经心包腔途径转染提高大鼠体内心肌细胞转染的效率**★**

齐迎春，谢晓华，陈 雯，李朝晖

Improvement of transfection efficiency with plasmid transfected to the myocardium of rats intrapericardially *in vivo*

Qi Ying-chun, Xie Xiao-hua, Chen Wen, Li Zhao-hui

Abstract
BACKGROUND: It has always been the highlights to find how to accomplish safe, effective and extensive transfection of the myocardium.
OBJECTIVE: To explore a new feasible method for improving transfection efficiency of non-viral plasmids to the myocardium and for obtaining satisfactory myocardial targeting.
METHODS: We chose PLacZ as a report gene. Wistar rats were randomly divided into five groups: control group, intrapericardial group, intrapericardial negative group, sublingual vein group, sublingual vein negative group. For all the subsets of experiments, hearts were harvested at 6 days after injection. Tissues of heart, lung, liver and kidney were stained with X-gal, and PlacZ gene expression of the heart and other non-targeted organs was observed to decide the gene transfection status and myocardial targeting.
RESULTS AND CONCLUSION: After 6 days of transfection, only rats in the intrapericardial group were stained blue in parts of the myocardium on the atrial, ventricular and apex level. Other groups were negative for X-gal staining in the myocardium, lung, liver and kidney. The intrapericardial injection of microbubbles and some enzymes, as well as plasmids, with the aid of ultrasound, can improve transfection efficiency of plasmids significantly and the heart targeting is satisfactory.

Qi YC, Xie XH, Chen W, Li ZH. Improvement of transfection efficiency with plasmid transfected to the myocardium of rats intrapericardially in vivo. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(15): 2785-2788.
[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要
背景：如何获得安全、有效、广泛心肌组织的转染一直是国内外学者研究的热点。
目的：探讨能够改善动物水平心肌组织非病毒载体的转染效率、增强基因导入靶向性的方法。
方法：以β半乳糖苷酶质粒PLacZ作为报告基因，将Wistar大鼠随机分为5组：①空白组。②心包腔内组：心包腔注射质粒+微泡+酶混悬液，超声导入。③心包腔内阴性对照组：以生理盐水代替质粒干预。④舌下静脉组：舌下静脉注射质粒+微泡混悬液，超声导入。⑤舌下静脉阴性对照组：以生理盐水代替质粒干预。注射6 d后处死，进行心、肺、肝、肾组织的X-gal染色。
结果与结论：转染6 d后，仅有心包腔内组大鼠的部分心肌细胞在心尖、心室及心房水平可见明显的蓝染，其他各组大鼠心肌X-gal染色为阴性；各组大鼠肺、肝、肾组织X-gal染色均为阴性。提示采用心包腔内途径转染、再辅以超声微泡导入以及酶类的使用，可明显改善质粒对在体心肌细胞的转染效率，且不伴有心外组织目的基因的表达，具有较好的靶向性。

关键词：心包；心肌细胞；siRNA；RNAi；转染；基因
doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.15.027

齐迎春，谢晓华，陈雯，李朝晖. 经心包腔途径转染提高大鼠体内心肌细胞转染的效率[J].中国组织工程研究，2012，16(15): 2785-2788. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

First Department of Integrated Surgery, South Building, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China

Qi Ying-chun★, Master, Physician, First Department of Integrated Surgery, South Building, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China
shepherdessqi@hotmail.com

Corresponding author: Xie Xiao-hua, Master, Chief physician, Professor, Doctoral supervisor, First Department of Integrated Surgery, South Building, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China
n4xxh@126.com

Supported by: the Military Medical Science Foundation during the Tenth Five-year Period, No. 02Z0010*

Received: 2012-01-30
Accepted: 2012-03-02

0 引言

心血管疾病有较高的病死率、病残率，积极防治心血管疾病具有重要的临床及社会意义。目前，基因转染作为一种心血管疾病研究及治疗手段，已显示出其巨大的潜在价值[1-2]，难点在于心肌细胞属于有丝分裂后期细胞，转染难度相对较大，且对于心肌存在广泛病理改变的心肌肥大、心肌病、心力衰竭等疾病来说，只有心肌组织获得相对广泛地转染才可能达到研究及治疗目的。

实验采用相对安全的非病毒质粒载体[3]，以创伤较小的转染途径——心包腔内及外周静脉注射进行心肌组织转染，探讨一种能够改善质粒在动物水平心肌组织的转染效率、增强靶向性的转染途径。

