

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780038602.4

[51] Int. Cl.

*A61K 48/00 (2006.01)*

*A61K 31/7088 (2006.01)*

*A61K 9/00 (2006.01)*

*A61P 31/00 (2006.01)*

*A61P 41/00 (2006.01)*

*A61P 35/00 (2006.01)*

[43] 公开日 2009 年 12 月 9 日

[11] 公开号 CN 101600460A

[51] Int. Cl. (续)

*A61P 43/00 (2006.01)*

[22] 申请日 2007.11.5

[21] 申请号 200780038602.4

[30] 优先权

[32] 2006.11.14 [33] US [31] 60/858,784

[86] 国际申请 PCT/CN2007/003123 2007.11.5

[87] 国际公布 WO2008/058451 英 2008.5.22

[85] 进入国家阶段日期 2009.4.16

[71] 申请人 香港大学

地址 中国香港薄扶林道

[72] 发明人 黎嘉能 蓝辉耀

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 林毅斌 黄可峻

权利要求书 2 页 说明书 11 页 附图 9 页

[54] 发明名称

超声微泡介导的基因递送系统

[57] 摘要

本发明提供了一种方法，该方法具体利用由超声触发的荷有诱导型 Smad7 基因的微泡系统破裂来递送诸如基因、质粒和其他活性 DNA 相关分子等的药剂，用于治疗包括腹膜纤维化和术后腹膜粘连在内的腹膜疾病。

1. 一种方法，用于将一种或多种用于治疗腹膜疾病的基因、DNA 分子或质粒递送至患者腹膜区，以治疗其中的腹膜疾病，所述方法包括：

提供含有一种或多种用于治疗腹膜疾病的基因、DNA 分子或质粒的微泡来源；

向所述患者腹膜区灌注所述微泡；和

给予足够的超声能量给所述腹部或腹膜区，以使所述一种或多种基因、DNA 分子或质粒转染至患者腹部或腹膜组织。

2. 权利要求 1 的方法，其中所述微泡包含大量成膜蛋白包裹的不溶性微泡。

3. 权利要求 1 的方法，其中所述微泡充有不溶性全氟化碳气体。

4. 权利要求 3 的方法，其中所述全氟化碳气体为全氟甲烷、全氟乙烷、全氟丙烷、全氟丁烷或全氟戊烷。

5. 权利要求 1 的方法，其中所述微泡直径为 1-5 微米。

6. 权利要求 3 的方法，其中所述超声能量以约 0.5-约 5MHz 的频率给予。

7. 权利要求 6 的方法，其中所述超声能量造成微泡在腹膜组织内破裂。

8. 权利要求 1 的方法，其中所述腹膜组织包括患者腹膜腔、腹壁和肠系膜区内的组织。

9. 权利要求 1 的方法，其中所述腹膜疾病包括腹膜腔内炎症、纤维化、术后腹膜粘连或肿瘤。

10. 权利要求 2 的方法，其中所述一种或多种基因、DNA 分子或质粒包括：寡核苷酸、DNA、DNA 质粒、siRNA、shiRNA 和微小 RNA。

11. 权利要求 1 的方法，其中所述腹膜疾病由腹膜输注/透析、手术、创伤、感染、遗传或系统性疾病引起或与它们相关。

---

12. 权利要求 1 的方法，其中所述 DNA 分子是包括 Smad7 肽和蛋白的 SMAD7 转基因。

13. 权利要求 1 的方法，其中所述 DNA 分子为 SMAD7 cDNA、Smad7 ODN、Smad7 siRNA 和 Smad7 微小 RNA。

## 超声微泡介导的基因递送系统

### 发明领域

本发明涉及将局部超声介导的荷有基因/化学药物的含气(gas filled)微泡系统用于腹膜疾病的方法。

若干出版物通过括号内的阿拉伯数字被引作本文的参考。这些参考文献的完整引文可在本说明书的结尾处找到。本文所引用的参考文献，包括专利和已公开的专利申请在内，均通过参考结合到本文中。

### 发明背景

尽管病毒型载体业已显示有效将治疗性 DNA 递送至包括心血管系统、肺、肾和肿瘤在内的各种组织中，但是主要的顾虑仍然在于使用腺病毒和逆转录病毒的安全性，这些病毒可能会引起免疫应答和具有插入突变潜在性[1, 2]。为了克服这些缺点，业已报道了几种非病毒方法，包括脂质型载体体系和电穿孔法。最近，我们和其它研究者已报道超声微泡在肾、心血管组织和肿瘤中显著提高基因转染率[3-12]。然而，将超声微泡介导的基因/药物治疗用于腹膜疾病(包括腹膜纤维化，术后腹膜粘连，腹膜炎和腹膜肿瘤)还没有报道过。

超声本身被认为是对人体无害的，广泛用于许多临床目的，包括物理治疗，诊断，指导深部器官活检，局部药物递送和遗传物质递送，在美国专利第 5,190,766 号中已有描述。根据在美国专利中所描述，大部分微泡造影剂还是安全的试剂且广泛应用于临床，其中包括含气脂类(美国专利第 5,580,575 号)和白蛋白微泡如 Optison[13-16]。大部分微泡在室温都为液态，但体温中它们变成具有平均 3 $\mu$ m 直径的含气微泡。微泡有弹性且可压缩，是超声的有效反射物。

微泡通过在超声束中共振；根据声波的压力变化快速收缩和膨胀来发挥作用。微泡可通过自身和作为携带药物或遗传物质的媒介帮助

药物送递，用于位点特异性治疗和基因治疗[13-16]。

利用超声微泡技术转移基因的明确机制仍基本未知。它可与声孔效应、超声机械指数和超声频率[15, 16]有关。基于超声的策略原理是使用超声造影剂降低由超声能量引起的空化阈值。利用微泡和包被物质的物理性质，可将基因引入(incorporate)超声造影剂中[13, 14]。

可经静脉内或局部注射荷有基因的微泡，再将超声能量施用到所述靶区域。随着微泡进入超声作用区域，它们空化并局部释放DNA[13, 14]。空化也有可能引起局部冲击波增加细胞通透性，从而提高细胞内的DNA摄取[13-16]。扫描电镜术也可证明，超声连同微泡(Optison)在细胞表面瞬时形成在24小时内不再能检测的孔(< 5  $\mu\text{m}$ ) [17]。

在患有晚期肾病并接受最方便价廉的肾脏替代疗法:持续腹膜透析(PD)的患者中，腹膜炎/纤维化是常见的并发症。它是PD技术失效的主要原因，导致这些PD患者改换更昂贵的血液透析。另外，腹膜粘连也是一种纤维化病变，其发生在相当大比例的接受腹部外科的患者中，并促使各种并发症包括肠梗阻、女性不育症和慢性腹痛，导致高发病率和死亡率以及造成卫生保健的高额支出。我们已经表明，腹膜纤维化由称为转化生长因子 $\beta$  (TGF- $\beta$ )的纤维生成介质通过其下游信号通路激活Smad2/3来介导。本发明提供了由超声触发的、荷有基因的微泡来局部释放名为Smad7的抗纤维化和抗炎基因，以特异性抑制TGF- $\beta$ /Smad信号途径，从而抑制腹膜纤维化以及在各种状况下与长期腹膜纤维化相关的腹膜炎。

