

超声微泡转染前列腺癌细胞的参数筛选

谢鑫¹, 陈峰^{1△}, 姜庆², 郑元义³ (1. 重庆市南川区人民医院泌尿外科 408400; 重庆医科大学附属第二医院; 2. 泌尿外; 3. 超声研究所 400010)

【摘要】目的 观察不同辐照参数下超声微泡对前列腺癌细胞生长及基因转染效率的影响。**方法** 采用噻唑兰比色法检测单纯超声、单纯微泡、超声辐照微泡对前列腺癌细胞生存率的影响。荧光显微镜观察超声微泡介导的质粒为 EGFP 基因与 HSV 1-TK 基因共表达载体。观察它对前列腺癌细胞 PC-3 转染后荧光表达情况, Western blot 检测 EGFP 蛋白的表达情况。**结果** MTT 显示超声强度为 1.0 W/cm^2 , 频率为 1 MHz , 辐照时间 30 s 时超声辐照对细胞无明显的抑制作用; 采用不同浓度的微泡对前列腺癌细胞 PC-3 作用 24 h 后, 各实验组细胞存活率与对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 当采用最适的超声辐照时间辐照微泡浓度为 $10, 20, 40, 80 \mu\text{L}$ 时, 超声+微泡 ($80 \mu\text{L}$) 组细胞存活率低, 与对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而 $10, 20, 40 \mu\text{L}$ 组中细胞生长良好; 转染 EGFP 后 48 h , 在荧光显微镜观察对照组未见荧光表达, 其他各组中均有荧光表达, 并随着微泡剂量的增加, 荧光表达量增多; Western blot 检测显示各处理组中均有 EGFP 蛋白的表达, 超声+微泡 ($20 \mu\text{L}$) + TK ($1 \mu\text{g}$) 组、超声+微泡 ($40 \mu\text{L}$) + TK ($1 \mu\text{g}$) 组的 EGFP 蛋白表达明显高于其他各组。**结论** 在最适辐照参数下, 超声微泡造影剂能够有效地促进 TK 基因的转染。

【关键词】 前列腺癌; 超声微泡; 超声参数; 基因转染

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2012.17.003 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)17-2118-03

The screening of radiation parameters of ultrasound microbubble contrast agent to enhance gene transfection in prostate cancer cells XIE Xin¹, CHEN Feng^{1△}, JIANG Qing², ZHEN Yuan-yi³ (1. Department of Urology, People's Hospital of Nanchuan District, Chongqing 408400, China; 2. Department of Urology; 3. Institute of Ultrasound, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, 400010, China)

【Abstract】Objective To observe the growth condition of prostate cancer cells and gene transfection under different radiation parameters by ultrasound mediated microbubble destruction. **Methods** The growth condition of prostate cancer cells influenced by ultrasound, microbubble and ultrasound mediated microbubble destruction were detected by MTT. An inverted fluorescence microscope was used to observe ultrasound microbubble contrast agent mediated plasmid gene for co expression vector of the EGFP gene and HSV 1-TK. Its fluorescence after transfection of prostate cancer cells PC-3 expression was observed, and by EGFP protein expression was detected by Western blot. **Results** MTT assay showed that ultrasonic had no significant inhibition on cell viability under the conditions of the magnitude (1.0 W/cm^2), frequency (1 MHz), and every 30 s ultrasound exposure time. Different doses of microbubble were added into PC-3 cell. After 24 hours , there has no significant difference in the survival rates between the experiment groups and the control group. Ultrasound mediated microbubble ($80 \mu\text{L}$) destruction could reduce the survival rate of PC-3 cell significantly, while ultrasound mediated microbubble ($10, 20, 40 \mu\text{L}$) destruction did not have much influence on PC-3 cell. After transfer EGFP 48 h , the fluorescence microscopy found that the green fluorescence could be seen both in ultrasound mediated microbubble destruction groups. with the increasing of the dose of microbubble, fluorescence expression increased. Western blot test showed that the treatment groups all had EGFP protein expressions. In ultrasound + microbubble ($20 \mu\text{L}$) + TK ($1 \mu\text{g}$) group, ultrasound + microbubble ($40 \mu\text{L}$) + TK ($1 \mu\text{g}$) group, EGFP of protein expression was much higher than other groups. **Conclusion** In the most comfortable radiation parameters, ultrasound microbubble can effectively transfer TK genes.

