

· 研究简报 ·

两种阳离子脂质体介导基因转染的比较研究

支德福^{1,3}, 王冰³, 崔韶辉³, 杨宝灵³, 赵不凋³, 赵轶男³,
姜云霞², 于世钧¹, 张树彪^{3*}

(辽宁师范大学 1. 化学化工学院, 2. 生命科学学院, 辽宁 大连 116029;

3. 大连民族学院生命科学学院生物技术与资源利用国家民委-教育部重点实验室, 辽宁 大连 116600)

关键词: 基因载体; 阳离子脂质体; Lipofectamine 2000; DOTAP; 转染

中图分类号: R963

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 05-0553-05

Comparison of two kinds of cationic vectors-mediated gene delivery

ZHI De-fu^{1,3}, WANG Bing³, CUI Shao-hui³, YANG Bao-ling³, ZHAO Bu-diao³, ZHAO Yi-nan³,
JIANG Yun-xia², YU Shi-jun¹, ZHANG Shu-biao^{3*}

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, 2. College of Life Science, Liaoning Normal University, Dalian 116029, China; 3. Key Laboratory of Biotechnology and Bioresources Utilization, The State Ethnic Affairs Commission-Ministry of Education, College of Life Science, Dalian Nationalities University, Dalian 116600, China)

Abstract: In order to study the important factors involved in cationic liposome-mediated gene transfer, Lipofectamine 2000 or DOTAP was evaluated using three types of cells (Hep-2, MCF-7 and SW-480) *in vitro* transfection efficiencies. Different properties of the two reagents were analyzed and compared by DNA rearrange assay and MTT assay. Both Lipofectamine 2000 and DOTAP had strong capability to combine with DNA; Lipofectamine 2000 can get higher transfection efficiency of the three cells by using GFP as report gene, meanwhile, DOTAP can also get higher transfection efficiency against Hep-2 cell. However, DOTAP showed lower transfection efficiency against MCF-7 and SW-480 cell. On the other hand, the cytotoxicity assay showed that over 85% cell viability of MCF-7 cell could be achieved both by Lipofectamine 2000 and DOTAP under the optimal transfection condition. Relatively speaking, Lipofectamine 2000 has very high transfection efficiency in a broad range of cell lines, but because of the special selectivity of cell type on liposome, DOTAP also has a broad application prospect.

Key words: gene vector; cationic liposome; Lipofectamine 2000; DOTAP; transfection

基因治疗作为一种革命性的治疗手段, 对免疫缺陷病、肿瘤等多种疾病的疗效已得到验证^[1-3]。而基因治疗若要大规模进入临床治疗, 还需进行很多基础性的研究。其中高效、稳定、无毒、具有靶向性的基因导入载体的研究是基因治疗基础研究进一步深入的关键。基因导入载体主要分为病毒型和非病毒型两种

^[4]。目前大量应用的病毒类载体的缺陷是免疫原性高、容量小、制备困难、成本较高, 而非病毒类基因载体可以克服这些缺点^[5, 6], 作为非病毒类基因载体中重要的一种——阳离子脂质体因其操作简便, 转染的安全性、高效性和通用性而得到广泛应用^[7-9]。

本文选取的 3 种细胞, Hep-2 为人喉癌上皮细胞, MCF-7 为人乳腺癌细胞, SW-480 为人结肠癌细胞, 这 3 种癌症的发病率都比较高, 是目前研究的热点。Lipofectamine 2000 是一种常用的阳离子脂质体转染

收稿日期: 2008-10-16.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20876027).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-411-87656141, E-mail: zsb@dlnu.edu.cn

试剂,它是由几种阳离子脂质体混合而形成的,在多种细胞系中具有极高的转染效率和较高水平的重组蛋白表达,在体内外基因转染的研究中已有很多文献^[10,11]报道。DOTAP 体外培养时,培养血清和抗生素不影响其转染效率,其介导的基因转染还具有效率较高、重复性好等特点。所以,本文选取阳离子脂质体 Lipofectamine 2000 和 DOTAP 为研究对象,考察不同条件下的转染效率,优化两种试剂的使用条件。通过比较两种试剂的优缺点,为新型阳离子基因载体的设计开发提供信息。

