

应用纳米技术研究 p21cip1 基因对人 RPE 增殖的抑制作用

王 岩, 王昕华, 李若溪

作者单位: (110031) 中国辽宁省沈阳市第四人民医院眼科
作者简介: 王岩, 副主任医师, 研究方向: 眼底病。
通讯作者: 李若溪, 学士, 主任医师, 主任, 研究方向: 眼底病。
sysylrx@126. com
收稿日期: 2011-06-15 修回日期: 2011-07-22

Inhibition of p21cip1 gene on proliferation of cultured human RPE by application of nano-technology

Yan Wang, Xin-Hua Wang, Ruo-Xi Li

Department 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. sysylrx@126. com

Received: 2011-06-15 Accepted: 2011-07-22

Abstract

• **AIM:** To study the inhibition of p21cip1 gene on proliferation of cultured human retinal pigment epithelial (RPE) cells by application of nano-technology.

• **METHODS:** Preparation of p21cip1 gene nano-particles was transfected into cultured human RPE cells for detection of expression of p21cip1 by immunohistochemistry. Cell cycle related cell volume changes were detected by flow cytometry.

• **RESULTS:** DNA content of p21cip1 nano-particles was 3%, encapsulation efficiency was 78%. Because of the protective effects of PLGA-PVA vector p21cip1 gene in the body could maintain a longer valid period than naked plasmid, overcoming problems of the naked plasmid prone to nuclease degradation *in vivo*. Flow cytometry results showed RPE cells of transfected object gene had G₁ phase arrest, significantly inhibited cell proliferation. Immunohistochemical detection results showed RPE cells of transfected object gene had markedly stronger expression of p21cip1.

• **CONCLUSION:** p21cip1 gene may serve as a target gene, with the emerging nano-particles of gene vector, to be used for gene therapy in inhibition of cell proliferation.

• **KEYWORDS:** nano-particles; p21cip1; retinal pigment epithelial cells; cell cycle

Wang Y, Wang XH, Li RX. Inhibition of p21cip1 gene on proliferation of cultured human RPE by application of nano-technology. *Guji Yanke Zazhi (Int J Ophthalmol)* 2011; 11(9): 1531-1533

摘要

目的:通过新兴的纳米粒子基因载体观察 p21cip1 基因对视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞增殖的抑制情况。

方法:制备 p21cip1 基因纳米粒子, 将其转染到培养的人 RPE 细胞, 通过免疫组织化学检测 p21cip1 蛋白的表达, 流式细胞仪检测细胞周期的相关细胞量的变化。

结果:p21cip1 纳米粒子的 DNA 含量为 3%, 包封效率为 78%, p21cip1 基因在体内由于 PLGA-PVA 载体的保护作用, 可以维持比质粒更长时间的有效期, 减少质粒易被生物体内核酸酶降解的问题。流式细胞仪检测显示转染了目的基因的 RPE 细胞发生 G₁ 期阻滞, 细胞增殖明显受到抑制。免疫组织化学检测结果显示转染了目的基因的 RPE 细胞 p21cip1 蛋白表达明显增强。

结论:p21cip1 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细胞增殖的基因治疗。

关键词:纳米粒子; p21cip1; 视网膜色素上皮细胞; 细胞周期

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-5123. 2011. 09. 011

王岩, 王昕华, 李若溪. 应用纳米技术研究 p21cip1 基因对人 RPE 增殖的抑制作用. *国际眼科杂志* 2011; 11(9): 1531-1533

0 引言

增殖性玻璃体视网膜病变 (proliferative vitreous retinopathy, PVR) 是眼外伤、糖尿病及血管性、炎症性视网膜病变的一种严重并发症, 也是裂孔性视网膜脱离手术失败的最重要原因, 对视功能的危害较大。研究发现, PVR 的发病机制主要是与视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞的病理性增生相关^[1]。p21cip1 是一种细胞周期素依赖激酶抑制物 (CKI), 主要功能是作为抑制因子参与细胞周期调控。我们利用 p21cip1 对细胞周期的负性调节作用, 借助新兴的基因载体——纳米粒子, 将 p21cip1 基因纳米粒子导入增生的 RPE 细胞上进行治疗, 以观察 p21cip1 基因纳米粒子对人 RPE 细胞增殖的抑制作用。

