

超声辐照载腺病毒靶向微泡增强报告基因在 小鼠颅内胶质瘤中的转染效果

徐忠烨 李小青 胡兴华 张俊槐 宦仁正 李雪松

摘要 **目的** 探讨低频聚焦超声辐照携载腺病毒靶向微泡增强基因转染颅内胶质瘤的效果。**方法** 原位接种U251胶质瘤细胞制备小鼠颅内胶质瘤模型25只;制备可以携载腺病毒载体和偶联RGD肽的脂质体微泡,并检测其性状。筛选颅内胶质瘤直径3.0~4.0 mm的小鼠分为3组, I组注射未携载腺病毒的非靶向微泡(对照组), II组注射载腺病毒的非靶向微泡, III组注射载腺病毒的靶向微泡,各组注射微泡后均接受超声辐照,频率1 MHz,强度0.7 W/cm²,时间5 min;使用小动物活体荧光成像系统观察各组小鼠颅内荧光强度。**结果** 制备的脂质体微泡直径为1.10~1.20 μm,平均浓度(7.8±0.43)×10⁸/ml,其可携载腺病毒,还可偶联RGD肽。MRI筛选颅内肿瘤直径3.0~4.0 mm的荷瘤小鼠15只,分为3组(每组5只),小动物活体荧光成像显示,与I组和II组比较,III组小鼠颅内荧光强度显著增强(均P<0.01)。**结论** 静脉注射偶联RGD肽的载腺病毒靶向微泡可以将携带的目的基因有效地转染至颅内胶质瘤,为胶质瘤的基因治疗提供了一种新思路。

关键词 胶质瘤;靶向微泡;腺病毒;RGD肽;低频聚焦超声;小鼠
[中图分类号]R453 [文献标识码]A

Transfection of adenovirus-targeted microbubbles enhanced report gene in mouse intracranial glioma by ultrasound irritation

XU Zhongye, LI Xiaoqing, HU Xinghua, ZHANG Junhuai, HUAN Renzheng, LI Xuesong
Department of Neurosurgery, the Third People's Hospital of Huizhou, Guangdong 516002, China

ABSTRACT Objective To explore the transfection efficiency of adenovirus-targeted microbubbles enhanced report gene in intracranial glioma by low frequency focused ultrasound irritation. **Methods** Intracranial glioma models were prepared by transplanting U251 glioma cells in 25 mice. Liposome microbubbles carrying adenovirus vector and RGD peptide were prepared and their properties were detected. Fifteen mice of intracranial glioma model were selected and randomly divided into three groups with 5 mice in each group. The animals in group I were injected untargeted microbubbles without carrying adenovirus, the ones in group II were injected untargeted microbubbles carrying adenovirus, the ones in group III were injected targeted microbubbles carrying adenovirus, all three groups were irradiated by ultrasound (1 MHz, 0.7 W/cm², 5 min). The intracranial fluorescence intensity in three groups was observed and analyzed by small animal in vivo fluorescence imaging system. **Results** The diameter of liposome microbubbles was about 1.10~1.20 μm, and the average concentration was about (7.8±0.43)×10⁸/ml, these microbubbles could carry adenovirus and couple RGD peptide. 15 mice with glioma diameter 3.0~4.0 mm were selected by MRI, then divided into 3 groups (each group has 5 mice). In vivo fluorescence imaging of small animals showed that the intracranial fluorescence intensity of group III mice was significantly increased compared with group I and group II (P<0.01). **Conclusion** Intravenous injection of adenovirus-targeted liposome microbubbles coupled with RGD peptide can effectively transfect the target gene into intracranial glioma, which provides a new idea for gene therapy of glioma.

