

## · 实验研究 ·

# Entranster™ 纳米载体介导大鼠角膜 CD25 siRNA 转染的效果及安全性评估

秦琴 石韵洁 赵敏

400016 重庆医科大学附属第一医院眼科 重庆市眼库

通信作者:赵敏, Email: minzhao8866@163.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.10.005

**【摘要】** **背景** 基因转染是多种眼病基因治疗的有效方法,理想的非病毒载体是研究角膜基因治疗的关键因素,选择高转染率、基因高表达、低毒性的非病毒载体是成功实施基因治疗的前提。**目的** 探讨 Entranster™、脂质体非病毒载体对正常 SD 大鼠角膜转染 CD25 siRNA 的转染率和安全性,筛选角膜基因转染的最佳载体。**方法** 应用随机数字表法将 80 只雄性 SPF 级成年 SD 大鼠随机分为 Entranster™-CD25 siRNA 组、脂质体-CD25 siRNA 组、单纯 CD25 siRNA 组和生理盐水组,每组 20 只,均以右眼作为实验眼。实验眼眼表麻醉后刮除角膜上皮,按照分组不同分别用 Entranster™-CD25 siRNA、脂质体-CD25 siRNA、单纯 CD25 siRNA 和生理盐水各 50  $\mu$ l 点眼。于点眼后 12 h、24 h、3 d 和 7 d 在裂隙灯显微镜下观察大鼠眼表组织反应,检查各组大鼠角膜表面绿色荧光个数。分别于上述时间点处死各组大鼠各 4 只并获取角膜组织,采用苏木精-伊红染色法行角膜组织病理学检查;采用罗丹明染色行荧光检测,评估各组大鼠角膜基因转染的转染率;采用 TUNEL 染色法检测实验眼角膜细胞的凋亡情况以评估各种转染载体的安全性;采用免疫荧光技术检测角膜组织中 CD11b 的表达。**结果** Entranster™-CD25 siRNA 组大鼠角膜表面的荧光染色数量及强度明显高于脂质体-CD25 siRNA 组,单纯 CD25 siRNA 组大鼠角膜荧光染色出现早,但转染后 24 h 角膜荧光染色消失。角膜组织病理学检查显示,各组大鼠行基因转染后脂质体-CD25 siRNA 组大鼠角膜上皮水肿和角膜炎性细胞浸润程度较 Entranster™-CD25 siRNA 组、单纯 CD25 siRNA 组和生理盐水组严重,角膜基质层和内皮层未发现异常,脂质体-CD25 siRNA 组大鼠角膜炎性细胞数明显多于 Entranster™-CD25 siRNA 组、单纯 CD25 siRNA 组和生理盐水组,差异均有统计学意义(均  $P=0.00$ )。TUNEL 检测发现,基因转染后 12 h 和 3 d,脂质体-CD25 siRNA 组大鼠角膜细胞凋亡数明显多于 Entranster™-CD25 siRNA 组、单纯 CD25 siRNA 组和生理盐水组,差异均有统计学意义(均  $P=0.00$ )。免疫荧光检测显示,CD11b 荧光主要分布于角膜上皮层和角膜基质层,随着基因转染后时间的延长,脂质体-CD25 siRNA 组大鼠角膜组织中 CD11b 的表达量逐渐增加,基因转染后 24 h 时荧光强度达峰,随后逐渐减弱,至转染后第 7 天仍可见弱荧光。Entranster™-CD25 siRNA 组、单纯 CD25 siRNA 组和生理盐水组大鼠角膜组织中均未发现 CD11b 的荧光表达。**结论** Entranster™ 纳米材料作为载体转染 CD25 siRNA 于正常 SD 大鼠角膜具有转染效率高、毒性低、不引起角膜免疫反应的特点,可作为角膜疾病基因治疗的合适载体。

**【关键词】** 基因转染; 小干扰 RNA; 角膜; 基因治疗/方法; 凋亡/药物作用; 纳米聚合物; 脂质体; 大鼠

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (81170822)

**The efficiency and safety assessment of Entranster™ nanoparticle carrier for CD25 siRNA transfection in rat cornea** Qin Qin, Shi Yunjie, Zhao Min

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing Eye Bank, Chongqing 400016, China

Corresponding author: Zhao Min, Email: minzhao8866@163.com

**【Abstract】** **Background** Gene transfection is an effective therapeutic avenue to target many kinds of eye

diseases. Non-viral vectors with high transfection efficiency, long-term expression, low toxicity and high expression levels are pivotal in gene therapy of corneal disease. **Objective** This study was to evaluate and compare the safety and efficiency between Entranster™ and liposome vectors for transfer of CD25 siRNA in rat cornea. **Methods** Eighty male SPF SD rats were randomly divided into Entranster™-CD25 siRNA group, liposome-CD25 siRNA group, simple CD25 siRNA group and normal saline solution (NSS) group with the right eye as experimental eyes. Corneal epithelia of the rats were completely removed after ocular surficial anesthesia, and 50  $\mu$ l Entranster™-CD25 siRNA, liposome-CD25 siRNA, CD25 siRNA solution and NSS were topical administered in the eyes respectively. Ocular response and green fluorescence number on the corneas were examined under the slit lamp assisted microscope 12 hours, 24 hours, 3 days and 7 days after use of the drugs. The rats were sacrificed and the corneas were obtained, and corneal histopathological examination was performed by using hematoxylin eosin stain. The gene transferred efficiency in the corneas was evaluated by fluorescence technology, and the safety of Entranster™ and liposome carriers was assessed using TUNEL stain. The expression and location of CD11b in the corneas were detected by immunofluorescence technology. The use and care of the experimental animals complied with Regulations for the Administration of Affairs Concerning Experimental Animals by State Science and Technology Committee. **Results** The quantity and intensity of fluorescence staining in the corneas were significantly increased in the Entranster™-CD25 siRNA group in comparison with the liposome-CD25 siRNA group, and the corneal fluorescence appeared earlier in the simple CD25 siRNA group, but it disappeared in 24 hours after transfection. Corneal histopathological examination revealed that the corneal edema and inflammatory cell infiltration in corneal epithelium after gene transfection were more dominant in the liposome-CD25 siRNA group than those in the Entranster™-CD25 siRNA group, simple CD25 siRNA group and NSS group, and no abnormality was seen in the stroma and endothelium. The number of inflammatory cells was more in the liposome-CD25 siRNA group than that in the Entranster™-CD25 siRNA group, simple CD25 siRNA group and NSS group (all at  $P=0.00$ ). The number of apoptosis cells was significantly more in the liposome-CD25 siRNA group than that in the Entranster™-CD25 siRNA group, simple CD25 siRNA group and NSS group in 12 hours and 3 days after transfection (all at  $P=0.00$ ). Immunofluorescence assay showed the expression of CD11b primarily located in the corneal epithelial and stromal layers. The expression of CD11b was gradually enhanced over time in the liposome-CD25 siRNA group and peaked in 24 hours after transfection. However, the expression was absent in the Entranster™-CD25 siRNA group, simple CD25 siRNA group and NSS group. **Conclusions** Entranster™ nanometer material-mediated transfection of CD25 siRNA in corneas of normal SD rats appears to have high transfection efficiency, low toxicity and slight irritating response to corneas, and Entranster™ vector is currently available for the gene therapy of corneal disease.

