

流式细胞仪快速优化大鼠原代培养肝细胞基因转染

王金林¹, 闵 军¹, 魏 菁², 周晓东², 陈积圣¹

(中山大学附属第二医院 1. 肝胆外科, 2. 医学研究中心, 广东 广州 510120)

摘 要:【目的】用流式细胞仪 (FCM) 快速检测外源性血管内皮生长因子基因 (VEGF 基因) 在大鼠原代培养肝细胞转染表达, 根据结果优化其转染表达条件。【方法】以加强型黄色荧光素蛋白 (EYFP) 为标记, 用 FCM 快速检测重组质粒 pIRES-EYFP/VEGF₁₂₁ 在大鼠原代培养肝细胞中转染表达, 根据结果优化 pIRES-EYFP/VEGF₁₂₁ 转染表达条件。【结果】pIRES-EYFP/VEGF₁₂₁ 得以成功构建, 并转染大鼠原代培养肝细胞; 优化的转染表达条件: 在细胞数密度 0.1×10^6 /mL, 质粒孵育时间 30 min, 质粒与脂质体混合物孵育时间 15 min, 质粒与脂质体比例为 1:10, 转染时间 2 h, NAIR-1 作转染培养液时, 转染效率达 17.5%。【结论】以 EYFP 为标记, FCM 可简便快捷地检测并优化外源性 VEGF 基因在大鼠原代培养肝细胞转染表达, 可为研究 VEGF 基因修饰大鼠原代培养肝细胞移植和肝基因治疗打基础。

关键词: 流式细胞仪; 黄色荧光蛋白; 转染; 脂质体; 细胞, 培养的; 内皮生长因子

中图分类号: Q786

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2004)03-0237-04

Rapid Optimization of Gene Transfection in Rat Primary Cultured Hepatocyte by Using Flow Cytometry

WANG Jin-lin, MING Jun, WEI Jing, ZHOU Xiao-dong, CHEN Ji-sheng

(Department of Hepatobiliary Surgery, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】To rapidly examine exogenous VEGF genes transfection and expression in rat primary culture hepatocyte by using flow cytometry, and optimize the condition of exogenous VEGF genes transfection and expression according to the results. 【Methods】Recombinant plasmid pIRES-EYFP/VEGF₁₂₁ was transfected into rat primary cultured hepatocyte. The transfection and expression of which was rapidly examined by using flow cytometer (FCM) with enhanced yellow fluorescent protein (EYFP) as a marker. The condition of pIRES-EYFP/VEGF₁₂₁ transfection and expression were optimized on the based results. 【Results】pIRES-EYFP/VEGF₁₂₁ plasmid was constructed successfully and transfected into rat primary cultured hepatocyte. The transfection efficiency was 17.5% in condition as flow cell density 0.1×10^6 /mL, plasmid incubation time 30 min, plasmid and liposome incubation 15 min, plasmid and liposome ratio as 1:10, transfection time 2 h, NAIR-1 as transfection culture medium. 【Conclusion】Exogenous VEGF genes transfection and expression in rat primary cultured hepatocyte can be examined and optimized conveniently and quickly by FCM with EYFP as a marker. Based on the results, the condition of transfection and expression can be optimized. The background for rat primary cultured hepatocyte transplantation and liver-derived gene therapy would be established.

Key words: flow cytometer; yellow fluorescence protein; transfection; liposome; cell culture; endothelial growth factor

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2004, 25(3): 237-240]

收稿日期: 2003-11-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39670715); 国家教委博士点基金资助项目 (9947)

