

正电荷载基因纳米微泡的超声成像及靶向杀伤肝癌细胞的研究

王玲¹, 李嘉¹, 卢航青², 高启¹, 丁粉干³, 袁晨燕⁴, 张东生^{5*}

¹东南大学附属中大医院超声诊断科, 江苏 南京 210009; ²东南大学医学院检验系, 江苏 南京 210009; ³东南大学附属中大医院病理科, ⁴检验科, 江苏 南京 210029; ⁵东南大学医学院病理学与病理生理学系, 江苏 南京 210009

[摘要] 目的:制备载基因纳米微泡并探讨其体内外超声成像和靶向杀伤肝癌细胞的效果。方法:采用薄膜水化-机械震荡法制备磷脂为壳膜、六氟化硫(suphurhexafluoride, SF₆)气体为核心的正电荷纳米微泡,再偶联甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)启动子的单纯疱疹病毒胸苷激酶(simplex herpes virus thymidine kinase, HSV-TK)质粒DNA制备载基因纳泡。对其形态、平均粒径、zeta电位、DNA结合力、基因转染进行检测;然后对其体内外超声成像特性进行考察;最后采用CCK-8和流式细胞(FCM)分析检测载基因纳泡联合超声靶向微泡击破(ultrasound-targeted microbubble destruction, UTMD)技术对BEL-7402和SMCC-7721细胞的杀伤作用。结果:电镜显示纳泡呈圆球形壳核结构;平均水合粒径约为667 nm,带正电;琼脂糖凝胶电泳显示质量比≥5时,纳泡可有效结合质粒DNA;体内外超声显示载基因纳泡具有良好的超声对比增强特性;RT-PCR检测显示纳泡联合UTMD能使HSV-TK在AFP阳性肝癌细胞内表达。CCK-8和FCM分析显示载基因纳泡+UTMD组能显著抑制BEL-7402细胞的增殖和诱导其凋亡,与其他组相比差异具有显著性($P < 0.05$)。结论:具有良好超声成像功能的载基因纳泡能够高效靶向杀伤AFP阳性的肝癌细胞。

[关键词] 纳米微泡;超声成像;甲胎蛋白;基因治疗;超声靶向微泡击破

[中图分类号] R312

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)12-1667-07

doi:10.7655/NYDXBNS20181201

Study of cationic gene-loaded nanoscale microbubbles guided US imaging and targeted killing of hepatocellular carcinoma cells

Wang Ling¹, Li Jia¹, Lu Hangqin², Gao Qi¹, Ding Fenggan³, Yuan Chenyan⁴, Zhang Dongsheng^{5*}

¹Department of Ultrasonography, ZhongDa Hospital, Southeast University, Nanjing 210009; ²Medical School, Southeast University, Nanjing 210009; ³Department of Pathology, ⁴Department of Clinical Laboratory, Zhong Da Hospital, Southeast University, Nanjing 210009; ⁵Department of Pathology and Pathophysiology, Medical School, Southeast University, Nanjing 210009, China

[Abstract] **Objective:** To prepare gene loaded nanobubbles and explore their effects of ultrasonography and targeted killing of hepatocellular carcinoma cells *in vivo* and *in vitro*. **Methods:** Positively charged nanobubbles with the peripheml phospholipid shells filled by suphurhexafluoride (SF₆) gas were fabricated through the method of lipid thin-film, hydration and mechanical agitations. Then simplex herpes virus thymidine kinase (HSV-TK) plasmid DNA coupled with alpha fetoprotein (AFP) promoter was conjugated to create gene loaded nanobubbles. The characteristics such as morphology, average particle size, zeta potential, capacity of DNA binding and gene transfection were detected. Then the effect of ultrasound contrast enhancement imaging was investigated *in vivo* and *in vitro*. Finally, the killing efficiency of gene-loaded nanobubbles on BEL-7402 and SMCC-7721 cells when combined with ultrasound-targeted microbubble destruction (UTMD) was detected using CCK-8 and flow cytometry (FCM) assay. **Results:** The nanobubbles appeared as a spherical morphology with a core-shell structure under TEM, and they were about 667 nm in mean hydrodynamic diameter with positive charge. Nanobubbles can effectively bind with plasmid DNA when particle/DNA weight ratio was set at 5:1. The gene-loaded nanobubbles had good ultrasonic contrast enhancement characteristics *in vitro* and *in vivo* ultrasonography. RT-PCR assays indicated that nanobubbles combined with UTMD enabled HSV-TK to be expressed in AFP positive hepatocellular carcinoma cells rather than AFP negative ones. The analysis of CCK-8 and FCM showed that gene-loaded nanobubbles combined with UTMD could significantly

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金(81700678, 81501525);南京市卫计委一般性课题(YKK16280)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: zdszds1222@163.com

inhibit the proliferation of BEL-7402 cells and induce apoptosis, which was significantly different from other groups ($P < 0.05$).

Conclusion: Gene-loaded nanobubbles with good ultrasonic imaging function can effectively induce targeted killing of AFP positive hepatocellular carcinoma cells.

