

# 超声破坏载 pcDNA3-bFGF-NGF 基因纳泡治疗 糖尿病大鼠烫伤创面的实验研究

王丽华 宗建春 刘之川 简华刚 余萍萍 梅英

**摘要** 目的 探讨超声破坏载 pcDNA3-bFGF-NGF 基因纳泡对糖尿病大鼠烫伤创面的治疗作用。方法 制备载 pcDNA3-bFGF-NGF 基因纳泡,检测其基本特性;MTT 法检测其对大鼠真皮成纤维细胞活性的影响;Western-blot 检测其在大鼠真皮成纤维细胞中的基因表达水平及转染效率。选取糖尿病大鼠 27 只,分为空白对照组、载基因纳泡组及超声破坏载基因纳泡组,超声破坏载基因纳泡组又分别于 1 d、2 d、3 d、4 d、7 d、14 d 及 21 d 观察创面愈合情况,以及 bFGF 及 NGF 蛋白表达水平及转染效率,并与空白对照组、载基因纳泡组 21 d 时的结果进行对照。结果 所制备的阳离子纳泡形态规则,稳定性好,平均表面电位为 12.7 mV;与基因结合量高达  $3.8 \mu\text{g}/10^8$  个纳泡;基因结合率高达 39.5%;MTT 显示对细胞无明显毒性。Western-blot 半定量结果显示,空白对照组和载基因纳泡组 bFGF 及 NGF 蛋白水平低;bFGF 蛋白及 NGF 蛋白在载基因纳泡组 48 h 时转染效率及表达水平最高。超声破坏载基因纳泡 48 h 组 bFGF 水平在治疗第 7 天表达及转染率达到峰值,NGF 水平在治疗第 4 天表达及转染率最高。结论 载 pcDNA3-bFGF-NGF 基因纳泡能显著增强超声显影;经超声基因转染仪破坏后可定位释放基因,且基因转染效率明显提高,对糖尿病大鼠烫伤创面有较好的治疗效果。

**关键词** 纳泡;质粒;基因转染;蛋白生成;超声成像

[中图分类号]R445.1;R33

[文献标识码]A

## Experimental study on the treatment of scald wounds in diabetic rats by ultrasound-induced destruction of pcDNA3-bFGF-NGF gene-loaded nanobubbles

WANG Lihua, ZONG Jianchun, LIU Zhichuan, JIAN Huagang, YU Pingping, MEI Ying

Department of Emergency, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China

**ABSTRACT Objective** To investigate the therapeutic effect of ultrasound-induced destruction of pcDNA3-bFGF-NGF gene-loaded nanobubbles on scald wounds in diabetic rats. **Methods** Nanobubbles containing pcDNA3-bFGF-NGF gene was prepared and its basic characteristics was detected. MTT assay was used to detect its effect on the activity of rat dermal fibroblasts. Western-blot was used to detect its gene expression level and transfection efficiency in rat dermal fibroblasts, and the optimal action time was chosen. 27 diabetic rats were divided into blank control group, gene-loaded nanobubbles group and gene-loaded nanobubbles combined with ultrasound irradiation group. Gene-loaded nanobubbles combined with ultrasound irradiation group were observed for wound healing on 1, 2, 3, 4, 7, 14 and 21 d, respectively, and the expression level of bFGF and NGF protein. The transfection efficiency was compared with that of blank control group and gene-loaded nanobubble group at 21 d. **Results** The prepared cationic nanobubbles had regular morphology, good stability, average surface potential of 12.7 mV, gene binding capacity of  $3.8 \mu\text{g}/10^8$  nanobubbles, maximum gene binding rate of 39.5%. MTT showed no obvious toxicity to cells. Western-blot protein semi-quantitative results showed that bFGF and NGF protein levels were low in blank control group

基金项目:重庆市卫生局医学科面上项目(2012-2-055)

作者单位:400010 重庆市,重庆医科大学附属第二医院急诊科(王丽华、宗建春、刘之川、简华刚),健康管理中心(余萍萍、梅英)

通讯作者:梅英,Email:meiying1975@sina.com

and Nabu group, the transfection efficiency and expression level of bFGF and NGF protein were the highest in Nabu 48 h group containing pcDNA3-bFGF-NGF gene. The expression and transfection rate of bFGF in the pcDNA3-bFGF-NGF gene nanobubbles combined with ultrasound irradiation group reached the peak on the 7th day of treatment, and the expression and transfection rate of NGF on the 4th day of treatment were the highest. **Conclusion** pcDNA3-bFGF-NGF gene-loaded nanobubbles can significantly enhance ultrasound imaging. The gene can be localized and released after destruction by ultrasound gene transfectors, and the efficiency of gene transfection is significantly improved. It has a good therapeutic effect on rat wounds and can provide a new method for the treatment of diabetic wounds.