[**Key words**] Gene transfer techniques; Small interfering RNA; Cornea; Gene therapy/methods; Apoptosis/drug effects; Nano-polymer; Liposome; Rats

[**Fund program**]: National Natural Science Foundation of China (81170822)

近年来,基因治疗方法逐渐用于一些眼科疾病的治疗,角膜由于在基因治疗方面具有可视性、易于接触、在体外生存时间较长以及具有免疫赦免等独特的优势已成为基因治疗研究的主要靶组织之一<sup>[1-2]</sup>,而眼表基因治疗的效果取决于转染基因在眼表组织中表达时间的长短。因此,选择一种既能有效缓控基因在眼表释放的有效剂量,又具有低毒性和生物安全性的转染载体成为基因治疗的关键。目前,基因治疗的转染载体包括病毒载体和非病毒载体两大类,其中病毒载体转染效率较高,但存在免疫原性、致癌性、宿主 DNA 插入整合等缺点,故其临床应用受到一定的限

制,而非病毒载体具有价格低廉、制备简单、安全、有效、无免疫原性等优点,逐渐成为基因载体研究的热点<sup>[3]</sup>。本实验中分别选取了 Entranster™ 和脂质体 lipofectamine2000 两种非病毒载体,将其与 CD25 小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 结合,探讨其对大鼠角膜的转染效率和毒性,为后续角膜移植动物的基因治疗提供实验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物 健康成年雄性 SPF 级 SD 大鼠 80

只,体质量 200 ~ 250 g,由重庆医科大学动物实验中心提供,于动物房适应性饲养 1 周。采用随机数字表法将大鼠随机分为 Entranster™-CD25 siRNA 组、脂质体-CD25 siRNA 组、单纯 siRNA 组和生理盐水组,每组 20 只,均取右眼作为实验眼。实验动物的饲养和使用符合国家科学技术委员会颁布的《实验动物管理条例》。

**1.1.2 主要试剂及仪器** Entranster™ 体内转染试剂(北京英格恩生物科技有限公司);5'端用 FAM 标记的 CD25 siRNA(上海吉玛制药技术有限公司);脂质体 lipofectamine2000(美国 Invitrogen 公司);TUNEL 试剂盒(南京凯基生物有限公司);小鼠抗大鼠 CD11b 单克隆抗体(ab1211,英国 Abcam 公司);Alexa Fluor 488 山羊抗小鼠 IgG(A0428,美国 Life Technologies 公司),质量分数 4% 多聚甲醛(北京海德生物有限公司);盐酸奥布卡因滴眼液(日本参天制药株式会社)。DM6000B 型正置荧光显微镜、M841 型眼科实验手术显微镜(德国 Leica 公司);DC3 型眼前节裂隙灯显微镜照相系统(日本 Topcon 公司);眼科显微手术器械(苏州明仁医疗器械有限公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 转染试剂的制备** 按照 Entranster™ 体内转染试剂说明书中的方法配制 Entranster™-CD25 siRNA 复合物(132 μl)。(1)核酸的稀释 33 μg 核酸+33.0 μl 焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)水+33.0 μl 质量分数 10% 葡萄糖溶液。(2)转染试剂的稀释 16.5 μl Entranster™ 体内转染试剂+33.0 μl 10% 葡萄糖溶液+16.5 μl DEPC 水。(3)将(1)和(2)溶液充分振荡混匀,室温下静置 15 min。同法配制脂质体-CD25 siRNA 复合物(33 μg 核酸+33.0 μl DEPC 水+33.0 μl 10% 葡萄糖溶液+16.5 μl lipofectamine2000 转染试剂+33.0 μl 10% 葡萄糖溶液+16.5 μl DEPC 水)、CD25 siRNA(132.0 μl:33 μg 核酸+132.0 μl DEPC 水)和生理盐水。

**1.2.2 眼表基因转染** 质量分数 3% 戊巴比妥钠溶液腹腔内注射麻醉大鼠,大鼠右眼质量分数 0.4% 盐酸奥布卡因滴眼液点眼,参照 Sharma 等<sup>[4]</sup>的方法,用手术刀在眼科实验手术显微镜下刮除大鼠右眼角膜上皮,消毒棉签拭干眼表,取 50 μl Entranster™-CD25 siRNA、脂质体-CD25 siRNA、单纯 CD25 siRNA、生理盐水按照分组分别点眼,待转染 5 min 后用消毒棉签拭干眼表,将实验鼠放回笼中正常饲养。

**1.2.3 裂隙灯显微镜下检查** 各组大鼠眼前节反应 分别于转染后 12 h、24 h、3 d、7 d 在裂隙灯显微镜下观

察眼睑、巩膜、结膜、虹膜、晶状体和角膜充血、水肿等炎症反应情况。

**1.2.4 采用荧光方法检测大鼠角膜基因转染率** 分别于点眼后 6 h、12 h、24 h、3 d、7 d 各组任意处死 4 只大鼠,避光条件下取出角膜,置于 4% 多聚甲醛溶液中 4 ℃ 过夜,然后将角膜置于质量分数 30% 蔗糖溶液中 2 d,取出角膜并立即用 OCT 包埋,采用冰冻切片行 7 μm 厚切片,切片在避光条件下置于防脱载玻片上,PBS 清洗 2 次,荧光显微镜下观察基因转染情况,有绿色荧光为基因表达阳性。荧光强弱的判断标准:无荧光为(-),可疑荧光为(±),荧光较弱但清晰可见为(+),荧光明亮为(++),荧光闪亮为(+++ ~ +++++)。计算各组大鼠角膜表面绿色荧光个数。

