

阳离子脂质体介导的外源基因转染小鼠脾细胞的方法学探讨

何承伟¹, 梁念慈¹, 朱振宇², 何晓顺³, 黄洁夫³, 马涧泉²

(1. 广东医学院生物化学与分子生物学研究所, 广东 湛江 524023; 2. 中山医科大学生物化学教研室;

3. 中山医科大学附属第一医院器官移植中心, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】探讨高效阳离子脂质体介导外源基因转染体外生长的小鼠脾细胞的方法。【方法】用新型阳离子脂质体 DOSPER 包裹携带 *lacZ* 报告基因的质粒 pCAGGS-*lacZ* 按 3 种方法转染小鼠脾细胞, ①常规方法直接转染; ②脾细胞经刀豆球蛋白 A (Con A) 活化后再按常规方法转染; ③用黏附辅助脂质体法 (adhesion-assisted lipofection, AAL) 转染脾细胞。转染效率用 X-gal 染色法测定。【结果】上述 3 种方法的转染效率依次为 < 0.010 , 0.057 及 0.199 , 经方差分析, 3 种方法转染效率的差异有显著性 ($P < 0.01$, $n = 3$)。【结论】AAL 法介导外源基因转染体外生长的小鼠脾细胞的转染效率最高。

关键词: 脾/细胞学; 脂质体/遗传学; 阳离子; 转染/遗传学; 转染/方法

中图分类号: Q789 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2002)02-0087-03

Methodological Investigation of Foreign Gene Transferring Mouse Spleen Cells Mediated by Cationic Liposomes HE Cheng-wei¹, LIANG Nian-ci¹, ZHU Zhen-yu², HE Xiao-shun³, HUANG Jie-fu³, MA Jian-quan². [1. Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China; 2. Department of Biochemistry, Sun Yat-sen University of Medical Sciences (SUMS); 3. Organ Transplantation Center, First Affiliated Hospital, SUMS, Guangzhou 510089, China]

Abstract 【Objective】To investigate the high efficient methods of foreign gene transferring mouse spleen cells cultured *in vitro* mediated by cationic liposomes. 【Methods】Mouse spleen cells were transfected with *LacZ* reporter gene harbored plasmid pCAGGS-*lacZ* coated by cationic liposome DOSPER using the following three alternative methods: First, the spleen cells were transfected directly with plasmids/liposome complexes using conventional procedure; Second, Concanavalin A (Con A) stimulated spleen cells were transfected using routine method; Third, spleen cells were transfected using adhesion-assisted lipofection (AAL) method. The transfection efficiency was determined by X-gal staining method. 【Results】The transfection efficiency of the three methods were < 0.010 , 0.057 and 0.199 respectively. Statistical results of SNK Test showed significant differences ($P < 0.01$, $n = 3$) among the three groups. 【Conclusion】AAL mediated foreign gene transferring the *in vitro* cultured mouse spleen cells shows the highest efficiency.

Key words: spleen/cytology; liposomes/genetics; cations; transfection/genetics; transfection/methods

外源基因可通过病毒载体或非病毒载体两类方法导入真核细胞(转染)。阳离子脂质体(cationic liposome)是非病毒载体中应用最多的基因转染方法之一。阳离子脂质体的基因转染效率受脂质体成分, 细胞种类及实验条件等诸多因素的影响^[1]。常规的阳离子脂质体体外转染悬浮生长的细胞(包括脾细胞)或体内转染的效率往往低于 1%。因此探讨新的阳离子脂质体转染方法仍是当务之急。本研究比较了 3 种脂质体转染方案, 以寻求适合于体外培养小鼠脾细胞的质粒 DNA 转染方法, 为脾细胞及其他悬浮生长细胞的外源基因转染提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

昆明小鼠(20±2)g 由中山医科大学实验动物中心提供。NIH3T3 细胞由广东医学院生物化学与分子生物学研究所翁云老师惠赠。携带 *lacZ* 报告基因的质粒 pCAGGS-*lacZ*^[2] 由第二军医大学医学生物技术和分子遗传研究所陈坚老师惠赠。刀豆球蛋白 A (Con A) 为 SIGMA 公司产品。DOSPER 脂质体为 Boehringer Mannheim (Roche) 公司产品。X-gal 及 RPMI-1640 培养基为 GIBCO 公司产品。淋巴细胞分离液为华美生物工程公司产品。

收稿日期: 2001-10-03

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(963003)