1 材料和方法

1.1 材料 聚乳酸-聚乙醇酸共聚物 (PLGA) 购自美国伯明翰公司; 聚乙烯醇 (PVA) 购自大连生物公司; 鱼精蛋白购自天象人生物工程有限责任公司。鼠抗人 p21cip1 单克隆体和 SP 试剂盒、DMEM/F12 培养基、小牛血清、胰蛋白酶抗体稀释液, 均购自北京中山生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 人 RPE 细胞的取材和培养及鉴定 取眼外伤眼球摘除的成人眼球, 无其他疾病史, 知情同意签字。用灭菌冰盒转移至医用生物柜内, 修剪球壁结缔组织, 750mL/L 乙醇浸泡冲洗眼球, 用含青霉素的 PBS 液冲洗干净, 由角

膜缘后4mm处环形剪开眼球壁,去除眼前节、玻璃体。不含血清的DMEM培养液冲洗眼后段并用吸管反复吹打,使眼球内壁视网膜神经上皮层与色素上皮层脱离,显微镊剪除视乳头。加入胰蛋白酶30min后取出,加含150mL/L胎牛血清的DMEM培养液,终止胰蛋白酶反应,并用滴管吹打眼球内壁,以使RPE细胞脱落分散,离心10min,弃上清。加入完全培养液将RPE细胞悬浮于培养瓶中,置于37°C,CO₂培养箱中培养。2d后开始换液,每1d换液1次。当细胞增殖到单层融合时按1:5传代。细胞鉴定采用角蛋白18免疫组织化学SP法。

1.2.2 p21cip1 基因纳米粒子的制备 采用乳化-溶剂挥发法将p21cip1基因及鱼精蛋白加入适量PLGA二氯甲烷溶液中,搅拌乳化,再加入含PVA的水溶液,继续搅拌,形成水复乳液,完全除去有机溶剂,然后离心30min使纳米粒子从乳化液中分离,收集p21cip1基因纳米粒子,除掉聚乙烯醇后,冷冻干燥,4°C冰箱保存。p21cip1基因纳米粒子中基因含量的测定及p21cip1基因纳米粒子体外释放实验均由中国医科大学细胞与遗传实验室检测。

1.2.3 基因纳米粒子转染人RPE细胞 取人RPE细胞按 2×10^5 个/孔接种于6孔板中培养,使达到60%融合。分为三组:基因纳米粒子组即于孔中加入p21cip1基因纳米粒子2.0mg;单纯纳米粒子组即于孔中加入单纯纳米例子2.0mg;空白对照组。均培养48h收集细胞。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞周期的相关细胞量的变化 转染48h后分别收集上述三组细胞离心10min,成单细胞悬液,加入700mL/L冷乙醇,固定过夜。流式细胞仪分析细胞周期。

1.2.5 免疫组织化学检测 p21cip1 蛋白的表达 将基因纳米粒子组、单纯纳米粒子组和空白对照组细胞置于经处理的载玻片上,固定15min。采用免疫组化法检测玻片上细胞p21cip1的表达情况。一抗为鼠抗人p21单抗,二抗为羊抗鼠多克隆抗体溶液,常规脱水、封片,显微镜下观察结果(蛋白阳性细胞胞核呈棕黄色)。

2 结果

2.1 人RPE细胞的培养和鉴定 原代培养的人RPE细胞呈六边形,含丰富的色素颗粒。传代后细胞呈梭形或多边形,色素减少。抗细胞角蛋白染色阳性细胞胞浆呈棕黄色;胞核由于未复染,呈空泡状。抗细胞角蛋白染色阳性率达100%,说明培养的基本上都是RPE细胞(图1)。

2.2 p21cip1 基因纳米粒子中基因含量的测定及体外释放实验结果 p21cip1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78%。该实验说明聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)是一种可降解的功能高分子有机化合物,具有良好的生物相容性、无毒、良好的成囊和成膜性能。PLGA较之其它病毒载体,具有安全和无免疫原性等优点。由于PLGA-PVA载体在体内对p21cip1基因起到良好的保护作用,相比其它载体有更长的作用时间。

