

文章编号:1005-6947(2008)1-0057-04

· 基础研究 ·

# RNA 干扰沉默蛋白激酶 B 基因表达对移植 静脉内膜增生的影响

于维东<sup>1</sup>, 胡新华<sup>2</sup>, 张志深<sup>2</sup>, 李铁民<sup>1</sup>, 杨军<sup>2</sup>, 张强<sup>1</sup>

(中国医科大学附属第一医院 1. 干部诊疗科 2. 外科, 辽宁 沈阳 110001)

**摘要:**目的 观察纳米粒子加载的靶向蛋白激酶 B (PKB) 基因的 shRNA 表达载体局部转染对大鼠移植静脉内膜增生的影响。方法 应用聚乳酸聚乙醇酸共聚物 (PLGA) 和聚乙烯醇 (PVA) 包载 PKB 的 RNA 干扰基因载体, 制备纳米级粒子混合物。建立自体颈静脉-颈总动脉移植模型共 72 只, 随机分成转基因组、空载体组和对照组。分别于术后 3, 7, 14, 28 d 取材; 常规 HE 及 Verhoeff 染色, 用 Northern blot 和 Western blot 检测 PKB 基因的 mRNA 及蛋白的变化, HE 和 Verhoeff 染色观察内膜厚度, TUNEL 法观察血管平滑肌细胞 (VSMC) 凋亡的动态变化。结果 转基因组内膜中 PKB 基因的 mRNA 及蛋白产物表达较其他两组明显减少 ( $P < 0.05$ ); 术后 7, 14, 28 d 转基因组静脉内膜增生厚度较其他组明显减少 ( $P < 0.01$ ); 转基因组细胞凋亡率较其他组明显增高 ( $P < 0.05$ )。结论 纳米粒子可以作为转基因载体; 沉默 PKB 基因表达能有效地抑制自体移植静脉内膜的增生, 促进 VSMC 的凋亡。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(1): 57-60]

**关键词:** 蛋白激酶 B; 短发夹环 RNA; 内膜增生; 纳米粒子

**中图分类号:** R 654; R 337.1 **文献标识码:** A

## The effect of expression of RNA interference targeting PKB mediated by nanoparticles on intimal hyperplasia in vein graft of rats

YU Weidong<sup>1</sup>, HU Xinhua<sup>2</sup>, ZHANG Zhishen<sup>2</sup>, LI Tiemin<sup>1</sup>, YANG Jun<sup>2</sup>, ZHANG Qiang<sup>1</sup>

(1. Department of Gerontology, 2. Department of Surgery, the First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China)

**Abstract: Objective** To study the effect of expression of RNA interference targeting protein kinase B (PKB) gene transfection mediated by nanoparticles (NP) on intimal hyperplasia (IH) in vein grafts of rats.

**Methods** Nanoparticle PKB short hairpin RNA (shRNA) gene complex was prepared with PLGA and PVA. Autogenous vein graft model was established in 72 rats by transplanting internal jugular vein to carotid artery. The models were randomly divided into 3 groups: (1) PKB shRNA group: PKB-shRNA gene mediated by NP were transfected into the veins before anastomosis. (2) Empty vector group: the veins were transfected by empty vector mediated by NP. (3) Control group (no transfection). The grafted veins were harvested 3, 7, 14 and 28 days after the operation respectively. The mRNA and protein expression of PKB were determined by Northern blot and Western blot. IH was observed by HE and Verhoeff stain. The presence of apoptotic VSMC was detected by TUNEL stain. **Results** Compared to empty vector group and control group, PKB shRNA group had less expression of mRNA and protein of PKB gene ( $P < 0.05$ ), less IH in the vein graft especially during 7~28d ( $P < 0.01$ ), and more apoptotic VSMC ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Nanoparticle is an effective gene transfecting carrier, and RNA interference targeting PKB expression can prevent IH and promote VSMC apoptosis after vein grafting. [Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(1): 57-60]

**Key words:** Protein Kinase B; shRNA; Intimal Hyperplasia; Nanoparticle

**CLC number:** R 654; R 337.1 **Document code:** A

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(30400435, 30672048); 辽宁省教育厅科学技术研究项目(2004F76)。

