

治疗性超声介导微泡破裂促进大鼠体内肌肉 基因转染的参数优化实验研究*

唐远姣, 张凌燕, 王磊, 林玲, 文晓蓉, 邱迺[△]

四川大学华西医院 超声科(成都 610041)

【摘要】 目的 探讨治疗性超声介导微泡破裂促进基因体内转染大鼠肌肉的最适合的转染条件。**方法** 在大鼠双侧胫前肌内局部注射微泡与增强型绿色荧光蛋白(EGFP)质粒混合物,应用不同输出功率、不同占空比及不同超声辐照时间的治疗性超声辐照胫前肌,分别用肌肉局部注射及静脉注射微泡和质粒联合超声辐照,根据荧光染色及免疫组化染色下 EGFP 表达结果判断转染效果,根据转染效果最好且 HE 染色下肌肉损伤最小选出最适合的超声辐照条件和最适合的注射方式。将大鼠分为 4 组:①超声辐照+微泡+质粒组,②微泡+质粒组,③超声辐照+质粒组,④单纯质粒组。选取最适辐照及注射方式后,将大鼠在超声辐照后 5 d 处死,荧光染色及免疫组化染色下观察肌肉 EGFP 表达情况,HE 染色观察肌肉损伤情况。**结果** 在 1 MHz 治疗性超声辐照下,输出功率 2 W/cm²,占空比 20%,超声辐照 3 min 的最适合的辐照条件下,肌肉 EGFP 表达明显,且无明显损伤。肌肉局部注射较静脉注射更适合。荧光染色和免疫组化染色示 4 组中超声辐照+微泡+质粒组肌肉 EGFP 表达高于其余 3 组,微泡+质粒组高于其余 2 组($P<0.05$)。HE 染色下未见超声辐照及微泡造成的肌肉损伤。**结论** 在适合转染条件下,治疗性超声联合微泡能明显增强基因体内转染大鼠肌肉的效率,且不损伤肌肉细胞,可作为基因治疗的一种安全有效的非病毒性基因转染方法。

【关键词】 超声介导微泡破裂 基因转染 肌肉 参数优化

Study on the Parameter Optimization for Therapeutic Ultrasound Mediated Microbubble Destruction Enhances Gene Transfection in Rat Muscle *in vivo* TANG Yuan-jiao, ZHANG Ling-yan, WANG Lei, LIN Ling, WEN Xiao-rong, QIU Li[△]. Department of Ultrasound, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China
[△] Corresponding author, E-mail: wsqiuli@126.com

【Abstract】 Objective To search for the most suitable gene transfection conditions for rat muscle *in vivo* by therapeutic ultrasound-mediated microbubble destruction (UMMD). **Methods** A mixture of microbubbles and enhanced green fluorescence protein (EGFP) plasmids was injected into rat tibialis anterior muscle and the muscles treated with ultrasound irradiation by different output intensity, duty cycle and irradiation time of therapeutic ultrasound. The transfection efficiency was demonstrated by the EGFP expression results under fluorescent staining and immunohistochemical staining. And the most favorable ultrasound conditions as well as local intra-muscle and intravenous injection methods were selected based on the best transfection efficiency and the least muscle damage under HE staining. The rats were divided into four groups: ① ultrasound + microbubbles + plasmid; ② microbubble + plasmid; ③ ultrasound + plasmid; ④ plasmid only. The favorable ultrasound conditions and injection method were selected out on the basis of above steps. EGFP expression was observed in the tibialis anterior muscle of each group. The rats were sacrificed in groups at 5 days after they underwent ultrasound irradiation, the EGFP expression in muscle was observed after fluorescent and immunohistochemical staining and the muscle damage was also observed under HE staining. **Results** The most favorable conditions consisted of a 1-MHz therapeutic ultrasound irradiation applied for 3 min, a power output of 2 W/cm² and a 20% duty cycle. Under these conditions, the muscle showed significant EGFP expression, and the muscle was not significantly damaged. The EGFP expression induced by the local intra-muscle injection was more significantly increased than that induced by the intravenous injection. Among the four groups, the EGFP expression under fluorescence staining and immunohistochemical staining in the muscle of the ultrasound + microbubbles + plasmid group was significantly

* 国家自然科学基金(No. 81271585)资助

[△] 通讯作者, E-mail: wsqiuli@126.com

higher than that of the other three groups, and the microbubbles + plasmid group was higher than that of the other two groups ($P < 0.05$). No muscle damage caused by the ultrasound and microbubbles was detected under HE staining. **Conclusion** Under the optimal transfection conditions, the therapeutic ultrasound-mediated microbubble destruction method can significantly enhance the *in vivo* gene transfection efficiency of rat muscle and found no damage to the muscle. Thus, these conditions can be used as part of a safe and effective non-viral gene transfection procedure for gene therapy.