### 发明简述

本发明提供了一种方法，用于将一种或多种基因、DNA分子或质粒递送至患者腹膜区来治疗其中的腹膜疾病，该方法包括提供含有一种或多种用来治疗腹膜疾病的基因、DNA分子或质粒的微泡来源；向患者腹膜区灌注所述微泡；将充足超声能量提供给腹部区，以使所述一种或多种基因、DNA分子或质粒从微泡转染至腹膜区，以渗透其中

构成的腹膜组织。

### 附图简述

通过阅读以下优选实施方案的详细描述以及附图，本发明进一步的特征和优点将是显而易见的，所述附图为：

图 1 显示显微照片和功能数据表明本发明的超声微泡治疗腹膜组织的安全性。

图 2 显示超声微泡介导的 Smad7 转基因在腹膜组织中表达的效率，其通过抗-flag-m2Smad7 免疫染色和 RT-PCR(B)证明，其中 U 表示尿毒症，PD 表示腹膜透析，CV 表示对照载体。

图 3 通过蛋白印迹和 RT-PCR，证明超声微泡介导的 Smad7 基因疗法阻断腹膜 TGF-Smad 信号转导(p-Smad2/3)的激活而不阻断其表达的机制。

图 4 揭示了超声微泡介导的 Smad7 基因疗法在腹膜透析期间促进腹膜功能的疗效。

图 5 显示组织学和免疫组织化学的显微照片，通过 Mason 三色染液(蓝色)染色和胶原蛋白 I 免疫染色(棕色)，表明超声微泡介导的 Smad7 基因疗法抑制与尿毒症大鼠中腹膜透析相关的腹膜纤维化。

图 6 是半定量数据，显示了在腹膜透析期间超声微泡介导的 Smad7 基因疗法通过抑制胶原蛋白 I 和胶原蛋白 III 的 mRNA 和蛋白表达，来阻滞腹膜纤维化。

图 7 是半定量数据，显示了在腹膜透析期间超声微泡介导的 Smad7 基因疗法通过阻断  $\alpha$ -SMA+肌成纤维细胞和纤连蛋白表达来抑制腹膜纤维化。

图 8 显示了在超声微泡介导的 Smad7 基因治疗之后，组织学和免疫组化的显微照片。根据 Mason 三色染液(蓝色)和胶原蛋白 I 免疫染色(棕色)表明，该疗法抑制了与术后腹膜粘连相关的腹膜纤维化。

图 9 是定量实时 PCR 数据，显示了超声微泡介导的 Smad7 基因疗法通过阻断胶原蛋白 I、胶原蛋白 III、 $\alpha$ -SMA 和纤连基因表达来

抑制与术后腹膜粘连相关的腹膜纤维化。

### 优选实施方案详述

本发明提供了一种方法,用于将一种或多种基因、DNA 分子或质粒递送递送至患者腹膜区来治疗患者腹膜疾病,该方法包括提供含有一种或多种用于治疗腹膜疾病的基因、DNA 分子或质粒的微泡来源;将微泡灌注至患者腹膜区;给予腹部区充足超声能量,以使所述一种或多种基因、DNA 分子或质粒微泡破裂,允许其穿透其中构成的腹膜组织。

优选所述微泡为大量成膜蛋白(filmogenic protein)包裹的不溶性微泡,并充有不溶性全氟化碳气体,例如(不限于)全氟甲烷,全氟乙烷,全氟丙烷,全氟丁烷或全氟戊烷。在一个实施方案中,所述微泡直径为约 1-约 5 微米。

所述超声能量应优选按约 0.5-约 5MHz 的频率给予腹膜区,且应足以使患者腹膜腔(包括腹膜壁和肠系膜在内)中的所述微泡破裂。普通技术人员应能理解,应对所施用的超声能量的量进行调整,使之足够降解、胀裂、破裂或分裂微泡,而不造成对腹膜区或包裹在微泡内的 DNA 的损伤。所述 DNA 应能从微泡释放至邻近腹膜组织,在那里它能被病变细胞和其它细胞吸收,而该 DNA 或其自身可掺入到或转染至宿主细胞基因组。

利用本发明可治疗的腹膜疾病包括腹膜腔内的炎症、纤维化、术后腹膜粘连或癌症。腹膜疾病可由腹膜输注/透析、手术、创伤、感染、遗传或系统性疾病引起或与它们相关。

重要的是,所述一种以上 DNA 分子或质粒包括:寡核苷酸、DNA、DNA 质粒、siRNA、shiRNA 和微小 RNA。在一个实施方案中,所述 DNA 分子是 SMAD7 转基因,而在优选实施方案中,所述 DNA 分子为 SMAD7 cDNA。

因此,本发明提供了用于预防和治疗腹膜疾病(如腹膜炎/纤维化和术后腹膜粘连)新方法,其利用超声介导并涉及使靶基因从含气微泡

局部释放至腹膜组织。本发明有几个优点。

超声微泡介导基因疗法用于腹膜纤维化是安全的，因为它既不会造成可检测的组织学和功能上的损伤，也不会对正常腹膜组织有细胞毒性。将小 DNA 分子连同造影剂注射进腹膜腔中，随后以 1 MHz、2 W/cm<sup>2</sup> 的物理治疗水平进行经皮肤超声。此外，在进行超声辐照时通过将温度控制在约 37°C，避免超声诱导的热量对组织的损伤也是可行的。我们发现，能量输出为 2 W/cm<sup>2</sup>、辐照间隔时间为 30 秒、总时间为 4-6 分钟，对于超声直接辐照皮肤而言是安全的。

本发明的重要优点在于超声介导的基因转移至腹膜组织是暂时的或瞬时的，所述转染的 Smad7 基因在该腹膜组织中 3-4 周内将会逐渐降解，在 14 天时再次进行基因转移以维持高水平 Smad7 是可行的。这表明与基于病毒的技术介导稳定转基因表达所不同的是，超声可不将靶基因引入基因组。这可解释为什么超声介导的是暂时转基因表达。同样地，就根据先前报道[1, 2]的插入诱变潜在性而言，病变组织中 Smad7 转基因的瞬时表达表明超声介导的基因转移比基于病毒的方法更安全。高基因转染率是超声微泡介导基因转染的第二个优点。事实上，我们发现超过 80% 的腹膜细胞转染有 Smad7 基因，这与我们之前报道一致，即在正常和患病大鼠肾的不同细胞类型中超声使基因转染率显著增至约 1000 倍[10-12]。

使用本发明基因疗法的另一重要优点是：利用本发明中阐述的诱导型基因疗法来将病变组织中所转染基因的表达控制在治疗水平内，并且不产生副作用。例如，虽然 Smad7 基因的过表达能够阻断 TGF- $\beta$ /Smad 信号转导和阻滞组织瘢痕化，但是据表明由多西环素 (doxycycline) 诱导的 Smad7 在肾中的加强表达会导致大量细胞凋亡和急性肾损伤。因此，将 Smad7 基因表达水平控制在治疗水平，而在尝试过表达 Smad7 时使副作用最小化是至关重要的。