**1.2.5 各组大鼠角膜组织病理学观察** 采用随机数字表法分别于点眼后 12 h、24 h、3 d、7 d 各组随机处死 4 只大鼠,取术眼角膜,用 4% 多聚甲醛固定,常规石蜡包埋,行 5 μm 厚切片,常规苏木精-伊红染色,光学显微镜下观察。

**1.2.6 TUNEL 法检测基因转染后角膜细胞的凋亡** 大鼠角膜材料的获取同 1.2.5,用 30% 蔗糖溶液脱水后迅速 OCT 包埋,用冰冻切片行 5 μm 厚切片。按照 TUNEL 说明书操作步骤检测角膜细胞凋亡情况。与罗丹明染料结合的角膜凋亡细胞呈红色荧光,DAPI 染色的细胞核呈蓝色荧光,荧光显微镜下进行观察。

**1.2.7 免疫荧光组织化学法检测** 各组大鼠角膜组织中 CD11b 的表达 于点眼后 6 h、12 h、24 h、3 d、7 d 各组处死 4 只大鼠后取出角膜,固定和包埋方法同 1.2.6,7 μm 厚切片,0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次,每次 10 min。将角膜置入质量分数 0.1% TritonX-100 溶液和体积分数 5% 驴血清混合液中,室温下于摇床上放置 2 h;取出角膜放入含小鼠抗大鼠 CD11b 单克隆抗体(用 5% 驴血清和 0.01 mol/L PBS 稀释至 1:200)的溶液中 4 ℃ 过夜。阴性对照组为每组 1 只角膜置于不含一抗的稀释液中孵育过夜。次日 0.01 mol/L PBS 漂洗角膜 3 次,每次 10 min,加入 FITC 标记的山羊抗小鼠二抗(PBS 稀释至 1:500),避光条件下于 37 ℃ 孵育 2 h,0.01 mol/L PBS 漂洗角膜 10 min,DAPI 染色 10 min,0.01 mol/L PBS 漂洗 2 次,每次 10 min,用防脱载玻片铺片,滴加少许抗荧光淬灭剂封片,免疫荧光显微镜下观察角膜组织中 CD11b 表达情况。

## 1.3 统计学方法

采用 SPSS 11.5 统计学软件进行统计分析。本研究中各检测指标的数据资料经正态性检验证实呈正态分布,以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间方差经 Levene 检验方差齐。

采用完全随机分组单因素干预多水平研究设计, Entranster™-CD25 siRNA 组、脂质体-CD25 siRNA 组、单纯 CD25 siRNA 组、生理盐水组大鼠在角膜基因转染后不同时间点角膜炎性细胞数、角膜凋亡细胞数、角膜绿色荧光个数的总体差异比较均采用两因素方差分析,多重比较采用 SNK-*q* 检验。采用双尾检测法,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 基因转染后活体大鼠眼前节炎症反应情况

基因转染活体大鼠后,裂隙灯显微镜下可见转染

后 12 h 各组大鼠角膜均有少量角膜上皮细胞,未见角膜混浊、前房渗出、虹膜水肿、晶状体脱出等表现;转染后 24 h 各组大鼠角膜上皮基本修复,角膜透明,脂质体-CD25 siRNA 组大鼠角膜水肿程度明显重于 Entranster™-CD25 siRNA 组、单纯 CD25 siRNA 组和生理盐水组;转染后 3 d,脂质体-CD25 siRNA 组大鼠角膜水肿程度减轻,Entranster™-CD25 siRNA 组、单纯 CD25 siRNA 组和生理盐水组大鼠角膜水肿消退;转染后 7 d,脂质体-CD25 siRNA 组大鼠角膜水肿明显改善,角膜透明(图 1)。

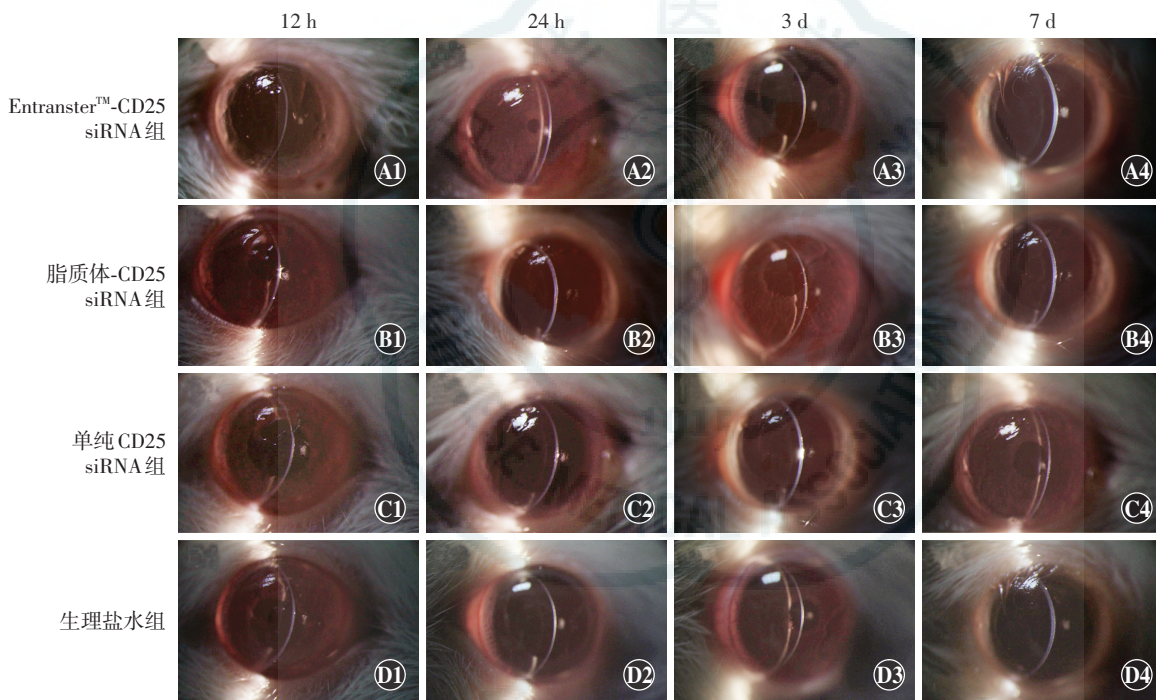


图 1 基因转染后裂隙灯显微镜下活体观察大鼠角膜表现

A1: Entranster™-CD25 siRNA 组转染后 12 h, 可见角膜上皮组织缺损, 角膜透明  
A2: Entranster™-CD25 siRNA 组转染后 24 h, 角膜上皮修复, 角膜轻度水肿 A3: Entranster™-CD25 siRNA 组转染后 3 d, 角膜上皮完全修复, 水肿消失 A4: Entranster™-CD25 siRNA 组转染后 7 d, 角膜透明, 无水肿  
B1: 脂质体-CD25 siRNA 组转染后 12 h, 可见角膜上皮组织缺损, 角膜透明

