

3 种脂质体介导法转染大鼠小胶质细胞的比较研究

许期年¹, 王秀云¹, 左剑玲¹, 王 中^{2*}

(1 苏州大学附属第一医院, 江苏苏州 215006; 2 苏州大学附属第一医院)

摘要:目的 以 Lipofectamine™2000 为对照, 研究 GenEscort™ I 和 GenEscort™ III 在大鼠小胶质细胞中的转染效率及毒性。方法 分别采用 Lipofectamine™2000、GenEscort™ I 和 GenEscort™ III 为载体, 转染绿色荧光蛋白(GFP)标记的 siRNA 进入大鼠小胶质细胞。计算转染效率。采用磺基罗丹明 B 法(SRB)分析转染试剂对细胞的毒性, 并研究细胞传代次数、接种密度、脂质体与 siRNA 的比例及脂质体-siRNA 复合物形成时间等对脂质体转染效率的影响。结果 2~3 次细胞传代, 接种密度为 1×10^5 (24 孔板)、脂质体与 siRNA 比例为 1:2.5、脂质体-siRNA 复合物形成时间分别为 30 min 或 15 min, 转染效率最高。3 种不同脂质体介导的 GFP-siRNA 转染的大鼠小胶质细胞内均有 GFP 表达, 其最佳转染比例下转染效率比较为 Lipofectamine™2000 组 > GenEscort™ I 组 > GenEscort™ III 组 ($P < 0.01$); 3 种转染剂的细胞毒性比较为 Lipofectamine™2000 组 > GenEscort™ I 组 > GenEscort™ III 组 ($P < 0.01$)。结论 阳离子脂质体 GenEscort™ I 比 Lipofectamine™2000 细胞毒性低, 转染效率可, 是一种更为理想的小胶质细胞基因转染载体。

关键词:脂质体; 细胞转染; 转染效率; 小胶质细胞; 磺基罗丹明 B 法; 大鼠

中图分类号:R349.6 **文献标志码:**B **文章编号:**1002-266X(2011)04-0035-03

神经系统的细胞系包括神经细胞和神经胶质细胞, 相对于其他细胞系来讲, 是较难转染的一类细胞系。要想获得体内外的稳定转染, 需要不断摸索转染条件和转染剂的种类。2009 年 9~12 月, 我们以一种已在离体小胶质细胞上获得稳定转染的经典体外脂质体转染剂 Lipofectamine™2000 为对照, 研究阳离子脂质体 GenEscort™ I 和 GenEscort™ III 对大鼠小胶质细胞株的转染效率, 以期后续研究提供基础。

1 材料与方 法

1.1 材料 大鼠小胶质细胞株: HAPI 细胞株来源于美国宾西法尼亚州医学院神经解剖学实验室, 由南通医学院施建华博士惠赠。Lipofectamine™2000 (Invitrogen 公司, 美国)。DMEM 培养液 (Gibco 公司, 美国)。GenEscort™ I 和 GenEscort™ III (慧基生物, 南京)。通用型荧光标记的阴性对照 GFP-siRNA 由上海吉玛制药有限公司合成。Hoechst33258 (Sigma 公司, 美国)。抗荧光淬灭封片液 (碧云天生物, 江苏海门)。磺基罗丹明 B (SRB, ICN Biomedicals 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 永生化大鼠小胶质细胞的培养及分组 细胞复苏后, 用高糖 DMEM 培养基 (含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 U/ml 链霉素) 在细胞培养瓶中培养, 每 1~2 d 换液。转染时取对数生长期的细胞 (经实验摸索, 约在传代 2~3 次后达到) 接种于 24 孔板 (用于荧光显微镜拍照计算转染效率) 或 96 孔板 (用于细胞毒性实验), 加入不含抗生素的适量 DMEM 培养液 (含 10% 的胎牛血清) 继续培养 24 h。

