

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)16-1459-03

自制多聚胺阳离子脂质体转染效率及细胞毒性的评价

孙瑞琳¹ 金发光¹ 吴道澄² 吴红³ 刘彬⁴ 温德升⁴ (第四军医大学:¹唐都医院呼吸科 陕西 西安 710038,³药理学化学教研室,⁴口腔医院生物教研室 陕西 西安 710033,²西安交通大学生命信息学院 陕西 西安 710049)

Evaluation of transfection efficiency and cytotoxicity of self-prepared polyamine cationic liposome

SUN Rui-Lin¹, JIN Fa-Guang¹, WU Dao-Cheng², WU Hong³, LIU Bin⁴, WEN De-Sheng⁴

¹Department of Respiratory Diseases, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China, ³Department of Chemistry, School of Pharmacy, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China, ⁴Department of Oral Biology, Stomatological Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China, ²School of Life Science & Information, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China

【Abstract】 AIM: To evaluate the transfection efficiency and cytotoxicity of polyamine cationic liposome (PCL) prepared by ourselves. **METHODS:** PCL with polyamine cationic lipids TC-Chol and neutral phospholipid DOPE at a molar ratio of 3:1 was prepared, and PCL or Lipofectamine 2000 (as control) mediated by the plasmid PIRES2-EGFP was transfected into HeLa cells or Hep2 cells, and the expression of EGFP was determined by fluorescence microscope. The survival fraction was determined by MTT to evaluate the transfection efficiency and cytotoxicity after transfection. **RESULTS:** The transfection efficiency of PCL prepared with TC-Chol and DOPE at a molar ratio of 3:1 was a few lower than that of Lipofectamine 2000, but the cytotoxicity of the former was less than the latter. **CONCLUSION:** PCL has a sound transfection activity and less cytotoxicity compared with Lipofectamine 2000. It is shown to be promising for gene transfection and gene therapy.

【Keywords】 polyamine cationic liposome; preparation; transfect

【摘要】目的:评估制备的多聚胺阳离子脂质体转染哺乳动物细胞的转染效率及细胞毒性。方法:多聚胺阳离子脂质体 TC-Chol 与中性磷脂 DOPE 以 3:1 摩尔比,制备多聚胺阳离子脂质体,通过转染以增强型绿色荧光蛋白为报告基因的质粒

收稿日期 2006-03-10; 接受日期 2006-05-20

基金项目 陕西省社会发展计划项目(2003K10G55)

通讯作者 金发光。Tel:(029)84777425 Email:jinf@fmmu.edu.cn

作者简介:孙瑞琳,硕士生(导师金发光)。Tel:(029)84777725

Email:sunruilin213@163.com

PIRES2-EGFP 入 HeLa 细胞, Hep2 细胞, 倒置荧光显微镜下检测转染细胞的报告基因表达, 通过 MTT 法检测细胞存活分数, 并以 Lipofectamine2000 为对照, 评价制备阳离子脂质体转染效率及细胞毒性。结果:多聚胺阳离子脂质体转染效率略低于 Lipofectamine 2000, 但细胞毒性较低, 为一种相对高效低毒的阳离子脂质体。结论:多聚胺阳离子脂质体为一种相对高效低毒的阳离子脂质体, 在基因转染和基因治疗方面具有较广阔的前景。

【关键词】 多聚胺阳离子脂质体 制备 转染

【中图分类号】 R319; R914.3 **【文献标识码】** A

0 引言

基因治疗能否成功最重要的影响因素是基因转染载体。阳离子脂质体能与目的基因以静电作用相结合, 可携带的外源基因容量较大, 且不含抗原成分, 细胞毒性低, 可被机体降解, 能多次反复转染, 因此成为一种有临床应用潜力的基因转染载体^[1]。多聚胺阳离子脂质体 (polyamine cationic liposome, PCL) 易与核酸形成静电复合物而自由通过亲脂性膜, 因此, 是阳离子脂质体中效果较好的核酸运载体^[2]。本研究旨在以 Invitrogen 公司阳离子脂质体 Lipofectamine2000 为对照, 转染带有增强型绿色荧光蛋白 EGFP 质粒 PIRES2-EGFP 入 HeLa 细胞或 Hep2 细胞, 通过荧光显微镜观察报告基因的表达, 评价 PCL 的转染效率, 通过 MTT 法检测细胞存活分数, 评价自制 PCL 的细胞毒性。

