

PPENK-MIDGE-NLS 基因载体的构建及其在活体大鼠的表达

陈曦, 徐学敏, 彭细娟, 蒋玮, 姚立农

第四军医大学唐都医院麻醉科, 陕西 西安 710038

陈曦, 徐学敏, 彭细娟, 等. *PPENK-MIDGE-NLS* 基因载体的构建及其在活体大鼠的表达. 生物工程学报, 2015, 31(2): 258–268

Chen X, Xu XM, Pu XJ. Construction of *PPENK-MIDGE-NLS* gene vector and the expression in rat. Chin J Biotech, 2015, 31(2): 258–268.

摘要: 增加体内免疫细胞合成分泌内源性阿片肽, 可对心肌缺血再灌注损伤产生保护作用。基因治疗是增加内源性脑啡肽 (Enkephalin, ENK) 的一种有前景的研究方向, 但是以往的病毒、质粒等载体受到其自身免疫原性的限制并存在基因重组、原癌基因激活、抗细菌蛋白抗体产生以及基因表达改变等诸多问题。本研究采用非病毒、非质粒的微量免疫原定义的基因表达 (Minimalistic immunological defined gene expression, MIDGE) 方法构建前脑啡肽原 (Preproenkephalin, PPENK) *PPENK-MIDGE-NLS* 基因载体能克服病毒和质粒载体的上述缺点。用 PCR 技术扩增大鼠前脑啡肽原 (Preproenkephalin, PPENK) 外显基因, 产物插入 pEGFP-N1 质粒, 双酶切质粒获得包含启动子、目的基因、RNA 稳定序列的线性载体, 两端以不受外切酶作用的发夹样脱氧寡核苷酸序列 (Oligodesoxynucleotides, ODNs) 封闭。为保证载体的入核和表达效率, 载体的一端连接了核定位序列 (Nuclear localization sequence, NLS)。流式细胞术和激光共聚焦检测其转染效率, Western blotting 检测组织内前脑啡肽蛋白的表达。结果显示, *PPENK-MIDGE-NLS* 能够转染大鼠活体细胞并表达前脑啡肽蛋白, 增加载体的量能够在一定范围内提高转染效率。研究结果表明该载体可能成为预防和治疗心肌缺血再灌注损伤的新方法。

关键词: 心肌缺血再灌注损伤, 脑啡肽, 基因载体, 白细胞

Received: May 29, 2014; **Accepted:** August 27, 2014

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 81270264).

Corresponding author: Linong Yao. Tel/Fax: +86-29-84717327; E-mail: yaolin@fmmu.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 81270264) 资助。

Construction of *PPENK-MIDGE-NLS* gene vector and the expression in rat

Xi Chen, Xuemin Xu, Xijuan Peng, Wei Jiang, and Linong Yao

Department of Anesthesiology, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi, China

Abstract: Increasing the production and secretion of endogenous opioid peptide by immune cell can significantly induce myocardial protective effects against ischemia-reperfusion injury. Gene therapy is promising to increase endogenous enkephalin (ENK). However, classical viral and plasmid vectors for gene delivery are hampered by immunogenicity, gene recombination, oncogene activation, the production of antibacterial antibody and changes in physiological gene expression. Minimalistic immunologically defined gene expression (MIDGE) can overcome all the deficiencies of viral and plasmid vectors. The exon of rat's preproenkephalin (PPENK) gene was amplified by PCR and the fragments were cloned into pEGFP-N1 plasmids. The recombinant plasmids were digested with enzymes to obtain a linear vector contained promoter, preproenkephalin gene, RNA stable sequences and oligodesoxy nucleotides (ODNs) added to both ends of the gene vector to protect gene vector from exonuclease degradation. A nuclear localization sequence (NLS) was attached to an ODN to ensure the effective transport to the nucleus and transgene expression. Flow cytometry, laser confocal microscopy and Western blotting demonstrated that PPENK-MIDGE-NLS can transfect leukocyte of rat *in vivo*, increase the expression of proenkephalin (PENK) in tissue, and the transfection efficiency depends on gene vector's dosage. These results indicate that PPENK-MIDGE-NLS could be an innovative method to protect and treatment of myocardial ischemia-reperfusion injury.

Keywords: ischemia-reperfusion injury, enkephalin, gene vector, leukocyte

心肌缺血再灌注损伤是临床常见的棘手难题。缺血预处理 (Ischemic preconditioning, IPC) 和缺血后处理 (Ischemic postconditioning, IPTC) 均是心肌缺血再灌注损伤最有效的内源性保护机制^[1-3]。但是, 不论 IPC 还是 IPTC, 在临床应用中都受到伦理和方法的制约, 而且有增加心肌损害的可能。大量研究证实阿片受体 (Opioid receptor, OR) 参与介导了 IPC 和 IPTC 效应, 而且外源性阿片类药物能完全模拟 IPC 和 IPTC 的心肌保护作用, 减轻心肌坏死程度、减少心律失常、改善再灌注期心肌功能^[4-7]。但是, 产生 IPC 效应的阿片类药物剂量明显大于临床常规用量^[8], 中枢神经系统和呼吸系统的诸多副作用随即难以避免, 该临床难题严重困扰了阿片类药物