1.2.2 转染细胞密度的优化 取对数生长期的细胞计数后分别接种于 24 孔板或 96 孔板稳定培养 24 h 后进行“伪”转染, 即只加入相同容量的细胞毒性较大的 Lipofectamine™2000, 分别于转染前即刻及转染 12 h 后光镜拍照, 以估算最合适的细胞接种密度。其中 24 孔板的接种梯度为: 0.5×10^5 、 1×10^5 、 2×10^5 ; 96 孔板的接种梯度为: 3×10^3 、 1×10^4 。每孔梯度组分别重复 4~6 复孔。

1.2.3 转染比例的优化 综合考虑 Lipofectamine™2000、GenEscort™ I 和 GenEscort™ III 转染剂要求, 结合我们以往的转染经验^[1], 分别选择脂质体 1 μ l 与相应剂量的 siRNA 混匀形成转染复合物, 使其终浓度分别为 40 nmol (1:4)、60 nmol (1:2.5)、80 nmol (1:2); 24 孔板, 终容积为 1 ml/孔。每孔梯度

基金项目: 江苏省医学重点人才培养资助项目 (RC2007081)。

* 通讯作者, E-mail: jyuansun@yahoo.com

组分别重复 4~6 复孔。

1.2.4 荧光显微镜拍照计算转染效率 24 孔板的细胞转染 12 h 后,在培养液中加入 Hoechst 33258 (终浓度 5 mg/L) 孵育 10 min 染核,用 DPBS 洗 3 遍后,4 ℃ 遮光预冷的丙酮固定 10 min, PBS 洗 3 遍,以特制的圆形盖玻片加抗荧光淬灭封片剂封片。速将细胞置于荧光显微镜下 (Olympus BX60) 观察转染效率,选择在激发波长为 488 nm 下观察 GFP 的绿色表达,在 594 nm 下观察 Hoechst33258 的蓝色表达,以 100 倍的视野为标准,两人同时独立估计相同视野下绿色荧光细胞数与蓝色荧光的总细胞数百分比,求 GFP 表达率。GFP 表达率(转染效率) = 发绿色荧光细胞数/发蓝色荧光的细胞总数。共计 5 个视野取其平均值。

1.2.5 细胞毒性实验 按照文献方法^[2]采用改良的 SRB 法进行各转染条件下转染复合物细胞毒性的测定。于酶联免疫检测仪 (BIO-RAD 公司,美国) 上选择最适波长 490 nm 读数测定光吸收值,并重复 3 次取平均值。每孔测量组分别重复 6~8 复孔。计算公式如下:细胞存活率 (%) = 实验组光吸收值/对照组光吸收值 × 100%。

1.2.6 统计学方法 采用 SPSS 16.0 软件处理数据,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞密度的优化结果 24 孔板中接种梯度为 1×10^5 的细胞生长状态最好,转染前细胞融合度高,且转染 12 h 后细胞贴壁生长仍疏密合适。而 0.5×10^5 密度细胞板中,转染前细胞密度偏低,且转染后由于转染剂的细胞毒作用漂浮了部分细胞,因此细胞转染 12 h 后细胞密度更低,细胞量更少,后续实验中的定量 PCR 和 Western blot 难以完成。 2×10^5 密度细胞板中,转染前细胞融合度已非常高,且很多孔中出现细胞堆叠生长并出现漂浮细胞的现象,因此在各孔细胞计数时容易出现误差。96 孔板的接种梯度为 1×10^4 的细胞密度最合适。此外,本研究在预实验中进行了部分转染条件的优化,发现经 2~3 次细胞传代,分别 30 min (LipofectamineTM2000) 或 15 min (GenEscortTM I 和 GenEscortTM III) 脂质体-siRNA 复合物形成时间,转染效率最高。

