

超声微泡介导pEGFP-N1转染大鼠牙囊细胞：细胞生物学性质相对稳定

冉玲¹，李晓倩²，蒋欣益³，邓锋¹，宋锦璘¹，曹礼¹(¹重庆医科大学附属口腔医院，口腔疾病与生物医学重庆市重点实验室，重庆市 401147; ²重庆三峡中心医院口腔分院，重庆市 404199; ³四川省绵阳市中心医院口腔科，四川省绵阳市 621000)

文章亮点：

1 实验分离培养了大鼠牙囊细胞，并首次探讨了不同超声参数组合介导 pEGFP-N1 质粒转染大鼠牙囊细胞的影响。

2 文章重点探讨了强度为 0.5 W/cm² 且辐照时间为 30 s 的超声组合介导 pEGFP-N1 质粒对大鼠牙囊细胞转染率的影响，并与传统脂质体介导下的转染率和细胞活力比较。得出超声微泡能安全、高效介导 pEGFP-N1 质粒转染大鼠牙囊细胞，且细胞生物学性质相对稳定，可为牙周组织工程提供一种较理想的基因转染方法。

关键词：

干细胞；培养；超声辐照；微泡；大鼠牙囊细胞；基因转染

主题词：

牙囊；高能量冲击波；基因；转染

基金资助：

国家自然科学基金资助项目(30870754)；重庆市教委第二批优秀专业技术人才资助项目(渝教人 2010[72])

摘要

背景：利用超声波和微泡对比剂相互作用，产生空化效应和机械效应，破坏细胞膜的完整性，产生暂时性、可逆性的小孔，增加细胞膜的通透性，增强微泡载体对基因的转移，提高基因转染率。

目的：探讨在超声波辐照下微泡对比剂介导 pEGFP-N1 质粒转染 SD 大鼠乳鼠牙囊细胞的效率及安全性。

方法：体外原代培养新生 SD 大鼠牙囊细胞并传至第 4 代，在不同条件下采用 pEGFP-N1 质粒转染乳鼠牙囊细胞。以不同的超声辐照时间(15, 30, 45, 60 s)和辐照强度(0.5, 1 W/cm²)两两组合进行辐照，筛选较高转染效率的参数组合并应用于后续实验。实验分组为质粒组、微泡+质粒组、超声+质粒组、超声+微泡+质粒组和脂质体+质粒组。转染 48 h 后倒置荧光显微镜观察 pEGFP 表达，MTT 法检测转染后的乳鼠牙囊细胞增殖抑制率。

结果与结论：超声强度为 0.5 W/cm² 且辐照时间为 30 s 时转染率明显高于其他超声参数组合。该条件下超声微泡介导 pEGFP-N1 质粒对乳鼠牙囊细胞的转染率高于传统脂质体介导的转染率，且对细胞活力无明显影响。提示超声微泡能安全、高效介导 pEGFP-N1 质粒转染大鼠牙囊细胞，其细胞生物学性质相对稳定，可为牙周组织工程提供一种较理想的基因转染方法。

冉玲，李晓倩，蒋欣益，邓锋，宋锦璘，曹礼. 超声微泡介导 pEGFP-N1 转染大鼠牙囊细胞：细胞生物学性质相对稳定[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(50):8151-8155.

pEGFP-N1 transfection of rat dental follicle cells under ultrasound-mediated lipid microbubble: transfected cells have a relatively stable biological property

Ran Ling¹, Li Xiao-qian², Jiang Xin-yi³, Deng Feng¹, Song Jin-lin¹, Cao Li¹ (¹Affiliated Hospital of Stomatology, Chongqing Medical University, Chongqing Key Laboratory for Oral Diseases and Biomedical Sciences, Chongqing 401147, China; ²the Stomatological Hospital of Chongqing Three Gorges Central Hospital, Chongqing 404199, China; ³Department of Stomatology, Mianyang Central Hospital, Mianyang 621000, Sichuan Province, China)

Abstract

BACKGROUND: With the interaction of ultrasound and microbubbles, cavitation and mechanical effects undermine the integrity of the cell membrane, resulting in temporary and reversible holes, increasing the permeability of cell membranes, enhancing gene transfer and improving gene transfection efficiency.

