

阳离子聚合物介导下白细胞介素 1 受体拮抗剂基因兔角膜原位转染及其表达

袁进 陈家祺 周世有 刘祖国 王智崇 顾建军

【摘要】 目的 探讨阳离子聚合物即线性聚乙烯亚胺(PEI)介导下兔角膜基质注射 PEGFP-IL-1ra 质粒进行基因角膜原位转染的有效性和安全性。方法 以人 cDNA 文库为模板进行聚合酶链反应(PCR),获得人 IL-1ra cDNA 片段,构建重组质粒 PEGFP-hIL-1ra。以阳离子聚合物为介导转染角膜内皮细胞,通过绿色荧光蛋白(GFP)示踪、蛋白免疫印迹技术检测转染后 IL-1ra 基因和蛋白的表达。实验组 30 只 Wistar 大鼠角膜基质注射 PEGFP-hIL-1ra 质粒和 PEI-in-vivo 的混合溶液 20 μl(含 10 μg 质粒),对照组 15 只 Wistar 大鼠角膜基质注射 PEI-in-vivo 溶液 20 μl。注射后 1、3、6、14、21 d,收集角膜通过 HE 染色、透射电镜、锥虫蓝-茜素红染色、免疫组织化学观察 IL-1ra 基因角膜原位转染后的细胞结构和功能的变化。荧光显微镜下追踪 IL-1ra-GFP 融合蛋白在角膜的表达部位和表达强度。结果 以 cDNA 文库为模板扩增出 hIL-1ra cDNA 片段,构建重组质粒 PEGFP-hIL-1ra。经 PstI 和 BamHI 酶切及 DNA 测序证实了插入片段方向和大小正确。PEI-in-vitro 介导下 PEGFP-hIL-1ra 转染角膜内皮细胞 12 h 后,可见 10% ~ 15% 细胞中有 GFP 荧光表达。Western-blotting 检测可见相对分子质量为 44 000 的 hIL-1ra-GFP 蛋白表达。PEGFP-hIL-1ra 质粒和 PEI-in-vivo 角膜基质注射后 1 d,角膜上皮基底细胞可见荧光条带,6 d 时全角膜荧光强度达到高峰,14 d 开始减弱,21 d 角膜上皮层尚存微弱荧光。对照组观察期内始终未见绿色荧光。实验组角膜 HE 染色未见病理性改变,角膜上皮基底细胞层 p63 抗体阳性;锥虫蓝-茜素红联合染色未见角膜内皮细胞损伤;透射电镜显示角膜各层细胞的细胞质内可见 IL-1ra-GFP 颗粒,未见细胞器的损害。结论 阳离子聚合物介导下角膜基质注射 PEGFP-hIL-1ra 质粒可快速、有效地将 IL-1ra 基因转入角膜并表达,为临床上使用抗炎细胞因子 IL-1ra 对角膜免疫炎性反应相关疾病进行基因治疗提供了新的技术平台。(中华眼科杂志,2006,42:686-693)

【关键词】 受体,白细胞介素 1; 聚乙烯亚胺; 角膜; 转染

The transfection and expression of IL-1ra gene to the rabbit cornea in situ via cation polymer mediation YUAN Jin*, CHEN Jia-qi, ZHOU Shi-you, LIU Zu-guo, WANG Zhi-chong, GU Jian-jun.
* Zhongshan Ophthalmic Centre, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China
Corresponding author: CHEN Jia-qi, Email: gdeyeb@gzsums.edu.cn

【Abstract】 **Objective** To investigate the efficiency and safety of transfection of PEGFP-IL-1ra plasmid via cation polymer mediation (poly-ethylenimine, PEI) by injection into the corneal stroma. **Methods** Human IL-1ra cDNA fragments were cloned by RT-PCR. Plasmid PEGFP-hIL-1ra recombinants were constructed and transferred into corneal endothelial cells (CEC) via cation polymer mediation. Expression of IL-1ra mRNA and IL-1ra was detected by green fluorescent protein (GFP) and Western-blotting. In the experiment group, 20 μl preparation containing 10 μg plasmid PEGFP-hIL-1ra recombinants and PEI-in-vivo was injected into the corneal stroma of Wistar rats (n = 30). Equivalent PEI-in-vivo solution was injected into another 15 corneas as the controls. Corneas were harvested at different time points (day 1, 3, 6, 14 and 21) after injection. The changes of tissue structure and function after IL-1ra in situ transfection were studied by HE staining, transmission electron microscopy, trypan blue-alizarin red staining and immunohistochemistry. The location and intensity of IL-1ra-GFP fusion protein expression were monitored by fluorescence microscopy. **Results** The size of the RT-PCR product of hIL-1ra fragments was approximately 500 bp in agarose gel electrophoresis. Restrictive enzyme digestion analysis of PstI, BamHI and DNA

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30271388);卫生部临床重点基金资助项目(2004-468)

作者单位:510060 广州,中山大学中山眼科中心,教育部眼科学重点实验室(刘祖国现在厦门大学医学院,361005)

通讯作者:陈家祺,Email:gdeyeb@gzsums.edu.cn

sequence analysis showed that expression of plasmid PEGFP-hIL-1ra recombinants had been constructed successfully. Twelve hours after the transfection of PEGFP-hIL-1ra, GFP fluorescence was detected in 10% - 15% endothelial cells. IL-1ra protein (RMW: 44 000) was detected by Western-blotting. In PEGFP-hIL-1ra treated group, fluorescence was appeared at day 1 in cornea basal epithelial cells, peaked at day 6 in whole cornea, began to weaken at day 14, and only weak fluorescence remained in cornea epithelial cells at day 21. No fluorescence appeared in the control group. No significant pathologic changes could be found in HE stained cornea tissues in both transfected group and the controls. p63 immunocytochemical staining in cornea epithelium was positive in both groups. Trypan blue-alizarin red staining confirmed that there was no damage in cornea endothelial cells. IL-1ra-GFP granules could be found by transmission electron microscope in every layer of cornea in the transfected group, but none in the controls. There was no impairment in the ultrastructure of cells in both groups. **Conclusions** By direct injection of PEGFP-hIL-1ra into corneal stroma and mediated by cation polymer, IL-1ra genes could be transferred and expressed in corneal tissue efficiently and safely, and might provide a novel technique of gene transfection to cornea in situ. (*Chin J Ophthalmol*, 2006, 42:686-693)