B2: 脂质体-CD25 siRNA 组转染后 24 h, 可见角膜透明, 角膜水肿 B3: 脂质体-CD25 siRNA 组转染后 3 d, 角膜上皮完全修复, 角膜水肿减轻 B4: 脂质体-CD25 siRNA 组转染后 7 d, 可见角膜透明, 无水肿 C1~4: 单纯 CD25 siRNA 组大鼠转染后各时间点角膜表现与 Entranster™-CD25 siRNA 组类似 D1~4: 生理盐水组大鼠转染后各时间点角膜表现与 Entranster™-CD25 siRNA 组类似

### 2.2 各组大鼠眼表基因转染后角膜组织中的基因转染率

生理盐水组大鼠角膜组织中未发现绿色荧光。大鼠眼表基因转染后 6 h, 单纯 CD25 siRNA 组角膜组织中荧光最强, 其次为 Entranster™-CD25 siRNA 组, 脂质体-CD25 siRNA 组角膜组织中荧光最弱。基因转染后 6 h 和 12 h, 单纯 CD25 siRNA 组荧光强度均为(++), 转染后 24 h 时荧光消失。转染后 24 h, Entranster™-CD25 siRNA 组大鼠角膜组织中绿色荧光强度为(++++) , 脂质体-CD25 siRNA 组为(+), 随时间延长荧光强度均逐渐减弱。基因转染后 3 d 和 7 d, Entranster™-CD25 siRNA 组和脂质体-CD25 siRNA 组大鼠角膜表

面仍可见绿色荧光, 分别为(++ )和(+), 其分布随着时间的延长由角膜上皮层蔓延至角膜基质层(图 2)。基因转染不同时间点各组大鼠角膜表面绿色荧光个数的总体比较差异均有统计学意义( $F_{\text{分组}} = 18.544, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 4.409, P = 0.003$ ), 其中基因转染后 6 h 和 12 h, 单纯 CD25 siRNA 组大鼠角膜表面荧光个数均明显多于 Entranster™-CD25 siRNA 组和脂质体-CD25 siRNA 组, 基因转染后 24 h, Entranster™-CD25 siRNA 组大鼠角膜表面荧光个数最多, 明显多于同组其他时间点, 各时间点 Entranster™-CD25 siRNA 组大鼠角膜表面荧光个数均明显多于脂质体-CD25 siRNA 组, 差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ )(表 1)。

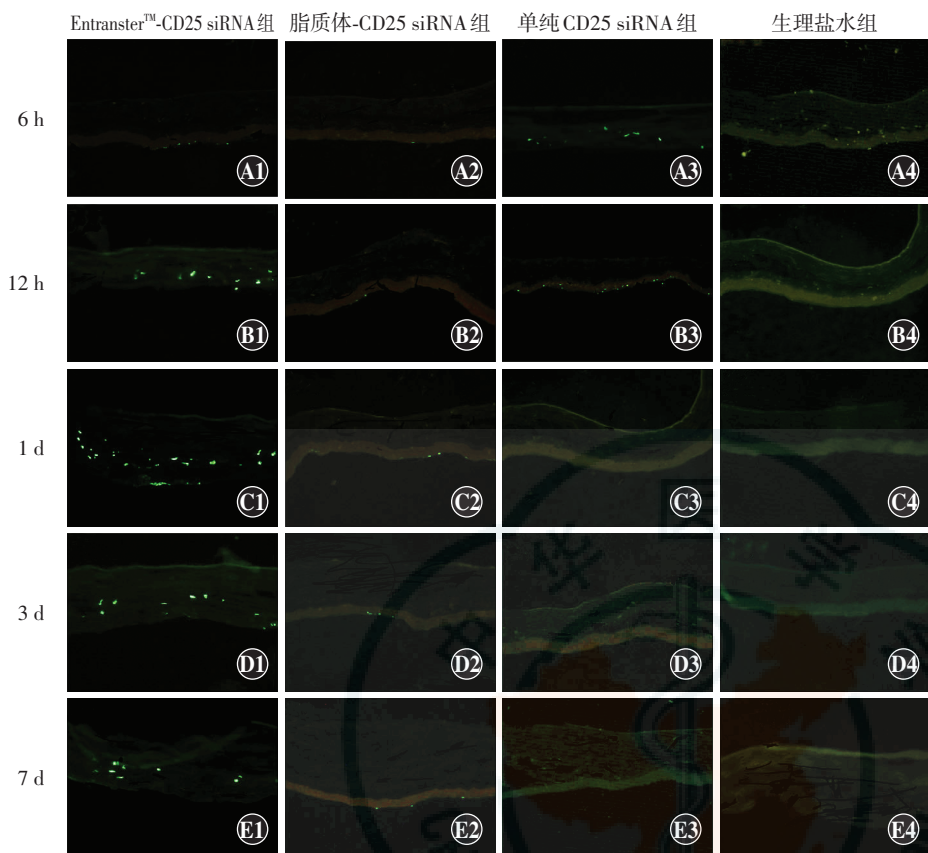


图 2 各组大鼠眼表基因转染后角膜组织绿色荧光表达 (FITC ×200) A1~3: 基因转染后 6 h, 单纯 CD25 siRNA 组绿色荧光数量及强度明显高于 Entranster™-CD25 siRNA 组和脂质体-CD25 siRNA 组 B1~3: 基因转染后 12 h, 单纯 CD25 siRNA 组绿色荧光数量仍多于 Entranster™-CD25 siRNA 组和脂质体-CD25 siRNA 组, 但荧光强度弱于转染后 6 h C1~3: 基因转染后 1 d, 单纯 CD25 siRNA 组无荧光, 而 Entranster™-CD25 siRNA 组绿色荧光个数达到高峰, 荧光强度为 (++++) ; 脂质体-CD25 siRNA 组荧光强度为 (+) D1~3, E1~3: 各组荧光随时间延长逐渐衰减 A4、B4、C4、D4、E4: 无荧光显示

