

# 玻璃体内注射载 HIF-1 $\alpha$ shRNA 质粒的 PLGA 纳米粒眼部转染效率

张 楚 王雨生 吴 红 张朝霞 蔡 岩 马吉献

## Transfer efficiency of HIF-1 $\alpha$ short hairpin RNA plasmid loaded PLGA nanoparticles by intravitreal injection

Zhang Chu, Wang Yusheng, Wu Hong, Zhang Zhaoxia, Cai Yan, Ma Jixian. Eye Institute, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

**Abstract Objective** To evaluate the possibility of nanoparticle as a gene vector for hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) shRNA plasmid (pshHIF-1 $\alpha$ ). **Methods** Nanoparticles encapsulating HIF-1 $\alpha$  short hairpin RNA (shRNA) plasmid (pshHIF-1 $\alpha$  nanoparticles) encoding for green fluorescence protein (GFP) were formulated using poly (D, L-lactide-co-glycolide) (PLGA) by multiple emulsion technique. The envelopment efficiency, plasmid loading capacity, size and in vitro release of the nanoparticles were determined. Forty-eight eyes of 48 Brown Norway rats were divided into phosphate buffer solution (PBS, 10  $\mu$ L) group, blank nanoparticles (10  $\mu$ L, 1.89 mg/mL) group, free plasmid (10  $\mu$ L, 2.0 mg/mL) injection and pshHIF-1 $\alpha$  NPs (10  $\mu$ L, 1.89 mg/mL) injection group. The animals were sacrificed on day 3, 7, 14 and 28 after intravitreal injection, and immunofluorescence was used to evaluate the location of GFP. Histologic analysis was performed to observe the tissue change in the eyes on day 3. **Results** The envelopment efficiency and the size of pshHIF-1 $\alpha$  nanoparticles were 60.2% and 164-342 nm respectively. Loading rate of plasmid in the nanoparticles was 1.06%. In vitro, nanoparticles presented the sustained-release of plasmid for 4 weeks. Immunofluorescence showed that GFP was successfully transferred into the retina and choroid, showing the green fluorescence in the retinal pigment epithelium (RPE) layer at 7 days and lasted for 3 weeks with a significantly longer period than that of group free plasmid. pshHIF-1 $\alpha$  nanoparticles did not induce any histology signs of ocular inflammation 3 days after their injection in the vitreous. **Conclusion** PLGA nanoparticles can act as a vector to transfer specific plasmid in vivo. It possesses the advantages of low drug toxicity, controlled release and prolonged action, and may be a novel therapeutic approach to ocular neovascularization diseases.

**Key words** gene delivery; poly (D, L-lactic/glycolic acid) nanoparticles; plasmid; RNA interference; hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$

**摘要 目的** 观察携载体缺氧诱导因子-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) 短发卡式小干扰 RNA (shRNA) 质粒 (pshHIF-1 $\alpha$ ) 的纳米粒转染眼部组织的可行性。**方法** 应用聚乳酸聚乙醇酸共聚物 (PLGA) 包载绿色荧光蛋白 (GFP) 表达的 pshHIF-1 $\alpha$ , 制备纳米粒, 检测其粒径、包封率、载药量及体外释放情况; 将 48 只大鼠分为 4 组, 每组 12 只 (12 只眼), 分别向玻璃体内注入 10  $\mu$ L 磷酸盐缓冲液 (PBS)、空白纳米粒 (1.89 mg/mL)、裸质粒 pshHIF-1 $\alpha$  (0.02 mg/mL) 和 pshHIF-1 $\alpha$  纳米粒 (1.89 mg/mL)。分别在注药后 3、7、14、28 d 观察纳米粒的眼内穿透性和基因转染情况。通过组织病理学检查, 观察注射后第 3 天眼内组织结构的变化。**结果** 纳米粒的载药率和包封率分别为 1.06% 和 60.2%, 平均粒径为 284 nm, 体外释药达 4 周。体内实验显示, 载 pshHIF-1 $\alpha$  纳米粒定向聚集于视网膜色素上皮 (RPE) 层, GFP 表达时间持续达 28 d。组织病理学检查眼内未见明显炎性细胞浸润。**结论** 纳米粒可向眼底递送质粒形式的 DNA, 是眼部基因治疗安全、有效的载体之一。

**关键词** 基因载体; PLGA 纳米粒; 质粒; RNA 干扰; 缺氧诱导因子-1 $\alpha$

**分类号** R 773.4 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)06-0462-06

本课题为国家自然科学基金资助 (30371516, 30672291)

作者单位: 710032 西安, 第四军医大学西京医院眼科 全军眼科研究所 (张楚、王雨生、张朝霞、蔡岩、马吉献); 710032 西安, 第四军医大学化学教研室 (吴红)

通讯作者: 王雨生 (Email: wangys@fmmu.edu.cn)

