

# 六氟化硫微泡介导人脂联素基因兔主动脉内转染及表达☆

杨文凯<sup>1,2</sup>, 陈庆<sup>3</sup>, 杨春丽<sup>4</sup>, 王现国<sup>1</sup>, 谢霆<sup>1</sup>, 董念国<sup>1</sup>, 陈新忠<sup>1</sup>

## Transfection and expression of human apM1 gene into the aorta of rabbits mediated by using ultrasound with SonoVue

Yang Wen-kai<sup>1,2</sup>, Chen Qing<sup>3</sup>, Yang Chun-li<sup>4</sup>, Wang Xian-guo<sup>1</sup>, Xie Ting<sup>1</sup>, Dong Nian-guo<sup>1</sup>, Chen Xin-zhong<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Cardiosurgery, <sup>2</sup>Department of General Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China; <sup>3</sup>Department of Cardiothoracic Surgery, <sup>4</sup>ICU Department, Jiangxi Provincial People's Hospital, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Yang Wen-kai☆, Studying for doctorate, Attending physician, Department of Cardiosurgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China; Department of Cardiothoracic Surgery, Jiangxi Provincial People's Hospital, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China doctor\_wenkaiyang@yahoo.com.cn

Corresponding author: Chen Xin-zhong, Doctor, Attending physician, Department of Cardiosurgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China xinzhongchen@yahoo.com.cn

Received: 2011-12-21  
Accepted: 2012-01-27

### Abstract

**BACKGROUND:** Gene delivery using ultrasound microbubbles is an emerging directional transmission gene technology. **OBJECTIVE:** To construct a recombinant plasmid containing human apM1 gene and delivery apM1 gene into the aorta of rabbits by using ultrasound with SonoVue. **METHODS:** Twenty-one rabbits were randomized into control group ( $n=6$ ) and apM1 group ( $n=15$ ). apM1 mRNA from epicardial adipose tissue was amplified by reverse transcription-PCR and cloned into plasmid pcDNA3.1 to generate the recombinant plasmid pcDNA3.1-apM1, which was confirmed by nucleotide sequencing and transiently transfected into human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). While the mixture of SonoVue and pcDNA3.1-apM1 was injected through helix vein, the thoracoabdominal aorta of rabbits were sonicated by ultrasound for 3 minutes. The arterial vessels and blood serum of rabbits were harvested at 2, 7 and 14 days respectively after delivery to detect apM1 expression by Western blot analyses and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **RESULTS AND CONCLUSION:** The identification of pcDNA3.1-apM1 recombinant by DNA sequencing was correct. The expression of apM1 gene could be detected by Western blot in HUVECs after pcDNA3.1-apM1 transient transfection. apM1 gene could be effectively transferred into the aorta wall of rabbit by using ultrasound with SonoVue. The high expression of apM1 gene was detected at 2 days after delivery and until to 14 days. ELISA results showed that the concentration of apM1 protein in serum of rabbit could be significantly increased by delivery of apM1 gene using ultrasound with SonoVue ( $P < 0.01$ ). These findings indicate that the eukaryotic expression recombinant containing apM1 gene can be successfully constructed. apM1 gene can be transferred into the deep area of rabbit aorta vessel wall by ultrasound with SonoVue and expressed and secreted effectively.

Yang WK, Chen Q, Yang CL, Wang XG, Xie T, Dong NG, Chen XZ. Transfection and expression of human apM1 gene into the aorta of rabbits mediated by using ultrasound with SonoVue. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(15): 2704-2708. [http://www.crter.cn http://en.zgckf.com]