KEY WORDS Glioma; Targeted microbubbles; Adenovirus; RGD peptide; Low frequency focused ultrasound; Mouse

目前,恶性胶质瘤放化疗治疗术后平均生存期仅8~13个月。随着细胞分子生物学的进步、肿瘤发病机制的深入研究和新型生物材料的发展应用,恶性胶质瘤的基因治疗得以开展,并备受关注。但如何安全、

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81471676);重庆市科委基础与前沿一般项目(cstc2014jcyjA10050);重庆市卫生局中医药课题(ZY20132103);重庆市卫生局课题(2012-2-065)

作者单位:516002 广东省惠州市第三人民医院神经外科(徐忠烨、李雪松);重庆市肿瘤医院超声科(李小青);重庆医科大学附属第二医院神经外科(胡兴华、张俊槐、宦仁正)

靶向、高效地将治疗性基因传递到恶性胶质瘤内是目前基因治疗值得关注的问题^[1-2]。本研究通过构建可以靶向恶性胶质瘤内特异性抗原 $\alpha V \beta 3$ 的靶向微泡,探讨低频聚焦超声辐照携载腺病毒靶向微泡增强基因转染颅内胶质瘤的效果。

材料与方 法

一、实验动物

25 只成年雄性 BALB/C 小鼠,10 周龄,体质量 26 g,由重庆医科大学实验动物中心提供及饲养。

二、主要材料与试剂

U251 胶质瘤细胞和具有 EGFP 报告基因的 pDC316-EGFP-U6 腺病毒(本实验室冻存自备);胎牛血清(FBS)和 DMEM/F12 培养基(美国 Hyclone 公司);二棕榈酰磷脂酰乙醇胺(DSPC)、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DPPE)、聚乙二醇(PGE)、甘油(美国 Sigma 公司);抗 RGD 肽 FITC 荧光抗体(德国 Miltenyi 公司),胶质纤维酸性蛋白(GFAP,美国 Santa Cruz 公司),DAB 显色试剂盒(北京中杉公司)。

三、仪器与方法

(一)仪器

TC233 二氧化碳培养箱(美国 Thermo 公司),倒置荧光显微镜(德国 Leica 公司),流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司),小动物脑立体定位仪(ALC-H 系列,上海奥尔科特公司),Malvern 激光粒径测量仪(3000SSA 型,美国 Zetasizer 公司),7.0 T 小动物核磁共振仪(7.0 T MRI,德国 Bruker 公司),小动物活体荧光成像系统(美国 Perkin Elmer 公司)。

(二)方法

1. 胶质瘤细胞的培养:①冻存的 U251 胶质瘤细胞复苏后接种于含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基中,每 3~4 d 换液一次,每 7 d 传代一次。取生长状态良好的胶质瘤细胞用于小鼠脑胶质瘤模型的制备。②验证腺病毒对胶质瘤细胞的感染能力:将胶质瘤细胞接种于 24 孔板中,当细胞融合度达 90% 时,用 10 感染复数的腺病毒感染细胞,2 h 后更换新鲜培养基,48 h 后于荧光显微镜下观察感染情况。

2. 小鼠颅内胶质瘤模型的建立: BALB/C 小鼠麻醉后,头部固定于小动物立体定位仪上,以冠状缝前 0.4 mm,中线旁开 2.0 mm 为中心,钻一直径为 5 mm 的骨窗,于硬膜下 2.5 mm 缓慢注入胶质瘤细胞悬液 5 μ l,接种后 21 d 行 MRI 扫描,将有肿瘤生长的荷瘤鼠取脑固定,石蜡包埋切片,行 HE 和 GFAP 染色。

3. 载病毒靶向微泡的制备: DSPC 5 mg、DPPE 2 mg、PGE 10 μ l、甘油 50 μ l 加入 PBS 中,终体积为 500 μ l,混合后置于 1.5 ml 内含全氟丙烷的管形瓶中,置于 40 $^{\circ}$ C 水浴 30 min,牙科振荡仪振荡 35 s,静置 5 min,加入 0.5 ml PBS 稀释,500 G 离心 5 min,脂质体微泡为上层的乳白色悬浮带;制备携载腺病毒的脂质体微泡时,PBS 溶液更换为含有 1×10^{12} pfu/ml 腺病毒的 PBS 溶液,并在振荡及 PBS 稀释后加入一定量的补体中和未结合的腺病毒,再将 RGD 肽与载腺病毒的脂质体微泡混合(RGD 与顺丁烯二酰亚胺摩尔比为 30:1),4 $^{\circ}$ C 孵育 12 h,500 G 离心 5 min,获得载腺病毒的靶向微泡。