基因治疗是指把基因导入人体细胞,使其发挥生物学效应,从而达到治疗疾病目的的技术方法。眼部因位置浅表,易于基因导入治疗和观察,以及血-眼屏障的存在,是基因治疗的理想靶器官<sup>[1]</sup>。近年来用聚乳酸聚乙醇酸共聚物(poly(D, L-lactide-co-glycolide acid), PLGA)为材料制得的纳米粒可以起到保护药物、提高生物利用度的作用,达到较长时间的缓控释目的<sup>[2]</sup>。本研究采用 PLGA 材料包载缺氧诱导因子 1 $\alpha$ (hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )短发卡式小干扰 RNA(short haripin RNA, shRNA)质粒(pshHIF-1 $\alpha$ ),观察 pshHIF-1 $\alpha$  通过 PLGA 包载后眼内转染的可行性,为眼底新生血管疾病的基因治疗提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

PLGA(50:50, Mw:40 000~75 000)、聚乙烯醇(Polyvinyl Alcohol, PVA, Mw:30 000~70 000)(美国 Sigma 公司);二氯甲烷、三氯甲烷(分析纯,天津市化学试剂三厂);高速搅拌机(上海弗鲁克流体机械制造有限公司);恒温磁力搅拌器(DF-101 s,河南予华仪器有限公司);超速离心机(GL 21M,长沙湘仪离心机仪器有限公司);恒温摇床(HYA,中国科学院武汉科学仪器厂);可见紫外分光光度计(Ultrospec 2000,美国 Pharmacia 公司);电泳仪(WDY-III,西安第四军医大学医电系);冷冻干燥机(BenchTop-K,美国 VirTis 公司);激光粒度测定仪(Zeta Sizer Nano-ZS,英国 Malvern instruments 公司);扫描电镜(JEM-2000EX,日本电子公司);激光共焦显微镜(FV1000, PA, 日本 Olympus 公司);体视显微镜(DM LB2,德国 Leica 公司);棕色挪威大鼠(Brown Norway, BN,第四军医大学航空航天医学系提供,研究者已获得实验动物使用许可证);大鼠小肠隐窝细胞(IEC6)由上海吉凯基因公司提供;克隆用大肠杆菌 DH5 $\alpha$  为本室保存。

### 1.2 方法

**1.2.1 大鼠 HIF-1 $\alpha$  特异性 siRNA 载体的构建、测序及内源靶** 上海吉凯基因公司提供具有氨苄抗性、绿色荧光蛋白(green fluorescence protein, GFP)表达的 pGCsi-U6/Neo/GFP/shRNA 载体,代理构建了针对大鼠 NM—024359 基因(HIF-1 $\alpha$ )4 个靶点的 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)载体后对克隆的 RNAi 进行测序,并将包装了 RNAi 的慢病毒颗粒感染大鼠小肠隐窝细胞 IEC6 进行干扰效率的内源靶,细胞分为空白对照组、空病毒载体组、shRNA1 组~shRNA4 组(KD<sub>1</sub>~KD<sub>4</sub>)。感染 3 d 后荧光显微镜下观察细胞荧

光表达情况,5 d 后收集细胞,提取 RNA,通过 RT-PCR 检测目的基因 mRNA 的表达情况。

**1.2.2 载 pshHIF-1 $\alpha$  纳米粒的制备** 采用乳化-溶剂挥发法制备载 pshHIF-1 $\alpha$  纳米粒。100  $\mu$ g pshHIF-1 $\alpha$  质粒冻干粉溶于 TE 缓冲液(Tris-EDTA buffer, pH 8.0)中作为内水相,冰浴条件下将内水相滴加入 2.0% (w/v) PLGA/二氯甲烷溶液中同时高速搅拌进行乳化(30 000 r/min, 30 s  $\times$  2 次)。将形成的油包水型初乳加入 1.0% (w/v) PVA 水溶液,继续高速搅拌器搅拌(30 000 r/min, 4 min),形成均一的水包油包水乳液,于通风橱内常压下搅拌 3 h, 4  $^{\circ}$ C、13 000 r/min 离心 20 min,收集沉淀,蒸馏水洗 3 遍除掉游离的基因及 PVA,冻干后 4  $^{\circ}$ C 保存。离心和洗涤过程中同时收集所有上清液,用于检测游离 pshHIF-1 $\alpha$  的含量。