作者简介: 王金林 (1966-), 男, 江西南康人, 博士生, 主治医师, 现在广东省东莞市人民医院外科 (511700); 陈积圣, 教授, 博士生导师。

E-mail: wangjinlin@hotmail.com

以绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 基因作为报告基因可以对基因转染表达进行研究, 加强型黄色荧光蛋白 (enhanced yellow fluorescent protein, EYFP) 是一个野生型 GFP 黄绿色变种。本研究通过自行构建的携 EYFP 和人源性血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 双基因的真核表达载体, 以 EYFP 作为标记, 应用流式细胞仪 (flow cytometer, FCM) 对 pIRES-EYFP/VEGF₁₂₁ 质粒在大鼠原代培养肝细胞中转染表达、快速检测; 根据结果优化可能影响转染表达的各种因素: 细胞数密度、脂质体孵育时间、质粒 DNA 与脂质体混合物比例, 以及孵育时间、转染时间、转染培养液等。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 pcDNA3VEGF₁₂₁ 质粒由本室保存。阳离子脂质体转染试剂 CLONfectin 和质粒 pIRES-EYFP 购自美国 CLONtech 公司, pIRES-EYFP 为含有 IRES 和 EYFP 的基因载体, 在激发波长为 488 nm 或 513 nm 时发出黄色荧光; 内切酶 BamH I、EcoR I、EcoR V, 以及 T₄DNA 连接酶均为德国 Boehringer Mannheim 公司产品, Klenow 片段购自华美生物公司。

1.1.2 动物 同系成年雄性 SD 大鼠, 体重 200 ~ 250 g, 原中山医科大学实验动物中心提供。

1.1.3 分组 A 组为未转染阴性对照组, 以消除荧光本底的影响; B 组为 pIRES-VEGF₁₂₁ 质粒转染实验对照组, 以排除脂质体对自发荧光的影响; C 组为质粒 pIRES-EYFP/VEGF₁₂₁ 转染实验组; 各组细胞均来自共同灌注分离的大鼠原代培养肝细胞。

1.2 检测方法

1.2.1 重组质粒 pIRES-EYFP/VEGF₁₂₁ 构建、扩增、纯化和鉴定 将含 121 个氨基酸编码序列的 VEGF₁₂₁ cDNA 进行定向克隆插入质粒 pIRES-EYFP 中, 构建 pIRES-EYFP/VEGF₁₂₁。质粒扩增、纯化和酶切鉴定, DNA 测序, 质粒部分 DNA 序列分析结果与 GenBank 中 VEGF₁₂₁ cDNA 序列一致, 表明 pIRES-EYFP/VEGF₁₂₁ 构建正确^[1]; 质粒扩增、提纯、紫外分光光度计检测

后, 调整质粒质量浓度 $\rho(\text{pIRES-EYFP/VEGF}_{121}) = 1 \text{ mg/L}$ 。

1.2.2 原代肝细胞分离、培养 按改良原位胶原酶灌注法制备肝细胞悬液^[2], 离心、过滤, 用 Percoll 去除死的肝细胞, 肝细胞重悬于 NAIR-1 (日本通商产业省工业技术院产业技术融合领域研究所仿生组配方) 培养液中, 用 4 g/L 台盼蓝法检测肝细胞活力为 95%, 肝细胞数为 60×10^6 。按 $10 \times 10^3 \sim 0.5 \times 10^6 / \text{mL}$ 接种在 24 孔板, 培养 48 h。

1.2.3 质粒 pIRES-EYFP/VEGF₁₂₁ 转染大鼠原代培养肝细胞 参照 CLONfectin 使用说明和 Watanabe 等^[3]的方法, 用 CLONfectin 将 pIRES-EYFP/VEGF₁₂₁ 质粒转染到用 24 孔板培养的大鼠原代培养的肝细胞中: ①质粒 DNA 和 CLONfectin 按比例混合孵育, 用培养液稀释; ②将混合液加入大鼠原代培养肝细胞中, 孵育, 吸去转染液, 加入 NAIR-1 培养基继续进行原代培养。在质粒与脂质体混合物孵育温度为 37 °C, 质粒的质量浓度 $\rho(\text{pIRES-EYFP/VEGF}_{121}) = 1 \text{ mg/L}$ 时, 对细胞数密度 ($10 \times 10^3 / \text{mL}$, $50 \times 10^3 / \text{mL}$, $0.1 \times 10^6 / \text{mL}$, $50 \times 10^6 / \text{mL}$)、质粒孵育时间 (10、20、30、40 min)、质粒与脂质体混合物孵育时间 (10、12.5、15、17.5 min)、质粒与脂质体的比例 (1:1, 1:5, 1:10, 1:15)、转染时间 (1、2、3、4 h) 及转染培养液 (NAIR-1, DMEM) 等与大鼠原代培养肝细胞转染效率的关系分别进行研究。每组设 3 个复孔。