OBJECTIVE: To investigate the efficiency and safety of rat dental follicle cells transfected with pEGFP-N1 plasmid mediated by microbubble under ultrasonic irradiation.

METHODS: The primary dental follicle cells from newborn rats were cultured in vitro and passaged to the 4th generation. Under different conditions, pEGFP-N1 was used to transfect rat dental follicle cells. By combining the ultrasonic intensity (0.5, 1 W/cm²) with the irradiation time (15, 30, 45, 60 seconds), we got the best conditions of ultrasonic irradiation for the next experiment. There were five groups: plasmid, microbubble+plasmid, ultrasound+plasmid, ultrasound+microbubble+plasmid, and liposomes+plasmid groups. The expression of pEGFP was observed by inverted fluorescence microscope 48 hours after transfection, and meanwhile, the proliferation inhibition rate of rat dental follicle cells was determined by MTT method.

冉玲，女，1985 年生，四川省内江市人，汉族，重庆医科大学在读硕士，主要从事牙周组织工程再生研究。

通讯作者：宋锦璘，博士，教授，主任医师，硕士生导师，重庆医科大学附属口腔医院，口腔疾病与生物医学重庆市重点实验室，重庆市 401147

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.50.020
[http://www.crter.org]

中图分类号:R394.2

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2014)50-08151-05

稿件接受: 2014-11-18

Ran Ling, Studying for master's degree, Affiliated Hospital of Stomatology, Chongqing Medical University, Chongqing Key Laboratory for Oral Diseases and Biomedical Sciences, Chongqing 401147, China

Corresponding author: Song Jin-lin, M.D., Professor, Chief physician, Master's supervisor, Affiliated Hospital of Stomatology, Chongqing Medical University, Chongqing Key Laboratory for Oral Diseases and Biomedical Sciences, Chongqing 401147, China

Accepted: 2014-11-18

RESULTS AND CONCLUSION: Under the 0.5 W/cm² ultrasound for 30 seconds, the transfection efficiency was obviously higher than that under the other combinations. Under the above-mentioned condition, the transfection efficiency of rat dental follicle cells with pEGFP-N1 plasmid was higher than that mediated by the traditional liposome, and the cell viability had no obvious changes. Under suitable conditions, ultrasound microbubble technology can safely and effectively mediate the transfection of rat dental follicle cells with pEGFP-N1 plasmid, and transfected cells also have a stable biological property as normal dental follicle cells. Therefore, ultrasound microbubble technology can provide an ideal method of gene transfection in periodontal tissue engineering.

Subject headings: dental sac; high-energy shock waves; genes; transfection

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 30870754; the Second Batch of Outstanding Technical Personnel of Chongqing Municipal Education Commission, No. 2010[72]

Ran L, Li XQ, Jiang XY, Deng F, Song JL, Cao L. pEGFP-N1 transfection of rat dental follicle cells under ultrasound-mediated lipid microbubble: transfected cells have a relatively stable biological property. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(50):8151-8155.

0 引言 Introduction

种子细胞、生长因子与支架材料是牙周组织工程的三大要素^[1]。牙囊细胞(dental follicle cell, DFC)系较好的牙周组织工程种子细胞来源之一^[2], 其特异的、高亲和的膜受体与生长因子结合, 产生促进增殖和成骨分化的效应^[3]。外源性生长因子很难达到效用浓度, 且存在免疫原性^[4]。将生长因子基因片段导入靶细胞内, 有利于获得生长因子持续高效发挥作用, 但不同转染方法具有不同效率。根据载体的不同, 基因转染分为病毒类和非病毒类, 两者均存在不足。超声微泡技术的出现带给基因转染新的方向, 其利用超声波和微泡对比剂相互作用, 产生空化效应和机械效应, 通过增加细胞膜的通透性以增强基因转染效率。