**1.2.3 载 pshHIF-1 $\alpha$  纳米粒的表征** (1)激光粒度分析及 Zeta 电位分析:用 0.22  $\mu$ m 滤膜滤过的蒸馏水适量悬浮少量的纳米粒,进行激光粒度测定和 Zeta 电位分析。(2)透射电镜观察纳米粒表面形态和粒径范围:取纳米粒混悬液,蒸馏水适当稀释,磷钨酸负染,滴于镀膜的铜网上晾干,透射电镜下观察并拍照。(3)纳米粒中 pshHIF-1 $\alpha$  质粒含量的测定:精确称量载 pshHIF-1 $\alpha$  的纳米粒 10 mg,加入 500  $\mu$ L 氯仿至溶解完全,再加入 500  $\mu$ L TE 缓冲液,充分振荡 30 min, 12 000 r/min 离心 3 min,取上清并反复洗 3 次。将 3 份上清混合均匀,紫外分光光度计在波长 260 nm 处测定吸光度,根据公式(1):载药量% = 上清中 pshHIF-1 $\alpha$  量/纳米粒量  $\times$  100%,计算基因含量,剩余上清混合液用于质粒结构完整性检测。(4)纳米粒包封率的测定:取制备时的上清以及洗涤液混合均匀,精确测定溶液体积,并用紫外分光光度计测定溶液吸光度,计算游离 pshHIF-1 $\alpha$  质粒含量,根据公式(2):包封率% = (总 pshHIF-1 $\alpha$  量 - 上清中 pshHIF-1 $\alpha$  量)/总 pshHIF-1 $\alpha$  量  $\times$  100%,计算包封率。

**1.2.4 载 pshHIF-1 $\alpha$  纳米粒体外释放实验** 载 pshHIF-1 $\alpha$  纳米粒体外释放在含 0.02% 叠氮化钠(NaN<sub>3</sub>)的磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS, pH 8.0)中进行。精确称量 20 mg 纳米粒,加入 1 mL PBS 溶液中形成均一的悬浮液,置于恒温摇床(37  $^{\circ}$ C, 100 r/min)进行释放实验,每 24 h 取 100  $\mu$ L 用紫外分光光度计测定吸光度,同时用同等体积新鲜缓冲液更换释放液。计算释放量并绘制累积释放曲线。

**1.2.5 质粒 DNA 结构完整性的检测** 1.0% 琼脂糖凝胶电泳比较质粒 DNA 在纳米粒包载前后以及未经 PLGA 包载但以相同条件进行高速搅拌的质粒 DNA

的结构完整性,凝胶成像系统观察并拍照。

### 1.2.6 纳米粒视网膜穿透性及转染效率的观察

(1)动物模型的建立:健康成年 BN 大鼠 48 只,体重 180 ~ 220 g,实验前双眼前节和眼底检查均正常。每只大鼠随机选取 1 只眼为实验眼,另 1 只眼为对照眼。

(2)实验分组:实验随机设立空白纳米粒组、PBS 组、裸质粒组和载 pshHIF-1 $\alpha$  纳米粒转染组,每组 12 只眼。(3)玻璃体腔内注射:体视显微镜下用 27 号注射针头连接微量注射器在鼻上或颞上象限距角膜缘后 2 mm、以 40° ~ 60° 朝向赤道区刺入玻璃体腔<sup>[2]</sup>,确定针头进入玻璃体腔后,分别注入 10  $\mu$ L 空白纳米粒 (1.89 mg/mL)、pshHIF-1 $\alpha$  (0.02 mg/mL)、pshHIF-1 $\alpha$  纳米粒 (1.89 mg/mL) 或 PBS。(4)纳米粒在眼内的穿透性及转染观察:分别在注射后 3、7、14、28 d 过量麻醉处死大鼠,灌注后取眼球制成眼杯,行冰冻切片,DAPI 染核后激光共焦显微镜下观察。

1.2.7 组织病理学检查 注射后第 3 天,将大鼠的实验眼制作眼球组织石蜡切片,通过苏木精 - 伊红染色,在光学显微镜下观察眼内组织结构的改变。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 11.0 统计学软件进行统计学处理。测试的数据资料均以  $\bar{x} \pm s$  表示,经 Levene 检验示方差齐。组间 Real-time RNAi 检测结果的整体比较采用单因素方差分析,组内的多重比较采用 Dunnett *t* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 构建针对大鼠 HIF-1 $\alpha$ 的 siRNA 质粒 pshHIF-1 $\alpha$ 及内源靶靶

经测序证实,克隆的 4 条 RNAi 100% 打靶正确。细胞感染病毒 3 d,荧光检测结果显示,细胞 GFP 的转染效率均达到 70% 以上 (图 1)。RT-PCR 结果显示,

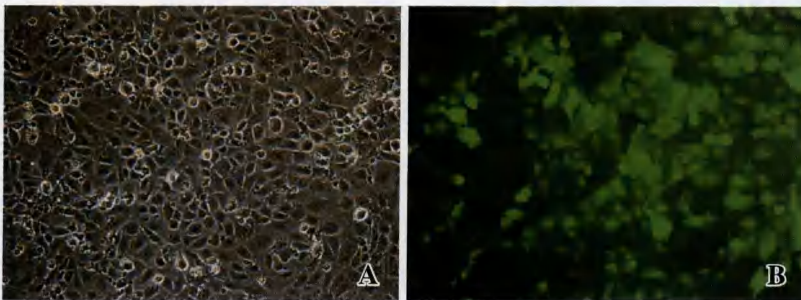


图 1 慢病毒颗粒感染细胞 GFP 的表达情况 A:2 号 RNAi 靶点病毒感染图 (倒置相差显微镜) B:2 号 RNAi 靶点病毒感染 (荧光显微镜  $\times 200$ )