2.3 流式细胞仪测定 p21cip1 纳米粒子对细胞周期调控的结果 实验结果显示转染前细胞G₁/G₀期比例,基因纳米粒子组、单纯纳米粒子组和空白对照组分别为92.4%,91.5%和90.8%,转染后48h G₁/G₀期比例分别为87.3%,43.3%和42.5%,S期为4.2%,19.3%和20.4%。表明单纯纳米粒子组和空白对照组的G₀/G₁→S的过程非常迅速,细胞增殖活跃。而基因纳米粒子组G₁/G₀期比例为87.3%,S期为4.2%,说明细胞发生G₁期阻滞,细胞增殖受到抑制。

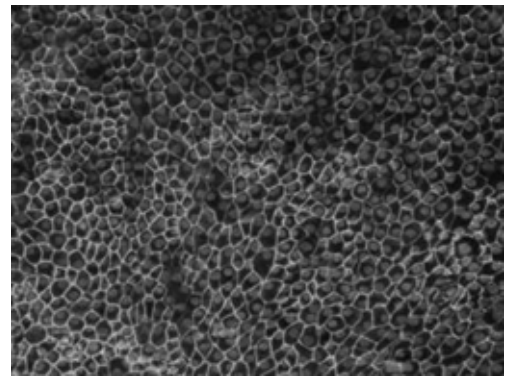


图1 原代培养的人RPE细胞的形态及鉴定(SP×300)。

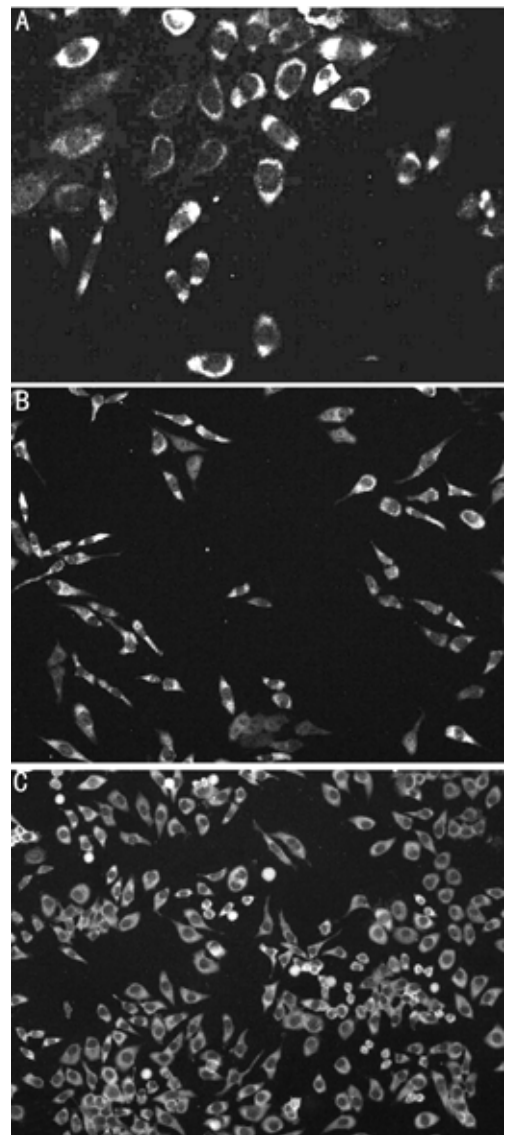


图2 p21cip1蛋白的表达(SP×400) A:空白对照组;B:单纯纳米粒子组;C:基因纳米粒子组。

2.4 p21cip1 蛋白的表达 空白对照组中少数细胞p21cip1蛋白表达且为弱阳性,染色率为5.9%(图2A);单纯纳米粒子组仅少数细胞p21cip1蛋白表达且为弱阳性,染色率为8%(图2B);基因纳米粒子组中p21cip1蛋白阳性细胞数明显增多,染色率为51%(图2C),阳性染色深于对照细胞,阳性蛋白存在于细胞核和细胞浆中,以胞核表达为主。说明外源性p21cip1基因转染人RPE细胞后,p21cip1蛋白表达明显增强。

