

p27kip1 基因纳米粒子抑制鼠移植 静脉内膜增殖的实验研究

杨 菁¹⁾ 宋存先^{1)*} 郎晓讴²⁾

¹⁾ 中国协和医科大学 生物医学工程研究所, 天津市生物材料重点实验室, 天津 300192;

²⁾ 中国医科大学第一附属医院血管外科, 沈阳 110001)

摘要 用美国 FDA 批准使用的生物可降解材料聚乳酸聚乙醇酸共聚物 (PLGA) 为载体材料, 制备载 p27kip1 基因的纳米粒子. 用激光光散射法测定纳米粒子的平均粒径为 288.9 nm, 粒径呈窄分布, 扫描电镜观察纳米粒子表面光滑. DNA 含量为 3%. 包封效率为 86%. 观察 p27kip1 基因纳米粒子的体外释放情况, 发现 DNA 体外最初释放速度较大, 约 1 周后释放速度开始减缓, 可维持平稳释放 15 天以上. 体外转染大鼠血管平滑肌细胞, 用流式细胞仪检测到 p27kip1 基因纳米粒子对细胞周期进程的抑制作用. 建立自体静脉移植大鼠模型, 随机分成三组进行试验: p27kip1 基因纳米粒子组, 空白纳米粒子组, 单纯静脉移植组. 分别于给药后 3 天、7 天、14 天、28 天取材, HE 染色及 Verhoeff 染色检测内膜厚度, 蛋白质印迹检测 P27 抑癌基因蛋白的表达, 免疫组化 SABC 法检测移植静脉内膜 PCNA、E2F 表达. 动物模型试验中转基因组内膜平均厚度较其他组明显减少 ($P < 0.01$); 转基因组 PCNA 的表达较其他组明显降低 ($P < 0.01$); 转基因组 E2F 的表达 7~14 天较其他组显著降低 ($P < 0.01$); 对照组及单纯静脉移植组之间均无明显差异. 纳米粒子作为 p27kip1 基因载体能够有效抑制自体静脉移植后内膜平滑肌细胞的增殖.

关键词 p27kip1 基因, 再狭窄, 纳米粒子, 静脉移植

学科分类号 R318.08; R34

当血管有缺损, 不能直接缝合时, 血管移植是常用的方法. 移植的血管有多种选择, 但在显微血管手术中, 仍以自体动、静脉移植最常用. 静脉移植术后易发生血管内膜平滑肌细胞增殖, 造成血管阻塞, 严重影响患者的术后生活. 应用系统给药方法对再狭窄进行防治, 常受限于超生理剂量所带来的全身毒副作用和血管内药物分布、代谢低效能, 以及药物在局部维持有效作用浓度的时间较短等缺陷. 应运而生的纳米药物载体技术可通过局部给药将高浓度的治疗剂直接运送至血管成形部位, 既能提高给药效率, 又能避免系统给药的上述弊端. p27Kip1 是一种细胞周期素依赖激酶抑制物, 它抑制 G1 期的进程并对其进行调节, 虽然 p27Kip1 的过度表达会减少细胞周期数, 但是它并不改变细胞周期. 我们利用 p27Kip1 对细胞周期负性调节作用, 借助新兴的基因载体——纳米粒子, 首次将 p27Kip1 基因纳米粒子导入移植静脉动物模型上进行基因治疗, 以观察 p27kip1 基因纳米粒子的转染、表达及对静脉内膜平滑肌细胞增殖的抑制作用.

1 材 料

聚乳酸-聚乙醇酸共聚物 (PLGA 75:25) 购自美国 Birmingham Polymers 公司; 聚乙烯醇(PVA) 购自北京有机化工厂; 重组质粒 PCMV5-p27kip1 由中国医科大学临床一院提供; 鱼精蛋白购自天象人生物工程有限责任公司; PCNA、E2F、SABC 试剂盒购自武汉博士德生物制品有限公司.

