文章编号:1000-5404(2007)21-2097-03

技术方法

TDL复合物提高人脐静脉内皮细胞基因转染效率的体外实验

任建丽,王志刚,李兴升,苏 琳,张 勇,汪朝霞,杨春江,张群霞,许川山 (重庆医科大学附属第二医院超声科,超声影像学研究所,重庆 400010)

提 要:目的 研究HIV-1 Tat蛋白转导域/质粒DNA/Liposome(TDL)复合物介导增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, pEGFP)在体外培养人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)的转染效率。**方法** 将质粒DNA与Tat肽以不同的电荷比混匀,再加入2 μl Lipofectamine 2000制成TDL复合物。琼脂糖凝胶电泳分析质粒DNA与Tat肽的结合力;荧光显微镜和流式细胞仪观察TDL复合物与lipofectamine 2000介导基因在体外培养人脐静脉内皮细胞中的转染效果;MTT法检测TDL复合物对人脐静脉内皮细胞生长活性的影响。**结果** TDL复合物组琼脂糖凝胶电泳未发现明显DNA条带。TDL复合物的转染率优于单用Lipofectamine 2000($P<0.05$)。Tat/DNA电荷比为8:1时,TDL复合物的转染效率最高。TDL复合物组对细胞活性均无明显影响。**结论** TDL复合物可明显提高基因在体外培养人脐静脉内皮细胞的转染效率,该方法可作为提高基因转染效率的有效手段之一。

非病毒基因载体系统虽然已经广泛应用于基础研究及前临床/临床基因治疗领域,但其转染效率低仍是国内外学者关注的问题,细胞膜被认为是主要的屏障。在非病毒基因载体中,脂质体及细胞穿膜肽(cell-permeable peptides,CPP)分别以其在基因转染中表现出来的独特作用方式,启发我们构建新型非病毒基因载体的思考。脂质体的类细胞膜结构使其在基因转染中具有较好的膜亲和性,从而提高基因转染效率,但有细胞毒性[1]。CPP因具有惊人的携带大分子物质直接主动穿过细胞膜进入细胞质和核内的功能及无细胞毒性而受到国内外学者的关注[2,3]。目前研究最多的是人免疫缺陷病毒的转录活化因子[transactivating transcriptional activator protein (TAT) from human immunodeficiency virus type 1, HIV-1 Tat],它是来源于HIV-1 Tat蛋白的既有穿膜特性又无细胞毒性的最小片段[4]。本研究旨在探讨HIV-1 Tat蛋白转导域/质粒DNA/Liposome(TDL)复合物作为有效的非病毒基因载体的可行性,为同时使用多种非病毒基因载体提高基因转染效率开拓思路。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

HUVEC细胞株(南京凯基生物科技发展有限公司),胎牛血清(FBS)(MDgenics公司,美国),pEGFP(由本实验室保存),质粒抽提试剂盒(上海华舜生物工程有限公司),转染试剂Lipofectamine 2000(Invitrogen公司,美国),细胞穿膜肽Tat序列为Y_{47} GRKKRRQRRR$_{47}$(Anaspec公司,美国),荧光显微镜(Olympus IX71,日本),流式细胞仪(FACS Calibur BD,美国),酶标仪(Elx800,BIO-TEX公司,美国)。其他试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 质粒的抽提 将pEGFP转化DH5α大肠杆菌,卡那霉素筛选后挑选单克隆扩增,参照质粒抽提试剂盒说明书抽提纯化质粒。取少量质粒进行琼脂糖凝胶电泳,紫外分光法测定*OD*值,调整质粒浓度至0.1 μg/μl。

1.2.2 转染复合物的制备 HIV-1 Tat、质粒DNA与Lipofectamine 2000的复合物是在室温下制备的。根据Lipofectamine的转染说明,本实验以1 μg质粒DNA加入2 μl Lipofectamine作为固定比率。每孔TDL复合物制备如下:首先将适量的Tat肽与1 μg质粒DNA以不同的电荷比(1:1、4:1、8:1、16:1)分别用5 μl的0.15 mol/L NaCl稀释,再将稀释后的质粒DNA溶液滴入Tat肽溶液中,通过剧烈吹打使二者混匀,复合物室温孵育30 min后,再加入2 μl Lipofectamine,室温孵育30 min,最后加入250 μl无血清、无双抗的DMEM。电荷比的计算是基于DNA每330带一个负电荷,Tat肽每247带一个正电荷[5]。