Fig. 1 The expression level of GFP after transfected by Lentivirus A:2# RNAi under the phase contrast microscopy B:2# RNAi under the fluorescence microscopy ( $\times 200$ )

相对于空病毒载体组,KD2 号和 KD3 号靶点对 IEC6 细胞 HIF-1 $\alpha$  基因的表达敲减效率分别为 45% 和 40% (图 2)。选取敲减效率较高的 2 号质粒进行以下的实验,序列为:5' -CCAGTTGAATCTTCAGATA-3'。

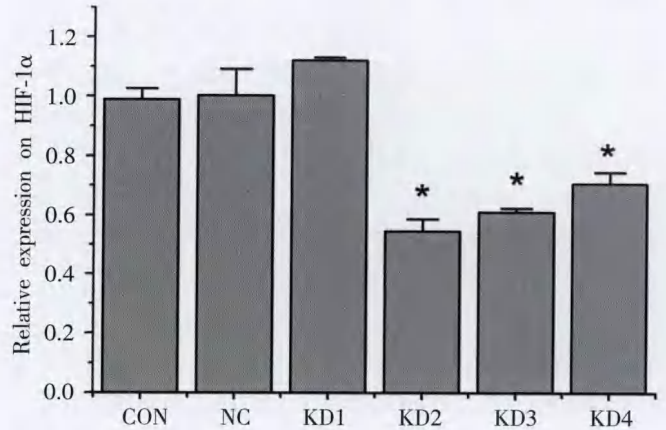


图 2 Real-time PCR 结果 CON:空白对照组 NC:空病毒载体组 KD1-4:shRNA1 组 ~ shRNA4 组 ( $F = 17.2, P < 0.01$ ; 与 NC 对照组比较,  $* P < 0.01$ )

Fig. 2 Real-time PCR result CON: non-transfected group NC: negative control group KD1-4:1#-4#RNAi virus transfected groups  $F = 17.2, P < 0.01$ ;  $* P < 0.01$  vs respective NC group (One-way ANOVA, Dunnett *t* test)

### 2.2 纳米粒的表征检测及体外释药

#### 2.2.1 纳米粒子的粒度、粒度分布及 Zeta 电位

78.7% 载 pshHIF-1 $\alpha$  纳米粒集中分布在 164 ~ 342 nm,呈窄分布,平均粒度为 284 nm,Zeta 电位为 -8.91 mV。

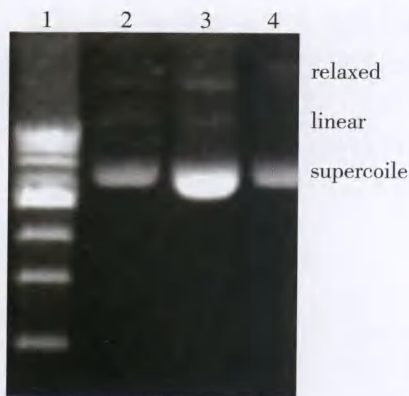
2.2.2 载 pshHIF-1 $\alpha$  纳米粒的微观形态 透射电镜下纳米粒呈圆形或椭圆形粒子,直径为 100 ~ 300 nm,与光粒度分析结果相符。

2.2.3 载 pshHIF-1 $\alpha$  纳米粒中的基因含量及基因包埋效率的测定 紫外分光光度法测得制备的纳米粒包埋效率为 60.2%,纳米粒中基因含量占 1.06%。

2.2.4 载 pshHIF-1 $\alpha$  纳米粒体外释放的测定 在体外最初 5 d 为突释相,约有 70% 的质粒 DNA 释放;随后的 23 d 呈稳态缓释。

#### 2.2.5 质粒 DNA 结构完整性的检测

1.0% 琼脂糖凝胶电泳结果显示与未经 PLGA 纳米粒包载但经过高速搅拌的质粒 DNA 和纳米粒包载前的质粒 DNA 相比,未经 PLGA 包载的质粒 DNA 在高速搅拌后含有更高比例的开环形式的 DNA,提示 PLGA 在高速剪切过程中对 DNA 存在一定的保护作用 (图 3)。



**图 3 琼脂糖凝胶电泳检测质粒 DNA 结构完整性**

1: DNA 分子标记  
2: 高速剪切但未包载 PLGA 的质粒 DNA  
3: PLGA 包载前质粒 DNA  
4: PLGA 包载后质粒 DNA

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA released from nanoparticles

1: DNA marker 2: non-entrapped plasmid DNA 3: plasmid before PLGA entrapment 4: plasmid DNA after PLGA entrapment

**2.3 玻璃体内注射的眼部转染效率**

激光共焦显微镜对缓释纳米粒眼内注射后的视网膜穿透性观察显示,注射后 3 d 载 pshHIF-1 $\alpha$  纳米粒组可见 GFP 在视网膜内层表达,此外,睫状体、脉络膜、血管和视盘围组织也可见绿色荧光表达。第 7 天可见 GFP 向视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 层聚集,第 14 天起呈持续明亮的线状表达,4 周后消失。裸质粒组在第 3 天时可见散在荧光表达于视网膜及脉络膜,第 7 天时已观察不到荧光。整个观察

