

微球包裹 pcDNA3-GRF(1-32) 在小鼠肌肉组织的表达及对生长的影响

任晓慧 张永亮* 刘松财 戴建威

(中国人民解放军军需大学军事兽医系生化教研室, 长春 130062)

摘 要 以乳酸-乙醇酸共聚物为载体, 采用复乳-液中蒸发法制备载生长激素释放因子(Growth hormone releasing factor, GRF)真核表达质粒 pcDNA3-GRF(1-32)微球, 其中包封率达 69%, 平均粒径为 2.20 μ m, 载药量 80 μ g/mg, 收率 70%; 体内转染小鼠肌肉组织, 提取注射部位肌肉组织 DNA 和总 RNA, 经 PCR 和 RT-PCR, 发现注射 pcDNA3-GRF(1-32)微球组的 GRF 表达水平最高(UVIBAND Version 99 分析)释放的 GRF 表达质粒在小鼠肌肉内存在并表达的时间至少 30d。体重统计结果表明, 30d 后微球包裹质粒组累积增重与其它组相比差异极显著($P < 0.01$), 比裸质粒组、质粒和空白微球混合物组、生理盐水组分别高 12.87%、19.72%、58.58%。结论认为, 载 pcDNA3-GRF(1-32)微球具有缓释作用, 并可实现 GRF 基因体内局部基因转染、表达, 发挥其相应的生物学效应, 有望成为提高质粒在动物肌肉组织表达效率的新方法。

关键词 乳酸-乙醇酸共聚物, 微球, 生长激素释放因子

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)04-0615-04

生长激素释放因子(Growth hormone releasing factor, GRF)是生长激素的正调控因子, 在畜牧业和医学领域具有重要的应用价值。应用基因转染技术可以将 GRF 真核表达质粒导入动物体内表达, 具有促进生长的作用^[1-5], 但有些方法表达水平较低。寻求安全、高效的基因传递系统是提高 GRF 在体内表达水平和生物学作用的一个重要方面。利用生物可降解聚合物包裹质粒 DNA 制成微球(microspheres, MP)或毫微球(nanospheres, NP)后, 与裸 DNA 比较, 具有保持 DNA 结构的完整性, 能抵抗核酸酶的降解, 因此有可能成为基因传递的一种有效途径^[6]。

本研究中, 我们尝试利用 GRF 基因的真核表达质粒 pcDNA3-GRF(1-32), 以乳酸-乙醇酸共聚物(poly-lactic-co-glycolic acid, PLGA)为载体进行微球包裹, 并对载 GRF 基因微球在小鼠肌肉组织的表达及对生长的影响进行了探索。

1 材料与方 法

1.1 材 料

昆明种小鼠(雄性, 25 日龄, 18~20g)由解放军军需大学动物试验中心提供。真核表达质粒 pcDNA3-GRF(1-32)由本课题组构建。RNA 提取试剂购自 Promega 公司。RT-PCR、PCR 试剂购自 TaKaRa。PLGA 购于山东省医疗器械研究所(MW = 50 000 LA:GA = 85:15 $\eta = 0.46$)。其他试剂均为分析

纯, 购自长春市化玻站。

1.2 pcDNA3-GRF(1-32)的提取、定量、鉴定

常规 SDS 碱裂解法进行质粒的大量提取, 大量制备的质粒 DNA 在 GeneQuant 上进行定量; 将上述提取质粒在 1.5% 琼脂糖电泳上进行电泳鉴定; 对提取质粒用 EcoRI 和 BamHI 双酶切并以质粒为模板进行 PCR 扩增鉴定, 1.5% 琼脂糖电泳分析结果, 紫外灯下观察结果并拍照。

1.3 pcDNA3-GRF(1-32)微球的制备

采用改良的复乳-液中蒸发法制备 pcDNA3-GRF(1-32)微球。取质粒加入溶有 PLGA 的二氯甲烷溶液中, 超声分散, 加入 4% PVA, 再超声, 将此液倒入 0.4% 浓度 PVA 溶液中, 室温下磁力搅拌 18h, 12 000r/min 离心 10min(保留上清, 回收未包入的质粒, 备用), 沉淀微球, 用蒸馏水洗微球 3 次, 离心收集室温干燥, 即得 pcDNA3-GRF(1-32)微球 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.4 pcDNA3-GRF(1-32)微球载药量的测定

