

## 纳米血管生成素-2 小干扰 RNA 质粒制备及功能研究

陈波<sup>1</sup>, 熊利华<sup>1</sup>, 华平<sup>1</sup>, 廖洪映<sup>1</sup>, 殷香保<sup>2</sup>, 汤志华<sup>2</sup>, 蒙荣森<sup>3</sup>, 邓伟<sup>4</sup>

(中山大学附属第二医院 1. 心胸外科, 2. 肝胆外科, 3. 中西医结合科,  
广东广州 510120; 4. 中山大学附属第一医院肝胆外科, 广东广州 510080)

**摘要:**【目的】制备血管生成素-2 小干扰 RNA(Ang-2siRNA)质粒纳米微粒,并观察其基因转染能力和基因沉默效果。【方法】应用分子克隆的方法构建 Ang-2siRNA 质粒,将其与聚乳酸-*O*-羧甲基壳聚糖水/油/水(W/O/W)双乳化溶剂蒸发法制备纳米微粒,扫描电镜观察其形态和粒径。然后转染原代人脐带静脉内皮细胞,观察纳米 Ang-2siRNA 微粒干扰 Ang-2 基因表达的效果及其细胞保护功能。【结果】扫描电镜观察到 Ang-2siRNA 纳米微粒呈球形和椭圆形,粒径 150~200 nm,大小分布均匀,包封完整,分散性良好。有较强转基因能力,良好的 RNA 干扰效果和血管内皮细胞保护功能。【结论】成功制备纳米 Ang-2siRNA 微粒,并证实其转基因能力和 RNA 干扰效果,对血管内皮细胞损伤因素有良好保护作用,为进一步研究心肌梗死的血管修复机制奠定了坚实的基础。

**关键词:** Ang-2; siRNA; 纳米微粒; 基因载体

**中图分类号:** R329.2

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1672-3554(2005)02-0146-05

## Encapsulation of Ang-2 Small Interfering RNA Shuttle Vector in Poly Lactic Acid /*O*-carboxy Methylated Chitosan Nanospheres and Its Functional Investigation

CHEN Bo<sup>1</sup>, XIONG Li-hua<sup>1</sup>, HUA Ping<sup>1</sup>, LIAO Hong-ying<sup>1</sup>, YIN Xiang-bao<sup>2</sup>,

TANG Zhi-hua<sup>2</sup>, MENG Rong-sen<sup>3</sup>, DENG Wei<sup>4</sup>

(1. Department of Cardio-thoracic Surgery, 2. Department of Hepatobiliary Surgery, 3. Department of Traditional Chinese Medicine, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China; 4. Department of Hepatobiliary Surgery, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objective】 To prepare Ang-2 small interfering RNA (siRNA) shuttle vector nanosphere and evaluate both its gene-delivery ability and its gene-silence effect. 【Methods】 The nanosphere was prepared by the solvent evaporation technique with Poly (lactic acid)/*O*-carboxymethylated and Ang-2 siRNA shuttle vector. The microscopic morphology of the nanosphere was examined by scanning electron microscope. The gene silence effect of nanosphere for transfected human umbilical vein endothelium cells (HUVEC) was observed. 【Results】 The nanospheres were spherical or ellipse shape. Their diameters were in the range of 150-200 nm. Its gene-delivery and RNA interfering ability were perfect. 【Conclusion】 We synthesized Ang-2(siRNA) shuttle vector nanosphere successfully and proved both its gene-delivery ability and its RNAi effect. It laid the foundation vascular renovation about myocardial infarction.

**Key words:** Ang-2; siRNA; nanosphere; gene-delivery system

J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2005,26(2):146-150

目前临床试验研究提示,用血管内皮生长因子(VEGF)治疗缺血性心血管性疾病具有良好的前景,但是在 VEGF 作用下生成的小血管其管腔细小、迂曲,寿命短以及渗漏性高等问题是制约

VEGF促血管生长治疗的重要因素,也是临床亟待解决的问题。血管生成素(angiopoietins, Ang)是新发现的与 VEGF 及血管生成、重塑密切相关的分子,特别是血管生成素-2(Ang-2)在心肌梗死中