材料与方法

材料与仪器 转染试剂 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司, DOTAP 购自 Roche 公司。质粒 pGFP-N2 (含有绿色荧光蛋白基因) 购自 Clontech 公司,质粒提取试剂盒购自 Bio Basic Inc. 公司。Marker (λ DNA/EcoR I + Hind III Markers 3) 购自 Fermentas 公司。细胞培养基 Opti-MEM 购自 Gibco 公司, DMEM 基础培养液购自 Invitrogen 公司。Hep-2 细胞、MCF-7 细胞和 SW-480 细胞由大连民族学院的实验室保存和使用。倒置荧光显微镜 (Olympus IX 71, 日本)、多孔板照度计 (Perkin Elmer LS-55, USA)、紫外-可见光分光光度计 (Perkin Elmer Lambda 25, USA)、酶标仪 (Sunrise Tecan, 澳大利亚)、二氧化碳培养箱 (NAPCO 7000, 法国)、凝胶成像系统 (SYNGENE, USA)。

DNA 延滞实验^[10] 首先将酶切质粒 DNA (pGFP-N2) 1.0 μg 稀释于 DMEM 中,总体积 10 μL ;再分别取质量浓度为 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 Lipofectamine 2000 和 DOTAP 试剂 0、0.5、1、2、3、4、6 和 8 μL 稀释于 DMEM 中,总体积 10 μL ;然后将上述转染试剂稀释液滴加到质粒 DNA 的稀释液中,使得转染试剂和 DNA 的质量比分别为 0、0.5、1、2、3、4、6、8 倍,用漩涡振荡器充分混匀,室温温育 15 min。将加样缓冲液 3.2 μL 加入上述样品中混匀,取 20 μL 加入到 1.2% 琼脂糖凝胶中,90 V 电泳 50 min。在紫外线下观察 DNA 电泳图谱并照相。

细胞株培养 在 DMEM 基础培养液中加入 10% 胎牛血清和 100 $\text{u}\cdot\text{mL}^{-1}$ 青霉素、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 链霉素。细胞传代后放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养。

基因转染实验 ① 细胞铺板:于 96 孔板中每孔种植适量细胞 (Hep-2 细胞、MCF-7 细胞和 SW-480 细胞),细胞培养液为 DMEM (含血清,不含抗生素),

总体积 100 μL 。将细胞放置在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育 16~24 h,使在转染时日细胞密度达 70%~90%;② 转染复合物制备 (按每孔 50 μL 用量计算):将质粒 DNA (pGFP-N2) 0.2 μg 和转染试剂分别稀释于 Opti-MEM 25 μL 中,然后将转染试剂稀释液 25 μL 滴加到质粒 DNA 的稀释液 25 μL 中,边加边用漩涡振荡器振荡,室温温育 20 min;③ 转染:移去生长培养基,用等量 (100 μL) DMEM (无血清) 培养基清洗,再用等量 (100 μL) Opti-MEM (无血清) 培养基替换。每孔直接加入复合物 50 μL ,摇动培养板,轻轻混匀。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 4~5 h,更换含血清和抗生素的培养基,培育 48 h,进行基因表达分析。

绿色荧光蛋白表达 用倒置荧光显微镜观察绿色荧光蛋白信号。阳性细胞发出明亮的绿色荧光,而阴性细胞则无。

细胞毒性分析^[10] 在 96 孔细胞培养板上种植 SW-480 细胞株,每孔细胞数为 $1.5\times 10^5/100$ μL 培养液。将细胞置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 16~24 h。将质粒 DNA (pGFP-N2) 0.5 μg 和转染试剂分别稀释于 DMEM 25 μL 中,然后将转染试剂稀释液 25 μL 滴加到质粒 DNA 稀释液 25 μL 中,边加边用漩涡振荡器振荡,室温温育 20 min。其中 Lipofectamine 2000 和质粒的质量比为 3:1, DOTAP 和质粒的质量比为 6:1。将转染试剂/DNA 混合物 (50 μL) 加入细胞中,轻轻摇匀,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h。每孔细胞中加入 MTT (Sigma, 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 20 μL ,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 4 h。小心弃去所有液体,加入 DMSO 150 μL 。用酶标仪检测 A_{550} 。以对照 (未转染细胞) 的吸收度为 100%,计算基因转染后细胞存活的百分率。

结果

1 DNA 延滞实验

DNA 延滞实验用于检测转染试剂结合 DNA 的能力。图 1 中的数字表示转染试剂与 DNA 的质量比,随着复合物中转染试剂比例的增加, DNA 延滞作用明显增强。如图 1A 所示,当 Lipofectamine 2000 与 DNA 的质量比增加到 4 以上时,所有的 DNA 都被 Lipofectamine 2000 结合,在电场中停止泳动。如图 1B 所示, DOTAP 与 DNA 的质量比为 8 时,所有的 DNA 都被阳离子脂质体 DOTAP 结合。