精密称取微球适量(约 2mg), 加入乙腈-水(9:1, V/V)溶解, 12 000r/min 离心 5min, 确定体积后, 用 GeneQuant 测定上清液质粒浓度。

载药量(μ g/mg) = 上清液质粒浓度(μ g/mL) \times 上清体积(mL) / 微球重量(mg)^[7]

质粒包封率 = (加入质粒总量 - 未包入质粒量) / 加入质粒总量 $\times 100\%$

收稿日期 2003-11-11, 修回日期 2004-02-20。

基金项目 国家自然科学基金资助(No.39500105、39700104)。

* 通讯作者。Tel: 86-431-6986151; E-mail: zhangyl@public.cc.jl.cn

产率(回收率)=微球重量(加入质粒重量+加入聚合物重量)×100%

1.5 空白微球与 pcDNA3-GRF(1-32)质粒混合物的制备

同上制备空白微球,与质粒按比例混合后,37℃、200 r/min 摇动孵育 8~10h[8]。

1.6 动物分组及注射

将小鼠调养 3d,待适应环境后开始实验,随机分为以下 4 组,每组 12 只:I 组:微球包裹质粒组,注射 pcDNA3-GRF(1-32)微球;II 组:质粒组,注射 pcDNA3-GRF(1-32)质粒;III 组:质粒+空微球,注射质粒和空微球混合物;IV 组:对照组,注射生理盐水。

1.7 称重

分别于注射时和注射后 5d、10d、15d、20d、25d、30d 空腹称重,记录结果。

1.8 RT-PCR 和 PCR 扩增

实验进行到 30d 时杀死每组的小鼠,取注射部位肌肉组织,用 Trizol 从组织中同时制备 DNA 和总 RNA。以提取的总 RNA 为模板,以 Oligo-T 为引物按常规法用 AMV 反转录酶进行反转录反应,分别以提取组织 DNA 和反转录产物为模板进行 PCR 扩增。所采用的引物为:P1:CGGGATCCATGCTGCTCTGGGTGTTTC;P2:CGGAATICTTACCCCTGCTGCCTGCTTAT。PCR 的扩增程序为 95℃ 预变性 2min,然后 95℃/30s、55℃/30s、72℃/60s,35 个循环,最后 72℃/10min。用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 结果,紫外灯下观察结果并拍照。

1.9 统计分析

利用生物学软件 UVIBAND Version 99 对 RT-PCR 和 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳图谱进行分析,所得数据用生物学统计软件 SPSS10.0 进行统计学分析。

2 结果

2.1 pcDNA3-GRF(1-32)质粒鉴定与定量

大量提取的质粒,进行 EcoRI 和 BamHI 双酶切,酶切产物进行 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳,见图 1;质粒为模板,P1、P2 为引物进行 PCR 扩增,扩增产物进行 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳,见图 2。从酶切及 PCR 产物电泳图中存在稍小于 250bp 特异的条带,其大小和质粒中所含的 GRF 的片段(194bp)相吻合,证明所提取的质粒为保存的 pcDNA3-GRF 质粒。

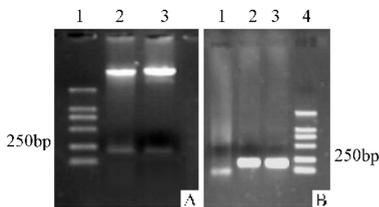


图 1 pcDNA3-GRF(1-32) 酶切及 PCR 鉴定
Fig.1 Identification of pcDNA3-GRF(1-32) with enzyme digestion and PCR

(A)Enzyme digestion. 1:marker DL2000;2~3:enzyme digestion.(B) PCR. 1:negative;2~3:PCR;4:marker DL2000

2.2 pcDNA3-GRF(1-32)微球

通过反复试验,我们制得的微球呈白色粉末,在荧光显微镜下观察微球分散、完整(图 2)。经过条件优化制备了收率、粒径大小和分布及含药量均满意的 pcDNA3-GRF(1-32)微球,其中包封率达 69%,载药量 80μg/mg,平均粒径为 2.20μm,收率 70%。