**KEY WORDS** Nanobubbles; Plasmid; Gene transfection; Protein production; Ultrasound imaging

糖尿病可致代谢紊乱,引起血管狭窄甚至完全闭塞、毛细血管脆性增加、微血栓形成等,造成局部组织缺血坏死,在患者体表形成溃疡。碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)和神经生长因子(nerve growth factor, NGF)被认为是促进糖尿病创面愈合的两个主要因子<sup>[1-2]</sup>,且二者有协同作用<sup>[3-4]</sup>。目前临床多采用改善循环、营养神经等方式治疗糖尿病创面,但效果欠佳;新起的基因疗法通过选择性地提高一部分生长因子的表达,将生长因子传递至创口,作用于靶点,最大限度地加速血管及组织再生,促进创面愈合<sup>[3-5]</sup>。本实验构建载bFGF和NGF基因纳泡(载pcDNA3-bFGF-NGF基因纳泡,以下简称载基因纳泡),在超声辐照下,纳泡破裂,释放目的基因<sup>[6]</sup>,于创面局部表达bFGF和NGF,从而加速创面愈合,为临床解决经久不愈的创面提供了新的思路。

## 材料与方法

### 一、载基因纳泡的制备及其基本特性检测

1. 制备超声纳泡:将二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC, 美国Sigma公司)、二硬脂酰磷脂酰乙醇(DSPE, 美国Sigma公司)及DC-胆固醇(美国Avanti Polar Lipids公司)、甘油(美国Sigma公司)和PBS缓冲液(美国Sigma公司)按照一定比例(磷脂质量比5:2:1,甘油、PBS体积比1:9)混合后于40℃溶解30 min,以全氟丙烷气体置换其瓶内空气,然后进行机械振荡。将制得的含全氟丙烷的微囊液加入等体积的5%聚乙二醇4000溶液混合,进行冷冻干燥,重新充入全氟丙烷气体,即得纳泡冻干制剂备用<sup>[7]</sup>。

2. 构建载bFGF和NGF重组质粒:将质粒pCA13-NGF酶切,克隆出NGF基因片段,与pcDNA3-bFGF质粒上的bFGF连接,构建pcDNA3-bFGF-NGF质粒,并将pcDNA3-bFGF-NGF质粒转入大肠杆菌DH5 $\alpha$ ,扩增质粒;电泳及酶切鉴定后SPIN法提取质粒DNA。

将获得的质粒行基因测序鉴定后,碱裂解法大量扩增提取质粒备用。

3. 制备载基因纳泡:将纳泡冻干制剂以双蒸水复溶重悬,再将质粒2.5  $\mu$ g与超声纳泡混悬液50  $\mu$ l混合,使pcDNA3-bFGF-NGF质粒通过静电作用吸附于纳泡外壳,制得载基因纳泡。观察载基因纳泡的粒径、形态、电位基本特性;以DiI标记质粒,通过流式细胞仪检测基因与纳泡结合率,并计算载基因量。

二、体外检测超声破坏载基因纳泡对大鼠真皮成纤维细胞活性的影响,以及基因表达水平

取对数生长期的大鼠真皮成纤维细胞,以每孔 $0.5 \times 10^5$ 密度接种于96孔板上,5% CO<sub>2</sub>, 37℃培养至70%~80%融合时弃去培养液,每孔加入2 ml完全培养液待用,分为以下5组:空白对照组、载基因纳泡组、超声破坏载基因纳泡12 h组、超声破坏载基因纳泡24 h组及超声破坏载基因纳泡48 h组,每组3个复孔。以自行研制的DZC超声基因转染仪进行辐照,频率1 MHz,声强范围0.25~2.5 W/cm<sup>3</sup>, 1.5 W/cm<sup>3</sup>超声辐照60 s,工作时间控制为20%(即辐照4 s,停24 s)破泡转染目的基因。在光镜下观察大鼠成纤维细胞膜及细胞器的改变,以及载基因纳泡对大鼠真皮成纤维细胞活性的影响。采用MTT法于酶标仪490 nm处测定OD值,计算细胞活性率,公式:细胞活性率=OD处理组/OD对照组 $\times 100\%$ 。采用Western-blot技术检测各组阳性细胞中pcDNA3-bFGF-NGF质粒转染及bFGF和NGF的表达水平。

