

Enhancement of EGFP gene transfection to rat myocardium: ultrasound-targeted microbubble destruction combined with PEI

CHEN Zhi-yi, XIE Ming-xing*, WANG Xin-fang, LV Qing

(Department of Ultrasonography, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Hubei Province Key Laboratory of Molecular Imaging, Wuhan 430022, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine whether ultrasound-targeted microbubble destruction (UTMD) combined with polyethylenimine (PEI) enhances gene transfection in vivo to BALB/c mice heart. **Methods** BALB/c mice were divided into 7 groups: PBS group, naked plasmid group, plasmid plus US irradiation group (P + US), plasmid plus US irradiation and SonoVue group (P + UTMD), plasmid plus PEI group (P + PEI), plasmid plus US irradiation and PEI group (P + PEI + US), plasmid plus PEI and US irradiation and SonoVue group (P + PEI + UTMD). Plasmid DNA encoding enhanced green fluorescent protein (EGFP) which was mixed with SonoVue or PEI was injected by tail vein to BALB/c mice, and the hearts were exposed to transthoracic US. Gene expression and HE stain in myocardium were evaluated four days after treatment. In addition, gel electrophoresis analysis was performed to determine the structural integrity of plasmid DNA or PEI/DNA after US exposure. **Results** There was no damage to DNA or PEI/DNA complexes after sonication in electrophoresis gel assay. The EGFP was significantly expressed in the subendocardial layer when the heart was not exposed to US. The strongest expression was detected at the anterior wall of the left ventricle that had faced the US probe. Distributional difference of EGFP was not obvious when US combined with PEI. The fluorescence intensity and transfection efficiency were the highest in the P + PEI + UTMD group. **Conclusion** The present study shows that this method of UTMD combined with PEI can be used to deliver plasmid DNA to the myocardium selectively and effectively. This noninvasive technique is a promising method for cardiac gene therapy and could be applied in the rapidly developing gene therapy for heart diseases. **Key words** Ultrasound; Gene therapy; Myocardium; Polyethylenimine

超声靶向微泡破裂联合 PEI 增强小鼠 EGFP 基因心肌转染

陈智毅, 谢明星*, 王新房, 吕清

(华中科技大学同济医学院附属协和医院超声影像科, 湖北省分子影像重点实验室, 湖北 武汉 430022)

[**摘要**] **目的** 探讨超声靶向微泡破裂(UTMD)联合聚乙烯亚胺(PEI)增强 BALB/c 小鼠心肌绿色荧光蛋白基因(EGFP)转染的可行性和应用价值。**方法** 实验分为 7 组: PBS 组、裸质粒组、质粒 + 超声辐照组(P + US)、质粒 + SonoVue + 超声辐照组(P + UTMD)、质粒 + PEI 组(P + PEI)、质粒 + PEI + 超声辐照组(P + PEI + US)、质粒 + PEI + SonoVue + 超声辐照组(P + PEI + UTMD)。由 BALB/c 小鼠尾静脉注入 EGFP 质粒和 SonoVue 微泡或 PEI 的复合物, 处理 4 d 后检测心肌基因表达效率及 HE 染色, 并对超声辐照后的质粒完整性进行分析。**结果** 电泳显示超声辐照不会损坏 DNA 或 PEI/DNA 复合物。非超声辐照时, EGFP 只在心内膜下层表达; 而超声辐照时, 表达最强的位置为靠近探头的左室前壁; 超声联合 PEI 时, EGFP 的分布差异不明显。P + PEI + UTMD 组的转染率最高, 荧光强度最强。**结论** UTMD 联合 PEI 可高效、靶向地将质粒 DNA 输送至心肌, 这种非侵入性的技术在心脏基因治疗上很有前景, 有望应用于迅速发展的心脏病基因疗法。

[**关键词**] 超声; 基因治疗; 心肌; 聚乙烯亚胺

[**中图分类号**] R445.1; R-332 [**文献标识码**] A [**文章编号**] 1003-3289(2009)01-0025-04

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(30670548)。

[**作者简介**] 陈智毅(1975 -), 男, 广东广州人, 博士。研究方向: 超声基因转染及分子靶向。E-mail: winchen@smail.hust.edu.cn