作者简介: 何承伟(1972-), 男, 江西南康市人, 博士, 讲师。

1.2 脾细胞悬液的制备

取昆明鼠 1 只, 颈椎脱位处死后, 置于体积分数为 70% 乙醇中浸泡 5 min, 取出后右侧卧位, 消毒左侧背腹交界处皮肤, 无菌取脾脏置于盛有不含小牛血清的 RPMI-1640 培养基的平皿中, 洗去血迹, 剪去脂肪及筋膜组织, 于 200 目金属网筛上研压, 用 RPMI-1640 培养基冲洗, 收集网下的细胞悬液, 用尖咀吸管吹打使成单细胞悬液, 将细胞悬液缓慢铺于淋巴细胞分离液液面上, 注意使两种液体分层良好, 于水平离心机上 3 000 r/min 离心 20 min(TD5 型离心机, 离心半径为 12 cm)。吸取中间层单个核细胞, 用 RPMI-1640 培养基洗涤两次后, 配成所需浓度。

1.3 DOSPER 脂质体介导质粒 DNA 转染脾细胞

1.3.1 直接转染 用 RPMI-1640 培养基调整脾细胞浓度为 2.5×10^6 /mL, 于 24 孔培养板中每孔加 0.2 mL。用 HBS 缓冲液(20 mmol/L HEPES, pH 7.4, 150 mmol/L NaCl)稀释 0.5 μ g 含 *Lac Z* 报告基因的质粒 pCAGGS-lacZ DNA 至总体积为 10 μ L, 此为 A 液; 用 HBS 缓冲液稀释 2 μ L DOSPER 脂质体至总体积为 10 μ L, 此为 B 液。混合 A 液和 B 液, 轻摇混匀, 室温放置 15 min, 期间再轻摇混匀 5 次, 然后逐滴加入 24 孔培养板的细胞悬液中, 轻轻旋转培养板混匀, 于 37 $^{\circ}$ C, 体积分数为 5% CO₂ 孵箱中孵育 6 h 后, 移去培养基, 加入 2 mL 含体积分数为 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 完全培养基, 继续孵育至 48 h, 收集细胞作下一步转染效率测定试验。

1.3.2 质粒 DNA 转染 Con A 激活后的脾细胞

按上述方法制备脾细胞, 调整细胞浓度为 1×10^6 /mL, 加入 10 μ g/mL Con A, 孵育 48 h, 用 RPMI-1640 培养基洗涤两次, 重悬于 RPMI-1640 培养基中, 加入 24 孔培养板, 每孔 5×10^5 , 总体积为 0.2 mL, 按上述方法转染细胞。

1.3.3 黏附辅助脂质体法(adhesion-assisted lipofection, AAL) 转染脾细胞^[3] 0.1×10^6 /mL NIH3T3 细胞悬于 1 mL 含体积分数为 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 完全培养基中, 接种于 24 孔培养板中, 孵育 6 h, 使其形成单层贴壁细胞(约贴满总面积的 70%)。将 5×10^5 新鲜制备好的脾细胞悬于 1 mL RPMI-1640 完全培养基中, 铺于 NIH3T3 细胞上, 继续孵育 12 h 后, 吸去培养基, 用 RPMI-1640 培养基冲洗一遍, 加入 0.2 mL RPMI-

1640 培养基。按上述方法制备 DOSPER 脂质体/pCAGGS-lacZ 质粒 DNA 混合物并转染细胞。于 37 $^{\circ}$ C, 体积分数为 5% CO₂ 孵箱中孵育至 48 h, 吸去培养基, 用含 0.5 mmol/L EDTA 的 PBS 冲洗一遍, 加入 0.2 mL 2.5 g/L 胰蛋白酶和 0.2 mL 含 0.5 mmol/L EDTA 的 PBS 消化 5 min, 重悬于 2.5 mL RPMI-1640 完全培养基中, 转入 25 mL 小培养瓶, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h 左右, 收集悬浮生长的细胞, 将该细胞悬液转入另一培养瓶中, 37 $^{\circ}$ C 培养 2 h 左右, 再次收集悬浮生长的细胞, 然后按下述方法测定转染效率。