【Key words】 Receptors, interleukin-1; Polyethyleneimine; Cornea; Transfection

白细胞介素 1 受体拮抗剂 (Interleukin-1 recipient antagonist, IL-1ra) 是天然存在的 IL-1 同型异构体, 能特异性地与细胞表面的 IL-1 受体结合而不激活靶细胞, 从而阻断早期炎症因子 IL-1 介导的炎症反应^[1,2]。有研究^[3,4]表明 IL-1ra 对于角膜移植排斥反应、眼化学伤等免疫炎症相关性病变具有良好的治疗效果。尽管 IL-1ra 有明确的药理作用和应用前景, 但是 IL-1ra 达到有效阻断 IL-1 生物学效应的应用剂量较大, 且 IL-1ra 蛋白质性质不稳定, 需反复持续给药以维持有效治疗浓度, 临床应用成本昂贵。因此, 提高 IL-1ra 眼部使用的生物利用度, 探索新的给药模式是非常值得研究的。Wolf 等^[5]证实将质粒 DNA 直接注射在心肌和骨骼肌, 可获得外源 DNA 的表达, 从而开创了基因组织原位转染的先河。本研究拟采用新型非病毒载体阳离子聚合物即线性聚乙烯亚胺 (polyethyleneimine, PEI) 包装 IL-1ra 质粒 DNA, 进行角膜基质注射, 评价外源性基因角膜原位转染的有效性和安全性, 以期为日后角膜疾病的 IL-1ra 转基因治疗提供新的技术平台。

材料和方法

一、试剂和仪器

荧光质粒 PEGFP-C2、亚克隆载体 PGEM-TEasy、质粒快速提取试剂盒 (均购于美国 Promega 公司), 阳离子聚合物 JetPEI-in-vivo/vitro (法国 Polyplus Transfection 公司), Western-blotting 试剂盒 (深圳达科为公司), 鼠抗人 IL-1ra 单克隆抗体 (美国 Cytoskeleton 公司), RPMI-1640 培养基 (美国 Gibco 公司), 兔抗鼠 p63 单克隆抗体, SP 免疫化学试剂盒 (福建迈新生物工程有限公司), 聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 仪 (美国 PE 公司), 垂直电泳-转膜系统、凝胶系统成像仪 (美国 BioRad

公司), 荧光显微镜 (德国 Lecia 公司), 透射电镜 (日本 JEOL-1200EX), 微量进样器 (上海激光医疗设备公司)。

二、实验动物

45 只清洁级 Wistar 大鼠由广东省医学实验动物中心提供, 体重 200 ~ 250 g, 鼠龄 2 个月, 雌雄不限。

三、实验方法

1. 表达 IL-1ra 基因重组质粒的构建: (1) 引物设计: 搜索 Genebank 中 hIL-1ra 全基因序列, 在成熟蛋白的编码区两侧设计含信号肽的引物。3' 端引物: CTTAAGCTTACTCGTCCTCCTGGAAGTAG, 5' 端引物: ATGGAAATCTGCAGAGGCT。在 5' 端引物中加入 EcoRI 位点, 在 3' 端引物中加入了 Sall 位点。(2) IL-1ra 的 PCR 扩增: 以人 cDNA 文库为模板, 加入引物后, 94℃ 变性, 4 min 后进入以下程序: 94℃ 变性 1 min, 60℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 循环 28 次后 72℃ 延伸 8 min, 纯化 PCR 产物, 然后经 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增效果。(3) 重组质粒 PEGFP-hIL-1ra 的构建: 将纯化的 PCR 产物插入 PGEM-TEasy 载体, 挑取阳性克隆。PEGFP-C2 质粒经 PstI 和 BamHI, 亚克隆质粒 PGEM-T-hIL-1ra 经 HindIII 和 EcoRI 酶切, 回收并纯化目的片段。酶切后载体经 CIP 处理后与 IL-1ra 小片段连接, 构建成重组质粒 PEGFP-hIL-1ra。

2. 构建质粒的鉴定: 对 PEGFP-hIL-1ra 进行双酶切和 PCR 鉴定, 检测插入片段的 DNA 序列, 利用 Genebank 中 Blast 搜索引擎, 将测序结果与 Genebank 中标准序列对比。按 JetPEI-in-vitro 推荐的核苷酸与阳离子聚合物混合比例配制转染溶液, 质粒浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。24 孔培养板中传代角膜内皮细胞生长接近 60% ~ 70% 融合时, 每孔加入 JetPEI-DNA 溶

液 100 μl , 另一 24 孔培养板只加不含质粒的 JetPEI 溶液。培养 12 h 后, 倒置荧光显微镜下用 495 nm 蓝光为激发光, 观察细胞内绿色荧光表达情况。培养 24 和 48 h 后收集细胞通过 Western-blotting 检测 IL-1ra 蛋白表达水平, 方法参见分子克隆实验指南 (第 2 版)^[6]。

