

文章编号: 1000-5013(2010)01-0049-04

脂质体转染人肝星状细胞和肝细胞条件优化

吕颖慧, 王启钊, 刁 勇, 许瑞安

(华侨大学 分子药理学研究所, 福建 泉州 362021)

摘要: 利用 Lipofectamine 2000 (Lipo) 介导 LacZ 及 EGFP 基因转染人肝星状细胞系 LX-2 和人肝细胞系 Chang Liver, 探讨 Lipo 用量、质粒用量、转染时间、细胞初始接种密度及不同启动子驱动对转染效率的影响。结果显示, 两种细胞均能得到高效转染, Chang Liver 细胞转染效率 ($> 80\%$) 高于 LX-2 细胞 ($> 60\%$)。Lipo 用量为每孔 $2\ \mu\text{L}$, 转染后 6 h 换液, LX-2 细胞应用质粒 DNA 为每孔 $0.45\ \mu\text{g}$, Chang Liver 细胞应用质粒 DNA 为每孔 $0.30 \sim 0.45\ \mu\text{g}$, 此时转染效率最高。巨细胞病毒 (CMV) 启动子驱动 LacZ 转染效率与 CMV 早期增强子/鸡 肌动蛋白 (CAG) 启动子驱动增强型绿色荧光蛋白 (EGFP) 转染效率无显著差异; 细胞初始接种密度对转染效率无显著影响。

关键词: 脂质体; 肝星状细胞; 肝细胞; 转染效率

中图分类号: Q 753

文献标识码: A

体细胞基因转导技术的建立, 使在细胞水平研究基因功能及相互作用成为可能, 并且促成了基因运载工具的快速研发。病毒载体在基因转导方面具有得天独厚的优势, 尤其是腺相关病毒载体, 具有靶向性、效率高、表达持久、免疫原性低等优势, 被广泛应用于体内基因转导实验中^[1-2]。但是, 应用腺相关病毒作为载体必须将目的基因制备成相应的病毒, 生产周期相对较长且有一定的技术难度, 对于细胞水平大量基因的功能筛选与评估有一定局限性。脂质体作为技术较为成熟的非病毒载体可作为有效替代物。脂质体介导的细胞转染是通过脂质体 DNA 复合物与细胞融合将 DNA 导入细胞, 具有高效、简便、对细胞损伤小和容易重复等优点, 但其转染效率很大程度上取决于细胞类型及各种不同转染参数的选择^[3]。Invitrogen 公司的 Lipofectamine 2000 已被成功用于多种细胞的转染中, 不但可用于 DNA 的转染, 还可用于 siRNA, miRNA 等小分子核苷酸的转染^[4-5]。本文选用可转染性人肝星状细胞系 LX-2^[6] 与人正常肝细胞系 Chang Liver, 摸索 Lipofectamine 2000 对这两种细胞的最优转染条件。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞及质粒 人肝星状细胞系 LX-2 (美国标准生物制品收藏中心), 人肝细胞系 Chang Liver (上海复旦大学); LacZ 质粒 (pAAV-CMV-LacZ 质粒) 与 EGFP 质粒 (pAAV-CAG-EGFP 质粒) 为本实验室构建并保存。

1.1.2 试剂 Lipofectamine 2000 (Lipo), Opti-MEM 培养基 (美国 Gibco 公司); DMEM 高糖培养基、胎牛血清 (FBS)、青链霉素混合液 (双抗) 试剂 (美国 Hyclone 公司); 胰蛋白酶 (美国 Amresco 公司); 质粒大量提取试剂盒 (Tip500, 荷兰 Qiagen 公司); 四甲基偶氮唑盐 (MTT) 试剂, X-gal (购自美国 Sigma 公司); 其他生化试剂均为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 质粒的提取 LacZ 质粒与 EGFP 质粒转化大肠杆菌 DH-5。扩大培养后, 采用 Qiagen-Tip500

收稿日期: 2009-04-19

通信作者: 许瑞安 (1948-), 男, 教授, 主要从事重大疾病基因治疗的研究。E-mail: ruiyanxu@hqu.edu.cn.