1.4 X-gal 染色法测定转染效率^[4]

细胞内 β -半乳糖苷酶基因(*lac Z*)的表达用 X-gal 染色法检测, 记数染成蓝色的(阳性)细胞的比例, 即转染效率。收集上述转染 pCAGGS-lacZ 质粒 DNA 的脾细胞于 eppendorf 离心管中, 用 PBS 洗 1 次, 加入 2.5 g/L 戊二醛 0.3 mL 固定 15 min, 用 PBS 洗 3 次, 用吸管移去上清液, 加入 0.3 mL X-gal 溶液(2.45 mmol/L X-gal, 5 mmol/L K₃Fe(CN)₆, 5 mmol/L K₄Fe(CN)₆, 1 mmol/L MgCl₂), 转入 24 孔培养板中, 37 $^{\circ}$ C 保温过夜, 显微镜下计数每 1 000 个细胞中染成蓝色细胞的比例。

2 结 果

阳离子脂质体 DOSPER 包裹的 pCAGGS-lacZ 质粒 DNA 直接转染脾细胞, 其转染效率 < 0.010 (图 1A)。脾细胞经 Con A 激活后再用 DOSPER/pCAGGS-lacZ 复合物转染脾细胞, 转染效率有所提高, 达 0.057 ± 0.021 (图 1B)。将悬浮生长的脾细胞接种在贴壁生长的 NIH3T3 细胞上, 再一同转染质粒 DNA (即 AAL 转染法), 转染 48 h 后两次贴壁去除 NIH3T3 细胞, 收集纯化的脾细胞, 作 X-gal 染色, 记数阳性细胞比例, 结果显示(图 1C), 转染效率达 0.199 ± 0.033 。经方差分析, 3 种方法转染效率有显著性差异 ($P < 0.01$, $n = 3$), 其中 AAL 法转染效率最高。

3 讨 论

外源基因导入细胞及表达的效率一直是制约基因治疗(包括反义 RNA 基因治疗)的重要影响因素之一^[5]。到目前为止, 还没有一种 DNA 转运方法既高效又方便、安全、实用, 现有的病毒载体及非病毒载体均有各自的优缺点。探寻新的更优越的

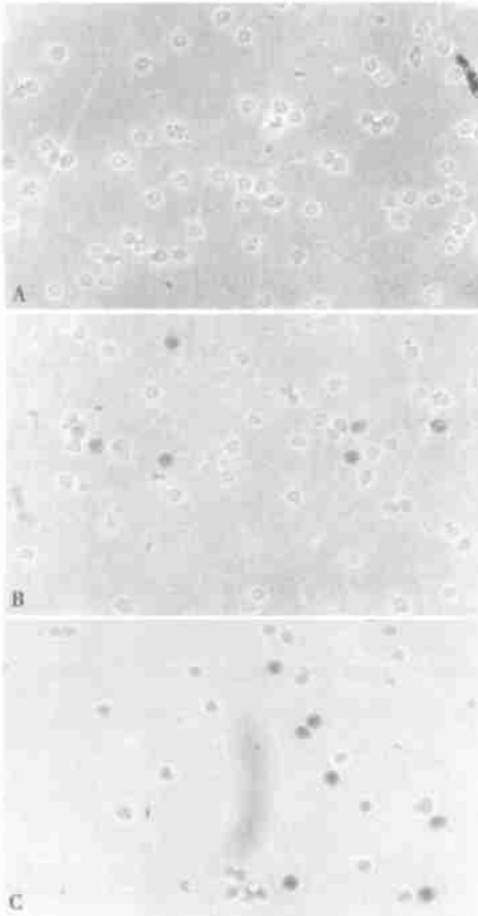


图1 用不同的方案作 DOSPER 脂质体介导 pCAGGS lacZ 质粒 DNA 导入脾细胞的转染效率测定

Fig. 1 Analysis of β -galactosidase expression in spleen cells after transfection with DOSPER/pCAGGS lacZ complexes by alternative strategies ($\times 100$)

A: Spleen cells were transfected directly; B: After stimulated by Con A, the spleen cells were transfected; C: Spleen cells were transfected using adhesion-assisted lipofection procedure

DNA 转运方法仍然是目前基因治疗基础研究领域的重要课题之一。病毒载体是目前应用最广泛也是效率最高的外源基因转运系统,但由于其可能存在的遗传毒性、免疫原性及难于象质粒那样大规模制备重组病毒而限制了他们的应用。由 Felgner^[6] 首创的阳离子脂质体载体没有遗传毒性和免疫原性,可以运载几乎任意大小的核酸分子,核酸分子被脂质体包裹后不易被核酸酶降解,脂质体可大规模地制备,储存和使用也很方便。用脂质体载体转染贴壁生长的细胞株可获得很高的转染效率(可达 90% 以上)。但对于原代培养的贴壁生长细胞,淋巴细胞及其他血细胞等悬浮生长的细胞用脂质体转染的效果却不尽人意,转染效率常低于 1%。本