【Key words】 prostate cancer; ultrasound microbubble; ultrasound parameters; gene transfection

随着前列腺癌 (Prostate cancer, PCa) 发病率迅速升高, PCa 的治疗成为肿瘤研究关注的焦点之一, 而基因疗法是肿瘤治疗研究的热点和希望所在, 其中近年出现的单纯疱疹病毒 I 型胸苷激酶/更昔洛韦 (herpes simplex virus type I-thymidine kinase/ganciclovir, HSV 1-TK/GCV) 系统显示出了良好的应用前景^[1]。然而病毒载体的安全性及非病毒载体的低效性等问题限制了肿瘤基因疗法的进一步发展。最近出现的一种新基因靶向转染技术——利用微泡造影剂在低频超声辐照下定向释

放靶基因, 有望解决上述问题^[2]。但目前利用超声微泡造影剂转染基因尚无统一优化的参数指标, 作者利用超声微泡造影剂携 HSV 1-TK 自杀基因对前列腺癌细胞 PC-3 进行转染, 并对超声辐照的强度、时间及微泡的浓度等参数指标对转染效率的影响进行了初步探讨, 为前列腺癌的基因治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 前列腺癌 PC-3 细胞株由本科室保存; 超声微泡造影剂为重庆医科大学附属第二医院超声影像学研究所惠赠。

增强型绿色荧光蛋白与单纯疱疹病毒 1 型胸苷激酶真核共表达质粒载体 pRS2-EGFP-HSV 1-TK 为重庆医科大学周世骥博士构建并惠赠^[3]。无内毒素质粒抽取纯化试剂盒购自 Omega 公司,多聚赖氨酸购自美国 Sigma 公司,更昔洛韦(GCV)购自湖北科益药业有限公司。RPMI 1640 购自美国 Gibco 公司,胎牛血清购自杭州四季青公司;TK1 单克隆抗体购自英国 Abcam 公司,辣根过氧化物酶(HRP)标记的第二抗体购自美国 GenScript 公司,内参照肌动蛋白购自美国 GenScript 公司。

1.2 方法

1.2.1 PC-3 细胞的培养 应用 RPMI 1640 培养液(含 10% 灭活胎牛血清、青霉素 100×10³/L、链霉素 100×10³/L)常规在 37℃,5%的 CO₂ 孵箱中培养,48 h 更换培养液,待细胞长至 80%~90%时传代。

1.2.2 MTT 筛选培养细胞超声辐照最适时间 培养 PC-3 细胞生长至 80%~90%时,倾去培养液,用磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗,0.125%胰蛋白酶在 37℃消化至细胞皱缩变圆,弃去胰酶,加入无血清培养基重悬。调整细胞数为 5×10⁴/mL,采用超声辐照(施加声强 1.0 W/cm²,频率为 1 MHz,辐照时间分别为 0、30、60、90、180 s)细胞后,以每孔 200 μL 接种于 96 孔板中,每组 6 复孔,置于孵箱中培养过夜,加入 5 g/mL 的 MTT 20 μL,继续培养 4 h 后吸弃培养基加入二甲亚砜(DMSO)200 μL,振荡 10 min,于自动酶标仪 570 nm 波长处测定各孔的吸光值[A_{570 nm}],并按公式计算细胞存活率:细胞存活率=[实验组 A_{570 nm}值/对照组 A_{570 nm}值]×100%。