3. IL-1ra 绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 基因角膜原位转染: 按数字随机分配法将 Wistar 大鼠分为 2 组, 实验组 (A 组) 30 只鼠, 角膜基质注射 JetPEI/PEGFP-hIL-1ra 溶液; 对照组 (B 组) 15 只鼠, 基质注射不含质粒的 JetPEI 溶液作为对照, 均为右侧眼注射。Wistar 大鼠用氯胺酮 + 氯丙嗪 (1:1) 按 0.2 ml/100 g 的注射量进行腹腔注射麻醉, 选右眼角膜 12 和 6 点钟位作为注射点, 显微镜下用微量进样器自角膜缘进入, 刺进角膜基质层 1.5 ~ 2.0 mm 后, 缓慢推注溶液 10 μl , 使其在角膜层间均匀弥散, 其中 A 组注射液中含有 PEGFP-hIL-1ra 质粒 20 μg 。注射完毕后退出进样器, 结扎眼睑缝线。两组 Wistar 大鼠均常规喂养, 每天裂隙灯显微镜观察角膜和内眼情况。注射后分别于 1、3、6、14、21 d 处死实验动物, A 组每时间点处死 6 只, B 组每时间点处死 3 只。取下角膜后做冰冻切片、HE 染色、免疫组织化学及透射电镜等相应检测。

4. IL-1ra-GFP 基因角膜原位转染后荧光动态示踪: 将眼球自视神经处剪断后完整取出, 放入冷冻包埋剂中, 低温成型后, 超薄切片机连续切片, 片厚 14 μm , 荧光显微镜下以蓝光激发 GFP 绿色荧光, 观察并摄片。

5. 角膜苏木素-伊红 (HE) 染色: 冰冻切片后标本解冻, 于 10% 甲醛液中固定 24 h, 60%、70%、80%、90% 及 100% 乙醇梯度脱水, 石蜡包埋, 连续切片, 4 μm 厚, HE 染色, 中性树胶封片, 光学显微镜下观察。

6. 角膜上皮 p63 抗体检测: 石蜡切片脱蜡 30 min, 95%、90%、85% 乙醇透明, 切片置入枸橼酸钠缓冲液中于微波炉抗原修复 10 min, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min。按 SP 试剂盒说明进行免疫组织化学操作。p63 抗体的 I 抗稀释浓度为 1:50, 显色时间为 5 min, 蒸馏水冲洗, 中性树胶封片镜下观察。阴性对照为上 I 抗时以 PBS 代替, 余步骤相同。

7. 角膜内皮活性染色: 2.5 g 锥虫蓝, 少量蒸馏水研磨, 加双蒸水至 100 ml, 用滤纸过滤, 使用时用 PBS 稀释至 0.25%, 同样方法配制 0.2% 的茜素红

染液。取下角膜后, 0.25% 锥虫蓝溶液滴于角膜内皮面染色 120 s, 生理盐水漂洗后用 0.2% 茜素红染色 120 s, 洗去浮色, 光镜观察。

8. 角膜超微结构的观察: (1) 转染复合物的负染色: 重组质粒/阳离子聚合物溶液以蒸馏水稀释, 磷钨酸负染 8 min, 透射电镜观察。(2) 角膜透射电镜标本制作: 角膜标本置于 2.5% 戊二醛中前固定 24 h, 0.1 mol/L 磷酸缓冲液漂洗, 1% 锇酸后固定 2 h, PBS 冲洗 3 遍。30%、50%、70%、90% 乙醇与 90% 丙酮混合液逐级脱水, 每次 15 min, 90%、100% 丙酮脱水各 3 次, 每次 15 min。环氧树脂 Epon-812 包埋, 半薄切片定位, 经醋酸铀-柠檬铅双染色 20 ~ 30 min, 透射电镜观察。

结 果

一、真核表达质粒 PEGFP-hIL-1ra 的构建

以人 cDNA 文库中模板扩增出 hIL-1ra cDNA, 琼脂糖凝胶电泳显示相对分子质量 500 bp 左右的条带, 片段大小与预测结果一致 (图 1)。重组质粒经 PstI 和 BamHI 酶切, 证实 hIL-1ra cDNA 正向插入质粒 (图 2, 3)。双酶切后产物 cDNA 测序序列全长: ACCTCCTGTCCTATCAGGCCCTCCCCATGC

