

## 技术与方法

## 水压转染法在小鼠不同肝叶的表达效率

方方<sup>1,2</sup> 常玉巧<sup>1,2</sup> 李娜娜<sup>2</sup> 刘恒兴<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>新乡医学院人体解剖学教研室, 新乡 453003; <sup>2</sup>河南省组织再生重点开放实验室, 新乡 453003

**摘要** 为了解水压转染法(hydrodynamics-based transfection, HDT)在小鼠肝脏不同肝叶的转染效率, 将容量为小鼠体重的10%, 绿色荧光蛋白基因质粒pEGFP-C1含量为35  $\mu\text{g}$ /只的生理盐水溶液以0.4 mL/s的速度从小鼠尾静脉注射, 于注射后不同时间取小鼠各肝叶制备冰冻切片, 在荧光显微镜下观察, 计数各肝叶的绿色荧光蛋白表达情况。结果显示注射后12 h, 绿色荧光蛋白阳性细胞比例最高, 从24 h起表达量逐渐减少, 至48 h时各肝叶均基本难以检测出绿色荧光蛋白阳性细胞。在12 h观察各肝叶的转染效率如下: 右叶、蒂状叶的绿色荧光蛋白阳性细胞约为22%, 左叶、中叶、尾状叶约为15%, 取材部位不同会造成数据分析的极显著差异。

**关键词** 小鼠; 肝脏; 水压转染法; 增强型绿色荧光蛋白

质粒介导的外源基因体内表达是研究基因功能和进行基因治疗的基本方法, 具有制备简便、价廉、安全等优点, 是介导外源基因转移和表达的理想载体。小鼠尾静脉快速注射大量质粒介导外源基因肝脏表达的效率比常规方法如门静脉注射法提高了100~1 000倍<sup>[1-3]</sup>, 由于该方法介导的基因转染率和表达水平主要取决于质粒溶液在体内形成的瞬时液压, 因此被称为水压转染法(hydrodynamics-based transfection, HDT)。这种方法建立在常规尾静脉注射的基础上, 因此操作简单易于掌握, 对实验室硬件要求不高, 易于推广和使用, 目前被广泛应用于肝脏病理模型的构建、基因功能的研究、基因疫苗的研制等<sup>[4-6]</sup>。但我们在查阅文献时发现不同作者或/和不同实验室对于转染效率的描述大相径庭, 我们认为数据的差异可能来源于取材位置的不同, 小鼠肝脏有5片肝叶, 各肝叶转染效率是否存在差异尚未有人分析报道。为此, 本文探索了水压转染法在小鼠不同肝叶的表达效率。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物和仪器设备 实验用SD纯系小鼠由新乡医学院实验动物中心提供, 体重(20 $\pm$ 3) g。冰冻切片机为德国Leica公司生产的CM1850。荧光

显微镜为日本Nikon公司生产的ECLIPSE 80i。

1.1.2 质粒和主要试剂 质粒pEGFP-C1由新乡医学院生物化学与分子生物学教研室张继红赠送。质粒大量提取试剂盒D1110购自北京索莱宝科技有限公司, 生理盐水常规制备。

### 1.2 方法

1.2.1 水压法转染小鼠肝脏细胞 乙醚麻醉小鼠, 用脱脂棉球蘸取60~70  $^{\circ}\text{C}$ 的热水擦拭鼠尾, 使鼠尾表面的角质层软化和尾静脉充血, 将无菌注射器针头刺入距鼠尾1/3处的静脉内, 以注射容量为小鼠体重10%、质粒含量为35  $\mu\text{g}$ /只、注射速度为0.4 mL/s的标准将生理盐水—质粒溶液注入尾静脉。注射完毕后, 拔出针头, 用脱脂棉按住针眼处止血, 最后在针眼处涂抹红霉素软膏以防止感染。

1.2.2 绿色荧光蛋白在肝脏内表达情况监测 于尾静脉水压法转染后6, 12, 24, 48, 96, 144 h颈椎脱臼处死小鼠, 每个时间点各取5只, 分别于肝的右叶、左叶、中叶、尾状叶、蒂状叶取材, 并置于-20  $^{\circ}\text{C}$ 速冻, 然后用冰冻切片机制备7  $\mu\text{m}$ 冰冻切片, 在荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白表达量和计数绿色荧光蛋白阳性细胞数, 并按“视野中绿色荧光蛋白阳性细胞