4. 微泡性状的检测:微泡原液用 PBS 稀释 100 倍,取 100 μ l 置于粒度分析仪的样品槽中,检测 5 个循环,每个循环时间为 2 min;检测微泡浓度时将微泡稀释 100 倍,取样品 1 μ l 滴在盖玻片上,再用另一张盖玻片覆盖,光镜下观察,利用图像分析软件计算微泡浓度。分析微泡携载腺病毒和结合 RGD 肽的能力:将载腺病毒的靶向微泡与 PI 溶液和抗 RGD 肽的 FITC 荧光抗体孵育,行流式细胞仪检测时激发光波长为 488 nm,检测波长分别为 515 nm (FITC) 和 560 nm (PI),应用 Cell Quest 3.2 软件采集和分析数据。

5. 载病毒靶向微泡对颅内胶质瘤的靶向转染能力:应用 MRI 筛选颅内肿瘤直径 3.0~4.0 mm 的荷瘤小鼠,分为 3 组: I 组经尾静脉注射 50 μ l 无腺病毒非靶向的脂质体微泡溶液; II 组经尾静脉注射 50 μ l 载腺病毒非靶向的脂质体微泡溶液; III 组经尾静脉注射 50 μ l 载腺病毒的靶向脂质体微泡溶液,利用超声基因转染仪经骨窗以 1 MHz 频率,0.7 W/cm² 强度的超声间歇触发辐照 5 min,辐照后 48 h 应用小动物活体荧光系统观察绿色荧光蛋白的表达强度,参数如下:发射波长 520 nm,激发波长 480 nm,曝光时间 1 s,应用 Maestro 8.5 分析系统对荧光强度进行半定量分析。

四、统计学处理

应用 SPSS 18.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较行 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

一、腺病毒对胶质瘤细胞的感染能力

腺病毒感染后 48 h,普通光镜和荧光显微镜下均见细胞活力尚好,且全部细胞均为 EGFP 阳性(图 1~3)。

二、小鼠颅内胶质瘤 MRI 及病理检查

接种后 21 d, MRI 筛选颅内肿瘤直径 3.0~4.0 mm

的荷瘤小鼠15只,分为3组(每组5只)。MRI示15只小鼠颅内肿瘤均生长明显,T2WI示实性瘤体与周围组织无明显边界,周围脑组织水肿明显,占位效应显著(图4)。

肿瘤组织肉眼下观察为团块状,实性,形态不规则,无包膜,呈灰白色鱼肉状,瘤体向周围脑组织浸润性生长;HE染色见肿瘤细胞多呈梭形和多角形,细胞核成圆形或不规则形,排列紊乱,肿瘤中心有出血坏死(图5)。GFAP染色见肿瘤内大部分细胞为GFAP阳性(图6)。

三、微泡性状分析

制备的脂质体微泡呈白色均匀液,静置后可获得下层白色乳液,低速离心纯化后镜下可见微泡呈空心球形、大小均一、分散良好(图7)。粒度分析仪显示制备后24 h微泡粒径为1.10~1.20 μm ,平均浓度 $(7.8 \pm 0.43) \times 10^8/\text{ml}$,流式细胞仪显示微泡为PI和FITC双阳性。

四、载腺病毒靶向微泡对颅内肿瘤的靶向转染能力

I组小鼠未见明显荧光信号,II组小鼠可见微弱的荧光信号,III组小鼠可见较强的荧光信号(图8)。半定量分析结果:II组和III组小鼠的荧光强度均较I组显著增强(均 $P < 0.01$),III组小鼠的荧光强度较II组显著增强($P < 0.01$)。见图9。

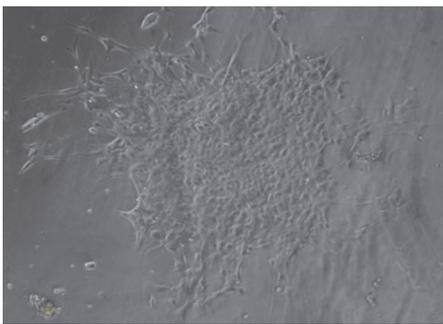


图1 U251胶质瘤细胞腺病毒感染后48 h相差显微镜图片($\times 100$)