本发明的另一方面是以下的局部疗法：通过直接注射 Smad7 基因和微泡造影剂的混合物至腹膜腔，随后经由腹部皮肤直接进行超声局



部治疗。这显著增强了局部疗效，同时使经静脉途径系统给予药物或基因所致的副作用最小化。

对于腹膜疾病而言，从荷有基因的微泡至局部腹膜组织的超声介导基因转移是安全有效的疗法。作为液体或白蛋白形式的含气微泡(直径 3 $\mu$ m)能携带药物/基因以形成荷有药物/基因的微泡[13-16]。微泡有弹性、可压缩并且是超声的有效反射物。微泡通过在超声束中共振；根据声波的压力变化快速收缩和膨胀来发挥作用，导致由超声能量引起的空化阈值的降低[13-16]。可经静脉内或局部注射荷有基因的微泡并将超声能量施用到靶区域。随着微泡进入超声作用区域，它们空化并局部释放 DNA 和药物。空化也有可能造成增加细胞通透性的局部冲击波，因而提高细胞内摄取 DNA[13-16]。

在本研究中，将 pcDNA3 中的于 NH<sub>2</sub> 端具有 flag 标签(m2)的鼠 Smad7 cDNA 亚克隆至四环素诱导型载体 pTRE 中，得到 pTRE-m2Smad7。为了实现多西环素(四环素衍生物)诱导 Smad7 转基因表达，使 pTRE-m2Smad7 和改良的 pTet-on 载体：pEFpurop-Tet-on 共转染至腹膜腔。在试点研究中，我们发现，在转染后第二天观察到外源 Smad7 在腹膜组织中的基因表达高峰，且转基因表达以时间依赖的形式减少。为了确保转染的有效性，在 PD 的第 1 天和第 14 天将外源 Smad7 施用到尿毒症大鼠的腹膜腔中。接受了无 Smad7 插入的空载体的 PD 尿毒症大鼠作为治疗对照。转染的过程如下。使大鼠吸入异氟烷进行麻醉。将质粒和微泡(Optison, Amersham Health Inc., Princeton, NJ, USA 或者 SonoVue, Bracco International B.V., Amsterdam, Netherlands)的混合物按 1: 1 体积比制备。然后立即将含有 100 $\mu$ g 质粒的混合溶液注射至腹膜腔。然后将介导超声的凝胶施用到祛毛的腹部皮肤。超声换能器(Sonitron 2000, Rich-Mar Corp., Inola, Oklahoma, USA)以输入频率 1 MHz、输出强度 2 W/cm<sup>2</sup>、工作比(duty cycle) 20% 间隔 30s 总时为 4 分钟直接施用到腹膜壁上。在所述基因转移步骤之后，注射 1 毫升的多西环素(500  $\mu$ g/ml, Sigma)至腹膜腔以诱导 Smad7

转基因表达，随后饮用水中以 200  $\mu\text{g/ml}$  多西环素来维持转基因表达的诱导作用。

用于腹膜纤维化的超声微泡介导的基因疗法的安全性是本发明的最重要方面。用于腹膜纤维化的超声微泡介导的基因疗法是安全的，因为它非侵袭性的；通过将小 DNA 分子与造影剂注射进腹腔中，随后以 1 MHz、2  $\text{W/cm}^2$  的物理治疗水平进行 4 分钟经皮肤的超声处理，既不会造成可检测的组织学和功能上的损伤，也不会对正常腹膜组织有细胞毒性。超声本身被认为是对人体无害的，并广泛用于许多临床目的，包括物理治疗、诊断、指导深部器官活检、局部递送药物和遗传物质[13-16]。所述微泡造影剂也是安全的，且广泛应用于临床。业已充分证明的是，微泡能通过自身帮助药物递送，并作为携带药物或遗传物质的试剂用于位点特异性治疗和基因疗法[13-16]。此外，腹腔内注射小 DNA 也是安全的。在进行超声辐照时通过将温度控制在约 37°C 避免由超声引起的对组织的热损伤也是可行的。我们发现能量输出在 2  $\text{W/cm}^2$ 、辐照间隔时间为 30 秒、持续至多 6 分钟对于超声直接辐照皮肤而言是安全的。如图 1 所示，不存在可检测到的、与超声微泡治疗有关的组织学或功能损伤。最重要的是，我们还发现进入腹膜组织的超声介导的基因转移是暂时性的，这与临床治疗相似。经转染的 Smad7 基因在该腹膜组织中于 3-4 周内逐渐降解，因其实用且无侵袭性，在 14 天时再次进行基因转染以维持高水平 Smad7 是可行的。这表明，与基于病毒的技术介导稳定转基因表达不同的是，超声可不将靶基因引入基因组中。这可解释为什么超声介导暂时的转基因表达。同样地，就插入突变的潜在性而言[1, 2]，病变组织中 Smad7 转基因的瞬时表达表明，超声介导的基因转移比基于病毒的方法更安全。总体而言，所述超声微泡基因治疗方法是安全的。

由超声微泡系统介导的高基因转染率是本发明的另一个显著优点。长期以来业已表明，低基因转染率是使用非病毒型基因递送系统例如裸 DNA 和脂质体时的主要缺点。通过超声引发使基因从微泡中

释放的高基因转染率通过以下结果得以证实：超过 80% 的表面间皮细胞层腹膜细胞和亚间皮细胞(submesothelial cell)呈 flag-M2 Smad7 转基因阳性(图 2A)，导致 Smad7 的显著上调(图 2B)，这是抗腹膜纤维化的关键机制，因为 Smad7 的过表达可通过抑制 Smad2/3 磷酸化来阻断 TGF- $\beta$ /Smad 信号转导的激活(图 3C)。

利用超声微泡技术来预防和治疗腹膜纤维化的有效性是本发明的关键方面。尽管腹膜纤维化是使腹膜透析技术失效的主要原因和共同特征，但尚无专一且有效的疗法可用来预防和治疗该疾病。本发明已表明，超声介导的 Smad7 基因从白蛋白型微泡中释放，能够基本抑制临床特征为晚期肾病的尿毒症大鼠中与腹膜透析相关的腹膜纤维化的发展。如图 1-7 所示，由超声微泡介导基因疗法致使的腹膜 Smad7 过表达，导致 Smad2/3 活性的基本抑制(图 3C)，从而阻滞膜透析相关的腹膜纤维化(由保留腹膜功能来说明(图 4))；减弱腹膜纤维增厚(图 5)；通过抑制胶原蛋白 I 和胶原蛋白 III、纤连蛋白和  $\alpha$ -SMA 表达来阻止腹膜纤维化(图 6, 7)。

此外，本发明还证明了超声介导的 Smad7 基因表达能够阻滞大鼠中的与术后腹膜粘连/纤维化相关的腹膜纤维化(图 8)。事实上，外科擦伤(surgical abrasion)四周后，该大鼠出现明显腹膜粘连，包括  $\alpha$ -SMA、胶原 I 和 III、纤连蛋白的过表达。TGF- $\beta$  的表达增强和 TGF- $\beta$ /Smad 信号转导的活化被超声微泡介导的 Smad7 转染阻断(图 8, 9)。因此，经超声微泡介导系统来阻断 TGF- $\beta$ /Smad 信号转导途径展现了用于预防术后腹膜粘连的安全新型疗法。

本发明的另一个重要方面是：如本文所述，利用诱导型基因疗法来将病变组织中转染基因的表达控制在治疗水平内却不引起副作用；而且这已应用于基因治疗。例如，虽然 Smad7 的过表达能够阻断 TGF- $\beta$ /Smad 信号转导和阻滞组织瘢痕化，但是我们之前的结果也表明由高浓度多西环素诱导的 Smad7 在肾中的过高表达会导致大量细胞凋亡和急性肾损伤[10]。因此，将 Smad7 转基因表达水平控制在治