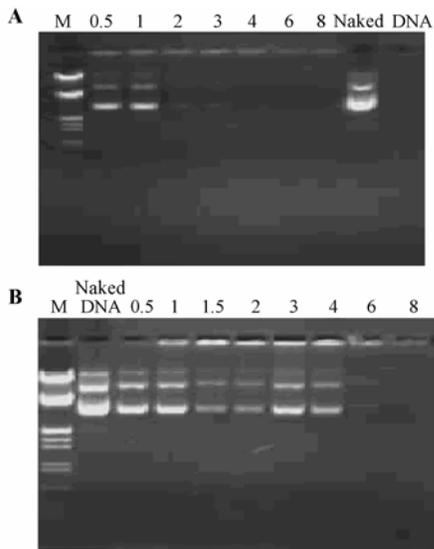


Figure 1 Gel electrophoresis of Lipofectamine 2000/DNA complexes (A) and DOTAP/DNA complexes (B)

2 不同条件基因转染效率的研究

在前期工作中,作者曾详细考察过 Lipofectamine 2000 和 DOTAP 的转染时间、转染试剂/DNA 比例等因素对 HeLa 细胞的转染效率的影响。结果表明, Lipofectamine 2000 的最佳转染时间为 6 h, Lipofectamine 2000/DNA 最佳比例为 3:1, DOTAP/DNA 比例为 6:1^[10, 11]。在此重点考察 Lipofectamine 2000 和 DOTAP 在不同质粒浓度、不同细胞中转染效率的差别。

2.1 质粒浓度对转染效率的影响 转染时质粒浓度的高低影响转染效率, 本实验以绿色荧光蛋白基因 (GFP) 作为报告基因, 可在 508 nm 用倒置荧光显微镜观察绿色荧光, 选取两组质粒 (分别为 0.3 μg/孔和

0.5 μg/孔) 进行比较, 浓度高则细胞毒性大, 更低时转染效率比较差。GFP 阳性细胞越多, 信号越强, 表明转染效率越高。如图 2 所示, 在用 Lipofectamine 2000 作为转染试剂对 Hep-2 细胞进行转染的过程中, 每孔质粒为 0.3 μg 时, 转染效率达到最高, 而在用 Lipofectamine 2000 和 DOTAP 作为转染试剂分别对 MCF-7 和 SW-480 等 2 种细胞株进行转染的过程中, 每孔质粒都为 0.5 μg 时, 转染效率均达到最高。

2.2 DOTAP 和 Lipofectamine 2000 对细胞的转染选择性 DOTAP 和 Lipofectamine 2000 对 Hep-2、MCF-7 和 SW-480 等 3 种细胞株的转染荧光照片如图 2 所示。从图中可以看出, 由于细胞种类的不同, 转染试剂 DOTAP 和 Lipofectamine 2000 的转染效率明显不同。从实验考察的 3 种细胞可以看出, 当每孔质粒为 0.5 μg 时, 用 DOTAP 作为转染试剂对 Hep-2 细胞转染的转染效果明显优于其他 2 种细胞。当每孔质粒为 0.3 μg 时, 用 Lipofectamine 2000 作为转染试剂对 Hep-2 细胞转染的转染效果明显优于其他 2 种细胞; 而当每孔质粒为 0.5 μg 时, Hep-2、MCF-7 和 SW-480 等 3 种细胞株的转染效率虽然都表现出较好的效果, 但同时也存在一些差异。这些差异性也正是源于不同种类的细胞结构上的差异, 这点对于基因治疗的应用是很有意义的。利用大多数组织和器官对于阳离子脂质体的“不敏感性”, 这样可以在保证敏感部位进行基因治疗的同时, 达到降低脂质体基因载体副作用的目的, 可以用来选择合适的转染试剂。

2.3 同一细胞不同试剂的转染效率 对同一细胞株的转染, 不同的试剂也有明显的区别。在对 Hep-2、MCF-7 和 SW-480 等 3 种细胞株的转染中, 作者发现