[Key words] Ultrasound-mediated microbubble destruction Gene transfection Muscle Parameter optimization

基因治疗是最近医学研究的热点,其优势主要为在体内可以稳定持续地表达治疗分子、给药间隔长、治疗成本低等。基因治疗载体或基因导入手段是基因治疗研究的关键。目前,用作基因治疗的载体大致可分为病毒载体和非病毒载体,他们均存在各自的局限性。超声介导微泡破裂法(UMMD)是一种新型的基因转染方法,因其具有较高转染效率、靶向性和安全性等特点,弥补了病毒载体和非病毒载体基因转染的不足^[1-3]。

肌细胞作为基因治疗的理想靶细胞一直是人们关注的热点。骨骼肌是体内较丰富的组织,约占成人平均体质量的40%,取材容易,注射方便;基因转入骨骼肌后可在体内持续表达并释放治疗性蛋白质,一旦插入分泌性基因还可使基因产物直接分泌进入血液,从而达到系统性治疗疾病的目的^[4]。

UMMD的转染效率受超声辐照强度、占空比(正脉冲的持续时间/脉冲总周期)及辐照时间影响,而且超声空化效应也可能导致组织损伤。既往虽然有UMMD促进肌肉基因转染的研究,但尚缺乏其参数优化的研究。本研究拟寻找UMMD促进体内肌肉基因转染的最优转染条件,为基因治疗寻找一种安全有效的基因转染方法。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及其制备

1.1.1 质粒 pEGFP-C1质粒(4.2 kb)购自Roche公司(Basel, Switzerland),产物为增强型绿色荧光蛋白(EGFP)。

质粒通过DH5 α 感受态细胞(Invitrogen Carlsbad, CA, USA)进行转化,按试剂盒(Qiagen, Hilden, Germany)要求抽提和纯化质粒。对获得的质粒DNA运用分光光度计测定其浓度(1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$),在260 nm波长下测定质粒DNA的光密度(OD),当OD₂₆₀与OD₂₈₀的比值在1.8~2.1之间,表明质粒DNA没有被污染,-20℃保存备用。

1.1.2 微泡 Sonovue微泡为Bracco公司(Milano, Italy)产品。使用0.9%盐水溶液配制Sonovue微泡悬液,通过倒置或振荡使微泡均匀分

布,微泡密度为 $2 \times 10^8 \sim 5 \times 10^8/\text{mL}$,浓度5 mg/mL。

1.1.3 Sonovue/DNA复合物 实验前将100 μL Sonovue与100 μL (100 μg)质粒DNA溶液混匀,4℃备用。

1.2 动物

Wistar大鼠42只,体质量300~400 g,雌雄各半,随机分组。大鼠在适合温度及湿度的房间、用标准饲料及水饲养。所有实验按照四川大学动物研究委员会规则进行。

1.3 超声辐照及注射方式

用2%戊巴比妥钠40 mg/kg腹腔注射大鼠,麻醉后将大鼠固定于实验台上,小腿处备皮,周围涂抹耦合剂。超声辐照选用超声治疗仪(Sonic Master ES-2, OG Giken),探头面积为10 cm²,探头频率1 MHz,脉冲重复频率100 Hz,输出功率、占空比及时间可调。

肌肉局部注射:用1 mL注射针于大鼠下肢脱毛处膝-踝中点(胫前肌)垂直进针2~3 mm,匀速推药,时程>10 s,完毕后等待5 s后抽针,注射后立即用超声辐照肌肉注射区域。

静脉注射:经大鼠尾静脉缓慢匀速推注溶液,于开始推注后15 s开始超声辐照胫前肌区域。微泡静脉推注时间与超声治疗时间相同。

1.4 超声辐照条件选择

用EGFP判断基因转染是否有效及大致判断转染效果,即根据荧光染色及免疫组化染色下肌肉EGFP的表达判断转染效果。取24只大鼠的双侧胫前肌($n=48$)进行3个系列实验,每只大鼠均于双侧胫前肌分别注入100 μL (100 μg)EGFP质粒与100 μL Sonovue混合溶液后立即用超声辐照,于超声辐照后5 d处死大鼠,分3个步骤,根据转染效果好且HE染色下肌肉损伤最小选出适合的超声辐照条件。

