DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.12.018

验结果的差异，正常TEC整合素α3仅于细胞基底侧表达，因而无法在活细胞产生足够的抗原抗体反应导致显色反应，而缺氧损伤后于细胞侧缘表达的整合素α3则可直接与培养液中的抗体反应产生荧光。为证实这一推测，我们进一步采用纯乙醇固定细胞后加用Triton-100以增加抗体对细胞的通透性，染色后出现与Gailit相同的实验结果。实验结果显示，缺氧、氧化损伤后整合素α3的表达只存在分布的改变而无明显强度变化，活细胞仅缺氧组染色的原因源于活细胞对抗体分子不通透而在空间上阻碍了细胞基底侧表达的整合素α3与其相应抗体间的正常抗原抗体反应所致。活细胞仅缺氧组于细胞周边染色更加证实在本实验条件下缺氧后存在细胞整合素α3在侧缘的重新分布，表明损伤后确实存在着整合素分子分布的改变。通过我们在体肾缺血再灌注损伤后整合素α3的免疫金银染色结果也显示出明显的细胞侧缘及顶侧的分布改变。

本研究结果表明，缺氧、氧化损伤后TEC整合素α3均可出现明显的极性分布变化，这种变化有可能是导致细胞间粘附力增强而细胞与基底面粘附力减弱的的基础。

参考文献：

[1] Noiri E, Gailit J, Sheth D, *et al*. Cyclic RGD peptides ameliorate ischemic acute renal failure in rats[J]. Kidney Int, 1994, 46(4): 1 050—1 058.
[2] Gailit J, Colflesh D, Rabiner I, *et al*. Redistribution and dysfunction of integrins in cultured renal epithelial cells exposed to oxidative stress[J]. Am J Physiol, 1993, 264(1 Pt 2): F149—F157.
[3] Zuk A, Bonventre J V, Brown D, *et al*. Polarity, integrin, and extracellular matrix dynamics in the postischemic rat kidney[J]. Am J Physiol, 1998, 275(3 Pt 1): C711—C731.
[4] Canfield P E, Geerdes A M, Molitoris B A. Effect of reversible ATP depletion on tight-junction integrity in LLC-PK1 cells[J]. Am J Physiol, 1991, 261(6 Pt 2): F1 038—F1 045.
[5] Gumbiner B M. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis[J]. Cell, 1996, 84(3): 345—357.
[6] Lieberthal W, McKenney J B, Kiefer C R, *et al*. Betax1 integrin-mediated adhesion between renal tubular cells after anoxic injury[J]. J Am Soc Nephrol, 1997, 8(2): 175—183.
[7] Romanov V, Noiri E, Czerwinski G, *et al*. Two novel probes reveal tubular and vascular Arg-Gly-Asp (RGD) binding sites in the ischemic rat kidney [J]. Kidney-Int, 1997, 52(1): 93—102.

（编辑 冷怀明）

文章编号：1000-5404(2002)12-1415-02

个案与短篇

口服聚乙二醇改性聚乳酸靶向分布实验

Studies on distribution of PELA after oral administration

曾韦锟，任建敏，邹全明 （第三军医大学医学检验系临床微生物学及免疫学教研室，重庆 400038）

聚乙二醇改性聚乳酸(PELA)是能在生物体内被水解或酶解后吸收并排出体外的高分子聚合物。它具有无毒、靶向、缓释性等优良性能，因此在载药方面显示出良好的应用前景。通过控制制造工艺，可以将其制成不同直径大小的微球，从而产生不同的定位效果[1]。本研究试采用与人在解剖结构上有较好可比性的小型猪为实验对象，采用造影剂示踪法，从大体上研究微球在动物胃肠道的靶向分布情况。

1 材料和方法

1.1 材料

聚乙二醇改性聚乳酸PELA[P(L-PEG2000)(95∶5)]：M_v 20000-23000，(本室合成)。泛影葡胺(浓度为60%)。聚乙烯醇(PVA-1788)：中国石化总公司四川维尼纶厂生产。LeitzDiaplan-光学显微镜Wild MPS46、PHOTOAUTOMAT、Wild Leitz、Wild MPS52照相设备，德国生产。AMRAY型扫描电子显微镜。WL-2激光粒度分析仪，TV显微系统（重庆大学光电学院研制），可见/紫外分光光度计DU640（美国BECKMAN），低温高速离心机（美国BECKMAN），高速乳化制作器T25B（美国），真空干燥器（国产），低温冷冻真空干燥器（国产）。CT机（德国西门子公司）。雄性小型猪，体重为20 kg（第三军医大学实验动物中心）。