三、超声破坏载基因纳泡在糖尿病大鼠烫伤创面增强显像情况

1. 糖尿病大鼠烫伤模型的建立。造模前1个月,大鼠喂以高脂、高蛋白、高糖饲料,以诱导出胰岛素抵抗;随及于禁食(不禁水)14 h后腹腔注射链尿佐菌素30 mg/kg(溶于0.1 mmol/L柠檬酸盐缓冲液中, pH 4.5,新鲜配制),72 h后尾静脉采血测定血糖(在诱导前和

诱导后均经尾静脉采血,用快速血糖仪测基础血糖和随机血糖水平)。同时对诱导后大鼠的体质量进行观察,若诱导前基础血糖水平 $< 8.9 \text{ mol/L}$ ,诱导后血糖水平 $> 16.7 \text{ mol/L}$ ,大鼠体质量明显下降,即可视为糖尿病模型诱导成功<sup>[8]</sup>。凡未达标者,3 d后补充注链尿佐菌素(以 $10\sim 20 \text{ mg/kg}$ 剂量腹腔注射),并仍喂以高脂、高蛋白、高糖饲料8周,每周测体质量、血糖。糖尿病大鼠模型诱导成功后8周进入深Ⅱ度烫伤模型制作程序:烫伤前24 h,给予 $25 \text{ g/L}$ 戊巴比妥钠( $35 \text{ mg/kg}$ 体质量)腹腔注射麻醉,背部用硫化钡混合物脱去背部体毛,脱毛后24 h用电热恒温水浴箱,设定致伤温度 $80^\circ\text{C}$ ,时间15 s。

2. 超声破坏载基因纳泡在糖尿病大鼠烫伤创面增强显像情况。以 $1\%$ 戊巴比妥钠溶液( $60 \text{ mg/kg}$ )肌肉注射麻醉大鼠后,固定四肢,鼠尾静脉注射载基因纳泡 $1.5 \text{ ml}$ <sup>[9]</sup>,随后使用意大利百胜 MyLab 90 彩色多普勒超声诊断仪对创面皮肤及皮下组织进行超声显像。探头与皮肤创面之间以耦合剂密闭,选用 LA533 探头,频率 $12 \text{ Hz}$ ,成像深度 $2 \text{ cm}$ ,在造影模式下观察创面皮肤及皮下超声显像情况,于注射载基因纳泡前后及超声破坏载基因纳泡前后采集声像图。

四、超声破坏载基因纳泡在糖尿病大鼠烫伤创面体内定位释放

将糖尿病大鼠烫伤模型27只,分为空白对照组3只,鼠尾静脉注射 $1.5 \text{ ml}$ 生理盐水;载基因纳泡组3只:鼠尾静脉注射超声纳泡 $1.5 \text{ ml}$ ;超声破坏载基因纳泡组21只:鼠尾静脉注射载基因的超声纳泡 $1.5 \text{ ml}$ ,同时采用自行研制的DZC超声基因转染仪定点辐照,辐照深度 $10 \text{ mm}$ ,发射声波为脉冲波,频率 $1.0 \text{ MHz}$ ,声强 $1.5 \text{ W/cm}^2$ ;探头与皮肤创面之间以耦合剂密闭、辐照时间 $30 \text{ min}$ 。肉眼观察并记录各组糖尿病大鼠烫伤1 d、2 d、3 d、4 d、7 d、14 d及21 d创面愈合情况,每个

时间点各3只大鼠。于各治疗时间点结束后,处死大鼠,取创面组织,采用Western-blot技术半定量检测bFGF及NGF蛋白水平,观察超声破坏载基因纳泡在创面的定位释放情况。空白对照组和基因纳泡组选21 d结果做对照。

五、统计学处理

应用SPSS 16.0统计软件,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用方差分析或t检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、载基因纳泡的基本特征

载基因纳泡乳液呈均匀乳白色,光镜下呈圆球形或呈点状,分布较均匀(图1);透射电镜观察超声纳泡及载基因纳泡均呈球形,形态规则(图2)。马尔文仪测得载基因纳泡粒径约 $450 \text{ nm}$ ,电位约 $12.7 \text{ mV}$ (壳材中加入阳离子脂质体,电荷为正)。流式细胞术测得载基因纳泡载基因量为 $3.8 \mu\text{g}/10^8$ 个纳泡。