基金项目: 厦门市科技计划项目 (3502Z20053046); 泉州市科技计划项目 (2007Z41); 华侨大学高层次人才科研启动项目 (09BS516)

试剂盒提取质粒,用紫外分光光度计测定浓度,用 D-Hanks 缓冲液将质粒稀释至 $75\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,过滤灭菌备用.

1.2.2 转染 细胞接种于 24 孔培养板,转染前用无双抗培养基(DMEM + 10 %FBS)培养 12 ~ 24 h.转染时,用 Opti-MEM 培养基分别将 Lipo 及质粒稀释至相应浓度,等体积混合二者并孵育 20 min.此间,更换培养板中的培养基为无血清 Opti-MEM(洗一遍,每孔 500 μL).每孔加入 100 μL 质粒-Lipo 混悬液,晃动培养板使其分布均匀,转染一定时间后换为 DMEM + 10 %FBS 继续培养.

1.2.3 转染效率检测及计算方法 LacZ 质粒转染的细胞进行原位 β -半乳糖苷酶染色^[7],光镜观察并照相;EGFP 质粒转染的细胞于 Nikon TE-2000U 型荧光显微镜蓝色激发光激发.每种转染条件均做 3 个平行,分别随机拍摄一个视野,每张照片计数 4 个 $5\text{ cm}\times 5\text{ cm}$ 的区间转染效率.其中:区间转染效率(T_i)为表达 β -半乳糖苷酶或 EGFP 的阳性细胞数在视野内总细胞数的百分比,而转染效率(T)为 12 组区间转染效率的平均值 \pm 其标准偏差.

1.2.4 MTT 检测 达到既定时间后,每孔中加入 50 μL $5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ MTT,继续培养 4 h.终止培养后,吸弃培养液,每孔加入 500 μL 的 DMSO,震荡使结晶物充分溶解,于酶标仪 492 nm 处测光密度值(D),以 630 nm 做参比波长.相对增殖率(γ)为转染组的吸光值与未转染对照组的吸光值的百分比.

1.3 数据统计

所有数据用均值 \pm 标准偏差表示,并经 Student's t -test 检验显著性差异.其中: $p < 0.01$ 为极显著差异, $p < 0.05$ 为显著性差异.

2 实验结果

2.1 Lipo 用量对转染效率的影响

Lipo 用量(V_{Lipo})对 LX-2 和 Chang Liver 细胞转染效率(η)及细胞增殖率(γ)的影响,如图 1 所示.从图 1(a)可知,随着每孔 Lipo 用量的增加(1 ~ 2 μL),LX-2 与 Chang Liver 细胞转染 LacZ 质粒的效率也随之增加,且每孔 2 μL 的 Lipo 用量的转染效率最高($p < 0.01$);继续增加 Lipo 用量,转染效率与每孔 2 μL 无显著性差异($p > 0.05$),然而 MTT 检验表明细胞毒性增加(图 1b).这说明,高浓度的 Lipo 具有一定的细胞毒性.因此,对于 2 种细胞,Lipo 用量均以每孔 2 μL 为宜.