1.2 方法

1.2.1 微球包裹泛影葡胺的制备方法 参照文献[2、3]制备，低温真空干燥，贮存备用。

1.2.2 微球的表征 微球表面形态用AMRAY型扫描电子显微镜照相观察；粒径分布用WL-2激光粒度分析仪测定；微球的粒径M.D用LeitzDiaplan-光学显微镜目测，计算得数均粒径$\bar{X}$，即$\bar{X}=\Sigma X_i/n$，其中X_i为单个微球粒径；$\bar{X}$为数均粒径；n为粒子数目(不少于150)。结果平均粒径为6.4 μm。

1.2.3 动物实验 动物实验前，禁食1 d。经口灌服20 ml液体石蜡油。全麻插胃管，对照组灌服空微球(20 g)悬液，实验组灌服PELA包裹物悬液(20 g微球内含包裹的泛影葡胺约为10 ml)。于实验第7天禁食。经口灌服20 ml液体石蜡油。第8天CT下观察活体及胃肠组织(离体)。

2 结果

与口服空微球的对照组比较，口服PELA包裹泛影葡胺的实验组小型猪，活体检查可见局部肠壁密度增强，胃肠组织离体下，胃壁及小肠粘膜出现致密影。提示微球包裹物沿胃、肠壁沉积在小肠粘膜。

（下转1419页）

作者简介：曾韦锟(1974—)，男，贵州省贵阳市人，硕士，医师，主要从事病原微生物的检测及预防等方面的研究。电话：68753590
收稿日期：2001-06-06；修回日期：2001-12-12

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

一步克隆分析。

差异片段的成功回收是对其进行分析鉴定的关键, 从聚丙烯酰胺凝胶中回收 DNA 片段是一项比较困难的工作, 常用的方法主要是对经过溴乙锭染色或放射性标记显影后的凝胶进行回收, 因为银离子对 DNA 结构的破坏严重, 一般不从银染凝胶中回收 DNA 片段[2]。我们通过实践建立了一种简便的半玻板凝胶染色法, 使银染凝胶 DNA 片段的回收成为可能。半玻板凝胶染色使待回收片段不受银离子破坏, 并且连续点样使对回收片段的定位准确, 应用这一方法我们成功地回收了 4 条片段。由于从聚丙烯酰胺凝胶回收的产物量常很低, 需要进行 PCR 再扩增才能进一步应用, 我们将回收的 4 条片段再扩增, 均得到与目的片段大小一致的产物。

本实验对回收的 4 条片段进行克隆, 经筛选、鉴定证实有 1 条回收片段克隆成功, 我们对其进行了测序。通过 GenBank 用 BLAST 搜寻均未见同源性信息, 我们目前还不能明确这条片段的价值, 有可能是新的基因序列, 但还需要进一步验证才能明确。

参考文献:

[1] Vos P, Hogers R, Bleeker M, *et al*. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting[J]. Nucleic Acids Res, 1995, 23(21): 4 407—4 414.

[2] 金冬雁, 黎孟枫 等译. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1992. 45—60, 325—333.

[3] 肖翠英, 张思仲. PCR 产物的克隆方法[J]. 中华医学遗传学杂志, 1997, 14(3): 161—165.

[4] 况少青, 张宇舟, 陈　竺. 基因组扫描-遗传病相关基因定位的有利工具[J]. 中华医学遗传学杂志, 1997, 14(2): 99—103.

[5] 赵　勇, 丁金凤. 寻找差异基因[J]. 国外医学: 遗传学分册, 2000, 23(2): 76—80.

[6] De Juan C, Iniesta P, Cruces J, *et al*. DNA amplification on chromosome 6p12 in non small cell lung cancer detected by arbitarily primed polymerase chain reaction[J]. Int J Cancer, 1999, 84(4): 344—349.

[7] Savelkoul P H M, Aarts H J M, Hass J D, *et al*. Amplifedi fragment length polymorphism analysis: the State of an Art[J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(10): 3 083—3 091.

[8] Lindstedta B, Heira E, Vardunda T, *et al*. A variation of the amplified-fragment length polymorphism(AFLP) technique using three restriction endonucleases and assessment of the enzyme combination BglII-MfeI for AFLP analysis of *Salmonella enterica subsp. Enterica isolates*[J]. FEMS Microbiol Lett, 2000, 189(1): 19—24.

