): 347-351
- [8] Koch S, Pohl P, Cobet U, Rainov NG. Ultrasound enhancement of liposome-mediated cell transfection is caused by cavitation effects. *Ultrasound Med Biol*, 2000, **26** (5): 897-903
- [9] Skyba DM, Price RJ, Linka AZ, Skalak TC, Kaul S. Direct in vivo visualization of intravascular destruction of microbubbles by ultrasound and its local effects in effects on tissue. *Circulation*, 1998, **98**: 290-293
- [10] Porter TR, Iversen PL, Li S, Xie F. Interaction of diagnostic ultrasound with synthetic oligonucleotide-labeled perfluorocarbon-exposed sonicated dextrose albumin microbubbles. *J Ultrasound Med*, 1996, **15**: 577-584
- [11] Lawrie A, Briskin AF, Francis SE, Cumberland DC, Crossman DC, Newman CM. Microbubble-enhanced ultrasound for vascular gene delivery. *Gene Therapy*, 2000, **7**: 2 023-027
- [12] Gambihler S, Delius M, Ellwart JW. Permeabilization of the plasma membrane of L1210 mouse leukemia cells using lithotripter shock waves. *J Memb Biol*, 1994, **141**: 267-275
- [13] Shohet RV, Chen S, Zhou YT, Wang Z, Meidell RS, Unger RH, et al. Echocardiographic destruction of albumin microbubbles directs gene delivery to the myocardium. *Circulation*, 2000, **101**: 2 554-556

(此文编辑 胡必利)