1 材料和方法

设计：随机对照动物实验。

时间及地点：实验在解放军总医院南楼综合外一科实验室完成(生物安全的防护水平，BSL-2)。

材料：

实验动物：清洁级成年雄性Wistar大鼠9只，160~200 g，由军事医学科学院实验动物中心提供。

解放军总医院南楼综合外一科，北京市　100853

齐迎春★，女，1978 年生，辽宁省凌源市人，汉族，2001 年华北煤炭医学院毕业，硕士，医师，主要从事高血压心脏病的机制研究。
shepherdessqi@hotmail.com

通讯作者：谢晓华，硕士，主任医师，教授，博士生导师，解放军总医院南楼综合外一科，北京市100853
n4xxh@126.com

中图分类号:R318
文献标识码:B
文章编号:1673-8225(2012)15-02785-04

收稿日期: 2012-01-30
修回日期: 2012-03-02
(20120130009/W ·W)

主要试剂与仪器：

试剂及仪器	来源
质粒大提试剂盒	威格拉斯公司
PLacZ 对照质粒	Invitrogen
X-gal	TianGen
透明质酸酶、胶原酶Ⅱ	Sigma
声诺维微泡(Sonovue)	Bracco
亚铁氰化钾/铁氰化钾	益利公司
氨苄西林(100 mg/L)	齐鲁制药厂
Philip 5500 超声仪、S3 探头	Philip

实验方法：

实验动物分组：随机分为5组：①空白组(n=1)：心包腔内注射生理盐水750 μL，30 min~1 h后超声导入。②心包腔内组(n=3)：经腹心包内腔注射PLacZ质粒+微泡sonovue+酶混悬液750 μL，30 min~1 h后超声导入。③心包腔内阴性对照组(n=1)：用生理盐水代替PLacZ，与sonovue及酶混合后心包腔内注射，30 min~1 h后超声导入。④舌下静脉组(n=3)：缓慢经舌下静脉注射PLacZ+sonovue+酶，同时超声导入。⑤舌下静脉阴性对照组(n=1)：用生理盐水代替PLacZ，与sonovue及酶混合经舌下静脉注射，同时超声导入。所有动物术后均存活，于手术6 d后处死。

质粒抽提：PLacZ(500 mg/L)为表达半乳糖苷酶的报告基因质粒，转化TOP10 感受态大肠杆菌细胞，挑选单克隆扩增后大量提取，紫外分光法测定浓度及A比，A_{260}/A_{280}>1.8，琼脂糖凝胶电泳未见基因组DNA污染。

基因包载：以生理盐水稀释质粒(2 mg)至5 mL，注入sonovue微泡冻干粉瓶中，振摇混匀，形成SF6微泡(8 mL/L)。4 ℃孵育0.5~1.0 h使质粒黏附于微泡表面。

酶的配置：分别称取透明质酸酶0.8 mg和胶原酶Ⅱ1mg溶于生理盐水250 μL。心包腔内组大鼠注射500 μL质粒微泡悬液及250 μL酶溶液(共计750 μL[4])。舌下静脉组大鼠注射500 μL质粒微泡悬液，不与酶类混合。

质粒与微泡黏附情况检测：质粒微泡悬液(4 ℃孵育1 h)及质粒+微泡+酶悬液各取50 μL，另取用仅生理盐水配制的微泡悬液(无质粒或酶)50 μL作空白对照，加入0.5 μL GelRed，GelRed可与DNA结合并在紫外激发下发出荧光，使用荧光显微镜观察质粒与微泡的黏附情况。

经腹心包腔注射：参考既往报道的方法[4-5]，戊巴比妥钠腹腔注射麻醉(40 mg/kg)。固定消毒后，取上腹部中线切口2.0~3.0 cm，暴露膈肌，取自制套管针，以心脏上缘与肺交界、靠近镰状韧带处进针，水平向前刺入，有突破感后，撤出针芯，将质粒微泡及酶的混合液750μL注入心包腔内，拔出套管针，以无菌纱布按压针孔1.0~2.0 min，关腹。

超声导入：超声导入在心包腔内注射后30 min~1 h、舌下静脉注射的同时进行，方法如下：使用Philips5500超声仪、S3探头，心前区去毛后涂藕合剂，将探头垂直于心前区表面，照射参数为：二次谐波(频率为1.3/2.6 MHz)，机械指数(MI)1.6，深度4 cm，持续8 min，心电触发模式，每5个周期触发1次。