[Key words] nanobubbles; US imaging; AFP; gene therapy; UTMD

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(12): 1667-1673, 1700]

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是原发性肝癌的主要形式,是全世界癌症死亡的第三大主因^[1]。全世界每年超过一百万人被诊断为HCC,其中55%的发病和死亡病例来自中国^[2]。目前治疗主要是手术治疗、放疗、化疗以及综合治疗等,然而治疗效果并不理想。近年来,基因治疗作为肝癌治疗的新手段已逐渐成为研究热点。

开发安全、高效、靶向的非病毒基因载体一直是肿瘤基因治疗的目标。超声微泡不仅能作为优良的超声成像对比增强剂在肿瘤诊断方面发挥重要作用,还可用作药物和基因等治疗物质的控制释放载体^[3-4],达到靶向输送的目的。由于微米尺寸的影响,超声微泡造影剂不易透过肿瘤血管内皮间隙,大大减弱了其对治疗物质的转运能力,而纳米级微泡造影剂则可以穿过肿瘤血管内皮细胞到达癌细胞,从而为实现靶向药物或基因传递提供了可能。超声靶向微泡击破(ultrasound-targeted microbubble destruction, UTMD)技术是一种新型的靶向释放技术,它借助低频超声的局部辐照,使携带治疗物质的微泡发生破裂,从而使治疗物质被局部靶向释放。同时微泡破裂产生的增强空化作用会对周围组织产生一定的生物学效应,使得血管通透性增加,这样释放出来的治疗性物质可以进一步通过血管内皮屏障到达特定肿瘤部位发挥治疗作用^[5]。而且这种定位释放技术能显著减少药物或基因用量,减轻不良反应,提高病灶局部药物或基因浓度,增强治疗效果^[6-7]。

在肿瘤的基因治疗中,如何实现治疗基因只在肿瘤组织或细胞内表达,而不在正常组织细胞内表达是影响肿瘤基因治疗成败的关键因素之一。应用肿瘤特异性启动子能够调控目的基因在肿瘤细胞内特异性表达,也是实现靶向性基因治疗的重要手段。理想的肿瘤特异性启动子在肿瘤细胞内呈现高表达,而在正常细胞内不表达或几乎不表达。目前对于肝癌的靶向基因治疗而言,甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)启动子是最常使用的启动子之一。当肝癌发生时,AFP基因被重新激活并重新表达,AFP启动子调节下游的基因只表达在HCC细胞

中。多项研究已经证实AFP启动子能够在肝癌细胞内特异性激活外源性基因的转录,并在肝癌的靶向性基因治疗中具有一定疗效^[8-9]。

本课题采用纳米技术制备可载、可视、可控、可诊和可治的脂质纳米微泡(简称纳泡),同时装载前期课题组已经成功制备的p[HRE]AFP-HSVTK表达载体作为靶向AFP阳性肝癌的治疗基因^[10],并对其体内外超声成像特性和体外靶向杀伤肝癌细胞的疗效进行考察。

1 材料和方法

1.1 材料

二硬脂酰基卵磷脂(DSPC)、二苯基磷酰基叠氮化物(DPPA)、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000(DSPE-PEG2000)、DC-胆固醇(DC-cholesterol, Corde公司,瑞士),六氟化硫气体(SF₆,南京特种气体厂),三氯甲烷及甘油(国药集团化学试剂有限公司),小牛血清(杭州四季青生物工程公司); RPMI1640培养基及胰蛋白酶(Gibco BRL公司,美国), Pluronic F-68(Sigma-Aldrich公司,美国), TRIzol、RT试剂盒和PCR试剂盒(TaKaRa公司,日本),溴化乙锭(南京峰展精细化工),磷酸盐缓冲液(phosphate balanced solution, PBS)由实验室自配,实验中所用去离子超纯水由Milli-Q超纯水仪(Millipore公司,美国)制得,pEGFP质粒为实验室保存^[11]。

1.2 方法

1.2.1 纳米脂质微泡的制备

参照 Abdalkade 等^[12]方法,使用电子天平依次称取摩尔比为80:12:8:12的DSPC、DPPA、DSPE-PEG2000、DC-胆固醇,并将其混合后置于茄形瓶中,先加入10 mL三氯甲烷将上述混合物溶解分散;然后将茄形瓶置于旋转蒸发器(河南英裕予华仪器厂)上,使茄形瓶中的有机溶剂充分挥发,直至在瓶底壁形成一层白色、均匀的脂质薄膜(旋转蒸发温度55℃、转速100 r/min、抽真空压力为0.10 mPa);并将茄形瓶置于通风橱30 min,以除去残存的有机溶剂;随后向茄形瓶中加入0.1 mol/L PBS 4 mL(pH值

7.4),10%甘油(V/V)和1 mL Pluronic F-68混合液使脂质薄膜剥脱,外加超声分散直至瓶壁薄膜完全脱落,形成一定浓度的脂质悬液;最后将得到的脂质悬液分装到1个2 mL的小瓶(1 mL/瓶),充入SF₆气体置换瓶内的空气并压盖密封。最后,将封装好的小瓶置入银汞调合器(上海医疗器械股份有限公司)中振荡55 s[工作频率≥4 500/min的振动,振幅(15±1)mm];静置后,低速离心,弃上层溶液和最下层沉淀物,保留中下层,PBS漂洗数次,重悬即得纳米微泡,保存于4℃冰箱内备用。

1.2.2 表征

采用JEM-200CX高分辨率透射电子显微镜(TEM,JEOL公司,日本)观察纳米微泡的形态、分布;马尔文粒度仪(Malvern公司,英国)检测纳米微泡粒径和表面电位,用血细胞计数板测定纳米微泡的浓度。

1.2.3 纳泡和DNA结合力的检测

将正电荷纳米微泡和p[HRE]AFP-HSVTK质粒DNA以不同质量比分别为0:1、0.25:1、0.50:1、1.00:1、2.00:1、3.00:1、4.00:1、5.00:1混合在100 μL双蒸水中,室温混匀后静置30 min以反应充分形成各种不同比例的纳米微泡和DNA复合物,4℃放置备用。取10 μL样品置于1%琼脂糖凝胶中,80 V电泳40 min,凝胶成像系统观测并拍照。