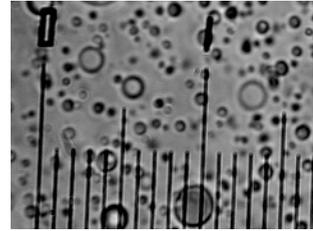


图 2 pcDNA3-GRF(1-32) PLGA 微球
(16×40×,1 刻度=2.4μm)

Fig.2 PLGA Microsphere carrying pcDNA3-GRF(1-32)
(16×40×,1mark=2.4μm)

2.3 注射后的累积增重结果

数据经生物统计软件 SPSS10.0 分析,Friedman Test 检验,结论:4 个组在实验期间即 0~30d 体重的累积增长都不相同,Chi-Square=11.769,P=0.008<0.01,实验 30d 时微球包裹质粒组累积增重比裸质粒组高 12.87%,比质粒和空白微球混合物高 19.72%,比对照组高 58.58%。将 4 组小鼠体重的累积增加数值对时间用 Excel 软件作图,如图 3 所示。

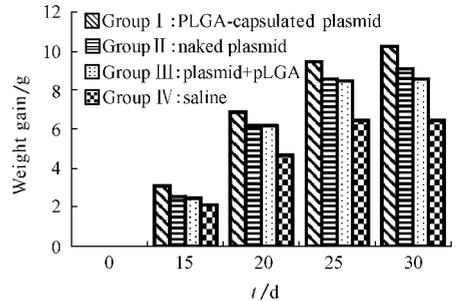


图 3 小鼠在 30d 内的体重累积增长

Fig.3 Accumulated body weight gain in 30d in mice

6 只注射微球包裹质粒(I 组)的小鼠肌肉 DNA 的 PCR 扩增片段(图 4,lane 16~21),大小在 250bp~100bp 之间,与 GRF 基因的大小(194bp)符合,而对照组(图 4,lane 1~2)没有特异条带出现。5 只注射裸质粒(II 组)和 5 只注射混合物的小鼠(III 组)肌肉 DNA 的 PCR 扩增片段(图 4,lane 6~15)只有两只出现阳性结果,但扩增条带很模糊。6 只注射微球包裹质粒(I 组)的小鼠肌肉的 RT-PCR 扩增片段(图 5,lane 19~24)除一只为阴性外其他均在大小在 250bp~100bp 之间出现特异条带,与 GRF 基因的大小(194bp)符合;5 只注射裸质粒(II 组)和 5 只注射混合物的小鼠(III 组)肌肉的 RT-PCR 扩增片段(图 5,lane 1~5 和 10~14)有两只未出现阳性结果,其他均有特异条带,但是亮度较 I 组弱很多。对照组(图 5,lane 7~9、16~17)没有特异条带出现。

谱进行分析,结果见图6。微球包裹质粒组 PCR 和 RT-PCR 产物明显高于其它组。

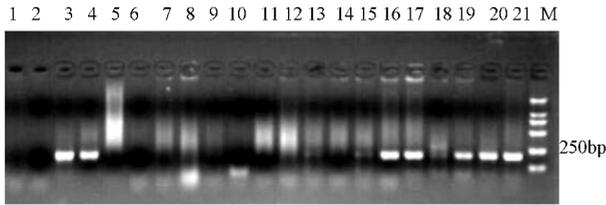


图4 第30d小鼠肌肉组织DNA的PCR扩增

Fig.4 PCR results of DNA from mice muscle in 30d after injection

1,2: PCR in group IV; 3,4: negative control; 5: positive control; 6~10: PCR in group II; 11~15: PCR in group III; 16~21: PCR in group I; 22: marker DL2000

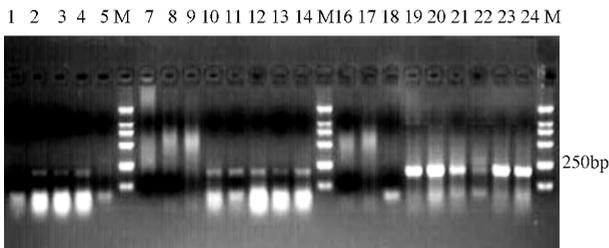


图5 第30d小鼠肌肉组织的RT-PCR扩增

Fig.5 RT-PCR results of DNA from mice muscle in 30d after injection

1~5: RT-PCR in group III; 7~9 and 16~17: RT-PCR in group IV; 10~14: PCR in group II; 18: negative control; 19~24: PCR in group I; M: marker DL2000