### 摘要

**背景:** 超声微泡载基因传输技术是一种新兴起的定向传输基因技术。**目的:** 构建含人脂联素基因脂联素的真核表达载体, 采用六氟化硫微泡介导脂联素基因进行兔主动脉转染及表达, 为脂联素用于体内干预动脉粥样硬化的研究奠定基础。**方法:** 人心外膜脂肪组织提取总 RNA 构建 pcDNA3.1-脂联素重组体, 通过瞬时转染人脐静脉内皮细胞验证载体构建是否成功。21 只大白兔随机分成对照组( $n=6$ )和脂联素转基因组( $n=15$ ), 脂联素转基因组经兔耳缘静脉注射 pcDNA3.1-脂联素与六氟化硫微泡的混合物, 诊断超声仪照射兔胸腹主动脉区域, 于照射后 2, 7, 14 d 取兔主动脉血管及血清, 检测主动脉血管壁中脂联素基因的表达及血清中脂联素蛋白水平。**结果与结论:** pcDNA3.1-脂联素瞬时转染入人脐静脉内皮细胞可有效表达。六氟化硫微泡传输脂联素基因 2 d 后即可检测到兔主动脉血管壁脂联素基因高表达, 持续至 14 d, 且兔血清脂联素蛋白水平显著增加( $P < 0.01$ )。说明 pcDNA3.1-脂联素重组体构建成功, 六氟化硫微泡可在快速血流状态下, 安全、高效传输脂联素基因入兔主动脉血管壁并有效表达与分泌至血浆。

**关键词:** 六氟化硫微泡; 脂联素; 动脉粥样硬化; 基因; 重组质粒  
doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.15.010

杨文凯, 陈庆, 杨春丽, 王现国, 谢霆, 董念国, 陈新忠. 六氟化硫微泡介导人脂联素基因的兔主动脉内转染及表达[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(15):2704-2708. [http://www.crter.org http://cn.zgckf.com]

## 0 引言

脂肪组织在机体能量代谢中起关键作用, 它可分泌多种特异性因子即脂肪因子<sup>[1]</sup>。其中相对分子质量约30 000的脂联素是脂肪组织分泌最多的脂肪因子, 在血液中以相对较高浓度循环<sup>[2]</sup>。研究发现脂联素具有抗动脉粥样硬化、改善胰岛素抵抗、抗炎症等特性<sup>[1]</sup>。内脏

肥胖患者脂联素循环浓度减少, 引起胰岛素抵抗和内皮功能紊乱。低脂联素是预测心脑血管病变新的危险因素, 且脂联素是迄今发现的与体脂含量呈负相关的唯一脂肪因子<sup>[3]</sup>, 提高体内血浆脂联素水平, 可抑制动脉粥样硬化的发展<sup>[4]</sup>。提示脂联素具有广阔的临床应用前景, 如何提高血浆脂联素水平已成为国内外心血管领域研究的热点之一。

基因转移方法可以提供长期、稳定的蛋白

表达产品。目前多采用重组腺病毒感染的方式补充血浆脂联素<sup>[4]</sup>。然而腺病毒载体的免疫原性、细胞毒性、致基因突变性等毒副作用使其临床应用的安全性受到质疑<sup>[5]</sup>。超声微泡载基因传输技术是一种新兴起的定向传输基因技术<sup>[6]</sup>，超声微泡对比剂对机体无毒害作用，为现代基因治疗提供了一种新的、安全的、非病毒性的转运手段，具有良好的应用前景。本实验旨在构建含人脂联素基因的真核表达载体，并拟用超声微泡六氟化硫微泡介导脂联素基因在体内无创、安全高效表达。

## 1 材料和方法

**设计：**动物实验观察。

**时间及地点：**于2010-06/2011-11在华中科技大学同济医学院实验中心完成。

**材料：**脂肪组织取自冠状动脉搭桥患者的心外膜脂肪，液氮冻存备用，患者对实验知情同意，实验符合医学伦理学标准。大肠埃希菌DH5 $\alpha$ 、pcDNA3.1(+)质粒为本实验室保存。健康新西兰大耳白兔21只，6~8月龄，雄性，体质量为1.6~2.0 kg，由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供，校外购买。实验过程中对动物的处置符合医学伦理学标准。人脐静脉内皮细胞系购自武汉大学典型培养物保藏中心(CCTCC)。

**主要仪器、试剂：**

试剂及仪器	来源
TRIZOL 试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、Takara 公司	
限制性核酸内切酶 <i>Bam</i> H I 和 <i>Xho</i> I	
质粒抽提试剂盒	OMEGA 公司
六氟化硫微泡(商品名：声诺维)	Bracco 公司
兔抗人脂联素抗体、人脂联素 ELISA 试剂盒	santa cruz 公司