2 方 法

2.1 p27kip1 基因纳米粒子的制备

采用乳化-溶剂挥发法制备含 p27kip1 的纳米粒子. 将 p27kip1 基因及鱼精蛋白加入适量 PLGA 二氯甲烷溶液中, 用高速搅拌器进行乳化, 形成油包水型乳液后, 再加入含 PVA 的水溶液, 继续用

* 通讯联系人.

Tel: 022-87892052, Fax: 022-87892052

E-mail: scxian@tom.com

收稿日期: 2005-07-19, 接受日期: 2005-09-07

高速搅拌器搅拌, 形成水包油包水复乳液, 于通风橱内常压下搅拌至完全除去有机溶剂, 然后, 23 000 r/min 离心 20 min 使纳米粒子从乳化液中分离, 收集载 p27kip1 基因纳米粒子, 蒸馏水洗涤 3 遍, 除掉游离的基因及聚乙烯醇 (PVA) 后, 冷冻干燥, 4℃ 保存. 离心和洗涤过程中同时收集所有上清液, 用于检测游离 p27kip1 基因的含量.

2.2 p27Kip1 基因纳米粒子的表征

2.2.1 载 p27Kip1 基因纳米粒子的粒径. 采用激光光散射实验测定纳米粒子的粒径及分布. 用 0.22 μm 滤膜滤过的蒸馏水适量悬浮少量的 p27Kip1 基因纳米粒子, 转入洁净的测定瓶中, 于 (25±0.1)℃ 进行激光光散射测定.

2.2.2 p27Kip1 基因纳米粒子表面形态的观察. 取少量的纳米粒子冻干产品铺在铝箔的粘性表面上, 粒子的表面真空喷涂金, 扫描电镜下观察粒子的形态.

2.2.3 p27Kip1 基因纳米粒子中基因含量的测定. 精确称量载 p27Kip1 基因的纳米粒子 15.0 mg, 加入氯仿 280 μl 至溶解完全, 再加入 Tris-EDTA 混合液 1.0 ml, 充分振荡, 13 000 r/min 离心 2 min 取出上清, 再向残余物内加入 TE 1.0 ml, 重复上面的操作, 反复提取 3 次, 将 3 份上清液混合均匀, 定量稀释 10 倍后, 用紫外分光光度计 260 nm 波长下测定上清液吸光度, 计算基因含量. 另取纳米粒子制备时收集的上清混合液, 精确测定溶液体积, 并用紫外分光光度计 260 nm 波长下测定溶液吸光度, 计算游离的 p27Kip1 的总量并间接计算包埋效率.

2.2.4 p27Kip1 基因纳米粒子体外释放试验. p27Kip1 纳米粒子体外释放在 TE 缓冲液中进行. 精确称量载 p27Kip1 基因的纳米粒子 15 mg, 加入定量的 TE 溶液中制成悬浮液, 将其放入双腔扩散池的一侧, 两池之间用 0.22 μm 的滤膜隔开, 另一侧为接收池, 加入等体积新鲜的 TE 释放液, 将此双室扩散池置于 37℃ 130 r/min 的恒温摇床中进行释放实验, 每 24 h 用新鲜缓冲液更换接收池中的释放液, 更换出的样品直接用紫外分光光度计在波长 260 nm 处测定吸光度, 从而计算释放量并绘制累积释放曲线.

2.3 基因纳米粒子转染大鼠动脉平滑肌细胞

分离大鼠胸主动脉, 胶原蛋白酶消化分离、培养血管平滑肌细胞 (SMC), 鉴定后, 培养 3~5 代细胞用于实验. SMC 按 2×10^5 个 / 孔, 接种于 6 孔板

中培养, 使达到 60% 融合. 分别于孔中加入 p27Kip1 基因纳米粒子 1.0 mg; 单纯纳米粒子 1.0 mg; 空白对照组不做任何处理, 均培养 48 h. 收集细胞, 流式细胞仪检测细胞周期的相关细胞量的变化.