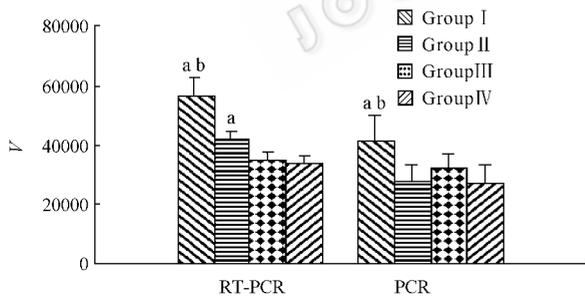


图6 用UVIBAND V99分析RT-PCR和PCR结果

Fig.6 Analysis of RT-PCR and PCR results with UVIBAND V 99 mean \pm SD. a: compared with saline group, $P < 0.01$; b: comparison between PLGA-capsulated plasmid group and naked plasmid group, $P < 0.01$

3 讨论

本实验采用改良的复乳-液中蒸发法制备 pcDNA3-GRF(1-32)微球时,在体外溶于有机油相,与DNA水溶液混合后,经超声,形成油包水乳液,将质粒DNA包被于聚合物分子中心。DNA通过渗透和扩散的方式释放出来。在磁力搅拌过程中利于药物在重结晶的过程中吸附表面活性剂。另外我

们发现外水相与油相比为1:1时微球易形成球形。

各种生物可降解聚合物以及人工合成高分子聚合物均能和相应的活性成分(药物或核酸)制成传递系统,活性成分释放的时间可控制于数小时至数月之间。本实验中使用的PLGA是一种已经由美国FDA批准应用于临床的生物可降解高分子聚合物,它在体内的最终代谢产物是 H_2O 和 CO_2 ,对生物体无毒性,生物相容性极佳,无免疫原性。

据报道,微球包裹的DNA生化性质不会改变^[9],这种微球转导系统也可提高DNA对核酸酶的耐受能力,延长在体内的有效释放时间^[10]。本实验在注射不同剂型后,各组小鼠增重的统计结果表明在25~30d注射微球包裹质粒小鼠的日增重分别较注射混合物的鼠、注射盐水的小鼠高6.4倍和15倍,较注射裸质粒组高52.83%;在注射后的第30天,通过RT-PCR检测,通过UVIBAND Version 99分析电泳区带,结果显示注射微球包裹质粒组的GRF表达水平最高。UNIBAND Version99分析尽管不能精确的反应GRF基因的表达水平,但由于PCR和RT-PCR的模板是由注射部位的所有肌肉提取,且其它条件完全一致,所以也能在一定程度上说明问题。这表明PLGA微球包裹质粒在30d时,仍有很好的作用,说明我们制备的载GRF基因微球可以实现体内肌肉的基因转染,比未包裹的DNA直接转染具有更好的效果。据报道PLGA微球包裹的质粒DNA可以免受组织液中各种酶的降解^[11]。随着PLGA的降解,质粒逐渐释放出来,并有机会进入肌细胞进行表达,使质粒具有了明显的缓释作用。资料表明^[12]PLGA包裹质粒在肌肉组织中的表达比裸质粒提高1~2个数量级。本研究通过PCR产物电泳结果分析也得到了相似的结果,但没有进行基因表达的定量分析。

和我们已前的研究相比^[1-5],应用PLGA微球包裹GRF表达质粒在动物体内的表达和生物学作用要优于裸质粒注射、布比卡因处理、原生质体介导和受体介导的肝脏定向表达等方法,且能使小鼠平均日增重较对照组高58.58%,因此PLGA微球很可能成为提高外源基因在肌肉组织表达的高效载体,这项技术在医学实践中有潜在的应用价值。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Zhang YI(张永亮), Lian JQ(连继勤), Liu SC(刘松财) et al. Expression of modified growth hormone releasing factor gene in animal skeletal muscle. *Chinese Journal of Veterinary Science*(中国兽医学报), 2000, 20(3): 245-247
- [2] Zhang YL. Gene endocrine gland: expression of growth hormone releasing factor in animal muscle. Young Scientist Travel Fellowship Symposium. 18th international congress of biochemistry and molecular biology, 2000, Birminham, UK
- [3] Zhang YI(张永亮), Lian JQ(连继勤), Liu SC(刘松财) et al. Effect of growth hormone-releasing factor expressed in rabbit skeletal muscle on rabbit growth. *Chinese Journal of Veterinary Science*(中国兽医学报), 2003, 23(1): 56-59
- [4] Zhang YI(张永亮), Tian BI(田保磊), Bai ZH(白忠彬) et al. Construction and expression of growth hormone releasing factor gene in rabbit. *中国科学: 生命科学*, 2004, 34(1): 1-6