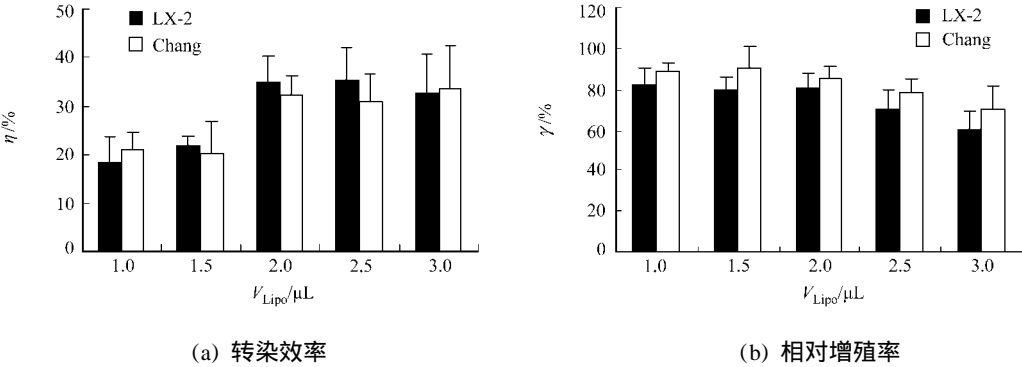


图 1 Lipo 用量对 LX-2 和 Chang Liver 细胞转染效率及细胞增殖的影响

Fig. 1 Effect of Lipo amount on the transfection efficiency and proliferation of LX-2 and Chang Liver cells

2.2 转染时间对转染效率的影响

以初始接种密度 $1\times 10^8\text{ L}^{-1}$ 接种,每孔 0.5 mL,Lipo 用量为每孔 2 μL ,质粒用量为每孔 10 μL ,转染 24 h.观察换液时间(t)对转染效率的影响,如表 1 所示.

表 1 转染时间对转染效率影响

Tab. 1 Effect of different transfection time on the transfection efficiency

	on the transfection efficiency					%
t/h	3	6	9	12	24	
LX-2-LacZ	23.7 \pm 3.9	31.6 \pm 6.1	N/ A	N/ A	N/ A	
Chang-LacZ	27.4 \pm 2.5	33.1 \pm 4.5	N/ A	N/ A	N/ A	

从表 1 可知,在 3,6 h 换液的细胞状态较好,3 h 的转染效率略低于 6 h ($p < 0.01$);在 9,12,24 h 换液的细胞大量死亡且随着时间的增加(镜检),转染效率小于 10 %.这说明,脂质体对于细胞的毒性随着时间增加而加大.因此,Lipo 转染时间不宜超过 6 h.

2.3 细胞初始接种密度对转染效率的影响

以初始接种密度 $0.6 \times 10^8 \sim 0.8 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 接种的 LX-2 细胞,在转染后 5 d 时达到 100 % 汇合,而在 $1.0 \times 10^8 \sim 1.2 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 转染后 4 d 时达到 100 % 汇合, $1.4 \times 10^8 \sim 1.6 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 转染后 3 d 达到汇合, $1.8 \times 10^8 \sim 2.0 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 在转染后 2d 即接触抑制明显. 初始接种密度 $1.0 \times 10^8 \sim 1.2 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 接种的 Chang Liver 细胞在 4 d 时达到 100 % 汇合,而 $1.5 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 转染后 2 d 即达到 100 % 汇合, $2.0 \times 10^8 \sim 3.0 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 在 1 d 时接触抑制即很明显.

这表明,细胞初始接种密度对于转染后细胞存活影响不大(MTT 检测,数据未列出),且在 Lipo 与质粒用量固定且足量的情况对转染效率无显著影响($p > 0.05$). 因此,在实验中可根据对细胞总量及检测时限的实际需求选择细胞初始接种密度.

2.4 质粒用量对转染效率的影响

质粒用量(V_{DNA})对两种细胞转染效率的影响,如图 2 所示. 由图 2 可知,质粒用量为每孔 6 μL (每孔 0.45 μg) 时,2 种质粒对 LX-2 细胞的转染效率最高;而对于 Chang Liver 细胞,质粒用量为每孔 4 ~ 6 μL (每孔 0.30 ~ 0.45 μg) 时转染效率最高,且用量在这个范围内转染效率无显著性差异($p > 0.05$). CMV 启动子驱动 LacZ 转染效率与 CAG 启动子驱动 EGFP 转染效率无显著差异($p > 0.05$).

对 2 种细胞来说,质粒用量过低会造成转染不彻底;同样用量过高,也会阻碍 Lipo-质粒复合体进入细胞. 在转染时应用最佳 Lipo-质粒配比,不仅能节省质粒用量,还能得到最佳转染效率.