疗水平，而在尝试使 Smad7 过表达时将副作用最小化是至关重要的。

利用直接腹膜注射荷有 Smad7 的微泡，再将局部超声施用到病变皮肤的局部疗法是最有价值的一种。这避免了使用全身治疗。事实上，传统腹膜疾病治疗依靠全身用药。这种方法通常不是有效的且可能造成不良副作用。本发明已克服这一缺点，并大大提高了负性 TGF- $\beta$  信号转导分子 Smad7 局部表达有效性，从而抑制 TGF- $\beta$ /Smad 介导的腹膜纤维化。

以下参考文献在此处引作参考：

1. Check E: 基因疗法：悲剧性的挫折(Gene therapy: a tragic setback). *Nature* 2002; **420**:116-8.

2. Haviernik P, Bunting KD: 关于利用逆转录病毒载体进行造血干细胞基因转移安全性的忧虑(Safety concerns related to hematopoietic stem cell gene transfer using retroviral vectors). *Curr. Gene Ther.* 2004; **4**:263-76.

3. Bekeredjian R, Chen S, Frenkel PA, Graburn PA, Shohet RV. 超声靶向的微泡破裂可重复使高度专一质粒的表达靶向心脏(Ultrasound-targeted microbubble destruction can repeatedly direct highly specific plasmid expression to the heart). *Circulation* 2003; **108**:1022-26.

4. Korpany G, Chen S, Shohet RV 等. 利用超声破坏微泡使 VEGF 介导的血管发生靶向大鼠心肌(Targeting of VEGF-mediated angiogenesis to rat myocardium using ultrasonic destruction of microbubbles). *Gene Ther.* 2005; **12**:1305-12.

5. Lu QL, Liang HD, Partridge T, Blomley MJ.微泡超声提高体内骨骼肌基因转导效率且降低组织损伤(Microbubble ultrasound improves the efficiency of gene transduction in skeletal muscle in vivo with reduced tissue damage). *Gene Ther.* 2003; **10**:396-405.

6. Taniyama Y, Tachibana K, Hiraoka K 等.利用超声将质粒 DNA 局部递送至大鼠颈动脉(Local delivery of plasmid DNA into rat carotid

artery using ultrasound). *Circulation* 2002; **105**:1233-39.

7. Shimamura M, Sato N, Taniyama Y 等. 利用微泡加强的超声将有效质粒 DNA 转递至成年鼠中枢神经系统的进展(Development of efficient plasmid DNA transfer into adult rat central nervous system using microbubble-enhanced ultrasound). *Gene Ther.* 2004; **11**:1532-39.

8. Manome Y, Nakamura M, Ohno T, Furuhashi H. 超声促进裸质粒 DNA 的结肠癌细胞体内外转导(Ultrasound facilitates transduction of naked plasmid DNA into colon carcinoma cells in vitro and in vivo). *Hum. Gene Ther* 2000; **11**:1521-28.

9. Sakakima Y, Hayashi S, Yagi Y, Hayakawa A, Tachibana K, Nakao A. 利用造影剂加强声孔作用的肝细胞癌基因疗法(Gene therapy for hepatocellular carcinoma using sonoporation enhanced by contrast agents). *Cancer Gene Ther.* 2005; **12**:884-9.

10. Lan HY, Mu W, Tomita N 等. 大鼠 UUO 模型中利用超声微泡系统基因转移诱导性 Smad7 的肾脏纤维化抑制(Inhibition of renal fibrosis by gene transfer of inducible Smad7 using ultrasound-microbubble system in rat UUO model). *J. Am. Soc. Nephrol.* 2003; **14**:1535-48.

11. Moullier P, Friedlander GF, Cause D, Ronco P, Perricaudet M, Ferry N : 体内肾小管细胞的腺病毒介导的基因转导(Adenoviral-mediated gene transfer to renal tubular cells *in vivo*). *Kidney Int* 45:1220 -1225, 1994.

12. Imai E, Isaka Y: 将基因转移至肾的策略(Strategies of gene transfer to the kidney). *Kidney Int* 53: 264- 272, 1998.

13. Tomita N, Morishita R, Lan HY 等: 体内给予核转录因子- $\kappa$ B 诱杀剂抑制实验性新月体肾小球肾炎(In vivo administration of a nuclear transcription factor- $\kappa$ B decoy suppresses experimental crescentic glomerulonephritis). *J Am Soc Nephrol* 11 : 1244-1252, 2000.

14. Tsujie M, Isaka Y, Nakamura H, Imai E, Hori M: 肾小球靶向性的电穿孔介导的基因转移(Electroporation-mediated gene transfer that

targets glomeruli). *J Am Soc Nephrol* 12: 949-954, 2002.

15. Hou CC, Wang W, Huang XR 等. 超声微泡介导的基因转移诱导型 Smad7 阻断大鼠残余肾中生长因子  $\beta$  信号转导和纤维化的转化 (Ultrasound-microbubble-mediated gene transfer of inducible Smad7 blocks transforming growth factor-beta signaling and fibrosis in rat remnant kidney). *Am. J. Pathol.* 2005; **166**:761-71.

16. Ng YY, Hou CC, Wang W, Huang XR, Lan HY. 通过大鼠残余肾中超声介导的 Smad7 基因转移阻断 NF-kappaB 活化和肾炎 (Blockade of NF-kappaB activation and renal inflammation by ultrasound-mediated gene transfer of Smad7 in rat remnant kidney). *Kidney Int.* 2005; **94**:S83-91.

17. Bekeredian R, Grayburn PA, Shohet RV. 超声造影剂在心血管内科中用于基因或药物递送的用途 (Use of ultrasound contrast agents for gene or drug delivery in cardiovascular medicine). *J. Am. Coll. Cardiol.* 2005; **45**:329-35.

18. Unger EC, Matsunaga TO, McCreery T, Schumann P, Sweitzer R, Quigley R. 微泡的治疗应用 (Therapeutic applications of microbubbles). *Eur. J. Radiol.* 2002; **42**:160-8.

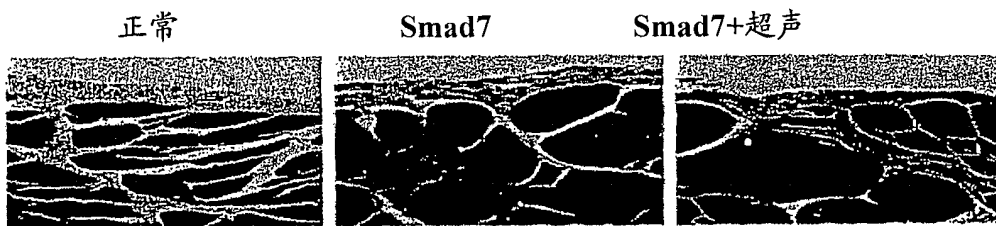
19. Blomley MJK, Cooke JC, Unger EC, Monaghan MJ, Cosgrove DO: Science, 科学、医学和未来: 微泡造影剂: 超声的新纪元 (medicine, and the future: Microbubble contrast agents: a new era in ultrasound). *BMJ* 322: 1222-1225, 2001.