表 1 基因转染后不同时间点各组大鼠角膜表面荧光个数 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本量	转染后不同时间角膜表面绿色荧光个数				
		6 h	12 h	1 d	3 d	7 d
Entranster™-CD25 siRNA 组	4	6.80±0.84 <sup>ab</sup>	11.60±1.14 <sup>ab</sup>	25.80±0.84 <sup>b</sup>	12.80±0.84 <sup>ab</sup>	6.00±1.00 <sup>ab</sup>
脂质体-CD25 siRNA 组	4	1.60±0.55	2.20±0.84	5.00±0.71	5.80±0.84	3.40±0.55
单纯 CD25 siRNA 组	4	11.40±1.14 <sup>bc</sup>	16.40±1.14 <sup>bc</sup>	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00

注:  $F_{\text{分组}} = 18.544, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 4.409, P = 0.003$ . 与 Entranster™-CD25 siRNA 组内 24 h 值比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与同一时间点脂质体-CD25 siRNA 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.01$  (两因素方差分析, SNK-q 检验)

### 2.3 基因转染后角膜组织病理学改变

基因转染后 12 h, 各组大鼠均可见角膜上皮组织缺损, 基因转染后 24 h, 角膜上皮层基本修复, 但各组大鼠均出现角膜水肿, 脂质体-CD25 siRNA 组大鼠角膜水肿程度较 Entranster™-CD25 siRNA 组、单纯 CD25 siRNA 组和生理盐水组严重, 角膜基质层和内皮层结构清楚, 未发现细胞变形, 脂质体-CD25 siRNA 组大鼠炎性细胞数明显多于其他 3 个组且持续至基因转染后第 3 天, 差异均有统计学意义 (均  $P = 0.00$ ), Entranster™-CD25 siRNA 组、单纯 CD25 siRNA 组和生理盐水组间大鼠角膜炎性细胞数的差异均无统计学意义 (均  $P > 0.05$ ), 基因转染后第

3 天无炎性细胞浸润 (图 3, 表 2)。

### 2.4 各组大鼠基因转染后角膜细胞的凋亡

基因转染后 12 h, 脂质体-CD25 siRNA 组大鼠角膜 TUNEL 阳性细胞数明显多于 Entranster™-CD25 siRNA 组、单纯 CD25 siRNA 组和生理盐水组, 差异均有统计学意义 (均  $P = 0.00$ ), Entranster™-CD25 siRNA 组、单纯 CD25 siRNA 组和生理盐水组之间差异均无统计学意义 (均  $P > 0.05$ )。随着时间的延长, TUNEL 阳性细胞数逐渐减少, 直到基因转染后第 7 天, 脂质体-CD25 siRNA 组仍有少许 TUNEL 阳性细胞; Entranster™-CD25 siRNA 组、单纯 CD25 siRNA 组和生理盐水组在转染后第 3 天时无 TUNEL 阳性细胞 (图 4, 表 3)。

表 2 基因转染后不同时间点各组炎性细胞数量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本量	不同时间点炎性细胞数			
		12 h	24 h	3 d	7 d
Entranster™-CD25 siRNA 组	4	5.8±0.8 <sup>a</sup>	14.2±0.8 <sup>a</sup>	1.8±0.8 <sup>a</sup>	0.0±0.0
脂质体-CD25 siRNA 组	4	11.6±1.1	32.4±1.5	6.2±1.3	0.0±0.0
单纯 CD25 siRNA 组	4	5.8±0.8 <sup>a</sup>	12.8±0.8 <sup>a</sup>	1.6±0.6 <sup>a</sup>	0.0±0.0
生理盐水组	4	5.6±0.9 <sup>a</sup>	13.6±1.1 <sup>a</sup>	1.6±0.9 <sup>a</sup>	0.0±0.0

注:  $F_{\text{分组}} = 15.635, P = 0.001; F_{\text{时间}} = 3.255, P = 0.074$ . 与脂质体-CD25 siRNA 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$  (两因素方差分析, SNK-q 检验)

