

ORMA40 载体介导生存素基因转染嗅神经鞘细胞

朱兴宝^{1,2)}, 林勇³⁾, 郭西良²⁾, 孟庆妹³⁾, 王廷华³⁾, 范泉水²⁾

(1) 成都军区昆明总医院神经外科; 2) 成都军区疾病预防控制中心博士后科研工作站, 云南昆明 650032; 3) 昆明医学院神经科学研究所, 云南昆明 650031)

[摘要] **目的** 评价以纳米粒子 ORMA40 为载体介导生存素基因转染嗅神经鞘细胞的效率. **方法** 合成 ORMA40; 扩增、分离并纯化人类生存素基因的质粒 pS 和 mS; 制备 ORMA40-pS/mS 复合体 pSO 和 mSO; 分离、培养、纯化并鉴定嗅神经鞘细胞 (olfactory nerve ensheathing cells, ONECs); 分别采用 pS、pSO、mS 或 mSO 转染 ONECs. **结果** 电镜表明, 水相 ORMA40 分散好、平均直径为 20 nm; 电泳表明, mSO 和 pSO 不被 DNase I 消化; 免疫细胞染色表明, mS、pSO 和 mSO 可转染 50% 以上的 ONECs; 统计分析表明, pSO 和 mSO 转染 ONECs 的效率比 pS 转染者高 ($P < 0.01$)、与 mS 转染者相当 ($P > 0.05$). **结论** 以纳米粒子 ORMA40 为载体可高效地介导生存素基因转染 ONECs.

[关键词] 纳米粒子; 生存素; 嗅神经鞘细胞

[中图分类号] R651 **[文章标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706 (2007) 06-0064-04

Nanoparticle ORMA40 as a Vector Mediates Survivin Gene Delivery to Olfactory Nerve Ensheathing Cells

ZHU Xing-bao^{1,2)}, LIN Yong³⁾, GUO Xi-liang²⁾, MENG Qing-shu³⁾, WANG Ting-hua³⁾, FAN Quan-shui²⁾

(1) Neurosurgery Dept. Kunming General Hospital of Chengdu Military Command; 2) Postdoctoral Research Station, Disease Prevention and Control Center of Chengdu Military Command, Kunming 650032; 3) Institute of Neuroscience, Kunming Medical College, Kunming 650031, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effectiveness of nanoparticle ORMA40 as a vector for delivery of survivin gene to olfactory nerve ensheathing cells (ONECs). **Methods** ORMA40 nanoparticles (ORMA40) was synthesized, and plasmid survivin (pS and mS) was propagated, isolated and purified to form ORMA40-survivin complexes (pSO and mSO); ONECs was isolated, cultured, purified and identified to transfect ONECs with pS, mS, pSO or mSO. **Results** Transmission electron microscopy showed that ORMA40 were highly monodispersed in the aqueous solution with the average size of 20 nm; agarose gel electrophoresis showed that both mSO and pSO were free from digestion of DNase I; immunostaining showed that mS, pSO and mSO can transfect more than 50% of ONECs; and statistical analysis showed that the transfection effectiveness of pSO and mSO was higher than that of pS ($P < 0.01$) and as the same as that of mS ($P > 0.05$). **Conclusion** Nanoparticle ORMA40, as a vector, can effectively mediate the delivery of survivin gene to ONECs.

[Keywords] Nanoparticles; Survivin; Olfactory nerve ensheathing cells

[基金项目] 云南省自然科学基金资助项目(2003C0075M)

[作者简介] 朱兴宝 (1966~), 男, 云南宣威人, 医学博士, 副教授, 主要从事微侵袭神经外科学和分子神经外科学研究.

基因治疗是一种提供神经生长相关信号的有用工具^[1],其前提是基因转移.由于病毒载体有致病原性和免疫原性且操作烦琐,最近几年,越来越多的学者正在尝试采用非病毒载体介导基因转移.研究发现,纳米粒子(nanoparticles, NPs)的合成非常简便、很容易与DNA结合成为复合体、以其介导基因转移不影响宿主细胞的新陈代谢.在众多的NPs中,有机修饰的硅纳米粒子(organically modified silica nanoparticles, ORMOSIL NPs)可能是最有前途的非病毒载体.根据Roy I et al (2005)的报道,调整化合物的种类和比例,可合成多种ORMOSIL NPs.其中,ORMA40最适宜介导基因转移^[2].