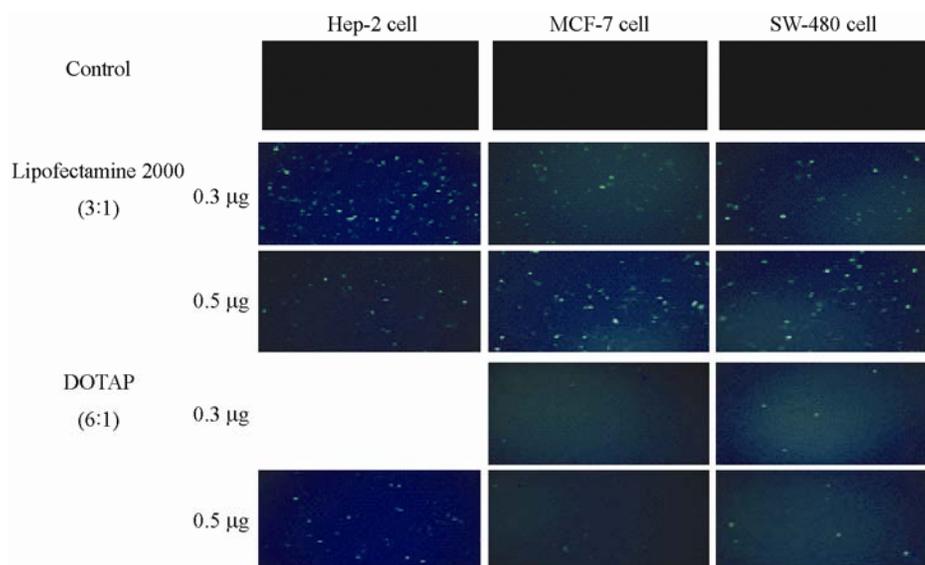


Figure 2 GFP gene transfection by Lipofectamine 2000 and DOTAP reagents with different kinds of cells

Lipofectamine 2000 的转染效果要比 DOTAP 明显(图 2)。

3 细胞毒性实验

在基因转染 24 h 后,用 MTT 法测定细胞存活率。由于通过基因转染实验,找到了两种转染试剂与 DNA 的最佳比例。在较佳比例下,用 Lipofectamine 2000 和 DOTAP 转染的 3 组平行实验中, MCF-7 细胞的平均细胞存活率分别为 86.6%和 95.2%(图 3)。说明,在该比例下,两种转染试剂对细胞的毒性都很小。

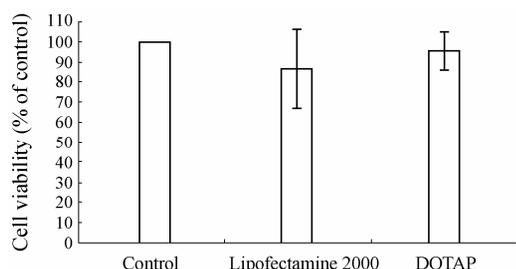


Figure 3 Cell viability (% of control) of MCF-7 cells by MTT (Lipofectamine 2000 and DOTAP)

讨论

阳离子脂质体在生理 pH 值下带有正电荷,能够与 DNA 分子中的磷酸基团自组装形成脂质体/DNA 复合物,借静电作用吸附于细胞表面,通过细胞内吞将基因导入细胞,而发挥基因的治疗作用。阳离子脂质体介导基因转染的效率与脂质体结构、质粒浓度、脂质体与 DNA 的比例、细胞状态、转染时间以及靶细胞的选择性作用有关。由于转染时脂质体与 DNA 形成了小单层脂质体包裹 DNA 的复合物,适当的 DNA/转染试剂比例有利于两者形成稳定的空间结构,利于转染的顺利进行;而脂质体与 DNA 的比例较最佳值低时,产生的游离的 DNA 分子会影响脂质体/DNA 复合物的稳定性,当脂质体与 DNA 的比例较最佳值高时,产生的游离的脂质体则可增加细胞毒性,对细胞的代谢产生负面作用,使细胞表达外源基因受到影响,最终降低细胞的转染效率。DNA 和脂质体的比例也决定了复合物表面电荷的分布以及复合物颗粒的大小,在最佳的 DNA 和脂质体的比例下,复合物的表面呈网状布满正电荷。这些都可能影响转染实验的结果。DNA 延滞实验已经证明, Lipofectamine 2000 和 DOTAP 能与 DNA 很好地结合。实验表明,当 Lipofectamine 2000 和 DOTAP 与 DNA 的转染比例分别为 3:1 和 6:1 时转染效果最好。在转染过程中,质粒浓度也是一个很重要的参数,随着质粒