**收稿日期:** 2004-10-08

**基金项目:** 卫生部科研基金资助项目(981093)

**作者简介:** 陈波(1970-),男,湖北汉川人,博士生,主治医师;熊利华,博士生导师,通讯作者. E-mail: ylab@hotmail.com

的作用,至今尚未见相关报道。在本实验中,我们应用纳米技术包载 Ang-2RNA 干扰专用质粒,转染人脐带静脉内皮细胞,观察其干扰 Ang-2 基因表达的效果,为进一步的心肌梗死基因治疗奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

PSIREN-Shuttle Vectors 购自美国 BD biosciences 公司;Lipofectamine TM Reagent 购自美国 Invitrogen 公司;聚乳酸(DL型):山东医疗器械研究所;O-羧甲基壳聚糖:青岛弘信生物科技有限公司;细胞培养用胰酶、培养基及内皮细胞生长支持物均购自美国 sigma 公司;RT-PCR 试剂:大连宝生物(Takara)公司;Ang-2 抗体:美国 Santa Cruz 公司;免疫细胞化学试剂盒:武汉博士德公司;质粒提取试剂盒:美国 Omega Bio-Tek 公司;引物合成:广州博亚公司;细胞凋亡检测试剂盒:德国 Roche 公司。

### 1.2 方 法

1.2.1 Ang-2 小干扰 RNA (siRNA) 表达载体的构建 引物设计:根据 BD Biosciences 公司软件,在线设计 Ang-2siRNA 引物 2 条,序列如下:5'-gatccGTGAGCAGGACTGTTCTTCTTCAAGAGAGAA GAACAGTCCTGCTCACTTTTTTg-3';5'-aattc AAAAGTGAGCAGGACTGTTCTTCTTCTTGAAGA AGAACAGTCCTGCTCACg-3'。双链 DNA(dsDNA)的合成:将 2 条引物用 TE 溶解为 100  $\mu\text{mol/L}$ ,按 1:1 混合为终浓度 50  $\mu\text{mol/L}$ ,按以下反应条件合成 dsDNA:95  $^{\circ}\text{C}$  30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  2 min,37  $^{\circ}\text{C}$  2 min,25  $^{\circ}\text{C}$  2 min,然后置冰上备用。与 PSIREN-Shuttle Vectors 线状质粒连接:PSIREN-Shuttle (25 mg/ $\mu\text{L}$ ) 2  $\mu\text{L}$ ,dsDNA 1  $\mu\text{L}$ ,10 $\times$ T4 连接缓冲液 1.5  $\mu\text{L}$ ,T4 连接酶(400 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ ,无核酶水 9.5  $\mu\text{L}$ ,BSA(10 mg/mL) 0.5  $\mu\text{L}$ ,共 15  $\mu\text{L}$  的反应体系,17  $^{\circ}\text{C}$  连接过夜。Ang-2siRNA 表达载体的扩增,质粒抽提,酶切鉴定及测序:将连接产物转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞,铺板(卡那霉素抗性)后挑取单菌落摇菌过夜,用质粒提取试剂盒少量抽提质粒。质粒酶切及测序结果均符合设计要求,成功构建 Ang-2siRNA 表达载体。

### 1.2.2 纳米 Ang-2siRNA 微粒制备和检测 纳米

Ang-2siRNA 微粒制备:用水/油/水(W/O/W)双乳化溶剂蒸发法制备纳米微粒。将 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  的 Ang-2siRNA 质粒适量加入一定体积的质量分数 1% 降解聚乳酸二氯甲烷溶液中,超声 5 min 使之成为均一稳定的初乳液(油包水),然后在超声条件下将 100 mL 质量分数 0.4% O-羧甲基壳聚糖水溶液滴加到初乳液,超声 10 min 后形成复乳液(水包油)。将此复乳液在电磁搅拌条件下挥发 4 h,形成胶体纳米微粒,采用高速离心得到白色沉淀,冷冻干燥后得到白色粉末。纳米微粒的形态和粒径:Ang-2siRNA 纳米微粒胶体溶液滴加到铜网支持膜上,扫描电镜观察微粒的形态和粒径。