[**通讯作者**] 谢明星, 华中科技大学同济医学院附属协和医院超声影像科, 430022。E-mail: xiexm64@126.com

[**收稿日期**] 2008-05-09 [**修回日期**] 2008-10-07

安全有效的基因传输技术可为心脏疾病提供新的治疗方法。病毒载体介导的基因转移可有效地转运基因,但其免疫原性限制了临床应用。超声靶向微泡破裂(ultrasound-targeted microbubble destruction, UTMD)是一种新型的非病毒基因转染方法^[1-3]。当超声和聚乙烯亚胺(polyethylenimine, PEI)有机结合时,在转染效率得到明显提高的同时,可实现特异的器官靶向性^[4]。研究表明^[5]:UTMD 联合 PEI 能明显增强体外心肌细胞的基因转染效率。本研究应用 UTMD 联合 PEI 的方法,观察靶向促进心肌基因转染的可行性和有效性,旨在为非侵袭性的基因传输奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器 pEGFP-C1 质粒(4.7 kb)购自 Clontech 公司,产物为增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP);质粒抽试剂盒(Giagen 公司);分支型 25 kDa PEI 购自 Sigma-Aldrich 公司;SonoVue 微泡为 Bracco 公司产品;超声仪(Accusonic, Metron 公司),探头频率为 3 MHz,探头面积为 0.8 cm²;OCT 冰冻切片包埋剂为 Sakura Finetek 公司产品;超声耦合凝胶(Aquasonic 100, Parker 公司);冷冻切片机(CM1900, Leica 公司);UV 分光光度计(DU640, Beckman 公司);FV500 激光共聚焦显微镜(Olympus 公司);Gene Genius 凝胶成像系统(Syngene 公司)。

1.2 质粒 DNA 的扩增、提取和纯化 质粒通过 DH5 α 感受态细胞(Invitrogen 公司)进行转化,按试剂盒要求抽提和纯化质粒。对获得的质粒 DNA 运用分光光度计测定其浓度(1 μ g/ μ l),在 260 nm 波长(A 260)下测定质粒 DNA 的吸光度,OD260 到 OD280 的比值在 1.7~2.0 之间,表明质粒 DNA 没有被污染,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3 SonoVue/DNA 或 SonoVue/PEI/DNA 复合物的制备 SonoVue/DNA 制备:使用 0.9% 盐水溶液配制 SonoVue 微泡悬液,通过倒置或振荡使微泡均匀分布,微泡密度为 $2 \times 10^8 \sim 5 \times 10^8$ /ml,浓度 5 mg/ml。实验前将 100 μ l SonoVue 与 100 μ l 质粒 DNA 溶液(含 30 μ g 质粒)混匀,4 $^{\circ}$ C 备用。

SonoVue/PEI/DNA 复合物的制备:PEI 稀释在双蒸水中,浓度调整为 1 mg/ml,经盐酸中和,并用 0.22 μ m 滤器(Milllex-GS, Millipore 公司)过滤、除尘。将 30 μ g 质粒 DNA 和 22.5 μ l PEI 以 N/P 比(氮/磷酸盐比)为 6^[6]混合在 47.5 μ l 无菌双蒸水中,孵育 20~30 min。实验前将 PEI/DNA 与 100 μ l SonoVue 微泡混合。

1.4 实验分组及处理方法 BALB/c 小鼠(雄性,18~22 g,6~8 周)购自湖北省实验动物研究中心[合格号 SCXK(鄂)2003-0005]。严格按照实验动物管理条例饲养于 SPF 级环境中。实验动物分 7 组,每组 5 只:①PBS 组,注入 200 μ l PBS;②裸质粒组(P),注入 200 μ l 质粒溶液(含 30 μ g 质粒);③质粒+超声辐照组(P+US),注入质粒溶液后予以超声辐照;④质粒+SonoVue+超声辐照组(P+UTMD),注入 SonoVue/DNA 后予以超声辐照;⑤质粒+PEI 组(P+PEI),注入 PEI/DNA 复合物;⑥质粒+PEI+超声辐照组(P+PEI+US),注入 PEI/DNA 复合物后予以超声辐照;⑦质粒+PEI+SonoVue+超声辐照组(P+PEI+UTMD),注入 SonoVue/PEI/DNA 复