1.2.4 细胞转染

按上述最佳比例分别结合pEGFP和p[HRE]AFP-HSVTK质粒制备载pEGFP和p[HRE]AFP-HSVTK的纳米微泡备用。

将BEL-7402(AFP阳性)和SMCC-7721(AFP阴性)细胞(南京凯基生物有限公司),分别接种于6孔板中,每孔3×10⁵个细胞,孵育18 h后(细胞有80%融合),用2 mL无血清培养基替换原来的细胞培养基,两组细胞均分别加入含4 μg质粒的载pEGFP纳米微泡和载p[HRE]AFP-HSVTK的纳米微泡,然后利用HM-1超声治疗仪(江苏汉美科技有限公司)进行低频超声辐照。具体方法如下:超声探头涂抹适量耦合剂后置于培养板底部,边辐照边缓慢移动,尽量使孔内细胞受到的辐照均匀一致(超声辐照条件:频率1 MHz时,脉冲重复频率为1 kHz,占空比为50%,强度为0.3 W/cm²,曝光时间为1 min),辐照后细胞在缺氧条件下培养5 h,然后更换为含血清的细胞培养液继续常养培养。两组细胞均于转染48 h后采用倒置荧光显微镜(Nikon公司,日本)观察pEGFP质粒的转染情况并用流式细胞仪检测其转染

表达效率。同时采用RT-PCR方法检测载p[HRE]AFP-HSVTK纳米微泡联合UTMD转染上述两组细胞后HSV-TK表达情况。具体实验步骤如下:按TRIzol使用说明书于转染48 h后提取BEL-7402和SMCC-7721两组细胞的总RNA,然后将提取的总RNA反转录为cDNA后进行PCR扩增,目的基因和内参GAPDH的引物如下:TK上游5'-CGTTTACGGGCTACTTGCCAAT-3',下游5'-GATAAAGACGTGCATGGAACGG-3',270 bp;GAPDH上游5'-GAAATCCCATCACCATCTTCCAG-3'下游5'-ATGACCTTGCCACAGCCTTG-3',440 bp。PCR的终反应体积为20 μL,反应条件为:95℃预变性5 min;95℃变性30 s,58℃退火30 s,72℃延伸30 s,35个循环;最后72℃延伸5 min。扩增后取PCR产物5 μL,加入溴化乙锭染色,在1%琼脂糖凝胶电泳上电泳,电泳结束后,取胶块在凝胶成像系统上拍照。

1.2.5 体外超声造影成像

超声造影成像采用临床用彩色多普勒超声诊断仪MyLab Twice(百胜公司,意大利),LA332探头(基波成像探头频率为7.5 MHz,造影成像探头频率为2.5 MHz)。随机内置实时造影匹配成像模式(Contrast-Tuned Imaging,CnTI™),参数如下:增益(Gain)为105,深度为31 mm,机械指数(MI)为0.089。

体外超声造影采用自制模拟装置进行,在水槽中横贯1根弹性透明医用级硅胶管,浸没于液面之下。探头置于液面下,紧贴塑胶管表面,其间充填超声耦合剂以便更好地观察超声造影效果;首先充满脱气水管腔的二维图像被采集,随后2 mL浓度为1×10⁷个/mL的载基因纳米微泡被注入,造影剂注入的同时启动CnTI™造影模式对流动的微小气泡进行超声造影成像,采集并存储图像。临床用商品化声诺维造影剂作为对照(使用前用一定量0.9%的生理盐水稀释至与载基因纳泡相同的浓度并轻微震荡)。上述造影成像实验重复3次,每次超声造影成像结束后需启动Flash破泡模式将造影过程中残存的造影剂击破清除并用脱气水冲洗后,再进行新的超声造影成像。

体外UTMD试验:注入载基因纳泡后,待造影图像达最强时,外加低频超声辐照管腔直至此区的微泡全部被击破,随后对辐照后的管腔进行超声观察并存储图像(仪器和辐照条件同基因转染部分)。

对成像过程中所采集的所有超声图像选择1个圆形区域作为感兴趣区域(region of interest,ROI),使用Image J软件对ROI平均灰度值进行定量分析

(实验结果用平均值和标准偏差表示)。

1.2.6 体内超声造影成像

成像仪器、成像参数同体外超声成像。Balb/c-nu 裸鼠(北京大学医学部)6只,雌性,鼠龄4~6周,体质量18~22g,饲养1周后,皮下接种人肝癌细胞BEL-7402(南京凯基生物有限公司), $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 个/只,接种7~10d后即肿瘤大小为70~100 mm³时进行实验。荷瘤裸鼠麻醉后被固定在实验板上,先常规二维超声观察皮下移植肿瘤大小、回声情况,选择最大切面后固定探头,将成像模式转入CnTI™造影模式。经尾静脉通道团注超声造影剂(0.1 mL/只)注射后立即用生理盐水冲洗通道。同步开启CnTI™造影模式,注入造影剂即刻起全程动态采集并存储超声造影剂注入后皮下移植肿瘤随时间改变回声动态增强图像,对所采集的超声造影图像使用造影软件绘制时间-强度曲线,计算ROI超声造影增强达最强时的达峰时间和峰值强度。