心肌保护作用的临床转化, 所以有必要探索一种能在体内持续产生阿片类物质而且靶向释放于心肌缺血局部的方法, 以充分利用 IPC 和 IPTC 效应减轻心肌缺血再灌注损伤, 发挥其心肌保护作用。基因转染则有可能成为增加内源性阿片类物质的有效方法。

心肌缺血再灌注损伤的局部重要特征之一是粒细胞活化、心肌浸润及脱颗粒, 而粒细胞系是体内除神经系统外最大的内源性阿片肽 (Endogenous opioid peptide, EOP) 来源^[9], 此外, 各种免疫细胞如单核细胞、淋巴细胞、粒细胞和肥大细胞等都可合成分泌脑啡肽 (Enkephalin, ENK), 内源性 EOP 无任何中枢神经系统的副作用^[10]。因此免疫细胞是携带内源性阿片肽而且能

靶向聚集到缺血区域的存储库和天然载体。

为促进免疫细胞持续、大量产生内源性脑啡肽，基因重组是最有力的手段。最常用的基因载体是重组病毒载体，但病毒载体具有免疫原性，而且存在与野生型病毒重组的可能性，致癌基因的激活、相对小的 DNA 容量也是明显不足。非病毒载体不会整合入宿主细胞内，安全性优于病毒载体，同时它不具有传染性，载体容量大。但是存在抗细菌蛋白抗体的产生、抗生素耐药性标志物引起基因表达改变、对 CpG 二核苷酸的免疫反应等具体问题。

非病毒、非质粒的微量免疫原定义的基因表达 (Minimalistic immunologically defined gene expression, MIDGE) 可克服上述两种基因载体的缺点^[11]。MIDGE 载体是包含启动子、目的基因和 RNA 稳定序列的线性分子，两侧是短发夹结构的寡核苷酸序列。MIDGE 载体比质粒的明显优势是体积小、缺乏抗菌素耐药基因和相对低的 CpG 序列。为确保载体基因有效转染到细胞核，本研究在 MIDGE 上附加了一个核定位序列 (Nuclear localization sequence, NLS)^[12]。

本课题设想利用 pPENK-MIDGE-NLS 基因载体转染白细胞，增加心肌缺血局部脑啡肽及其活性产物的含量，探讨转染白细胞合成的内源性脑啡肽的心肌保护作用，是心肌缺血再灌注损伤研究领域的有力突破，将有力促进阿片肽心肌保护作用实验研究成果的临床转化。

1 材料与方法

1.1 材料

pEGFP-N1 质粒由第四军医大学生化实验室提供。SD 大鼠由第四军医大学实验动物中心

提供。寡核苷酸序列 ODNs，目的基因前脑啡肽基因，PCR 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成，二价交联剂 Sulf-MBS 购自上海生工生物工程技术有限公司。限制性内切酶 *Ase* I、*Afl* II，外切酶 *Exo* III 购自 New England Biolabs 公司。T4 DNA 连接酶、核酸分子量标准 (20 bp Ladder, DL10 000 marker)、PCR 产物清洁试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒均购自 TaKaRa 公司。蛋白分子量标准 (6 500–66 000Da)， β -actin，抗 PENK 抗体购自 Sigma 公司。质粒中提试剂盒购自 QIAGEN 公司。琼脂糖粉为 Biowest agarose。Western 及 IP 细胞裂解液、蛋白酶抑制剂 PMSF (Phenylmethanesulfonyl fluoride)、二抗购自碧云天生物技术研究，藻红蛋白 (PE)-cy5-标记的小鼠抗大鼠 CD45、小鼠抗大鼠 CD3-PE、PE-标记的小鼠抗大鼠 RP-1、二抗大鼠抗小鼠 IgG2a+b PE 购自 BD Biosciences，荧光素异硫氰酸盐标记的小鼠抗大鼠 CD68 购自 abd serotec，3E7 购自 Gramsch Laboratories。动物组织、外周血白细胞分离液试剂盒购自灏洋生物制品科技有限责任公司，其余试剂均为国产分析纯以上。

1.2 载体两端发夹样保护结构 ODNs 的合成

已知组成 tRNA 中存在着一些能局部互补配对的区域，这些局部双链呈茎状，中间不能配对的部分则膨出形成环或袢状结构，称为发夹结构。模拟真核生物细胞内 tRNA 相对稳定的发夹结构，构建载体两端稳定的 ODN 序列，分别在其两端加上与目的基因表达框两端的酶切位点相对应的酶切位点，能够封闭目的基因表达框两端的线性缺口，从而有效地防止体内核酸外切酶的降解，增强基因载体在体内的稳定性^[13]。ODN1

序列为: TAGCGCTCAGTTGGGAGAGCGCTAAT, ODN2 序列为: TTAAGGCGCTCAGTTGGGAGAGCGCC。单链寡核苷酸序列通过退火形成二维发夹样结构 (图 1)。

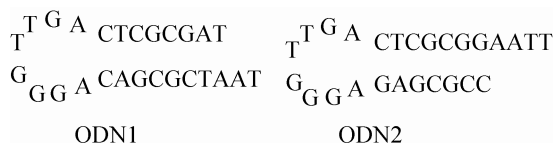


图 1 ODNs 序列二维结构

Fig. 1 Protective structure of ODNs.

