

非病毒载体介导的基因转染效率及其对人舌鳞癌细胞生长增殖的影响

刘习强¹, 黄洪章¹, 曾融生², 潘朝斌¹, 张彬¹

(中山大学 1. 附属第二医院口腔颌面外科, 广东 广州 510120, 2. 光华口腔医学院
广东 广州 510055)

摘要:【目的】观察多种非病毒载体介导增强型绿色荧光蛋白(EGFP)基因在舌鳞癌细胞内的表达情况,评价各载体的转染效率及其对细胞生长增殖的影响。【方法】采用 pEGFP-N1 评估阳离子脂质体、聚酰胺-胺型树枝状高聚物(PAMAM-D)以及 SuperFect 纳米微粒在舌鳞癌 Tca8113 细胞中的转染效率;绘制生长曲线,计算细胞的相对存活率,流式细胞仪检测细胞增殖与凋亡。【结果】第5代(G5)PAMAM-D 的转染效率明显高于第2代(G2)PAMAM-D (42.1% vs 19.4%, $P=0.003$),与 SuperFect 和脂质体转染组的结果无统计学差异(42.1% vs 35.9%和 42.1% vs 47.7%, $P > 0.05$)。G5 PAMAM-D 对细胞的生长增殖无明显影响($P > 0.05$),而脂质体转染组细胞的生长增殖受到明显的抑制($P=0.001$),细胞凋亡水平升高($P=0.01$)。【结论】G5 PAMAM-D 载体安全低毒,转染效率高,是一种有良好应用前景的新型纳米载体基因转移系统。

关键词:舌肿瘤;癌,鳞状细胞;基因转染;增强型绿色荧光蛋白;细胞增殖

中图分类号:R739.86

文献标识码:A

文章编号:1672-3554(2005)03-0285-04

Efficiencies of Several Non-viral Vectors-mediated Gene Transfection and Their Influence on Tongue Squamous Carcinoma Cells *In Vitro*

LIU Xi-qiang¹, HUANG Hong-zhang¹, ZENG Rong-sheng², PAN Chao-bin¹, ZHANG Bin¹

(1. Department of Oral & Maxillofacial Surgery, The Second Affiliated Hospital, 2. Guanghua College of Stomatology, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract:【Objective】To evaluate the gene transfection efficiencies of several non-viral vectors in tongue carcinoma Tca8113 cells, and to investigate their influence on biological behaviors of the tumor cells. 【Methods】The transfection efficiencies of polyamidoamine dendrimer (PAMAM-D), SuperFect and cationic Lipofectamine 2000 in Tca8113 cells were evaluated using PEGFP-N1. Moreover, multiple biological behaviors of the tumor cells such as growth and proliferating potential were also determined using growth curve depiction, MTT assay, and flow cytometry. 【Results】The transfection efficiency of the generation 5 (G5) PAMAM-D group was higher than that of the generation 2 (G2) PAMAM-D group (42.1% vs 19.4%, $P=0.003$) while had no statistical difference compared to SuperFect or cationic lipids group (42.1% vs 35.9% and 42.1% vs 47.7%, $P > 0.05$). The growth and proliferation activity of the tumor cells in G5 PAMAM-D group was not suppressed compared to untransfected group ($P > 0.05$), whereas in cationic lipids group was significantly inhibited in a dose-dependent manner ($P < 0.01$) and the apoptotic level was increased ($P=0.01$). 【Conclusions】G5 PAMAM-D can efficiently transfer reporter gene into Tca8113 cells with no significant cytotoxicity, suggesting its potential as gene delivery vector for tongue carcinoma gene therapy.