1.2.3 人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 的原代培养 无菌收集足月顺产的胎儿脐带(中山大学附属第二医院产科提供)长约 20~30 cm。用 D-Hanks 冲洗至静脉内无血,止血钳夹住一端插管,另一端注入 2.5 g/L 的胰蛋白酶,使之充盈后夹闭脐带,将其放入无菌容器内,37  $^{\circ}\text{C}$  保温 15~20 min。D-Hanks 冲洗至加有少量血清(中和胰酶)的 50 mL 离心管中。20~25  $^{\circ}\text{C}$  1 200 r/min 离心 10 min(北京医用离心机厂 LD4-2,  $r = 15$  cm)。用 5~10 mL 含 200 mL/L 血清并添加内皮细胞生长支持物的 M199 培养基重悬细胞,将细胞移入 2 g/L 明胶包被过的培养瓶中,37  $^{\circ}\text{C}$  培养过夜,换液。以后隔天换液。当细胞融合后传 1~3 代。备用。

1.2.4 HUVEC 的细胞转染 在 24 孔培养板中接种 HUVEC 细胞(细胞爬片),试验分 3 组:空白对照组,纳米组,脂质体组。37  $^{\circ}\text{C}$ ,体积分数 5%  $\text{CO}_2$  孵箱培养至细胞覆盖率约 70% 时,吸去培养液,用 PBS 洗细胞 2 次,加 Ang-2siRNA 纳米微粒与无血清培养基的混合溶液覆盖 HUVEC 细胞,37  $^{\circ}\text{C}$ ,体积分数 5%  $\text{CO}_2$  孵箱培育 8 h 后,替换为含体积分数 20% 小牛血清的完全培养基,48 h 后 PCR 和免疫细胞化学观察 Ang-2 的表达情况。同时以脂质体转等量 Ang-2siRNA 质粒进入 HUVEC 细胞为对照。

1.2.5 Ang-2siRNA 干扰效果的检测 免疫细胞化学:细胞爬片后进行免疫细胞化学分析,采用 SABC 法,DAB 显色。结果判定标准:细胞浆见到清晰的棕褐色颗粒者为阳性细胞。每例样本观察 5 个高倍视野,以综合染色强度评分和阳性细胞数占同类细胞的百分比计算阳性细胞,通过染色强度指数(staining intensity index, SII)(染色强度指

数=0×阴性细胞%+1×弱阳性细胞%+2×阳性细胞%+3×强阳性细胞%)进行半定量分析。半定量 RT-PCR: 从 HUVEC 细胞中提取总 RNA, 进行 RT-PCR, 产物进行琼脂糖凝胶电泳分析, 看有无 320 bp 长的特异性 Ang-2 基因片断出现, 并进行激光积分密度扫描, 曲线下面积作为 PCR 产物的含量进行半定量。

### 1.2.6 Ang-2siRNA 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤细胞的保护作用

细胞转染 8 h 后, 3 组(空白对照组, 纳米组, 脂质体组)细胞均加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 终浓度为 0.5×10<sup>5</sup> mol/L, 24 h 后观察细胞凋亡情况。细胞凋亡检测按德国 Roche 公司 TUNNEL 原位细胞凋亡检测试剂盒说明进行。凋亡结果判定: 细胞核中有棕黄色颗粒沉积者为阳性细胞。高倍镜下随机选择 5 个视野, 数 500 个细胞, 其中阳性细胞所占百分比即凋亡指数(apoptotic index, AI)。

### 1.3 统计学处理

所得数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用方差分析; 如方差不齐, 则先行秩和检验比较 3 组总体分布情况, 再作秩变换后行方差分析比较各组间差异。所有数据均用 Windows SPSS11.0 软件包处理。

## 2 结 果

### 2.1 纳米微粒形态与尺寸

扫描电镜(图 1)见 Ang-2siRNA 纳米微粒呈球形和椭球形, 粒径 200 nm, 大小分布均匀, 包封

完整, 分散性良好。紫外分光光度计 260 nm 测定 Ang-2siRNA 纳米微粒基因含量平均值为 3.52%, 基因包埋率为 97.55%。按以下公式计算: 包埋率(%)=[m(包裹前总 DNA)-m(未被包裹 DNA)]/m(包裹前总 DNA)]×100%。