1.3 核定位序列的连接

核定位序列 NLS (PKKKRKVEDYPC) 为一短的氨基酸序列, 能与入核载体相互作用, 保证了入核的效率和外源基因的表达。为了将其连接在载体上, 需先以二价交联剂 Sulf-MBS 将其与保护结构 ODN1 连接, 再将连接产物与目的基因表达框连接。二价交联剂通过与 ODN 上的氨基形成酰胺键, 同时和 NLS 的硫形成硫醚键, 从而实现了 ODN1 与 NLS 的连接, 因此, 需对 ODN1 的第十二位 T 进行氨基修饰。

1.4 目的基因表达框的获得

限制性内切酶 *Ase* I 和 *Afl* II 双酶切 pEGFP-N1 质粒, 1%琼脂糖凝胶电泳, 胶回收约 1.6 kb 左右的片段, 即为含启动子、EGFP 基因、RNA 稳定序列的基因表达框。双酶切重组质粒 pEGFP-N1-PPENK, 1%琼脂糖凝胶电泳, 胶回收约 2.4 kb 左右的片段, 即为含启动子、EGFP-PPENK 基因、RNA 稳定序列的基因表达框。

1.5 *PPENK-MIDGE-NLS* 基因载体的构建

加入目的基因表达框及 3 倍摩尔质量的 ODNs 保护序列, 在 T4 DNA 连接酶的作用下

16 °C 过夜反应, 进行连接。用 *Exo* III 外切酶处理消化未连接片段。PCR 产物清洁试剂盒纯化 MIDGE-NLS 载体。

为保证载体携带 *PPENK* 基因, 利用 PCR 扩增 *PPENK* 基因。PCR 产物用 *Eco* 31 I 酶切, *Kpn* I 和 *Sac* I 消化后结扎、克隆入 pEGFP-N1 质粒。重复以上步骤, 以获得多拷贝 *PPENK-MIDGE-NLS* 基因载体。*PPENK-MIDGE-NLS* 基因载体的结构示意图如图 2 所示。

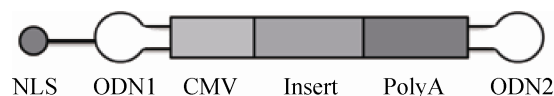


图 2 *PPENK-MIDGE-NLS* 基因载体结构示意图

Fig. 2 A schematic drawing of the structure of *PPENK-MIDGE-NLS*.

1.6 *PPENK-MIDGE-NLS* 基因载体转染效果的检测

1.6.1 载体局部注射时对免疫细胞的转染效率

12 只 SD 大鼠, 随机分为两组, 每组 6 只。在每只大鼠右后足底部注射 100 μL 完全弗氏佐剂诱导局部炎症, 4 d 后实验组大鼠注射 50 μg *PPENK-MIDGE-NLS* 基因载体, 对照组注射 50 μL 0.9%生理盐水。24 h 后用过量戊巴比妥钠处死大鼠, 两组大鼠各取 3 只右后足底部皮肤及皮下组织做冰冻切片, DAPI 染色后在荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白有无表达。

实验组和对照组另外 3 只大鼠分别取右后足炎性组织做细胞悬液^[14], 藻红蛋白 (PE) -cy5-标记的小鼠抗大鼠 CD45 标记所有血细胞, 小鼠抗大鼠 CD3-PE 标记 T 细胞。按标准制备细胞进行胞内染色^[15]。PE-标记的小鼠抗大鼠 RP-1 孵育,

荧光素异硫氰酸盐标记的小鼠抗大鼠 CD68 (识别单核/巨噬细胞) 或 3E7 (单克隆抗体识别阿片肽固有序列 Tyr-Gly-Gly-Phe)。二抗为大鼠抗小鼠 IgG2a+b PE 抗体。同种非免疫血清对照。流式细胞术检测每种白细胞表达绿色荧光的百分比。

Western blotting 检测 PENK 蛋白表达: 分别采集正常大鼠、对照组大鼠、实验组大鼠和炎症部位注射 PENK 抗体的实验组大鼠的炎症及相应部位的皮肤及皮下组织, DPBS 中切碎、匀浆、离心, -80°C 保存。测定时取样 $50\ \mu\text{g}$, 变性 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 半干法将蛋白转移至硝酸纤维素膜, 电泳后 4°C 封闭过夜。加入 1:1 000 抗-PENK 多克隆抗体, 杂交。封闭液漂洗后加入 1:2 000 二抗。漂洗后加显色剂氯化硝基四氮唑蓝 (NBT)。图像扫描仪扫描显影条带。

1.6.2 载体静脉注射时对白细胞的转染及心肌浸润

12 只 SD 大鼠随机分为 4 组, 每组 3 只。其中 3 组实验组均给予尾静脉注射 $100\ \mu\text{g}$ ($500\ \text{ng}/\mu\text{L}$) *PPENK-MIDGE-NLS* 基因载体, 对照组尾静脉注射 2 mL 0.9% 生理盐水。注射 *PPENK-MIDGE-NLS* 后 24、48、72 h 采集血液标本, 制备细胞悬液。按上述方法标记细胞, 流式细胞术检测 *PPENK-MIDGE-NLS* 对各种细胞的转染效果。