**收稿日期:**2007-04-02; **修订日期:**2007-08-27。

**作者简介:**于维东,男,辽宁营口人,中国医科大学附属第一医院主治医师,主要从事血管疾病的发病机理方面的研究。

**通讯作者:**于维东 E-mail:yuweidongcmu@126.com

利用自体静脉行冠状动脉搭桥或肢体旁路转流手术,目前仍然是挽救患者生命和肢体功能的重要手段。然而,血管移植后狭窄、闭塞使手术远期失败率高达30%~50%。蛋白激酶B(protein kinase B, PKB)是1991年发现的一种分子质量约为60 kD的蛋白激酶,属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族成员。PKB是逆转录病毒Akt8癌基因v-Akt编码的蛋白产物,故也称为Akt<sup>[1]</sup>。PKB是细胞存活信号通路中的关键调节者,能促进细胞存活及抑制细胞凋亡。为此,笔者拟构建靶向PKB基因的RNA干扰(RNAi)表达载体,通过纳米粒子包载并局部转染,观察其对移植血管内膜增生的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

Wistar大鼠72只,雌雄不拘,体重250~300 g,购于中国医科大学实验动物中心。聚乳酸聚乙醇酸(PLGA)、聚乙烯醇(PVA)由中国医学科学院生物工程研究所提供。凋亡检测试剂盒和PKB多克隆抗体均为武汉博士德公司产品。

### 1.2 实验方法

1.2.1 RNA干扰表达载体的构建及包装 自GenBank中查到大鼠PKB的基因序列(NM\_033230),设计软件选择RNA干扰片段,BLAST软件同源性分析。短发夹环RNA(shRNA)序列的排列顺序均为:BamH I酶切位点+反义序列+Loop+正义序列+终止信号+Hind III酶切位点。具体序列如下:shRNA,针对129~157之间的29bp(CAAGAATGATGGCACCTTTATTGGCTACA) 5'-GGATCCCG -TGTAGCCAATAAAGGTGCCATCATTCT-TG-TTGATATCCG-CAAGAATGATGGCACCTTTATTG-GCTACA-TTTTTTCCAAAAGCTT-3'。采用T载体克隆、BamH I及Xho I双酶切,将shRNA序列插入pLXIN载体,PT67细胞包装重组,构建靶向PKB基因的逆转录病毒RNA干扰载体重组质粒pLXIN-PKB-shRNA。

1.2.2 纳米微粒包载DNA质粒 将pLXIN-PKB-shRNA质粒加入适量PLGA二氯甲烷溶液中,在冰浴条件下用高速搅拌器进行乳化,形成油包水型乳液后,再加入PVA水溶液,搅拌形成均一的水包油包水乳液,于通风橱内常压下搅拌挥发有机溶剂2h后,高速离心机离心20 min;收集沉淀,水洗除掉游离的基因及PVA后,冷冻干燥。

1.2.3 纳米粒子粒径及分布的测定 采用激光

子相关光谱仪(PCS美国Brookhaven公司)、BI-9000AT相关器、BI200SM光度计及Innova304氩离子激光器(美国Coherent公司)于25±0.1℃下,进行激光光散射的测定。纳米粒子表面形态的观察:将包装了质粒DNA的纳米粒子溶于蒸馏水中,滴加于盖玻片上,自然干燥,喷金扫描。

1.2.4 载基因纳米粒子体外释放试验 称取含pLXIN-PKB-shRNA质粒DNA的纳米粒子15.5 mg,加入TE溶液中制成均一的悬浮液,将其放入双室扩散池的一侧;两池之间用0.22的滤膜隔开,另一侧为接收池,存放等体积新鲜的TE释放液,将此双室扩散池置于37℃ 130r/min的恒温摇床中进行释放实验,每24小时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260nm处测定吸光值,计算出释放量并绘制累积释放曲线。

1.2.5 实验动物分组、局部基因定位转染及取材 72只大鼠,随机分成转基因组、空载体组和对照组,每组24只。应用显微外科技术建立大鼠自体静脉移植模型<sup>[2]</sup>:移植前将切取的颈静脉内侧支5mm,于不同溶液中浸泡30 min;切断同侧颈总动脉,用11-0无创缝合线将静脉段与同侧颈总动脉断端间(端-端吻合)。转基因组采用纳米粒子包载的pLXIN-PKB-shRNA质粒溶液浸泡静脉;空载体组用纳米粒子包载的pLXIN空质粒浸泡静脉;对照组用生理盐水浸泡静脉。分别于术后3,7,14,28 d宰杀动物切取移植静脉段,液氮中冻存。