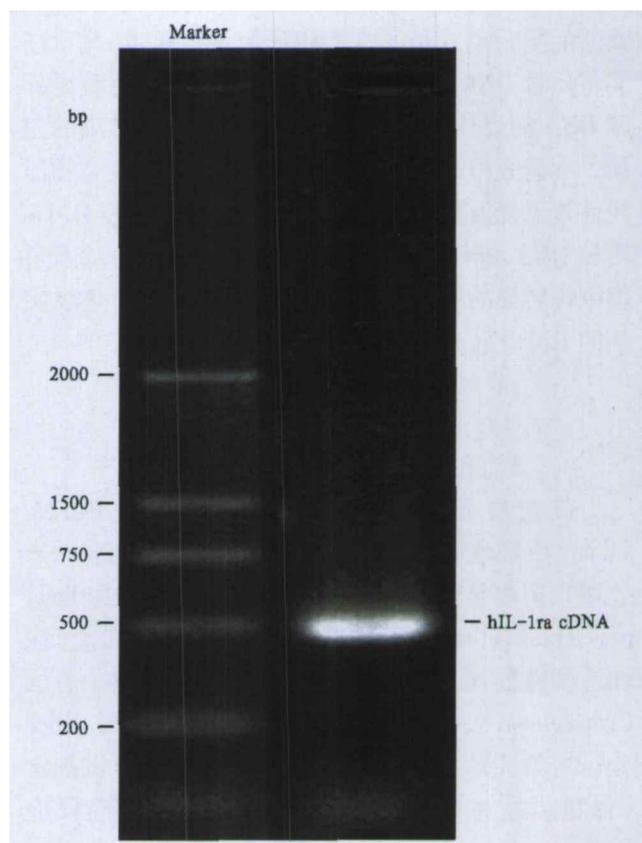


图 1 以人 cDNA 文库为模板扩增出的 PCR 产物电泳图

CTTTAGAGACGATCTGCCGACCCTCTGGGAGAAAA
 TCCAGCAAGATGCAAGCCTTCAGAATCTGGGATGT
 TAACCAGAAGACCTTCTATCTGAGGAACAACCAAC
 TAGTTGCTGGATACTTGCAAGGACCAAATGTC AAT
 TTAGAAGAAAAGATAGATGTGTTACCCATTGAGCC
 TCATGCTCTGTTCTTGGGAATCCATGGAGGGAAGA
 TGTGCCTGTCTGTGTC AAGTCTGGTGATGAGACC
 AGACTCCAGCTGGAGGCAGTTAACATCACTGACCT
 GAGCGAGAACAGAAAGCAGGACAAGCGCTTCGCC
 TTCATCCGCTCAGACAGTGGGCCACCACCAGTTT
 TGAGTCTGCCGCTGCCCGGTTGGTTCTCTGCAC
 AGCGATGGAAGCTGACCAGCCCGTCAGCCTACCA
 ATATGCCTGACGAAGCGTCATGGTCACCAAATTCT
 ACTTCCAGGAGGACGAGTAGTACTGCCGAATTCTGC
 AGATATCCATCACACTGGCGCCGCTCGAGCATGCA
 TCTNAAGGGCCCTATTCTATAGTGT CAGCTAAATGC
 TAGAGCTCGCTGATCAACCTCGACTGTGCCTTTCTA
 GTTTGCAGCCATCTGTTGTTTTGCCCTCCCCCGTG
 CCCTTCC。与 Genebank 中标准序列对比:gi |32576 |
 emb |X52015. 1 | HSI1RA, H. sapiens mRNA for IL-
 1ra, Length = 1740, Score = 942 bits (475), Expect =
 0.0, Identities = 478/479 (99%), Strand = Plus/Plus。
 结果表明在核酸序列上,417 位碱基突变,从 C 变成
 G,另外 2 个克隆的测序结果也是同样,说明不是
 PCR 引入的突变,是取样个体本身具有这个突变位
 点,但在氨基酸序列,突变位点组成的密码子编码相
 同的氨基酸,所以氨基酸序列无变化。

二、PEGFP-hIL-1ra 在真核细胞内的表达

PEGFP-IL-1ra 转染角膜内皮细胞 12 h 后,细胞
 形态正常,10% ~ 15% 细胞见绿色荧光表达(图 4)。
 24、48 h Western-blotting 检测均可见目标蛋白表达,
 因 hIL-1ra-GFP 为融合蛋白,其相对分子质量为
 44 000。阴性对照组无荧光和 hIL-1ra-GFP 蛋白表
 达。

三、PEGFP-IL-1ra 质粒基质注射后角膜和内眼 情况

微量进样器刺入角膜基质后,推注质粒溶液在
 角膜层间均匀弥散,角膜轻微水肿(图 5),24 h 后
 角膜水肿消退,完全恢复透明(图 6)。观察期内未
 见眼局部充血、前房渗出及晶状体变化等。

四、IL-1ra-GFP 基因角膜原位转染后荧光表达

PEGFP-hIL-1ra 质粒角膜基质注射 1 d 后,角膜
 上皮层的基底细胞层出现 1 条连续的绿色荧光条
 带,提示 hIL-1ra-GFP 基因在细胞内得到表达,3 d

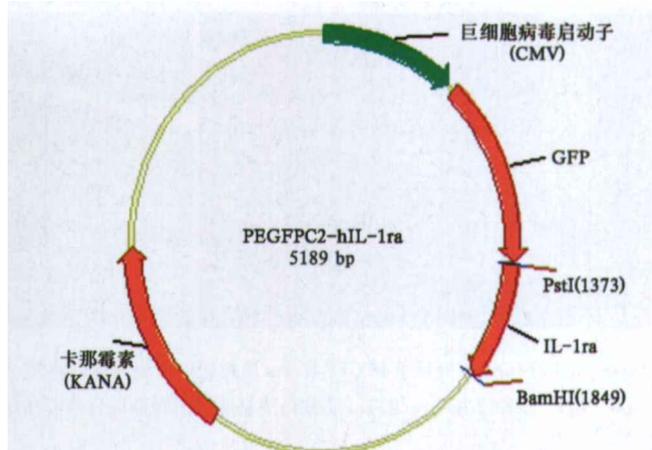
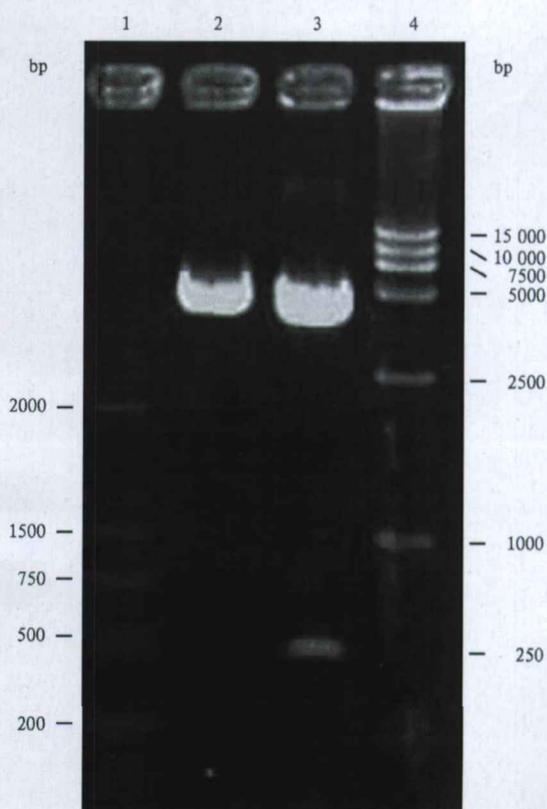