目前, 应用超声微泡介导外源基因转染靶细胞已较为成熟^[5], 但应用于牙囊细胞的转染尚未见相关报道。寻求最佳超声参数组合, 获得牙囊细胞安全高效率的转染对于牙周组织工程极为关键^[6]。因此, 探讨不同超声参数条件下, 破裂微泡介导pEGFP-N1质粒转染大鼠牙囊细胞的效率及对细胞活性的影响, 获得一种安全高效的基因转染方法, 将为牙周组织工程基因转染提供重要的参考依据。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 分组对照观察细胞学实验。

时间及地点: 实验于2012年9月至2013年6月在重庆医科大学完成。

材料:

动物实验: 六七天龄SD乳鼠10只, 雌雄不限, 由重庆医科大学实验动物中心提供。

实验方法:

大鼠牙囊组织的获取及细胞培养: 取10只新生六七天的SD乳鼠, 麻醉后引颈法处死, 外科法取出下颌骨, 置入PBS(含青霉素, 链霉素)。在解剖显微镜下分离出下颌第1磨牙牙胚, 进一步分离出牙囊。倒置显微镜下观察细胞自组织块爬出, 待覆盖瓶底60%~70%进行首次传代。首次传代后, 经0.25%胰酶1.0~2.0 mL和DMEM处理, 转移细胞悬液离心(1 000 r/min×5 min), 按1:2或1:3传代接种培养(胎

超声微泡介导pEGFP-N1转染大鼠牙囊细胞实验所用细胞、质粒、试剂及仪器:

细胞、质粒及仪器	来源
DH5α感受态细胞和pEGFP-N1质粒	重庆海韵生物科技有限公司提供
超声辐照仪(超声发射频率300 kHz, 声强范围0.5~2.0 W/cm ² , 可连续或间断发射, 时间精确到秒)	重庆医科大学超声研究工程研究所研制
倒置荧光显微镜及照相系统	Olympus, 日本
核酸电泳仪: Bio. RadPower/PAC200电泳仪	美国
-80 °C超低温冰箱	中国海尔集团
六氟化硫微泡对比剂	意大利Bracco公司
胎牛血清、DMEM培养基(高糖)	HyClone, USA
去内毒素质粒提取试剂盒	康为世纪生物

牛血清, DMEM培养基, 体积分数5% CO₂、37 °C饱和湿度的培养箱)。

大鼠牙囊细胞来源鉴定: 取第4代乳鼠牙囊细胞消化后, 显微镜下观察细胞形态。采用免疫组织化学SP法, DAB显色, 进行细胞波形丝蛋白和细胞角蛋白单克隆抗体染色, 显微镜下观察; 苏木精复染细胞核, 甘油封固, 显微镜下观察并拍照。

质粒pEGFP-N1的获取和鉴定: 采用感受态细菌DH5α转化质粒pEGFP-N1, 利用卡那霉素挑取质粒转化阳性菌落, 然后扩增, 参照去内毒素质粒提取试剂盒说明书抽提质粒, 采用0.8%琼脂糖凝胶电泳鉴定, 以4.7 kb位置出现特异片段为目标分子。

实验分组: 依据不同超声辐照时间(15, 30, 45, 60 s)、不同辐照强度(0.5, 1 W/cm²)为依据共分成8组, 筛选出较高转染效率的参数组合。取第4代乳鼠牙囊细胞, 在不同条件下pEGFP-N1质粒转染乳鼠牙囊细胞。具体如下: 质粒组、微泡+质粒组、超声+质粒组、超声+微泡+质粒组和脂质体+质粒组。根据已经获得的实验结果, 选择转染率高于脂质体转染效率的超声参数组合6组和脂质体组进行转染并测定增殖抑制率。以上各组均重复3次, 以排除实验偶然性的影响。