生存素(survivin)是凋亡蛋白抑制因子家族的成员之一,它不仅参与抑制细胞死亡和调节细胞分化,而且参与组织损伤及其愈合^[3,4].嗅神经鞘细胞(olfactory nerve ensheathing cells, ONECs)是嗅神经的髓鞘形成细胞,其主要特点是来源与Schwann细胞者相似、功能与少突胶质细胞者相似.由于ONECs的取材方便且可供自体移植,故其在脊髓损伤修复中可能有广阔的应用前景^[5].本研究采用ORMA40介导生存素基因转染ONECs,为以后治疗脊髓损伤奠定基础.

1 材料和方法

1.1 实验动物

新生SD大鼠10只,体重20~25g,由昆明医学院动物科提供.

1.2 主要试剂和仪器

survivin - MIEG3 (mS) 和 survivin - pcDNA3.1(+)(pS) (新加坡国立神经科学学院神经肿瘤学研究室馈赠);兔抗P75NGFR抗体(Abcam),兔抗人生存素抗体(R&D Systems);98%的气溶胶OT(Aerosol OT, AOT; Aldrich),99.8%的1-丁醇(1-butanol; Aldrich),97%的乙烯基三乙氧基硅烷(triethoxyvinylsilane, TEVS; Aldrich),99%的3-氨基丙基三乙氧基硅烷(3-aminopropyltriethoxysilane, APTES; Aldrich),二甲亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO; Fisher Chemicals);12~14 kDa的透析膜(Spectrum Laboratories, Inc.),0.2 μm的滤膜(Nalgene);磁力搅拌器, JEOL JEM

2020 电子显微镜.

1.3 方法

采用纳米化学技术在AOT-DMSO-H₂O胶粒的无极核心合成ORMA40^[6],用透射电镜技术确定水溶性ORMA40的形态和大小^[7].在E.coli中扩增mS和pS,分别采用氯霉素和氨苄青霉素选择mS和pS的阳性菌落.采用去内毒素试剂盒(Qiagen, Valencia, CA)从E.coli中分离、纯化mS和pS,用琼脂糖凝胶电泳鉴定mS和pS.制备mS/pS-ORMA40复合体mSO/pSO,琼脂糖凝胶电泳上证明其对质粒DNA的保护作用^[6].免疫细胞化学方法鉴定分离、培养的ONECs^[8].采用ORMA40为载体介导生存素基因转染ONECs^[2],即将传代培养第5代的ONECs分成6组,每组加入转染液570 μl: A组,10%FBS/DMEM/F12培养液; B组,ORMA40/10%FBS/DMEM/F12培养液; C组,pS/10%FBS/DMEM/F12培养液; D组,mS/10%FBS/DMEM/F12培养液; E组,mSO/10%FBS/DMEM/F12培养液; F组,mSO/10%FBS/DMEM/F12.之后,将各组细胞在37℃、5%CO₂孵箱中孵育24h,弃去转染液并加入10%FBS/DMEM/F12培养液.采用兔抗人生存素抗体,通过免疫细胞化学方法评价ORMA40载体介导生存素基因转染ONECs的效率.

采用SPSS统计软件对数据进行统计分析.正态分布计量资料用均数±标准差表示,随机区组设计资料采用随机区组方差分析,用SNK法进行两两比较.

2 结果

透射电镜检查表明,ORMA40在水相分散好、平均直径为20nm(图1a).琼脂糖凝胶电泳表明,mSO和pSO不被DNase 1消化(图1b~c).以ORMA40为载体可成功地将生存素基因转入ONECs(图2b~d),其转染成功率超过50%.pS转染ONECs的效率非常低,而mS、pSO和mSO转染ONECs的效率都很高,50%以上的ONECs被转染.pSO和mSO的转染效率比裸体质粒直接转染者高且与mS转染者相当(图3).