2.4 自体静脉移植与局部基因定位转染

雄性 Wistar 大鼠 120 只, 体重 300~350 g (中国医科大学实验动物中心). 建立大鼠自体静脉移植模型, 随机分成转基因治疗组、对照组、单纯静脉移植组, 每组 40 只, 应用显微外科技术, 取大鼠的颈总静脉侧支 0.5 cm, 将移植静脉段在吻合前置于已准备好的 p27kip1 基因纳米粒子溶液中作用 30 min, 使基因纳米粒子被移植静脉组织吸收, 取出静脉段, 切断同侧颈总动脉, 用 11-0 无创缝合线将静脉段端吻合于同侧颈总动脉. p27kip1 基因纳米粒子组使用生理盐水配成 20 g/L 的均一悬浮液, 对照组使用空白的纳米粒子溶液, 单纯静脉移植组使用生理盐水. 各组动物分别于给药后 3 天、7 天、14 天、28 天全身麻醉取下移植静脉段, 用 10% 中性福尔马林液固定或冻存于液氮中.

部分标本用 10% 中性福尔马林液固定过夜, 石蜡包埋切片, 作 HE 染色、Verhoeff 弹力纤维染色、PCNA、E2F 免疫组化染色 (SABC 法). 计算机图像分析仪分析 Verhoeff 切片, 测量内膜厚度; 分析免疫组化切片, 计算阳性细胞百分比.

2.5 蛋白质印迹检测 p27kip1 蛋白的表达

取组织加裂解液, 匀浆、离心取上清, 测蛋白质浓度. 以 50 μg 上样, 经 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 将蛋白质转移至硝酸纤维素膜上, 用 BlottoA (1×TBS, 5% 脱脂奶粉, 0.05% Tween 20) 封闭 40 min 后, 与 p27kip1 多克隆抗体结合 1 h, 再与二抗结合 30 min 后显影, 凝胶成像仪分析结果.

2.6 统计学分析

实验数据分析采用成组 *t* 检验方法, $P < 0.05$ 表示存在显著性差异.

3 结 果

3.1 载 p27Kip1 基因纳米粒子的体外表征

采用高速搅拌溶剂挥发法得到的 p27Kip1 基因纳米粒子经冷冻干燥, 肉眼观察其表观形态为絮状粉末, 用扫描电镜放大可观察到微粒子的形态. 但放大倍数 10 K 以上时样品台与电子束的距离太近, 电子束在样品表面引起局部温度升高, 非常容易使

低分子质量的 PLGA 纳米粒子受热熔融, 导致纳米粒子变形和熔结成团, 因此只有在很短时间内完成观察和拍照才能捕捉到纳米粒子的微观形态. 图 1 显示位于上层的 p27Kip1 纳米粒子发生了熔结, 下层部位的粒子形态基本完好, 为圆形或介于圆形和椭圆型之间大小均匀的纳米级粒子, 粒子表面光滑, 包封完好, 图 2 是由光散射粒度测定仪直接绘出一组典型的 p27Kip1 纳米粒子的粒度分布数据和分布图, 结果显示, 我们用于动物体内实验的 p27Kip1 纳米粒子的粒度集中分布在 243~343 nm, 平均粒度为 288.9 nm, 粒径呈窄分布, 粒度分布指数为 0.192. p27Kip1 纳米粒子的载基因率用紫外分光光度计测得为 3%. 包封效率为 86%, 关于如何提高纳米粒子基因含量的方法, 我们在过去的文章中已有报道^[1], 影响 p27Kip1 纳米粒子包封效率的原因是由于制备时加入的 p27Kip1 基因量太少, 在制备过程中用于容器的转移而造成了损失. PLGA 为安全有效的生物可降解材料, 较之逆转录病毒、