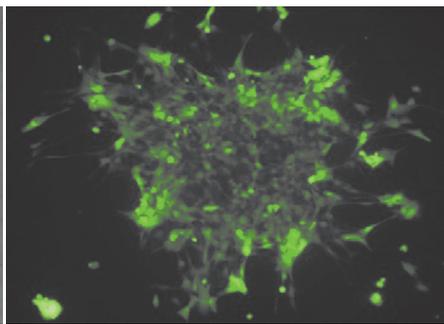


图2 U251胶质瘤细胞腺病毒感染后48 h荧光显微镜图片($\times 100$)

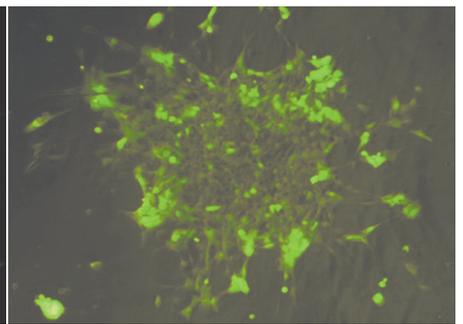


图3 U251胶质瘤细胞腺病毒感染后48 h相差显微镜和荧光显微镜的融合图片($\times 100$)

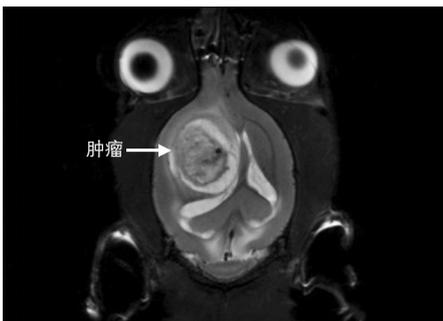


图4 肿瘤接种后21 d MRI图像(箭头示肿瘤灶)

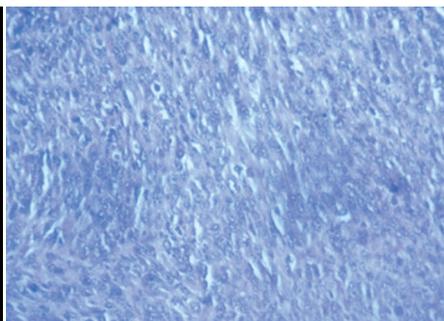


图5 肿瘤切片的HE染色图片($\times 100$)

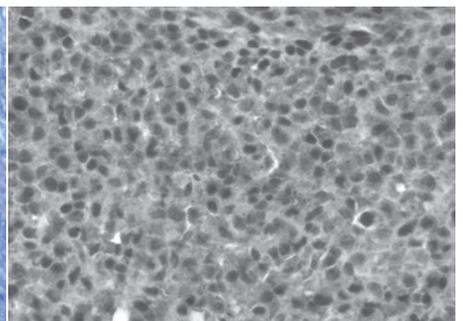


图6 肿瘤切片的GFAP染色图片($\times 200$)

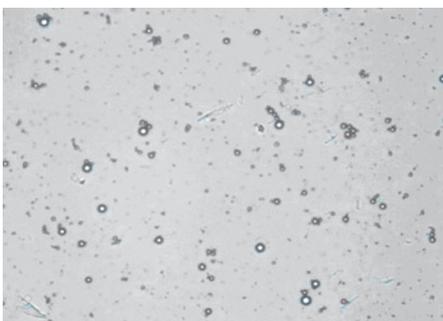


图7 光学显微镜下微泡性状($\times 200$)