图 2 重组 PEGFPC2-hIL-1ra 质粒图谱



1: DL2000 相对分子质量,2: PEGFPC2-hIL-1ra BamHI 单
 酶切,3: PEGFPC2-hIL-1ra BamHI 和 PstI 双酶切,4:
 DL15000 相对分子质量

图 3 PEGFPC2-hIL-1ra 质粒的双酶切鉴定电泳图

时上皮细胞全层、基质细胞及内皮细胞可见绿色荧
 光;6 d 时全角膜强荧光,14 d 时角膜荧光强度逐渐
 降低;21 d 时只有角膜上皮层尚存微弱荧光。对照
 组则始终未见绿色荧光表达(图 7 ~ 10)。

五、角膜 HE 染色

质粒基质注射后胶原纤维间有少许间隙,3 d
 后恢复正常。角膜上皮 4 ~ 5 层,细胞排列规则,胶
 原纤维排列整齐,基质细胞散布其间,角膜内皮细胞



图 4 JetPEI-in-vitro 介导下 PEGFP-IL-1ra 质粒转染角膜上皮细胞 12 d, 在蓝色激发光下部分细胞的胞质可见绿色荧光表达 荧光显微镜 × 400 图 5 JetPEI-in-vivo/IL-1ra 质粒角膜基质注射转染混合溶液在角膜层间扩散 图 6 注射后 24 h 角膜透明, 前房未见渗出物

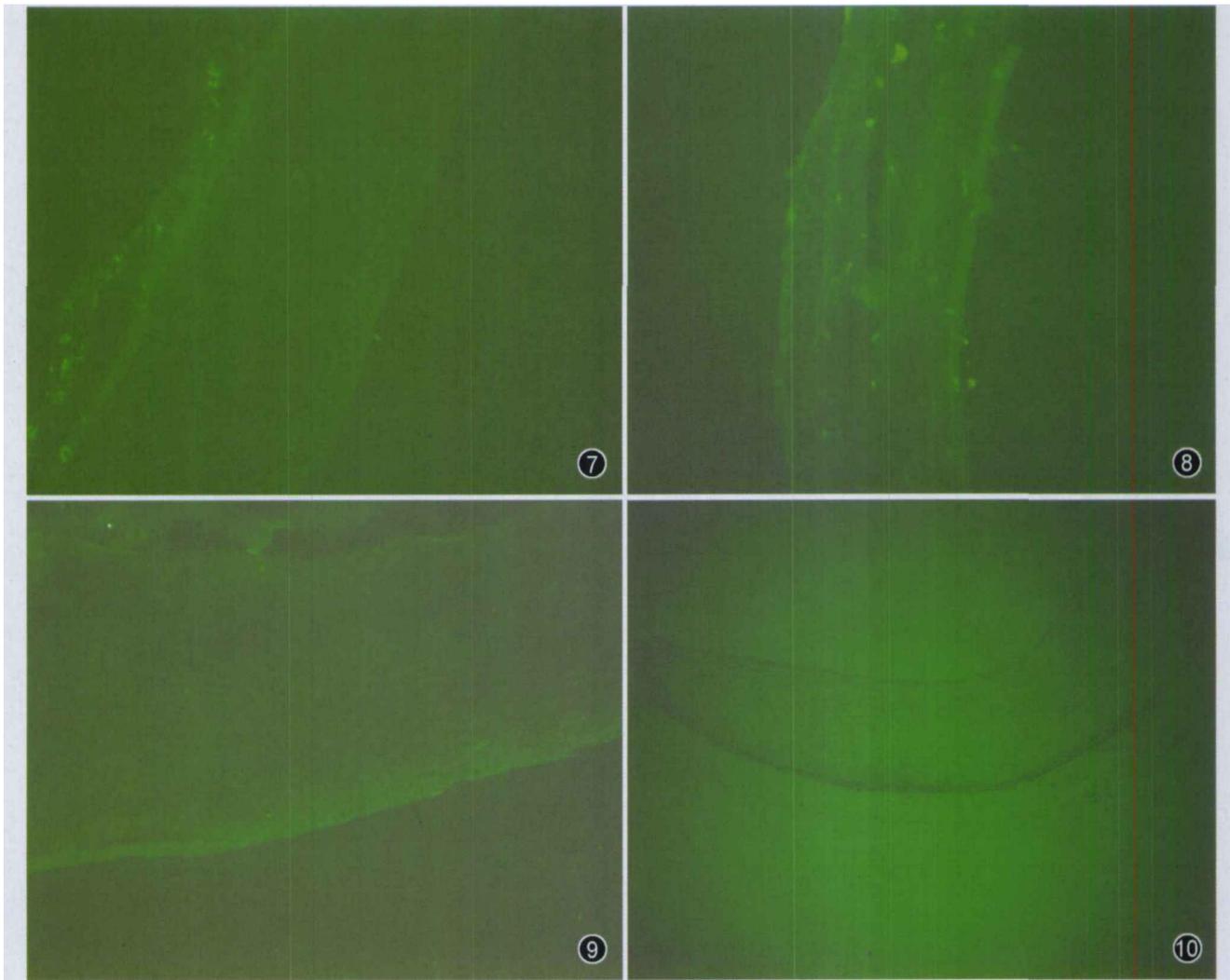


图 7 荧光显微镜下观察, PEGFP-hIL-1ra 质粒角膜基质注射 1 d, 角膜上皮基底细胞和角膜内皮细胞可见 GFP 荧光阳性 × 200 图 8 荧光显微镜下观察, IL-1ra-GFP 基因原位转染后 3 d, 角膜上皮层、基质细胞和内皮细胞均可见 GFP 荧光表达 × 200 图 9 荧光显微镜下观察, 注射后 21 d, 全角膜荧光减退, 角膜上皮层仍有较多 IL-1ra-GFP 阳性细胞 × 200 图 10 荧光显微镜下观察, 观察期内对照组角膜未见 GFP 荧光表达 × 200