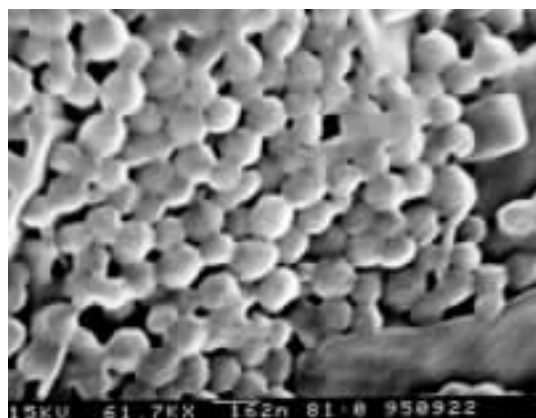


Fig. 1 SEM photographs of p27Kip1 gene nanoparticles

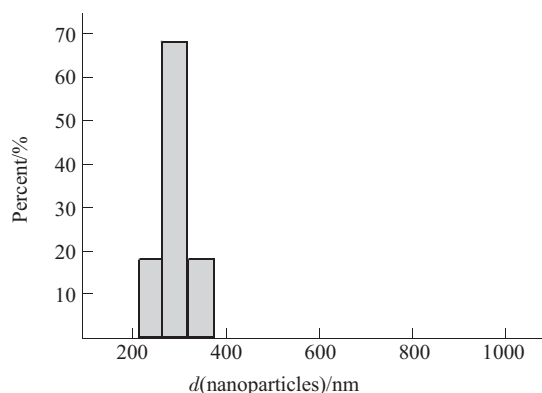


Fig. 2 p27kip1 gene nanoparticles size distribution

Mean diameter of the NPs was 288.9nm with a very narrow range of 243~343 nm.

腺病毒等病毒载体, 具有安全和无免疫原性等优点. 由 p27Kip1 基因纳米粒子的体外释放曲线图中可以看到, 开始的 5 天累积释放曲线接近直线, 基本符合恒速药物释放 (0 级释放) 动力学, 约 1 周后释放量开始变慢, 释放曲线缓慢上升, 可平稳维持释放两周以上(图 3). 可以预计, p27Kip1 基因在体内由于 PLGA-PVA 载体的保护作用, 可以维持比裸质粒更长时间的有效期, 克服裸质粒易被体内核酸酶降解, 最终将解决基因治疗中基因作用时间短的难题^[2,3].

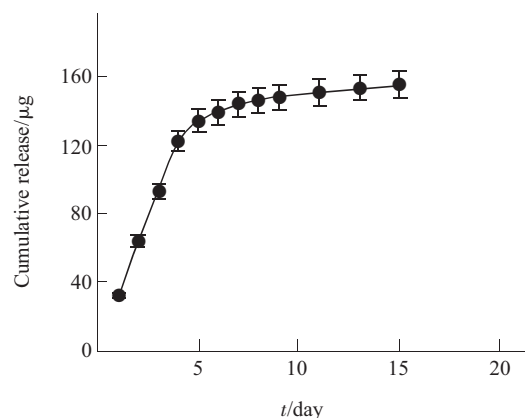


Fig. 3 Accumulative release graph of P27kip1 from the PLGA NPs

The results indicated that the NPs maintained above 15 days DNA release with a faster DNA release rate for the first five days followed by a slower and steady release rate.

3.2 流式细胞仪测定 p27kip1 纳米粒子对细胞周期调控的结果

p27kip1 是一个非特异性 CKI, 主要功能是作为抑制因子参与细胞周期调控. p27kip1 在 G0/G1 期表达增高, 当细胞进入 S 期时则表达下降. p27kip1 基因转染细胞的过量表达可使细胞 DNA 合成强烈受抑制, 阻止其从 G1 期进入 S 期. 因此, p27kip1 基因有可能作为一个目的基因, 用于抑制细胞增殖的基因治疗. 我们用纳米粒子作为 p27kip1 基因载体进行细胞转染, 实验结果显示转染前细胞 G1/G0 期比例为 92.4%, 转染后 48 h, 空白对照组及空白纳米粒子组 G1/G0 期比例为 64.5%、68.3%, S 期为 12.4%、10.3%, 表明 G0/G1→S 的过程非常迅速, 细胞增殖活跃. 而基因组 G1/G0 期比例为 88.3%, S 期为 7.2%, 说明细胞发生 G1 期阻滞, 细胞增殖受到抑制 (图 4).