1.2.6 形态学观察 参照文献<sup>[2]</sup>,取部分标本以10%中性福尔马林液固定过夜,石蜡包埋后切片,作HE染色和Verhoeff弹力纤维染色。计算机图像分析仪分析Verhoeff切片,测量内膜厚度。

1.2.7 Northern印迹检测PKB mRNA的表达 收集移植静脉,提取总RNA,用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法制备PKB的cDNA探针,采用Prime-a-Gene随机引物标记试剂盒(美国Promega公司)分别进行 $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP标记。取30 $\mu$ g总RNA,经1%琼脂糖-甲醛凝胶变性电泳分离,转移RNA到硝酸纤维素滤膜,42℃条件下预杂交3h,再加入cDNA探针进行杂交16~18h;杂交膜先后经2×SSC(0.5% SDS),2×SSC(0.1% SDS),0.1×SSC(0.5% SDS)和0.1×SSC分别漂洗,-70℃放射自显影48h后洗片。凝胶成像系统摄像,分析各条带吸光度值,与对应的28S rRNA条带比较。

**1.2.8 免疫组织化学染色(免疫组化)** PKB 多克隆抗体购自武汉博士德公司。按试剂盒说明染色, DAB 显色。正常静脉作为对照, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 代替一抗作阴性对照。400 倍光镜观察: 细胞浆或胞核出现棕黄色颗粒为 PKB 阳性, 计数单位视野内阳性细胞占总细胞数的百分比。

**1.2.9 TUNEL 法检测细胞凋亡** 按试剂盒说明进行染色, DAB 显色。400 倍光镜下计数单位视野内阳性细胞占总细胞数的百分比。

**1.2.10 免疫蛋白印迹 (Western blot) 检测 PKB 蛋白的表达** 取组织加裂解液, 匀浆, 离心 20 min 取上清液, 测蛋白浓度; 以 50  $\mu\text{g}$  上样, 经 10 % SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 将蛋白转移至硝酸纤维素膜上, 5 % 脱脂奶粉封闭, 与 PKB 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。

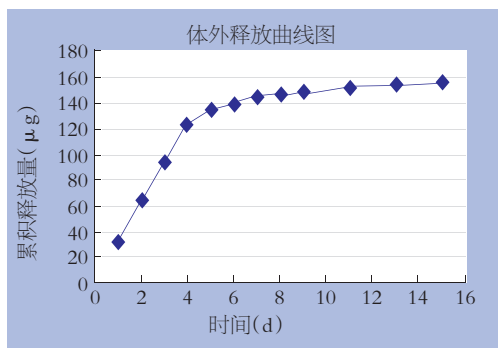


图1 载 pLXIN-PKB-shRNA 纳米粒子的累积释放曲线

### 1.3 统计学处理

采用 SPSS10.0 软件进行统计学处理。组内差异采用方差分析, 组间比较采用 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 纳米粒子的粒度、体外释放及直径的测定

制备的载 pLXIN-PKB-shRNA 质粒 DNA 纳米粒子的粒度集中分布在 245 ~ 347 nm, 平均粒度为 289.6 nm。粒径呈窄分布, 粒径大小稳定可靠, 包封效率为 61 %, 用紫外分光光度计测得 DNA 含量为 3.2 %。粒子的体外释放开始阶段存在爆破释放现象, 约 1 周后释放量开始稳定, 释放曲线缓慢上升, 平稳维持释放 16 d 以上 (图 1)。电镜扫描观察载 pLXIN-PKB-shRNA 的纳米粒子, 其直径在 300 nm 左右 (图 2)。

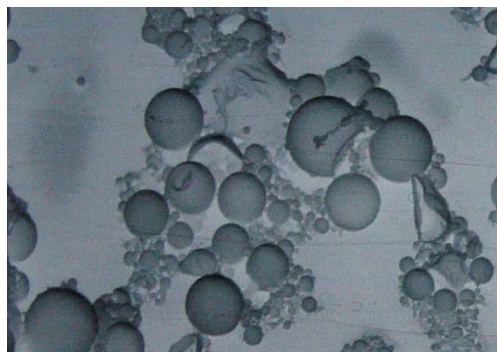


图2 载 pLXIN-PKB-shRNA 质粒 DNA 纳米粒子扫描电镜图 ( $\times 8\ 000$ )