[9] 万春玲, 朱玉芳, 谭远德. AFLP 标记在研究家蚕遗传多态性方面的应用[J]. 生物技术, 1999, 9(5): 4—9.

[10] Allan B, Curtis C H. Carcinogenesis in mouse and human cells: parallels and paradoxes[J]. Carcinogenesis, 2000, 21(3): 371—377.

[11] Yamasaki H, Omori Y, Zaidan-Dagli M L, *et al*. Genetic and epigenetic changes of intercellular communication genes during multistage[J]. Cancer Detect Prev, 1999, 23(4): 273—279.

[12] 张树辉, 史景泉, 魏　泓. 小鼠高低转移性肝癌微卫星不稳定性的研究[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(1): 64—67.

[13] Fukuda T, Kido A, Kajino K, *et al*. Cloning of differentially expressed genes in highly and low metastatic rat osteosarcomas by a modified cDNA-AFLP method[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 261(1): 35—40.

[14] Majima S, Kajino K, Fukuda T, *et al*. A novel gene rising dbl quote, left (low) Niban" upregulated in renal carcinogenesis: cloning by the cDNA-amplified fragment length polymorphism approach[J]. Jpn J Cancer Res, 2000, 91(9): 869—874.

(编辑　薛国文)

(上接 1415 页)

3　讨论

PELA 具有无毒, 可降解的优点, 通过控制合成条件, PELA 微球可以制成不同粒径的微球, 从而在机体组织内具有不同的靶向性, 利用 PELA 包裹抗原物质可制备口服疫苗, 这种高分子具有抗酸作用, 微球口服后, 包裹物不受胃肠道消化酶及酸性的影响, 因此能够有效的运送抗原至粘膜部位, 由于 PELA 能够生物降解, 可以在粘膜局部保持抗原的缓慢释放, 保证抗原的长效全程刺激免疫系统, 而且实验还发现 PELA 抗原载体系统具有粘膜免疫佐剂效应。因此微球载体在疫苗免疫接种中呈现出广泛的应用前景。

本实验证明粒径在 6 μm 左右的 PELA 包裹物, 口服一周后, PELA 可在胃及肠道粘膜沉积下来, 具有良好的胃肠道靶向性。能够在 CT 下, 观察到明显的影像学改变, 说明局部肠道对微球具有较好的捕获作用。在国内外的类似的研究中, 多采用小型哺乳动物, 而本实验采用的小型猪, 其免疫系统和消化器官在解剖、组织、生理代谢等方面与人类极为相似的。通过对大型哺乳动物的研究, 尤其是粒径在 6 μm 左右的微粒胃肠道的靶向数据, 对聚合物的进一步人体实验具有一定的参考价值。在类似的研究中, 聚合物的示踪方法多采用荧光放射性标记法[4,5], 这种方法适用于局部、微观检测, 具有较高检出率等特点, 但是这种方法需要分批处死动物, 不利于动态观察结果。而本实验首创的造影剂示踪法, 能够从大体上动态观测聚合物的靶向作用, 并具有一定的灵敏度, 尤其它可活体观察的特点, 使该方法可能在 PELA 的缓释实验中, 对连续动态观察具有应用价值。

关键词: PELA; 靶向实验
中图法分类号: R914　　文献标识码: B

参考文献:

[1] Eldridge J H, Stass J A, Meulbroek J A, *et al*. Biodegradable microspheres ad vaccine delivery system[J]. Mol Immunol, 1991, 28(3): 287.

[2] Lim D W, Park T G. Stereocomplex formation between enantiomeeric PLA-PEG-PLA triblock copolymers: characterization and use as protein-delivery mecroparticulate cariers[J]. J Polym Sci, 2000, 75(2): 1 615—1 623.

[3] Hans K, Kricheldorf H R, Boettcer D, *et al*. Ploylactones: 2 3 polymerization of racemic and meso D, L-lactide with various catalysts stereo-chemical aspects[J]. Ploymer, 1992, 33(3): 2 817—2 824.

[4] Eyles J E, Williamson E D, Alpar H O, *et al*. Immunological responses to nasal delivery of free and encapsulated tetanus toxoid: studies on the effect of vehicle volume[J]. Int J Pharm, 1999, 189(1): 75—9.

[5] 张文彬, 贾文祥, 刘　聪, 等. 口服霍乱微球疫苗的制备极其靶向分布[J]. 华西医科大学学报, 1999, 30(1): 31—33.

(编辑　陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net