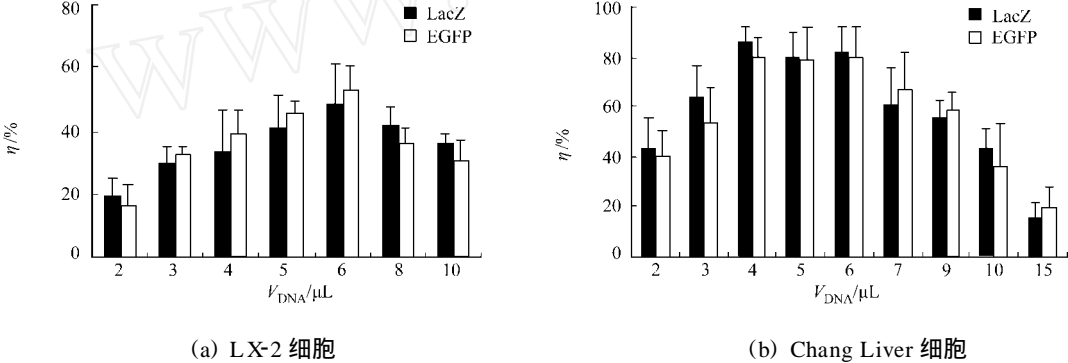


图 2 质粒用量对两种细胞转染效率的影响

Fig. 2 Effect of plasmid amount on the transfection efficiency

2.5 优化的转染条件

将以上实验摸索的条件优化组合得到最佳转染条件(24 孔板),如表 2 所示. 表 2 中:Lipo 用量(V)和质粒 DNA 的用量(m)均为每孔用量.

根据最佳转染条件进行实验,可得到 LX-2 细胞最高转染效率大于 60 %,Chang Liver 细胞最高转染效率大于 80 %,如图 2 所示.

表 2 优化组合的最佳转染条件

Tab. 2 Optimization of transfection condition

组合	$V_{\text{Lipo}}/\mu\text{L}$	$V_{\text{DNA}}/\mu\text{L}$	t/h
LX-2-LacZ	2	6	6
LX-2-EGFP	2	6	6
Chang-LacZ	2	4 ~ 6	6
Chang-EGFP	2	4 ~ 6	6

3 讨论

选用的人肝星状细胞系 LX-2 是 Friedman 于 2005 年构建,具有活化态肝星状细胞的表型. 将其培养于类细胞外基质的 Matrigel 上或降低血清浓度,则可使其回复静息态表型,非常适用于体外研究肝星状细胞激活机制^[6]. Chang Liver 是正常人肝细胞系,其分化特性与正常肝细胞相似,培养条件较原代细胞简便并可无限传代,是体外研究肝细胞生理特性与基因表达的优良模型^[8]. 研究证实了 2 种细胞利用 Lipofectamine 2000 介导都能实现高效转染,LX-2 细胞转染效率高达 60 %,明显高于 Friedman 利用 Eugene 转染得到的结果(30 %左右)^[6];Chang Liver 细胞转染效率则高达 80 %,可满足一般实验需求.

研究发现,要取得最佳转染效率,Lipo 用量、转染后换液时间、质粒 DNA 用量都需优化. Lipo 用量过多、转染后换液时间太长,均会产生明显的细胞毒性;而 Lipo 用量不足、转染时间太短及质粒 DNA 用量过低,都会使转染效率偏低. 质粒 DNA 用量过多,形成的 Lipo-DNA 复合物电量不适也能导致转染效率偏低.

细胞初始接种密度虽然对转染效率及细胞毒性无显著性作用,但也要考虑到实验需要的细胞密度及检测时限来具体选择.另外,转染前细胞状态很重要,细胞最好在冻存复苏后传代 10 次以内操作,并且在接种后 24 h 内转染,否则也得不到可重复性的高转染效率.