另将 15 只 SD 大鼠随机分为 5 组, 每组 3 只。4 个实验组分别给予静脉注射 *PPENK-MIDGE-NLS* 基因载体 50、100、200、400 μg , 注射容积 2 mL, 对照组注射 2 mL 0.9% 生理盐水。24 h 后采集血液标本, 制备细胞悬液, 按照上述方法进行标记, 流式细胞术检测载体注射剂

量与转染效果的关系。

将 6 只 SD 大鼠随机分为两组, 实验组大鼠静脉注射基因载体 $200\ \mu\text{g}$ ($1\ 000\ \text{ng}/\mu\text{L}$), 对照组注射 2 mL 0.9% 生理盐水, 24 h 后用 1% 戊巴比妥钠麻醉 ($40\ \text{mg}/\text{kg}$), 用 4% 多聚甲醛灌注, 取心肌组织在多聚甲醛中固定 4 h, 30% 蔗糖溶液脱水。做冰冻切片 ($10\ \mu\text{m}$) 后用 PE-cy5-标记的小鼠抗大鼠 CD45 标记白细胞, DAPI 染色细胞核, 在激光共聚焦下观察白细胞在心肌的浸润及脑啡肽的表达。

2 结果与分析

2.1 *PPENK-MIDGE-NLS* 基因载体

本实验成功构建了 *PPENK-MIDGE-NLS* 基因载体, 图 3 为载体琼脂糖凝胶电泳结果, 其中泳道 1 为 DL10 000 DNA marker, 泳道 2 为

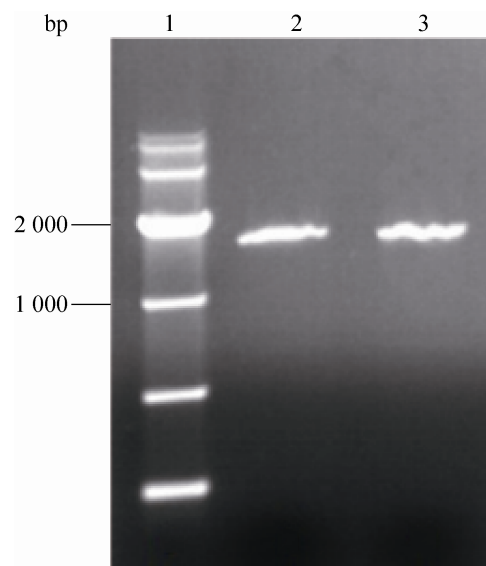


图 3 *MIDGE-NLS* 基因载体电泳检测

Fig. 3 The determination of *MIDGE-NLS* by gel electrophoresis. 1: DL10 000 DNA marker; 2: *MIDGE-NLS* gene vector; 3: gene cassettes without ODNs.

MIDGE-NLS 基因载体, 泳道 3 为连接 ODNs 之前目的基因表达框。MIDGE 的分子量约为 1 600 bp, 连接 NLS 后在琼脂糖中的电泳速度会变慢, 因此 MIDGE-NLS 的电泳结果显示的分子量大于 1 600 bp, 构建成功的载体与 *PPENK* 基因表达框相差大概 50 bp。

2.2 局部注射 *PPENK-MIDGE-NLS* 基因载体的转染效果

为了探讨局部注射 *PPENK-MIDGE-NLS* 基因载体能否转染活体细胞, 我们通过诱导局部炎症增加炎症局部的白细胞的数量, 炎症部位注射基因载体 24 h 后, 激光共聚焦显微镜下我们观察到的结果如图 4 所示, 图 4C 为观察到的绿色荧光蛋白表达 (绿色信号所示) 的图像, 图 4B 为 DAPI 染色进行的细胞核定位, 4A 为后两图的融合图像。而注射生理盐水组大鼠未观察到绿色荧光蛋白的表达 (图 4F), 证实了载体对活体细胞的成功转染和表达。图片右下角的比例尺大小为 50 μm 。

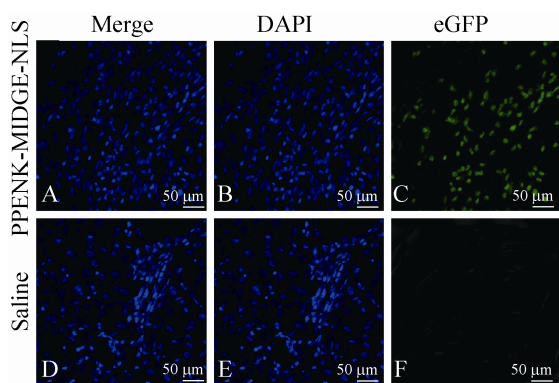


图 4 载体在炎症组织的表达

Fig. 4 Expression of gene vector in inflammatory tissue. (A) Fusion image of B and C. (B) Cell nucleus. (C) Green fluorescent protein. (D) Fusion image of E and F. (E) Cell nucleus. (F) Green fluorescent protein wasn't expressed in skin and subcutaneous tissues. A, B, C are images of experimental group; D, E, F are images of control group.