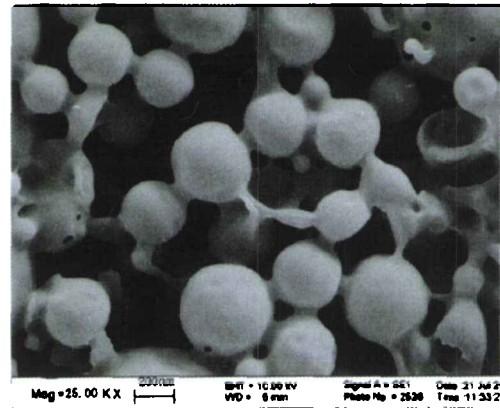


图 1 纳米的形态和尺寸

Fig.1 The microscopic morphology of the nanosphere (×25 000)

### 2.2 纳米 siAng-2 微粒转染 HUVEC 后免疫细胞化学染色

细胞转染研究发现, 纳米 Ang-2siRNA 微粒可转移 SiRNA 质粒进入 HUVEC 细胞, 免疫细胞化学鉴定, 转染前 HUVEC 的 Ang-2 表达旺盛(图 2), 纳米、脂质体转染 Ang-2siRNA 质粒后 Ang-2 表达很少(图 3, 4)与转染前比较, 两组  $P < 0.01$ , 差异有统计学意义(表 1)。

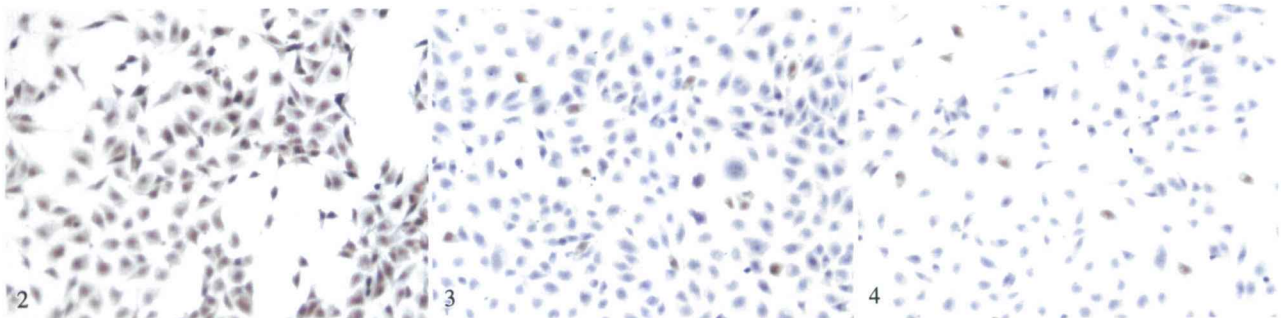


图 2 转染前 Ang-2 的表达丰富

图 3 转染纳米微粒后 Ang-2 表达稀少

图 4 转染脂质体后 Ang-2 表达稀少

Fig.2 Flourishing Ang-2 expression before transfection (×400)

Fig.3 Rare Ang-2 expression after nanosphere was transfected (×400)

Fig.4 Rare Ang-2 expression after liposome was transfected (×400)

表1 转染前后 Ang-2 染色强度指数, mRNA 表达半定量, 凋亡指数比较

Table 1 Comparison of staining intensity index, semi-quantitative ratio, and apoptotic index before and after transfection

Group	SII (n=7)	SQR (n=8)	AI (n=9)
Control	2.23 ± 0.18	1.15 ± 0.10	50.90 ± 8.30
Nanosphere	0.31 ± 0.03	0.13 ± 0.03	8.20 ± 1.10
Liposome	0.32 ± 0.03	0.12 ± 0.03	31.50 ± 18.70

SII: staining intensity index; SQR: semi-quantitative ratio; AI: apoptotic index. Compared among three groups, SII:  $\chi^2=13.602$ ,  $P < 0.01$ , SQR:  $\chi^2=15.666$ ,  $P < 0.01$ , AI:  $F=145.285$ ,  $P < 0.01$

### 2.3 纳米 siAng-2 微粒转染 HUVEC 后 Ang-2 的 mRNA 表达

Ang-2 表达量与内参照的吸光度积分比值 (semi-quantitative ratio, SQR): 纳米组、脂质体组与对照组相比,  $P < 0.01$ 。纳米和脂质体转导 siRNA 后, HUVEC 的 Ang-2 的表达明显受到抑制 (图 5)。两种载体介导的 Ang-2siRNA 均有明显的干扰效果 (表 1)。

