

文章编号:1005-6947(2007)06-0570-04

· 基础研究 ·

纳米粒子介导反义 mTOR 基因转染抑制移植静脉内膜增生

胡新华, 张强, 杨军, 刘程伟, 张志深, 杨德华

(中国医科大学附属第一医院 外科, 辽宁 沈阳 110001)

摘要:目的 观察以纳米粒子为载体的外源性反义雷帕霉素靶蛋白(mTOR)基因局部转染对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 mTOR 基因,制备纳米级粒子混合物。建立自体静脉移植模型 72 只,随机分成转基因组(转染以纳米粒子为载体的反义 mTOR 基因),空载体组(单纯转染纳米粒子包载的空载体)和对照组(不予特殊处理)。分别于术后 3,7,14,28d 取材。检测 mTOR 基因的 mRNA 及蛋白产物表达,以及血管平滑肌细胞(VSMC)凋亡的动态变化。结果 转基因组内膜中 mTOR 基因的 mRNA 及蛋白产物表达较其他两组明显减少($P < 0.05$);转基因组内膜增生厚度于 7,14,28d 较其他组明显减少($P < 0.01$);转基因组凋亡细胞较其他组明显增高($P < 0.05$)。结论 纳米粒子可以作为转基因载体。反义 mTOR 基因的表达能有效抑制自体移植静脉内膜的增生及促进 VSMC 凋亡。[中国普通外科杂志,2007,16(5):570-573]

关键词: 雷帕霉素靶蛋白; 内膜增生; 纳米粒子; 转染; 基因表达

中图分类号: R654; R337.1

文献标识码: A

The effect of antisense mTOR gene mediated by nanoparticles on neointimal formation in vein graft in rats

HU Xin-hua, ZHANG Qiang, YANG Jun, LIU Cheng-wei, ZHANG Zhi-shen, YANG De-hua
(Department of Vascular Surgery, the First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of antisense mTOR gene transfection mediated by nanoparticles (NP) on intimal periferation after vein grafting. **Methods** Nanoparticle antisense mTOR gene complex was prepared with PLGA and PVA. Autogenous vein graft model was established in 72 rats by transplanting internal branch of jugular vein to carotid artery. Three groups were studied: (1) antisense mTOR group, antisense mTOR gene mediated by NP was transfected into the veins before anastomosis. (2) Empty vector group, the vein was transfected by empty vector mediated by NP. (3) Control group, no transfection. The grafted veins were harvested 3 days, 1 week, 2 weeks and 4 weeks after operation, respectively. The exogenous mTOR mRNA and protein expression were determined and intimal hyperplasia (IH) was observed. The presence of apoptotic VSMC was also detected. **Results** Antisense mTOR gene transfection mediated by nanoparticle complex inhibited the mRNA and protein expression of mTOR gene ($P < 0.05$), and the IH was inhibited in the vein graft especially during 7d ~ 28d ($P < 0.01$). **Conclusions** Nanoparticle is an effective gene transfecting carrier, and antisense mTOR gene expression can prevent the IH and promote apoptosis after vein grafting. [Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16(5): 570-573]

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30400435,30672048) 辽宁省博士启动基金资助项目(20041053)

收稿日期:2006-08-04; **修订日期:**2006-10-08。

作者简介:胡新华,男,辽宁清原县人,中国医科大学附属第一医院副主任医师,主要从事血管外科疾病的基础和临床方面的研究。

通讯作者:胡新华 E-mail:xinhuahu@126.com

Key words: mTOR; Intimal Hyperplasia; Nanoparticle; Transfection; Gene Expression

CLC number: R654;R337.1

Document code: A

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40%~60%。哺乳类动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)作为一种重要的信号传导分子,参与细胞的多种生理和病理过程,在细胞的生存、生长及增殖过程中起中心调控作用^[1]。笔者已成功构建 mTOR 基因的反义 RNA 真核质粒表达载体^[2]。本研究进一步以纳米粒子为载体局部转染反义 mTOR 基因,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 250~300g。重组质粒 pEGP-C1-mTOR 为本课题组自行构建。聚乳酸聚乙醇酸(PLGA)和聚乙烯醇(PVA)由中国医学科学院生物工程研究所提供。原位末端标记法(TUNEL)试剂盒为武汉博士德公司产品。mTOR 多克隆抗体为 Santa Cruz 公司产品。激光光子相关光谱仪(PCS 美国 Brookhaven 公司)、BI-9000AT 相关器、B1200SM 光度计及 Inova304 氩离子激光器(美国 Coherent 公司)。