**方法：**

**人脂肪组织总 RNA 提取：**按 TRIZOL (invitrogen公司)试剂盒说明书进行操作，从冻存的心外膜脂肪组织中提取总RNA，紫外分光光度计测定RNA的纯度及含量。

**反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)扩增人脂联素基因：**反转录合成脂联素基因 cDNA第一链。根据已报道的人脂联素基因序列(Genebank号：BC096308)，采用Primer 5.0软件设计引物，引物由上海生工公司合成，序列如下：

**上游引物：**TTTT GGATCC ATG CTG TTG CTG GGA GCT G，含 *Bam*HI酶切位点；下游

**引物：**TTTT CTCGAG TCA GTT GGT GTC ATG GTA GAG，含 *Xho* I 酶切位点。PCR扩增条件为：94 °C 变性2 min 后，以94 °C 1 min，55 °C 1 min，72 °C 2 min，反应25个循环。末轮循环后72 °C延伸5 min。扩增片段735 bp。取5  $\mu$ L反应产物置1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定后，DNA纯化试剂盒纯化PCR产物。

**pcDNA3.1-脂联素真核表达重组体的构建：**选用 *Bam*H I 和 *Xho* I 交叉双酶切pCDNA3.1和脂联素基因，1%琼脂糖凝胶电泳后，片段回收，将回收的脂联素片段及pCDNA3.1大片段按3~5：1摩尔比混合，加入T<sub>4</sub> DNA连接酶，16 °C水浴16 h进行片段连接。连接产物转化感受态细菌DH5 $\alpha$ ，行质粒小量制备，*Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切鉴定。取与预期相符的酶切结果所对应的菌种进行测序。将测序结果与GenBank公布的序列相比较。所得重组体命名为pcDNA3.1-脂联素。行质粒大量制备并纯化待用。

**人脐静脉内皮细胞的培养及pcDNA3.1-脂联素的瞬时转染：**采用含体积分数10%胎牛血清，2 mmol/L L-谷氨酸，100 U/mL链霉素和100 g/L青霉素的DMEM培养基，在37 °C，体积分数5%CO<sub>2</sub>培养箱内培养，每3 d传代1次。基因转染前，将6 $\times$ 10<sup>4</sup>细胞接种于六孔板，至细胞贴壁生长达70%，采用Lipofectamine 2000™试剂盒进行质粒转染。转染48 h后收集细胞提取总蛋白，行Western blot检测脂联素的表达。

**六氟化硫微泡传输pcDNA3.1-脂联素：**21只大白兔随机分成以下两组：对照组( $n=6$ )、脂联素转基因组( $n=15$ )。各组兔喂饲正常饲料。脂联素转基因组兔称质量，3%戊巴比妥钠以1 mL/kg耳缘静脉注射麻醉，超声仪确定兔胸腹主动脉位置，并将探头置于该处，1 mL pcDNA3.1-脂联素(1 g/L)与5 mL六氟化硫微泡充分混匀，室温静置15 min后，按1.2 mL/只从兔耳缘静脉缓慢注入，同时超声探头于定位处在MI:1.2，频率13 MHz，TI:1.0条件下，持续照射3 min，观察兔至其麻醉苏醒<sup>[8]</sup>。另外取1只对照组兔以同样方法进行pEGFP-C1基因转移，2 d后行主动脉快速冰冻切片，荧光显微镜检测以鉴定基因转染是否成功。

**冰冻切片荧光显微镜检测：**基因转染后2 d，取pEGFP-C1转基因兔胸腹主动脉，生理盐水漂洗，用OCT冰冻切片包埋剂包埋速冻，行快速冰冻切片，切片厚度为10  $\mu$ m，避光，立即

华中科技大学同济医学院附属协和医院，<sup>1</sup>心外科；<sup>3</sup>普外科，湖北省武汉市430022；江西省人民医院，<sup>2</sup>胸心外科；<sup>4</sup>ICU，江西省南昌市330006

杨文凯☆，男，1975年生，山东省新泰市人，汉族，1975年生，华中科技大学同济医学院在读博士，主治医师，主要从事心外科临床和基础研究方面的研究。  
doctor\_wenkaiyang@yahoo.com.cn

通讯作者：陈新忠，博士，主治医师，华中科技大学同济医学院附属协和医院心外科，湖北省武汉市430022  
xinzhongchen@yahoo.com.cn

中图分类号：R318  
文献标识码：A  
文章编号：1673-8225  
(2012)15-02704-05

收稿日期：2011-12-21  
修回日期：2012-01-27  
(20111221022/D·L)

