

纳米粒子 PLGA 介导 p27kip1 基因转染抑制兔 RPE 细胞增殖的研究

杨 智¹, 王昕华², 李若溪²

作者单位:¹(116044) 中国辽宁省大连市, 大连医科大学;
²(110031) 中国辽宁省沈阳市第四人民医院眼科

作者简介:杨智,男,在读硕士研究生,主治医师,研究方向:玻璃体视网膜病。

通讯作者:李若溪,女,主任医师,主任,硕士研究生导师,研究方向:玻璃体视网膜病. ssyslrx@126.com

收稿日期:2011-08-31 修回日期:2011-11-03

Experimental study on transfection of p27kip1 gene mediated by nanoparticles PLGA restraining RPE proliferation

Zhi Yang¹, Xin-Hua Wang², Ruo-Xi Li²

¹Dalian Medical University, Dalian 116044, Liaoning Province, China; ²Department of Ophthalmology, Shenyang the Fourth Hospital of People, Shenyang 110031, Liaoning Province, China

Correspondence to: Ruo-Xi Li. Department of Ophthalmology, Shenyang the Fourth Hospital of People, Shenyang 110031, Liaoning Province, China. ssyslrx@126.com

Received:2011-08-31 Accepted:2011-11-03

Abstract

• AIM: Through p27kip1-gene mediated by the emerging polylactic acid-polyglycolic acid copolymer (PLGA) nanoparticles transfecting retinal pigment epithelium (RPE), to observe the inhibition effect of RPE proliferation of the retinal detachment (RD) rabbit eye.

• METHODS: Preparation of p27kip1 gene nanoparticle was made and determination of gene content was measured. Animal grouping and preparation of RD animal model were made. Experimental data were analyzed using paired *t*-test and independent samples *t*-test method, there were significant differences ($P < 0.05$).

• RESULTS: At 7, 14, 28 days, PCNA protein expression of p27kip1 gene therapy group was significantly lower than the control group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). This indicated that PCNA protein expression were significantly inhibited by p27kip1 gene nanoparticles. At the same time, in the gene transfection group, p27kip1 protein expression was significantly increased compared with the control group at 3, 7, 14 days, the difference was significant ($P < 0.05$).

• CONCLUSION: p27kip1 gene may be used as a target gene, and through the emerging gene nanoparticles may

be used for the gene therapy about inhibition of RPE cell proliferation.

• KEYWORDS: nanoparticle; p27kip1 gene; retinal pigment epithelium; PCNA

Yang Z, Wang XH, Li RX. Experimental study on transfection of p27kip1 gene mediated by nanoparticles PLGA restraining RPE proliferation. *Guoji Yanke Zazhi (Int J Ophthalmol)* 2011;11(12):2082-2084

摘要

目的:通过聚乳酸-聚乙醇酸共聚物(PLGA)纳米粒子载体介导 p27kip1 基因转染视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞,观察其对视网膜脱离(retina detachment, RD)的兔眼 RPE 增殖的抑制情况。

方法:制备 p27kip1 基因纳米粒子,并进行基因含量的测定。然后制备 RD 动物模型,应用免疫组织化学法检测 PCNA 蛋白的表达,蛋白质印迹法检测 p27kip1 蛋白在各视网膜细胞的表达。

结果:p27kip1 基因治疗组于 7, 14, 28d 的 PCNA 蛋白表达阳性率较对照组明显低,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),表明 PCNA 蛋白阳性表达受到 p27kip1 基因纳米粒子的明显抑制。且基因转染组 3, 7, 14d 时 p27kip1 蛋白表达较对照组明显增多,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

结论:p27kip1 基因有可能作为一个目的基因,借助新兴的基因载体纳米粒子用于抑制 RPE 细胞增殖的基因治疗。

关键词:纳米粒子;p27kip1;视网膜色素上皮细胞;PCNA

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2011.12.007

杨智,王昕华,李若溪. 纳米粒子 PLGA 介导 p27kip1 基因转染抑制兔 RPE 细胞增殖的研究. 国际眼科杂志 2011;11(12):2082-2084