收稿日期: 2011-06-16 接受日期: 2011-07-16

新乡医学院高层次人才(No.08SSKYQD-005)资助项目

\*通讯作者。Tel: 0373-3029051, E-mail: liuhengxing@hotmail.com

数/截面上总数细胞 $\times 100\%$ ”计算转染率,每个材料至少计数1 000个细胞。

## 2 结果

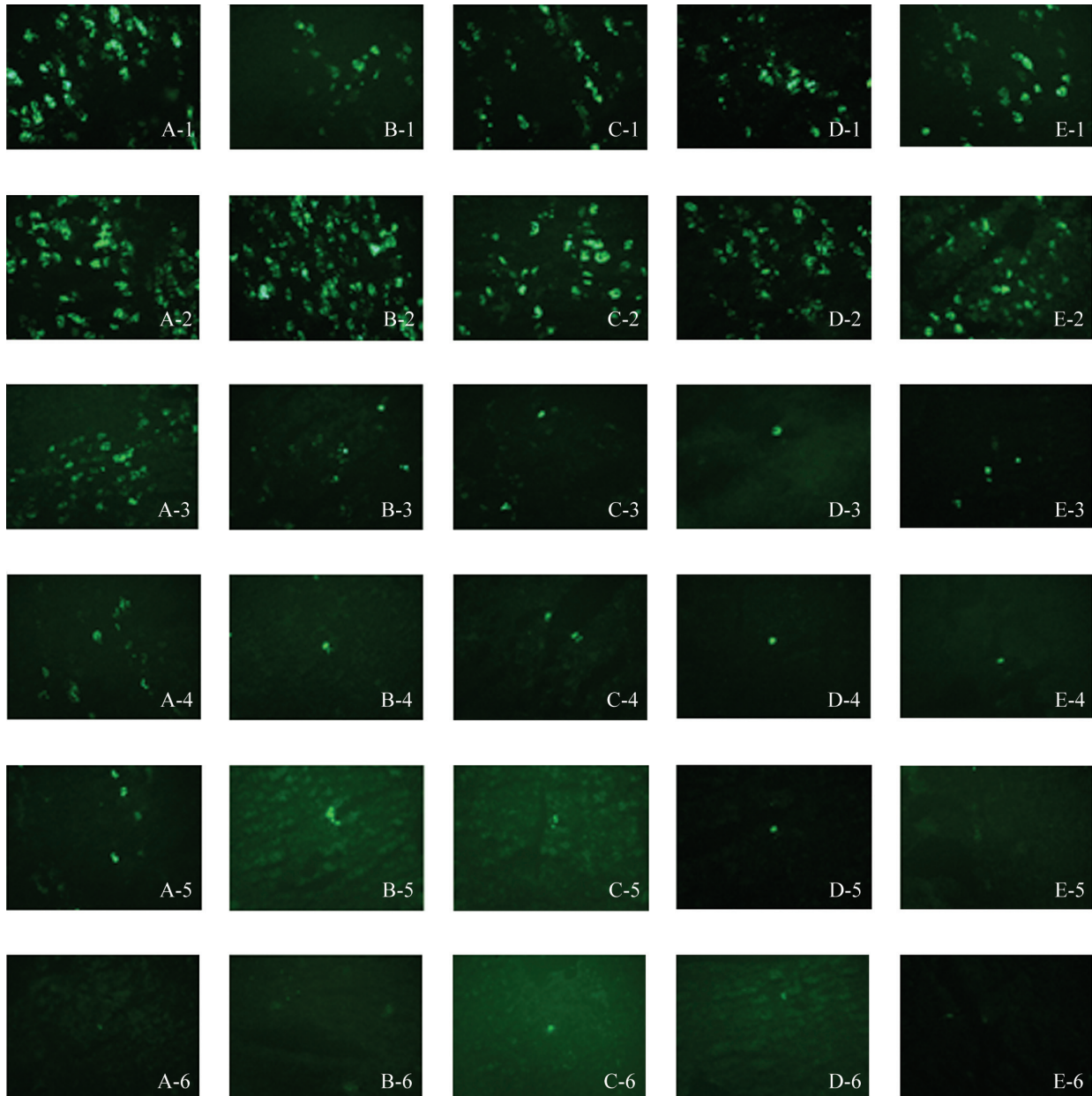
### 2.1 小鼠尾静脉水压法转染后绿色荧光蛋白表达的最佳观测时间

将小鼠于注射后6, 12, 24, 48, 96, 144 h处死,分

别取出肝右叶、蒂状叶、中叶、左叶、尾状叶,在荧光显微镜下观察。结果显示12 h绿色蛋白表达达到高峰,24 h后表达量急剧下降,48 h后几乎检测不到绿色荧光蛋白(图1)。