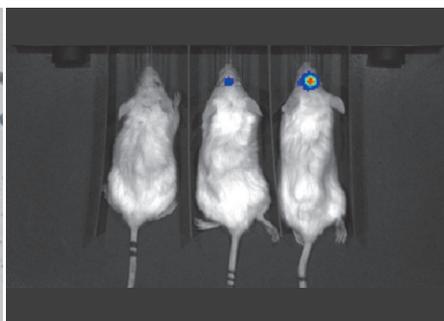


图8 各组小鼠活体荧光检查图,从左到右分别为I-III组

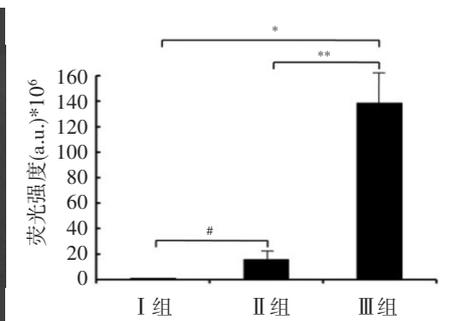


图9 各组小鼠荧光强度的半定量分析

讨 论

恶性胶质瘤的基因治疗是将治疗性基因通过不同的载体导入靶细胞内,从而治疗胶质瘤的一种细胞分子生物学技术,被认为是最有可能“根治”恶性胶质瘤的治疗手段。然而,由于血脑/血瘤屏障的存在,传统的基因转染方法不能有效地将目的基因转染到体内的胶质瘤细胞,而超声靶向破坏微泡技术作为一种新型基因转染技术^[3],为目的基因在胶质瘤内的靶向转染带来了希望。新一代微泡的平均直径小于红细胞,因此红细胞的通路可以成为微泡的通路,使微泡聚集在肿瘤内部。此外,由于肿瘤内部血管的快速增生,部分新生血管结构异常,出现管壁通透性增高和拟血管生成等现象,微泡还可以穿过此类发育不成熟的血管床或病理性缺陷的血管壁进入肿瘤实质或滞留于肿瘤细胞间^[4],再利用超声辐照作用击破微泡,使被击破的微泡释放基因载体,或使局部细胞膜通透性增加,更多的微泡和微泡释放的基因载体通过破裂的内皮细胞间隙到达肿瘤实质内^[5]。本实验制备的微泡直径为 1.1~1.2 μm ,可以有效地分布于肿瘤血管末梢,并可以通过内皮细胞的裂隙泄露,滞留于肿瘤组织内。

本实验采用的腺病毒载体具有转染效率高、扩增成本低、致病性低及不整合入宿主细胞基因等优点^[6-7]。本实验结果显示胶质瘤细胞被腺病毒感染 48 h 后,荧光显微镜下可见全部细胞表达外源性的指示基因,且光镜下可见全部细胞均有较好的活力,证明腺病毒载体对于胶质瘤细胞来讲是一种高效、易表达、安全的基因载体。尽管腺病毒载体用于体外转染时有很多优点,但其用于体内转染时则存在靶向性差、体内清除速率快、机体免疫性高等不足,因此探索一种新的技术手段,既能有效地包载腺病毒载体,又能实现安全、高效、靶向性的传递具有重要意义^[8]。为了解决上述问题,本实验构建了一种新型的治疗物质载体——脂质体微泡。脂质体是一种人工合成的生物膜,用其将药物包封后,可以有效降低药物毒性,并可以在体内长时间循环,从而减少药物的全身毒副作用。传统的脂质体很容易被体内的网状内皮系统清除掉,因此本实验在制备过程中加入了亲水性的 PGE 聚合物共价吸附在脂质体表面形成一种屏障^[9],可使微泡免于被网状内皮系统清除,延长了其在循环中的滞留时间。本实验结果表明,不论是在 II 组还是在 III 组,携载腺病毒的微泡经尾静脉注射后均可以转染颅内胶质瘤,说明本实验制备的脂质体微泡包裹腺病毒后不会引起机体明显的免疫反应,可以保护腺病毒不被机体迅速地清除掉,在血管内长效循环。

尽管脂质体微泡可以保护腺病毒载体免于被机体清除,但微泡本身缺乏靶向性。为进一步提高脂质体微泡的靶向性,本实验将具有特异性结合作用的配体链接到微泡表面,构成靶向微泡。整合素 $\alpha V \beta 3$ 是一种重要的整合素膜受体,在正常脑组织血管内皮细胞表面无明显表达,而在恶性胶质瘤的血管内皮细胞表面表达丰富^[10-11],RGD 肽是 $\alpha V \beta 3$ 的特异性配体,因此本实验利用 RGD 肽可以和脂质体微泡中 PEG 链末端顺丁烯二酰亚胺能特异性偶联的机理,制备了表面结合 RGD 肽的靶向微泡。小动物活体荧光实验结果表明,靶向微泡可以显著提高小鼠颅内胶质瘤的转染效率,荧光半定量分析表明 III 组荧光强度较 II 组显著增强($P < 0.01$)。