过程中无绿色荧光在 RPE 层聚集的现象。空白纳米粒子组和 PBS 组均未观察到荧光 (图 4,5)。

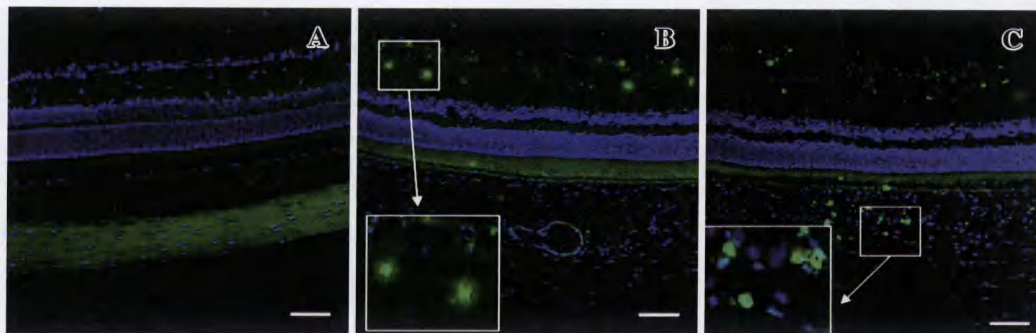
**2.4 组织病理学观察**

注射后第 3 天,载 pshHIF-1 $\alpha$  纳米粒组的睫状体和视网膜等眼内组织结构正常,未见炎性细胞浸润。

**3 讨论**

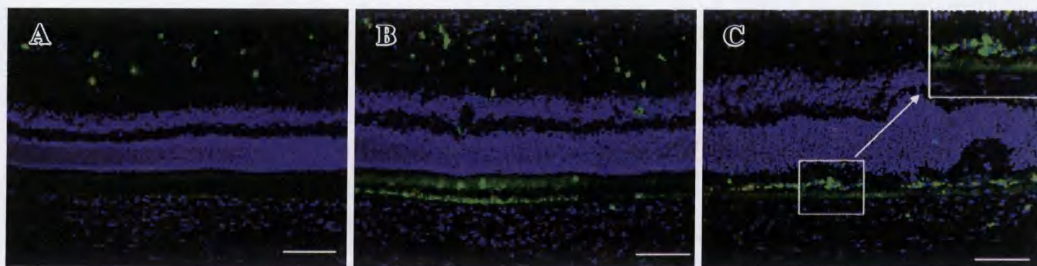
基因疗法将为治疗某些视网膜疾病提供新的思路<sup>[3]</sup>,其关键在于选用能够能进入靶细胞并与基因整合、持续释放表达产物来发挥其长期治疗作用的载体。利用病毒载体递送目的基因,因其具有诱变作用和致癌作用,以及携带遗传物质能力有限,限制了其在临床上的广泛应用<sup>[4]</sup>。相反,递送质粒形式的基因更为安全,并具有药理学合理性。

系统给药已用于治疗一些玻璃体视网膜疾病,但是血-视网膜屏障阻止了循环系统内的特定药物进入视网膜组织,加上目前的非病毒载体效率较低以及核酸酶的存在,质粒 DNA 在体内清除迅速,限制了静脉给药途径递送药物至眼内的效率。目前,治疗眼后节疾病最合理的给药方式是玻璃体腔注射。尽管此种方法可获得较高的玻璃体及视网膜药物质量浓度,但因



**图 4 玻璃体腔注射后 3 d GFP 的表达情况 (×20)** A: PBS 组 B: pshHIF-1 $\alpha$  纳米粒组 C: 裸质粒组 (bars = 50  $\mu$ m)

Fig. 4 The expression of GFP on 3 days after vitreous injection (×20) A: PBS group B: pshHIF-1 $\alpha$  nanoparticles group C: free pshHIF-1 $\alpha$  group (bars = 50  $\mu$ m)



**图 5 载 pshHIF-1 $\alpha$  纳米粒玻璃体腔注射后不同时间点 GFP 的表达情况 (×20)** A: 第 3 天 B: 第 7 天 C: 第 14 天 (bars = 50  $\mu$ m)

Fig. 5 GFP expression of pshHIF-1 $\alpha$  nanoparticles at different time points after vitreous injection (×20) A: 3 days B: 7 days C: 14 days (bars = 50  $\mu$ m)

药物在玻璃体内的半衰期相对较短,为维持有效的药物质量浓度,在一定时期内需要多次、反复注射,不仅导致患者不适,而且易发生玻璃体出血、感染和晶状体或视网膜的损伤等并发症<sup>[5-6]</sup>。近年来可降解聚合物 (包括天然和人工合成的) 因其良好的生物相容性越来越多地被用于基因传递。PLGA 已被 FDA 批准用于人体,具有无毒、无免疫原性和可生物降解等优点<sup>[7-8]</sup>。有研究显示,PLGA 纳米粒能够转染体内外的 RPE 细胞,玻璃体腔注射后未观察到明显的视网膜毒性和炎症体征<sup>[2,9-10]</sup>。采用复乳-溶剂挥发法将