表 1 超声强度 0.5 W/cm²、辐照时间 30 s 时各组的平均转染率

Table 1 Average transfection efficiency when the ultrasound intensity was 0.5 W/cm² and the irradiation time was 30 seconds ($\bar{x} \pm s$, %)

组别	平均转染率
质粒组	0.70±0.67
微泡+质粒组	0.31±0.09 ^a
超声+质粒组	0.40±0.52
超声+微泡+质粒组	26.82±1.26 ^a
脂质体+质粒组	6.48±0.77 ^a

表注: 超声(0.5 W/cm², 30 s)+微泡+质粒组平均转染率最高, 微泡+质粒组平均转染率最低。与单纯质粒组比较, ^aP < 0.05。

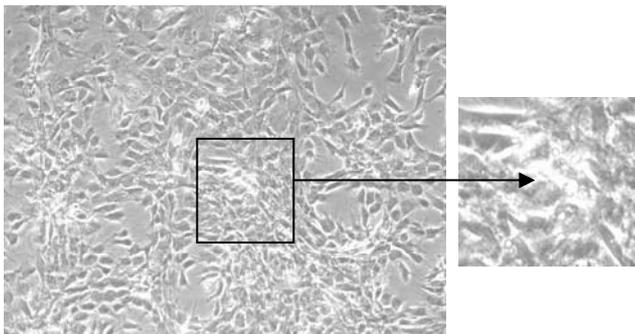


图 1 SD 大鼠乳鼠第 4 代牙囊细胞(×100)

Figure 1 The 4th generation of neonatal rat dental follicle cells (×100)

超声微泡与脂质体介导 pEGFP-N1 质粒对乳鼠牙囊细胞的转染

制取质粒-微泡悬液中质粒浓度约为 10 mg/L, 微泡浓度约为 45 mg/L。取第 4 代 1.0×10⁶ 浓度牙囊细胞按加入 24 孔培养板内(每间隔一孔传代, 以免超声探头发射超声时可能带来的邻间孔的影响)。培养 24 h 后观察, 待细胞生长状态良好, 并覆盖培养板底部面积达 80% 以上时, 换入无血清、无抗生素的 DMEM 培养液 400 μL, 依次向各孔中加入 100 μL 微泡对比剂和质粒的混合悬液。超声探头通过耦合剂紧贴培养板底部, 依照实验设计进行不同条件的超声辐照。

不同超声参数组合和脂质体介导 pEGFP-N1 质粒对乳鼠牙囊细胞转染率的测定: 细胞转染 48 h 后, 光镜和倒置荧光显微镜下观察, 转染后 EGFP 荧光表达。随机抽取 10 个 100 倍的均匀分布的视野, 计算每个视野内的细胞总数和转染阳性细胞数, 取平均值计算转染率: 转染细胞百分率=(表达 EGFP 的细胞数/总细胞数)×100%。

超声微泡介导转染安全性检测: 转染 48 h 后行 MTT 法检测, 测定 A 值, 根据公式计算转染后细胞增殖抑制率。

$$\text{增殖抑制率} = 1 - \frac{(\text{实验组 A 值} - \text{空白组 A 值}) - (\text{转染前 A 值} - \text{空白组 A 值})}{(\text{对照组 A 值} - \text{空白组 A 值}) - (\text{转染前 A 值} - \text{空白组 A 值})}$$

主要观察指标: ①牙囊细胞形态学观察。②细胞来源免疫组织化学的鉴定结果。③不同超声辐照时间和强度的转染率。④超声与脂质体介导 pEGFP-N1 质粒的转染率。⑤转染后细胞增殖抑制率。

统计学分析: 根据资料数据采用单因素方差分析比较

表 2 不同超声强度、不同照射时间乳鼠牙囊细胞的增殖抑制率比较
Table 2 Proliferation inhibition rates of rat dental follicle cells under different ultrasonic intensities and irradiation time ($\bar{x} \pm s$, %)