### 2.2 移植静脉内膜的形态学改变

各组均可见移植静脉内膜增厚。术后 3 d, 对照组及空载体组的内膜增生厚度与转基因组差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ ); 术后 7, 14, 28 d, 转基因组内膜增生程度明显低于对照组及空载体组, 差异有显著意义 ( $P < 0.01$ ); 对照组及空载体组比较差异无显著性 ( $P > 0.05$ ) (表 1)。

表1 移植静脉内膜增生程度的比较 ( $\mu\text{m}$ )

分组	移植后 3 d	移植后 7 d	移植后 14 d	移植后 28 d
对照	7.9 $\pm$ 1.8	18.2 $\pm$ 5.6 <sup>1)</sup>	23.9 $\pm$ 5.3 <sup>1)</sup>	25.4 $\pm$ 6.6 <sup>1)</sup>
空载体	8.0 $\pm$ 2.2	17.8 $\pm$ 4.8 <sup>1)</sup>	24.5 $\pm$ 5.9 <sup>1)</sup>	26.6 $\pm$ 4.8 <sup>1)</sup>
转基因	7.5 $\pm$ 2.3	11.0 $\pm$ 3.4	16.4 $\pm$ 4.0	17.0 $\pm$ 3.5

注: 1) 与转基因组相比较,  $P < 0.01$

### 2.3 Northern blot 检测 PKB 的 mRNA 表达

感染 pLXIN-PKB-shRNA 后, PKB 的 mRNA 表达术后 7, 14, 28 d 均显著降低, 以 28 d 降低最为显著, 表达量降低至 1/6 (图 3)。

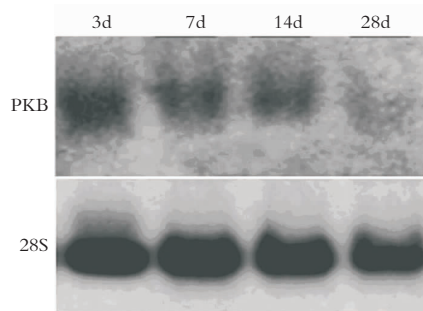


图3 Northern blot 检测移植血管 PKB 的 mRNA 表达

### 2.4 PKB 免疫组化检测

PKB 阳性表达细胞胞浆有棕黄色颗粒状沉淀。3 组术后 3 d 阳性表达均较少, 移植 7 d 表达增多, 14 ~ 28 d 达高峰, 此时阳性细胞分布广泛, 增生内膜及中层血管平滑肌细胞 (VSMC) 中均可见较多阳性表达转基因组 PKB 阳性表达在所有时间点均较其他 2 组明显减少 ( $P < 0.01$ ) (表 2)。

## 2.5 细胞凋亡检测

移植血管的凋亡细胞百分率在术后7 d开始增高,14 d达高峰;转基因组凋亡细胞增加明显,

在术后7,14,28 d与空载体组和对对照组之间差异均有显著性( $P < 0.01$ );空载体组与对照组差异无显著性( $P > 0.05$ )(表2)。

表2 移植静脉 PKB 表达及细胞凋亡率比较(%)

分组	PKB				TUNEL			
	移植 3 d	移植 7 d	移植 14 d	移植 28 d	移植 3 d	移植 7 d	移植 14 d	移植 28 d
对照	15.8 ± 4.2	21.2 ± 6.2 <sup>1)</sup>	27.5 ± 7.8 <sup>1)</sup>	32.8 ± 6.6 <sup>1)</sup>	7.9 ± 2.3 <sup>1)</sup>	15.4 ± 3.2 <sup>1)</sup>	26.4 ± 6.4 <sup>1)</sup>	23.5 ± 6.0 <sup>1)</sup>
空载体	16.0 ± 3.8	20.4 ± 5.8 <sup>1)</sup>	28.0 ± 7.2 <sup>1)</sup>	32.2 ± 6.8 <sup>1)</sup>	8.0 ± 2.4 <sup>1)</sup>	15.3 ± 3.4 <sup>1)</sup>	25.5 ± 5.8 <sup>1)</sup>	22.8 ± 4.2 <sup>1)</sup>
转基因	14.0 ± 4.2	17.0 ± 4.0	22.2 ± 6.2	25.2 ± 6.4	10.0 ± 2.0	27.5 ± 6.5	38.0 ± 7.6	35.4 ± 6.6