Key words: tongue neoplasms; neoplasms, squamous cell; gene transfer; enhanced green fluorescence protein; cell proliferation

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2005, 26(3):285-288]

收稿日期:2004-10-12

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30271423);广东省自然科学基金资助项目(21865)

作者简介:刘习强(1973-),男,湖南沅江人,博士生;黄洪章,导师。E-mail:liuxiqiang02@163.com

目前应用的基因转移系统主要有病毒载体和非病毒载体两大类。非病毒载体中,以阳离子脂质体应用最广泛,而纳米微粒则是近年来发展起来的最有前途的基因转移系统。体内外研究表明,阳离子脂质体和纳米微粒可以将人内皮抑素等目的基因有效转运至多种人类肿瘤细胞并发挥杀瘤效应^[1,2]。本研究以增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)为报告基因,分别应用阳离子脂质体、聚酰胺-胺型树枝状高聚物(polyamidoamine dendrimer, PAMAM-D)和 SuperFect 纳米微粒对人舌鳞癌 Tca8113 细胞进行基因转染,观察绿色荧光蛋白在细胞内的表达,评价各种非病毒载体的转染效率及其对肿瘤细胞生长增殖的影响,为舌鳞癌(tongue squamous cell carcinoma, TSCC)和其他口腔肿瘤的基因治疗寻找合适的新型载体。

1 材料和方法

1.1 细胞培养和质粒 pEGFP-N1 的制备

人舌鳞癌 Tca8113 细胞株由上海第二医科大学何荣根教授惠赠,本实验室保存。用含有 100 mL/L 胎牛血清(FCS)的 H-DMEM 培养基,普通培养箱中常规培养细胞。转染前 1 d 以每孔 2.5×10^4 个细胞接种 12 孔板,继续培养至细胞密度达 70%~80% 融合时进行基因转染。真核表达质粒 pEGFP-N1 由中山大学基础医学院药理教研室黎明涛教授惠赠。以 DH5 α 为宿主菌,对真核表达质粒 pEGFP-N1 进行转化、扩增和质粒抽提,直接测序和 *EcoR* I 单酶切琼脂糖凝胶电泳验证,紫外分光光度计测定质粒 DNA 的浓度和纯度。

1.2 转染复合物的制备

第 2 代(generation 2, G2)和第 5 代(generation 5, G5) PAMAM-D、SuperFect 和 LipofectamineTM 2000 分别购自美国 Dendritech 和 Gibco 公司;预实验摸索出最佳条件后,取 1.0 μ g 质粒加入 300 μ L Opti-MEM I 培养基中,混匀后置室温下孵育 10 min;另取等量 Opti-MEM I 培养基,然后分别按质量比 1:2 和 1:8 加入 G2 和 G5 PAMAM-D,按质量比 1:4 加入 SuperFect 或脂质体,将质粒与各载体溶液混合,振荡摇匀,室温下孵育 20 min 备用。

1.3 转染复合物粒径和 Zeta 电位的测定

取转染复合物溶液滴加在铜网支持膜上,自然干燥后把铜网浸入磷钨酸溶液中,静置约 2 min 后拿起铜网,待自然干燥后置于透射电镜(TEM)下观察。用动态激光散射仪(DLS)在波长为 660 nm,散射角为 90° 的条件下,测定各转染复合物的粒径,各样品重复测定 6 次,求均值及标准差;输入平均粒径,用 Zeta 电位分析仪测定相应的 Zeta 电位,相同条件下测定 6 次并求其均值。

1.4 基因转染和转染效率的测定

设立转染组、单纯质粒组(DNA)和对照组(单用 PAMAM-D)。各组平行设置 3 孔,重复 3 次。将生长至约 70%~80% 融合状态的细胞用 PBS 漂洗后,加入转染复合物,单纯质粒组和对照组加入等量 DNA 或 PAMAM-D。培养 2 h 后加入 500 μ L 含胎牛血清的 H-DMEM 培养基继续培养,每天在倒置相差荧光显微镜下对细胞中 GFP 的表达情况连续观察,光镜下观察细胞的形态变化、生长特点、移行方式以及培养基的改变,进行记录并拍照。在荧光显微镜下,计数至少 100 个细胞中发出绿色荧光的细胞,计算其所占百分比(转染效率)。各培养孔随机选取 3 个视野计数,求其平均值及标准差,比较各组间的转染效率。