1.2.7 载基因纳泡联合UTMD体外靶向抗肝癌试验

对数生长期的BEL-7402(AFP阳性)和SMCC-7721(AFP阴性)细胞,用0.25%的胰酶消化,然后用含10%胎牛血清的RPMI1640培养液终止消化并吹打细胞成单细胞悬液,随后根据细胞计数板计数结果调整细胞浓度为 4×10^4 个/mL,接种于96孔板(100 μ L/孔),每组6个复孔,置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养。待细胞生长密度为50%~60%后随机分成3组:①阴性对照组;②载基因纳泡组;③载基因纳泡+UTMD组;按分组情况分别加入RPMI1640和载基因纳泡,UTMD组在加入载基因纳泡后超声探头涂耦合剂置于培养板底部,边辐照边缓慢移动,尽量使细胞受到的辐照均匀一致。辐照条件同细胞转染部分,辐照后细胞在缺氧条件下培养6h并加入GCV调整其浓度为10 μ g/mL,之后继续在常氧条件下培养。所有组细胞治疗48h后,每孔加入10 μ L CCK8溶液,继续培养3h,置于酶标仪上读取450 nm处吸光度值。利用公式计算细胞生存率(%)=实验组吸光度值/对照组吸光度值 $\times 100\%$ 。

按上述分组处理BEL-7402和SMCC-7721细胞后,先用不含EDTA的胰酶消化收集各组细胞(消化时间不宜过长,以免引起细胞凋亡引起假阳性),然后用PBS洗涤细胞2次(2 000 r/min,离心5 min),收集 $1 \sim 5 \times 10^5$ 细胞,在50 μ L的Binding Buffer中加入5 μ L 7-AAD染液,混匀;收集细胞中加入上述7-AAD染液,混匀;室温、避光、反应5~15 min;反应后再加入450 μ L的Binding Buffer混匀;加入1 μ L Annexin

V-PE混匀;室温、避光、反应5~15 min;1 h内用流式细胞仪进行细胞凋亡检测。用BD FACSDiva软件分析,计算细胞凋亡率。

1.3 统计学方法

所有资料均采用SPSS18.0软件分析。研究数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计算各组平均值及标准差,组间比较采用单因素方差分析, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 表征

透射电镜下,纳米脂质微泡造影剂呈现为圆球形外观,外包被一层脂质膜,内充有透亮的SF₆气体,分散度好(图1A);纳米脂质微泡平均直径为(667 ± 12) nm,呈单峰状(图1B);zeta电位为($+23.4 \pm 1.2$) mV(图1C);血球计数仪测得纳米微泡平均浓度为(1.09 ± 0.11) $\times 10^8$ 个/mL。

2.2 与DNA结合力的测定

琼脂糖凝胶电泳显示,以不同质量比配制的正电荷纳米微泡和DNA复合物,随着纳米微泡的比例增加,质粒的迁移速度减慢,其DNA包裹能力增强,从5:1开始,正电荷纳米微泡便能将DNA完全缩合,使其滞留在孔内(图2)。

2.3 基因转染

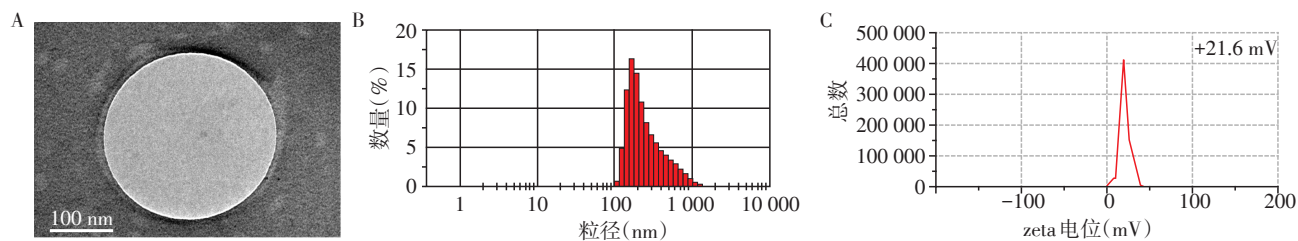
转染pEGFP质粒48h后绿色荧光蛋白表达情况(图3),BEL-7402(AFP阳性)和SMCC-7721(AFP阴性)两组细胞转染5h后均可在荧光显微镜下观察到细胞体内的绿色荧光,48h达最强,转染效率分别为51.9%和59.3%。

RT-PCR检测显示HSV-TK在AFP阳性的BEL-7402细胞内有表达;在AFP阴性的SMCC-7721细胞内没有表达(图4)。

2.4 超声造影成像

体外超声造影成像显示,相比无回应的脱气水,载基因纳泡注入后超声图像呈现为细密的强回声,且回声光点分布较均匀,其强度(176.58 ± 11.06)与临床用声诺维造影剂的强度(184.63 ± 5.67)相仿($P > 0.05$),当进行UTMD试验后其声像图瞬间变为近似无回声(图5)。

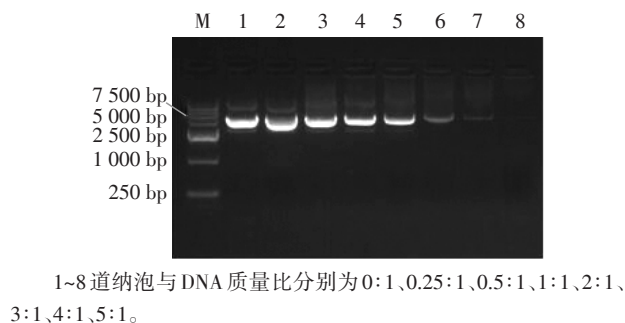
体内超声造影成像显示,载基因纳泡注入后移植瘤血管内出现强回声点,并迅速充盈,造影剂从肿瘤周围逐渐向中央部充填,并迅速充填移植瘤,灰阶强度迅速增强,后开始缓慢廓清,移植瘤灰阶强度也逐渐减弱。整个造影过程持续了3 min,时间