PLGA 与 DNA 水溶液混合后经高速搅拌形成水包油包水乳液,将质粒 DNA 包被于多聚物中,此法实用有效、简便易行。经证实,通过改变共聚物的组成和分子量,DNA 从 PLGA 中释放可持续数日到数月<sup>[11-12]</sup>,使获得长期稳定的治疗效果成为可能。因其良好的组织穿透能力,极易被细胞摄入,因此具有作为基因治疗载体的独特优越性,是具有广阔开发前景的缓释控释制剂<sup>[13-14]</sup>。

眼内新生血管的发生发展与眼组织缺血缺氧关系密切,RPE 细胞在受到缺氧信号的作用后,HIF-1 $\alpha$  表达增加,从而显著上调血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达<sup>[15]</sup>,因此 HIF-1 $\alpha$  的调节作用在眼内新生血管形成中起核心作用。用小分子基因片断如 RNAi,抑制 HIF-1 $\alpha$  的活性,可减弱或静止其对下游靶基因如 VEGF 和转化生长因子  $\beta$  等的作用<sup>[16]</sup>。有研究证实,基因沉默人 RPE 细胞 HIF-1 $\alpha$  可显著抑制体外模型中脉络膜新生血管的发生<sup>[17]</sup>。本研究构建并筛选了针对大鼠 HIF-1 $\alpha$  的 shRNA 质粒进行 PLGA 纳米粒包载并评测纳米粒相关的各项指标,通过玻璃体腔注射纳米粒观察其在视网膜内的穿透性以及转染效率。结果显示,78.7% 载 pshHIF-1 $\alpha$  纳米粒集中分布在 164 ~ 342 nm,平均粒度为 284 nm,在体外可匀速释放达 4 周。纳米颗粒是亚微米颗粒,能渗透入深层组织,到达并被靶细胞摄入。玻璃体腔注射后,小粒径的纳米粒遵循一种“贯穿视网膜通路”迅速内化入 RPE 细胞内,激光共焦观察可见 GFP 最终集中表达于 RPE 层,与之前的研究结论一致<sup>[10,18-19]</sup>。且由于外层 PLGA 的保护作用增强基因片段耐核酸酶的能力,降低了基因片段被酶降解的几率,使质粒作用维持了比裸质粒更长的有效期,克服了裸质粒易被体内核酸酶降解、作用时间短的难题<sup>[14,20]</sup>。组织病理学观察也证实纳米粒玻璃体腔内注射后,眼内组织结构无改变,未见明显眼内炎症征象。

生物降解的 PLGA 制备的纳米粒已被广泛作为靶向和局部定位载体应用,除了质粒 DNA,其还可运载蛋白质、羧氨酸及低分子量的化合物<sup>[21]</sup>。PLGA 纳米粒的眼后节药物递送系统将为大量玻璃体视网膜疾病提供治疗手段,包括年龄相关性黄斑变性、视网膜色素变性、血管性疾病如糖尿病视网膜病变和视网膜静脉或动脉阻塞、炎症性疾病如葡萄膜炎、增生性疾病如增生性玻璃体视网膜病变以及感染性疾病如眼内炎。此外,青光眼或视神经炎也可通过递送神经保护性因子至眼后节达到治疗目的<sup>[7]</sup>。通过对纳米粒被细胞吞

噬的机制以及增强其基因治疗作用效果的研究发现,其释放速度稳定、生物相容性好,在组织和细胞基因治疗具有潜在优势。本研究结果进一步证实纳米粒有可能为眼部新生血管性疾病提供有效的治疗途径。

(志谢:感谢德国洪堡基金会仪器设备捐赠基金的资助)