1.4.1 不同输出功率 选取6只大鼠,随机平均分为2组,2组占空比均为20%,治疗时间均为3 min,第一组选用输出功率1 W/cm²,第二组选用输出功率2 W/cm²。

1.4.2 不同占空比 选取 9 只大鼠,随机平均分为 3 组,第一组占空比 20%,第二组 30%,第三组 50%,3 组辐照时间均为 3 min,输出功率由 1.4.1 决定。

1.4.3 不同辐照时间 选取 9 只大鼠,随机平均分为 3 组,第一步辐照时间 1 min,第二组 3 min,第三组 5 min,输出功率由 1.4.1 决定,占空比由 1.4.2 决定。

1.5 注射方式选择

选取 6 只大鼠,随机平均分为 2 组,超声辐照条件由 1.4 决定,第一组胫前肌分别注入 100 μ L(100 μ g)EGFP 质粒与 100 μ L Sonovue 混合溶液,第二组分 2 次分别经大鼠尾静脉缓慢匀速推注相同量混合溶液,两次静脉推注时间间隔 30 min。于超声辐照后 5 d 处死大鼠,根据荧光染色及免疫组化染色下转染效果好且 HE 染色下肌肉损伤最小选出适合的注射方式。

1.6 不同治疗方式比较

选取 12 只大鼠的双侧胫前肌($n=24$),依据注射不同物质及超声辐照将其随机平均分为 4 组:①超声辐照+微泡+质粒组,②微泡+质粒组,③超声辐照+质粒组,④单纯质粒组。以上 4 组质粒均为 100 μ L,前 2 组微泡均为 100 μ L,超声辐照条件与注射方式由 1.4 及 1.5 决定。荧光染色及免疫组化染色下观察各组肌肉 EGFP 表达情况,HE 染色下观察肌肉有无损伤。

1.7 病理检查

经静脉注射过量戊巴比妥钠将大鼠处死,取辐照区肌肉组织。将新鲜肌肉组织立即置于恒冷箱切片机内冻结 15 min,然后修整组织,包埋固定,进行冰冻切片,以间距 90 μ m 将肌肉横切为厚度 7 μ m 薄片,然后用 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)对细胞核进行染色,荧光显微镜下细胞核呈黄色为阳性。搜集所有冰冻切片,荧光倒置显微镜(Nikon TE 2000 U, Nikon, Japan)200 倍下每一切片随机观察 10 个视野,选取绿色荧光表达最明显的切片,运用 computerized image analysis (Image-Pro Plus, Media Cybernetics)进行测量,数据用表达荧光的肌纤维数占肌纤维总数的百分比和 EGFP 荧光的平均光密度(MOD)值表达,测量 3 次后取平均值。

肌肉组织用 10 %甲醛固定 24 h,经石蜡包埋,部分标本切成 5 μ m 薄片后行 HE 染色,观察组织有无损伤。部分标本进行免疫组化染色,一抗为 GFP(小鼠来源单克隆抗体),滴度为 1 : 1000,采用 Envision 二步法。运用 Image-Pro Plus 软件(Media Cybernetics)对 EGFP 表达最强处进行测量,数据用 EGFP 阳性染色即棕黄色区的 MOD 值

表达,测量 3 次后取平均值。

病理观察由 2 名有 5 年以上工作经验的病理医师进行观察和评价,观察者不了解实验分组及实验条件。评价前行诊断一致性实验, $\kappa=0.88$ 。

1.8 统计学方法

两组间均数比较用 t 检验,多组数据间均数比较用方差分析,进一步两组间比较用 LSD 法。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 超声辐照条件选择

2.1.1 不同输出功率的转染效果比较 双侧胫前肌局部注射相同量微泡与质粒溶液,在占空比、辐照时间相同条件下,超声输出功率 2 W/cm² 较 1 W/cm² EGFP 表达明显($P<0.05$)(表 1)。光镜下观察正常组织未见损伤(图 1)。因此 2 W/cm² 为更合适的输出功率。

表 1 不同输出功率的转染效果比较 ($n=6$)

Table 1 Comparison of the transfection efficiency of different power outputs ($n=6$)

	Power output		<i>P</i>
	2 W/cm ²	1 W/cm ²	
EGFP expression cell percentage (%)	69.00 $\pm$ 5.67	30.33 $\pm$ 3.61	<0.05
Fluorescence intensity (MOD)	0.25 $\pm$ 0.02	0.16 $\pm$ 0.01	<0.05
EGFP-staining intensity (MOD)	0.19 $\pm$ 0.02	0.11 $\pm$ 0.01	<0.05