1.2.3 微泡的制备及 MTT 法检测微泡剂量对 PC-3 细胞存活率的影响 微泡造影剂冻干粉由重庆医科大学附属第二医院超声研究所合成,加入 3 mL PBS 缓冲液,用力振摇即可产生微泡,常规显微镜下观察脂质微泡的形态,微泡浓度为 6.0×10⁷/mL。取对数生长期细胞,0.125%胰酶消化,离心,制备单细胞悬液,调整细胞浓度为 1×10⁵/mL,每孔总量 1 000 μL 接种于 24 孔板,每孔分别加入了微泡体积为 0、10、20、40、80 μL。每组样本设 6 复孔,置于孵箱中继续培养 24 h。加入浓度为 5 g/L 的 MTT 100 μL,继续培养 4 h 后吸弃培养基加入 DMSO 200 μL,振荡 10 min,于自动酶标仪测定 570 nm 波长处各孔的 A 值,并按以上公式计算细胞存活率。

1.2.4 MTT 检测超声辐照微泡对 PC-3 细胞活性的影响 取对数生长期细胞,0.125%胰酶消化,离心,制备单细胞悬液,调整细胞浓度为 1×10⁵/mL,实验分组为对照组,超声+微泡(10 μL)组,超声+微泡(20 μL)组,超声+微泡(40 μL)组,超声+微泡(80 μL)组。辐照条件为:声强 1.0 W/cm²,频率为 1 MHz,辐照时间为 30 s。辐照结束后以每孔 1 000 μL 接种于 24 孔板中,每组 6 复孔,置于孵箱中培养过夜,加入浓度为 5 g/L 的 MTT 200 μL,继续培养 4 h 后吸弃培养基加入 DMSO 200 μL,振荡 10 min,于自动酶标仪测定 570 nm 波长处各孔的 A 值,并按以上公式计算细胞存活率。

1.2.5 荧光显微镜观察携 HSV 1-TK 基因超声微泡造影剂转染前列腺癌细胞后的表达情况 按照试剂盒的说明书提取 pRS2-EGFP-HSV 1-TK 质粒;经紫外分光光度计检测合格(纯度 A_{260 nm}/A_{280 nm}为 1.85,调整浓度为 1 g/L),将含有 HSV1-TK 基因的质粒通过静电吸附在脂质微泡表面。取对数生长期的细胞(方法同 1.2.3)根据前期实验结果按以下分组进行转染:对照组、超声+微泡(10 μL)+TK(1 μg)组、超声+微泡(20 μL)+TK(1 μg)组、超声+微泡(40 μL)+TK(1 μg)组。转染后孵育 4~6 h 更换完全培养基继续培养,48 h 后在荧光显微镜下观察其绿色荧光蛋白(GFP)表达情况。

1.2.6 Western blot 检测 TK 蛋白的表达情况 采用 Aoi 等^[4]的方法,转染 72 h 后收集细胞的总蛋白-20℃保存。常规进行 Western blot 检测,经电泳(60 V,30 min,100 V,90 min)、转膜、封闭等步骤后,加入抗 TK1 单抗(1:500),室温孵育 2 h,4℃过夜。Tris 缓冲盐溶液洗膜 3 次,15 min/次,加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:5 000),室温下轻摇孵育 2 h;再经洗膜、显影、曝光等步骤后,采用 UVP 凝胶图像处理系统 Labworks4.6 软件分析目的条带与内参照 β-肌动蛋白的灰度值比值。

1.3 统计学处理 所有数据采用 SPSS17.0 软件分析,多组数据间采用多因素的 *q* 检验分析,两组数据间采用 *t* 检验分析,结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 最佳辐照时间确定 超声基因转染仪在声强 1.0 W/cm²,频率为 1 MHz,辐照时间为 30 s 时细胞的存活率最高(93.83%),因此,此参数为超声转染的最适参数(表 1)。

表 1 不同的辐照时间对前列腺癌细胞 PC-3 存活率的影响(n=6)

辐照时间	A _{570 nm} ($\bar{x} \pm s$)	存活率(%)
0 s	0.583±0.058	100.00
30 s	0.547±0.047	93.83
60 s	0.502±0.045	86.10
90 s	0.288±0.060	49.40
180 s	0.273±0.055	46.83