合物后予以超声辐照。

提高温度使血管扩张,行尾静脉注射。注射后行超声辐照。通过吸入乙醚麻醉 BALB/c 小鼠,固定在平板上,超声探头涂布耦合凝胶后,经鼠左侧胸壁辐照心肌,辐照条件为 1.0 W/cm²、20% 占空比,辐照 120 s。

1.5 超声及 PEI 对质粒 DNA 完整性的影响 为分析 EGFP 表达的减少是否由于超声或 PEI 的应用而使质粒发生降解所致,取 100 μ l 质粒或 PEI/DNA 复合物,交叉置于 96 培养板中(图 1),并暴露于上述超声辐照条件中,改变辐照时间(0~300 s)。辐照后立即行凝胶电泳分析,取 10 μ l 样品置于 0.8% 琼脂糖凝胶中,80 V 电泳 40 min,观察、拍照。超声辐照 PEI/DNA 后,将凝胶浸于 PEI 染液(0.1% 考马斯蓝、50% 甲醇、10% 冰醋酸)中 4 h,经 10% 甲醇和 10% 冰醋酸脱色 4 h,使复合物显影。

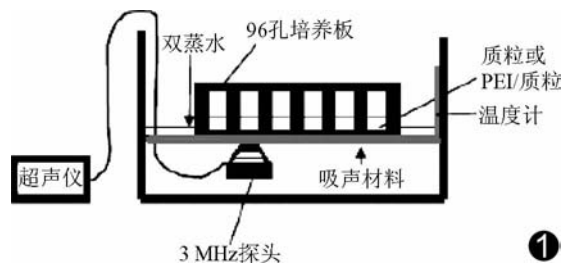


图 1 超声辐照装置示意图(PEI:多聚乙烯亚胺;质粒:EGFP)

1.6 荧光显微镜观察及 HE 染色 于第 4 d 处死小鼠^[1],取出心脏,OCT 包埋,立即作冰冻切片,将样品以 10 μ m 厚度连续切片,在激发波长 488 nm 处观察 EGFP 表达并摄片。对切片进行编号以实现盲法观察,重点观察荧光细胞数目、分布以及组织结构情况,运用 Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics 公司)专业图像分析软件行定量分析。常规进行 HE 染色及摄片。

1.7 统计分析 应用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析,组间两两比较采用 Tukey 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 琼脂糖凝胶电泳分析 样本经 30~300 s 的超声辐照后,未见质粒破坏所产生的 DNA 碎片;当辐照时间大于 180 s 时,仅有少量松弛的质粒 DNA,但仍以超螺旋形式为主(图 2A)。带负电荷的质粒 DNA(即对照)移行到电场的正极,而向负极移动的条纹表明带正电荷的 PEI/DNA 复合物仍是完整,超声辐照并没有损伤 PEI/DNA 复合物及 DNA 质粒,说明 PEI 对质粒有保护作用(图 2B)。

2.2 UTMD 联合 PEI 对心肌 EGFP 基因转染的影响 单独

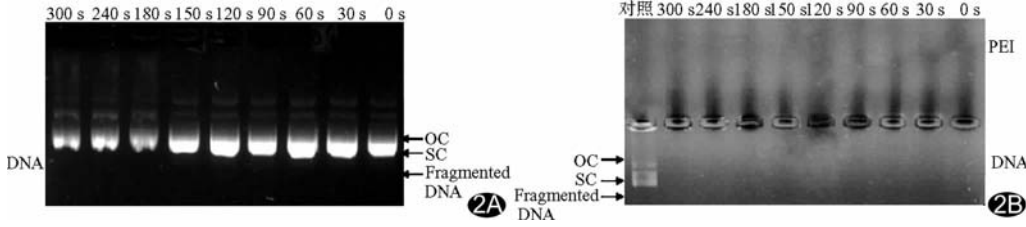


图 2 质粒或 PEI/DNA 复合物超声辐照后琼脂糖凝胶电泳分析 A. 质粒 DNA 超声辐照后的完整性分析; B. PEI/DNA 复合物超声辐照后的完整性分析 (OC: 开环螺旋结构; SC: 超螺旋结构; Fragmented DNA: DNA 碎片; 0 ~ 300 s 为辐照时间, 辐照条件为 1.0 W/cm²、20% 占空比; 对照: 裸质粒 (非质粒/PEI))