20. Harvey CJ, Blomley MJ, Eckersley RJ, Cosgrove DO: 超声造影剂的研究进展 (Developments in ultrasound contrast media). *Eur Radiol* 11 : 675-689, 2001.

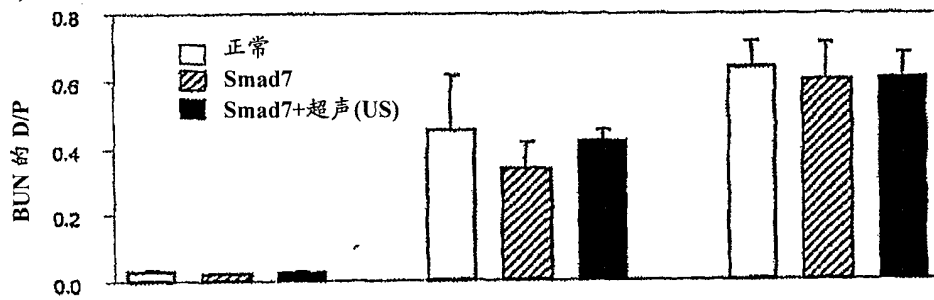
21. Taniyama Y, Tachibana K, Hiraoka K, Namba T, Yamasaki K, Hashiya N, 等. 利用超声局部递送质粒 DNA 至鼠颈动脉 (Local delivery of plasmid DNA into rat carotid artery using ultrasound). *Circulation* 2002; **105**:1233-1239.

图1 超声微泡介导的 Smad7 基因疗法不引起腹膜组织中组织学上(A)和功能上可检测的异常(B, C)。

(A) 腹膜组织学



(B) 腹膜的 BUN 渗透性



(C) 腹膜的葡萄糖吸收

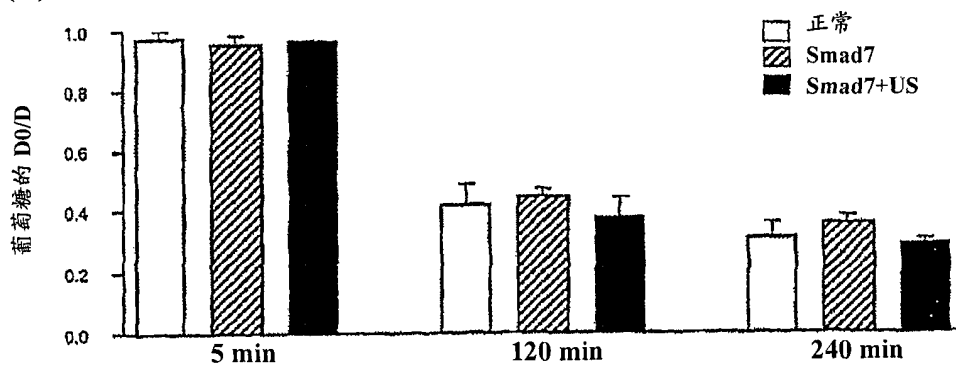
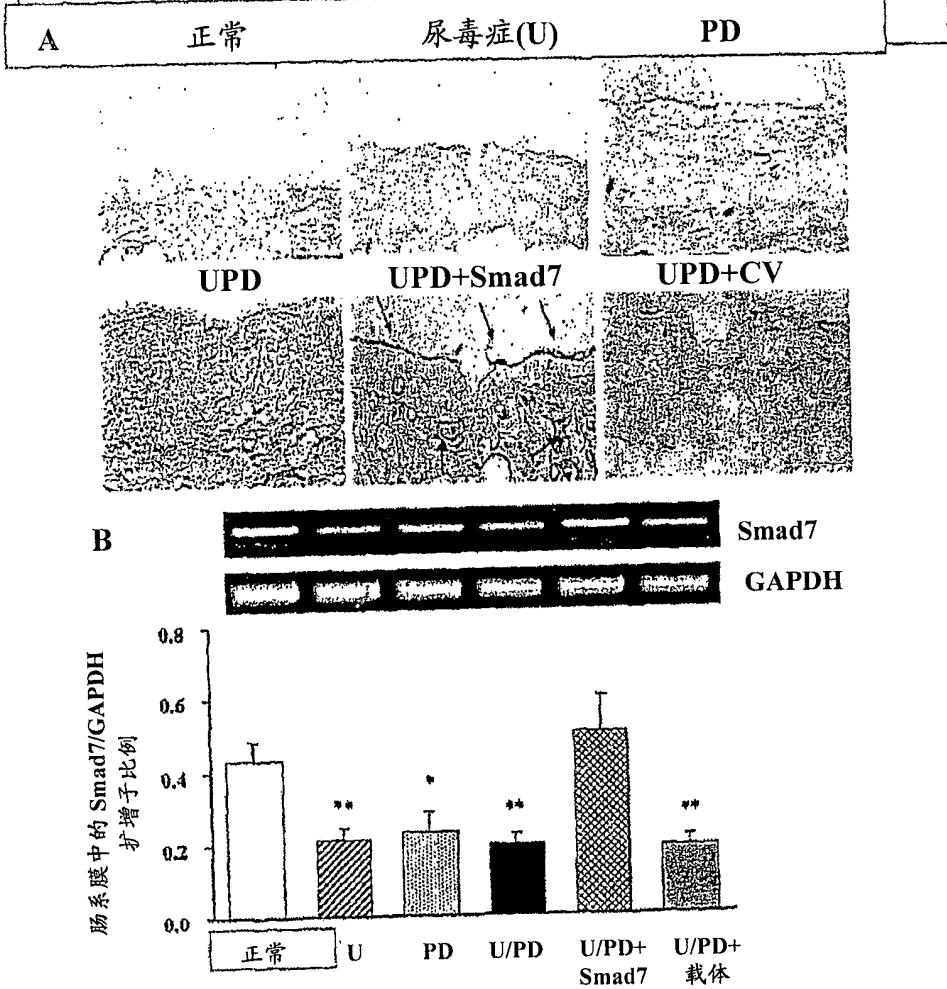


图2 根据抗-flag-m2Smad7免疫染色(A, 箭头处)和 RT-PCR (B) 所证明, 超声微泡显著提高了 Smad7 转基因在腹膜组织中的表达。



CV=对照载体。与正常对照和 Smad7 组相比 \*p<0.05, \*\*p<0.01。



图3 根据有效阻抑 Smad2/3 的磷酸化(p-Smad2/3, C), 但不阻抑 Smad2 的 mRNA 水平和蛋白表达的水平(A, B)所证明, 超声微泡介导的 Smad7 基因疗法阻断 TGF-β-Smad 信号转导的激活水平。对比正常对照 \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001; 对比 Smad7 治疗 Δp<0.05, Δ Δ p<0.01。