1.2.3 DNA亲和力分析 在有或无2 μl Lipofectamine的情况下,将1 μg质粒DNA与适量的Tat肽以不同的电荷比混匀,通过0.8%琼脂糖凝胶电泳分析质粒DNA与Tat肽的亲和力。

1.2.4 实验分组 A组:空白对照组;B组:单纯质粒DNA转染组;C组:Tat转染组(DNA + Tat);D组:脂质体转染组(DNA + Lipofectamine 2000);E组:Tat/DNA电荷比为1:1的TDL复合物组;F组:Tat/DNA电荷比为4:1的TDL复合物组;G组:Tat/DNA电荷比为8:1的TDL复合物组;H组:Tat/DNA电荷比为16:1的TDL复合物组。每组均有3个样品。

1.2.5 细胞培养与转染 HUVEC在含10% FBS和1%双抗的DMEM培养液中于37 ℃、5% CO_2培养箱条件下培养,取对

基金项目:国家自然科学基金重点项目(30430230);国家高技术研究发展规划"863"项目(2006AA02Z4F0)
Supported the Key Program of the National Natural Science Foundation of China(30430230) and the National "863" High-Tech Development Plan of China (2006AA02Z4F0)

作者简介:任建丽(1977-),女,吉林省吉林市人,博士研究生,主要从事心脏超声的诊断与治疗方面的研究。电话:13108959635, E-mail:renjianli_1977@163.com
通讯作者:许川山,电话:13752915007, E-mail:xcshan@163.com
王志刚,电话:13908397607,E-mail:wzg62942443@163.com

收稿日期:2007-01-22;修回日期:2007-05-28

数生长期细胞以每孔 0.5×10^5 的密度接种在24孔培养板，24 h后细胞达到60%～70%汇合时进行转染。转染前，吸弃培养板中的旧培养液，用PBS冲洗2次，再将含有1 μg质粒DNA的复合物加入每孔。放入37 ℃、5% CO_2 培养箱孵育4 h后，吸弃复合物，加入完全培养基。Lipofectamine 2000作为阳性对照，按照转染试剂说明书操作。所有转染实验重复3次。

1.2.6 基因的表达及转染效率的测定 基因表达的测定：转染24 h后，使用倒置荧光显微镜观察EGFP在HUVEC中的表达情况。转染率的测定：转染24 h后，PBS冲洗细胞2次，0.25%的胰酶消化细胞，使其悬浮在0.5 ml的PBS液中，使用流式细胞分析仪分析10 000个细胞，测出转染率。

1.2.7 细胞活性分析 MTT法用于评价Tat/DNA/Lipofectamine复合物对细胞活性的影响。HUVEC细胞按每孔细胞数为 1×10^4 接种96孔板中，培养过夜，吸弃培养基，每孔中加入不含血清及抗生素的培养基200 μl，再分别加入不同电荷比的样品各5 μl，每一样品3复孔，于37 ℃、5% CO_2 的培养箱中继续培养24 h。于24 h后取出细胞，每孔加入MTT 20 μl（5 mg/ml），37 ℃继续孵育4 h，终止培养，小心吸弃孔内培养上清液，每孔加入DMSO 150 μl，振荡10 min，使紫蓝色结晶能够完全溶解。在酶标仪上以490 nm波长检测各孔的光密度值[$D(490)$]，计算细胞活性。细胞活性计为[$D(490)_{试验组}/D(490)_{对照组}$]×100%。