- liver and its expression. *Chinese Journal of Veterinary Science* (中国兽医学报) 2003, **23**(4): 358 - 360
- [5] Bai ZH(白忠彬), Zhang YI(张永亮), Tian BI(田保磊) *et al.*. The expression of extro-growth hormone releasing factor mediated by protopost in rabbit. *Journal of Huazhong Agricultural University*(华中农业大学学报) 2002, **21**(6): 509 - 511
- [6] He X(何勤), Zhang ZR(张志荣), Liu X(刘戟) *et al.*. Study of encapsulation of suicide gene in poly(D, L-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles and its characteristics *in vivo*. *J Biomed Eng*(生物医学工程杂志) 2002, **19**(1): 30 - 33
- [7] Su Y(苏焱), Wang JI(王继麟), Xue HQ(薛红刚) *et al.*. Preparation of biodegradable PLA/PLG microspheres serves as an adjuvant of RNP. *Chin J Biologicals*(中国生物制品学杂志), 2000, **13**(4): 222 - 228
- [8] Gong K(龚非), Jiang SX(姜述德), Li WX(李卫东) *et al.*. Biodegradable poly(D, L-lactide-co-glycolic acid) microspheres used as adjuvant in DNA immunization of Hepatitis B Virus S gene. *Microbiology* (微生物学通报) 2001, **28**(2): 68 - 72
- [9] Luo D, Woodrow-Mumford K, Belcheva N *et al.*. Controlled DNA delivery systems. *Pharm Res*, 1999, **16**(8): 1300 - 1308
- [10] Thurmond KB, Rensen EE, Kowulewski T *et al.*. Packaging of DNA by shell crosslinked nanoparticles. *Nucleic Acids Res*, 1999, **27**: 2966 - 2971
- [11] Heng G, Yongjun L, Yuehong Z *et al.*. Nanoparticle as a new gene transferring vector in specific expression gene. *Chin Med Sci J*, 2002, **17**(4): 220 - 224
- [12] Cohen H, Levy RJ, Gao J *et al.*. Sustained delivery and expression of DNA encapsulated in polymeric nanoparticles. *Gene Ther*, 2000, **7**(22): 1896 - 1905

The Expression of Growth Hormone Release Factor Gene Carried with PLGA Microspheres in Muscle Tissue and its Effect on Mouse Growth

REN Xiao-Hui ZHANG Yong-Liang* LIU Song-Cai DAI Jian-Wei

(Department of Biochemistry, Changchun University of Agricultural and Animal Sciences, Changchun 130062, China)

Abstract Injectable sustained-release pcDNA3-GRF(1-32) microspheres were prepared by double emulsion-in liquid evaporation process using biodegradable poly lactic-co-glycolic acid as carrier. The enrapment efficiency, mean particle size, drug content thus prepared were 69%, 2.20 μ m, 8% and 70% respectively. The result of transfection *in vivo* showed that after 30 days, accumulative increased body weights on the group injected with pcDNA3-GRF(1-32) microspheres was significantly higher than those group injected with naked plasmid (12.87%), plasmid-empty microspheres (19.72%) and saline (58.58%) respectively. PCR and RT-PCR showed that the expression level of GRF gene on the group injected with pcDNA3-GRF(1-32) microspheres was the highest. GRF gene released by microspheres was still detected after 30 days. In conclusion, pcDNA3-GRF(1-32) microspheres have a controlled release effect and GRF gene could be successfully transfected into muscle cells of mouse by microspheres with higher efficacy and stronger biological function.

Key words PLGA microspheres, growth hormone release