1.2 纳米微粒包 载反义 mTOR 基因 DNA 质粒

将反义 mTOR 基因-pEGP-C1-mTOR 质粒加入适量二氯甲烷(PLGA)溶液中,在冰浴条件下用高速搅拌机进行乳化;形成油包水型乳液后,再加入聚乙烯醇(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,离心 20min,收集沉淀,水洗除掉游离的基因及 PVA 后,冷冻干燥。

1.3 纳米粒子粒径及分布的测定及体外释放试验

纳米粒子表面形态的观察:将包装了 pEGP-C1-mTOR 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。称取含 pEGP-C1-mTOR 质粒 DNA 的纳米粒子 15.5mg,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°C 130r/min 的恒温摇床中进行释放实验,每 24h 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,计算出释放量绘制累积释放曲线。

1.4 实验动物分组及局部基因定位转染

72 只大鼠,随机分成转基因处理组、空载体处理组和对照组,每组 24 只。转基因组移植静脉转染以纳米粒子为载体的 pEGP-C1-mTOR 质粒,空载体组转染纳米粒子包 载的 pEGP-C1 空质粒载体,对照组不予特殊处理。应用显微外科技术建立大鼠颈总动脉的自体颈静脉移植模型:移植前将切取的颈总静脉内侧支 5mm,于不同溶液中进行浸泡。转基因组将移植静脉段浸泡于已准备好的 DNA 溶液(称量 DNA 纳米粒子 6mg,加入生理盐水 0.3mL,制成均一的悬浮液)中,30min 后取出静脉;切断同侧颈总动脉,用 11-0 无创缝合线将静脉段端端吻合于同侧颈总动脉。空载体组使用纳米粒子包 载的 pEGP-C1 空质粒浸泡静脉,对照组使用生理盐水浸泡。各组动物分别于术后 3,7,14,28d 取材。切取移植静脉段,液氮中冻存。

1.5 形态学观察及分析

参照文献^[3],取部分标本,10%中性福尔马林液固定过夜,石蜡包埋后切片,作 HE 染色、Verhoeff 弹力纤维染色。TUNEL 法检测 VSMC 凋亡率。计算机图像分析仪分析 Verhoeff 切片,测量内膜厚度。

1.6 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测反义 mTOR 基因的整合

根据反义 mTOR 序列设计引物。F: 5'-AGCCCTTG GTGAGAGCTGTA -3', R: 5'-GGCACA CATTGAAGAAGCA -3',产物长度 322bp。β-actin F: 5'-TTCTGACCCATACCCACCAT -3', R: 5'-ATTACAGTGCGTGCTAAA GG -3',产物长度 508bp。各取组织约 100mg,按 Trizol 试剂盒说明提取总 RNA,逆转录为 cDNA。PCR 过程:20μL 反应体系,Taq DNA 聚合酶 0.5U,引物各 50pmol。PCR 反应条件:94°C 变性 2min 后,94°C 30s,56°C 45s,72°C 45s 顺序共循环 30 次,最后 72°C 延伸 7min。电泳,凝胶成像系统上摄像并分析各条带光密度值(基因表达值 = mTOR/β-actin)。

1.7 免疫蛋白印迹(Western blot)检测 mTOR 表达

取组织加裂解液,匀浆,1600r/min 离心 20min,取上清液,测蛋白浓度。以 50μg 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 mTOR 多克隆抗体结合 1h,再与二抗结合 30min 后显影,凝胶成像仪分析结果。

1.8 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 纳米粒子粒度的测定

光散射粒度分布图可见制备的载 pEGP-C1-mTOR 质粒 DNA 纳米粒子的粒度集中分布在 243 ~ 343 nm, 平均粒度为 289 nm。粒径呈窄分布, 粒径大小稳定可靠, 包封效率为 60%。用紫外分光

光度计测得 DNA 含量为 3%。粒子的体外释放开始阶段存在爆破释放, 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 18d 以上。扫描电镜观察载反义 mTOR 的纳米粒子, 其直径在 300 nm 左右。