完整、紧密、连续地黏附于后弹力层, 无角膜水肿、新生血管形成及炎性细胞浸润。

六、角膜 p63 抗体染色

观察期内, 实验组和对照组的角膜缘基底细胞

层细胞核呈深棕色, 提示 p63 抗体阳性, 表明存在增生活性良好的角膜缘干细胞或短暂扩充细胞(图 11)。

七、角膜内皮活性染色

角膜经锥虫蓝-茜素红联合染色,可见角膜内皮细胞间隙呈现红染反应,细胞间连接紧密,细胞形态近似六边形,夹有少许多形性细胞,细胞核未着染(图 12)。

八、透射电镜观察

PEGFP-hIL-1ra 质粒基质注射后,角膜胶原纤维间有较多大小不一、均匀分布的黑色圆点状物质,与阳离子聚合物/质粒混合溶液的负染色片对比,其电子密度相当,提示该颗粒为 PEI/DNA 复合物。3 d 后在角膜上皮细胞、基质细胞以及内皮细胞质内均可见外源性颗粒。透射电镜下未见细胞超微结构损伤,细胞核膜完整,核仁清晰,胞质内有较多粗面内质网核线粒体,上皮细胞间连接紧密,桥粒结构清晰。阴性对照组的胶原纤维和细胞内未见类似黑色圆点状物质(图 13~15)。

讨 论

一、真核细胞内表达 IL-1ra 基因质粒的构建

1985 年首次从 IgG 刺激后单核细胞培养上清分离获得 IL-1ra,与 IL-1 受体结合的亲和性与 IL- α 和 IL- β 相同,但不引起细胞内与炎症反应相关的信号转导,从而成为 IL-1 的天然拮抗剂^[7]。Arend 等^[8]成功克隆人 IL-1ra cDNA,利用基因工程技术构建在真核细胞表达 IL-1ra 的质粒进行基因治疗成为可能。本研究中直接以人 cDNA 文库为模板,设计引物后进行 PCR 扩增,获得了与基因文库中序列一致的 hIL-1ra cDNA,具有快速、重复性好的优点。有研究^[9]表明利用 PCR 技术未能从角膜内皮层扩增出 IL-1ra mRNA,且培养的内皮细胞亦不表达 IL-1ra 蛋白。因此,我们选择角膜内皮细胞作为 IL-1ra 基