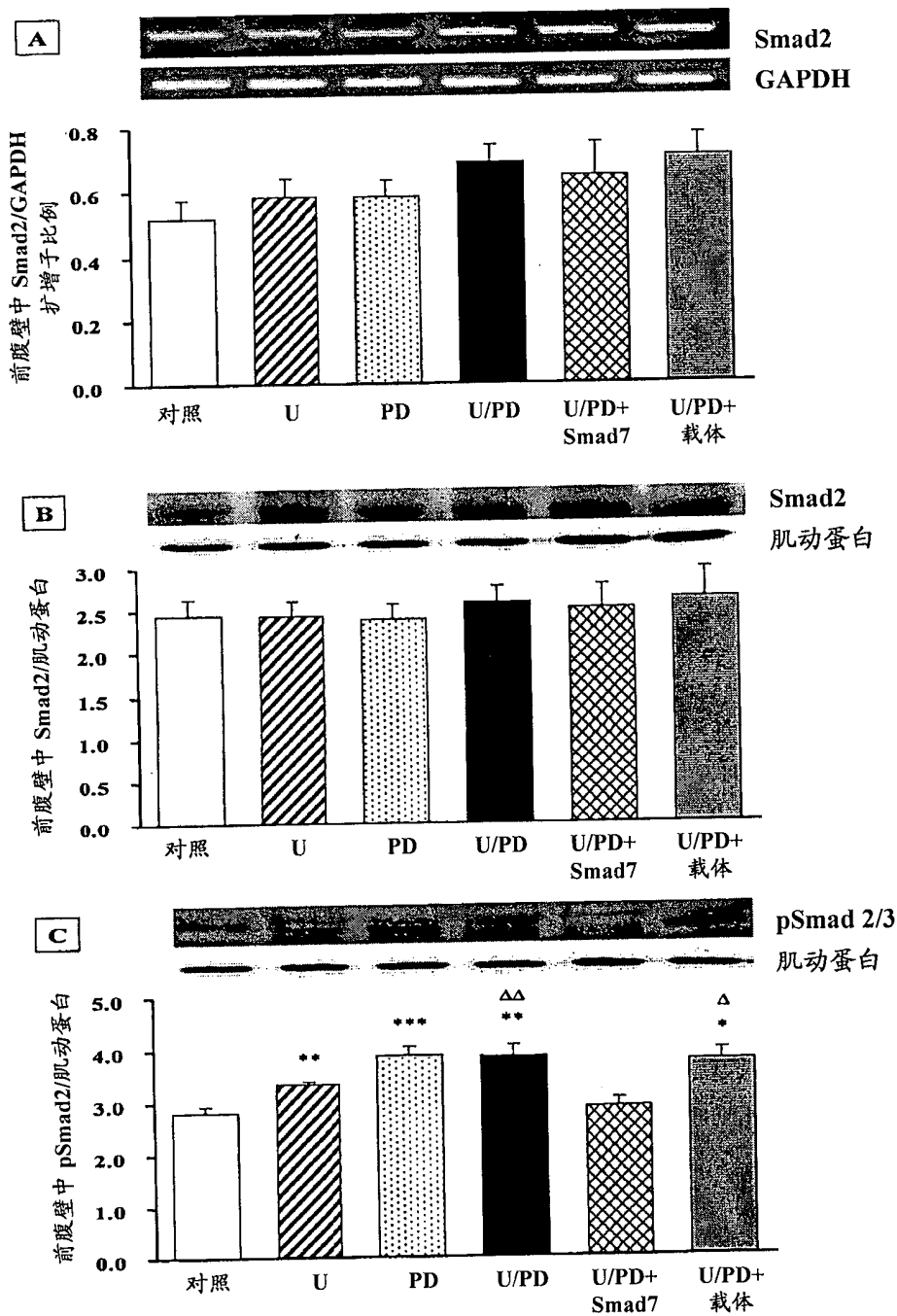


图4 在停留时间(dwel time)期间根据葡萄糖、BUN和总蛋白的渗透性减少所证明, 超声微泡介导的 Smad7 基因疗法在第4周增强腹膜功能。对比正常对照 \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001; 对比 Smad7 治疗  $\Delta\Delta$  p<0.05,  $\Delta\Delta\Delta$  p<0.01。

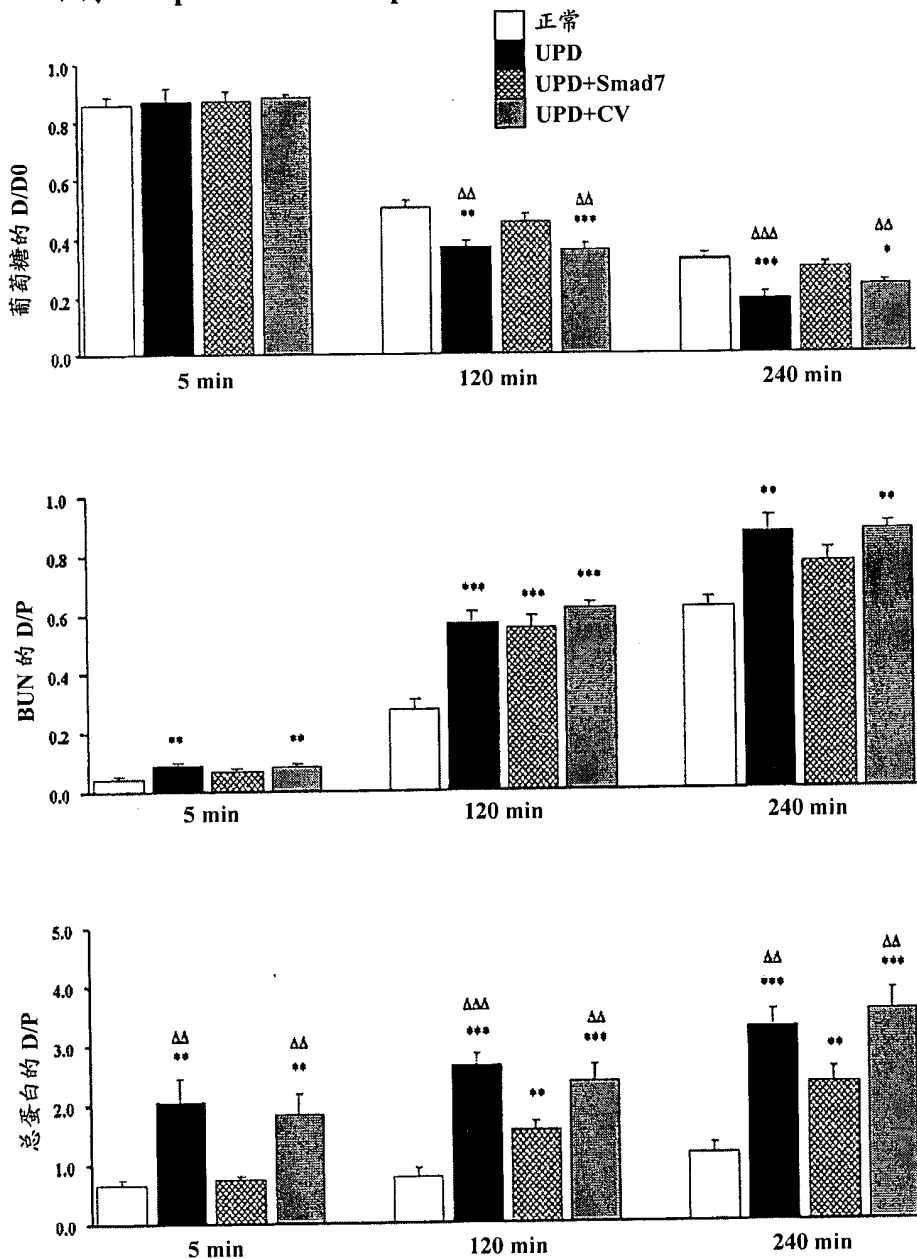


图 5 根据 Mason 三色染液(蓝色)染色和胶原蛋白 I 免疫染色(棕色)所证明, 超声微泡介导的 Smad7 基因疗法在第 4 周抑制尿毒症大鼠中与 PD 相关的腹膜纤维化。