2.2 局部基因转染结果

静脉移植 7 ~ 14d, 荧光显微镜下可见有较多转染基因表达, 分布于移植静脉中层及内膜; 移植 28d, 转染基因表达减少(图 1)。

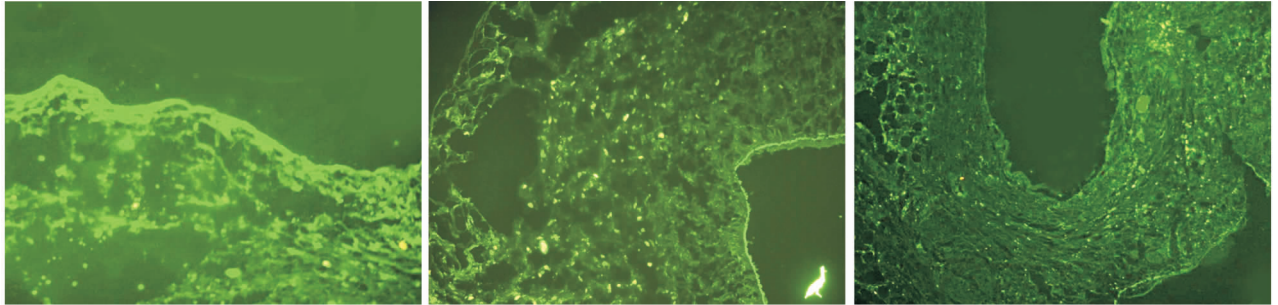


图1 荧光显微镜观察移植血管转染基因的表达

2.3 形态学观察结果

各组均可见移植静脉内膜增厚, 以 14 ~ 28d 最为明显。移植 3d, 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 ($P > 0.05$); 移植 7, 14, 28d, 转基因组内膜增生程度明显低于对照组, 差异有显著性 ($P < 0.01$) (图 2, 表 1); 而对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 (μm)

分组	3d	7d	14d	28d
对照	7.9 ± 1.8	18.2 ± 5.6	23.9 ± 5.3	25.4 ± 6.6 [†]
空载体	8.0 ± 2.2	17.8 ± 4.8	24.5 ± 5.9	26.6 ± 4.8 [†]
转基因	7.6 ± 2.0	10.9 ± 2.2 [†]	15.8 ± 4.6 [†]	18.3 ± 5.8

注: † 与转基因组比较, $P < 0.01$

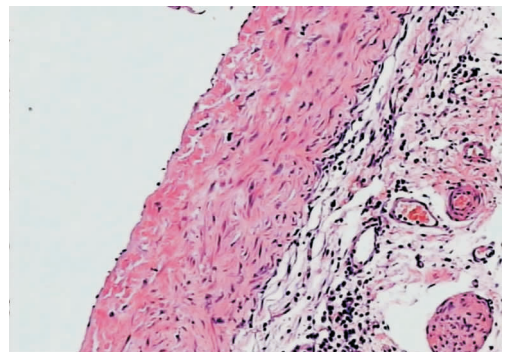
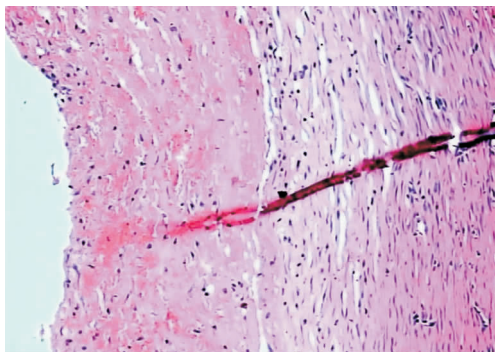


图2 移植后 14d, 两组血管内膜增生的比较

2.4 TUNEL 检测移植静脉细胞凋亡结果

移植血管的凋亡细胞百分比在术后 7d 开始增高, 14d 达高峰, 28d 有所下降。转基因组凋亡细胞增加明显, 在术后 14d 及 28d 与对照组和空载体组比较差异均有显著性 ($P < 0.05$) (表 2)。

表 2 移植静脉凋亡细胞百分比比较 (%)

分组	3d	7d	14d	28d
对照	7.9 ± 2.3	15.4 ± 3.2 [†]	26.4 ± 6.4 [†]	23.5 ± 6.0 [†]
空载体	8.0 ± 2.4	15.3 ± 3.4 [†]	25.5 ± 5.8 [†]	22.8 ± 4.2 [†]
转基因	9.0 ± 2.2	28.0 ± 6.2	39.0 ± 5.4	36.4 ± 4.6

注: † 与转基因组比较, $P < 0.05$

2.5 RT-PCR 结果

转基因组 RNA 经 RT-PCR 扩增后,可见特异性条带 322bp(图 3);而对照组及空载体组未见特异表达条带。提示纳米粒子可将外源反义 mTOR 基因导入移植血管并表达。