A:TEM;B:平均水合粒径;C:zeta电位。

图1 纳米脂质微泡的表征

Figure 1 Characterization of lipid nanobubbles



1~8道纳泡与DNA质量比分别为0:1、0.25:1、0.5:1、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1。

图2 琼脂糖凝胶阻滞

Figure 2 Agarose gel retardation

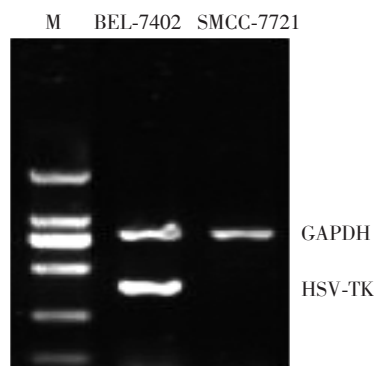
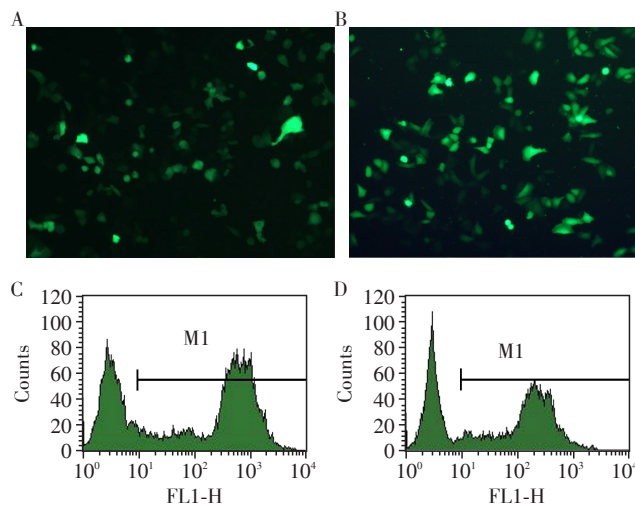


图4 RT-PCR检测HSV-TK的表达

Figure 4 Expression of HSV-TK detected by RT-PCR assay



A: BEL-7402细胞;B:SMCC-7721细胞;C和D为BEL-7402细胞和SMCC-7721细胞的转染效率。

图3 载pEGFP的纳泡联合UTMD的基因转染和转染效率

Figure 3 Gene transfection and transfection efficiency of the pEGFP-loaded nanobubbles combined with UTMD

峰值曲线显示达峰时间为 (24.03 ± 0.31) s,峰值强度为 70.10 ± 0.37 (图6)。

2.5 载基因纳泡联合UTMD体外靶向抗肝癌试验

2.5.1 CCK-8试验

除阴性对照组对BEL-7402和SMCC-7721细胞均无明显影响外,不同治疗组对两组细胞均有不同

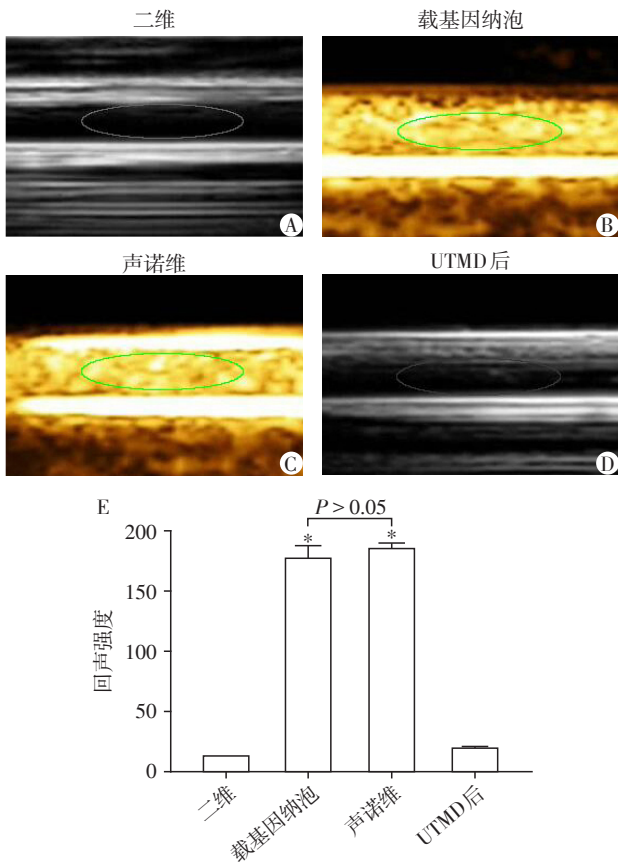
程度的增殖抑制作用,其中载p[HRE]AFP-HSVTK纳泡联合UTMD治疗组对AFP阳性的BEL-7402细胞的增殖抑制作用最明显,细胞生存率仅为20.98%,明显低于其他各组($P < 0.05$,图7)。

2.5.2 流式细胞仪测定细胞凋亡和坏死

载p[HRE]AFP-HSVTK纳泡联合UTMD治疗组对AFP阳性细胞和AFP阴性细胞均有诱导凋亡作用,两组细胞的平均凋亡率分别为35.25%和25.31%,且均较同组的其他治疗有统计学差异($P < 0.05$,图8);而且AFP阳性细胞治疗组的凋亡率高于AFP阴性细胞治疗组($P < 0.05$)。