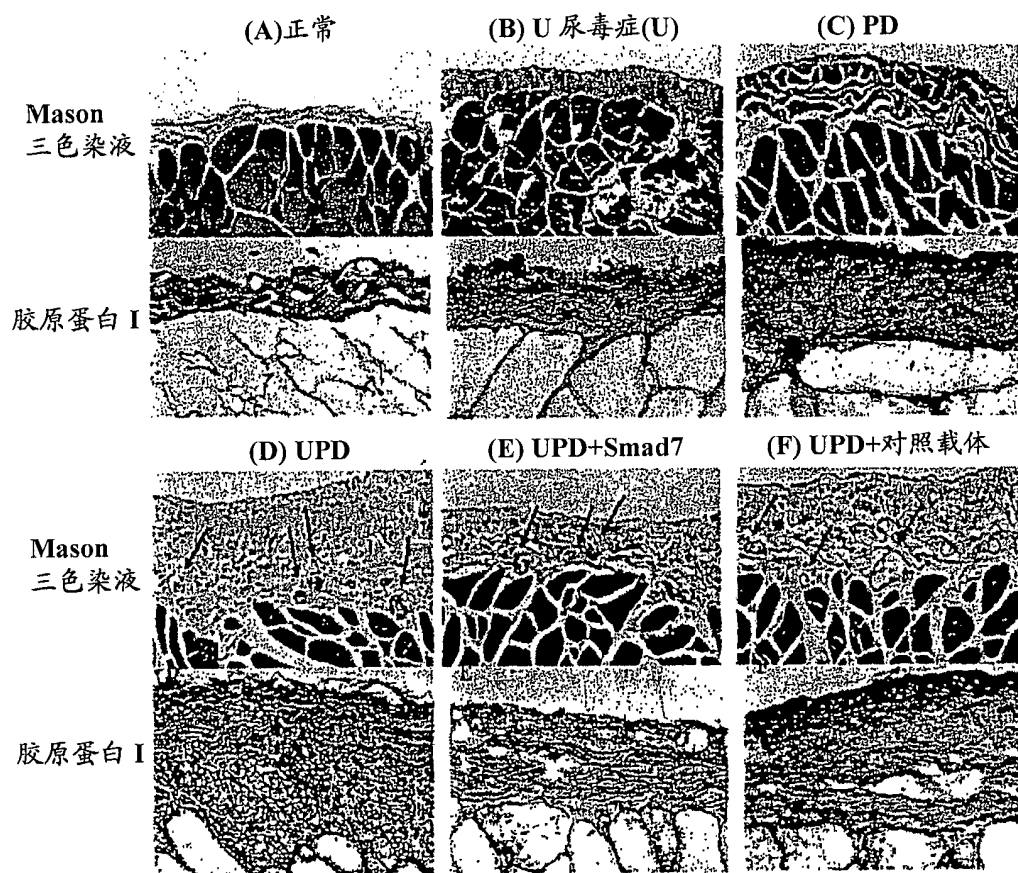


图 6 通过抑制胶原蛋白 I 的 mRNA (A)和蛋白(B)表达、胶原蛋白 III 的 mRNA (C)和蛋白(D)表达，证明超声微泡介导的 Smad7 基因疗法在第 4 周阻滞尿毒症大鼠中与 PD 相关的腹膜纤维化。对比正常对照 \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001; 对比 Smad7 治疗  $\Delta \Delta$  p<0.01,  $\Delta \Delta \Delta$  p<0.001。

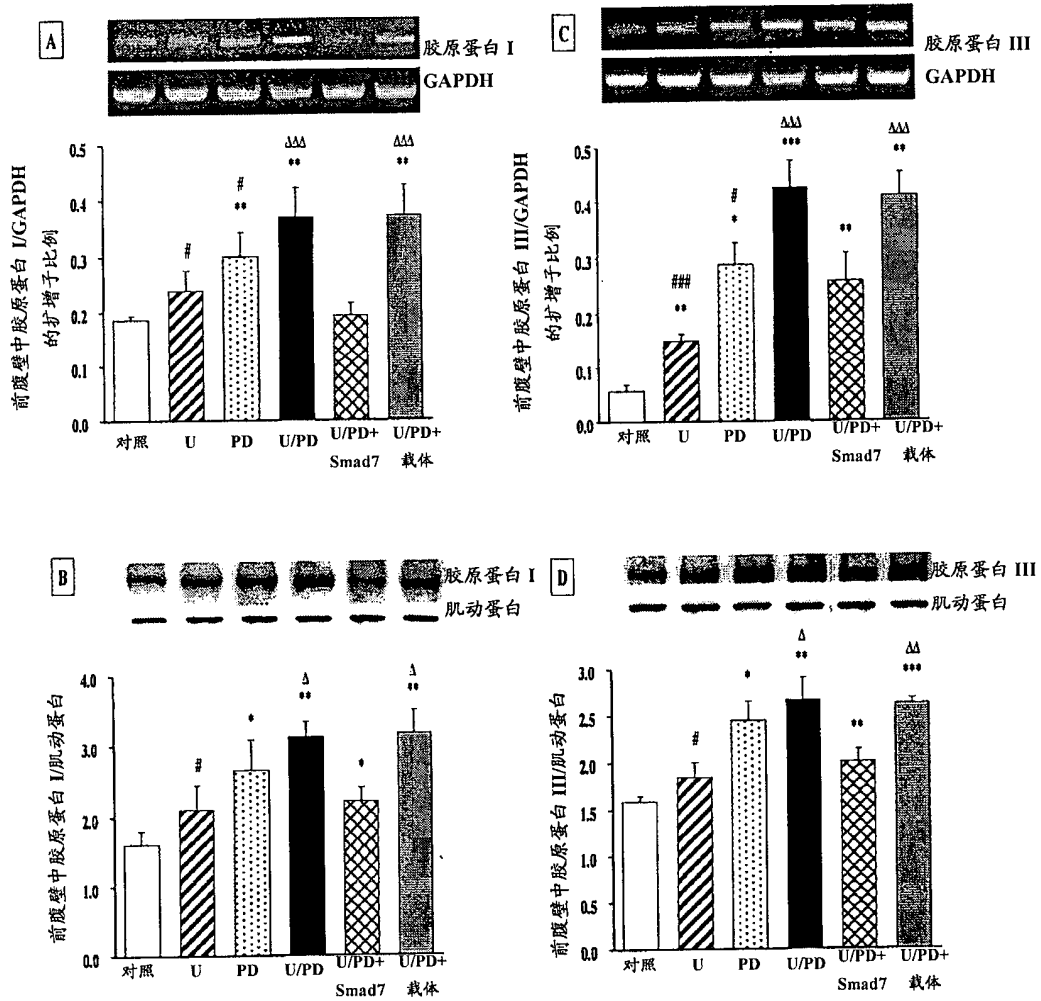


图7 根据抑制  $\alpha$ -SMA mRNA (A)和蛋白(B)表达、纤连蛋白 mRNA (C)和蛋白(D)表达所证明, 超声微泡介导的 Smad7 基因疗法在第4周阻滞尿毒症大鼠中与 PD 相关的腹膜纤维化。对比正常对照 \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; 对比 Smad7 治疗  $\Delta \Delta p < 0.01$ ,  $\Delta \Delta \Delta p < 0.001$ 。