1 材料和方法

1.1 材料 TC-Chol (Sigma), 二油酰磷脂酰乙醇胺 DOPE (Sigma), Lipofectamine 2000 (Invitrogen), 质粒 PIRES2-EGFP, 感受态细胞 DH5 α 均由我校免疫教研室杨安钢教授惠赠, 质粒微量抽提试剂盒 (安徽优晶生物工程有限公司), DMEM 培养基 (Gibco), 胎牛血清 (天津 TBD), 24 孔培养板 (Orange), 96 孔培养板 (Orange), MTT (Amresco)。

1.2 方法

1.2.1 PCL 的制备^[3-4] TC-Chol 溶于适量氯仿后, 分别与 DOPE 以 1:1 3:1 摩尔比混合, 在茄形瓶中振

荡摇匀使形成一层薄膜,真空除去有机溶剂,同时加 Heps (pH 7.8) 水浴超声约 5~10 min 制备 PCL,透射电镜检测后 4℃ 保存。

1.2.2 质粒 DNA 提取与纯化^[5] 质粒 PIRES2-EGFP 转化感受态细胞 DH5 α , 37℃, 200 r/min 摇菌过夜,质粒微量抽提试剂盒提取质粒,取少许稀释后,紫外分光光度计,以洗脱液为调零孔,测量 $A_{230\text{ nm}}$, $A_{260\text{ nm}}$, $A_{280\text{ nm}}$,以 $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}} > 1.5$, $1.8 \leq A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}} \leq 2.0$ 为合格质粒, -20℃ 保存备用。

1.2.3 体外细胞转染^[6-7] 转染前 1 d,胰酶消化 HeLa 细胞, Hep2 细胞并计数,按 $1 \sim 2 \times 10^5$ /孔接种于 24 孔培养板中,置 37℃, 50 mL/L 孵箱中培养使其在转染日密度为 80%。对于每孔细胞,使用 50 μ L 无血清 DMEM 培养基稀释 0.8 μ g 质粒,按照脂质体与质粒不同质量比分别用 50 μ L 无血清 DMEM 培养基稀释阳离子脂质体,每组 4 孔,在 10 min 内同稀释的质粒混合并静置 30 min,形成 PCL/DNA 复合物, Lipofectamine2000/DNA 复合物。用滴管吸去含血清培养基,用无血清 DMEM 培养基漂洗细胞 2 次,替换为 0.6 mL 无血清培养基,分别将复合物加入到每孔中,摇动培养板,轻轻混匀以使复合物充分散开。在 37℃, 50 mL/L 的 CO₂ 中孵育 5 h 后换含 100 mL/L 胎牛血清 DMEM 培养液。

1.2.4 基因转染效率测定 转染后 48 h,倒置荧光显微镜 (Olympus-IX71) 检测 EGFP 表达并计算转染效率:将转染后的细胞调整细胞密度 $100 \sim 200 \times 10^7$ /L 之间, 2.5 g/L 胰酶消化,血球计数板普通视野下计细胞数 A,换荧光下相同视野计荧光细胞数 a,计算转染效率(转染效率 = $a/A \times 100\%$)。