流式细胞术证实了炎症局部单核/巨噬细胞、T 细胞、粒细胞的聚集, 由各种白细胞中绿色荧光蛋白表达的细胞所占的比例可知其转染效率。由表 1 可知载体对各种白细胞均有转染, 其中对粒细胞的转染率最高, 而 T 细胞只有少量被转染。对照组阿片肽阳性细胞 3 组平均值为 2.57%, 说明白细胞本身就有一定量的阿片肽表达, 由实验组和对照组的阿片肽阳性细胞的转染率的对比可知, *PPENK-MIDGE-NLS* 基因载体增加了局部阿片肽的表达。

图 5 为 Western blotting 检测 PENK 蛋白表达的结果, 图中 0、1、2、3 分别为正常皮肤组织、对照组炎症组织、实验组炎症组织、注射载体前先注射抗 PENK 抗体的实验组炎症组织中的 PENK 蛋白表达量。由图 5 可清楚地看出注射基

表 1 载体对白细胞的转染率

Table 1 The ration of eGFP expression in leukocytes transfected by gene vector

	1	2	3	Average
Granulocytes (%)	20.75	47.58	32.67	33.67
T cells (%)	0.92	2.75	1.83	1.83
Monocytes/ macrophages (%)	28.82	24.32	20.03	24.39
Opioid cells (%)	19.15	36.13	23.3	26.19

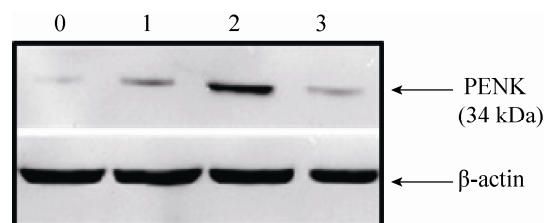


图 5 皮肤及皮下组织中 PENK 蛋白表达的检测

Fig. 5 The determination of protein PENK in the skin and subcutaneous tissue.

因载体后 (2) 组织中 PENK 蛋白的表达量明显大于正常组织 (0) 和对照组 (1)。

2.3 静脉注射 *PPENK-MIDGE-NLS* 基因载体对白细胞的转染效果及心肌浸润

本研究的最终目的是要探讨 *PPENK-MIDGE-NLS* 基因载体是否能通过转染白细胞从而在心肌靶向产生脑啡肽, 因此, 静脉注射载体后能否成功转染白细胞并且在心肌组织浸润非常关键。静脉注射基因载体 200 μg 后 24 h, 心肌组织的冰冻切片中发现了转染成功的白细胞。图 6 为心肌组织冰冻切片在激光共聚焦下拍摄的图像。图 6D 为心肌组织中绿色荧光蛋白表达的图像, 图 6C 为心肌组织中的白细胞, 图 6B 显示细胞核 DAPI 染色, 图 6A 为 B、C、D 的融合图像。证明转染成功的白细胞在心肌组织的存在。而对照组大鼠的心肌组织切片中的白细胞未见绿色荧光蛋白的表达。图中右下角比例尺为 10 μm 。

表 2 为由流式细胞术得到的 *PPENK-MIDGE-NLS* 基因载体对各种白细胞转染的百分率的检测结果的平均值, 由图 7 可直观看出注射载体 24 h 后粒细胞、单核/巨噬细胞中绿色荧光蛋白和阿片肽的表达率随时间的延长而降低, 而 T 细胞对绿色荧光蛋白的表达却升高。但是, 粒细胞和单核/巨噬细胞仍为基因载体转染的主要细胞。表 3 为不同剂量载体注射后 24 h 转染细胞的百分比数据表, 以其平均值作图即为图 8, 可知在载体的注射量为 50–200 μg 时, 载体的转染率随注射量的增加而提高, 当载体注射量为 400 μg 时, 转染率不再随剂量的增加而提高。

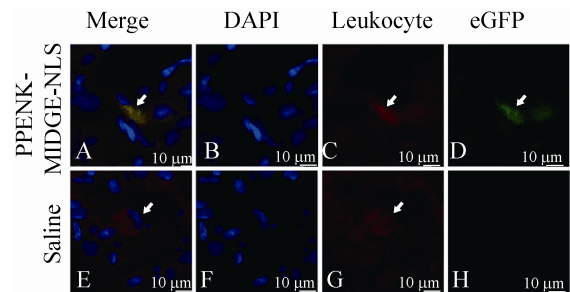


图 6 载体在心肌组织中的表达

Fig. 6 Expression of gene vector in Myocardium. (A) Fusion image of B, C and D. (B) Cell nucleus. (C) Leukocyte. (D) Green fluorescent protein. (E) Fusion image of F, G and H. (F) Cell nucleus. (G) Leukocyte. (H) Green fluorescent protein wasn't expressed in Myocardium. A, B, C, D are images of experimental group; E, F, G, H are images of control group.