送荧光显微镜观察荧光强度并拍照。该检测用于确定基因是否转至兔主动脉, 以便于确定是否进行后续实验组检测。

**Western blot 检测脂联素基因的表达:** 脂联素转基因组分别于基因转染后2, 7, 14 d各处死5只, 取主动脉血管组织, 以1:9(即100 μg组织加入900 μL)的比例加入蛋白匀浆提取液, 匀浆器制成10%的蛋白匀浆, 冰浴30 min, 4 °C, 12 000 r/min离心30 min, 取上清, 即为组织总蛋白提取液。BCA法测定提取液蛋白浓度。按样品:样品缓冲液为3:1比例混匀, 100 °C处理10 min, 冷却后备用。各取30 μg总蛋白进行7.5% SDS-PAGE后, 转至硝酸纤维素膜, 用含5%脱脂奶粉的1×TBST室温振荡封闭1 h, 1×TBST洗脱3次, 每次10 min。加入一抗(兔抗人脂联素的抗体, 1:2 000稀释), 4 °C轻摇孵育过夜, 1×TBST洗脱3次, 每次10 min, 加入二抗(羊抗兔, 1:5 000稀释)室温振荡孵育1 h, 洗膜, ECL检测。同时以β-actin做内参照。

**ELISA检测兔血清脂联素蛋白含量:** 上述留待14 d处死的5只脂联素转基因组兔, 分别于基因转染后2, 7, 14 d耳缘静脉各取血2 mL 1次, 2000 g离心10 min, 获取血清, 按ELISA检测试剂盒说明书操作, 检测兔血清中脂联素蛋白含量。

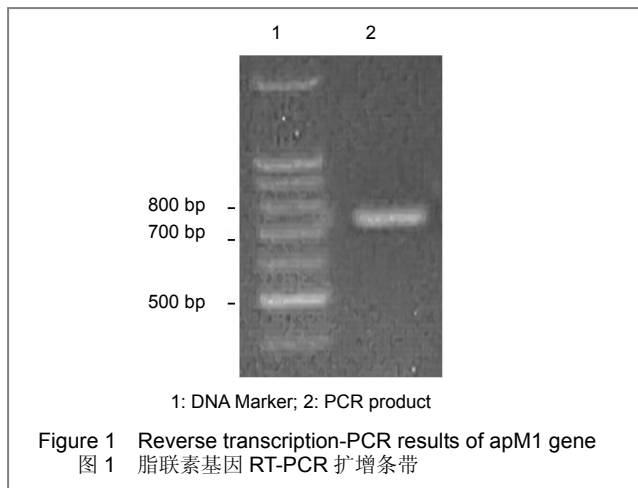
**主要观察指标:** ①构建及酶切鉴定脂联素基因真核表达重组体。②荧光显微镜和Western Blot检测脂联素重组体在人脐静脉内皮细胞及兔主动脉内的转染效率。③ELISA检测兔血液循环中的脂联素水平。

**统计学分析:** 全部数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用单因素方差分析, 用SPSS 12.0统计分析软件处理数据。

## 2 结果

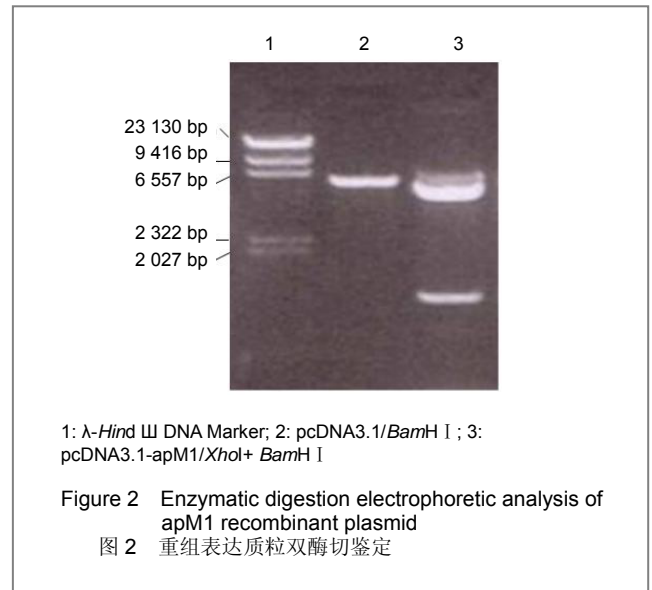
**2.1 实验动物数量分析** 纳入21只大白兔, 对照组6只, 脂联素转基因组15只, 实验过程中无脱落, 且转基因组兔均基因转染成功。