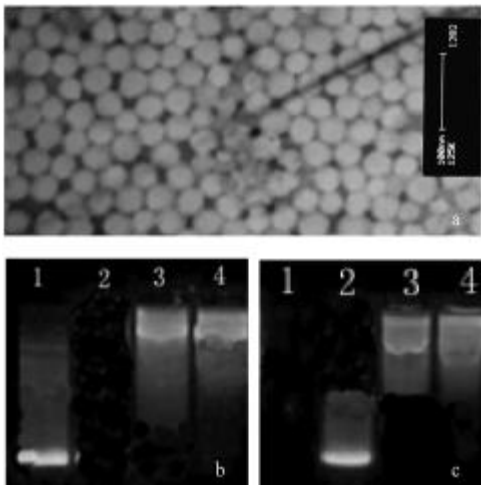


图 1 pSurvivin-ORMA40 和 mSurvivin-ORMA40 复合物

Fig.1 pSurvivin-ORMA40 and mSurvivin-ORMA40 complex

a: 透射电镜检查 ORMA40 在水相分散好; 粒径 = 100 nm. b: 1 道为 pS; 2 道为 pS 与 DNase 1; 3 道为 pSOC; 4 道为 pSO 与 DNase 1; c: 1 道为 mS; 2 道为 mS 与 DNase 1; 3 道为 mSOC; 4 道为 mSO 与 DNase 1. b、c 图为琼脂糖凝胶电泳.

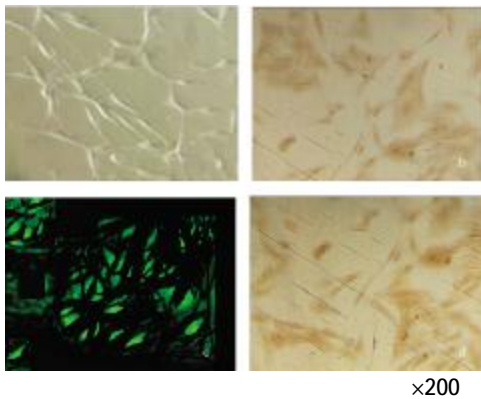


图 2 ORMA40 载体介导生存素基因转染 ONECs

Fig.2 ORMA40 mediates survivin gene delivery to ONECs

a: 原代培养的 ONECs (第 5 天); b: ORMA40 载体介导 pS 转染 ONECs, 抗生存素免疫染色; c: ORMA40 载体介导 mS 转染 ONECs, 荧光显微镜; d: ORMA40 载体介导 mS 转染 ONECs, 抗生存素免疫染色.

3 讨论

近年来, 髓内细胞移植治疗脊髓横断损伤取

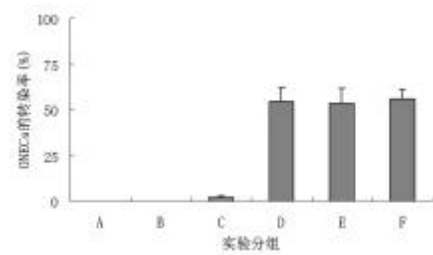


图 3 ORMA40 载体介导生存素基因转染 ONECs 的效率
Fig.3 Efficiency of ORMA40 mediating survivin gene delivery to ONECs

A: ONECs 单独培养; B: ONECs 与 ORMA40 共同培养; C: ONECs 与 pS 共同培养; D: ONECs 与 mS 共同培养; E: ONECs 与 pSO 共同培养; F: ONECs 与 mSO 共同培养. C 与 D 比较: $P < 0.01$; E 与 F 比较: $P > 0.05$.

得了一定疗效. 其中, 成髓鞘细胞移植最有前景. 成髓鞘细胞主要是 Schwann 细胞 (schwann cells, SCs)、少突胶质细胞 (oligodendrocytes, OCs) 和嗅神经鞘细胞 (olfactory nerve ensheathing cells, ONECs). 其中, OCs 是中枢神经系统 (the central nervous system, CNS) 的成髓鞘细胞, SCs 是周围神经系统 (the peripheral nervous system, PNS) 的成髓鞘细胞, ONECs 则兼有 OCs 和 SCs 的特性, 即起源于 PNS、可进入 CNS, ONECs 移植促进轴突再生和髓鞘化的效果最好^[9]. 移植细胞能否在宿主体内长期生存决定了细胞移植促进神经再生的时效. 迄今为止, 生存素是作用最强的凋亡蛋白抑制因子. 生存素可能是一个死亡关键, 除了在肿瘤细胞中抑制细胞凋亡之外, 还参与组织损伤及其修复^[3,4]. 本研究采用生存素基因修饰 ONECs, 就是希望生存素基因在宿主体内持续表达, 从而延长移植细胞的生存时间.