3 讨论

增殖性玻璃体视网膜病变对视功能的危害较大,目前PVR治疗方法很难使患者长期维持满意的视力,这就需要眼科工作者去探求新的PVR治疗方法。RPE细胞是一种静止细胞,正常情况下不会增殖,但当视网膜出现裂孔等病理状况时,RPE细胞则会发生趋化、迁移和增生,形成机化膜,成为参与PVR形成的主要细胞。细胞周期调控机制的核心是细胞周期素依赖性蛋白激酶(CDK),它们的激活与否一方面依赖于细胞周期素的表达、累积与分解,另一方面还要依赖于CKI等的综合调节作用。细胞增殖周期可分为DNA合成准备期(G_1)、DNA合成期(S)、DNA合成后期(G_2)及DNA分裂期(M),此外若细胞停止增殖,退出细胞周期称为静止期(G_0)。细胞周期各时相的分布是研究细胞增殖动力学的主要指标。p21cip1是一种非特异性CKI,主要功能是参与细胞周期负调控过程^[2]。p21cip1在 G_0/G_1 期表达增高,当细胞进入S期时则表达明显下降。细胞转染p21cip1基因后,由于p21cip1的过量表达可使细胞DNA合成强烈受到抑制,阻止其从 G_1 期进入S期,从而使细胞停滞在 G_0/G_1 期。采用常规给药方法对RPE细胞增殖进行防治,常受限于RPE细胞内药物分布少、代谢率低,而超生理剂量又会带来全身各种毒副作用,除此,药物在局部维持有效作用浓度的时间较短亦是其一大缺点。目前常用的基因运载系统包括病毒载体系统和非病毒载体系统。病毒载体系统以腺病毒转染效率最高,使用范围最广,但它容易引起炎症反应。应用效果较好的非病毒载体是脂质体,具有很好的转基因效率,但同时存在体内表达时间短、不易靶向化的缺点;除此,它引起的细胞毒性问题也在体内具有局限性。纳米载体技术可通过局部给药将高浓度的作用基因直接运送至靶向RPE细胞,又能避免常规给药的上述缺陷。包载基因的纳米粒子能保护基因不被破坏,可选择性地导向靶细胞,无毒性,因而可望成为临床基因治疗的有效基因载

体^[3]。本实验所用的载体材料PLGA由两种单体——乳酸和羟基乙酸随机聚合而成。PLGA的降解产物是乳酸和羟基乙酸,同时也是人代谢途径的副产物,所以它应用在医药和生物材料中时不会有毒副作用,被广泛应用于制药、医用工程材料和现代化工业领域。在美国,PLGA通过FDA认证,被正式作为药用辅料收录进美国药典。我们采用这一技术制备的p21cip1基因纳米粒子大小均匀,表面光滑,基因的包埋效率也较高。实验表明,p21cip1基因纳米粒子可以维持2wk以上体外稳定释放,可望达到长期缓释的效果。提高了稳定性的被载体材料包裹从而免受降解的核苷酸,进入视网膜上皮细胞,使基因在细胞内或周围组织中贮存和释放,起到治疗作用。免疫组织化学和流式细胞仪实验结果显示,转染了p21cip1基因纳米粒子的人RPE细胞内p21cip1蛋白表达明显增强,且增殖活动明显受到抑制,细胞DNA合成被强烈抑制,使细胞不能从 G_1 期进入S期。说明p21cip1基因纳米粒子的成功合成以及高效转染,为p21cip1基因做为抑制因子参与增殖的人RPE细胞周期调控提供了良好的平台。p21cip1基因有可能作为一个新兴的目的基因,用于抑制细胞增殖的治疗,借助纳米粒子基因载体对RPE细胞转染p21cip1基因,使其过量表达,有望为抑制视网膜上皮细胞的增殖提供新的途径。

参考文献

- 1 Lei H, Velez G, Cui J, *et al.* N-acetylcysteine suppresses retinal detachment in an experimental model of proliferative vitreoretinopathy. *Am J Pathol* 2010;177(1):132-140
- 2 Roy HK, Koetsier JL, Tiwari AK, *et al.* Involvement of p21cip1/waf1 in the anti-proliferative effects of polyethylene glycol in colon carcinogenesis. *Int J Oncol* 2011;38(2):529-536
- 3 Parveen S, Misra R, Sahoo SK. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine* 2011;Jun 7 [Epub ahead of print]