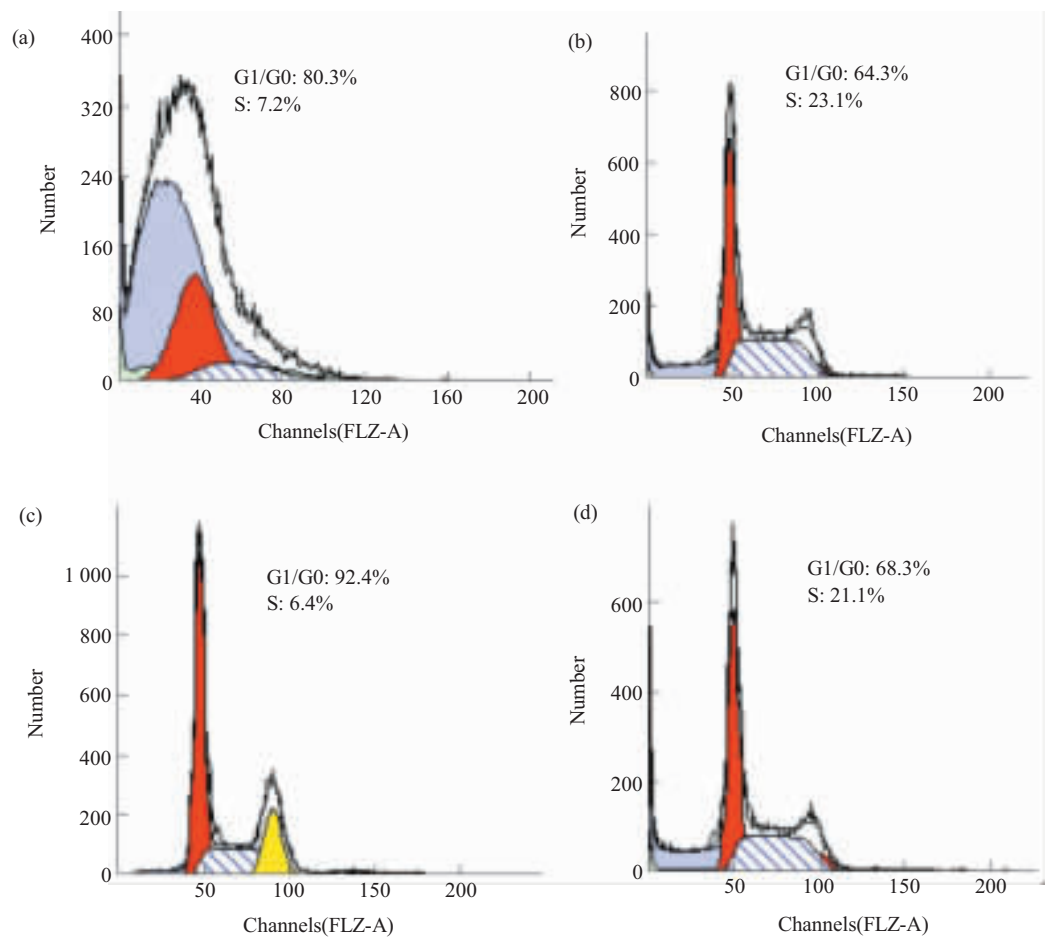


Fig. 4 The result of SMC cell cycle tested by flowcytometry
(a) Gene therapy group. (b) Control group. (c) Before transfer. (d) Shame NPs group.

3.3 移植静脉动物模型静脉经 p27kip1 基因纳米粒子溶液浸泡后血管内膜厚度的形态学观察

静脉移植手术后所有实验组动物均成活良好，活动正常，无偏瘫。各组镜下均见移植静脉的内膜增厚，以血管平滑肌细胞 (SMC) 的增生和基质沉积为主，且内膜增殖以 7 天、14 天最为明显。对照组内膜比基因治疗组明显增厚。检测内膜平均厚度：3 天，对照组与基因治疗组无显著性差异 ($P > 0.05$)；7 天、14 天、28 天，基因治疗组的内膜平均厚度明显低于对照组 ($P < 0.05$)。对照组与单纯静脉移植组无显著性差异，结果见图 5。结果表明基因治疗组明显减轻了内膜的增生程度，抑制了平滑肌细胞的增殖。