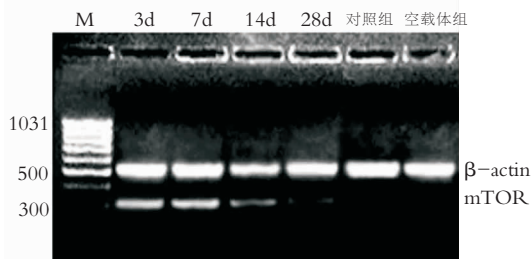


图3 RT-PCR 检测外源反义 mTOR 基因的表达

3 讨论

基因治疗的常用载体主要有腺病毒载体、逆转录病毒载体、脂质体、阳离子聚合物等。病毒载体存在着免疫原性、原癌基因特性及一些未知的长期作用等问题,而非病毒载体则不存在这些问题。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。其在保护基因片段不受破坏的同时可以将目的基因定向运送到血管内的病灶部位,并能透过血管内皮间隙进入 VSMC,使基因在细胞内或周围组织中长期贮存和释放,从而起治疗作用,并可提高转染基因的稳定性^[4]。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,其在人体内最终代谢产物为 H₂O 和 CO₂,无任何毒性。本实验制备的纳米粒子大小为 240 ~ 350 nm,属较大颗粒的纳米粒子,包载效率为 0.3%,DNA 通过渗透和扩散的方式释放出来,释放时间约为 2 周。

mTOR 是防治 PTCA 术后再狭窄药物 - 雷帕霉素的作用靶蛋白。现已证实,mTOR 是一种分子质量为 289 kD 的蛋白激酶,是 3 - 磷脂酰肌醇激酶相关激酶家族 (PI3 Ks) 中 FK506 结合蛋白 (FKBP12) 的相关蛋白。mTOR 信号通路在细胞的生存、生长及增殖过程中起中心调控作用,是细胞周期跨越 G₁/S 期所必需的^[1]。临床研究表明:应用雷帕霉素药物洗脱支架可以将 PTCA 术后再狭窄率降低 90% 以上^[5],深入研究 mTOR 信号通路可能揭示人类许多疾病的发病机制或病理过程。在前期工作中,笔者构建了 mTOR 的反义基因表达质粒载体,通过转染离体培养的 VSMC,初步证实它能抑制 VSMC 的增殖^[2]。但其

2.6 Western blot 检测蛋白产物表达

空载体组及对照组移植静脉在术后 3 ~ 7d 即出现 mTOR 蛋白产物的表达,14d 达到高峰,28d 有所下降,两组之间无显著性差异 ($P > 0.05$);转基因组的 mTOR 蛋白产物表达在术后 3,7,14d 较对照组和空载体组均有明显减少,差异均有显著性 ($P < 0.05$) (图 4)。

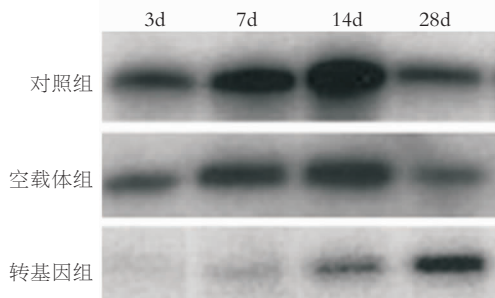


图4 Western 蛋白印迹检测移植血管 mTOR 蛋白产物的表达

在体作用及机制尚有待深入研究。

本实验采用纳米技术包裹反义 mTOR 基因进行局部转染,通过动物模型的在体研究,实验结果表明,成功检测到反义 mTOR 的 mRNA 及其蛋白产物的表达,并且发现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 mTOR 基因的表达能有效抑制自体移植静脉内膜的增生。故推测,其作用机制可能是通过抑制 VSMC 增殖、促进 VSMC 凋亡而实现的。本研究也表明,促进 VSMC 凋亡可能是防治内膜增生新的有效途径^[6]。因此,mTOR 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,对移植血管狭窄及闭塞机制的研究有非常重要的意义。

参考文献:

- [1] Fingar DC, Richardson CJ, Tee AR, *et al.* mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E [J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(1): 200 - 216.
- [2] 胡新华, 杨军, 张志深, 等. 雷帕霉素靶蛋白反义 RNA 真核表达载体的构建及其在血管平滑肌细胞中的表达 [J]. *中华实验外科杂志*, 2006, 23(4): 537 - 539.
- [3] 胡新华, 杨军, 杨德华, 等. p38 MAPK 在自体移植静脉中的表达及其意义 [J]. *中国普通外科杂志*, 2004, 13(1): 29 - 33.
- [4] Fishbein I, Chorny M, Rabinovich L, *et al.* Nanoparticulate delivery system of atyrophostin for the treatment of restenosis [J]. *J Control Rel*, 2000, 65(2): 221 - 229.
- [5] Moses JW, Leon MB, Popma JJ, *et al.* Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery [J]. *N Engl J Med*, 2003, 349(14): 1315 - 1323.
- [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.