取材：以短轴切面分别切取心房、心室及心尖水平的心肌组织，并切取适当大小的肺、肝、肾组织，戊二醛固定，漂洗后加入X-gal液，37 ℃孵育24 h，进行X-gal染色，冰冻切片、苏木精-伊红复染后，观察心房、心室及心尖水平短轴切面的心肌组织X-gal染色情况，细胞胞浆蓝染为LacZ报告基因表达，目的基因转染成功。观察心外组织(肺、肝、肾组织)LacZ报告基因的转染情况，以说明目的基因心肌转染的靶向性。

主要观察指标：①质粒与微泡黏附结果。②心肌及肺、肝、肾组织X-gal染色结果。

2　结果

2.1　实验动物数量分析　实验选用Wistar大鼠9只，分为5组，无脱失，进入结果分析9只。

2.2　质粒与微泡黏附结果　见图1。

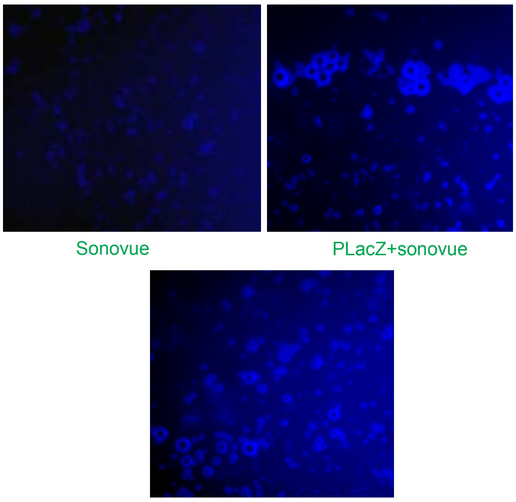

Figure 1　Electrophoresis of AQP4 expression detected by Western blot (×10)
图 1　质粒与微泡 sonovue 黏附情况的检测(×10)

荧光显微镜下可见：质粒与微泡sonovue孵育后，微泡的荧光增强，表面的光晕增厚，表明一定数量的质粒已经黏附于微泡表面；加入透明质酸酶和胶原酶Ⅱ溶液后，微泡的荧光强度无明显减弱，光晕厚度无明显减少，表明微泡的完整性及质粒与微泡的黏附均未受到明显影响。

2.3 心肌X-gal染色 光学显微镜下可见：所有空白对照组、心包腔内阴性对照组、舌下静脉注射组以及舌下静脉阴性对照组大鼠各个水平心肌组织均不着色；心包腔内组3只大鼠心房、心室、心尖水平部分外层心肌细胞胞浆均可见蓝染，表明目的基因的成功表达。见图2。

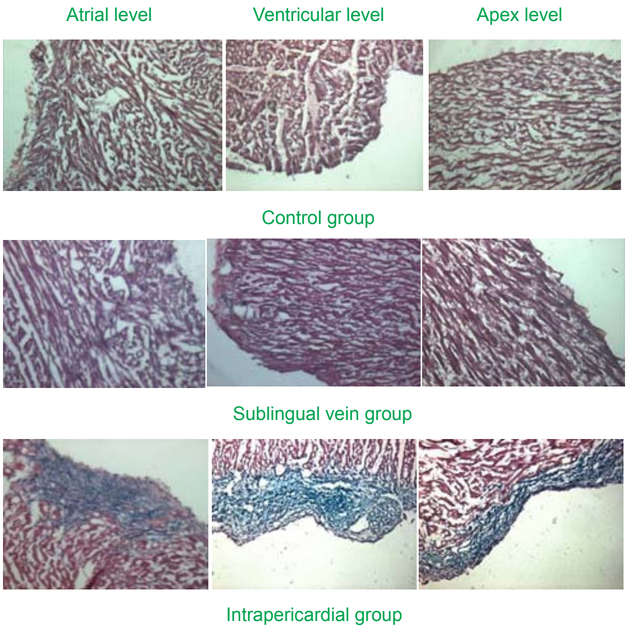

Figure 2 Counterstaining of the myocardium using X-gal staining and hematoxylin-eosin counterstaining (×10)
图 2 各组大鼠心肌组织 X-gal 染色、苏木精-伊红复染(×10)

2.4 肺、肝、肾组织X-gal染色 光学显微镜下可见：各组大鼠重要心外组织(肺、肝、肾)X-gal染色后均未见蓝染，表明以心包腔内注射途径、辅以超声微泡导入及酶类作用的方式转染，可提高非病毒质粒载体的转染效率，且具有一定的靶向性，不会引起其他重要脏器目的基因的表达。

3 讨论

基因转染成为目前有关心血管疾病的一种有巨大潜在价值的研究及治疗手段，但心肌组织基因转染难度相对较大，高效和高特异性安全的载体及转染方式一直是治疗和临床应用的一个瓶颈。