二、载基因纳泡细胞活性及体外基因表达水平

MTT结果显示细胞活性各组间及组间两两比较差异均无统计学意义,见图3。经超声辐照后,载基因纳泡组基因表达水平升高,且随着时间的延长,基因表达水平逐渐增高。Western-blot半定量结果显示,bFGF蛋白及NGF蛋白在载基因纳泡组转染效率明显增高,至超声破坏后48 h时表达水平最高。见图4,5。

三、载基因纳泡体内增强超声显像实验

注射载基因纳泡前,大鼠皮肤及皮下组织无强化;尾静脉注射造影剂后,超声显示大鼠创面皮肤及皮下组织出现强化影像;基因转染破坏纳泡的瞬间,造影显示大鼠皮肤及皮下出现均匀强化影,纳泡被击破后,皮肤及皮下组织增强显影逐渐减弱至造影剂注射前水平。见图6。

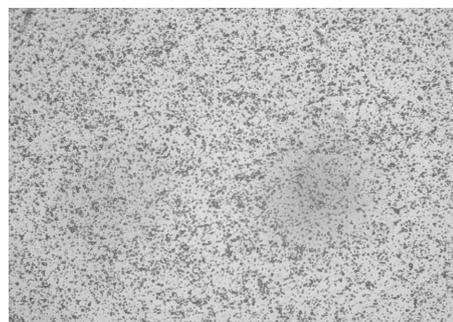


图1 载基因纳泡光镜图( $\times 400$ )



图2 载基因纳泡透射电镜图( $\times 1200$ )

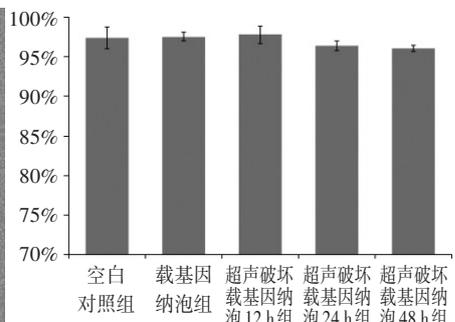
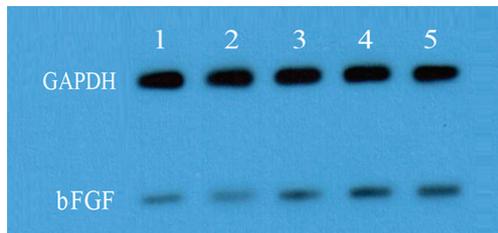
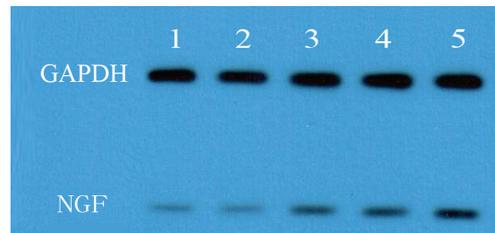


图3 各组细胞活性率比较



1:空白对照组;2:载基因纳泡组;3:超声破坏载基因纳泡12 h组;4:超声破坏载基因纳泡24 h组;5:超声破坏载基因纳泡48 h组

图4 各组细胞bFGF蛋白表达



1:空白对照组;2:载基因纳泡组;3:超声破坏载基因纳泡12 h组;4:超声破坏载基因纳泡24 h组;5:超声破坏载基因纳泡48 h组

图5 各组细胞NGF蛋白表达情况

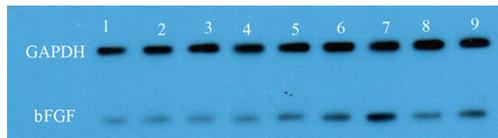


A:造影前,皮肤及皮下组织内无造影剂,表现为无强化;B:造影剂注射后,皮肤及皮下组织有造影剂显现,出现强化影像;C:超声破坏纳泡瞬间,皮肤及皮下出现均匀强化影;D:纳泡击破后,皮肤及皮下组织超声造影剂逐渐减少