3 讨论

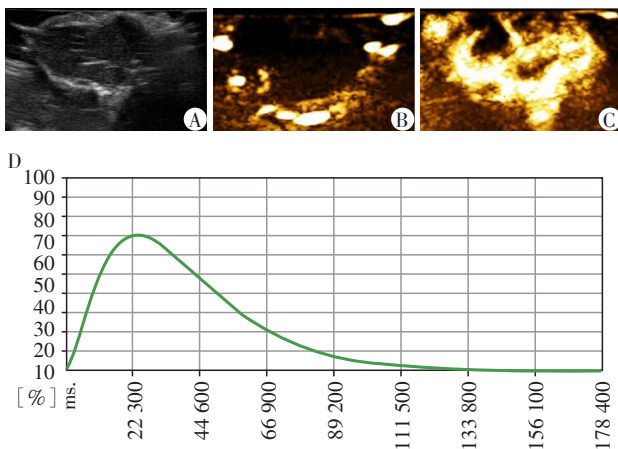
电镜显示纳米微泡被成功制备,其主要由壳膜和气核两部分组成。纳米微泡的外壳可由磷脂^[13-14]、蛋白^[15]或高分子多聚物等^[16]多种可生物降解的物质构成。而本研究则选用了多种磷脂材料来构建纳米微泡的脂质壳膜,这是因为相比其他物质,磷脂膜具有可生物降解、使用安全,对人体无害等优点,而且其形成的双分子磷脂膜结构还被证实能够增加超声造影效果^[17],这正是成像实验所需要的。此外脂质微泡在超声场中具有较强的空化作用,能够



A: 脱气水; B: 载基因纳泡; C: 声诺维; D: UTMD后纳泡破裂; E: 各组回声强度比较。载基因纳泡组和声诺维组与造影前二维相比, *P < 0.05。