MOD: Mean optical density

2.1.2 不同占空比的转染效果比较 双侧胫前肌局部注射相同量微泡与质粒溶液,在超声输出功率、辐照时间相同条件下,占空比 20% 较 30%、50% EGFP 表达更明显($P<0.05$),30% 组与 50% 组间比较差异没有统计学意义(表 2)。光镜下观察,在占空比 50% 条件下,辐照区部分肌肉坏死伴炎性细胞浸润(图 2),其余条件未见明显损伤。因此 20% 为更合适的占空比。

2.1.3 不同辐照时间的转染效果比较 双侧胫前肌局部注射相同量微泡与质粒溶液,在超声输出功率、占空比相同条件下,超声辐照时间越长 EGFP 表达越明显 ($P<0.05$),但 5 min 组出现辐照区部分肌肉坏死伴炎性细胞浸润,余条件未见肌肉组织损伤(表 3)。因此 3 min 为更合适的占空比。

2.2 注射方式选择

运用输出功率为 2 W/cm²、占空比为 20%、辐照时间为 3 min,100 μ L(100 μ g)EGFP 质粒与 100 μ L Sonovue 混合液条件,肌肉局部注射较静脉注射 EGFP 表达明显($P<0.05$)(表 4),两种方法均未发现明显肌肉损伤。

2.3 不同治疗方式的比较

使用肌肉局部注射微泡与质粒混合液,质粒量为 100 μg ,超声辐照选用输出功率 2 W/cm^2 ,占空比 20%,辐照时间 3 min 条件进行实验,荧光

图 1 正常肌肉 HE 染色图片。 $\times 200$

图 2 异常肌肉 HE 染色图片。 $\times 200$

图 3 荧光显微镜下观察 EGFP 表达。 $\times 200$

图 4 免疫组化观察 EGFP 表达。Envision $\times 400$

Fig 1 Image of normal muscle. HE $\times 200$

Fig 2 Image of abnormal muscle. HE $\times 200$

Fig 3 Detection of EGFP expression under fluorescence microscopy. $\times 200$

Fig 4 Immunohistochemical analysis of EGFP expression. Envision $\times 400$

1A, 2A: Cross section; 1B, 2B: Longitudinal section; 3A, 3C, 3E, 3G: Fluorescence images; 3B, 3D, 3F, 3H: DAPI images; 3A, 3B, 4A: US+MB+PL group; 3C, 3D, 4B: MB+PL group; 3E, 3F, 4C: US+PL group; 3G, 3H, 4D: PL group. The US+MB+PL group showed the brightest fluorescence and the greatest positive immunoreactivity. US: Ultrasound; MB: Microbubbles; PL: Plasmid

表 2 不同占空比的转染效果比较 ($n=6$)

Table 2 Comparison of the transfection efficiency of different duty cycles ($n=6$)

	Duty cycle		
	20%	30%	50%
EGFP expression cell percentage (%)	69.83 $\pm$ 4.49 *	37.50 $\pm$ 4.37	36.33 $\pm$ 3.56
Fluorescence intensity (MOD)	0.26 $\pm$ 0.02 *	0.15 $\pm$ 0.01	0.15 $\pm$ 0.02
EGFP-staining intensity (MOD)	0.18 $\pm$ 0.02 *	0.11 $\pm$ 0.01	0.11 $\pm$ 0.02

* $P<0.05$, vs. 30% and 50% groups

表 3 不同辐照时间的转染效果比较 (n=6)

Table 3 Comparison of the transfection efficiency of different ultrasound pulse durations (n=6)

	Ultrasound pulse duration		
	1 min	3 min	5 min
EGFP expression cell percentage (%)	17.50±4.51	70.00±3.16*	85.83±2.86*·#
Fluorescence intensity (MOD)	0.11±0.01	0.24±0.01*	0.33±0.03*·#
EGFP-staining intensity (MOD)	0.06±0.02	0.19±0.02*	0.27±0.03*·#

* P<0.05, vs. 1 min group; # P<0.05, vs. 3 min group

表 4 不同注射方式的转染效果比较 (n=6)

Table 4 Comparison of the transfection efficiency of different injection methods (n=6)