### 2.4 纳米 siAng-2 微粒对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤细胞的保护作用

### 作用

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对内皮细胞有较强的毒害作用, 对照组细胞凋亡较多 (图 6), 而转染纳米 siAng-2 后, 显示良好的细胞保护作用 (图 7)。但脂质体组未能表现出细胞保护作用 (图 8), 可能与脂质体的细胞毒性有关。3 组比较,  $P < 0.01$ , 差异有统计学意义 (表 1)。

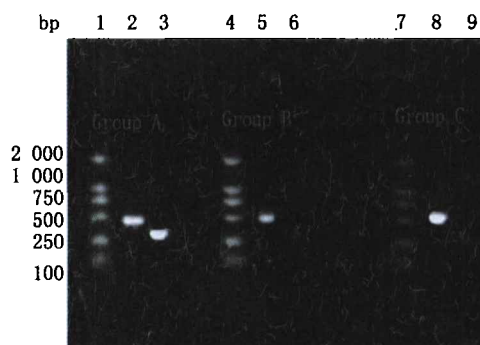


图5 转染前后, Ang-2 的 mRNA 表达水平

Fig.5 The level of Ang-2 expression before and after transfection

Lane1, 4, 7: Marker; Lane2, 5, 8:  $\beta$ -actin; Lane3, 6, 9: Ang-2; Group A: control group; Group B: nanosphere group; Group C: liposome group

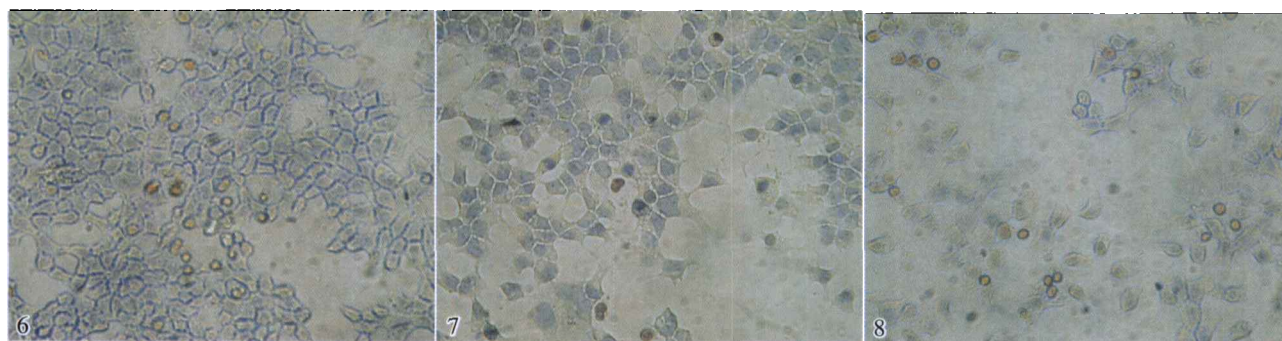


图6 对照组凋亡细胞较多

图7 纳米组凋亡细胞较少

图8 脂质体组凋亡细胞很多

Fig.6 Many apoptotic cell in control group (×400)

Fig.7 Rare apoptotic cell in nanosphere group (×400)

Fig.8 Flourishing apoptotic cell in liposome group (×400)

## 3 讨论

血管生成素家族包括 4 个成员: Ang-1, 2, 3, 4, 它们都有共同的受体即内皮受体酪氨酸激酶 Tie2<sup>[1]</sup>。传统观点认为, Ang-1 与 Ang-4 活化 Tie2

受体, 而 Ang-2 与 Ang-3 抑制 Ang-1 诱导 Tie2 的磷酸化作用。Ang-2 通过竞争结合 Tie2 受体拮抗 Ang-1 的血管生成作用。一般认为以 Ang-1 和 Ang-2 与血管生成关系最为密切<sup>[2]</sup>。

但最近发现, 血管生成素-2 的血管生成作用是多种多样的, 在不同的时间范围, 不同的剂量,

不同的组织、细胞类型,其血管生成都有可能不同,它既可能促进血管生成,也可能促进血管消退。其作用与周围的微环境特别是 VEGF 密切相关<sup>[3]</sup>。