综上所述,本实验成功制备了偶联 RGD 肽的载腺病毒靶向脂质体微泡,经静脉注射后不仅可以实现微泡在胶质瘤内部的靶向聚集,还可以将携载的目的基因有效地转染至颅内胶质瘤,且不影响正常组织,这为恶性胶质瘤的基因治疗提供了一种新的思路和技术手段。

参考文献

- [1] Tobias A, Ahmed A, Moon KS, et al. The art of gene therapy for glioma: a review of the challenging road to the bedside [J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2013, 84(2): 213-222.
- [2] Wheeler LA, Manzanera AG, Bell SD, et al. Phase II multicenter study of gene-mediated cytotoxic immunotherapy as adjuvant to surgical resection for newly diagnosed malignant glioma [J]. *Neuro Oncol*, 2016, 18(8): 1137-45.
- [3] Yoon YI, Kwon YS, Cho HS, et al. Ultrasound-mediated gene and drug delivery using a microbubble-liposome particle system [J]. *Theranostics*, 2014, 4(11): 1133-1144.
- [4] Panje CM, Wang DS, Willmann JK. Ultrasound and microbubble-mediated gene delivery in cancer: progress and perspectives [J]. *Invest Radiol*, 2013, 48(11): 755-769.
- [5] Yue P, Gao L, Wang X, et al. Ultrasound-triggered effects of the microbubbles coupled to GDNF-and Nurr1-loaded PEGylated liposomes in a rat model of Parkinson's disease [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(6): 4581-4591.
- [6] Pan M, Zhang Y, Deng Z, et al. Noninvasive and local delivery of adenoviral-mediated herpes simplex virus thymidine kinase to treat glioma through focused ultrasound-induced blood-brain barrier opening in rats [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2018, 14(12): 2031-2041.
- [7] Koschmann C, Moreno-Ayala MA, Assi H, et al. Adenoviral vector-mediated gene therapy for gliomas: coming of age [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2014, 14(9): 1241-1257.
- [8] Lukashev AN, Zamyatnin AA. Viral vectors for gene therapy: current state and clinical perspectives [J]. *Biochemistry*, 2016, 81(7): 700-708.
- [9] Omata D, Negishi Y, Hagiwara S, et al. Enhanced gene delivery using bubble liposomes and ultrasound for folate-PEG liposomes [J].

J Drug Target, 2012, 20(4): 355-363.

[10] Gao H, Xiong Y, Zhang S, et al. RGD and interleukin-13 peptide functionalized nanoparticles for enhanced glioblastoma cells and neovasculature dual targeting delivery and elevated tumor penetration[J]. Mol Pharm, 2014, 11(3): 1042-1052.

[11] González-Morales A, Zabaleta A, Guruceaga E, et al. Spatial and temporal proteome dynamics of glioma cells during oncolytic adenovirus Delta-24-RGDinfection [J]. Oncotarget, 2018, 9(57): 31045-31065.

(收稿日期: 2019-04-01)

· 病例报道 ·

Ultrasonic diagnosis of emphysematous cystitis with neurogenic bladder : a case report

超声诊断气肿性膀胱炎伴神经源性膀胱 1 例

杨金锋 徐翠萍 钮颖

[中图分类号]R445.1

[文献标识码]B

患者男, 29岁, 12年前外院诊断为 I 型糖尿病, 予以对症治疗后血糖控制良好。近期血糖持续升高伴口干、恶心、呕吐来我院检查, 空腹血糖 24.6 mmol/L, 拟诊为 I 型糖尿病酮症酸中毒。患者入院后胃纳不佳, 睡眠正常, 大便正常, 近期有明显尿频、尿急、尿不尽症状, 小便偶有失禁。常规超声检查: 双肾大小、形态均正常, 皮髓质分界清晰, 包膜光整, 双侧集合系统对称性分离约 12 mm(图 1); CDFI: 双肾树杈状血流显示良好; 双侧输尿管上段内径约 6 mm; 膀胱充盈尚可, 膀胱壁明显增厚, 层次不清晰, 回声减低。超声动态扫查示膀胱内壁毛糙、不光整, 小