组别	声强(W/cm ²)	辐照时(s)	增殖抑制率
超声+微泡+质粒组	0.5	15	0.21±0.02 ^a
	0.5	30	0.27±0.01 ^a
	0.5	60	0.31±0.04 ^a
	1.0	15	0.28±0.01 ^a
	1.0	30	0.30±0.02 ^a
	1.0	45	0.34±0.03 ^a
脂质体+质粒组			0.23±0.05 ^a

表注: 除声强为 0.5 W/cm² 辐照 15 s 外, 其余声强为 0.5 W/cm²、1 W/cm² 辐照时间乳鼠牙囊细胞增殖抑制率均高于脂质体+质粒组。两两比较, ^aP < 0.05。

多组样本均数后, 进一步用 LSD(Least-Significant Difference)-t 检验对各组指标值进行两两比较, 分析声强与辐照时间的交互和单独效应。使用 SPSS 18.0 软件进行分析, P < 0.05 时, 差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 牙囊细胞形态学表现 乳鼠牙囊细胞形态呈长梭形, 胞体较丰满, 细胞核仁清晰, 核呈圆形。培养至第 4 天, 组织块大部分脱落, 大量不规则多角形或梭形细胞在原组织块贴壁处生长, 呈旋涡状或放射状紧密排列, 相互接触, 呈现典型的成纤维细胞表型(图 1)。

2.2 细胞来源免疫组织化学的鉴定结果 第 4 代乳鼠牙囊细胞, 免疫组织化学鉴定结果显示细胞波形丝蛋白染色呈阳性, 细胞胞浆棕黄色着色(图 2A, B); 角蛋白染色呈阴性, 细胞胞浆透亮未着色(图 2C, D); 以上结果证明所培养细胞来源于外胚间充质, 结合取材部位及形态学观察能证明该细胞是乳鼠牙囊细胞。

2.3 不同超声辐照时间和强度的转染率 各组单独使用方差分析结果显示: 不同组别的指标值比较的 F 值为 1 128.721, 对应的 P < 0.05, 说明不同组别的指标值差异具有显著性意义。进一步使用 LSD-t 检验法进行两两比较时具体转染结果见图 3。

超声强度为 0.5 W/cm²、辐照时间为 30 s 时转染率明显高于其他各组; 超声强度为 1 W/cm²、辐照时间为 60 s 时转染率最低; 超声强度 0.5 W/cm²、辐照时间 15 s 组与超声强度 1 W/cm²、辐照时间 30 s 组数值比较差异无显著性意义 (P > 0.05)。

2.4 超声与脂质体介导 pEGFP-N1 质粒的转染率 超声 (0.5 W/cm², 30 s)+微泡+质粒组平均转染率最高, 微泡+质粒组平均转染率最低; 单纯质粒组即空白对照组与质粒+超声组比较, 差异无显著性意义 (P > 0.05); 脂质体转染组平均转染率低于超声微泡+质粒组, 但明显高于其他几组, 见表 1。