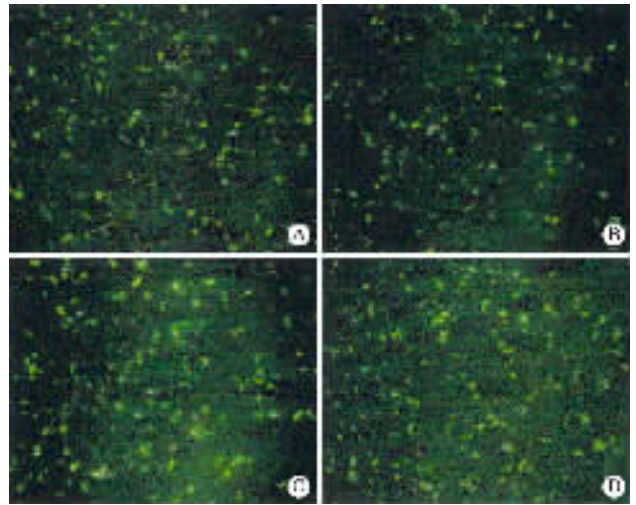
1.2.5 细胞毒性检测-MTT 试验 转染后 12 h 将各孔细胞分别吸出,按 1×10^4 /孔传至 96 孔培养板,至 48 h 每孔加入 5 g/L MTT, 37℃, 50 mL/L 的 CO₂ 中继续孵育 4 h 后将上清液吸弃并加入 DMSO,以无血清 DMEM 为调零孔,以未转染细胞为对照组,酶联免疫检测仪测 $A_{490\text{ nm}}$,并计算细胞存活分数(细胞存活分数 = 转染细胞 A/对照组细胞 A $\times 100\%$)。

统计学处理:采用 SPSS11.0 软件进行统计学分析,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用成组 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示有统计学差异。

2 结果

2.1 转染效率评价

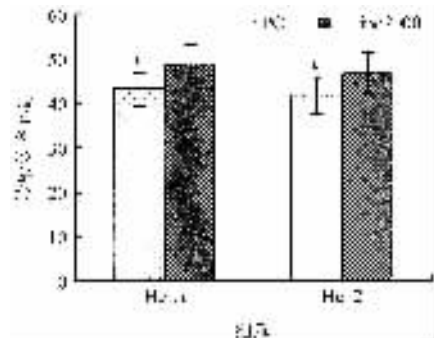
2.1.1 PCL 转染 HeLa 细胞、Hep2 细胞后 48 h 荧光显微镜观察(图 1)。



A: PCL 转染 HeLa 细胞后 48 h; B: PCL 转染 Hep2 细胞后 48 h; C: Lipofectamine 2000 转染 HeLa 细胞后 48 h; D: Lipofectamine 2000 转染 Hep2 细胞后 48 h。

图 1 PCL 或 Lipofectamine 2000 转染 PIRES2-EGFP 入 HeLa 细胞或 Hep2 细胞 $\times 10$

2.1.2 分别比较 PCL 与 Lipofectamine 2000 转染 HeLa 细胞, Hep2 细胞 48 h 后转染效率,结果表明, PCL 转染效率略低于 Lipofectamine 2000 ($P < 0.05$, 图 2)。



* $P < 0.05$ vs Lipofectamine2000 组。

图 2 PCL, Lipofectamine 2000 转染 PIRES2-EGFP 入 HeLa 细胞、Hep2 细胞转染效率比较

2.2 细胞毒性评价 MTT 法分别比较 PCL, Lipofectamine 2000 转染 HeLa 细胞 48 h 后存活分数,分别为 $(87.4 \pm 4.6)\%$ ($70.3 \pm 3.0\%$),经统计学分析,二者有显著性差异 ($P < 0.05$);检测 PCL, Lipofectamine2000 转染后 Hep2 细胞 48 h 后存活分数分别为 $(88.2 \pm 3.5)\%$, $(69.4 \pm 4.3)\%$,经统计学分析,二者有显著性差异 ($P < 0.05$)。结果表明, PCL 细胞毒性低于 Lipofectamine 2000。

3 讨论

影响基因转染效率的因素很多^[3],包括细胞种类、转染时间、载体结构、脂质体/DNA 复合物内部净电荷数量^[8]、脂质体粒径大小等方面。此外 Li 等^[9]认为脂质体 DNA 复合物中两者比例对基因转染效率也有重要的影响。我们在前期试验中制备四种 PCL,并按照 PCL 与 DNA 的不同质量比,通过转染质粒 PIRES2-EGFP 入 HeLa 细胞,检测转染后不同时间的转染效率和细胞存活分数,发现转染后 48 h 转染效率最高,阳离子脂质体与 DNA 结合比例为 3~4:1 时,同时筛选出相对高效低毒 PCL。