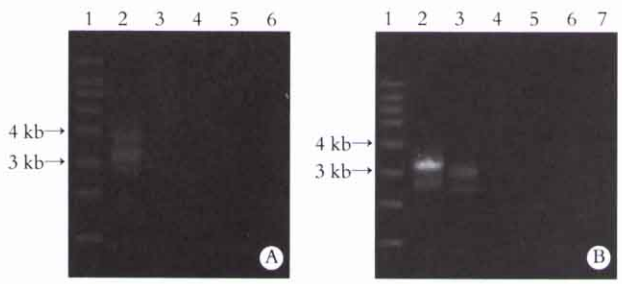
1.3 统计学分析

采用SPSS 13.0软件进行R×C表的 χ^2 检验。

2 结果

2.1 质粒DNA与Tat肽的亲和力

采用琼脂糖凝胶电泳分析在有或无脂质体的情况下，质粒DNA与Tat肽的亲和力情况如图1所示。图1A显示质粒DNA与Tat肽以不同电荷比混匀时，均没有观察到质粒条带，而图1B显示Lipofectamine与DNA混匀时，可观察到相应的较弱质粒条带，表明DNA与Tat肽的亲和力强于DNA与Lipofectamine的亲和力。Tat肽的存在增加了质粒DNA与Lipofectamine的亲和力。



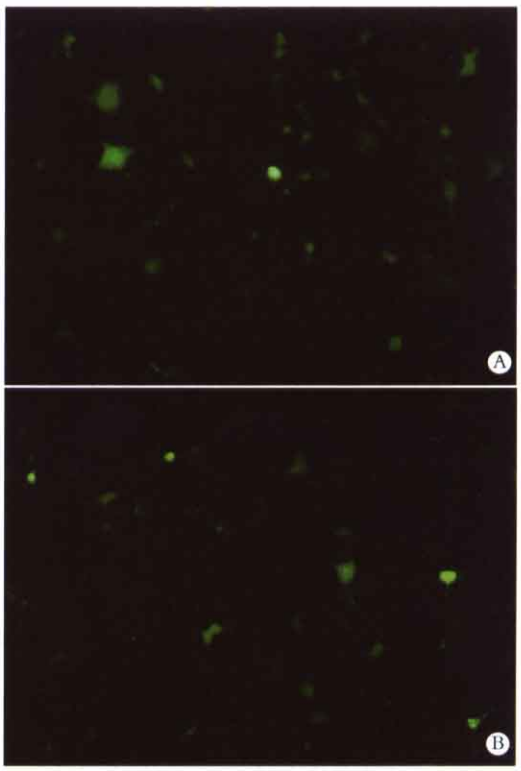
A：无脂质体存在的情况 1：标准；2：单纯质粒DNA；3：1∶1 Tat/DNA；4：4∶1 Tat/DNA；5：8∶1 Tat/DNA；6：16∶1 Tat/DNA

B：有脂质体存在的情况 1：标准；2：单纯质粒DNA；3：脂质体+DNA；4：1∶1 TDL；5：4∶1 TDL；6：8∶1 TDL；7：16∶1 TDL

图1 质粒DNA与Tat肽的结合情况

2.2 荧光显微镜观察基因的表达

转染24 h后，荧光显微镜观察增强型绿色荧光蛋白的表达情况如图2所示。A组、B组、C组均没有观察到绿色荧光。D组、E组、F组、G组、H组均可观察到绿色荧光，并且随着Tat/DNA电荷比的增加，转染效率显著增加，而电荷比高于8∶1时，转染率反而下降，表明TDL复合物中优化的Tat/DNA电荷比为8∶1，其转染率优于其他各组。



A：电荷比为8∶1的TDL复合物组；B：脂质体转染组

图2 pEGFP在体外培养人脐静脉内皮细胞中的基因表达情况（荧光显微镜×200）

2.3 流式细胞仪分析转染效率

各组条件下EGFP对HUVEC细胞的转染效率见表1。随着Tat/DNA电荷比的增加，转染效率显著增加，而电荷比高于8∶1时，转染率反而下降，表明TDL复合物中优化的Tat/DNA电荷比为8∶1，其转染率优于其他各组。