基因转染可以病毒载体或非病毒载体的方式进行[6]，病毒载体转染效率较高，表达时间长，但它制备复杂，有免疫原性，体内不能重复应用，且病毒基因产物对宿主细胞有一定的毒性，同时还有整合病毒所引起的整合突变、重组产生有复制能力的病毒等风险，相对来说，非病毒载体经济、易于构建、可大量生产、安全性较高(低毒性、无传染性及免疫原性)[7]，但是非病毒载体的转染效率远远低于病毒载体，如果能够改善非病毒载体的转染效率，它将比病毒载体更具有临床推广价值[8]。

转染途径也是直接影响转染效率的重要因素，最理想的转染途径应该是转染效率高、操作简便、创伤小、心肌转染靶向性高，目前的转染方式有：①心脏血管内注射途径[9]，即将载体溶液经主动脉根部/冠状动脉灌注、或经冠状静脉窦逆行灌注，一般来说，这种方式可以使载体最大程度上接触心脏局部的血液循环，获得相对较高的转染效率。但这种方法可产生心外组织目的基因的表达、对机体的损伤较大。②外周血管内途径，这种方法容易操作，创伤小，但转染效率低，而且心外组织器官表达目的基因的可能性显著增加，靶向性差[10]。③心内注射途径，其操作的难易程度、转染效率、转染靶向性介于上述两种方法之间，也可以同时结合主动脉/肺动脉血流阻断来改善转染效率及减少心外组织的表达[11]。④心肌内注射，容易操作、能够实现基因的定位转移，不易产生心外组织的基因表达[12]。但转染基因的表达仅局限于针刺部位及周围十分有限区域内，且可引起心肌损伤。⑤心包腔内注射法，又分经胸心包腔内注射法及经腹心包腔内注射法，这种方法操作相对简单，不易损伤心肌，其中经腹心包腔内注射法较经胸心包腔内注射法更容易、更安全，而且心包腔是一个封闭腔，延长心脏与基因载体的接触时间，有利于基因在心脏表达。Aoki等[13]采用心包内注射的方式，以HVJ (Hemagglutinating Virus of Japan)-Liposome为载体，获得了心包下层的心肌组织数层心肌细胞及纤维原细胞的转基因的表达。Fromes 等[4]以腺病毒为载体，与胶原蛋白酶和透明质酸酶同时注入Wistar大鼠心包腔，显著提高转染效率。

从安全、易操作角度考虑，本课题采用不良反应相对较小的非病毒载体，以外周静脉和心包腔内注射这两种创伤较小的途径进行在体心肌细胞的转染；从有效性考虑，作者借助声学对比剂微泡超声导入的方式以及酶类的辅助作用，来减轻心包脏层对转染的屏障作用，从而增加非病毒载体的转染效率。其中，超声微泡导入增加目的基因转染效率的方式越来越受到国内外学者的重视，其原理主要是携带载体的声学对比剂微泡在超声的作用下破裂，破裂的瞬间产生声孔效应，使载体容易到达目的组织[14]，它作为一种传输系统具有操作简单、损伤小、有一定靶向性等优点，最主要的是可以提高转染效率，弥补非病毒载体转染效率低的不足，具有广阔的临床应用前景[15-16]。声诺维Sonovue是一种新型超声

对比剂，内含六氟化硫(Csulfur hexalluoride，SF_6)气体，外被稳定的磷脂外壳，其坚硬度是空气气泡的2~4倍，90%的Sonovue微泡直径小于6 μm，99%的小于11 μm。SF_6是一种无害的惰性气体，水中溶解度极低，存在于肺毛细血管床内的99%气体能够经毛细血管进入肺泡，最后通过气道排出，在健康人体中即使反复经静脉注射后亦无蓄积。大量的临床研究已证实sonovue是一种优良的安全声学对比剂[17-18]。

本实验亦表明，心包腔内组3只大鼠在心房、心室、心尖水平均有部分心肌细胞目的基因的成功表达，并不伴有重要心外脏器组织，如肺、肝、肾组织的基因表达，靶向性好，所以作者认为采用心包腔内途径注射的方法，再辅以超声微泡导入以及酶类的使用，可明显改善质粒对在体心肌细胞的转染效率，并具有较好的靶向性。同时，心包内注射的方法具有操作简便、对机体损伤小等优点，可以重复应用并获得最终的治疗目的，适于临床推广。如果能够进一步改善转染效率(如辅以酶类及适当载体的应用)、进一步增加心肌转染的靶向性(如使用心肌特异性启动子)，这种方法就会表现出更大的临床广泛心肌细胞转染的潜力，本实验所涉及的载体用量及超声导入的各个参数优化还需要更加深入的研究，以获得更为满意的转染效果。