**2.2 脂联素基因的扩增** 见图1。

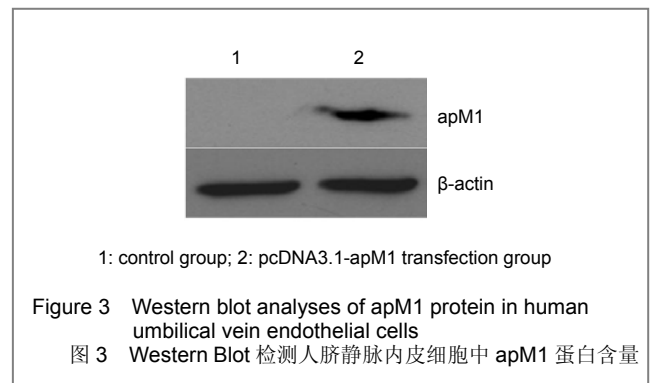


取RT-PCR产物5 μL置1.5%琼脂糖凝胶电泳, 可见清晰扩增条带, 结果表明扩增片段大小与预期相符。

**2.3 pcDNA3.1-脂联素重组体DNA测序鉴定结果** pcDNA3.1-脂联素经BamH I 和Xho I 双酶切后, 用1%琼脂糖凝胶电泳鉴定, 结果显示重组质粒经双酶切后产生的DNA小片段的大小与预期一致, 见图2, 测序鉴定报告结果与GenBank公布的序列一致, 证明重组体构建成功。

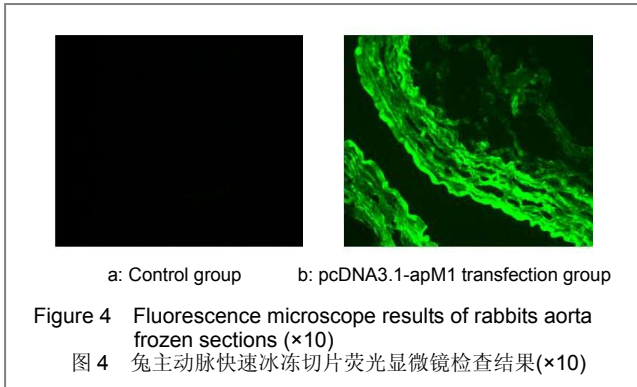


**2.4 人脐静脉内皮细胞中脂联素蛋白的 Western Blot 检测** 采用脂质体法将 pcDNA3.1-脂联素重组体瞬时转染人脐静脉内皮细胞 48 h 后, 裂解细胞抽提蛋白, 在总蛋白上样量一致的前提下采用脂联素单抗进行 Western blot 检测, 结果表明: 对照组未见明显条带, 基因转染组出现约 28 000 的显色条带, 见图 3, 说明 pcDNA3.1-脂联素质粒在人脐静脉内皮细胞中成功表达。