### 2.2 小鼠尾静脉水压法转染后各肝叶绿色荧光蛋白基因转染率

在最佳观测时间12 h对水压法转染小鼠的不同



A~E: 右叶、蒂状叶、中叶、左叶和尾状叶; 1~6: 6, 12, 24, 48, 96, 144 h 的表达变化水平。

A~E: right, pedicle, middle, left and caudate liver lobes, respectively; 1~6: the expression levels at 6, 12, 24, 48, 96 and 144 h.

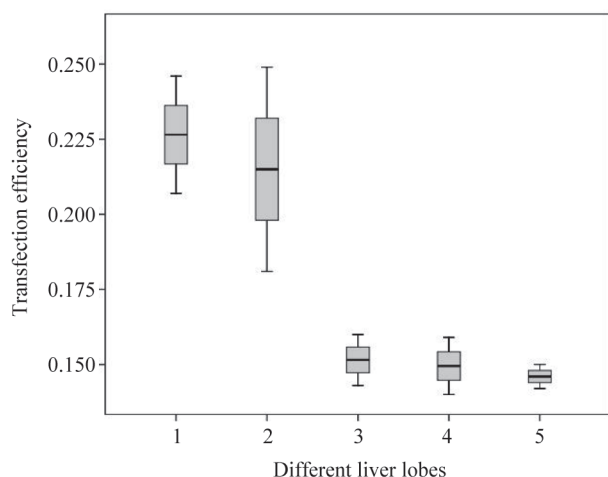
图1 尾静脉水压法转染后GFP基因在小鼠肝脏的表达变化(200 $\times$ )

Fig.1 Observation of the expression changes of GFP gene in mouse liver after hydrodynamics-based injection via tail vein (200 $\times$ )

肝叶取材, 荧光显微镜下观察。结果显示, 右叶转染率为 $22.7\% \pm 2.8\%$ , 蒂状叶转染率为 $21.5\% \pm 4.8\%$ , 中叶转染率为 $15.2\% \pm 1.2\%$ , 左叶转染率为 $15.0\% \pm 1.3\%$ , 尾状叶转染率为 $14.6\% \pm 0.6\%$ 。实验数据应用 SPSS 17.0 统计软件进行统计处理, 实验组之间的数据采用方差分析进行比较,  $P < 0.05$  视为存在显著差异,  $P < 0.01$  视为存在极显著差异(图2)。结果显示, 右叶、蒂状叶与中叶、左叶、尾状叶间转染率存在极显著差异。

### 2.3 小鼠尾静脉水压法转染后绿色荧光蛋白阳性细胞的体内分布

在最佳观测时间 12 h 对水压法转染小鼠的胃、



1~5: 右叶、蒂状叶、中叶、左叶和尾状叶。

1~5: right, pedicle, middle, left and caudate liver lobes, respectively.

图2 小鼠五片肝叶的转染率

Fig.2 The expression efficiency of transfection in mouse five liver lobes

十二指肠、盲肠、肾、脾、胰、脑等器官取材, 制备冰冻切片, 在荧光显微镜下观察它们的绿色荧光蛋白表达情况。结果表明, 除肝脏外, 其他器官均难以观察到绿色荧光蛋白。

### 3 讨论

本文发现外源质粒进入小鼠肝脏细胞后, 12 h 达到表达高峰, 24 h 以前可维持高表达水平, 此后迅速下降。其原因可能为: 水压转染法是基因的瞬时导入, 随着时间的推移质粒会逐步丢失, 能够看到绿色荧光蛋白的细胞逐步减少。如果想要利用此方法进行外源基因长时间表达, 可考虑多次注射或利用其它载体, 如病毒、壳聚糖纳米颗粒<sup>[3]</sup>等。