	Injection method		P
	Local injection	Intravenous injection	
EGFP expression cell percentage (%)	69.33±3.20	37.33±3.27	<0.05
Fluorescence intensity (MOD)	0.24±0.02	0.14±0.02	<0.05
EGFP-staining intensity (MOD)	0.18±0.01	0.10±0.01	<0.05

及免疫组化结果都显示超声辐照+微泡+质粒组

表 5 不同治疗方式的转染效果比较 (n=6)

Table 5 Comparison of the transfection efficiency of different ultrasound pulse durations (n=6)

	US+MB+PL	MB+PL	US+PL	PL
EGFP expression cell percentage (%)	69.83±5.27*·#	30.33±2.58*	7.83±1.72	7.00±2.61
Fluorescence intensity (MOD)	0.26±0.02*·#	0.13±0.01*	0.07±0.01	0.06±0.01
EGFP-staining intensity (MOD)	0.20±0.03*·#	0.09±0.02*	0.04±0.01	0.05±0.01

* P<0.05, vs. US+PL and PL groups; # P<0.05, vs. MB+PL group

3 讨论

基因治疗作为一种新的治疗方式,具有选择性高、能稳定作用到靶基因的优点。用作基因治疗的载体大致可分为病毒和非病毒载体,均可对肌肉进行体内基因转染,但有各自局限性^[5,6]。UMMD 是一种新型的基因转染方法,具有较高转染效率、靶向性和安全性等特点,研究已涉及多种体外细胞及体内组织器官^[7,8]。既往已有对于超声联合质粒及微泡对于肌肉转染的研究^[9],但较少有对其参数优化的相关研究,由于 UMMD 在不同条件下其基因转染效率存在差异,因此有必要进行进一步的研究。我们着重于 UMMD 肌肉基因转染的可能性、最优转染条件的研究,为基因治疗寻找一种新的非病毒性基因转染方法。

3.1 UMMD 促进体内肌肉基因转染的参数优化实验

UMMD 促进基因转染的同时,也可能损伤组织和细胞。微泡破裂的瞬间压力可能导致细胞产生可修复性声孔或致死性声孔效应,也可导致微血管破裂和组织结构断裂^[10]。从基因治疗的角度,为达到有效的治疗效果,必须要有较高的基因转染效率。但是超声破坏微泡产生超声空化等效应太强时,会导致细胞死亡,因此需要合适的条件使基因能够进

(US+MB+PL)与微泡+质粒(MB+PL)EGFP 转染效果优于其余两组,超声辐照+微泡+质粒组最为明显,荧光表达部分明亮,部分较暗淡(P<0.05),超声+质粒组(US+PL)及单纯质粒组(PL)EGFP 表达均很低,两组差异无统计学意义(P>0.05)(图 3,图 4,表 5)。HE 染色下,各组辐照区肌肉均未出现明显炎性细胞浸润或坏死表现,即各组均未发现明显肌肉损伤。

入细胞而同时细胞损伤最小。在 UMMD 促进基因转染过程中,必须掌握好超声强度同组织损伤的平衡关系。研究表明,基因转染效率受超声输出功率、占空比、辐照时间、质粒/微泡量以及注射方式等多种因素影响,对于体内及体外转染、不同的细胞及组织,其适合的转染条件有一定的差别^[8],因此,为基因治疗寻求一种适合的肌肉基因转染条件尤为重要。

在超声辐照方式的研究中,每只大鼠肌肉注入质粒与 Sonovue 混合溶液后立即用超声辐照,输出功率 2 W/cm² 较 1 W/cm² 时的 EGFP 表达更明显,且对辐照区正常组织无明显损伤。在占空比的研究中,20%转染效率最高,50%出现了辐照区部分肌肉坏死伴炎性细胞浸润,其余条件未见损伤。在辐照时间的研究中,时间延长转染效果增加,但 5 min 时辐照区部分肌肉坏死伴炎性细胞浸润。在对注射方式的研究中,运用相同的超声辐照条件及质粒/微泡量时,肌肉局部注射较静脉注射 EGFP 表达明显,正常组织未见明显损伤,因此,肌肉局部注射为更适合的方式。

因此,我们认为,选用超声输出功率 2 W/cm²,占空比 20%,超声辐照时间 3 min,肌肉局部注射为最适合体内基因转染的条件,在此条件下,能获得较好的基因转染效果,且辐照区正常组织不会出现损