2.2 自制脂质微泡光镜下的特征 微泡浓度为 1.5×10⁷ 个/微升,粒径分布均匀,分散度好,见图 1。

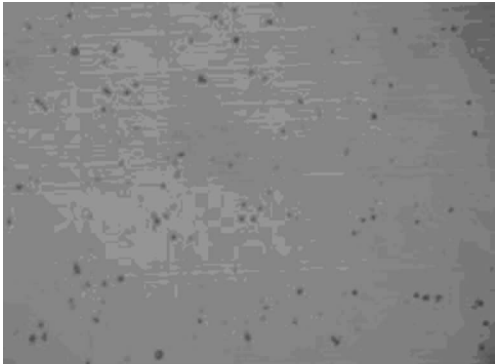


图 1 脂质微泡造影剂(×100)

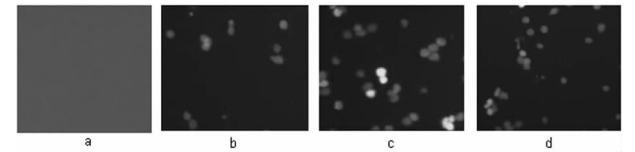
2.3 不同剂量微泡对前列腺癌细胞 PC-3 的影响 不同剂量的微泡作用细胞 24 h 后,用 MTT 法检测发现,各实验组中细胞存活率与对照组比较差异无统计学意义(*P*>0.05),见表 2。

表 2 不同浓度的微泡对前列腺癌细胞 PC-3 的存活率影响(n=6,%)

微泡剂量(μL)	A _{570 nm} ($\bar{x} \pm s$)	存活率(%)
0	0.565±0.033	100.00
10	0.552±0.021	97.70
20	0.554±0.025	98.05
40	0.538±0.018	95.22
80	0.521±0.022	92.21

2.4 超声辐照+微泡对前列腺癌细胞 PC-3 的影响 采用最适超声辐照时间分别辐照不同剂量的微泡,使用 MTT 法测出各组细胞的存活率分别为,超声+微泡(10 μ L)组中细胞存活率为 93.25%,超声+微泡(20 μ L)组中细胞存活率为 93.17%,超声+微泡(40 μ L)组中细胞存活率为 89.58%,超声+微泡(80 μ L)组中细胞存活率为 65.36%,与对照组相比超声+微泡(80 μ L)组明显影响细胞 PC-3 的存活率,达不到基因转染的条件。

2.5 增强型绿色荧光蛋白的表达情况 细胞通过超声介导微泡转染后置荧光显微镜下观察,可见对照组无荧光表达,而实验组都有荧光表达,随着微泡剂量的增加,荧光表达量增多,但微泡增加到一定剂量时荧光表达有减少趋势,见图 2。

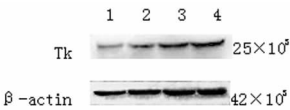


注:a 为对照组;b 为超声辐照+微泡(10 μ L)+TK(1 μ g)组;c 为超声辐照+微泡(20 μ L)+TK(1 μ g)组;d 为超声辐照+微泡(40 μ L)+TK(1 μ g)组。

图 2 荧光显微镜观察转染后 PC-3 细胞荧光表达情况($\times 100$)

2.5 超声联合微泡转染后对细胞活性的影响 超声在声强为 1.0 W/cm²,频率为 1 MHz,辐射时间为 30 s 条件下转染细胞 48 h 后用 MTT 法测出各组细胞的存活率为:对照组 100%;超声+微泡(10 μ L)组 93.23% $\pm$ 0.16%;超声+微泡(20 μ L)组 93.01% $\pm$ 0.08%;超声+微泡(40 μ L)组 87.59% $\pm$ 0.15%。与对照组相比差异无统计学意义($P>0.05$)。说明在合适的超声条件下联合微泡造影剂对细胞的生长无明显的抑制。