0 引言

研究发现,增殖性玻璃体视网膜病变(proliferative vitreous retinopathy, PVR)的发病机制主要与视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞的病理性增生相关^[1]。目前无有效药物,手术也不能防止复发,寻找新方法势在必行。抗增生基因治疗国内外已有很多成功案例^[2]。传统上的基因传递系统按载体分类,可分为两大类:一类是病毒载体(viral vectors)系统,一类是非病毒载体(non-viral vectors)系统。病毒载体的最大问题是安全问题,尤其是1999年发生首例运用腺病毒载体致人死亡事件^[3]后,更引起有关学者的注意。纳米粒子 PLGA 有应用于临床的报道,且 p27kip1 基因也有应用于肿瘤治疗的

表 1 术后 14d PCNA 阳性细胞百分比和 p27 蛋白/GAPDH 灰度值比

指标	RD 空白颗粒组	RD 基因颗粒组	玻璃体切割空白颗粒组	玻璃体切割基因颗粒组
PCNA 阳性细胞百分比	0.79 ± 0.08 ^a	0.23 ± 0.12	0.81 ± 0.07 ^c	0.24 ± 0.09
p27 蛋白/GAPDH 灰度值比	0.102 ± 0.025 ^a	0.177 ± 0.018	0.099 ± 0.028 ^c	0.193 ± 0.023

^a*P* < 0.05 vs RD 基因颗粒组; ^c*P* < 0.05 vs 玻璃体切割基因颗粒组。

实验研究^[4]。因此我们用该粒子携带 p27kip1 基因转染发生视网膜脱离 (retina detachment, RD) 的兔 RPE 细胞, 并观察分析 p27kip1 基因纳米粒子的转染、表达及对 RPE 增殖的抑制作用。

1 材料和方法

1.1 材料 成年健康有色家兔 40 只, 雌雄并用, 体质量 250 ~ 300g (购于中国医学科学院动物所), 无眼疾。聚乳酸-聚乙醇酸共聚物 (PLGA 75: 25) 购于美国 Birmingham 公司; 聚乙烯醇 (PVA) 购于北京有机化工厂; 重组质粒 PCMV5-p27kip1 由中国医科大学附属第一医院惠赠; 鱼精蛋白、PCNA, E2F, SABC 试剂盒购自北京中山生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 p27kip1 基因纳米粒子的制备 质粒的大量提取采用 W/O/W 双乳化溶剂蒸发法制备纳米颗粒, 将 PCMV5-p27kip1 质粒 150μL (约 600μg) 作为内水相, 质量为 50mg 的 PLGA 溶解于 1.5 mL 二氯甲烷中, 为油相, 混合后超声乳化使形成初乳, 再取 3mL 1.0% PVA 加到初乳中, 超声乳化形成复乳, 复乳加到 30mL 0.3% PVA 溶液中, 挥发干其中的有机溶剂, 即得到 PCMV5-p27kip1 纳米粒胶体液。空白 PLGA 纳米粒制备方法为将 150μL 的缓冲液作内水相, 其余条件不变。

1.2.2 p27kip1 基因纳米粒子中基因含量及包封率的测定 取适量纳米粒子混悬液, 加适量蒸馏水稀释, 再取离心上清液和洗涤后上清液, 先测定溶液体积, 再用紫外分光光度仪于 260nm 波长处测定吸光度, 按 OD 值 33mg/L 计算该溶液 DNA 浓度, 计算包封率, 包封率 (%) = [投药量 (μg) · 吸光度 × 33 × 体积 (mL)] / 投药量 (μg) × 100%。把 PLGA-PCMV5-p27kip1 纳米粒超声分散后, 取 0.5mL 加入 0.5mL 二氯甲烷后离心, 取上清液, 测定其吸光度, 按 OD 值 33mg/L 来计算纳米粒的 DNA 含量。