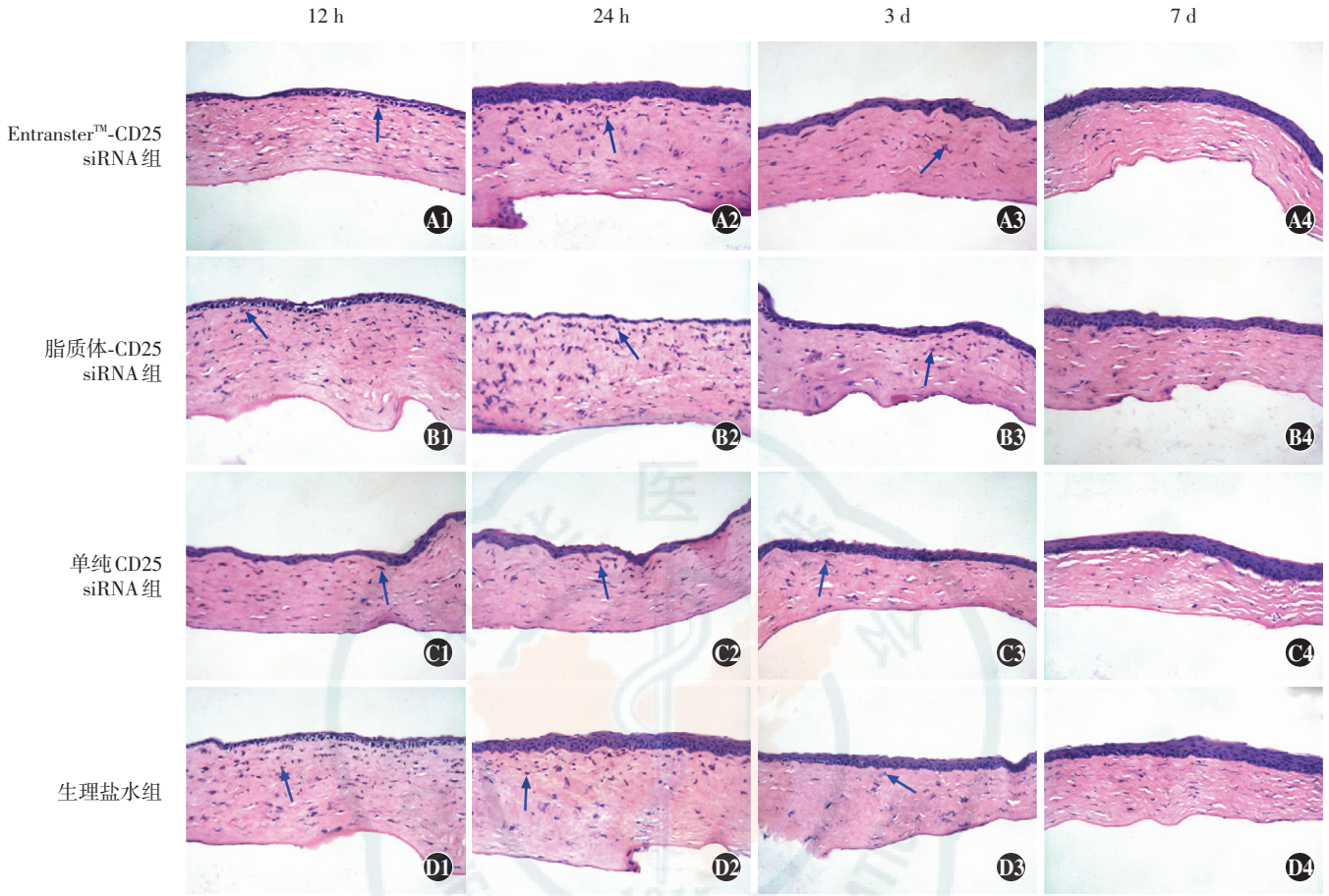


图 3 基因转染后角膜组织病理学检查 (HE ×200) A: Entranster™-CD25 siRNA 组大鼠角膜组织病理学图 B: 脂质体-CD25 siRNA 组大鼠角膜组织病理学图 C: 单纯 CD25 siRNA 组大鼠角膜组织病理学图 D: 生理盐水组大鼠角膜组织病理学图 箭头所指为炎性细胞

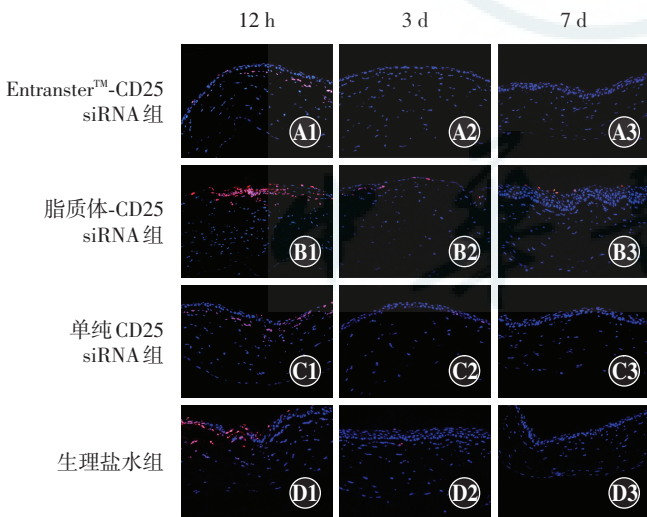


图 4 基因转染后角膜组织 TUNEL 染色结果 (×200) 大鼠角膜凋亡细胞呈红色荧光 (罗丹明), 细胞核呈蓝色荧光 (DAPI) A: 基因转染后 Entranster™-CD25 siRNA 组大鼠角膜凋亡细胞较少, 至转染后 3 d 无凋亡细胞 B: 基因转染后脂质体-CD25 siRNA 组大鼠角膜凋亡细胞数明显增多, 至转染后 7 d 仍可见凋亡细胞 C: 基因转染后单纯 CD25 siRNA 组大鼠角膜凋亡细胞数明显少于脂质体-CD25 siRNA 组, 至转染后 3 d 仅见少数凋亡细胞 D: 基因转染后生理盐水组大鼠角膜凋亡细胞数多于单纯 CD25 siRNA 组, 至转染后 3 d 仅见少数凋亡细胞

表 3 各组大鼠基因转染后不同时间点角膜凋亡细胞数比较 ( $\bar{x} \pm s$ , 个)

组别	样本量	不同时间点凋亡细胞数		
		12 h	3 d	7 d
Entranster™-CD25 siRNA 组	4	16.00±1.22 <sup>a</sup>	2.00±0.71 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>
脂质体-CD25 siRNA 组	4	25.80±1.48	12.40±1.82	6.40±1.14
单纯 CD25 siRNA 组	4	15.20±0.84 <sup>a</sup>	1.60±0.55 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>
生理盐水组	4	14.80±0.84 <sup>a</sup>	1.40±0.55 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>

注:  $F_{\text{分组}} = 41.432, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 199.499, P = 0.000$ . 与脂质体-CD25 siRNA 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$  (两因素方差分析, SNK-q 检验)

2.5 各组大鼠基因转染后角膜组织中 CD11b 的表达  
免疫荧光检测显示, 随着基因转染后时间的延长, 脂质体-CD25 siRNA 组大鼠角膜组织中 CD11b 的表达量逐渐增多, 基因转染后 24 h 荧光强度达高峰, 随后荧光强度逐渐减弱, 转染后第 7 天仍可见弱荧光。CD11b 荧光主要分布于角膜上皮层和角膜基质层 (图 5)。Entranster™-CD25 siRNA 组、单纯 CD25 siRNA 组和生理盐水组大鼠角膜组织中均无 CD11b 表达。

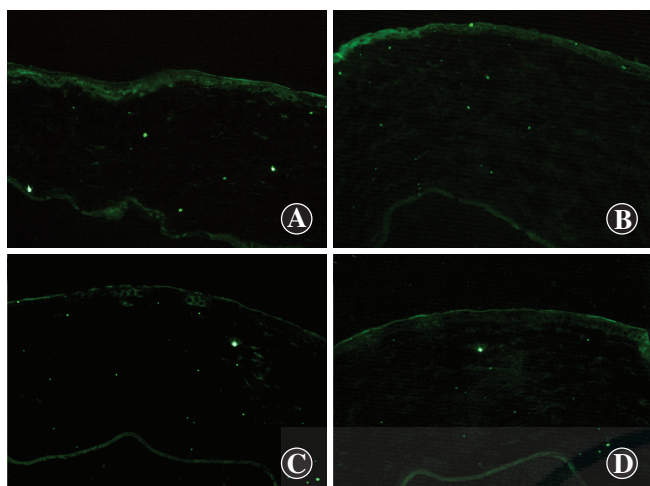


图5 基因转染后角膜组织中 CD11b 表达 (FITC  $\times 200$ ) A: 脂质体-CD25 siRNA 组基因转染后 12 h, 可见 CD11b 表达于角膜上皮层和基质层, 荧光较弱 B: 脂质体-CD25 siRNA 组基因转染后 24 h, CD11b 表达量增多, 荧光强度接近转染后 12 h C: 脂质体-CD25 siRNA 组基因转染后 3 d, CD11b 表达的荧光强度减弱 D: 脂质体-CD25 siRNA 组基因转染后 7 d, 仅见少许 CD11b 表达, 荧光微弱