1.5 生长曲线的绘制和细胞毒性检测

以每孔 1.5×10^4 个细胞接种 24 孔板,设对照组、脂质体和 G5 PAMAM-D 转染组。按上述方案转染。每天用 2.5 mg/mL 胰酶消化 4 孔细胞,台盼蓝染色后计数并求其均值,连续测定 7 d,绘制生长曲线。以每孔 3×10^3 个细胞接种 96 孔板,24 h 后按上述质量比转染细胞(质粒浓度分别为 0.5、1.0、2.0、4.0 和 6.0 μ g/mL),转染 3 d 后用四唑盐(MTT)比色试验检测细胞存活和生长情况,测定吸光度 A_{492} 值。每组设 7 个复孔,重复 3 次,按公式:相对存活率=(实验组 A_{492} 值/对照组 A_{492} 值) \times 100% 计算各组细胞的相对存活率。

1.6 细胞凋亡与增殖的检测

以每孔 6×10^4 个细胞接种 6 孔板,按上述方案进行基因转染(质粒浓度为 4 μ g/mL),继续培养 2 d 后收集细胞,PBS 重悬,体积分数 70% 的冰乙醇固定,-20 $^{\circ}$ C 下过夜。PBS 洗后加入 50 μ L RNA 酶(100 μ g/mL)消化 30 min,常规碘化丙啶(PI)一步法染色,4 $^{\circ}$ C 下避光放置 30 min,流式细胞仪(FCM)分析细胞周期改变及细胞凋亡指数(apoptosis index, AI)和增殖指数(proliferation

index, PI)。

1.7 统计学分析

所有实验数据均经 SPSS 11.0 for Windows 统计软件包进行分析处理, 多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 两组间比较采用 Student *t* 检验, 检验水平为 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 非病毒载体基因转移系统的理化特征

PAMAM-D 或 SuperFect 与 DNA 以最佳质量比混合, TEM 下观察复合物呈圆形或类圆形颗粒, 部分聚集成团, 微粒的平均直径约为 30~60 nm (图 1)。DLS 测得的 4 种转染复合物在水溶液中的平均粒径和 Zeta 电位见表 1, 可见, 脂质体/DNA 复合物的平均粒径明显大于其余 3 种复合物的平均粒径 ($P < 0.05$)。以最佳质量比混合后, G5 PAMAM-D/DNA 复合物的 Zeta 电位相对较小, 但与其余 3 种复合物间并无统计学差异 ($P > 0.05$)。



图 1 G5 PAMAM-D/DNA 复合物的透射电镜图像

Fig.1 G5 PAMAM-D/DNA complex observed under transmission electronic microscope ($\times 12\ 000$)

表 1 转染复合物在水溶液中的平均粒径和 Zeta 电位

Table 1 The average sizes and zeta potentials of the transfection complexes ($\bar{x}\pm s$)

Complex	<i>d</i> /nm	<i>U</i> _{Zeta} /mV
PAMAM-D G2/DNA	46±13	30.2±2.1
PAMAM-D G5/DNA	73±12	29.4±2.5
SuperFect/DNA	69±7	33.8±4.5
Lipid/DNA	173±51 ¹⁾	35.0±3.9

1) Compared with other groups, $P < 0.05$

2.2 转染效率测定及 EGFP 的表达

转染后 48 h 时的测定结果表明, G5 PAMAM-D 的转染效率 (42.1%) 明显高于 G2 PAMAM-D (19.4%, $P=0.003$), 与 SuperFect (35.9%) 和脂质体转染组 (47.7%) 的结果无统计学差异 ($P > 0.05$)。

G5 PAMAM-D 按最佳质量比转染后连续观察, 可见在 24 h 时细胞内已有 EGFP 表达, 此后表达渐多, 48 h 左右可获得最高转染效率, 72 h 时仍可维持较高的表达水平 (图 2)。用 G2 PAMAM-D 和 SuperFect 转染后, EGFP 的表达趋势与 G5 PAMAM-D 的观察结果大致相似, 而脂质体转染组的表达则稍有不同 (图 3)。