浓度的上升,虽然细胞接受转染复合物的可能性增加,但是它对细胞生长和代谢的负面影响将导致有效转染的效率降低。所以,质粒浓度也不是越大越好。在本实验中,在用 Lipofectamine 2000 作为转染试剂对 Hep-2 细胞进行转染的过程中,每孔质粒为 0.3 μg 时,转染效率达到最高;而在用 Lipofectamine 2000 和 DOTAP 作为转染试剂分别对 MCF-7 和 SW-480 两种细胞株进行转染的过程中,每孔质粒都为 0.5 μg 时,转染效率均达到最高。对于不同的细胞,它们吸收颗粒的能力是不同的,导致了有些细胞的转染远比其他细胞困难。Lipofectamine 2000 在 3 种细胞株中的转染效率均较高, DOTAP 在 Hep-2 细胞株中的转染效率较高,而在 MCF-7 和 SW-480 细胞株中的转染效率较低。对同一细胞来说, Lipofectamine 2000 的转染效率明显优于 DOTAP,这两种转染试剂性质的差异是由其结构的不同决定的^[8]。Lipofectamine 2000 作为混合型阳离子脂质体,分子中正电荷密度相对 DOTAP 较高,因而与 DNA 结合能力较 DOTAP 强(电泳实验结果),能较多地结合 DNA 形成的颗粒有利于细胞的吸收从而表现出较高的转染效率(如在 MCF-7 和 SW-480 细胞株中)。然而转染效率是受多方面因素影响的,影响阳离子载体介导基因转染的另外一个重要的因素就是细胞毒性。在转染过程中由于阳离子脂质体对细胞膜的损伤也会导致部分的细胞在转染过程中死亡。同时在转染后被导入外源基因的靶细胞会发生细胞代谢的改变,导致生长缓慢或者细胞死亡。过量的 DNA 或脂质体沉积于细胞表面,也会对细胞造成毒性作用,阳离子转染试剂的毒性源于其正电性,相对较高的正电荷密度意味着较大的细胞毒性,这也是阳离子脂质体进一步应用的主要障碍^[12],作者从实验中也发现阳离子脂质体 DOTAP 和 Lipofectamine 2000 虽然都表现出较低的细胞毒性,但是 DOTAP 的细胞毒性比 Lipofectamine 2000 更低,也说明了这一点。

综上所述,通过优化条件,阳离子脂质体可以得到较高的转染效率。但两类试剂仍各有优缺点,相对来讲, Lipofectamine 2000 试剂对多数细胞转染效率较高,但由于细胞种类对脂质体的特殊选择性, DOTAP 试剂仍有较好的应用前景。

References

- [1] El-Aneed A. An overview of current delivery systems in cancer gene therapy [J]. *J Control Release*, 2004, 94: 1-14.
- [2] Blau HM, Springer ML. Gene therapy - a novel form of drug delivery [J]. *New Engl J Med*, 1995, 333: 1204-1207.

- [3] Yang XR, Zong L, Yuan XY. Chitosan nanoparticles as gene vector: effect of particle size on transfection efficiency [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2007, 42: 774–779.
- [4] Liu F, Huang L. Development of non-viral vectors for systemic gene delivery [J]. *J Control Release*, 2002, 78: 259–266.
- [5] Zhang SB, Xu YM, Wang B, et al. Cationic compounds used in lipoplexes and polyplexes for gene delivery [J]. *J Control Release*, 2004, 100: 165–180.
- [6] Nicolazzi C, Garinot M, Mignet N, et al. Cationic lipids for transfection [J]. *Curr Med Chem*, 2003, 10: 1263–1277.
- [7] Tsukamoto M, Ochiya T, Sugimura ST, et al. Gene transfer and expression in progeny after intravenous DNA injection into pregnant mice [J]. *Nat Genet*, 1995, 9: 243–248.
- [8] Niculescu-Duvaz D, Heyes J, Springer CJ. Structure-activity relationship in cationic lipid mediated gene transfection [J]. *Curr Med Chem*, 2003, 10: 1233–1261.
- [9] Hirko A, Tang F, Hughes JA. Cationic lipid vectors for plasmid DNA delivery [J]. *Curr Med Chem*, 2003, 10: 1185–1193.
- [10] Ma BC, Zhang SB, Wang B, et al. Effects of cell type on transfection mediated by cationic liposomes [J]. *J Anhui Agric Sci (安徽农业科学)*, 2008, 36: 5779–5781.
- [11] Duan Y, Wang B, Cui SH, et al. Efficiency of gene transfection to Hela cells: mediated by cationic lipids [J]. *J Clin Rehabil Tissue Eng Res (中国组织工程研究与临床康复)*, 2009, 13: 2119–2122.
- [12] Lv HT, Zhang SB, Wang B, et al. Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery [J]. *J Control Release*, 2006, 114: 100–109.