1.2.4 流式细胞仪检测基因转染表达、根据结果优化基因转染表达条件 转染后 48 h, 用荧光显微镜观察 EYFP 黄色荧光; 收集上清液经 Western blotting 检测 VEGF 浓度; 参照 Michelle 等^[4]方法在聚苯乙烯管中用 Hank's 液稀释重新摇悬大鼠原代培养肝细胞, 以 EYFP 为标记, 用 FCM (美国 BD 公司, FAC-SCalibur) 检测本底荧光、自发荧光和黄色荧光素蛋白荧光的强度; 分析计数发黄色荧光的转染阳性细胞个数, 确定质粒 pIRES-EYFP/VEGF₁₂₁ 转染效率。用装备有 15 mW、488 nm, 氩离子激光器的 FACScan™ 描记前向散射光 (forward scatter, FSC)、侧向散射光 (side scatter, SSC) 和黄色荧光 (FL1)。FSC 和 SSC 用于确定活细胞数, 设立 Gate_{R1}, 把单个细胞从细胞碎片中区分开, 收集 10 000 个细胞。质粒 pIRES-EYFP/VEGF₁₂₁ 转染效率用 CellQuest 软件 (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) 从实验组转染细胞黄色荧光 FL₁ 中减去实验对照组转染细胞自发荧光 FL₁ 而计算得出。

2 结果

荧光显微镜观察到发黄色荧光的转染阳性细胞, Western blotting 检测到培养上清液中分泌 VEGF₁₂₁ 质量浓度 $\rho(\text{VEGF}_{121}) = 10 \sim 20 \text{ ng/mL}$ 。

用 FCM 检测质粒 pIRES-EYFP/VEGF₁₂₁ 转染: 转染后 48 h, FACSscan™ 描记 FSC、SSC 和 FL1, 确定活细胞数, 设立 GateR1, 把单个细胞从细胞碎片中区分开; 检测各实验组肝细胞的荧光强度, 未发现本底荧光强度和自发荧光强度对质粒 pIRES-EYFP/VEGF₁₂₁ 转染肝细胞 EYFP 荧光强度产生明显影响。随着细胞密度增加, 转染效率升高, 随后转染效率下降; 质粒孵育时间 0.5 h 前, 转染效率随质粒孵育时间延长而升高, 随后下降; 质粒与脂质体混合物孵育时间 15 min 前, 转染效率随质粒孵育时间延长而升高, 随后下降; 质粒与脂质体比例为 1:10 及以下, 转染效率随质粒与脂质体比例升高而升高, 随后下降; CLONfectin 在转染过程中对血清无严格限制, 本研究所用的 NAIR-1 培养基含 $\varphi = 5\%$ 胎牛血清, 与 DMEM 培养基相比, 转染效率由 13.2% 升高到 17.5%。本研究用 FCM 优化转染过程, 在细胞数密度 $0.1 \times 10^6/\text{mL}$, 质粒孵育时间 30 min, 质粒与脂质体混合物孵育时间 15 min, 转染时间 2 h, NAIR-1 作转染培养液时, 转染效率为 17.5%。

虽然 CLONfectin 对大多数细胞是低或无毒, 但本研究发现, 质粒与脂质体比例和转染时间对细胞活性产生影响, 随着质粒与脂质体比例升高和转染时间延长, 转染效率升高, 但当脂质体浓度达到 30 mg/L 时或转染时间延长达 4 h, 细胞活力分别下降到 85% 和 82%。

3 讨论

肝脏是基因治疗的重要靶器官, 肝细胞的基因转导技术已在肝细胞移植增殖研究方面进行了有益的尝试^[5]。以大鼠原代培养肝细胞为靶点进行基因转染, 是研究肝细胞基因表达和肝细胞移植的重要手段。将 DNA 有效转染到肝细胞内是产生肝细胞稳定转化的第一步, 也是分析肝细胞暂时性基因表达的有用工具。