2.2 转染效率的优化结果 见表 1。

2.3 细胞毒性检测结果 见表 2。

3 讨论

基因转染技术关键在于选择合适的载体^[3-6],理想的基因载体应该在有效性和安全性上都能满足

表 1 各转染条件下的转染效率 ($\bar{x} \pm s$)

siRNA 浓度	Lipofectamine TM 2000	GenEscort TM I	GenEscort TM III
40 nmol	78.5 ± 3.5*	68.4 ± 4.2* [△]	32.1 ± 6.1* [△]
60 nmol	93.2 ± 9.3	78.3 ± 3.3 [△]	51.3 ± 5.2 [△]
80 nmol	82.3 ± 9.3*	70.2 ± 5.1* [△]	41.1 ± 3.4* [△]

注:与 60 nmol 组比较,* $P < 0.01$;与同浓度下 LipofectamineTM 2000 转染剂组比较,[△] $P < 0.01$

表 2 各转染条件下的细胞存活率 ($\bar{x} \pm s$)

siRNA 浓度	Lipofectamine TM 2000	GenEscort TM I	GenEscort TM III
40 nmol	75.6 ± 8.2*	97.9 ± 9.1 [△]	99.2 ± 5.7 [△]
60 nmol	69.7 ± 5.3	95.3 ± 3.8 [△]	96.2 ± 4.8 [△]
80 nmol	61.3 ± 9.5*	93.2 ± 10.1 [△]	94.3 ± 8.3 [△]

注:与 60 nmol 组比较,* $P < 0.01$;与同浓度下 LipofectamineTM 2000 转染剂组比较,[△] $P < 0.01$

基因治疗的要求。一种基因转染载体真正应用于基因治疗临床必须同时具有提高转染效率与降低毒性这两个特性。高效高毒的基因转染载体由于其毒性破坏了细胞的生存能力从而使其效率无法发挥,低效低毒的基因转染载体由于其效率低,而体现不出基因治疗相对于传统治疗的优越性。如本研究中所使用的目前应用最为广泛的脂质体 LipofectamineTM 2000,虽然具有较高的转染效率,但是细胞毒性却较大,因此不能用于体内实验,限制了其在临床及动物实验的应用。

多聚乙烯亚胺 (PEI) 是一种人工合成型阳离子脂质体多聚物,能与 DNA 通过静电吸附作用而自组装成纳米微粒,不但能保护 DNA 抵抗核酸酶的水解,也有利于细胞的内存作用。进口的 jetPEITM 是线性的阳离子脂质体多聚物,作为非病毒基因载体已应用于多种细胞系的转染^[1],但由于其价格昂贵,因此使用受到一定程度的限制。GenEscortTM 由一种分枝状 PEI 衍生物与其他组分复合而成,血清和抗生素不影响其转染效果,细胞毒性低,转染前后不需要更换培养基,不用去除转染试剂,可用于体内动物实验。其中 GenEscortTM I 对绝大多数贴壁细胞系具有较高的转染效率。GenEscortTM III 由可完全生物降解的超高分枝的 PEI 衍生物与其他组分复合而成,具有较 GenEscortTM I 更低的毒性。本研究发现,与 LipofectamineTM 2000 相比,GenEscortTM I 与 GenEscortTM III 只具有极其微弱的细胞毒性,而且 GenEscortTM I 的转染效率尚可 (最高可达 78.33%),是合适的可用于体内的转染剂。此外,本实验中用 SRB 法检测细胞毒性,与传统的 MTT 法测量相比,SRB 法克服了其成色反应的时间依赖性,同时不像 MTT 法具有严格的时间窗,提高了效

率并减少误差^[2]。

综上所述,阳离子脂质体 GenEscort™ I 细胞毒性低,转染效率可,应用方便,优势明显,是一种很有前景的体内外小胶质细胞基因转染载体。

参考文献:

[1] Lan LS, Ping YJ, Na WL, et al. Down-regulation of Toll-like receptor 4 gene expression by short interfering RNA attenuates bone cancer pain in a rat model [J]. Mol Pain, 2010,6:2.

[2] 周思朗,屈艳妮,张健,等. SRB 法与 MTT 法细胞计数应用比较 [J]. 中国现代医学杂志,2005,15(17):2615-2620.

[3] Lasic DD. Recent developments in medical applications of liposomes; sterically stabilized liposomes in cancer therapy and gene delivery in vivo [J]. J Control Release, 1997,48(2-3):203-222.