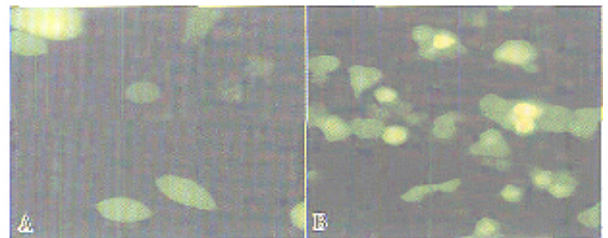


图 2 G5 PAMAM-D 介导质粒 pEGFP-N1 荧光表达

Fig.2 Expression of pEGFP-N1 mediated by G5 PAMAM-D under fluorescence microscope ($\times 200$)

A: 24 h; B: 48 h

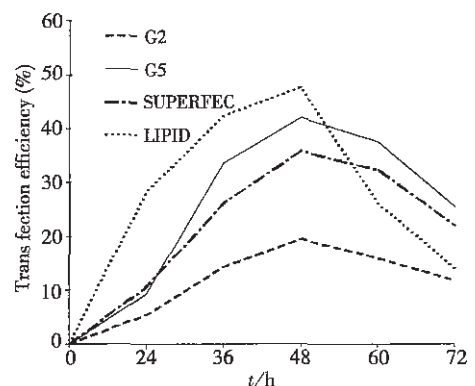


图 3 不同载体介导的基因转染效率的比较

Fig.3 Transfection efficiencies of various nonviral vectors in Tca8113 cells

2.3 生长曲线和细胞增殖、凋亡检测结果

G5 PAMAM-D 按最佳质量比介导不同浓度的 DNA 转染后, 细胞生长良好, 呈多角形, 单层贴壁, 核分裂相明显。绘制生长曲线图可知 G5 PAMAM-D 对细胞的生长增殖无明显影响 ($P > 0.05$)。脂质体对细胞的生长增殖呈剂量依赖性抑制; 当其浓度超过 16 $\mu\text{g/mL}$ (对应的质粒浓度为 4 $\mu\text{g/mL}$) 时, 会显著抑制细胞的生长增殖 (0.64 ± 0.07 vs 0.50 ± 0.06 , $P=0.001$)。转染 48 h 后, 由 FCM 检测结果可知 G5 PAMAM-D 组中处于 G0/G1、G2/M 和 S 期的细胞百分比以及细胞的增殖和凋亡指数都与对照组接近, G1 亚群峰 (凋亡峰) 很低 (见图 4)。脂质体转染组 G2/M 期细胞减少, AI 值显著高于对照组 (5.7 ± 2.4 , vs 1.3 ± 0.4 , $P=$

0.01), 而 PI 值低于对照组(42.5 ± 6.6 vs 57.8 ± 5.4 , $P=0.012$), 凋亡峰较明显(见图 4)。

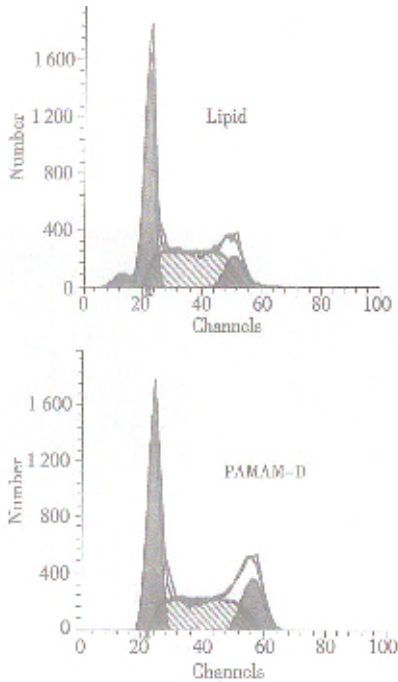


图 4 FCM 检测脂质体和 G5 PAMAM-D 转染 2 d 后细胞周期的改变

Fig.4 Cell cycle alterations of lipid or G5 PAMAM-D mediated gene transfection analyzed by FCM