1.2.3 RD 动物模型的制备和实验分组 操作前先用美多丽滴眼液散瞳。用 25g/L 硫喷妥钠注射液 50mg/kg 肌注麻醉, 4g/L 盐酸奥布卡因表面麻醉。开睑器撑开上下眼睑, 1mL 注射器抽取浓度为 10kU/L 透明质酸酶 0.2mL, 从鼻上方角膜缘后 4mm 处刺入颞下方的玻璃体腔内 (勿伤及晶状体), 将透明质酸酶缓缓注入。10min 后抽吸液化的玻璃体, 以较快的速度再将其注入 (针头尽量靠近视网膜但勿触及), 用此液流的冲击力人为造成视网膜裂孔和视网膜局部脱离。将所有家兔随机分为两组, 每组 20 只: (1) 视网膜脱离组: 其中任选 1 眼造成 RD 后进行基因转染, 另 1 眼造成 RD 后不转染做对照; (2) 视网膜复位组: 任选 1 眼造成 RD 1d 后行玻璃体切割和基因转染, 另 1 眼造成 RD 1d 后行玻璃体切割、不转染为对照。将每组 20 只分 4 个时间段: 术后 1, 4, 14 和 28d 取出眼球。检眼镜观察眼底证实 RD 形成后注入 p27kip1 纳米粒子 10mg, 拔

出针头。对照眼制作 RD 后注入空白 PLGA 纳米粒胶体液。

1.2.4 RD 1d 后玻璃体切割视网膜复位模型制备 视网膜复位组家兔用玻璃体切割机切除玻璃体, 灌注液中加入 p27kip1 纳米粒子, 作用时间 30min 以上。眼内气-液交换, 同时用接有尖端直径约 150 ~ 200μm 玻璃微穿刺针的注射器, 将视网膜下腔液体吸出, 使脱离的视网膜复位。200mL/L C₃F₈ 气体填充玻璃体腔。对照组玻璃体切割时使用空白 PLGA 纳米粒子灌注液。

1.2.5 PCNA 和 p27kip1 蛋白的检测 两组动物均于术后 1, 4, 14, 28d 全身麻醉取出眼球, 使用 40g/L 中性甲醛液固定。部分标本先用 40g/L 中性甲醛液固定, 过夜后石蜡包埋切片, 再作 PCNA 免疫组织化学染色 (SABC 法), 计算阳性细胞百分比。蛋白质印迹法检测 p27kip1 蛋白在各视网膜细胞的表达。

统计学分析: 采用 SPSS 17.0 统计学软件分析实验数据, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计方法采用独立样本 *t* 检验, 取 *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PLGA-PCMV5-p27kip1 基因纳米粒子中基因含量的测定及体外释放试验结果 PLGA-PCMV5-p27kip1 基因纳米粒子的粒度集中分布于 242 ~ 342 (平均 289.9) nm, 粒径呈窄分布, 粒度分布指数为 0.192。PLGA-PCMV5-p27kip1 基因纳米粒子的载基因率用紫外分光光度计测得为 3.5%, 包封效率为 85.6%。

2.2 注射空白 PLGA 纳米粒子的 RD 组及复位组 RPE 细胞 PCNA 和 p27kip1 蛋白表达 脱离 1d, 有个别 RPE 细胞 PCNA 染色呈阳性; 脱离 4d, PCNA 染色呈阳性的细胞数明显增多; 14d 达到最多; 28d 时几乎看不到有 PCNA 标记的 RPE 细胞。p27kip1 蛋白的表达 7d 开始出现, 14d 达到高峰, 28d 有所下降。RD 组和玻璃体切割复位组相比, 结果无统计学差异 (*t* = 0.3574, *P* > 0.05, 表 1)。

2.3 注射 PLGA-PCMV5-p27kip1 基因纳米粒子 RD 组及复位组 RPE 细胞 PCNA 和 p27kip1 蛋白表达 于 4, 14, 28d 的 PCNA 蛋白表达阳性率较对照组明显低, 具有统计学差异 (*t* = 17.3649, *t* = 22.3572, *P* < 0.05), 表明 PCNA 蛋白阳性表达受到 p27kip1 基因纳米粒子的明显抑制。4, 14d 时 p27kip1 蛋白表达较对照组明显增多, 差异有统计学意义 (*t* = 10.8879, *t* = 11.6014, *P* < 0.05)。RD 组和玻璃体复位组相比, 结果无统计学差异 (*t* = 0.3574, *P* > 0.05, 表 1)。