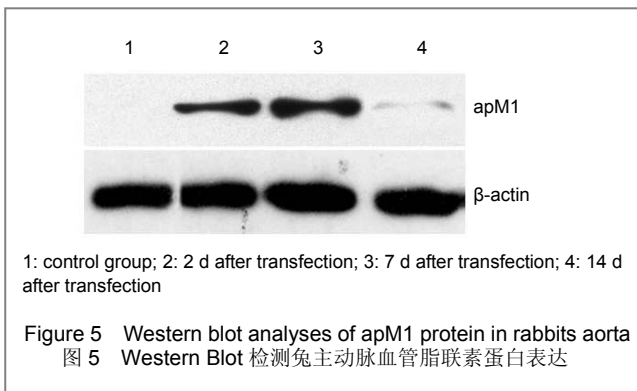


**2.5 荧光显微镜检测六氟化硫微泡传输pEGFP-C1的表达** 将pEGFP-C1(1 g/L)与六氟化硫微泡按200 μL:1 mL比例混匀, 室温静置15 min后, 经耳缘静脉注射, 同时采用诊断超声仪照射兔胸腹主动脉处

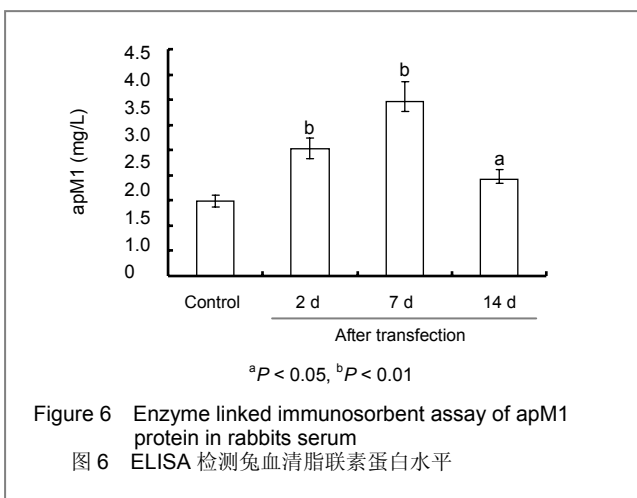
3 min, 于照光蛋白表达。结果显示兔主动脉血管壁全层均可见强荧光, 见图4, 表明六氟化硫微泡可有效传输基因至大血管并高效表达。在该结果支持下可进行后续检测。



2.6 兔主动脉脂联素蛋白的 Western Blot 检测 六氟化硫微泡传输 pcDNA3.1-脂联素重组体 2 d 后即可表达, 7 d 后仍显示高表达, 表达可持续至 14 d, 见图 5。



2.7 血清ELISA测定结果 见图6。



分别于六氟化硫微泡传输pcDNA3.1-脂联素重组体2, 7, 14 d后, 兔耳缘静脉取血, ELISA试剂盒检测兔血清中脂联素蛋白水平。结果显示, 对照组, 转染后2, 7, 14 d后兔血清中脂联素蛋白分别为(1.489±0.121), (2.532±0.208), (3.471±0.380), (1.923±

0.198) mg/L, 表明六氟化硫微泡传输pcDNA3.1-脂联素重组体可显著增加兔血清中脂联素蛋白含量, 差异有非常显著性意义( $P < 0.01$ ), 见图6。该结果与 Western Blot 检测结果一致, 六氟化硫微泡传输 pcDNA3.1-脂联素重组体入兔主动脉血管壁可有效表达并分泌脂联素至血浆。

### 3 讨论

目前已认识到脂肪不仅是贮存能量的“仓库”, 还是代谢活跃的内分泌器官: 可分泌脂联素、瘦素、肿瘤坏死因子 $\alpha$ 等诸多脂肪因子, 通过这些因子与心血管、肌肉、炎症细胞等进行对话, 调节机体的能量代谢及各种功能<sup>[7]</sup>。

脂联素是由脂肪细胞分泌的一种重要血浆蛋白, Cnop等<sup>[8]</sup>对182例研究对象进行检测, 结果显示, 血浆脂联素水平与腹部脂肪含量呈负相关。肥胖尤其是腹型肥胖者在脂肪容量增大的同时由成熟脂肪细胞合成分泌的脂联素反而减少。对于这一矛盾现象的调节机制尚不十分清楚, 推测脂联素在肥胖症患者中的表达可能存在某种负反馈机制。

众多迹象表明脂联素在能量代谢、胰岛素抵抗、动脉粥样硬化和炎症的形成等生理病理过程中发挥重要作用。注射重组脂联素可加速脂肪代谢<sup>[9]</sup>, 从而使肥胖动物体重减轻<sup>[10]</sup>。Berg等<sup>[11]</sup>将真核表达的脂联素通过腹腔注射入糖尿病小鼠模型可导致血糖的一过性下降。因此重组脂联素为临床对肥胖症、糖尿病和动脉粥样硬化的预防和治疗提供了新的思路 and 手段。与目前的治疗药物相比, 脂联素具有以下优点: ①可同时发挥降糖、降脂和抗炎3大作用, 尤其适于治疗代谢综合征。②由于肥胖患者常伴瘦素水平增高, 这正是瘦素等治疗肥胖及相关疾病效果不佳的重要原因之一; 而脂联素是惟一的一个在肥胖患者体内水平下调的脂肪因子<sup>[3]</sup>, 因此脂联素具有广阔的应用前景。但重组蛋白药物生产条件苛刻、服用复杂和价格昂贵, 蛋白注射后在体内存留时间较短, 限制了它的临床应用。