3 讨 论

阳离子脂质体具有瞬时转染效率较高、无免疫原性和操作简便等优点, 是目前应用最为广泛的非病毒载体。本研究中应用阳离子脂质体 Lipofectamine 2000 介导 EGFP 基因瞬时转染 Tca8113 细胞, 获得了较高的转染效率; 但同时也发现, 当脂质体的终浓度超过 $16 \mu\text{g/mL}$ 时, 对细胞的生长增殖有明显的抑制作用。

与阳离子脂质体相比, 纳米载体具有毒性低, 可缓释、压缩和保护核酸, 易于进行表面修饰和较强的靶向输送能力等优势, 其应用前景更为看好。PAMAM-D 是一种人工合成的新型纳米材料, 最早由美国化学家 Tomalia 博士在 1985 年发明, 直径范围为 $1 \sim 11 \text{ nm}$ 。PAMAM-D 的合成步骤决定其精确的代数和体积, 代数越高, 表面胺基团数目倍增, 与核酸结合能力更强。在多种细胞系中^[3, 4]的研究显示, PAMAM-D 比其它阳离子载体(包括脂质体)介导基因的转染效率要高, 尤其在人和猴的肿

PAMAM-D, 有研究^[5]提示它所介导的基因转移效率要高于完整的 PAMAM-D 分子并认为与其结构灵活性的增加有关。

理论上讲, PAMAM-D 的代数越高, 转染效率越高, 但同时细胞毒性也越大。由于受自身理化性能以及多种转染条件的影响, PAMAM-D 的最佳转染效率在不同类型细胞中差异较大。从本实验结果可看出, PAMAM-D 和 SuperFect 与 DNA 形成复合物的平均粒径虽然明显小于脂质体; 但在最佳质量比条件下, 4 种转染复合物的表面 Zeta 电位之间并无统计学差异。进一步的研究表明, G5 PAMAM-D 的转染效率明显高于 G2 PAMAM-D, 但与 SuperFect 和脂质体的转染效率相类似。上述结果提示, 影响转染效率最根本的因素是转染复合物的表面 Zeta 电位。不同的载体只有按一定的质量比与 DNA 形成复合物, 在溶液中具有合适的表面电位, 才可获得最佳的转染效率。同时, 这也说明 PAMAM-D 介导的入胞机制与脂质体等非病毒载体相似。

本研究应用 EGFP 作为报告基因, 发现相比脂质体而言, PAMAM-D 具有缓释和低细胞毒性的优点。G5 PAMAM-D 和 SuperFect 的转染效率与脂质体大致相当, 而 G2 PAMAM-D 的转染效果则不够理想。综合来看, G5 PAMAM-D 载体安全无毒, 转染效率高, 是一种有良好应用前景的新型纳米载体基因转移系统。

参考文献:

- [1] 潘朝斌, 黄洪章, 侯劲松, 等. 人内皮抑素基因转染对舌鳞癌 Tca8113 细胞生长的影响[J]. 中华口腔医学杂志, 2004, 39(4): 273-6.
- [2] Wang YN, Boros P, Liu JH, *et al.* DNA/dendrimer complexes mediate gene transfer into murine cardiac transplants *ex vivo* [J]. *Mol Ther*, 2000, 2 (6): 602-8.
- [3] Eichman JD, Bielinska AU, Kukowska-Latallo JF, *et al.* The use of PAMAM dendrimers in the efficient transfer of genetic material into cells [J]. *Pharm Sci Technol Today*, 2000, 3(7): 232-45.
- [4] Haensler J, Szoka FC Jr. Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture [J]. *Bioconjug Chem*, 1993, 4(5): 372-9.
- [5] Teixeira LAK, Fricke CH, Bonorino CB, *et al.* An efficient gene transfer system for hematopoietic cell line using transient and stable vectors [J]. *J Biotechnol*, 2001, 88 (1): 159-65.