3 讨论

PVR 的发病机制主要与 RPE 细胞的病理性增生相关^[1]。玻璃体手术是目前治疗 PVR 的最有效方法, 但远期仍会有大约 25% 病例复发。多年来国内外学者进行了大量防止增生药物的研究, 对于抗增生基因治疗, 国内外

已有很多成功范例^[2]。其中 p27kip1 基因已有应用于肿瘤治疗的实验研究^[4,5]。

基因传递系统按载体分为病毒载体和非病毒载体两大类。病毒载体有安全问题^[3],自纳米技术产生以后,用纳米颗粒、纳米胶束、纳米脂质体等作为基因转染载体已引起医学界广泛重视。由于纳米粒的大小与病毒相似,且具有表面效应、小尺寸效应以及宏观量子隧道效应等特性^[6],使纳米粒子作为基因载体成为可能。而 PLGA 纳米粒子已有应用于临床的报道和实验研究^[7]。本实验所用的载体材料 PLGA 是美国 FDA 批准的医用辅料,组织相容性很好,在人体内的最终代谢产物是 H₂O 和 CO₂,无毒性,其包载基因的技术已比较成熟^[3]。我们采用这一技术制备的 PLGA-PCMV5-p27kip1 基因纳米粒子可以维持 2wk 以上稳定释放,我们认为可达到长期缓释的效果。

PCNA 是近年来引起关注的一种与细胞增殖周期相关、参与 DNA 合成的核蛋白,检测 PCNA 可客观反映细胞的增殖特性,PCNA 蛋白表达阳性率高,说明细胞处于较高的增殖状态。PLGA-PCMV5-p27kip1 基因治疗眼(RD 组和复位组)于 7,14 和 28d 的 PCNA 蛋白表达阳性率比对照眼(RD 组和复位组)明显低,差异具有统计学意义($P < 0.05$),表明 PCNA 蛋白阳性表达受到该基因纳米粒子的显著抑制。本实验也应用蛋白质印迹检测 p27kip1 蛋白在各视网膜细胞的表达,基因转染组在 3,7,14d 时 p27kip1 蛋白表达较对照组明显增多,差异有统计学意义

($P < 0.05$),表明该基因纳米粒子转染 RPE 细胞成功,且能对发生 RD 眼的 RPE 增殖及玻璃体切割复位术后的 RPE 增殖均能很好抑制。RD 组和玻璃体切割复位组相比,不论注射 PLGA-PCMV5-p27kip1 基因纳米粒子还是注射空白粒子,检测 PCNA 和 p27kip1 蛋白都没有统计学差异($P > 0.05$),说明玻璃体切割手术不能阻止 RPE 细胞的增殖。

我们认为 PLGA-PCMV5-p27kip1 基因纳米粒子用于预防和治疗 PVR 有良好前景,应在今后对此方面进行更深入的研究。

参考文献

- 1 Liu B, Hui Y, Ma J, *et al.* Immunocytochemical study of cells in the vitreous of proliferative vitreoretinopathy. *Yan Ke Xue Bao* 1999; 15(1):13-16
- 2 王光明,邢彬彬. 逆转录病毒载体携带报告基因在色素上皮细胞的转染与表达. *眼科新进展* 2008;28(2):94-95
- 3 陈建海. 纳米技术在基因治疗中应用研究的现状. *中国药学杂志* 2004;39(7):481-483
- 4 赵斌杰,戢翰升. p27kip1 基因转移抑制大鼠胶质瘤生长的实验研究. *现代预防医学* 2007;34(23):4410-4412
- 5 张欣,张志刚. p27kip1 基因和蛋白表达的调控及其在肿瘤发生机制中的作用. *国际病理科学与临床杂志* 2009;29(2):170-174
- 6 杜仕国,施冬梅,韩其文. 纳米颗粒的液相合成技术. *粉末冶金技术* 2000;18(1):46
- 7 高文昌,张波,于如同. 纳米粒子 PLGA 介导 HIF-1 α 基因转染的实验研究. *江苏医药* 2010;36(22):2669-2672