### 3 讨论

RNA 干扰技术的发展为眼表疾病的基因治疗提供了一个新的途径, 其中 siRNA 是 RNA 干扰发挥效应的关键分子, 可高效、特异地抑制靶基因的表达, 实现转录后的基因沉默<sup>[5-6]</sup>。然而, 由于 siRNA 易受核酸自身相对分子质量、电荷、机体核酸酶降解、细胞膜、溶酶体吞噬等因素的影响, siRNA 转染研究中开发安全、有效的传递载体仍面临着巨大的挑战。

近年来, 非病毒载体以其独特的优势广泛应用于基因治疗的研究, 其中脂质体和纳米载体成为目前研究的热点。Lipofectamine2000 是常用的转染脂质体, 可与基因形成复合物, 有较强的转染能力。Yamashita 等<sup>[7]</sup>采用脂质体携带质粒的方法成功转染人角膜上皮细胞和大鼠结膜组织, 且未发现明显的毒性作用。Jiang 等<sup>[8]</sup>用阳离子包被的脂质体纳米载体 (cationic core-shell liponoparticle, DLCS-NP) 携带增强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescence protein, EGFP) 转染到雌性新西兰白兔的结膜上皮细胞中, 获得较好的转染效果。虽然脂质体具有良好的生物相容性, 但 Davis 等<sup>[9]</sup>和 Koirala 等<sup>[10]</sup>认为脂质体本身会参与细胞的生理活动, 引起基因表达的上调或下调, 转染效率低, 并可引起组织的炎症反应, 且目前脂质体的研究仍普遍停留在体外实验阶段, 在活体角膜的转染方面研究很少。Entranster™ 转染试剂属于纳米材料高分子聚合物, 目前在大鼠脑缺血损伤模型、CVB3 感染小鼠模型、小鼠哮喘模型的研究中均有着良好的转染优

势<sup>[11-13]</sup>, 但尚未用于活体角膜的实验研究。

目前, 角膜移植手术是治疗角膜盲的有效方法, 然而, 术后发生的移植排斥反应是导致角膜移植手术失败的主要原因, 即使术后给予糖皮质激素药物常规治疗, 仍有 10% ~ 30% 的患者发生排斥反应<sup>[14-15]</sup>。Jia 等<sup>[16]</sup>研究发现, T 细胞, 尤其是 CD4<sup>+</sup> T 细胞在角膜移植排斥反应中发挥重要作用。作为 T 淋巴细胞的主要膜蛋白, 白细胞介素 2 受体  $\alpha$ , 即 CD25 的表达则是 T 细胞活化的关键环节<sup>[17]</sup>, 例如 FK506 的主要作用机制即是抑制 *IL-2* 基因的转录, 从而抑制角膜移植排斥反应<sup>[18]</sup>。故下调 CD25 的表达对抑制角膜移植排斥反应的发生具有重要作用。因此, 本课题组拟筛选出最佳体内基因转染试剂, 从而为后续的抑制角膜排斥反应研究提供实验基础。

基因可通过结膜下注射、前房注射、点眼等不同途径原位转染至大鼠角膜组织, 结膜下注射和点眼可使目的基因在角膜上皮层及基质层大量表达, 前房注射途径可使目的基因在角膜内皮层大量表达<sup>[19]</sup>。本实验采用刮除大鼠角膜上皮后再用转染试剂点眼的方法, 旨在提高亲水性纳米载体的转染效率。本研究发现, 脂质体-CD25 siRNA 组给药后大鼠出现角膜水肿程度、角膜细胞凋亡数、炎症反应, 免疫反应均重于其他 3 个组, 从基因转染效率看, 单独的 siRNA 转染虽然早期转染效率高于 Entranster™-CD25 siRNA 组和脂质体-CD25 siRNA 组, 但在转染后 24 h siRNA 的绿色荧光消失, 因缺少载体的保护, siRNA 容易受到泪膜或角膜组织内核酸酶的降解, 丧失 siRNA 的活性<sup>[5-6]</sup>。Entranster™ 转染试剂和 Lipofectamine2000 相比, 前者的基因转染率明显高于后者, 并可持续到给药后第 7 天, 可能是由于 Entranster™ 转染试剂是将 siRNA 包裹在转染试剂内, 阻止了体内核酸酶对 siRNA 的降解, 同时对 siRNA 有缓释作用。此外 TUNEL 染色显示, Entranster™-CD25 siRNA 组角膜细胞的凋亡情况与单纯 CD25 siRNA 组和生理盐水组相似, 故推测角膜细胞的凋亡可能与转染时刮除角膜上皮细胞有关, 而不是由转染试剂的毒性引起的。因此, Entranster™ 作为载体具有高转染率、低毒性和生物安全性的特点, 而 Lipofectamine2000 作为载体引起角膜组织中炎性细胞浸润明显, 角膜细胞凋亡严重, 同时造成机体的免疫应答, 这与 Davis 等<sup>[9]</sup>和 Koirala 等<sup>[10]</sup>的研究结果类似。

综上所述, Entranster™ 纳米粒作为基因载体转染 siRNA 在正常 SD 大鼠角膜的转染效率高, 毒性作用小, 是一种安全、有效的非病毒转染载体, 这为进一步研究 Entranster™ 纳米粒介导的 CD25 siRNA 基因沉默

效应的机制和角膜移植排斥反应的体内外基因治疗提供了实验依据。然而,本实验仅探讨了该载体的短期转染效果和安全性,转染后 Entranster™ 纳米粒对角膜组织的长期毒性作用仍待进一步研究。另外,Entranster™ 纳米粒转染到角膜后是否会对结膜、房水、虹膜等组织产生影响也有待深入研究。