脂质体具有制备方便, 应用范围广, 毒性小, 免疫原性小, 且可以与抗体相连以进行 DNA 定向导入等, 其转染效率可与微注射法及电脉冲法相比拟, 但在原代培养的肝细胞用脂质体转染质粒 DNA 存在一定困难, 转染效率和表达水平较低, 特别是在大鼠。Watanabe 等^[3]在原代培养肝细胞中用脂质体转染 LacZ 基因, 在小鼠和仓鼠中见 LacZ 基因高效转染和表达, 而在大鼠中却未见 LacZ 基因的高效转染。因此, 在原代培养的大鼠肝细胞中高效地转染和表达质粒 DNA 并使之优化就显得尤其重要。

在基因转染过程中, 常用转染标志或报告基因检测转染效率, 诸如 LacZ, cat, 以及荧光素酶等, 涉及细胞固定、染色、孵化、摄影、计数染色细胞或细胞溶解、可溶性蛋白质提纯和分光光度计检测等, 通过分析转染细胞提取物中蛋白活力而间接检测基因转染表达; 以表达报告基因的细胞所占百分比(即阳性率)来衡量载体对不同细胞的基因转染效率, 这些方法工作量大, 存在人为误差, 检测繁杂, 需要较长时间, 无法衡量多重转染, 并且难于同时检测转染效率和表达水平。而荧光素蛋白质荧光能在活细胞中无创检测到。用 FCM 对荧光素蛋白表达进行分析成为一种基因转移定量常用方法^[6], 这种技术可以在不需要细胞固定和标本准备情况下, 同时进行外源性基因转染效率和表达水平快速检测。在转染后大约 48~60 h, 细胞仅在 Hank'S 液中就可以用 FCM 快速检测阳性细胞数比例以及在每一个细胞中荧光蛋白质表达水平。

以 GFP 基因为报告基因、通过 FCM 测定基因转染率和荧光指数, 避免了酶蛋白的存在与催化活性之间的差异, 大大增强敏感性; 克服了主观因素的影响, 提高了准确性, 减少了工作量; 克服了基因转染的多拷贝问题, 能更准确地反应基因转染效率和目的基因的表达效率。可用于比较不同转染条件对基因转染效率的影响; 将 GFP 基因与目的基因插入同一载体(或构建成融合基因)可直接检测目的基因的转移和表达效率^[7]。

本研究以 EYFP 为报告蛋白质, 用 FCM 检测 EYFP 发出黄色荧光的阳性细胞数以确定转染效率, 并对 EYFP 基因在大鼠原代培养肝细胞转染过程进行快速优化, 确定转染最佳条件。研究结果显示, NAIR-1 培养 48 h 后, 大鼠原代培养细胞数密度为 $0.1 \times 10^6/\text{cm}^2$, 质粒孵育时间 30 min, 质粒与

脂质体混合物孵育时间 15 min 时, 转染时间 2 h, 转染效率为 17.5%。虽然阳离子脂质体对细胞毒性小,但在大剂量时,不仅不经济,而且脂质体对细胞的活性也会产生毒性反应,转染时间过长,脂质体对细胞的活性也会产生毒性反应。

本研究中质粒 pIRES-EYFP/VEGF₁₂₁ 在原代培养大鼠肝细胞的转染效率达到 17.5%,可能与 NAIR-1 培养基中含有胎牛血清、胰高血糖素、表皮生长因子、胰岛素、甲状腺素、氢化可的松和转铁蛋白等可能提供适宜细胞因子微环境有利于分离肝细胞贴壁、存活或增殖,CLONfectin 对转染过程中对胎牛血清限制不严,有利于通过胞饮作用或浆膜融合等,使质粒转染效率提高。用 FCM 以荧光素蛋白质作为报告蛋白质是一种方便快捷同时检测基因转染效率和细胞平均表达水平的方法。为以大鼠原代培养肝细胞进行肝细胞移植和肝基因治疗的深入研究奠定基础。

参考文献:

[1] 王金林, 闵 军, 周晓东, 等. 加强型黄色荧光蛋白和 VEGF 双基因载体在肝细胞共转染表达 [J]. 中山医

科大学学报, 2002, 23(4):254-6.