超声 (0.5 W/cm², 30 s)+微泡+质粒组的光镜下图片见图 4A, 荧光图片见图 4B。

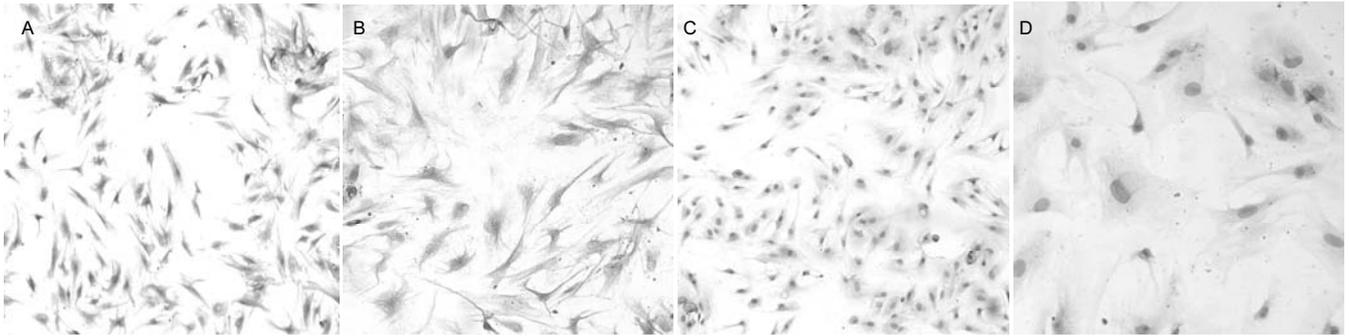


图2 SD大鼠乳鼠第4代牙囊细胞免疫组织化学鉴定结果

Figure 2 Immunohistochemistry identification of passage 4 dental follicle cells from newborn rats

图注: 图A为波形丝蛋白染色阳性($\times 100$); B为波形丝蛋白染色阳性($\times 200$); C为角化蛋白染色阴性($\times 100$); D为角化蛋白染色阴性($\times 200$). 结果证明所培养细胞是乳鼠牙囊细胞。

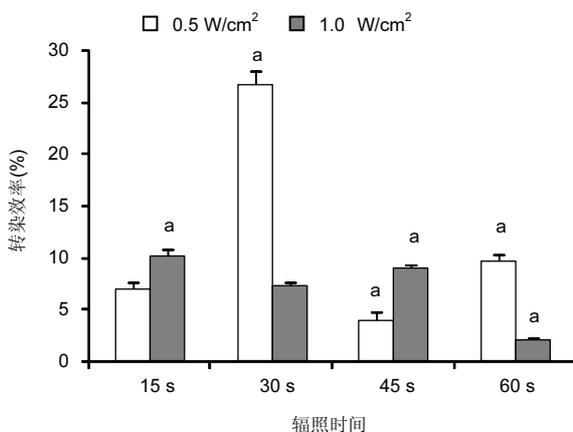


图3 不同超声强度和辐照时间大鼠牙囊细胞的平均转染率

Figure 3 Average transfection efficiency of rat dental follicle cells under different ultrasound intensities and irradiation time

图注: 超声强度为 0.5 W/cm^2 、辐照时间为 30 s 时转染率明显高于其他各组; 超声强度为 1 W/cm^2 、辐照时间为 60 s 时转染率最低。与超声强度 0.5 W/cm^2 、照射时间 15 s 比较, $^a P < 0.05$ 。

2.5 转染后细胞增殖抑制率 MTT法检测超声强度为 0.5 W/cm^2 、 1 W/cm^2 时乳鼠牙囊细胞转染率高于脂质体的6组组合和脂质体组的细胞增殖抑制率, 结果见表2, 各组分别两两比较差异均有显著性意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论 Discussion

牙囊细胞是牙齿分化发育的前体细胞, 临床来源丰富——智齿拔除, 系具有良好应用前景的牙周组织工程种子细胞来源之一^[7-8]。牙周组织工程研究的种子细胞应具体数量丰富并且细胞表型和生物学性质稳定的特点^[9]。体外培养的牙囊细胞在传代初期生长速度较快, 且混有少量上皮样细胞; 传代四五次后, 细胞开始纯化。第4-6代细胞生长趋于稳定, 适于对细胞施加各种影响因素并进行实验研究。

基因转染中, 转染率和细胞安全性是两个同等重要的参数, 其关键在于寻找安全高效的基因载体。在载体的选择方面, 病毒类载体转染率高, 但安全问题限制其在基因治疗中的应用; 而非病毒类载体相对安全, 但转染率相对较低^[10]。

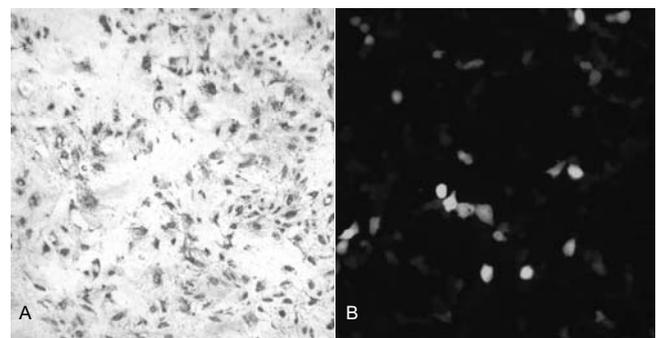


图4 超声强度 0.5 W/cm^2 、辐照时间 30 s 时大鼠牙囊细胞光镜和荧光镜下图片($\times 100$)