4 参考文献

[1] Lavu M, Gundewar S, Lefer DJ. Gene therapy for ischemic heart disease.J Mol Cell Cardiol. 2011;50(5):742-750.
[2] Meloni M, Descamps B, Caporali A,et al.Nerve growth factor gene therapy using adeno-associated viral vectors prevents cardiomyopathy in type 1 diabetic mice.Diabetes. 2012;61(1): 229-240.
[3] Higgins LJ, Hwang GL, Rosenberg J, et al. In vitro design and characterization of the nonviral gene delivery vector iopamidol, protamine, ethiodized oil reagent. J Vasc Interv Radiol. 2011; 22(10):1457-1463.
[4] Fromes Y, Salmon A, Wang X, et al .Gene delivery to the myocardium by intrapericardial injection. Gene Ther.1999,6(4): 683-688.
[5] Hui HP, Li XY, Peng J. Yixue Yanjiusheng Xuebao,2005;18(10): 879-881
惠海鹏,李小鹰,彭江.大鼠经腹心包腔内注射术的研究[J]. 医学研究生学报, 2005, 18(10):879-881.
[6] Kamimura K, Suda T, Zhang G, et al. Advances in Gene Delivery Systems. Pharmaceut Med. 2011;25(5):293-306.
[7] Roques C, Fattal E, Fromes Y. Comparison of toxicity and transfection efficiency of amphiphilic block copolymers and polycationic polymers in striated muscles. J Gene Med. 2009; 11(3):240-249.
[8] Guo X, Huang L. Recent Advances in Nonviral Vectors for Gene Delivery. Acc Chem Res. 2011 Aug 26. [Epub ahead of print]
[9] O'Donnell JM, Lewandowski ED.Efficient, cardiac-specific adenoviral gene transfer in rat heart by isolated retrograde perfusion in vivo Gene Ther.2005;12,958-964.
[10] Smith RS Jr, Agata J, Xia CF, et al.Human endothelial nitric oxide synthase gene delivery protects against cardiac remodeling and reduces oxidative stress after myocardial infarction. Life Sci. 2005; 76(21):2457-2471.
[11] Shinmura K, Morishita R, Aoki M,et al.Catheter-Delivered In Vivo Gene Transfer into Rat Myocardium Using the Fusigenic Liposomal Mediated Method. Jpn Heart J. 2000;41(5):633-647.
[12] Gwon HC, Jeong JO, Kim HJ,et al. The feasibility and safety of fluoroscopy-guided percutaneous intramyocardial gene injection in porcine heart. Int J Cardiol. 2001;79(1):77-88.
[13] Aoki M, Morishita R.Efficient In Vivo Gene Transfer into the Heart in the Rat Myocardial Infarction Model Using the HVJ (Hemagglutinating Virus of Japan)-Liposome Method. J Mol Cell Cardiol. 1997,29(3):949-959.
[14] Ren JL, Xu CS, Zhou ZY, et al. A Novel Ultrasound Microbubble Carrying Gene and Tat Peptide:Preparation and Characterization. 2009;(12):1457-1465.
[15] Chen ZY, Sun XF, Liu JQ, et al. Augmentation of transgenic expression by ultrasound mediated liposome microbubble destruction. Mol Med Report.2012;5(4):964-970.
[16] Taniyama Y, Azuma J, Rakugi H, et al. Plasmid DNA-based gene transfer with ultrasound and microbubbles. Curr Gene Ther. 2011; 11(6):485-490.
[17] 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.
[18] Li XH, Zhou P, Wang LH, et al. The targeted gene (KDRP-CD/TK) therapy of breast cancer mediated by SonoVue and ultrasound irradiation in vitro. Ultrasonics. 2012;52(1):186-191.

来自本文课题的更多信息--

基金声明：军队“十五”医药卫生科研基金重点课题(02Z0010)。

作者贡献：实验设计为第二作者，实施为第一、三作者，评估者为第一、三、四作者。盲法评估。

利益冲突：课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

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

文章概要：

文章要点：超声微泡导入及酶类的应用，可增加心包腔内注射途径非病毒载体的转染效率。

关键信息：非病毒载体、以心包腔内注射途径，辅以超声微泡导入及酶类的应用，可增加质粒的转染效率，而且操作损伤小。

研究的创新之处与不足：选择非病毒载体、心包腔内注射途径，辅以超声微泡导入及酶类的应用，改善了质粒的转染效率，并具有一定的靶向性。有待于优化超声参数、质粒用量及重复应用效果。