伤。

3.2 不同治疗方式的转染效果比较

Taniyama 等^[11]用编码荧光素的质粒体外转染细胞,微泡联合超声照射组比单纯质粒组荧光素活性高 7000~8000 倍,体内实验中,质粒+微泡+超声照射组比单纯质粒组荧光素活性高约 1000 倍。国内外有多项研究,运用不同种类的超声微泡进行 UMMD 肌肉基因转染的实验,结果表明部分微泡如 Optison、Sonovue 等能促进基因转染,部分微泡如 Levovist 则没有此作用^[12,13]。我们的研究运用 Sonovue 与 EGFP 质粒联合,在大鼠胫前肌局部注射微泡与质粒混合物,应用前一步得出的最适合体内基因转染条件进行基因转染,结果发现超声辐照联合微泡及质粒对 EGFP 基因的转染效果优于其他 3 组,微泡联合质粒同样也能达到基因转染的目的,但转染效果低于联合超声辐照组。单纯的微泡+质粒,与单纯注射质粒其转染效果极差。该结果与其他研究结果相符。因此,Sonovue 联合治疗超声辐照能明显增强体内肌肉基因的转染效果。

EGFP 可用于判断基因转染是否有效及大致判断转染效果,但不能做到完全量化,这是本研究的不足之处,我们在以后的研究中将运用荧光素酶进行量化实验。

综上,本研究发现,UMMD 促进大鼠体内肌肉基因转染的适合条件为输出功率 2 W/cm²,占空比 20%,超声辐照时间 3 min,肌肉局部注射微泡及质粒混合液,此条件下 UMMD 能明显增强质粒转染大鼠体内肌肉基因的效果,并不损伤辐照区正常组织,可作为疾病基因治疗的一种安全有效的非病毒性基因转染方法。

参 考 文 献

1 Li HL, Zheng XZ, Wang HP, *et al.* Ultrasound-targeted microbubble destruction enhances AAV-mediated gene transfection in human RPE cells *in vitro* and rat retina *in vivo*. *Gene Ther.* 2009;16(9):1146-1153.
2 Shen ZP, Brayman AA, Chen L, *et al.* Ultrasound with microbubbles enhances gene expression of plasmid DNA in the

liver via intraportal delivery. *Gene Ther.* 2008;15(16):1147-1155.
3 Aoi A, Watanabe Y, Mori S, *et al.* Herpes simplex virus thymidine kinase-mediated suicide gene therapy using nano microbubbles and ultrasound. *Ultrasound Med Biol.* 2008;34(3):425-434.
4 Li Y, Wang J, Satterle A, *et al.* Gene transfer to skeletal muscle by site-specific delivery of electroporation and ultrasound. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;424(2):203-207.
5 Phillips JL, Hegge J, Wolff JA, *et al.* Systemic gene transfer to skeletal muscle using reengineered AAV vectors. *Methods Mol Biol.* 2011;709:141-151.
6 Yang L, Li J, Xiao X. Directed evolution of adeno-associated virus (AAV) as vector for muscle gene therapy. *Methods Mol Biol.* 2011;709:127-139.
7 Guo H, Leung JC, Chan LY, *et al.* Ultrasound-contrast agent mediated naked gene delivery in the peritoneal cavity of adult rat. *Gene Ther.* 2007;14(24):1712-1720.
8 Newman CM, Bettinger T. Gene therapy progress and prospects:ultrasound for gene transfer. *Gene Ther.* 2007;14(6):465-475.
9 Liao ZK, Tsai KC, Wang HT, *et al.* Sonoporation-mediated anti-angiogenic gene transfer into muscle effectively regresses distant orthotopic tumors. *Cancer Gene Ther.* 2012;19(3):171-180.
10 Collis J, Manasseh R, Liovic P, *et al.* Cavitation microstreaming and stress fields created by microbubbles. *Ultrasonics.* 2010;50(2):273-279.
11 Taniyama Y, Azuma J, Rakugi H, *et al.* Plasmid DNA-based gene transfer with ultrasound and microbubbles. *Curr Gene Ther.* 2011;11(6):485-90.
12 Chen YC, Jiang LP, Liu NX, *et al.* Optison microbubbles and ultrasound cooperate in mediating plasmid DNA transfection in mouse skeletal muscles *in vivo*. *Ultrason Sonochem.* 2011;18(2):513-519.
13 Wang X, Liang HD, Dong B, *et al.* Gene transfer with microbubble ultrasound and plasmid DNA into skeletal muscle of mice: comparison between commercially available microbubble contrast agents. *Radiology.* 2005;237(1):224-229.

(2012-04-16 收稿,2012-08-02 修回)

编辑 吕 熙