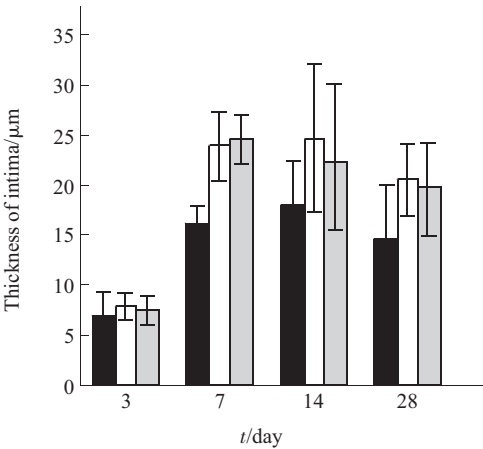


Fig. 5 The thickness of intima after be given p27kip1 gene nanoparticles in mice vein grafting model

The result showed that the intimal hyperplasia in the gene therapy group was obviously lower than that in the control groups ($P < 0.05$). Furthermore, the thickness of intima reduced with time (7 d, $t=6.124$; 14 d, $t=2.477$; 28 d, $t=2.987$). There was no obvious difference in the 2 control groups. ■: Nps gene therapy group; □: Control group; ▒: Vein grafting group.

3.4 自体静脉移植与局部 p27kip1 基因定位转染后 PCNA 及 E2F 免疫组化的观察

PCNA 是近年来引人注意的一种与细胞增殖周期有关, 参与 DNA 合成的核蛋白. 检测 PCNA 可客观反映细胞增殖特性, PCNA 蛋白表达阳性率高说明细胞处于高增殖状态. PCNA 检测结果显示: 术后 3 天可以观察到 PCNA 蛋白阳性表达, 7 天明显增高, 14 天达到高峰, 28 天有所下降. p27kip1 基因治疗组于 7 天、14 天、28 天的 PCNA 蛋白表达阳性率较对照组明显低, 具有统计学显著差异 ($P < 0.01$). 表明 PCNA 蛋白阳性表达受到 p27kip1 基因纳米粒子的明显抑制. 对照组与单纯静脉移植组之间无显著差异. 结果见图 6.

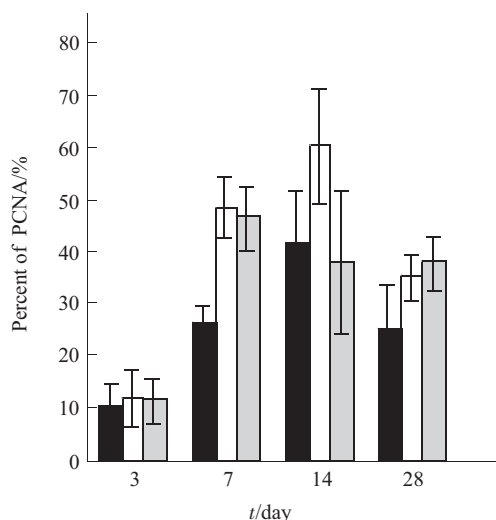


Fig. 6 Percent of PCNA positive expression cells after vein graft

The result showed that p27kip1 gene nanoparticles groups has statistically significant difference compared with the other groups ($P < 0.01$). ■: Nps gene therapy group; □: Control group; ▨: Vein grafting group. (n=10).

视网膜母细胞瘤易感基因 Rb 蛋白产物磷酸化后会失去抑制转录因子 E2F 的作用, 而 E2F 作为转录因子可启动 DNA 合成, 使细胞从 G1 期进入 S 期. G1 期的启动是细胞周期的关键, E2F 的减少可以抑制细胞从 G1 期进入 S 期, 从而抑制内膜的增殖. p27kip1 可以通过阻止 Rb 蛋白磷酸化来控制细胞周期的进程, 检测 E2F 结果显示: 术后 3 天可以观察到阳性表达, 7 天明显增高, 14 天后有所下降. P27kip1 基因组较对照组于 7 天、14 天 E2F 阳性表达受到明显抑制 ($P < 0.05$). 对照组与单纯静脉移植组无显著差异. 本实验中 p27Kip1 的表达, 使

静脉平滑肌细胞的增殖受到明显的抑制, 同时也减少了组织中 E2F 的含量, 结果见图 7.