图6 载基因纳泡体内超声增强显像

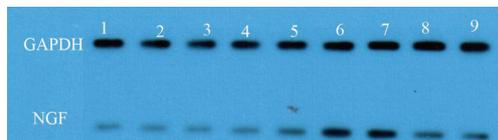
#### 四、载基因纳泡体内基因表达水平及转染效率

Western-blot 半定量结果显示,空白对照组和载基因纳泡48 h组 bFGF 及 NGF 蛋白水平低;超声破坏载基因纳泡48 h组 bFGF 及 NGF 蛋白水平显著升高,在治疗后第7天 bFGF 水平达到峰值,在治疗后第4天 NGF 水平最高,见图7,8。



1:空白对照组;2:载基因纳泡组;3:超声破坏载基因纳泡组1 d;4:超声破坏载基因纳泡组2 d;5:超声破坏载基因纳泡组3 d;6:超声破坏载基因纳泡组4 d;7:超声破坏载基因纳泡组7 d;8:超声破坏载基因纳泡组14 d;9:超声破坏载基因纳泡组21 d

图7 各组组织bFGF蛋白表达情况



1:空白对照组;2:载基因纳泡组;3:超声破坏载基因纳泡组1 d;4:超声破坏载基因纳泡组2 d;5:超声破坏载基因纳泡组3 d;6:超声破坏载基因纳泡组4 d;7:超声破坏载基因纳泡组7 d;8:超声破坏载基因纳泡组14 d;9:超声破坏载基因纳泡组21 d

图8 各组组织NGF蛋白表达情况

### 讨 论

糖尿病患者的代谢紊乱损害了血管内皮细胞的正常功能导致溃疡创面的供血障碍;此外创面局部的

周围神经病变导致的感觉减弱或缺失及后期的运动神经受累等也是糖尿病创面难愈合的重要原因。以上种种因素导致了溃疡创面的生长因子和胶原蛋白生成减少。近年来,有研究<sup>[10-11]</sup>认为成纤维细胞生长因子调控着创面愈合的各个阶段。bFGF是目前成纤维细胞生长因子家族中研究最多的,已有研究<sup>[1-2]</sup>证明bFGF对创面愈合有明显的促修复作用。NGF也被认为是与糖尿病创面愈合密切相关的细胞因子。因此,本实验采用bFGF和NGF两种基因作用于糖尿病大鼠创面,希望实现对糖尿病创面治疗的突破。

既往研究<sup>[12-14]</sup>所采用的脂质微泡作为载体仅能在血液中循环,大量的脂质微泡并未真正到达创面组织,而是聚积在创面血管里被击破。随着生物纳米技术的迅猛发展,纳米级超声造影剂(纳泡)应运而生,该类造影剂直径为纳米级,具有极强的穿透力,能够穿越血管内皮间隙,到达创面组织内部<sup>[15-17]</sup>。Oeffinger和Wheatley<sup>[18]</sup>研制的内含全氟丙烷的纳米级超声造影剂平均粒径为380~780 nm,血管内皮间隙容许小于700 nm的颗粒通过。因此纳米级超声造影剂有望克服微米级超声造影剂的弱点,同时有望成为基因的新型载体。本研究团队已具有制备纳米级超声造影剂的技术,李奥等<sup>[14]</sup>制备的纳米级脂质超声造影剂平均粒径为415.8 nm,完全符合纳泡的要求。本实验所制备的阳离子纳泡形态规则,稳定性好,与普通脂质纳泡比较,阳离子纳泡载基因量明显增加,最大基因结

含量达  $3.8 \mu\text{g}/10^8$  个纳泡;最大基因结合率为 39.5%;对细胞无明显毒性。Western-blot 半定量结果显示, bFGF 蛋白及 NGF 蛋白在超声破坏载基因纳泡组转染效率明显增高,至超声破坏后 48 h 时表达水平最高。后期体外实验观察超声破坏载基因纳泡组糖尿病大鼠烫伤 1 d、2 d、3 d、4 d、7 d 及 21 d 创面愈合情况, Western-blot 半定量结果显示,超声破坏载基因纳泡 48 h 组 bFGF 及 NGF 蛋白水平显著升高,在治疗后第 7 天 bFGF 水平达到峰值,而治疗后第 4 天 NGF 水平最高。

综上所述,纳米级超声造影剂(纳泡)具有更强的穿透力,可长时间滞留于通透性明显增加的创面组织间隙,并增加局部基因释放量,在超声破坏纳泡产生的驱动力作用下,将载联合 bFGF 基因和 NGF 基因的质粒(pcDNA3-bFGF-NGF)转染到创面组织内部,并表达 bFGF 和 NGF,借助超声纳泡定位释放技术可以更好地控制创面组织中 bFGF 和 NGF 的有效剂量,促进糖尿病创面的早期愈合。