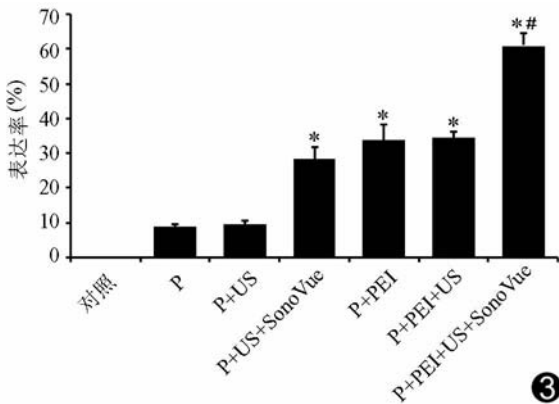


图 3 不同组别的 EGFP 表达率比较 ($\bar{x} \pm s, n = 5$) (P: 质粒; US: 超声; SonoVue: SonoVue 微泡; 对照: PBS 组; US + SonoVue: 超声靶向微泡破裂; *: 与对照组、P 组、P + US 组比较, $P < 0.01$; #: 与其他各组比较, $P < 0.01$)

注射裸质粒组 (P) 或质粒注射结合体外超声照射组 (P + US) 的 EGFP 基因表达无明显提高, 两者之间比较差异无统计学意义 ($P = 1.000$); 注射 SonoVue/DNA 结合超声辐照 (P + UTMD) 可明显提高小鼠心肌 EGFP 基因表达, 与 P 组及 P + US 组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 但与单独 PEI 转染或 PEI + 超声辐照比较差异均无统计学意义 ($P = 0.269$ 、 0.151); UTMD 联合 PEI 转染时, 转染率最高, 与其他组比较

差异均有显著统计学意义 ($P < 0.01$) (图 3)。当非超声辐照时, EGFP 表达多位于心内膜下层区域 (图 4A、B); 超声辐照时表达最强的位置为靠近探头的左室前壁, 超声联合 PEI 时, EGFP 分布差异不明显; UTMD 联合 PEI 转染时, 荧光强度最强 (图 4C)。

3 讨论

PEI 是一种新型阳离子多聚物基因载体, 已被应用于心肌细胞转染及体内研究。利用 25 kDa 的 PEI 可转染 VEGF165 至肌原细胞和急性心肌梗死的大鼠心脏模型, 为缺血性心脏病提供有效的非病毒基因疗法^[7]。另一方面, 研究表明^[1-2], UTMD 诱导形成的空化效应是一种很有前景、高效的心脏基因传输方法。Iwasaki 等^[8] 对小鼠静脉注射肝细胞生长因子并加以 UTMD, 心脏的形态和功能明显改善, 且重复处理可增强该效应, 引起心脏祖细胞增殖, 从而刺激左心室收缩功能障碍的改善。研究发现^[9], UTMD 在报告基因质粒的转移中起着重要作用, 微泡质粒混合液注射后并予以超声辐照, 小鼠心肌组织中有明显的荧光素酶活性表达。本研究结果显示, UTMD 联合 PEI 的心肌转染率明显高于单独的 UTMD 或 PEI 转染, 具有安全、高效、操作简单等优点, 有望成为一种新的基因疗法。