注:1)与转基因组相比较, $P < 0.01$

## 2.6 Western blot 检测蛋白产物的表达

空载体组及对照组在术后3~7 d即出现PKB蛋白产物的表达,14 d达高峰,28 d有所下降,两组之间无显著性差异( $P > 0.05$ );转基因组的PKB蛋白产物表达在术后3,7,14 d较对照组及空载体组明显减少,差异均有显著性(均 $P < 0.05$ )(图4)。

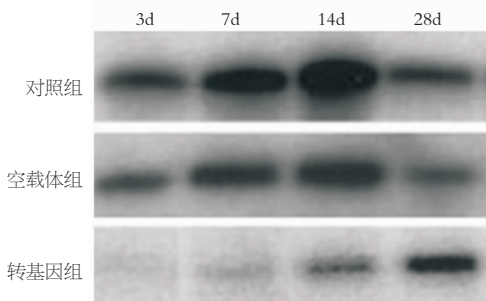


图4 Western 蛋白印迹检测移植血管 PKB 蛋白产物表达

## 3 讨论

纳米粒子是一种新兴的非病毒基因载体,它可以使被包裹的DNA免受水解酶的降解,提高转基因的稳定性。本实验所用的PLGA纳米粒子具有很好的组织相容性,现已应用于临床;在人体内其最终代谢产物为 $H_2O$ 和 $CO_2$ ,无任何毒性。PKB分子约由480个氨基酸残基组成,包含3种哺乳动物异构体。PKB1在大部分组织中表达;PKB2主要存在于胰岛素效应组织,如骨骼肌、肝、肾和心脏;PKB3则在睾丸和脑组织中高表达。PKB是细胞存活信号通路中的关键调节者,细胞发育的不同阶段PKB发挥的作用可能不相同。PKB对未分化的胚胎干细胞的自我更新和增殖的调节可能具有重要作用,对分化的细胞则可能通过调节葡萄糖代谢和蛋白质合成等促进细胞特定功能的行使;其表达异常可能导致细胞生存状态和功能的异常改变。PKB的研究已经成为细胞信号转导研究领域的一个新热点<sup>[3]</sup>。RNA干扰也被称为基因沉寂疗法,是近年来发现和发

展起来的新型基因阻断技术,主要利用双链RNA诱发对宿主细胞特异性RNA转录的抑制,从而抑制特异基因的表达<sup>[4]</sup>;它具有特异性强、效率高的特点。双链RNA在体内无法稳定表达而发挥作用。研究发现小的发夹样RNA(shRNA)可以发挥与双链RNA相同的作用。通过在哺乳动物细胞内转染带有RNA聚合酶III启动子H1或U6的基因,可以形成发夹样RNA<sup>[5]</sup>。本实验采用纳米技术包裹反义PKB基因进行局部转染,通过动物模型的在体实验研究,进一步观察反义PKB基因的表达效果,以及其对自体移植静脉内膜增生程度的影响。结果发现,PKB的mRNA及其蛋白产物的表达明显减少,内膜增生受到显著的抑制。本实验证实,纳米粒子作为基因载体是可行的、有效的,而反义PKB基因的表达能有效抑制自体移植静脉内膜的增生。笔者推测,其作用机制可能是通过抑制VSMC增殖、促进VSMC的凋亡而实现的<sup>[6]</sup>。故认为,PKB可能成为防治内膜增生或移植血管狭窄、闭塞的新的药物或基因干预靶点;其对移植血管的狭窄或闭塞机制的研究有非常重要的意义。

## 参考文献:

- [1] Bellacosa A, Testa JR, Staal SP, et al. A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region [J]. Science, 1991, 254(5029): 274-277.
- [2] 刘程伟,胡新华,杨军,等. Egr-1, PDGF-B, TGF-1在自体移植静脉中的实验研究[J]. 中国普通外科杂志, 2005, 14(12): 900-904.
- [3] Toker A, Newton AC. Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK22 site [J]. J Biol Chem, 2000, 275(12): 8271-8274.
- [4] Hammond SM, Bernstein E, Beach D, et al. An RNA-directed nucleic acid mediated post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells [J]. Nature, 2000, 404(6775): 293-296.
- [5] Yu JY, DeRuiter SL, Turner DL. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(9): 6047-6052.
- [6] 杨军,胡新华,刘程伟,等. 转染 survivin 反义寡脱氧核苷酸对移植血管内膜增生的影响[J]. 中国普通外科杂志, 2006, 15(1): 32-36.