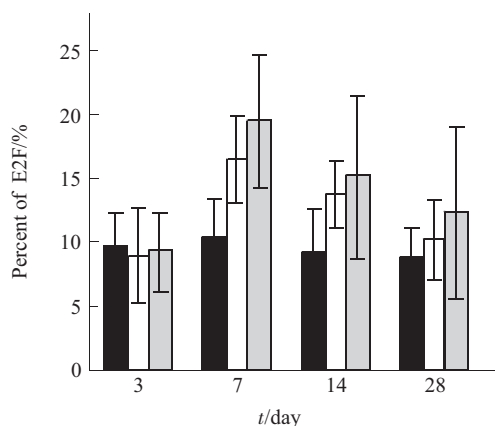


Fig. 7 Percent of E2F cell after vein graft

The result showed that NPs groups has obvious difference than the other groups ($P < 0.05$). ■: Nps gene therapy group; □: Control group; ▨: vein grafting group. (n=10).

蛋白质印迹检测 p27kip1 蛋白在各时期移植静脉局部的表达, 可以观察到单纯静脉移植组及对照组 p27kip1 蛋白的表达 7 天开始出现, 14 天达到高峰, 28 天有所下降, 较 14 天无显著差异, 两组之间无显著差异. 基因转染组表达 3、7、14 天 p27kip1 蛋白表达较对照组明显增多, 差异显著 ($P < 0.05$).

4 讨 论

近年来, 基因治疗正为越来越多的人所重视, 人们渴望将它尽快地推广到临床治疗中去. 虽然基因治疗极具潜力, 但开发高效临床医疗方案的进展仍然缓慢, 问题在于安全有效的基因输送系统的开发. 理想的基因载体应具备以下性能: 结构稳定, 能保护基因不被破坏, 可选择性地导向靶细胞, 能将基因运送到细胞腔内并使其高效地转染和表达, 对肌体无免疫原性和无毒性, 并能被临床接受. 基因纳米粒子是纳米技术和基因治疗相结合的产物, 它具有上述优势, 而且由于它微小的体积, 所以能在细胞质内扩散, 甚至能通过细胞核的孔隙, 因而可望成为临床接受的基因载体.

本实验所用的载体材料 PLGA 具有很好的组织相容性, 在人体内最终代谢产物为 H_2O 和 CO_2 , 无任何毒性, 是美国 FDA 批准的医用辅料. 用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 p27kip1 基因纳米粒子大小均匀, 表面光滑, 粒

径呈窄分布, 基因的包埋效率也较高. 通过体外释放的观察, p27kip1 基因纳米粒子可以维持两周以上稳定释放, 我们认为用于基因治疗可望达到长期缓释的效果. 被载体材料包裹的寡聚核苷酸可以免受水解酶的降解, 提高了寡聚核苷酸的稳定性, 透过血管内皮间隙进入血管平滑肌细胞, 使基因在细胞内或周围组织中贮存和释放, 起到治疗作用. 纳米粒子具有一些病毒载体不具备的优势^[4]. 我们的实验证实, 应用纳米技术包裹 p27kip1 基因, 在动物模型上经由移植静脉血管进行基因转染后, 可成功地检测到 p27kip1 蛋白的表达, 动物模型试验中转基因组内膜平均厚度较其他组明显减少, 3 天、7 天、14 天、28 天内膜分别为 6.8 μm 、15.9 μm 、17.8 μm 、14.3 μm ($P < 0.01$); 转基因组 PCNA 的表达较对照组及单纯静脉移植组明显降低, 3 天、7 天、14 天、28 天分别为 10.2%、26.1%、41.5%、24.6% ($P < 0.01$), 转基因组 E2F 的表达 7~14 天较对照组及单纯静脉移植显著降低 ($P < 0.01$), 3 天、7 天、14 天、28 天分别为 9.6%、10.3%、9.1%、8.7%. 这些结果从另一个角度证明了 p27kip1 被有效地转染进动物组织细胞, 从而抑制了细胞周期的

进程, 达到了我们治疗的目的, 并且合理地解释了基因治疗组内膜增生被抑制的内在原因. 我们的研究结果证明了纳米粒子作为基因载体, 有效可行, 这为基因治疗提供了一个新的途径.