2.6 Western blot 检测 TK 蛋白的表达 转染 72 h 后超声+微泡(20 μ L)+TK(1 μ g)组、超声+微泡(40 μ L)+TK(1 μ g)组的 TK 蛋白表达明显高于其他各组,差异具有统计学意义($P<0.05$),而该两组之间相对比值分别为(0.85 $\pm$ 0.05)、(0.83 $\pm$ 0.02),两组比较差异无统计学意义($P>0.05$),见图 3。



注:1 为对照组,2 为超声+微泡(10 μ L)+TK(1 μ g),3 为超声+微泡(20 μ L)+TK(1 μ g),4 为超声+微泡(40 μ L)+TK(1 μ g)。

图 3 Western blot 检测 TK 蛋白的表达

3 讨 论

近年来有研究发现超声可提高裸 DNA 在培养细胞和体内组织中的转染效率,而其机制主要为超声空化效应,声场内的超声波破坏微泡造影剂后,其产生的空化和机械效应可使细胞膜的通透性增加,基因可以通过破裂的微血管到达组织细胞内,从而达到提高基因转染靶向性和效率的目的。既往研究发现,超声微泡造影剂能够明显增加自杀基因质粒在肿瘤组织中的导入及表达,发挥杀伤肿瘤的作用^[5]。超声微泡造影剂作为一种空化核,可明显增强此作用,从而为裸 DNA 在细胞的转染提供了一种新的方法^[6-7]。冉海涛等^[8]体外研究证实了这一点,他们将体外培养的大鼠肺动脉平滑肌细胞,加入微泡后用超声辐照 20 s,电镜观察证实,细胞膜形态结构可见大小不等、

数量不一的小孔,呈“弹坑样”或“火山口样”,导致细胞膜通透性明显增加。

目前已有研究表明,采用超声频率为 1~2 MHz,声强为 0.5~2.0 W/cm² 可调控的脉冲波辐照微泡可以明显地促进基因的转染,但是空化作用同时有可能会产生非治疗性的生物学效应,这些因素可能对人体组织有一定的伤害^[9-10]。因此,本研究筛选了对 PC-3 细胞活性无明显抑制的最适超声辐照参数,实验发现随着超声辐照时间的延长及微泡剂量逐渐增大,细胞的存活率明显降低。而微泡达到一定剂量时,其转染效率无明显变化,可能是由于超声辐照微泡产生的声孔效应不同,在相同的超声辐照条件下,微泡的浓度和辐照未超过一定的范围,微泡与细胞间距较大,产生的可修复性声孔效应,对细胞的活性无明显的抑制,可促进基因的转染。然而当辐照时间延长或微泡浓度增加到一定范围时,细胞周围聚集较多携带基因的微泡,微泡与细胞间的距离减小,产生致死性的声孔效应导致细胞死亡,从而转染率也相应地降低。Miller 和 Quddus^[11]使用超声(1.5 MHz)辐照加有 2% 超声造影剂 Optison 和质粒 pGFP 的体外培养的单层表皮细胞,48 h 后经流式细胞仪检测到有 3.7% 瞬时转染率,但细胞死亡率达 28.6%。本实验中则发现,采用 1 MHz 的频率、时间为 30 s 的参数进行辐照,当微泡浓度为 1.5 $\times 10^7$ /mL,加入量为 80 μ L 时,细胞的死亡率约 35%,丧失了基因转染的价值;而体积为 20~40 μ L 时,可减少细胞的损伤及更有效地提高转染率,超声频率也接近动物体内转染的频率;而且转染后细胞的活性较高,48 h 后各组的生存率可达 85% 以上,提示这一方法可提高靶细胞的基因转染效率,增强靶向治疗的效果,具有良好的应用价值^[12]。

综上所述,在合适的超声参数下,超声微泡造影剂能够有效的促进自杀基因 HSV 1-TK 转染及表达,为前列腺癌的基因靶向治疗提供实验依据。

参考文献

[1] Freytag SO, Stricker H, Peabody J, et al. Five-year follow-up of trial of replication-competent adenovirus-mediated suicide gene therapy for treatment of prostate cancer[J]. Mol Ther, 2007, 15(3): 636-642.