本研究利用前期制备并筛选出的 PCL,采用前期实验筛选的 PCL 与 DNA 比例、转染时间等参数,通过转染携带绿色荧光蛋白报告基因的质粒 PIRES2-EGFP 进入 HeLa 细胞、Hep2 细胞,通过荧光显微镜检测 EGFP 的表达,反映 PCL 的转染效率。研究发现,本实验制备的 PCL 转染效率略低于 Lipofectamine2000。

转染 HeLa 细胞、Hep2 细胞,前者转染效率较高,其机制尚不清楚,考虑可能与细胞摄取能力有关,但尚不能认为 HeLa 细胞摄取任何脂质体的能力均强于 Hep2 细胞。通过 MTT 法检测细胞存活分数,实验发现,转染后 48 h, PCL 组较 Lipofectamine 2000 组表现出较小的细胞毒性,考虑 PCL 同 Lipofectamine 2000 相比,其疏水基团前者为胆固醇,后者为两条长链脂肪酸链,而胆固醇成分同细胞膜结构成分类似有关,因此细胞毒性较小。同时有学者报道,多聚胺胆固醇阳离子脂质以胆固醇基团替代两条长链脂肪酸后,从而亲水基团与胆固醇基团形成“T”空间结构^[3],且与 DNA 形成的复合物更稳定^[10],从而提高由其组成的载体的转染效率。

综上所述,本实验中成功制备的 PCL[TC-Chol:DOPE 3:1(摩尔比)]具有转染效率较高、细胞毒性较小的特点,在基因治疗方面具有广阔的应用前景。

【参考文献】

- [1] Ropert C. Liposomes as a gene delivery system[J]. *Braz J Med Biol Res*, 1999, 32(2): 163-169.
- [2] Lee ER, Marshall J, Siegel CS, et al. Detailed analysis of structures and formulations of cationic lipids for high efficient gene transfer to the lung[J]. *Hum Gene Ther*, 1996, 7(14): 1701-1717.
- [3] Judith K, Guy C, Veeraiah B, et al. Novel polyaminolipids enhance the cellular uptake of oligonucleotides[J]. *J Biol Chem*, 1995, 270: 31391-31396.
- [4] Xiang G, Leaf H. A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, 179: 280-285.
- [5] J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 1992: 16-19.
- [6] Choi JS, Lee EJ, Jang HS, et al. New cationic liposomes for gene transfer into mammalian cells with high efficiency and low toxicity[J]. *Bio Chem*, 2001, 12: 108-113.
- [7] Kim YJ, Kim TW, Chung H, et al. The effects of serum on the stability and the transfection activity of the cationic lipid emulsion with various oils[J]. *Int J Pharm*, 2003, 252(1-2): 241-252.
- [8] 韩一生, 胡蕴玉, 金格乐, 等. 脂质体介导下重组 pcDNA3-Hbmp3 转染兔关节软骨细胞的条件[J]. *第四军医大学学报*, 2001, 22(11): 987-990.
- [9] Li W, Ishida T, Okada Y, et al. Increased gene expression by cationic liposomes(TFL-3) in lung metastases following intravenous injection[J]. *Biol Pharm Bull*, 2005, 28(4): 701-706.
- [10] F Natali, C Castellano, D Pozzi, et al. Dynamic properties of an oriented lipid/DNA complex studied by neutron scattering[J]. *Biophys J*, 2005, 88(2): 1081-1090.

编辑 袁天峰

欢迎投稿 欢迎订阅

《第四军医大学学报》是国内外公开征稿和发行的高级综合性医学学术期刊,曾荣获首届国家期刊奖,第二届国家期刊奖提名奖和百种中国杰出学术期刊,是中国各大检索系统源期刊,《中文核心期刊要目总览》收入期刊,美国化学文摘(CA)和俄罗斯文摘杂志(AJ)源期刊。本刊主要刊载基础医学、临床医学、预防医学、军事医学、口腔医学、航空航天医学、中医中药学、生物医学工程学方面的研究原著、研究快报、经验交流、病例报告、综述和述评等各类学术性中文文稿。

地址(710033)西安市长乐西路169号

电话(029)84774674, 84773456, 84773804, 84773814

传真(029)84774499

http://journal.fmmu.edu.cn

Email: edjfmumu@fmmu.edu.cn