## 参考文献

- [1] 姚娟,李永平,林建贤. 常见角膜病变基因治疗的进展[J]. 眼科学报, 2010,25(1):1-3,10. DOI:10.3969/j.issn.1000-4432.2010.01.001.  
Yao J, Li YP, Lin JX. Development of gene therapy on common corneal diseases[J]. Eye Sci, 2010, 25(1):1-3, 10. DOI:10.3969/j.issn.1000-4432.2010.01.001.
- [2] Park K. Cornea-targeted gene therapy using adenovirus vector[J/OL]. J Control Release, 2014, 181:53 [2015-10-23]. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365914001977>. DOI:10.1016/j.jconrel.2014.03.042.
- [3] 李哲豪,任小元,王世兵,等. 介导 siRNA 传递的非病毒载体及其研究进展[J]. 生命科学, 2014, 26(4):392-399. DOI:10.13376/j.cbbs/2014057.  
Li ZH, Ren XY, Wang SB, et al. Research advances in non-viral-based siRNA delivery systems[J]. Chin Bull Life Sci, 2014, 26(4):392-399. DOI:10.13376/j.cbbs/2014057.
- [4] Sharma A, Tandon A, Tovey JC, et al. Polyethylenimine-conjugated gold nanoparticles: gene transfer potential and low toxicity in the cornea[J]. Nanomedicine, 2011, 7(4):505-513. DOI:10.1016/j.nano.2011.01.006.
- [5] Deng Y, Wang CC, Choy KW, et al. Therapeutic potentials of gene silencing by RNA interference: principles, challenges, and new strategies[J]. Gene, 2014, 538(2):217-227. DOI:10.1016/j.gene.2013.12.019.
- [6] Saengkrit N, Sanitrum P, Woramongkolchai N, et al. The PEI-introduced CS shell/PMMA core nanoparticle for silencing the expression of E6/E7 oncogenes in human cervical cells[J]. Carbohydr Polym, 2012, 90(3):1323-1329. DOI:10.1016/j.carbpol.2012.06.079.
- [7] Yamashita T, Sonoda S, Suzuki R, et al. A novel bubble liposome and ultrasound-mediated gene transfer to ocular surface: RC-1 cells *in vitro* and conjunctiva *in vivo*[J]. Exp Eye Res, 2007, 85(6):741-748. DOI:10.1016/j.exer.2007.08.006.
- [8] Jiang M, Gan L, Zhu C, et al. Cationic core-shell liponanoparticles for ocular gene delivery[J]. Biomaterials, 2012, 33(30):7621-7630. DOI:10.1016/j.biomaterials.2012.06.079.
- [9] Davis BM, Normando EM, Guo L, et al. Topical delivery of Avastin to the posterior segment of the eye *in vivo* using annexin A5-associated liposomes[J]. Small, 2014, 10(8):1575-1584. DOI:10.1002/sml.201303433.
- [10] Koirala A, Conley SM, Naash MI. A review of therapeutic prospects of non-viral gene therapy in the retinal pigment epithelium[J]. Biomaterials, 2013, 34(29):7158-7167. DOI:10.1016/j.biomaterials.2013.06.002.
- [11] Jiang Z, Chen CH, Chen YY, et al. Autophagic effect of programmed cell death 5 (PDCD5) after focal cerebral ischemic reperfusion injury in rats[J]. Neurosci Lett, 2014, 566:298-303. DOI:10.1016/j.neulet.2014.02.066.
- [12] He F, Yao H, Xiao Z, et al. Inhibition of IL-2 inducible T-cell kinase alleviates T-cell activation and murine myocardial inflammation associated with CVB3 infection[J]. Mol Immunol, 2014, 59(1):30-38. DOI:10.1016/j.molimm.2013.12.004.
- [13] Zhang Y, Zhang L, Wu J, et al. Heme oxygenase-1 exerts a protective role in ovalbumin-induced neutrophilic airway inflammation by inhibiting Th17 cell-mediated immune response[J]. J Biol Chem, 2013, 288(48):34612-34626. DOI:10.1074/jbc.M113.494369.
- [14] Price MO, Thompson RW, Price FW. Risk factors for various causes of failure in initial corneal grafts[J]. Arch Ophthalmol, 2003, 121(8):1087-1092. DOI:10.1001/archophth.121.8.1087.
- [15] Coster DJ, Williams KA. The impact of corneal allograft rejection on the long-term outcome of corneal transplantation[J]. Am J Ophthalmol, 2005, 140(6):1112-1122. DOI:10.1016/j.ajo.2005.07.024.
- [16] Jia Z, Jiao C, Zhao S, et al. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells in a rat corneal allograft rejection model[J]. Exp Eye Res, 2012, 102:44-49. DOI:10.1016/j.exer.2012.06.008.
- [17] 何维,高晓明,曹雪涛,等. 医学免疫学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2005:250-256.
- [18] Yuan J, Zhai JJ, Huang X, et al. Ocular safety and pharmacokinetics study of FK506 suspension eye drops after corneal transplantation[J]. J Ocul Pharmacol Ther, 2012, 28(2):153-158. DOI:10.1089/jop.2011.0108.
- [19] 袁伟,陆晓和,宫玉波,等. 重组腺病毒 Ad-EGFP 转染大鼠角膜的实验研究[J]. 眼科新进展, 2011, 31(4):324-326, 331.  
Yuan W, Lu XH, Gong YB, et al. Experimental studies of recombination adenovirus Ad-EGEP transfecting rat corneas[J]. Rec Adv Ophthalmol, 2011, 31(4):324-326, 331.

(收稿日期:2016-04-01)

(本文编辑:尹卫靖 刘艳)

## 广告目次

拓普康 OCT 系列 北京拓普康医疗器械有限公司……封二

同息通(曲安奈德注射液) 广东省医药进出口公司珠海公司……前插页

普诺明(高次非球面人工晶状体) 爱博诺德(北京)医疗科技有限公司……前插页

海露(0.1% 玻璃酸钠滴眼液) 深圳市瑞霖医药有限公司……前插页

沃丽汀(卵磷脂络合碘片) 武汉市威康药品有限责任公司……前插页

纯视(治疗用绷带镜) 山东博士伦福瑞达制药有限公司……前插页

见康(拉坦前列素滴眼液) 华润紫竹药业有限公司……前插页

施图伦(七叶洋地黄双苷滴眼液) 深圳市康哲药业有限公司……前插页

氟美童(氟米龙滴眼液) 参天制药(中国)有限公司……封三

迈达科技 天津迈达科技股份有限公司……封底