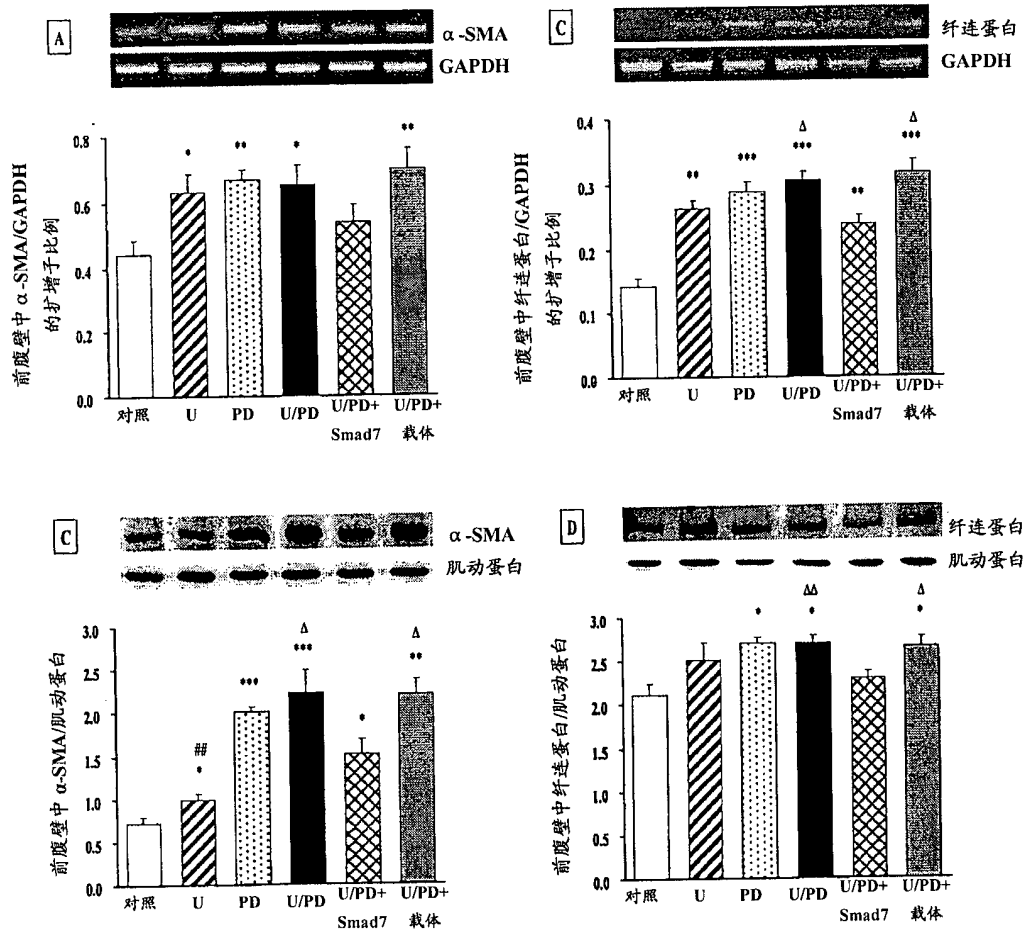
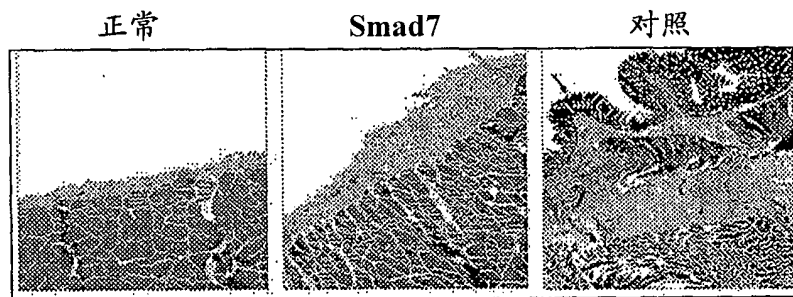


图 8 根据抑制腹膜增厚(A)和胶原蛋白 I 和  $\alpha$ -SMA 表达(B)所证明, 超声微泡介导的 Smad7 基因疗法在第 4 周阻滞了外科擦伤引发的腹膜粘连。表明 TGF- $\beta$  表达也被 Smad7 治疗抑制(B)。

(A) 组织学(Masson 三色染液染色)



(B) 免疫组织化学

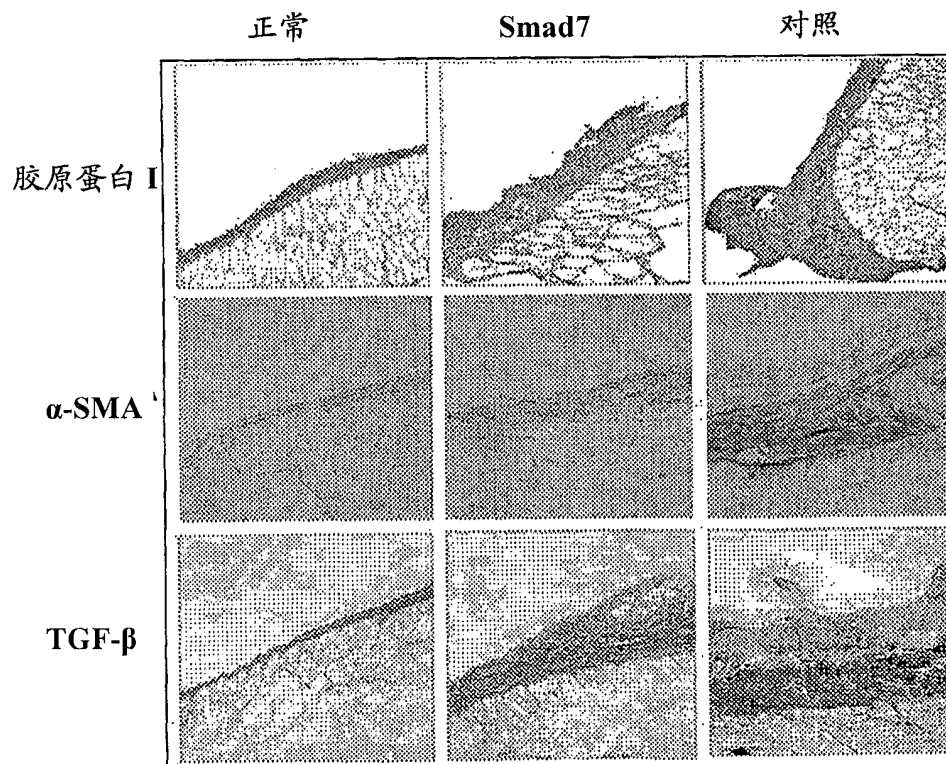


图9 根据抑制胶原蛋白 I (A, B)、胶原蛋白 III (C, D)、纤连蛋白 (E, F)和  $\alpha$ -SMA (G, H)的 mRNA 表达所证明, 超声微泡介导的 Smad7 基因疗法阻滞术后腹膜粘连/纤维化。水平线表示所测要素的中值水平。对比正常对照 \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; 对比无接受治疗的粘连 # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ 。