目的基因的成功转移是基因治疗的前提. 传统的基因转移载体是病毒载体. 最近几年, 越来越多的学者正在尝试非病毒载体介导的基因转移. Lee TW 等提到, 非病毒载体有阳离子脂质体、DNA-多聚体复合物和裸体 DNA^[10]. 脂质体或多聚体可组成纳米粒子 (nanoparticles, NPs). NPs 的直径通常在 50-300 nm 之间, 通过吞噬或胞饮机制, 很容易进入细胞内. 目前, 已经开发了多种 NPs. Roy I 等报道, 有机修饰的硅纳米粒子 (organically modified silica nanoparticles, OR-

MOSIL NPs) 可介导 DNA 转染体外培养的细胞^[2]; Bharali DJ 等报道, ORMOSIL NPs 还可介导 DNA 转染体内的细胞^[11].

目前所知, 逆转录病毒载体介导的基因转移, 转染效率最高. Williams DA 等提到, MIEG3 是基于小鼠干细胞病毒 (murine stem cell virus, MSCV) 构建的双-顺反子逆转录病毒载体^[12]. 为了验证 ORMA40 NPs 介导生存素基因转移的效率, 本文比较了 pS、mS、pSO 和 mSO 转染 ONECs 的效率, 结果发现, pS 转染 ONECs 的效率非常低, 而 mS、pSO 和 mSO 转染 ONECs 的效率都很高, 可使 50% 以上的 ONECs 被转染. 统计分析证明, pSO 和 mSO 的转染效率与 mS 转染者相当. 由于 ORMA40 的合成方法简便, 其原料低廉, 故本文认为, ORMA40 是一种非常有前途的非病毒载体, 在 CNS 的基因治疗中有潜在的应用价值.

[参考文献]

- [1] TUSZYNSKI M H, GAGE F H. Maintaining the neuronal phenotype after injury in the adult CNS. Neurotrophic factors, axonal growth substrates, and gene therapy [J]. *Mol Neurobiol*, 1995, 10 (2-3): 151 - 167
- [2] ROY I, OHULCHANSKY T Y, BHARALI D J, et al. Optical tracking of organically modified silica nanoparticles as DNA carriers: A nonviral nanomedicine approach for gene delivery [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102 (2): 279 - 284
- [3] ALTIERI D C, MARCHISIO P C. Survivin apoptosis: an interloper between cell death and cell proliferation in cancer [J]. *Lab Invest*, 1999, 79: 1327 - 1333
- [4] CHIOU S K, JONES M K, TARNAWSKI A S. Survivin - an anti-apoptosis protein: its biological roles and implications for cancer and beyond [J]. *Med Sci Monit*, 2003, 9 (4): 125 - 129
- [5] 任继鑫, 时述山, 孙天胜. 嗅神经鞘细胞的特性及对动物脊髓损伤的修复 [J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2001, 11 (3): 188 - 190
- [6] ROY I, OHULCHANSKY T Y, PUDAVAR H E, et al. Ceramic-Based Nanoparticles Entrapping Water-Insoluble Photosensitizing Anticancer Drugs: A Novel Drug Carrier-System for Photodynamic Therapy [J]. *J Am Chem Soc*, 2003, 125: 7860 - 7865
- [7] THOMAS M, KLIBANOVA M. Conjugation to gold nanoparticles enhances polyethylenimine's transfer of plasmid DNA into mammalian cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100 (16): 9138 - 9143
- [8] 徐明, 盛伟华, 谢宇锋, 等. 新生大鼠嗅球嗅神经鞘细胞的纯化方法研究 [J]. *苏州大学学报 (医学版)*, 2006, 26 (5): 738 - 740
- [9] IMAIZUMI T, LANKFORD K L, KOCSIS J D, et al. Comparison of myelin-forming cells as candidates for therapeutic transplantation in demyelinated CNS axons [J]. *No To Shinkei*, 2000, 52 (7): 609 - 15
- [10] LEE T W, MATTHEWS D A, BLAIR G E. Novel molecular approaches to cystic fibrosis gene therapy [J]. *Biochem J*, 2005, 387 (Pt 1): 1 - 15
- [11] BHARALI D J, KLEJBOR I, STACHOWIAK E K, et al. Organically modified silica nanoparticles: a nonviral vector for in vivo gene delivery and expression in the brain [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102 (32): 11539 - 11544
- [12] WILLIAMS D A, TAO W, YANG F, et al. Dominant negative mutation of the hematopoietic-specific Rho GTPase, Rac2, is associated with a human phagocyte immunodeficiency [J]. *Blood*, 2000, 96 (5): 1646 - 54

(2007-05-21 收稿)