Figure 4 Light and fluorescence microscope images of rat dental follicle cells under 0.5 W/cm^2 ultrasound for 30 seconds ($\times 100$)

图注: 图A为超声+微泡+质粒组光镜下图片; B为超声+微泡+质粒组荧光镜下表达。

超声微泡转染技术的出现为转基因技术带来新的希望, 孙钦峰和Wang等^[11-12]学者研究表明, 超声辐照可提高目的基因在体外和体内的转染与表达, 且具有靶向性。这种新型基因转导方式的机制主要是超声波的“空化效应”和“声孔机制”, 超声波使细胞膜产生“可逆性”小孔, 微泡内的气体能降低空化阈值, 更利于微泡破溃释放携带基因, 基因通过细胞膜上开放的小孔进入细胞, 实现基因的转移。微泡膜由磷脂材料制成且泡内含氟惰性气体, 使其有较好的组织相容性、保护质粒DNA不被分解, 更具良好稳定性。

细胞膜通透性的改变主要取决于声强和辐照持续时间, 但是强度过高或辐照时间过久会导致细胞死亡^[13-14]。本实验选取 0.5 W/cm^2 和 1 W/cm^2 两个声强、辐照时间为 1 min 以内的超声波结合微泡对比剂对乳鼠牙囊细胞进行转染, 发现 0.5 W/cm^2 的超声辐照 30 s 时转染率最高, 1 W/cm^2 的超声辐照 60 s 转染率最低, 而声强 0.5 W/cm^2 、照射时间 15 s 组和声强 1 W/cm^2 、辐照时间 30 s 组对比差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。同时, 研究发现相同超声强度下转染率与辐照时长并无正比例关系, 与区文超等^[15]发现超声辐照 30-60 s 时心肌细胞转染率最高, 而延长辐照时间后心肌细胞转染率并无明显提高。脂质体法是最常用非病毒

类转染法之一。

实验选用目前被广泛应用的Invitrogen 2000, 作为对照, 发现超声微泡作为载体的牙囊细胞转染率显著高于脂质体介导转染($P < 0.05$), 且对牙囊细胞生长的不利影响与脂质体介导转染无统计学差异($P > 0.05$)。表明超声微泡介导的基因转染具有一定的高效性和安全性。超声微泡组转染效率最高, 可能是超声微泡的相互作用机制和微泡的特定结构实现的。研究结果发现, 在其他条件不变的情况下, 随辐照时间的延长、声强的增大细胞存活率降低, 与超声微泡作用于其他细胞类似^[16-17], 这可能与超声波的声孔机制有关, 超声强度或辐照时间超过一定范围, 细胞膜表面会出现“不可逆性”小孔, 致细胞死亡。本研究通过筛选最佳超声参数组合, 并以脂质体作为对照, 结果发现超声(0.5 W/cm^2 , 30 s)+微泡+质粒组平均转染率最高。与此同时, 该方法介导转染的牙囊细胞的增殖活性优于脂质体介导转染的牙囊细胞, 表明其生物安全性良好。因此, 有望成为牙周组织工程基因转染的一种新方法。

作者贡献: 实验设计及资料收集由第一、二、五作者完成, 实验实施及评估由第一、二、三、四、五、六作者完成。第一、二作者成文, 通讯作者审校, 第一作者对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合相关动物伦理学标准的条例。