目前的试验均表明,在急、慢性心肌缺血等过程中,并未观察到 Ang-1 的变化,而 Ang-2 和 VEGF 则表达升高,因而认为,Ang-1 并未参与心力衰竭后的血管重建<sup>[4]</sup>。也有研究表明,单独的增加 VEGF 与心肌梗死的预后并无关系,另有其它因素一起参与了 VEGF 的心脏保护作用。在心肌梗死过程中,至今血管生成素-2 的机制不明。但可以肯定的是其作用是巨大的。

近年来的研究表明,一些短片段的双链 RNA 可以通过促使特定基因的 mRNA 降解来高效、特异的阻断体内特定基因表达,诱使细胞表现出特定基因缺失的表型,称为 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi)<sup>[5]</sup>。siRNA (small interfering RNAs) 就是这种短片段双链 RNA 分子,能够以序列同源互补的 mRNA 为靶目标,降解特定的 mRNA。

基因治疗的载体选择也是目前的难题。裸质粒转染效率极低,病毒类载体有免疫原性和潜在的致瘤性,阳离子脂质体则存在细胞毒性的问题。用高分子材料构建纳米微粒做转染载体,是近年来兴起的一种新方法<sup>[6]</sup>。我们采用聚乳酸(PLA)和 O-羧甲基壳聚糖作为纳米构建的原料,所得纳米微粒具有无毒、生物相容性高、生物可降解、可控制释放、提高生物利用度等优点<sup>[7]</sup>。

在本试验中,我们利用无免疫原性,无致瘤性和细胞毒性的纳米微粒,结合 siRNA 技术,成功地干扰 Ang-2 基因地表达,并发现其良好的细胞保护作用,验证了这一新技术的先进性和可行性。但这种细胞保护功能是直接干扰 Ang-2 所致<sup>[8]</sup>,还是改变 Ang-1/Ang-2 比值<sup>[9]</sup>引起,抑或是导致下游受体 Tie2 传导通路的变化<sup>[10]</sup>等等,这都是值得进一步研究的问题。纳米 Ang-2siRNA 微粒的构建,为我们下一步研究心肌梗死的血管修复机制奠定了坚实的基础。

#### 参考文献:

- [1] Chong A, Caine GJ, Lip GY. Angiotensin/tie-2 as mediators of angiogenesis: a role in congestive heart failure[J]. *Eur J Clin Invest*, 2004, 34(1):9-13.
- [2] Tsigkos S, Koutsilieris M, Papapetropoulos A. Angiotensins in angiogenesis and beyond [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2003, 12(6):933-41.
- [3] Ye F, Florian M, Magder SA, *et al.* Regulation of angiotensin and Tie-2 receptor expression in non-reproductive tissues by estrogen[J]. *Steroids*, 2002, 67(3-4):305-10.
- [4] Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, *et al.* Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium[J]. *Nature*, 2001, 410(6829):701-5.
- [5] Fire A, Xu S, Montgomery MK, *et al.* Potent and specific genetic interference by double-strand RNA in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Nature*, 1998, 391(6669): 744-5.
- [6] 潘仕荣,冯敏. 聚普生/聚乙二醇-聚谷氨酸苄酯共聚物纳米胶束[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2003,24(1): 52-7.
- [7] Welin-Berger K, Neelissen JA, Bergenstahl B. The effect of rheological behaviour of a topical anaesthetic formulation on the release and permeation rates of the active compound[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2001, 13(3): 309-18.
- [8] Xaymardan M, Zheng J, Duignan I, *et al.* Senescent impairment in synergistic cytokine pathways that provide rapid cardioprotection in the rat heart [J]. *J Exp Med*, 2004, 199(6):797-804.
- [9] Schafer R, Abraham D, Paulus P, *et al.* Impaired VE-cadherin/beta-catenin expression mediates endothelial cell degeneration in dilated cardiomyopathy [J]. *Circulation*, 2003, 108(13):1585-91.
- [10] Chen JX, Chen Y, DeBusk L, *et al.* Dual functional roles of Tie-2/angiopoietin in TNF-alpha-mediated angiogenesis[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, 287(1):H187-95.

(编辑 张敏瑞)