参 考 文 献

- 1 杨 菁, 孙洪范, 宋存先, 等. 提高载基因纳米粒子包埋率的实验研究. 生物医学工程学杂志, 2002, **19** (2): 109~110
Yang J, Sun H F, Song C X, *et al.* J Biomed Eng, 2002, **19**(2): 109~110
- 2 Hashiya N, Aoki M, Tachibana K, *et al.* Local delivery of E2F decoy oligodeoxynucleotides using ultrasound with microbubble agent (Optison) inhibits intimal hyperplasia after balloon injury in rat carotid artery model. Biochem Biophys Res Commun, 2004, **317** (2): 508~514
- 3 曾 勇, 朱文玲, 王宗立, 等. 纳米粒子载反义单核细胞趋化蛋白 1 基因局部定位转染抑制兔颈动脉内膜损伤后内膜增生的研究. 中华心血管病杂志, 2002, **30** (2): 67~70
Zeng Y, Zhu W L, Wang Z L, *et al.* Chin J Cardiol, 2002, **30** (2): 67~70
- 4 Mao H Q, Roy K, Kroung-Le V L, *et al.* Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: Synthesis characterization and transfection efficiency. Control Rel, 2001, **70** (2): 399~421

The Study of p27kip1 Gene Nanoparticles for The Inhibition of Intimal Hyperplasia in Mice Vein Grafting Model

YANG Jing¹⁾, SONG Cun-Xian^{1)*}, LANG Xiao-Ou²⁾

⁽¹⁾Institute of Biomedical Engineering, Chinese Academy of Medical Science, Tianjin 300192, China;

⁽²⁾China Medical University, First Clinical Hospital, Vascular Surgery, Shenyang 110001, China)

Abstract A therapeutic gene——p27kip1 gene were encapsulated into poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) NPs by an emulsification/solvent evaporation technique, and NP size distribution was assessed by submicro laser defractometer. The particle morphology was observed by scanning electron microscopy. The diameter of p27kip1 gene-NPs was around 288.9 nm with very narrow size distribution, and p27kip1 Nps showed good spherical shape with smooth uniform surface. The p27kip1 loading in NPs was about 3%. Encapsulation efficiency of gene was about 86%. *In vitro* gene release from the NPs was performed in TE buffer at 37°C under rotation (130 r/min) utilizing double-chamber diffusion cells on a shake stander, the result showed that gene release from the NPs lasted above two weeks. P27kip1 gene NPs was transduced in smooth muscle cell *in vitro* and cell cycle was tested by flowcytometry. Vein grafting model was established in 120 rats by transplanting internal branch of jugular vein to carotid artery. The rats were randomly divided into three groups: 1) The p27kip1 gene NPs treated grafting group; 2) Control group (treated with empty NPs without p27kip1 gene); 3) Shame grafting group. The grafted veins were harvested at 3d, 7d, 14d and 28d respectively after the operation. Intimal hyperplastic (IH) was observed by morphologic evaluation. The expression of PCNA, E2F were detected by immunohistochemistry and analyzed by computer digitizing system. The p27kip1 gene transfection mediated by NPs complex enabled to

produce protein expression of p27kip1 gene ($P < 0.05$) and significantly inhibits hyperplasia of the grafted vein especially for 7~28 days in p27 group ($P < 0.01$). Immunohistochemical analysis of PCNA indicated decreased positive cell in the p27kip1 group compared with the control group at 7~28 d ($P < 0.01$). The expression of E2F was decreased in p27 group at 7~14 d ($P < 0.01$). There is no significant difference between control group and grafting group in expression of E2F and PCNA. The p27kip1 gene NPs can prevent IH and SMC proliferation, NPs is an effective gene transfecting carrier.

Key words p27kip1 gene, nanoparticles, restenosis, vein graft

*Corresponding author . Tel: 86-22-87892052, Fax: 86-22-87892052, E-mail: scxian@tom.com

Received: July 19 2005 Accepted: September 7, 2005