## 参考文献

- 1 Reich SJ, Bennett J. Gene therapy for ocular neovascularization: a cure in sight [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2003, 13(3): 317 - 322
- 2 Xu JF, Wang YS, Li Y, et al. Inhibitory efficacy of intravitreal dexamethasone acetate-loaded PLGA nanoparticles on choroidal neovascularization in a laser-induced rat model [J]. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2007, 23(6): 527 - 540
- 3 叶子, 王雨生. 脉络膜新生血管基因治疗研究进展 [J]. *眼科新进展*, 2008, 28(6): 460 - 463
- 4 El-Anced A. An overview of current delivery systems in cancer therapy [J]. *J Control Release*, 2004, 94(1): 1 - 14
- 5 Ogura Y. Drug delivery to the posterior segments of the eye [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 52(1): 1 - 3
- 6 Peyman GA, Ganiban GJ. Delivery systems for intraocular routes [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 1995, 16(1): 107 - 123
- 7 Shive MS, Anderson JM. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 1997, 28(1): 5 - 24
- 8 Jain RA. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly ( lactide-co-glycolide ) ( PLGA ) devices [J]. *Biomaterials*, 2000, 21(23): 2475 - 2490
- 9 Bejjani RA, Ben Ezra D, Cohen H, et al. Nanoparticles for gene delivery to retinal pigment epithelial cells [J]. *Mol Vis*, 2005, 11: 124 - 132
- 10 Giordano GG, Chevez-Barrios P, Refojo, MF, et al. Biodegradation and tissue reaction to intravitreal biodegradable poly ( D, L-lactic-co-glycolic ) acid microspheres [J]. *Curr Eye Res*, 1995, 14(9): 761 - 768
- 11 Lin SY, Chen KS, Teng HH, et al. In vitro degradation and dissolution behaviours of microspheres prepared by three low molecular weight polyesters [J]. *J Microencapsul*, 2000, 17(5): 577 - 586
- 12 李越, 王雨生, 惠延年. 纳米给药系统在眼科的应用 [J]. *国际眼科杂志*, 2003, 3: 72 - 75
- 13 Prabha S, Labhasetwar V. Nanoparticle-mediated wild-type p53 gene delivery results in sustained antiproliferative activity in breast cancer cells [J]. *Mol Pharm*, 2004, 1(3): 211 - 219
- 14 Panyam J, Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2003, 55(3): 329 - 347
- 15 张鹏, 王雨生, 韩者艺, 等. 缺氧对人视网膜色素上皮细胞表达缺氧诱导因子-1 $\alpha$  及血管内皮生长因子的影响 [J]. *中华眼底病杂志*, 2006, 22(3): 204 - 205
- 16 张鹏, 王雨生, 惠延年, 等. 缺氧诱导因子 1 与眼内新生血管 [J]. *眼科新进展*, 2004, 24(3): 224 - 226
- 17 Zhao W, Wang Y, Hui Y, et al. Inhibition of proliferation, migration and tube formation of choroidal microvascular endothelial cells by targeting HIF-1 $\alpha$  with short hairpin RNA-expressing plasmid DNA in human RPE cells in a coculture system [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2008, 246(10): 1413 - 1422
- 18 Bourges JL, Gautier SE, Delie F, et al. Ocular drug delivery targeting the retina and retinal pigment epithelium using polylactide nanoparticles [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44(8): 3562 - 3569
- 19 Sakurai E, Ozeki H, Kunou N, et al. Effect of particle size of polymeric nanospheres on intravitreal kinetics [J]. *Ophthalmic Res*, 2001, 33(1): 31 - 36
- 20 Wattiaux R, Laurent N, de Coninck SW, et al. Endosomes, lysosomes: their implication in gene transfer [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2000, 41(2): 201 - 208
- 21 Aukunuru JV, Ayalasomayajula SP, Kompella UB. Nanoparticle formulation

enhances the delivery and activity of a vascular endothelial growth factor antisense oligonucleotide in human retinal pigment epithelial cells[J]. J Pharm Pharmacol, 2003, 55(9): 1199 - 1206

(收稿:2009-02-17 修回:2009-04-13)

(本文编辑:刘 艳)

## · 临床经验 ·

# 角膜缘干细胞移植治疗翼状胬肉低复发率手术技巧

李明桂 张发梁 梁惠文

Schermer 等<sup>[1]</sup>首次发现角膜缘干细胞位于角膜缘基底细胞中并命名。研究表明,翼状胬肉的发生与角膜缘干细胞缺陷有关<sup>[2]</sup>。本文探讨角膜缘干细胞移植治疗翼状胬肉低复发率的手术技巧。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集 2000 年 1 月—2008 年 6 月我院眼科住院治疗的翼状胬肉患者 400 例(580 眼),其中男 202 例(322 眼),女 198 例(258 眼);年龄 21~86 岁,平均 40.5 岁。2000 年 1 月—2003 年 12 月手术 180 例(260 眼)为第 1 组,2004 年 1 月—2008 年 6 月手术 220 例(320 眼)为第 2 组。所有患者翼状胬肉侵入角膜缘内 4~8 mm,平均(6.9±0.8)mm;翼状胬肉角膜缘处宽度 3~8 mm,平均(5.9±0.8)mm。2 组患者的年龄、性别、翼状胬肉大小比较,差异均无统计学意义。