表 2 载体对白细胞转染率随时间的变化

Table 2 Time history of gene vector's transfection rate

Time (h)	Granulocytes (%)	T cells (%)	Monocytes/macrophages (%)	Opioid cells (%)
24	25.41	0.12	19.14	20.13
36	17.56	1.69	11.22	15.78
72	5.49	3.96	4.32	5.01

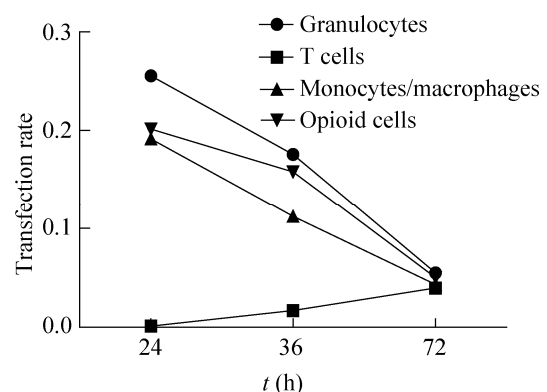


图 7 载体对白细胞转染效率的观察

Fig. 7 Transfection efficiency of gene vector in leukocytes.

表 3 载体对白细胞转染率的量效关系

Table 3 Dose-effect relationship of gene vector

Dose (μg)	Granulocytes (%)	T cells (%)	Monocytes/macrophages (%)	Opioid cells (%)
50	8.25	0.09	6.59	7.12
100	15.26	0.10	12.33	14.79
200	22.49	0.24	19.89	20.17
400	23.11	0.30	18.99	20.21

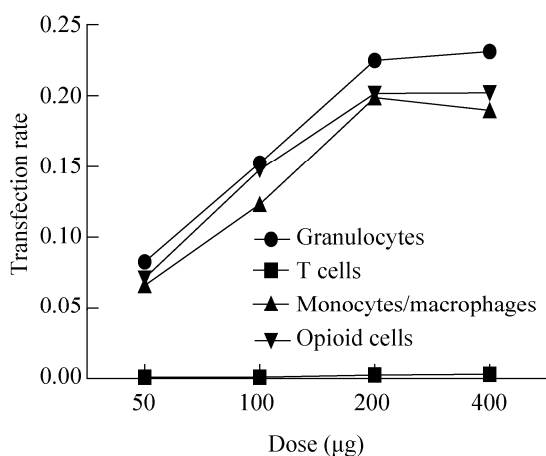


图 8 载体对白细胞转染的量效关系

Fig. 8 Dose-effect relationship of gene vector.

3 讨论

脑啡肽、强啡肽、孤啡肽对缺血性心肌和脑损伤的保护作用已得到充分证实^[16-19], 为促使免疫细胞持续、大量产生内源性脑啡肽, 基因重组是最有力的手段。最常用的基因载体是重组病毒载体, 病毒载体具有较高的转染效率, 但病毒载体具有免疫原性, 而且存在与野生型病毒重组的可能性, 致癌基因的激活、相对小的 DNA 容量也是明显不足。质粒编码的 *PPENK* 也已用于动物的疼痛治疗, 它虽然克服了载体基因容量的限制, 但是质粒载体存在抗细菌蛋白抗体的产生、

抗生素耐药性标志物引起基因表达改变、对 CpG 二核苷酸的免疫反应等具体问题。而这些问题的存在都阻碍了病毒与质粒载体的临床应用。因此, 构建一种安全可靠、转染效率高的基因载体是基因治疗技术的关键。

非病毒、非质粒的微量免疫原定义的基因表达 (Minimalistic immunologically defined gene expression, MIDGE) 可克服上述两种基因载体的缺点^[20]。MIDGE 载体是包含启动子、目的基因和 RNA 稳定序列的线性分子, 其安全性优于病毒载体, 比质粒的明显优势是体积小、缺乏抗菌素耐药基因和相对低的 CpG 序列。由于载体为两端封闭的哑铃状线性载体, 分子量较小, 因此易穿过细胞核膜进入细胞核内表达, 提高了表达效率, 而核定位序列 NLS 的连接更是确保了载体转染到细胞核^[21]。封闭载体两端的 ODNs 是模拟真核细胞内 tRNA 稳定 C 环结构合成, 封闭了线性核酸的开放性末端, 使其具有抗真核细胞内核酸外切酶的作用, 增加了基因载体的稳定性。因此, *PPENK-MIDGE-NLS* 基因载体为基因治疗运用于临床提供了更多的可能性。

由图 4 可知 *PPENK-MIDGE-NLS* 基因载体局部注射时能够成功地转染活体细胞并表达目的基因。图 5 的 Western blotting 结果也证明该基因载体能够增加局部 *PENK* 蛋白的表达量。图 4A 为绿色荧光蛋白表达图像与细胞核染色的融合图像, 证明载体注射 24 h 后进入细胞核内表达目的基因。载体转染的细胞类型主要为粒细胞和单核/巨噬细胞 (表 1)。图 6 证明载体静脉注射可以转染白细胞, 并存在心肌组织中。但是与图 4 相比较, 绿色荧光蛋白在 24 h 时不表达于细胞核内, 而是存在胞质中, 由此我们可以推测, 静脉