基因转移方法则可以提供长期、稳定的蛋白表达产品。Matsuda等<sup>[12]</sup>通过腺病毒局部表达脂联素蛋白, 可显著减轻脂联素缺陷小鼠因血管内皮损伤引起的内膜增生。Yamauchi等<sup>[4]</sup>对ApoE缺陷小鼠模型进行脂联素转基因治疗, 可显著抑制粥样斑块的形成。虽然国内外研究表明脂联素转基因治疗对心血管疾病具有一定疗效, 然而, 目前介导体内转基因治疗的载体仍不够理想, 例如病毒载体的免疫原性、细胞毒性、致基因突变性等, 使其临床应用的安全性受到质疑<sup>[5]</sup>。常用的非病毒载体转染效率又较低<sup>[13]</sup>。所以急需寻找安全、高效的脂联素基因在体传输载体及其释放系统。

近来研究发现, 超声微泡除了可作为超声诊断药剂之外, 还可作为一种新型的基因或药物靶向治疗载体。超声微泡转载基因传输技术成为一种新的定向传输基因技术<sup>[6]</sup>, 为基因治疗提供了新的载体选择, 具有很好的临床应用前景。在超声辐照下, 携带基因的超声微泡能在特定部位破裂释放, 所产生的空化效应可使靶细胞膜的通透性增加和增强微循环细胞连接, 以“声穿孔”效应介导外源基因的转染<sup>[14]</sup>, 极大地提高了靶组织的转基因效率。名六氟化硫微泡是一种超声微泡对比剂, 广泛应用于临床脏器诊断。已有研究证实了六氟化硫微泡微泡超声波转移药物和基因的可行性<sup>[15]</sup>。

本实验基于上述理论, 构建了含信号肽pcDNA3.1-脂联素真核表达重组体, 采用脂质体介导的pcDNA3.1-脂联素瞬时转染可在人脐静脉内皮细胞中有效表达脂联素, 表明pcDNA3.1-脂联素真核表达重组体构建成功。采用超声辐照下的六氟化硫微泡超声微泡传输脂联素基因, 结果表明, 在动脉血管内快速血流状态下, 可安全、高效传输脂联素基因入主动脉血管壁全层, Western Blot及ELISA检测显示脂联素基因可在动脉血管内有效表达并分泌至血浆, 该有效表达可持续14 d, 实现了长期、稳定提高血浆脂联素水平的目标, 建立了一种新的主动脉脂联素基因非病毒传输技术, 并可为后续实验进行基因治疗过程中, 确定基因传输的间隔时间打下基础。已有研究显示, 超声波可致微泡破灭, 产生空化作用, 增加细胞膜通透性及增宽内皮细胞间隙, 并可致直径小于7 μm的微血管破裂, 基因可通过破裂的微血管和内皮细胞间隙到达组织内<sup>[16]</sup>。推测六氟化硫微泡可利用这个机理传输基因入血管壁全层(图3)。本实验脂联素转基因兔在饲养过程中未见明显不适, 提示六氟化硫微泡传输脂联素的方法无明显转染毒副作用, 显著提高了基因转移的安全性; 且该方法创伤性小, 可重复操作, 为将来脂联素基因治疗提供方便。

综上所述, 超声辐照下的六氟化硫微泡可安全、高效传输脂联素基因至靶血管全层并高效表达, 可有效提高血液循环中脂联素蛋白水平。为临床动脉粥样硬化的特异性基因治疗提供了新思路, 具有广阔的临床应用前景。