**1.2 手术方法** 0.5% 爱尔凯因表面麻醉,2% 利多卡因局部浸润麻醉。第 1 组患者在显微镜下用传统的切除法切除翼状胬肉头部;第 2 组用撕除法,即用圆刀片沿翼状胬肉头缘或下缘外周切开其上上皮层,使翼状胬肉翘起少许,显微齿镊提起翘起的头部,顺其纤维的生长方向撕除,使翼状胬肉组织完整从角膜表面撕下,较大的翼状胬肉从上下缘分离后分别撕除,切除翼状胬肉两端角膜缘处正常球结膜 2 mm。分离翼状胬肉组织至泪阜部,剪除全部翼状胬肉及肥厚增生的结膜下组织,巩膜面轻度烧灼止血。第 1 组取 2 mm 宽的健康结膜瓣,结膜瓣大于翼状胬肉切除角膜缘缺损处 1 mm。第 2 组取 3.5 mm 宽的健康结膜瓣,切取结膜瓣大于角膜缘缺损处 2 mm。2 组结膜瓣均不带筋膜组织,植片上皮面向上将其移植到切除区,10/0 无创缝合线缝合于巩膜植床上。复发性手术在上次手术半年后进行。术后涂典必殊眼膏,包扎 24 h 后以典必殊、双氯芬酸钠及重组人表皮生长因子滴眼液点眼,每日 4 次。术后 2 周拆线,4 周停药。

**1.3 疗效评定标准** (1)痊愈:手术区光滑洁净,结膜平整无充血,角膜创面上皮覆盖,无新生血管及胬肉增生。(2)复发:结膜充血明显,局部增厚,角膜创面有新生血管及胬肉增生。

**1.4 统计学方法** 采用 SPSS 10.0 统计学软件进行统计学分析,2 组间角膜创面上皮愈合时间的比较采用独立样本的 *t* 检验,术后 6 个月 2 组间治愈率和复发率的比较采用卡方检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2 组患者术后早期均有不同程度的结膜植片充血、水肿和异物刺激感,3~9 d 后症状逐渐减轻。角膜创面上皮愈合时间第 1 组平均为(5.38±1.55)d,第 2 组平均为(1.23±1.15)d,

2 组比较差异有统计学意义( $t = 2.529, P < 0.05$ )。术后随访 6 个月~2 年,第 1 组 237 眼痊愈,31 眼复发,复发率为 11.92%;第 2 组 309 眼痊愈,11 眼复发,复发率为 3.44%,2 组间差异有统计学意义( $\chi^2 = 5.714, P < 0.05$ )。

## 3 讨论

单纯切除法破坏完整的角膜缘屏障,增生活跃的结膜成纤维细胞向角膜方向生长,导致翼状胬肉复发,复发率为 30%~50%。角膜缘干细胞存在于角膜缘基底部,能增生、分化为角膜上皮细胞,阻止结膜上皮细胞移行至角膜表面,保持角膜的透明性与正常生理功能<sup>[3]</sup>。完整的角膜缘是阻止结膜向角膜生长的屏障。角膜缘干细胞移植手术治疗翼状胬肉后其复发率均下降。本研究表明撕除法联合宽角膜缘干细胞植片手术的复发率较单纯切除法联合合适植片的复发率明显降低。

采用撕除法代替切除法的临床意义是角膜创面修复时间缩短,角膜上皮迅速上皮化,能遏制纤维血管组织向角膜表面生长,结构和功能健全的上皮组织是维持角膜透明的重要条件,从而降低翼状胬肉的复发率。宽角膜缘干细胞上皮的结膜瓣植片的切取技术是翼状胬肉手术成功、预防复发的关键。宽角膜缘干细胞植片有 2 层含义:(1)正常角膜缘宽 1 mm,有上皮细胞层、疏松纤维组织层和基质层,上皮细胞层超过 10 层,角膜缘上皮及浅层基质中存在角膜上皮来源的干细胞,位于角膜和结膜的移行区,角膜缘的基质层疏松,采用隧道刀分离至角膜缘内透明角膜内 1.5 mm。(2)彻底撕除胬肉组织后,切除翼状胬肉组织角膜缘处两端含正常结膜 2 mm,切取结膜瓣时角膜缘两端分别大于缺损区 2 mm。高慕洁等<sup>[4]</sup>报道翼状胬肉复发与干细胞植片大小有关,这是因为宽角膜缘干细胞植片与合适的角膜缘干细胞植片相比,角膜缘干细胞植片大、平整,角膜缘宽,使患者角膜缘更接近健康角膜缘结构,容易重建角膜缘干细胞所需的角膜缘龛环境,对干细胞的增生、分化及凋亡有调节作用,增强了角膜缘的 Vogt 栅栏结构和机械屏障作用。

## 参考文献

- Schermer A, Galvin S, Sun TT. Differentiation-related expression of a major 64k corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells[J]. J Cell Biol, 1986, 103: 49 - 62
- 刘新,肖颖,盛传家,等.翼状胬肉的发生与角膜缘干细胞缺乏的病理研究[J]. 中国实用眼科杂志, 2003, 21(7): 499 - 501
- Lam DS, Young AL, Leung AT, et al. Limbal stem cell allografting from related live donors for corneal surface reconstruction[J]. Ophthalmology, 2000, 107(3): 411 - 412
- 高慕洁,黎春雷.带角膜缘干细胞自体结膜瓣移植术治疗翼状胬肉[J]. 美中国际眼科杂志, 2002, 2(4): 54 - 55

(收稿:2009-02-11 修回:2009-03-05)

(本文编辑:尹卫靖)