注射 *PPENK-MIDGE-NLS* 基因载体后在 24 h 之内成功转染白细胞, 进入细胞核, 表达目的基因。载体注射 24 h 时, 绿色荧光蛋白已经分泌入胞质。

流式细胞术的结果证明, 静脉注射 *PPENK-MIDGE-NLS* 基因载体对各种类型的白细胞均有转染, 但是粒细胞和单核/巨噬细胞为主要靶细胞 (表 2)。图 7 为载体对各种白细胞转染时限的变化趋势, 我们可以看出随着时间的延长 (24–72 h), 粒细胞、单核/巨噬细胞转染比例及阿片肽阳性细胞所占比例逐渐下降, 而 T 细胞转染比例却呈现出轻微的上升趋势, 但是基因载体对 T 细胞的转染作用很微弱。心肌缺血再灌注损伤时损伤部位浸润的白细胞主要为粒细胞, 而 *PPENK-MIDGE-NLS* 基因载体增加粒细胞脑啡肽释放的时限约为 3 d, 相较于病毒和质粒载体长达 2 周以上的表达时间来说是比较短暂的^[22]。但是, 使用外源性阿片类药物时, 作用仅仅维持 5–10 min^[23], 由此来看, *PPENK-MIDGE-NLS* 基因载体的作用时间长于外源性阿片类物质, 并且能避免其呼吸系统和中枢神经系统副作用, 有临床应用价值。

表 3 为载体注射 24 h 时不同剂量下各种白细胞的转染比例。图 8 清楚地表明, 在载体剂量小于 200 μg 时, 载体对各种白细胞的转染效率均随剂量的增加而提高, 而当剂量大于 200 μg 时, 增加载体的剂量却不能再相应地提高转染效率。这或许跟载体入核时是通过 NLS 与核孔的相互作用而实现有关^[24]。当载体剂量达到一定数值以后, 核孔与 NLS 的作用处于饱和状态, 从而限制了载体进入细胞核的量进一步增加。

载体用绿色荧光蛋白基因标记, 转染成功后能够表达绿色荧光蛋白, 能够通过荧光显微镜、

激光共聚焦以及流式细胞术快速的检测转染结果, 使结果的检测简便、快捷, 同时具备较高的重复性。

在进行载体静脉注射时, 我们发现注射的药物体积直接影响大鼠的生存率, 而当采用 2 mL 的注射体积并在 10 s 内注射完毕时, 生存率为 99.99%。已有研究证明水流动力学静脉注射非病毒载体能够增加小鼠各器官组织的载体表达, 但是会引起小鼠肝脏出血性坏死, 这是否是本研究中导致大鼠死亡的原因之一有待进一步探讨。本研究中我们并未做最佳注射体积和注射速度的相关探索, 不排除载体的注射体积和注射速度对其转染效率存在影响。

此外, 载体静脉注射时, 在心肌只发现了少量的转染成功的白细胞, 这是因为在正常心肌中只有少量的白细胞存在, 而当心肌发生缺血再灌注损伤时, 会有大量的白细胞向心肌损伤区游动、浸润, 从而也会有更多的转染成功的白细胞存在于损伤区靶向释放脑啡肽, 这也是我们构建 *PPENK-MIDGE-NLS* 基因载体的初衷。

基因治疗的安全性、效率问题使得开发出安全有效的基因载体成为基因治疗的关键。*PPENK-MIDGE-NLS* 基因载体携带外源性基因少, 安全性优于传统的病毒及非病毒载体。其分子量小, 易于入核, 从而提高了转染效率。它相对较低的 CpG 序列避免了免疫激活效应。通过对 ODNs 序列的修饰, 使载体具有靶向效应, 特定的转染白细胞, 增加其阿片肽的表达。利用心肌缺血再灌注损伤时白细胞向缺血区游动、浸润的特点, 在损伤区靶向释放内源性脑啡肽, 从而保护心肌组织。本研究为心肌缺血再灌注损伤的预防和治疗探索了新的方法, 同时, 在以后的研

究中我们可以探讨将MIDGE-NLS载体作为通用载体,通过插入不同的目的基因片段以及更改核定位序列实现对不同类型的细胞转染以期将其用于各种可能的临床治疗方向,是基因治疗一个有潜力的发展方向。