房、小梁样结构增生, 膀胱内壁为弥漫性环状气体回声围绕, 前壁显示清晰, 后壁因气体反射无法显示(图 2), 转换体位后探头加压可见气体流动征象; 排尿后, 膀胱体积缩小, 残余尿量约 78 ml, 膀胱前壁显示清晰, 壁间显示散在气体反射, 腔内及后壁因气体反射无法显示, 仅显示为团状较强气体反射(图 3)。结合患者临床病史, 超声提示: ①膀胱壁毛糙增厚伴膀胱腔内及壁间积气, 考虑气肿性膀胱炎, 建议尿细菌培养; ②膀胱尿液潴留, 考虑神经源性膀胱可能。后行尿细菌耐药培养证实为多重耐药菌——大肠埃希菌。予以抗生素治疗后气体反射消失(图 4)。

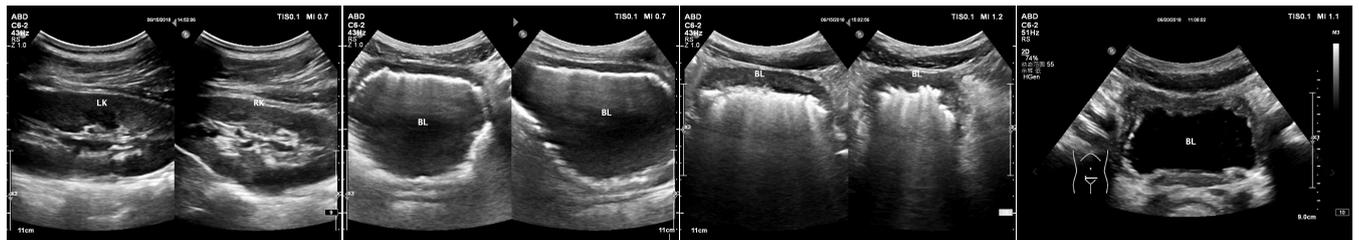


图 1 声像图示双肾集合系统轻度分离(LK:左肾;RK:右肾)

图 2 膀胱充盈时,膀胱壁增厚,回声偏低,膀胱内壁不光整,可见强回声气体环绕,膀胱腔内回声增强,显示不清晰(BL:膀胱)

图 3 排尿后膀胱壁增厚明显,膀胱内气体聚集,膀胱尿液潴留(BL:膀胱)

图 4 予以抗生素治疗 5 d 后,膀胱内气体消失,膀胱壁增厚毛糙(BL:膀胱)

讨论: 气肿性膀胱炎是指膀胱壁内或腔内有气体存在的一种膀胱炎症, 其致病菌主要为大肠埃希菌及产气杆菌, 通过酵解葡萄糖或尿中不正常蛋白质或正常蛋白质而产生气体。膀胱内致病菌产生的气体附着于炎性增厚毛糙的膀胱壁黏膜下, 量大时可以溢至膀胱内和(或)膀胱外周的浆膜下^[1]。本例患者超声表现为膀胱壁增厚, 膀胱壁内及膀胱腔内大量气体强回声反射, 膀胱前壁下气体反射导致膀胱腔及后壁显示不清。神经源性膀胱声像图表现为膀胱过度充盈, 壁增厚毛糙, 小梁、小房形成, 排尿后膀胱体积变化不明显。气肿性膀胱炎伴神经源性膀胱极为少见, 本例患者因长期糖尿病, 加之近期血糖控制不佳导致尿路感染。长期高血糖还会导致支配膀胱的周围神

经受损, 膀胱尿液潴留, 增加泌尿系统感染的几率。

气肿性膀胱炎的超声表现需与常见的医源性检查引起的气体、肠道膀胱瘘, 以及因外伤、放射治疗、异物或脓肿形成的膀胱积气鉴别诊断, 糖尿病引起的神经源性膀胱应与外伤性腰骶部神经受损及长期前列腺增生尿潴留引起的排尿障碍相鉴别诊断^[2]。

参考文献

- [1] 崔二峰, 张国富, 周建收, 等. 气肿性膀胱炎的 CT 分期及临床价值[J]. 中国中西医结合影像学杂志, 2018, 16(3): 295-296.
- [2] 吴阶平. 泌尿外科[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 1993: 830-831.

(收稿日期: 2018-06-30)