尽管本实验可实现脂联素基因无创、安全、高效的体内转移, 为肥胖及相关疾病的特异性基因防治提供了新的途径和思路, 但仍存在以下问题: ①本实验选用的超声参数及基因微泡混合比例均是参考的国内外相关文献, 并未对参数进行优化, 有待今后进一步研究。②尚须进一步与腺病毒转染效率进行比较, 以明确超声辐照下六氟化硫微泡的基因传输效率, 并进一步监控其安全性。③尚须深入研究脂联素转基因治疗的作用机制及作用效果, 明确适于脂联素转基因治疗的组织、疾病类型等。

#### 4 参考文献

- [1] Lago F, Gómez R, Gómez-Reino JJ, et al. Adipokines as novel modulators of lipid metabolism. Trends Biochem Sci. 2009;34(10):500-510.
- [2] Scherer PE, Williams S, Fogliano M, et al. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. J Biol Chem. 1995;270(45):26746-26749.
- [3] Chandran M, Phillips SA, Ciaraldi T, et al. Adiponectin: more than just another fat cell hormone? Diabetes Care. 2003;26(8):2442-2450.
- [4] Yamauchi T, Kamon J, Waki H, et al. Globular adiponectin protected ob/ob mice from diabetes and ApoE-deficient mice from atherosclerosis. J Biol Chem. 2003;278(4):2461-2468.
- [5] Warnock JN, Daigre C, Al-Rubeai M. Introduction to viral vectors. Methods Mol Biol. 2011;737:1-25.
- [6] Yoon CS, Park JH. Ultrasound-mediated gene delivery. Expert Opin Drug Deliv. 2010;7(3):321-330.
- [7] Rajala MW, Scherer PE. Minireview: The adipocyte at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. Endocrinology. 2003;144(9):3765-3773.
- [8] Cnop M, Havel PJ, Utzschneider KM, et al. Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex. Diabetologia. 2003;46(4):459-469.
- [9] Yamauchi T, Kamon J, Waki H, et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. Nat Med. 2001;7(8):941-946.
- [10] Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, et al. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98(4):2005-2010.
- [11] Berg AH, Combs TP, Du X, et al. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. Nat Med. 2001;7(8):947-953.
- [12] Matsuda M, Shimomura I, Sata M, et al. Role of adiponectin in preventing vascular stenosis. The missing link of adipo-vascular axis. J Biol Chem. 2002;277(40):37487-37491.
- [13] Keriell A, Rene C, Galer C. Canine adenovirus vectors for lung-directed gene transfer: efficacy, immune response, and duration of transgene expression using helper-dependent vectors. Virol. 2006;80(3):1487-1496.
- [14] Dayton PA, Zhao S, Bloch SH, et al. Application of ultrasound to selectively localize nanodroplets for targeted imaging and therapy. Mol Imaging. 2006;5(3):160-174.
- [15] Zhou J, Wang Y, Xiong Y, et al. Delivery of TFPI-2 using ultrasound with a microbubble agent (SonoVue) inhibits intimal hyperplasia after balloon injury in a rabbit carotid artery model. Ultrasound Med Biol. 2010;36(11):1876-1883.
- [16] Shen YY, Gao ZG, Rapoport N. Recent advances in the applications of ultrasonic microbubbles as gene or drug vectors. Yao Xue Xue Bao. 2009;44(9):961-966.

#### 来自本文课题的更多信息--

**基金声明:** 国家自然科学基金项目(30872541); 博士点基金新教师项目资助课题(200804871116)。

**作者贡献:** 杨文凯负责实验动物喂养、Western Blot检测、成文及对文章负责, 陈庆负责 RT-PCR 及质粒构建, 杨春丽负责超声照射基因转染, 王现国负责 ELISA 检测, 谢霆负责细胞培养, 董念国进行实验评估, 陈新忠进行实验设计、资料收集及审核。

**伦理要求:** 实验过程中对动物的处置应符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

**本文创新性:** 通过超声微泡载基因传输技术, 利用临床常用的无毒的超声诊断用微泡及诊断超声仪, 即可实现脂联素基因的无创、安全、高效的体内转染, 这一技术可高效传输脂联素基因至靶血管壁全层并高效表达, 可有效提高血液循环中脂联素蛋白含量, 突破了重组脂联素蛋白生产条件苛刻、蛋白注射后在体内存留时间较短的限制, 为临床动脉粥样硬化的特异性基因治疗提供了新思路, 具有广阔的临床应用前景。