超声辐照可增加细胞膜的通透性, 但值得考虑的是超声辐照是否对质粒 DNA 的完整性和稳定性造成影响, 从而影响基因转染和表达^[10]。琼脂糖凝胶电泳结果显示, 在本研究所用的超声辐照参数范围内, DNA 和 PEI/DNA 复合物的完整性均未发生改变。PEI 有很强的 DNA 亲和力, 负电荷的 DNA 受到 PEI 的保护, 可免受机械过程作用而发生降解^[11]。提供正电荷保护作用的 PEI 在转染过程中发挥重要作用, 当 PEI/DNA 复合物进入靶细胞表面时, 其正电荷与带负电荷的膜上配体之间的静电作用, 促进细胞胞吞和体内转染。另一方面,

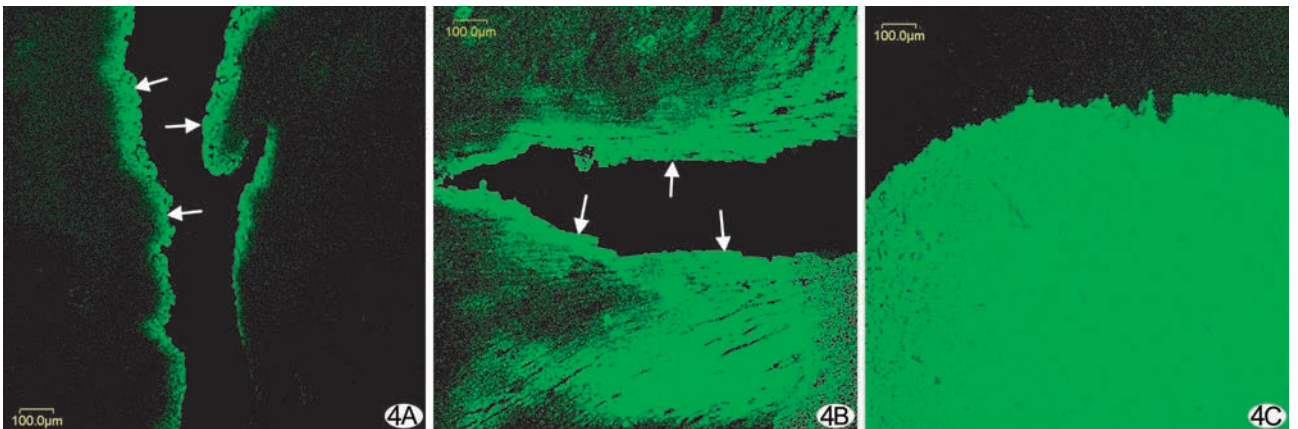


图 4 UTMD 联合 PEI 对心肌 EGFP 基因转染的影响 A. 裸质粒组; B. 质粒 + PEI 组; C. 质粒 + PEI + UTMD 组; 非超声辐照时, EGFP 多在心内膜下层区域表达 (图 A 和图 B 箭头所指); 质粒 + PEI + UTMD 时, EGFP 分布差异不显著, 转染率最高, 荧光强度最强 ($\times 200$)

超声辐照促进 PEI/DNA 复合物的定向释放,使细胞和 PEI/DNA 复合物的碰撞几率增加,提高基因输送的靶向性。微泡破裂促进胞吞作用和细胞对 PEI/DNA 复合物的吸附作用,增强了基因转染。其他效应如辐射力和声冲流,通过增加细胞通透性也有助于转染。另外,附着在细胞膜上的微泡可能与细胞膜相互作用,使细胞信号级联放大^[12]。另外,PEI/DNA 复合物与组织的结合可能被微泡阻断,从而避免组织损伤的发生。因此,UTMD 联合 PEI 时,转染效率得到显著提高。

静脉注射质粒或 PEI/DNA 复合物时,EGFP 主要分布在心腔周边的心内膜下层。UTMD 联合 PEI 转染时,EGFP 的表达分布无明显差异,说明超声辐照对 EGFP 在心肌层的表达分布有较大的影响,但超声强度可能在通过心脏肌层期间被减弱,导致质粒 DNA 在不同肌壁的基因表达存在差异。此外,随着各种各样的转基因和基因剔除小鼠模型的建立,对小鼠心脏模型的研究可促进人类心脏疾病治疗的发展,为阐明心血管疾病的分子机制提供有用的工具,具有较好的实用性及优越性。与其他研究相似^[8-9],本研究采用了非侵入性的尾静脉注射方法,最大限度地减少了手术操作对动物造成的伤害。但本研究尚未对注射途径、质粒浓度、微泡浓度和治疗前后的心功能进行比较分析,UTMD 联合 PEI 增强基因转染的具体机制仍需进一步的研究。