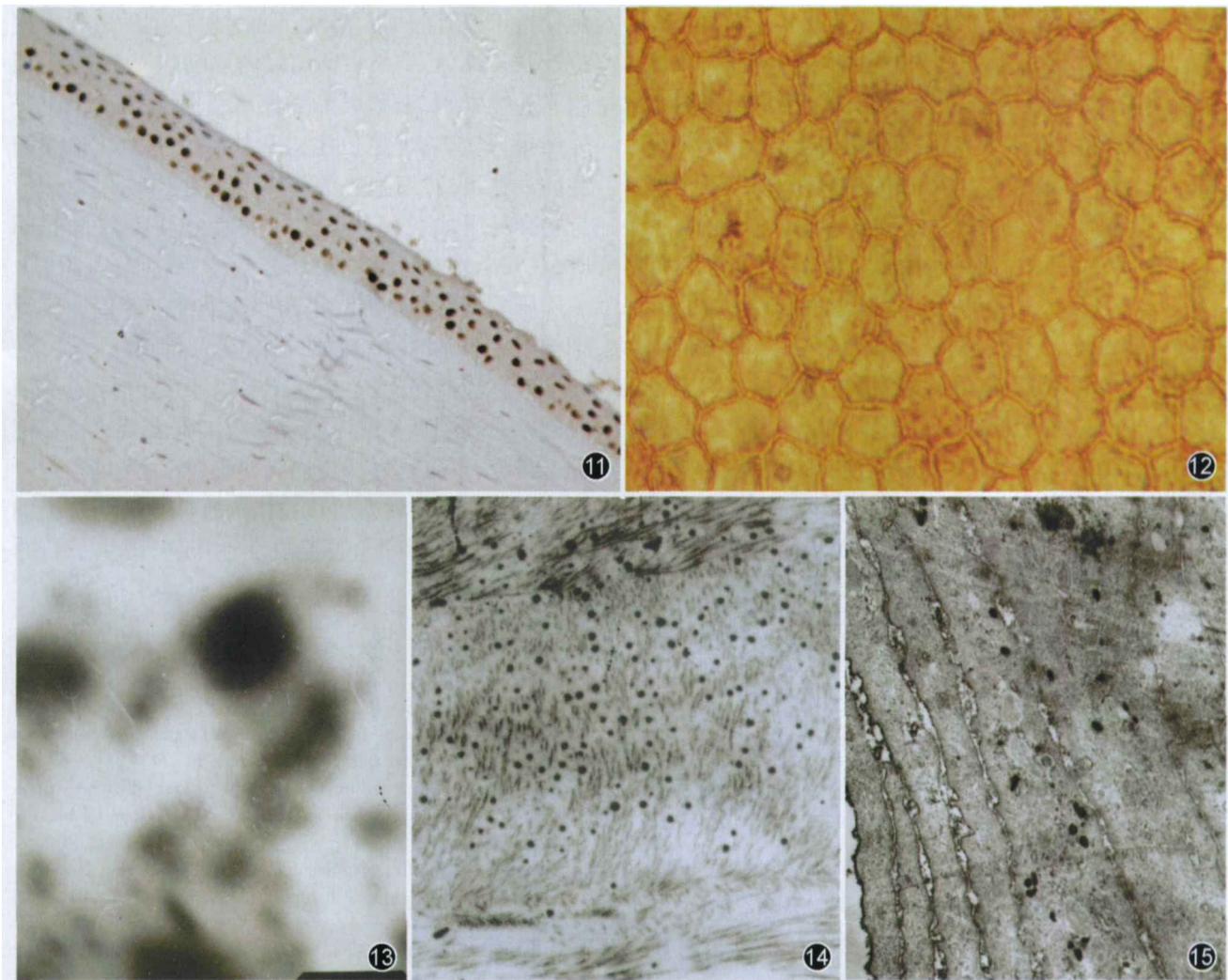


图 11 IL-1ra-GFP 质粒基质注射后 6 d,角膜基底细胞 p63 抗体阳性,细胞核呈深棕色 免疫组织化学染色 $\times 200$ 图 12 基因原位转染角膜的内皮细胞,连接紧密,细胞膜无损伤 锥虫蓝-茜素红联合染色 $\times 400$ 图 13 透射电镜下,可见 PEGFP-hIL-1ra 质粒/阳离子聚合物的混合溶液具有较高电子密度 $\times 20\,000$ 图 14 透射电镜下,可见基质注射后胶原纤维间大量黑色点状颗粒 $\times 10\,000$ 图 15 透射电镜下,可见角膜细胞质内有质粒/阳离子聚合物的复合颗粒 $\times 10\,000$

因瞬时表达验证细胞, 荧光显微镜下可见细胞内有作为蛋白示踪的绿色荧光表达, 免疫印迹亦见细胞有特异性的外源性 IL-1ra 条带。纯化 IL-1ra 蛋白相对分子质量为 18 000 ~ 20 000, PEGFP-IL-1ra 质粒中将 GFP 基因和 IL-1ra 基因相耦连, 其表达蛋白为 GFP 和 IL-1ra 的融合蛋白, 因此其相对分子质量为 44 000。本研究表明 PEGFP-IL-1ra 质粒构建成功, 并且能够携带 IL-1ra 基因在真核细胞内正确翻译、转录及表达, 为 IL-1ra 基因治疗研究提供了稳定可靠的质粒 DNA 来源。

二、阳离子聚合物介导下 IL-1ra 基因角膜原位转染的效率

角膜是基因治疗的理想靶器官。基因治疗能否成功取决于外源性基因能否转移到靶组织, 并有效地适度表达, 其中基因转染的载体选择和转染方式是关键因素。本研究使用的阳离子聚合物为 PEI, 是近年来受到关注的新型非病毒转染载体^[10]。PEI 与 DNA 结合后通过电荷吸附到细胞表面, 以内吞方式进入细胞。阳离子聚合物的重要特点是具有质子海绵作用, 能吸收溶酶体中的 H⁺, 使溶酶体中的核酸酶失活, 保护复合体中的外源性 DNA 不被降解, 随着质子的不断流入, 复合体逐渐膨胀裂解, 使外源性 DNA 持续释放到细胞质中并获得表达。

基因治疗另一个重要环节是基因转染的途径。体外培养细胞转染后, 筛选出阳性细胞再回输体内的方法操作繁琐, 影响因素多, 且细胞移植技术尚不成熟。近年来发展的组织原位转染技术提供了新的思路。Masad 等^[11]用阳离子脂质体包裹表达报告基因 β -gal 的重组质粒, 局部滴眼和前房注射, 结果显示角膜上皮和内皮、虹膜上皮、睫状体上皮均有报告基因的表达。但无论是滴眼或是前房注射, 均未能从角膜基质细胞中检出报告基因产物, 推测可能的原因是基质胶原纤维致密排列以及基质细胞过于分散导致基因转染不成功。Stechschulte 等^[12]将裸核 DNA 注射至角膜基质, 报告基因 LacZ 在注射 1 h 后于角膜开始表达, 24 h 达到峰值, 证实了对角膜基质注射实行基因原位转染的可行性, 但是裸核 DNA 注射的转染效率低, 基因表达时间短。近年来, 一些学者也尝试了其他的角膜基因原位转染方法, 包括基因枪、电脉冲诱导等, 但需要特殊设备且技术重复性不好, 转染效率有限^[13,14]。我们选用阳离子聚合物为载体, 研究了角膜基质注射的转染效果。通过微量进样器将 IL-1ra-GFP 基因直接注射到角膜基质层间, 通过压力传导和溶液的扩散作用,

使质粒 DNA 在角膜内弥散, 透射电镜显示基质注射后, PEI/DNA 复合物在基质纤维中散在分布, 进而以吞饮小泡的形式进入细胞内, 实现角膜各层细胞的有效转染。通过分析示踪蛋白 GFP 的显示强度和显示范围, 基质注射后目的基因持续时间达 14 d 以上, 这与阳离子聚合物所具有的 DNA 保护效应有关, 减少了进入细胞内的 DNA 降解带来的损失, 提高了外源性基因的利用率。