图5 体外超声成像和 UTMD 试验

Figure 5 US imaging and UTMD experiment *in vitro*

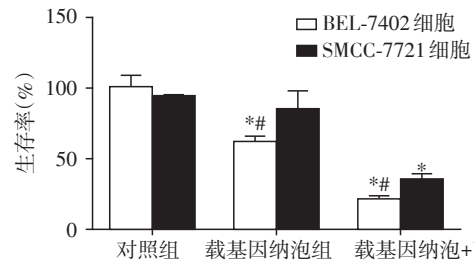


A: 肿瘤二维图; B: 肿瘤造影前; C: 肿瘤造影达最强时; D: 肿瘤超声造影时间-强度曲线图。

图6 载基因纳泡对肿瘤的超声造影成像

Figure 6 Ultrasound imaging of gene-loaded nanobubbles in tumors

被较低能量的超声辐照击破,从而避免对正常组织的损伤。粒径显示制备的微气泡属于纳米级微气



与相同细胞的对照组相比, *P < 0.05; 与同组的 SMCC-7721 细胞组生存率比较, #P < 0.05。

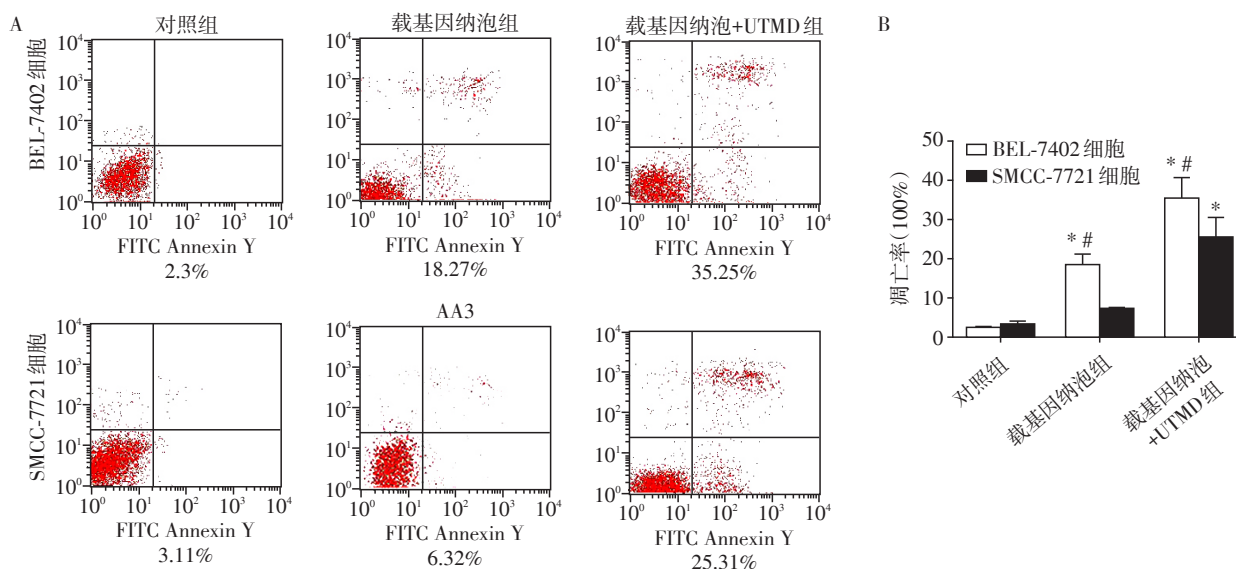
图7 CCK-8实验结果

Figure 7 Results of CCK-8 assay

泡而且带正电,因而能够作为有效的基因载体与带负电的质粒DNA相结合,而且转染pEGFP质粒后两组细胞内均可探测到绿色荧光蛋白表达,这也充分证明了自制的纳泡除能作为基因载体有效携带基因外还能结合 UTMD 进行有效的基因传递。研究中 p[HRE]AFP-HSVTK 质粒 DNA 与纳泡的结合不是在纳泡的制备过程中发生的,而是在其制备成功后再连接的,这样的方法结合 DNA 可以有效调控载基因量,既可以避免不必要的质粒浪费,同时也可以大致定量确定所载的质粒 DNA 的量。因此本研究最终根据琼脂糖凝胶电泳显示的最佳结合比例确定了纳泡所能携带的最佳基因量,从而为后续治疗试验提供了可供参考的依据。

超声成像结果显示自制的载基因纳泡尽管携带了质粒 DNA 但是在体外依然能够提供与临床用商品化声诺维相似的、令人满意的超声造影图像。而且外加低频超声辐照后,原本呈现为强回应的载基因纳泡在 UTMD 作用下瞬间变为无回声,说明纳米微气泡被有效击破,引起了回声减弱消失,从而推测微气泡被破坏的同时可能伴随有气泡的空化和所载基因的原地释放,这将有利的靶向基因治疗试验。同样的,体内超声造影成像中,载基因纳泡能够对移植瘤产生很好的超声造影增强显像,且有效的超声造影时间可以持续 3 min 之久,这说明自制的载基因纳泡造影剂具有持续稳定的超声造影成像效果,可以满足超声成像诊断的要求。此外,在整个移植瘤超声成像实验过程中,所有裸鼠生命体征都保持平稳,没有意外死亡等发生,也证实了自制的载基因脂质纳泡体内应用的安全性。

肝癌基因治疗的靶向性调控已经成为决定基因治疗可行性和治疗效果的关键因素。本研究采用的目的基因为自杀基因中常使用的 HSV-TK,它已经被成功应用于一些临床试验中^[19-20]。HSV-TK



A: 流式细胞仪测定 BEL-7402 和 SMCC-7721 细胞的凋亡率; B: BEL-7402 和 SMCC-7721 两组细胞凋亡率的统计分析结果。与相同细胞的对照组相比, * $P < 0.05$; 与同组的 SMCC-7721 细胞组凋亡率比较, # $P < 0.05$ 。

图8 流式细胞仪测定细胞凋亡率结果

Figure 8 Results of cell apoptosis rates detection by flow cytometry

本身对机体及肿瘤细胞无杀伤作用,但是却能够将无毒药物前体无环鸟苷代谢为毒性产物,不仅能直接杀伤肿瘤细胞,而且具有“旁观者效应”,杀伤细胞及邻近细胞。本研究首先利用纳米脂质微泡携带 HSV-TK 基因并联合 UTMD 技术将目的基因导入肝癌细胞,为靶向性基因治疗提供了可能。随后在肝癌特有的 AFP 调控下实现了 HSV-TK 基因在肝癌细胞内的特异性表达,并诱导 GCV 转化为毒性产物,既实现了最大限度地杀伤肝癌细胞,不损伤正常细胞,同时也实现了靶向杀伤 AFP 阳性肝癌细胞的目的。因此治疗试验显示,尽管 p[HRE]AFP-HSVTK 纳泡联合 UTMD 治疗组对 AFP 阳性细胞和 AFP 阴性细胞均有增殖抑制和诱导凋亡作用,但是对于 AFP 阳性肝癌细胞的杀伤效果明显强于 AFP 阴性肝癌细胞,这也再次证实了治疗基因靶向传递以及靶向基因治疗的重要性。

综上所述,本研究制备的载基因磷脂纳泡不仅具有良好的体内外超声造影增强特性,还能作为基因载体有效携带 p[HRE]AFP-HSVTK 质粒 DNA 并结合 UTMD 将其靶向传递到肝癌细胞并高效杀伤 AFP 阳性的肝癌细胞,这将为以后的动物实验和临床应用提供可行性参考和可靠的试验依据。同时基于纳米微泡平台能够将超声成像诊断和基因治疗合二为一,有望作为诊疗化物质在肝癌的诊断和治疗过程中同时发挥巨大作用,实现肝癌的诊疗一体化。

[参考文献]

- Forner A, Llovet J M, Bruix J. Role of the microenvironment in the pathogenesis and treatment of hepatocellular carcinoma[J]. *Gastroenterology*, 2013, 144(3): 512-527
- Song P. Standardizing management of hepatocellular carcinoma in China: devising evidence-based clinical practice guidelines[J]. *Biosci Trends*, 2013, 7(5): 250-252
- Li J, Zhou P, Li L, et al. Effects of cationic microbubble carrying CD/TK double suicide gene and $\alpha\text{V}\beta 3$ Integrin antibody in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells [J]. *PLoS One*, 2016, 11(7): e0158592
- Yan F, Li L, Deng Z, et al. Paclitaxel-liposome-microbubble complexes as ultrasound-triggered therapeutic drug delivery carriers [J]. *J Control Release*, 2013, 166(3): 246-255
- Zhou X, Shi Y, Xiong L. Inhibitory effects of the ultrasound-targeted microbubble destruction-mediated herpes simplex virus - thymidine kinase/ganciclovir system on ovarian cancer in mice [J]. *Exp Ther Med*, 2014, 8(4): 1159-1163
- Liu TY, Wu MY, Lin MH, et al. A novel ultrasound-triggered drug vehicle with multimodal imaging functionality [J]. *Acta Biomater*, 2013, 9(3): 5453-5463
- Zhao R, Liang X, Zhao B, et al. Ultrasound assisted gene and photodynamic synergistic therapy with multifunctional FOXA1-siRNA loaded porphyrin microbubbles for en-