文的实验结果也证实了这点。传统的观点认为,脂质体/DNA 复合物进入细胞的多少即代表其转染效率,但 Keller 等^[3] 的试验结果并不支持这种观点。他们将 pCMV β 质粒用脂质体转染悬浮生长的 TF1 细胞及贴壁生长的 NIH3T3 细胞,结果两种细胞内几乎有同样多的质粒 DNA,但经质粒转染后两种细胞内 β 半乳糖苷酶报告基因的表达水平却相差悬殊,在 NIH3T3 细胞内有高水平的表达,而在 TF1 细胞内则几乎检测不出报告基因的表达。说明细胞内质粒 DNA 的数量与目的基因的表达水平不呈正相关^[7]。后来 Keller 等将 TF1 细胞铺在 NIH3T3 细胞上共同孵育一定时间后再作常规的脂质体/pCMV β 转染,结果 TF1 细胞内 β 半乳糖苷酶的表达水平相当于 NIH3T3 细胞的 50%~80%。可见,悬浮生长细胞与贴壁生长细胞的黏附及进一步的相互作用对于外源基因在悬浮生长细胞内的高效表达是至关重要的。脂质体/DNA 复合体的摄入量并不是外源基因表达水平的决定因素,细胞是否有适合于外源基因高效表达的内环境才是关键所在。Dowty^[8] 和 Bebok 等^[9] 的实验结果也表明,即使所有细胞内均转染有重组质粒,但却只有少部分细胞有外源基因表达。细胞内究竟有那些因素影响和调控外源基因表达目前还不清楚,有待深入的研究。过去人们主要把注意力集中在如何提高 DNA 的转运效率上,现在看来应该把注意力转移到研究如何提高外源基因的表达水平及其调控机制上来了。

本研究对象是脾细胞。脾细胞为悬浮生长的细胞,用常规方法将脂质体/DNA 转染脾细胞,转染效率不到 1%。如果用该方法将目的基因转染脾细胞以作功能研究将是毫无意义的。王晓林等^[10] 先用植物血球凝集素(PHA)和 IL-2 刺激外周血淋巴细胞活化增殖 2 至 3 周后,再用常规脂质体转染法将 pBlaCZ 质粒导入细胞,转染效率可达 30% 以上。作者用类似的方法转染脾细胞,转染效率提高至 5.7%,仍不能满足一般实验的需要。后来参照 Keller 等^[3] 首创的黏附辅助脂质体转染法(AAL法)转染脾细胞,转染效率可达 19.9%。由于 X-gal 染色法检测转染效率的灵敏度有限,外源基因的实际表达水平可能比测定值高。但总的说来,转染效率仍太低,研究新的更高效率的基因转导方法及干预外源基因在宿主细胞内的表达环境仍是今后需努力的方向。

(下转第 93 页 to page 93)

时,染色图片输入全自动图像分析系统,测量神经细胞胞体大小和突起长度,从而定量地反映AA、DHA共同对海马神经细胞的细胞学效应。

本研究结果显示,一定浓度的AA或DHA具有促进培养海马神经细胞存活的作用,与许多研究报道^[7,8]一致。研究中发现,AA或DHA对培养海马神经细胞存活的作用的最佳有效浓度均为 $4\mu\text{mol/L}$ 。不同比例的AA和DHA对培养海马神经细胞生长发育的作用的结果显示,当无血清培养液中添加AA和DHA的总浓度为 $4\mu\text{mol/L}$,比例为2:1和4:1组的海马神经细胞的活力、胞体面积、最大长径、最大短径以及平均突起长度均高于单独添加AA、DHA和对照组。由此表明,与单一添加AA或DHA相比,AA和DHA的适宜比例具有更好地促进海马神经细胞生长发育的作用。

神经发育最重要的步骤之一是形成细胞间连接的庞大网络。神经突触作为大脑神经活动微观联络枢纽,反映到功能上表现为脑神经功能发育逐渐成熟,宏观上可能增强机体高级学习能力。海马与大鼠空间记忆以及海马分支程度与海马突触密切相关^[10,11]。海马神经细胞活力增强、胞体的增大、突起的生长和延长,可以增加海马区突触的密度,加速神经细胞之间枢纽的形成。因而,AA和DHA对海马神经细胞的细胞学效应,可看作是AA、DHA提高智力、增强学习能力的细胞形态学基础。本研究进一步说明了AA和DHA的同时补充,对神经系统的发育和功能具有重要意义。