#### 参考文献

- [1] Ochoa-Gonzalez F, Cervantes-Villagrana AR, Fernandez-Ruiz JC, et al. Metformin induces cell cycle arrest, reduced proliferation, wound healing impairment in vivo and is associated to clinical outcomes in diabetic foot ulcer patients [J]. PLoS One, 2016, 11(3):e0150900.
- [2] 曾钢,丁群芳.糖尿病微血管并发症及其相关分子机制研究进展[J].海南医学院学报,2019,25(1):77-80.
- [3] Ferraro B, Cruz YL, Baldwn M, et al. Increased perfusion and angiogenesis in a hindlimb ischemia model with plasmid FGF-2 delivered by noninvasive electroporation[J]. Gene Ther, 2010, 17(6): 763-769.
- [4] Beer HD, Bittuer M, Niklaus G, et al. The fibroblast growth factor binding protein is a novel interaction partner of FGF-7, FGF-10 and FGF-22 and regulates FGF activity: implications for epithelial repair[J]. Oncogene, 2005, 24(34):5269-5277.
- [5] Abdul chain M, Nawaf G, Nawaf F, et al. Increased prevalence of microvascular complications in type 2 diabetes patients with the metabolic syndrome [J]. Isr Med Assoc J, 2006, 8(6):378-382.
- [6] 李宏波,殷立平,张东生.超声靶向微泡破坏技术介导基因转染的研究进展[J].东南大学学报(医学版),2015,34(1):121-126.
- [7] Leroy V, Norisuye T. Investigating the existence of bulk nanobubbles with ultrasound[J]. Chemphyschem, 2016, 17(18):2787-2790.
- [8] 李文惠,柳国斌.下肢缺血型糖尿病溃疡大鼠模型的建立及评估[J].实用医药杂志,2019,36(5):449-453.
- [9] Xie X, Lin W, Liu H, et al. Ultrasound-responsive nanobubbles contained with peptide-camptothecin conjugates for targeted drug delivery[J]. Drug Deliv, 2016, 23(8):2756-2764.
- [10] 王敏华,李海坤,宋久于,曾祥泰.生长因子在糖尿病足难愈性溃疡中的研究进展[J].赣南医学院学报,2018,38(6):618-621.
- [11] 刘丽楠,王素莉,程晨.胶原负载神经生长因子治疗糖尿病足溃疡临床观察[J].武警后勤学院学报(医学版),2017,26(5):421-423.
- [12] Perera RH, Solorio L, Wu H, et al. Nanobubble ultrasound contrast agents for enhanced delivery of thermal sensitizer to tumors undergoing radiofrequency ablation [J]. Pharm Res, 2014, 31(6):1407-1417.
- [13] Deshpande N, Needles A, Willmann JK. Molecular ultrasound imaging: current status and future directions [J]. Clin Radiol, 2010, 65(7):567-581.
- [14] 李奥,王志刚,赵建农,等.纳米级超声分子探针的制备及其体外寻靶实验[J].中国超声医学杂志,2010,26(4):289-292.
- [15] 张勇,王志刚.纳米级超声造影剂的研究进展[J].临床超声医学杂志,2007,9(2):105-107.
- [16] Li J, Tian Y, Shan D, et al. Neuropeptide Y Y 1 receptor-mediated biodegradable photoluminescent nanobubbles as ultrasound contrast agents for targeted breast cancer imaging [J]. Biomaterials, 2017, 116(1):106-117.
- [17] 骆杰.肝癌超声分子影像学的研究进展[J].中国介入影像与治疗学,2009,6(6):575-578.
- [18] Oeffinger BE, Wheatley MA. Development and characterization of a nano-scale contrast agent [J]. Ultrasonics, 2004, 42(1-9):343-347.

(收稿日期:2019-01-14)

## 欢迎基金资助课题的论文投稿

为了进一步提高本刊的学术水平,鼓励基金资助课题(国家自然科学基金,国家各部委及省、市、自治区各级基金)的论文投到本刊。本刊决定,将对上述基金课题论文以绿色通道快速发表。请作者投稿时,在文中注明基金名称及编号,并附上基金证书复印件。

欢迎广大作者踊跃投稿!

本刊编辑部