[2] Watanabe Y, Aoi A, Horie S, et al. Low-intensity ultrasound and microbubbles enhance the antitumor effect of cisplatin[J]. Cancer Sci, 2008, 99(12): 2525-2531.

[3] 唐勇, 刘作金, 周世骧, 等. 增强型绿色荧光蛋白与单纯疱疹病毒 1 型胸苷激酶共表达质粒载体构建及在肝癌细胞株 HepG2 中表达的研究[J]. 中国实用外科杂志, 2009, 29(11): 937-940.

[4] Aoi A, Watanabe Y, Mori S, et al. Herpes simplex virus thymidine kinase-mediated suicide gene therapy using nano/microbubbles and ultrasound[J]. Ultrasound Med Biol, 2008, 34(3): 425-434.

[5] 蔡宇, 廖伟, 周世骧, 等. 全反式维甲酸增强超声微泡包裹的单纯疱疹病毒胸苷激酶自杀基因治疗荷肝癌裸鼠的效果[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(20): 2112-2115.

[6] Juffermans LJ, Meijering DB, van Wamel A, et al. Ultrasound and microbubble-targeted delivery of therapeutic compounds: ICIN Report Project 49: Drug and gene delivery through ultrasound and microbubbles[J]. Neth Heart J, 2009, 17(2): 82-86.

四烯酸级联代谢反应及巨噬细胞产生)等原因均可刺激肝脏合成 Fib。因此 Fib、D-D 与 AP 的分型相关,临床检测血浆 Fib、D-D 可判断 AP 的病情程度。

3.2 AP 预后与凝血纤溶/SIRS 的关系 Wroblewski 等^[5]发现在胰腺组织受损或胰腺感染时,胰腺组织中滞留的单核细胞首先被激活,合成和释放多种促炎细胞因子如 TNF α 、IL-1 等,从而刺激粒细胞的活化,激活炎性反应,同时,细胞因子发生级联反应,使促炎介质大量释放入血。MAP 时局部炎性反应和全身炎性反应起保护作用,而在 SAP 时,细胞因子的过度释放将激发 SIRS,对机体起损害作用,故 SAP 已是一种全身系统性疾病。

SAP 引发 SIRS,加上禁食、麻痹性肠梗阻等原因,肠道黏膜屏障功能减弱,导致肠道内毒素移位,感染率明显增加,感染是 AP 患者高并发症率、高病死率的最重要原因,易形成脓毒症,此时病原菌又以过度释放的细胞因子和炎性介质为中介加重凝血功能紊乱^[9]。本组资料发现 SIRS 组 PT、INR、Fib、D-D 较非 SIRS 组显著升高,SIRS 的存在与否是 MAP 向 SAP 转化的关键节点,如果能在 AP 最佳的治疗窗内调控过量的细胞因子和过度激活的白细胞,可防止病情恶化,所以早期检测凝血指标非常重要。本组资料中 MAP 组 SIRS 阳性率为 9.1%(2/22),与文献报道基本一致,MAP 组有约 9% 的患者可能由于已经存在的 SIRS 而出现病情恶化,发展为 SAP,出现 MODS 或 MOF 甚至死亡,若对此患者进行积极干预,意义重大。

本组研究 SIRS 组较非 SIRS 组 MOF 发生率高,两组比较差异有统计学意义($P < 0.01$);MOF 组和非 MOF 组凝血纤溶指标比较,PT、INR、Fib 及 D-D 在组间均差异有统计学意义;本组研究中,死亡病例均发生在伴有 SIRS 的 MOF 组,AP 的死亡与其并发症的发生有很大关系,在 2002~2009 年相关文献报道的 900 例 AP 中,死亡数 24 例,均发生于 AP 伴 SIRS 且出现并发症的患者中,可以看出 SIRS 在 AP 演进中的重要作用,SIRS 可作为判断 AP 病情严重程度、预后的一个简便、实用的指标。由于在 SAP 中 SIRS 的发生率可高达 84.6%,甚至有报道达到 95%,而在 SIRS 组中 MODS 发生率却不高,所以 SIRS 诊断标准过于宽松,敏感性过高,特异性较差,如能联合 SIRS 诊断标准与凝血-纤溶指标检测对 AP 患者病情进行动态监测,更有意义。