研究选用目前应用较为广泛的 2 种启动子来分别驱动 LacZ 基因与 EGFP 基因表达.实验证实 CMV 启动子驱动 LacZ 转染效率与 CAG 启动子驱动 EGFP 转染效率无显著差异($p > 0.05$).另外,实验中还发现 CMV 启动子与 CAG 启动子驱动基因表达的时限不同,CMV 启动子表达时限比较短,CAG 启动子则具有持久性表达的特性,可用于检测时限较长的实验(数据未列出).

研究证实:Lipofectamine 2000 可高效转染人肝星状细胞系 LX-2 与人正常肝细胞系 Chang Liver.通过优化得到最佳转染条件,其高效的转染效率使得应用这两种细胞系开展肝脏疾病,尤其是肝纤维化、肝硬化的研究可得到更为可信且直接的实验结果.

参考文献:

- [1] RUBANYI G M. The future of human gene therapy[J]. Mol Aspects Med,2001,22(3):113-142.
- [2] XU R,HARRISON P M,CHEN M,et al. Cytoglobin overexpression protects against damage-induced fibrosis[J]. Mol Ther,2006,13(6):1093-1100.
- [3] MADRY H,RESZKA R,BOHLENDER J,et al. Efficacy of cationic liposome mediated gene transfer to mesangial cells in vitro and in vivo[J]. J Mol Med,2001,79(4):184-189.
- [4] WU Y C,YEN W Y,LEE T C,et al. Heat shock protein inhibitors,17-DMA G and KNK437, enhance arsenic trioxide-induced mitotic apoptosis[J]. Toxicol Appl Pharm,2009,236(2):231-238.
- [5] YANG W,PASCHEN W. Conditional gene silencing in mammalian cells mediated by a stress-inducible promoter[J]. Biochem Bioph Res Co,2008,365(3):521-527.
- [6] XU L,HUI A Y,ALBANIS E,et al. Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: New tools for analysis of hepatic fibrosis[J]. Gut,2005,54(1):142-151.
- [7] XIAO X,LI J,SAMULSKI R J. Efficient long-term gene transfer into muscle tissue of immunocompetent mice by adeno-associated virus vector[J]. J Virol,1996,70(11):8098-8108.
- [8] KAGAWA T,SAITO H,MORIZANE T,et al. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity against cell lines generated by liver-specific idiotype-bearing antibody[J]. J Gastroenterol,1995,30(2):201-208.

Optimization of the Transfection Efficiency of Human Hepatic Stellate Cell and Hepatocyte Using Liposome

L Ü Ying-hui, WANG Qi-zhao, DIAO Yong, XU Rui-an

(Institute of Molecular Medicine, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

Abstract: PAAV-CMV-LacZ plasmid and pAAV-CAG-EGFP plasmid were transfected into a kind of human hepatic stellate cell line-LX-2 and a kind of human hepatocyte line-Chang Liver using Lipofectamine 2000, respectively. The impacts of liposome and plasmid amount, transfection time course, initial plated density and different promoter used on transfection efficiency were discussed. It indicated that both kinds of cell lines were highly transfectable, and the transfection efficiency of Chang Liver cells ($> 80\%$) was higher than LX-2 cells ($> 60\%$). The transfection efficiency turned out to be the highest while using $2\mu\text{L} \cdot \text{well}^{-1}$ of liposome, $0.45\mu\text{g} \cdot \text{well}^{-1}$ of plasmid DNA for LX-2 cells and $0.30 \sim 0.45\mu\text{g} \cdot \text{well}^{-1}$ of plasmid DNA for Chang Liver cells after 6 hours of transfection. There was no significantly difference in transfection efficiency whether the gene was driven by CMV or CAG promoter. The initial plated density seemed to have no obvious influence on the transfection efficiency, either.

Keywords: liposome; hepatic stellate cells; hepatocyte; transfection efficiency

(责任编辑:黄晓楠 英文审校:陈国华)