[4] 张红新,宋一民,高冬玲,等. VEGF-C siRNA 载体构建及其对转染食管癌细胞中 VEGF-C 表达的影响 [J]. 山东医药,2008,48(36):15-17.

[5] 蔡明,王国斌,陶凯雄,等. Survivin 靶向 siRNA 重组表达载体的构建和鉴定 [J]. 山东医药,2008,48(34):34-36.

[6] 田卫红,田芳,许培荣,等. p65 siRNA 联合顺铂对宫颈癌 HeLa229 细胞增殖及侵袭力的影响 [J]. 山东医药,2008,48(36):26-27.

(收稿日期:2010-03-11)

鼠 IL-2 基因的克隆及其杆状病毒表达载体的构建

黄大林¹,袁桂峰¹,王鑫²,李彬彬²,钟江^{2*}

(1 桂林医学院,广西桂林 541004;2 复旦大学)

摘要:目的 构建携带鼠 IL-2 基因的重组杆状病毒表达载体。方法 将目的基因鼠 IL-2 克隆入杆状病毒表达载体 pFastBacDual 中,构建重组质粒 pFB-CMV-IL-2 并予酶切和 PCR 鉴定;将 pFB-CMV-IL-2 转化到含杆状病毒穿梭载体 Bacmid 的 DH10Bac 感受态菌中,筛选阳性克隆,获得重组杆状病毒载体 Bacmid-pFB-CMV-IL-2,抽提质粒;用脂质体转染法将 Bacmid-pFB-CMV-IL-2 转染 Sf9 昆虫细胞包装病毒;收获完整重组杆状病毒,反复感染 Sf9 细胞扩增病毒,提取杆状病毒基因组,用 PCR 验证重组杆状病毒的正确性。结果 成功构建鼠 IL-2 基因杆状病毒表达载体。结论 本试验为进一步在哺乳细胞中表达鼠 IL-2 基因、开发研究 IL-2 奠定了基础,同时亦为其他蛋白质的真核细胞表达提供了方法参考。

关键词:白细胞介素 2;杆状病毒科;载体;质粒;小鼠

中图分类号:Q78;R373.9 **文献标志码:**B **文章编号:**1002-266X(2011)04-0037-03

杆状病毒是一类双链 DNA 大型病毒,能够感染 600 多种昆虫,可在感染的昆虫细胞中形成特征性的病毒包涵体。苜蓿银纹夜蛾多角体病毒(AcMNPV)是昆虫杆状病毒科核多角体病毒属的模式种,也是研究最多的杆状病毒。杆状病毒由于其自身的独特性使它成为一种新型的哺乳动物细胞基因表达和基因治疗的载体^[1]。上世纪 80 年代建立的杆状病毒-昆虫细胞表达系统已经成为一种最常用的真核细胞表达系统。但是感染病毒作为哺乳动物细胞基因转移载体也有一些缺点:在体内会引起补体反应;带入的表达框在哺乳动物细胞中可能被沉默;对

不同细胞的基因转移效率有很大差别。2009 年 11 月~2010 年 6 月,我们使用 Bac-to-Bac 系统成功构建鼠 IL-2 基因杆状病毒表达载体。现报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 采用 SPF 级 40 日龄的昆明小鼠进行试验,体质量(22.08 ± 3.00)g。采用拉颈法处死小鼠,无菌打开腹腔取出小鼠脾脏,使用 100 目细胞筛网制备脾细胞悬液,采用淋巴细胞分离液分离出淋巴细胞。

1.2 菌种和质粒 大肠杆菌 JF1125;昆虫细胞草地夜蛾卵巢组织细胞系 Sf9;苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(AcMNPV)、质粒 pFastBacDual 及 T-CMVp 等由复旦大学微生物学与微生物工程系钟江课题组实验室保存。

1.3 试剂 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶和碱性

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30770079)。

* 通讯作者,E-mail: jzhong@fudan.edu.cn