综上所述,Fib、D-D 在 AP 早期尤其是在 SAP 中明显异

常,鉴于 SIRS 诊断标准判断 AP 患者病情的缺点,本研究中采用凝血-纤溶指标 Fib、D-D 检测联合 SIRS 诊断标准,临床应用经济方便,可操作性强,动态监测上述指标,能更加准确判断 AP 患者病情演变及严重程度,提高 AP 预后预测的准确性,有利于判断 AP 患者微循环状态并及时改善微循环障碍,纠正凝血功能紊乱,及时调控 SIRS,改善 SAP 患者的预后。

参考文献

- [1] 林三仁. 现代临床医学内科进展:消化分册[M]. 北京:科学技术文献出版社,2006:25-26.
- [2] American College of Chest Physicians Society of Critical Care Medicine Consensus Conference. Definition for sepsis and organ failure and guidelines for of innovative therapies in sepsis[J]. Chest,2003,50:1790.
- [3] 吴在德,郑树. 外科学[M]. 5 版. 北京:人民卫生出版社,2001:55-72.
- [4] Rindermecht H. Fatal pancreatitis, a consequence of excessive leukocyte stimulation[J]. Int J Pancreatol,1988,3 (2/3):105-112.
- [5] Wroblewski DM,Barth MM,Oyen LJ. Necrotizing pancreatitis:pathophysiology diagnosis and acute care management [J]. AACN Clin Issues,1999,10(4):464-477.
- [6] Werner J,Rivera J,Fernandez-del C,et al. Differing roles of nitric oxide in the pathogenesis of acute endemations versus necrotizing pancreatitis [J]. Surgery,1997,121 (1):23-29.
- [7] Telek G,Scoazec JY,Chariot J,et al. Cerum-based histochemical demonstration of oxidative stress in tautocholate-induced acute pancreatitis in rat [J]. J Histochem Cytochem,1999,47(10):1201-1209.
- [8] 陈晓理,田伯东. 急性胰腺炎的免疫异常和多器官功能衰竭[J]. 华西医学,1997,12(4):537.
- [9] Hacke E. Tissue factor pathway of coagulation in sepsis [J]. Crit Care Med,2003,28(9):25-30.

(收稿日期:2012-03-14)

(上接第 2120 页)

- [7] Koike H,Tomita N,Azuma H,et al. An efficient gene transfer method mediated by ultrasound and microbubbles into the kidney[J]. J Gene Med,2004,7(1):108-116.
- [8] 冉海涛,任红,王志刚,等. 超声波空化效应对体外培养细胞细胞膜作用实验研究[J]. 中华超声影像学杂志,2003,12(8):499-501.
- [9] Sonoda S,Tachibana K,Uchino E,et al. Gene transfer to corneal epithelium and keratocytes mediated by ultrasound with microbubbles[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci,2006,47(2):558-564.
- [10] Dalecki D,Raeman CH,Child SZ,et al. Hemolysis in vivo

- from exposure to pulsed ultrasound[J]. Ultrasound Med Biol,1997,23(2):307-313.
- [11] Miller DL,Quddus J. Sonoporation of monolayer cells by diagnostic ultrasound activation of contrast-agent gas bodies[J]. Ultrasound Med Biol,2000,26(4):661-667.
- [12] Yamashita T,Sonoda S,Suzuki R,et al. A novel bubble liposome and ultrasound mediated gene transfer to ocular surface RC-1 cells in vitro and conjunctiva in vivo [J]. Exp Eye Res,2007,85(6):741-748.

(收稿日期:2012-04-23)