以往的研究侧重于注射液的容积、注射质粒的浓度、注射溶液的选择等基础条件的摸索, 尚未有人对各肝叶的表达情况进行分析报道。本文研究表明, 小鼠水压法转染后, 右叶和蒂状叶转染率较高, 中叶、尾状叶和左叶转染率较低, 经统计分析显示它们之间确实存在极显著差异。进行水压法转染时, 大体积的溶液通过尾静脉快速注入小鼠体内, 由于心脏在短时间内无法将如此大量的溶液从静脉运输到动脉完成循环, 因此, 在下腔静脉就产生了很高的静脉压力, 从而使肝静脉的血液倒流, 注射的质粒溶液也随即流入肝静脉<sup>[2]</sup>, 此静脉压力的大小直接与注射液的体积和注射速度有关, 注射液体积小、注射速度慢会降低转染率, 而注射液体积过大、注射速度过快则会导致动物死亡<sup>[1]</sup>。质粒溶液通过肝静脉逆流流入各肝叶的几率是相同的, 推测在进入质粒总量大致相等的情况下, 肝叶体积越大相对转染率就越低, 这也许是肝右叶、蒂状叶转染率高于左叶、中叶的原因。

实验证明不同肝叶的转染效率存在极显著差异, 因此, 取材时选择右叶或蒂状叶效果更佳。此外, 由于绿色荧光蛋白在肝脏中表达量最高, 因此水压转染法更适合用来研究肝脏。

### 参考文献 (References)

- Liu F, Song Y, Liu D. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther* 1999; 6(7): 1258-66.
- Zhang G, Gao X, Song YK, Vollmer R, Stolz DB, Gasiorowski JZ, *et al.* Hydroporation as the mechanism of hydrodynamic delivery. *Gene Ther* 2004; 11(8): 675-82.
- Centelles MN, Isasi JR, Qian C, Campanero MA, Irache JM. Influence of the chitosan nature on the transfection efficacy of DNA-loaded nanoparticles after hydrodynamic administration in mice. *J Microencapsul* 2010; 27(5): 460-9.
- Serruys B, Van Houtte F, Verbrugge P, Leroux-Roels G, Vanland-schoot P. Llama-derived single-domain intrabodies inhibit secretion of hepatitis B virions in mice. *Hepatology* 2009; 49(1): 39-49.
- Chen TH, Yeh CT, Ho YP, Hsu CM, Huang CC, Shiau SS, *et al.* Hydrodynamics-based transfection of pancreatic duodenal homeobox 1 DNA improves hyperglycemia and is associated with limited complications in diabetic mice. *Endocr J* 2009; 56(6): 783-90.
- Zhu HZ, Chen HY, Feng DM, Shen Q, Xue JL, Jia W. Eliminating bacteria backbone of naked DNA enhanced hFIX expression and reduced inflammatory response in mice. *Biomed Pharmacother* 2009; 63(2): 129-35.

## The Different Efficiency of Hydrodynamics-based Transfection in Mouse Liver Lobes

Fang Fang<sup>1,2</sup>, Chang Yuqiao<sup>1,2</sup>, Li Nana<sup>2</sup>, Liu Hengxing<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>*Department of Human Anatomy, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China;*

<sup>2</sup>*Tissue Regeneration Key Open Laboratory, Xinxiang 453003, China)*

**Abstract** To understanding the efficiency of hydrodynamics-based transfection method in mouse different liver lobes, we inject capacity of mouse weight 10%, content 35  $\mu\text{g}$  plasmid (pEGFP-C1, a kind of green fluorescent plasmid) each, and inject them with 0.5 mL/s, then collect mice' liver lobes at different time points after injection to make frozen section, finally observe and quantify the GFP expression with fluorescence microscope and count the expression of each lobe of liver. When one-off injection, the optimal conditions is that, at 12 h after injection, GFP-positive cells take on the highest proportion of above 20%; GFP begin to gradually reduce since 24 h, until 48 h almost no GFP-positive cells are seen in any liver lobe; briefly, under the above optimal condition, GFP expression in each liver lobe is described as follows: about 22% for right and pedicle lobe, about 15% for left, middle and caudate lobes, different part of materials can get very significant difference in transfection efficiency.

**Key words** mouse; liver; hydrodynamics-based transfection; EGFP

---

Received: June 16, 2011 Accepted: July 16, 2011

This work was supported by Xinxiang Medical University High-level Personnel Foundation of China (No.08SSKYQD-005)

\*Corresponding author. Tel: 86-373-3029051, E-mail: liuhengxing@hotmail.com