综上,UTMD 联合 PEI 可高效、靶向地促进心肌基因转染,这种非侵入性的技术在心脏基因治疗上很有前景,将在心血管疾病的治疗中发挥重要作用。

[参考文献]

- [1] Bekeredjian R, Chen S, Frenkel PA, et al. Ultrasound-targeted microbubble destruction can repeatedly direct highly specific plasmid expression to the heart. *Circulation*, 2003, 108(8): 1022-1026.
- [2] Ren JL, Wang ZG. Application of ultrasound microbubble contrast agent in gene therapy of cardiovascular disease. *Chin J Med Imaging Technol*, 2007, 23(8): 1257-1259.
任建丽, 王志刚. 超声微泡造影剂在心血管疾病基因治疗中的应用. *中国医学影像技术*, 2007, 23(8): 1257-1259.
- [3] Xue J, Wang ZG, Xu CS, et al. Granulocyte colony-stimulating factor facilitates the myocardial angiogenesis in rats induced by ultrasonic microbubble destruction. *Chin J Med Imaging Technol*, 2008, 24(8): 1162-1164.
薛静, 王志刚, 许川山, 等. 超声破坏微泡联合粒细胞集落刺激因子促进大鼠心血管新生的实验研究. *中国医学影像技术*, 2008, 24(8): 1162-1164.
- [4] Chumakova OV, Liopo AV, Andreev VG, et al. Composition of PLGA and PEI/DNA nanoparticles improves ultrasound-mediated gene delivery in solid tumors in vivo. *Cancer Lett*, 2008, 261(2): 215-225.
- [5] Wang GZ, Hu SJ, Zheng ZL, et al. Synthesis of new gene-loaded microbubbles serve as gene delivery vehicle applied in reporter gene transfer into cardiac myocytes. *Journal of Biomedical Engineering*, 2006, 23(4): 856-861.
汪国忠, 胡申江, 郑哲岚, 等. 新型载基因微泡的制备及其在心肌细胞报告基因转染中的应用. *生物医学工程学杂志*, 2006, 23(4): 856-861.
- [6] Ogris M, Walker G, Blessing T, et al. Tumor-targeted gene therapy: strategies for the preparation of ligand-polyethylene glycol-polyethylenimine/DNA complexes. *J Control Release*, 2003, 91(1-2): 173-181.
- [7] Ye L, Husnain KH, Tan R, et al. Transplantation of nanoparticle transfected skeletal myoblasts overexpressing vascular endothelial growth factor-165 for cardiac repair. *Circulation*, 2007, 116(Suppl): II13-120.
- [8] Iwasaki M, Adachi Y, Nishiue T, et al. Hepatocyte growth factor delivered by ultrasound-mediated destruction of microbubbles induces proliferation of cardiomyocytes and amelioration of left ventricular contractile function in Doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Stem Cells*, 2005, 23(10): 1589-1597.
- [9] Guo DP, Li XY, Sun P, et al. Ultrasound/microbubble enhances foreign gene expression in ECV304 cells and murine myocardium. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2004, 36(12): 824-831.
- [10] Kuo JH, Jan MS, Sung KC. Evaluation of the stability of polymer-based plasmid DNA delivery systems after ultrasound exposure. *Int J Pharm*, 2003, 257(1-2): 75-84.
- [11] Kircheis R, Wightman L, Wagner E. Design and gene delivery activity of modified polyethyleneimines. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 53(3): 341-358.
- [12] van Wamel A, Bouakaz A, Versluis M, et al. Micromanipulation of endothelial cells: ultrasound-microbubble-cell interaction. *Ultrasound Med Biol*, 2004, 30(9): 1255-1258.