学术术语: 超声微泡技术-为现代的基因治疗提供了一种新的、安全的、非病毒性的转运手段。其主要作用机制是声孔作用, 即膜上形成的瞬时孔。微泡具有靶向运载作用, 利用微泡在超声介导下的空化效应, 可以靶向传输基因或药物。通过调整微泡本身的特性, 可将药物或治疗性基因整合于微泡中。超声声压达到一定强度, 即可使微泡破裂产生空化效应, 破坏细胞膜的完整性, 产生暂时性、可逆性的小孔, 增加细胞膜的通透性, 增强载体微泡对基因或对药物转移, 提高药物和基因转染率。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Yen AH, Ye lick PC. Dental tissue regeneration - a mini-review. *Gerontology*. 2010;57(1): 85-94.
- [2] Yokoi T, Saito M, Kiyono T, et al. Establishment of immortalized dental follicle cells for generating periodontal ligament in vivo. *Cell tissue Res*. 2007;327(2): 301-311.
- [3] Zhao M, Xiao G, Berry JE, et al. Bone morphogenetic protein 2 induces dental follicle cells to differentiate toward a cementoblast / osteoblast phenotype. *J Bone Miner Res*.2002; 17(8): 1441-1451.
- [4] He J, Rosen CJ, Adams DJ, et al. Postnatal growth and bone mass in mice with IGF-I haploinsufficiency.*Bone*.2006;38(6): 826-835.
- [5] Luo J, Zhou X, Diao L, et al. Experimental research on wild-type p53 plasmid transfected into retinoblastoma cells and tissues using an ultrasound microbubble intensifier. *J Int Med Res*.2010;38(3): 1005-1015.
- [6] 孙钦峰,杜芳,徐岩,等.超声微泡破裂法促进骨形态发生蛋白-2在小鼠骨骼肌表达的研究[J].*华西口腔医学杂志*, 2009, 27(1): 84-87
- [7] Honda MJ, Imaizumi M, Tsuchiya S, et al. Dental follicle stem cells and tissue engineering. *Journal of oral science*, 2010; 52(4): 541-552.
- [8] Yokoi T, Saito M, Kiyono T, et al. Establishment of immortalized dental follicle cells for generating periodontal ligament in vivo. *Cell tissue Res*.2007;327(2): 301-311.
- [9] 杨尊,刘婷,郑鸿,等. SV40Tag基因片段转染SD大鼠牙囊细胞后相关生物学特性初步研究[J]. *华西口腔医学杂志*, 2013, 31(1): 4-7,12.
- [10] El-Anead A. An overview of current delivery systems in cancer gene therapy[J]. *J Control Release*.2004;94(1): 1-14.
- [11] 孙钦峰,刘玉,杨丕山,等.超声介导微泡破裂法促进外源性基因在小鼠 NIH3T3 细胞中的表达.*华西口腔医学杂志*, 2008, 26(2): 198-200.
- [12] Wang JF, Wang JB, Chen H, et al. Ultrasound mediated microbubble destruction enhances gene transfection in pancreatic cancer cells.*Advances in therapy*. 2008;25(5): 412-421.
- [13] Qian Z,Sagers RD, Pitt WG. Investigation of the mechanism of the bioacoustic effect. *J Biomed Mater Res*. 1999;44(2): 198-205.
- [14] Ward M, Wu J, Chiu J. Experimental study of the effects of optison concentration on sonoporation in vitro. *Ultrasound Med Biol*.2000; 26(7): 1169-1175.
- [15] 区文超,修建成,赖文岩,等.白蛋白包裹微泡介导报告基因转染心肌细胞的实验研究[J].*中华超声影像学杂志*, 2004, 13(3): 212-214.
- [16] Jose L, Tlaxca, Christopher R. Anderson, et al. Analysis of in vitro Transfection by Sonoporation Using Cationic and Neutral Microbubbles.*Ultrasound Med Biol*.2010;36(11): 1907-1918.
- [17] Qiu Y, Luo Y, Zhang Y, et al.The correlation between acoustic cavitation and sonoporation involved in ultrasound mediated DNA transfection with polyethylenimine (PEI) in vitro. *J Control Release*.2010;145(1): 40-48.