参考文献:

- [1] Raygada M, Cho E, Hilakivi-Clarke L. High maternal intake of polyunsaturated fatty acids during pregnancy in mice alters offspring's aggressive behavior, immobility in the swim test, locomotor activity and brain protein kinase C activity[J]. J Nutr, 1998, 128(12): 2505.
- [2] Birch E E, Hoffman D R, Uauy R, et al. Visual acuity and the essentiality of docosahexaenoic acid and arachidonic acid in the diet of term infant[s] J]. Pediatr Res, 1998, 44(2): 201.
- [3] Lauritzen I, Blondeau N, Heurteaux C, et al. Polyunsaturated fatty acids are potent neuroprotectors[s] J]. J EMBO, 2000, 19(18): 1784.
- [4] Birch E E, Garfield S, Hoffman D R, et al. A randomized controlled trial of early dietary supply of long-chain polyunsaturated fatty acids and mental development in term infants[s] J]. Dev Med Child Neurol, 2000, 42(3): 1741.
- [5] 韩宏裕, 苏宜香. $C_{20:4}$ 和 $C_{22:6}$ 对早产儿视功能和认知功能的影响[J]. 中山医科大学学报, 2001, 22(1): 64.
- [6] 韩宏裕, 苏宜香, 谭炳炎. $C_{20:4}$ 和 $C_{22:6}$ 对早产儿脂肪酸状况和生长的影响[J]. 营养学报, 2001, 23(1): 52.
- [7] Okuda S, Saito H, Katsuki H. Arachidonic acid: toxic and trophic effects on cultured hippocampal neurons[J]. Neuroscience, 1994, 63(3): 691.
- [8] Rotstein N P, Politi L E, Aveldano M I. Docosahexaenoic acid promotes differentiation of developing photoreceptors in culture[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1998, 39(13): 2750.
- [9] 赵金萍, 丁爱石, 刘玉辉, 等. 二十二碳六烯酸对神经细胞生长发育的作用[J]. 营养学报, 2001, 23(2): 106.
- [10] 姚志彬, 徐造成. GABA能突触在海马CA1锥体细胞树突分支点和棘颈处的分布[J]. 中山医科大学学报, 1998, 19(1): 42.
- [11] 周丽华, 姚志彬, 陈以慈, 等. 单侧穹隆伞损伤对老年大鼠空间记忆及海马胆碱能纤维的影响[J]. 中山医科大学学报, 1996, 17(1): 16.

(编辑 张恩健)

(上接第89页 from page 89)

参考文献:

- [1] Egilmez N K, Yoshimi I, Richard B B. Evaluation and optimization of different cationic liposome formulation for *in vivo* gene transfer[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1996, 221(1): 169.
- [2] 陈坚, 刘小萍, 曹韞旭, 等. 两个不同启动子在cos7细胞中转录效率的比较[J]. 中国生物化学与分子生物学学报, 1998, 14(4): 467.
- [3] Keller H, Yunxu C, Marit G, et al. Transgene expression but not gene delivery, is improved by adhesion-assisted lipofection of hematopoietic cells[J]. Gene Ther, 1999, 6(5): 931.
- [4] Bagnis C, Cosset F L, Samarut J, et al. Leukemogenicity of v-myb-transformed monoblasts cells can be modulated by normal bone marrow environment[J]. Oncogene, 1993, 8(3): 737.
- [5] Felgner P L. Nonviral strategies for gene therapy[J]. Sci Am,

1997, 276(6): 102.

- [6] Felgner P L, Gadek T R, Holm M, et al. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84(21): 7413.
- [7] Fasbender A, Marshall J, Moninger T O, et al. Effect of co-lipids in enhancing cationic lipid-mediated gene transfer *in vitro* and *in vivo* [J]. Gene Ther, 1997, 4(7): 716.
- [8] Dowty M E, Williams P, Zhang G, et al. Plasmid DNA entry into postmitotic nuclei of primary rat myotubes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(10): 4572.
- [9] Bebok Z, Abai A M, Dong J Y, et al. Efficiency of plasmid delivery and expression after lipid-mediated gene transfer to human cells *in vitro* [J]. J Pharmacol Exp Ther, 1996, 279(3): 1462.
- [10] 王晓林, 曹熙芳, 沈关心. 体外培养淋巴细胞基因转移的实验探讨[J]. 免疫学杂志, 1996, 12(3): 152.

(编辑 张敏瑞)