[2] Zhou X D, Tokiwa T, Kano J, et al. Isolation and primary culture of adult pig hepatocyte[J]. Meth Cell Sci, 1998, 19(4): 277-84.
 [3] Watanabe Y, Nomoto H, Takezawa R, et al. Highly efficient transfection into primary cultured mouse hepatocytes by use of cation-liposome: an application for immunization [J]. J Bio Chem, 1994, 116(6): 1220-6.
 [4] Keith M B, Farrell P J, Iatrou K, et al. Use of flow cytometry to rapidly optimize the transfection of animal cells[J]. Biotechniques, 2000, 28(1): 148-54.
 [5] 王金林, 周晓东, 闵 军, 等. 血管内皮生长因子基因转染对肝细胞移植的影响[J]. 中华肝脏病杂志, 2001, 9(3): 175-7.
 [6] Tseng W, Haselton F R, Giorgio T D, et al. Transfection by cationic liposomes using simultaneous single cell measurements of plasmid delivery and transgene expression[J]. J Biol Chem, 1997, 272(41): 25641-7.
 [7] 刘然义, 罗慧玲, 冯海林, 等. 一种用流式细胞术检测基因转移效率的新方法[J]. 癌症, 2002, 21(3): 267-71.

(编辑 张敏瑞)

(上接第 220 页 from page 220)
 一级释药模型。有研究表明用于眼部的药物从其基质中 5 h 内释放小于 80% 有较好的缓释效果^[9], 可以认为哌仑西平脂质体是较好的眼用缓释制剂, 但其角膜通透性和药物代谢动力学及其生物利用度有待下一步研究。

总之,通过本法制得的哌仑西平脂质体包封率高、缓释作用可靠、稳定性好,符合设计要求。为下一阶段进行药物吸收,生物利用度等实验打下基础。

参考文献:

[1] 张 燕, 张旭明, 伍 卫. 哌仑西平对兔心肌梗死心率变异性、压力反射敏感性与心肌电生理特性的影响 [J]. 中山医科大学学报, 2000, 21 (5): 349-51, 383.
 [2] Tigges M, Iuvone P M, Fernandes A, et al. Effects of muscarinic cholinergic receptor antagonists on postnatal eye growth of rhesus monkey [J]. Opt Vis Sci, 1999, 76(6): 397-407.
 [3] Cottrill C L, McBrien N A, Annes R, et al. Prevention of form deprivation myopia with pirenzepine: a

study of drug delivery and distribution [J]. Ophthalmic Physiol Opt, 1999, 19(4): 327-35.

[4] 戴怡康, 诸仁远. 哌仑西平滴眼剂在兔房水中的药代动力学研究 [J]. 眼视光学杂志, 2002, 4(4): 228-9.
 [5] 李 岩, 孙殿甲. 均匀设计筛选甲苯咪唑微丸的处方工艺 [J]. 中国现代应用药学, 2002, 19(2): 121 -3.
 [6] 罗招凡, 刘剑雄, 范 侠. 丽丝胺罗丹明 B 脂质体两种制备方法的比较 [J]. 中山医科大学学报, 1999, 20(3): 封 3.
 [7] Takashi O, Hiroshi M, Kiyoshi H. Improvement of encapsulation efficiency of water-soluble drugs in liposome formed by the freeze-thawing method [J]. Chem Pharm Bull, 1985, 33(9): 3945-52.
 [8] 洪 民, 蔡 谨, 高 峰, 等. 脂质体包埋猪血红蛋白的制备及其注入小鼠体内的初步试验 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2001, 17(6): 772-6.
 [9] Pekka J, Krisriina J, Arto U, et al. The use of cyclodextrins in ophthalmic formulation of diprivenin [J]. Inter J Pharm, 1997, 153(2): 225-33.

(编辑 刘清海)