(下转第 1700 页)

- Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines [J]. *J Am Coll of Cardiol*, 2010, 56(25):e50-103
- [3] Gao R, Yang Y, Han Y, et al. Bioresorbable vascular scaffolds versus metallic stents in patients with coronary artery disease [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2015, 66(21):2298-2309
- [4] Cai Y, Yang Y, Chen X, et al. Circulating 'LncRNA OT-THUMT00000387022' from monocytes as a novel biomarker for coronary artery disease [J]. *Cardiovasc Res*, 2016, 112(3):714-724
- [5] Wu G, Cai J, Han Y, et al. LincRNA-p21 regulates neointima formation, vascular smooth muscle cell proliferation, apoptosis and atherosclerosis by enhancing p53 activity [J]. *Circulation*, 2014, 130(17):1452-1465
- [6] Han Y, Xu H, Cheng J, et al. Downregulation of long non-coding RNA H19 promotes P19CL6 cells proliferation and inhibits apoptosis during late-stage cardiac differentiation via miR-19b-modulated Sox6 [J]. *Cell Biosci*, 2016, 6(1):58
- [7] Molina E, Chew GS, Myers SA, et al. A novel Y-Specific long Non-Coding RNA associated with cellular lipid accumulation in HepG2 cells and Atherosclerosis - related genes [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):16710
- [8] Wenger NK. 2011 ACCF/AHA focused update of the guidelines for the management of patients with Unstable Angina/Non-ST-Elevation Myocardial Infarction (updating the 2007 Guideline): highlights for the clinician [J]. *Clin Cardiol*, 2012, 35(1):3-8
- [9] Yang Y, Cai Y, Wu G, et al. Plasma long non-coding RNA, CoroMarker, a novel biomarker for diagnosis of coronary artery disease [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2015, 129(8):675-685
- [10] Wu Z, He Y, Li D, et al. Long noncoding RNA MEG3 suppressed endothelial cell proliferation and migration through regulating miR-21 [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(7):3326
- [11] Cai Y, Yang Y, Chen X, et al. Circulating "LncPPARδ" from monocytes as a novel biomarker for coronary artery diseases [J]. *Medicine*, 2016, 95(6):e2360
- [12] Knorr M, Münzel T, Wenzel P. Interplay of NK cells and monocytes in vascular inflammation and myocardial infarction [J]. *Front Physiol*, 2014, 5:295

[收稿日期] 2018-08-10

(上接第 1673 页)

- hancing therapeutic efficacy for breast cancer [J]. *Biomaterials*, 2018, 173:58-70
- [8] Yan C, Yang M, Li Z, et al. Suppression of orthotopically implanted hepatocarcinoma in mice by umbilical cord-derived mesenchymal stem cells with sTRAIL gene expression driven by AFP promoter [J]. *Biomaterials*, 2014, 35(9):3035-3043
- [9] Yu B F, Wu J, Zhang Y, et al. Ultrasound-targeted HSVtk and Timp3 gene delivery for synergistically enhanced anti-tumor effects in hepatoma [J]. *Cancer Gene Ther*, 2013, 20(5):290-297
- [10] Yuan C, An Y, Zhang J, et al. Magnetic nanoparticles for targeted therapeutic gene delivery and magnetic-inducing heating on hepatoma [J]. *Nanotechnology*, 2014, 25(34):345101
- [11] Zhang H, Hou X, Lin M, et al. The study on the preparation and characterization of gene-loaded immunomagnetic albumin nanospheres and their anti-cell proliferative effect combined with magnetic fluid hyperthermia on GLC-82 cells [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2015, 9:6445-6460
- [12] Abdalkader R, Kawakami S, Unga J, et al. Evaluation of the potential of doxorubicin loaded microbubbles as a therapeutic modality using a murine tumormodel [J]. *Acta Biomater*, 2015, 19:112-118
- [13] Yang H, Zhou T, Cai W, et al. Novel dual-mode nanobubbles as potential targeted contrast agents for female tumors exploration [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(10):1-11
- [14] Tian Y, Liu Z, Zhang L, et al. Apatinib-loaded lipid nanobubbles combined with ultrasound-targeted nanobubble destruction for synergistic treatment of HepG2 cells in vitro [J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11:4785-4795
- [15] Tong HP, Wang LF, Guo YL, et al. Preparation of protamine cationic nanobubbles and experimental study of their physical properties and in vivo contrast enhancement [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2013, 39(11):2147-2157
- [16] Yang H, Xue Shen, Yan J, et al. Charge-reversal functionalized PLGA nanobubbles as theranostic agents for ultrasonic imaging-guided combination therapy [J]. *Biomater Sci*, 2018, 6(9):2426-2439
- [17] Ling L, Qiang W, Li HB, et al. Evaluation of microbubbles as contrast agents for ultrasonography and magnetic resonance imaging [J]. *PLoS One*, 2012, 7(4):e34644
- [18] Zhao F, Tian J, An L, et al. Prognostic utility of gene therapy with herpes simplex virus thymidine kinase for patients with high-grade malignant gliomas: a systematic review and meta analysis [J]. *J Neurooncol*, 2014, 118(2):239-246

[收稿日期] 2018-07-27