三、阳离子聚合物介导下 IL-1ra 基因角膜原位转染的安全性

角膜基质注射质粒后, HE 染色未见角膜内炎症细胞聚集和新生血管形成, 提示基因的表达部位是在角膜组织细胞内, 而不是炎症细胞。透射电镜亦未发现角膜亚细胞水平的损伤。IL-1ra-GFP 荧光最早出现于角膜基底细胞和内皮细胞, 免疫组织化学显示基底细胞 p63 抗体阳性, 表明角膜缘基底细胞保持了原有的增生活性。通过对转染后角膜内皮进行联合染色, 结果表明角膜内皮细胞膜无损害, 细胞间连接紧密, 细胞屏障功能未受到干扰。以上研究结果证实 DNA 原位注射和外源性基因在角膜细胞的表达, 未对细胞的正常功能产生影响, 阳离子聚合物介导下质粒基质注射具备良好转染效率的同时, 其安全性亦可靠。

阳离子聚合物介导下角膜基质注射基因原位转染技术可快速地将外源性基因转入角膜并表达, 且转染效率较高, 安全性好。若采用受体介导的基因转染方式, 即 DNA 载体复合物与细胞表面的特异靶分子结合, 不仅可进一步提高转染效率, 还可实现对特定细胞的定向转染。该技术为临床上使用抗炎细胞因子 IL-1ra 治疗角膜免疫炎症性疾病, 提供了新的转基因平台。

参 考 文 献

- 1 Eisenberg SP, Evans RJ, Arend WP, et al. Primary structure and functional expression from complementary DNA of a human interleukin-1 receptor antagonist. *Nature*, 1990, 343: 341-346.
- 2 Dinarello CA. Therapeutic strategies to reduce IL-1 activity in treating local and systemic inflammation. *Curr Opin Pharmacol*, 2004, 4: 378-385.
- 3 Dana MR, Yamada J, Streilein JW. Topical interleukin 1 receptor antagonist promotes corneal transplant survival. *Transplantation*, 1997, 63: 1501-1507.
- 4 Yamada J, Dana MR, Sotozono C, et al. Local suppression of IL-1 by receptor antagonist in the rat model of corneal alkali injury. *Exp Eye Res*, 2003, 76: 161-167.
- 5 Wolff JA, Malone RW, William P, et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*, 1990, 247: 1465-1473.
- 6 金冬雁, 黎孟枫, 主编. 分子克隆实验指南. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1996. 547-569.

7 Freeman BD, Buchman TG. Interleukin-1 receptor antagonist as therapy for inflammatory disorders. *Expert Opin Biol Ther*, 2001, 1: 301-308.

8 Arend WP, Joslin FG, Thompson RC, et al. An IL-1 inhibitor from human monocytes. Production and characterization of biologic properties. *J Immunol*, 1989, 143:1851-1858.

9 Torres PE, De-Vos AF, van-der-Gaag R, et al. Cytokine mRNA expression during experimental corneal allograft rejection. *Exp Eye Res*, 1996, 63: 453-461.

10 Bragonzi A, Dina G, Villa A, et al. Biodistribution and transgene expression with nonviral cationic vector/DNA complexes in the lungs. *Gene Ther*, 2000, 7: 1753-1760.

11 Masad I, Matauo T, Yasuda T, et al. Gene transfer with liposome to the intraocular tissues by different routes of administration. *Invest Ophthalmol Vis Sic*, 1996, 37:1914-1926.

12 Stechschulte SU, Jousseaume AM, Von Recum HA, et al. Rapid ocular angiogenic control via naked DNA delivery to cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sic*, 2001, 42: 1975-1979.

13 Larkin D, Jun AS. Prospects for gene therapy in corneal disease. *Eye*, 2003, 17:907-911.

14 Borras T. Recent developments in ocular gene therapy. *Exp Eye Res*, 2003, 76:643-652.

(收稿日期:2006-04-18)

(本文编辑:韩银)

· 标准与规范探讨 ·

【编者按】在有关部门的支持和组织下,中华医学会眼科学分会角膜病学组组织了有关专家经多次讨论,制订了“眼库准入标准”,以期规范我国眼库工作,促进此项工作健康开展。现将此征求意见稿发表,希望能引起全国眼科医生和眼科机构的重视,并提出建议和修改意见。

眼库准入标准 (征求意见稿)

本眼库准入标准所称眼库是指提供角膜及相关组织供眼部临床移植和科学研究的组织库。

一、机构设置条件

设置眼库必须获得卫生行政主管部门的审批许可。

二、场地要求

1. 捐献者接待室。
2. 供体材料处理室。
3. 具有空气净化及消毒装置的供体材料保存室。
4. 病原检测室。
5. 档案室。

三、设备要求

1. 超净工作台。
2. 显微镜。
3. 恒温冰箱。

4. 裂隙灯显微镜。

5. 角膜内皮检测仪器。

四、人员配备

1. 眼库医学主任(必须具有高级眼科专业技术职称)。
2. 眼库专职技师。
3. 管理人员。

五、质量管理

1. 眼库必须设立医学主任。
2. 建立供体健康档案。
3. 必须对供体的人免疫缺陷病毒、乙型和丙型肝炎病毒及梅毒螺旋体进行检测。
4. 提供供体材料质量评估报告。

中华医学会眼科学分会角膜病学组

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊有关文稿中统计学符号的书写要求

按 GB335882《统计学名词及符号》的有关规定,常用统计学符号书写格式:(1)样本的算术平均数用英文小写(中位数仍用 M);(2)标准差用英文小写 s ;(3)标准误用英文小写 s_x ;(4) t 检验用英文小写 t ;(5) F 检验用英文大写 F ;(6)卡方检验用希腊文小写 χ^2 ;(7)相关系数用英文小写 r ;(8)自由度用希腊文小写 ν ;(9)概率用英文大写 P (P 值前应给出具体检验值,如 t 值、 χ^2 值、 q 值等)。以上符号均用斜体。

本刊编辑部