REFERENCES

- [1] Bousselmi R, Lebbi MA, Ferjani M. Myocardial ischemic conditioning: Physiological aspects and clinical applications in cardiac surgery. *J Saudi Heart Assoc*, 2014, 26(2): 93–100.
- [2] Yellon DM, Alkhalafi AM, Pugsley WB. Preconditioning the human myocardium. *Lancet*, 1993, 342(8866): 276–277.
- [3] Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, 285(2): H579–H588.
- [4] Garlid KD, Costa AD, Quinlan CL, et al. Cardioprotective signaling to mitochondria. *J Mol Cell Cardiol*, 2009, 46(6): 858–866.
- [5] Wong GT, Ling J, Irwin MG. Activation of central opioid receptors induces cardioprotection against ischemia-reperfusion injury. *Anesth Analg*, 2010, 1(1): 24–28.
- [6] Maslov LN, Lishmanov YB, Oeltgen PR, et al. Activation of peripheral delta2 opioid receptors increases cardiac tolerance to ischemia/reperfusion injury involvement of protein kinase C, NO-synthase, KATP channels and the autonomic nervous system. *Life Sci*, 2009, 84(19/20): 657–663.
- [7] Maslov LN, Lishmanov YB, Oeltgen PR, et al. Comparative analysis of the cardioprotective properties of opioid receptor agonists in a rat model of myocardial infarction. *Acad Emerg Med*, 2010, 17(11): 1239–1246.
- [8] Kato R, Foëx P. Myocardial protection by anesthetic agents against ischemia-reperfusion injury: an update for anesthesiologists. *Can J Anaesth*, 2002, 49(8): 777–791.
- [9] Machelska H. Targeting of opioid-producing leukocytes for pain control. *Neuropeptides*, 2007, 41(6): 355–363.
- [10] Labuz D, Schmidt Y, Schreiter A, et al. Immune cell-derived opioids protect against neuropathic pain in mice. *J Clin Invest*, 2009, 119(2): 278–286.
- [11] Machelska H, Schroff M, Oswald D, et al. Peripheral non-viral MIDGE vector-driven delivery of β -endorphin in inflammatory pain. *Mol Pain*, 2009, 5(6): 72–85.
- [12] López-Fuertes L, Pérez-Jiménez E, Vila-Coro AJ, et al. DNA vaccination with linear minimalistic (MIDGE) vectors confers protection against *Leishmania* major infection in mice. *Vaccine*, 2002, 21(3/4): 247–257.
- [13] Wang HS, Li XQ, He YW, et al. Construction and expression analysis of micro-linear vector as a new general gene therapy vector. *Chin J Biotech*, 2008, 24(8): 1333–1339 (in Chinese).
王红胜, 李小青, 何玉文, 等. 基因治疗微链载体的构建及表达分析. *生物工程学报*, 2008, 24(8): 1333–1339.
- [14] Rittner HL, Labuz D, Schaefer M, et al. Pain control by CXCR2 ligands through Ca^{2+} -regulated release of opioid peptides from polymorphonuclear cells. *FASEB J*, 2006, 20(14): 2627–2629.
- [15] Labuz D, Berger S, Mousa SA, et al. Peripheral antinociceptive effects of exogenous and immune cell-derived endomorphins in prolonged inflammatory pain. *J Neurosci*, 2006, 26(16): 4350–4358.
- [16] Sauriyal DS, Jaggi AS, Singh N. Extending pharmacological spectrum of opioids beyond analgesia: multifunctional aspects in different pathophysiological states. *Neuropeptides*, 2011, 45(3): 175–188.
- [17] Krepuska M, Sótónyi P, Csobay-Novák C, et al. Plasma nociceptin/orphanin FQ levels are lower in patients with chronic ischemic cardiovascular diseases—a pilot study. *Regul Pept*, 2011, 169(1/3): 1–5.

- [18] Romano MA, Seymour EM, Berry JA, et al. Relative contribution of endogenous opioids to myocardial ischemic tolerance. *J Surg Res*, 2004, 118(1): 32–37.
- [19] van den Brink OW, Delbridge LM, Rosenfeldt FL, et al. Endogenous cardiac opioids: enkephalins in adaptation and protection of the heart. *Heart Lung Circ*, 2003, 12(3): 178–187.
- [20] Zheng C, Juhls C, Oswald D, et al. Effect of different nuclear localization sequences on the immune responses induced by a MIDGE vector encoding bovine herpesvirus-1 glycoprotein D. *Vaccine*, 2006, 24 (21): 4625–4629.
- [21] Zheng C, Juhls C, Oswald D, et al. Effect of different nuclear localization sequences on the immune responses induced by a MIDGE vector encoding bovine herpesvirus-1 glycoprotein D. *Vaccine*, 2006, 24 (21): 4625–4629.
- [22] Hao S, Wolfe D, Glorioso JC, et al. Effects of transgene-mediated endomorphin-2 in inflammatory pain. *Eur J Pain*, 2009, 13(4): 380–386.
- [23] Labuz D, Berger S, Mousa SA, et al. Peripheral antinociceptive effects of exogenous and immune cell-derived endomorphins in prolonged inflammatory pain. *J Neurosci*, 2006, 26(16): 4350–4358.
- [24] Newmeyer DD, Forbes DJ. Nuclear import can be separated into distinct steps *in vitro*: nuclear pore binding and translocation. *Cell*, 1988, 52(5): 641–653.

(本文责编 陈宏宇)



《生物工程学报》入选“中国精品科技期刊”

2014年9月26日，中国科学技术信息研究所发布了《2014年版中国科技期刊引证报告（核心版）》，《生物工程学报》入选300种“第3届中国精品科技期刊”，为“中国精品科技期刊顶尖学术论文（F5000）”项目来源期刊。

《2014年中国科技期刊引证报告（核心版）》，涵盖了1989种中国科技核心期刊2013年的评价指标。通过对影响因子和总被引频次等指标进行综合评价，《生物工程学报》综合评分列生物工程类核心期刊第一名。