表1 TDL混合物对HUVEC基因转染效率的影响

组别	n	阳性细胞数	阴性细胞数	合计	转染率(%)
A	3	0	10 000	10 000	0
B	3	0	10 000	10 000	0
C	3	0	10 000	10 000	0
D	3	1 291	8 709	10 000	12.91
E	3	1 698	8 302	10 000	16.98[a]
F	3	1 864	8 136	10 000	18.64[a]
G	3	2 203	7 797	10 000	22.03[a]
H	3	1 794	8 206	10 000	17.94[a]

a：$P<0.05$，与D组比较

2.4 细胞活性分析

MTT的结果显示B组、C组、E组、F组、G组、H组的细胞活性分别为95%、99%、97%、98%、98%、96%，与A组比较差异无显著性意义（$P>0.05$），而D组的细胞活性仅为90%，与A组比较差异有显著性意义（$P<0.05$）。因此，TDL复合物没有显著减少各电荷比实验组的细胞活性，而单用Lipofectamine

组的细胞活性却明显减少。

3　讨论

目前有两大类基因治疗载体系统：病毒载体和非病毒载体[6]。目前，最常用的非病毒载体是阳离子脂质体，但现在研究表明，用于在体转染时，其毒性及转染效率低仍是困扰基因治疗的一大难题[7]。近年来，CPP 已经被证实能够转导大分子物质穿过细胞膜[8,9]，具有很大优势：细胞膜亲和性高、穿膜速度快、可迅速被降解，最重要的是对细胞膜没有破坏性。为了达到有效的基因转染，使 DNA 浓缩、保护 DNA 免遭核酸酶的降解、发生细胞内摄作用、将 DNA 传递到细胞质或细胞核是必须的[10]。CPP 和阳离子脂质体能够浓缩 DNA，保护 DNA 免遭核酸酶降解，将 DNA 传递到细胞质或细胞核。因此，我们想到把这两种非病毒基因载体结合应用是否会在提高基因转染效率方面起协同作用，本研究探讨了 TDL 复合物的体外转染效果。

研究结果显示 TDL 复合物中的 Tat 肽与质粒 DNA 有较强的亲和力，并减少了 Lipofectamine 的细胞毒性，能够增强基因转染。分析原因可能为：①Tat 肽与 DNA 之间静电作用的稳定性也许是决定基因转染效率的因素，而脂质体的加入增加了 TDL 的稳定性，并且促进了细胞融合，我们的结果表明 Tat/DNA/Lipofectamine 通过静电作用能够形成紧密的复合物，使 DNA 浓缩，从而促进了基因转染；②TDL 复合物可能具有两个功能区域，一个与 DNA 相互作用，另一个与细胞膜相互作用，这两个功能区域有利于促进基因转染，其具体机制有待于进一步探讨。已有研究表明阳离子多肽能够促进阳离子脂质体介导的基因转染[11]。因此，CPP 不仅作为引导基因进入哺乳动物细胞的载体，也可以作为促基因转染剂。本研究中，单独应用 11 个氨基酸的 Tat 肽介导质粒 DNA 没有产生基因转染，这与 Siprashvili 等[12]的结论一致。目前，我们还不知道没有脂质体的 Tat/DNA 不发生基因转染的原因，可能是由于与细胞膜有较差的结合以及 Tat 肽结构的不同。最值得关注的是 HIV-1 Tat 在体外及体内实验中均没有细胞毒性[13]，而阳离子脂质体却有细胞毒性[14]。本实验结果显示 TDL 复合物在体外实验中能够显著增强基因转染效率，同时对细胞活性无明显影响。也就是说，Tat 肽的加入减少了 Lipofectamine 的细胞毒性，这为今后治疗基因的转染提供一种新思路。

总之，本研究表明两种非病毒载体结合应用确实能够提高基因的转染效率，并对细胞活性无明显影响，提出了 TDL 复合物用于基因转染的潜在应用价值，它可以作为有效的非病毒基因转染载体，为今后治疗基因的转染提供了实验依据。我们今后的研究也将集中在如何改善 Tat 肽与 DNA 复合物的形成方法以克服尺寸的限制，从而进一步提高非病毒载体的基因转染效率。

关键词：TDL 复合物；人脐静脉内皮细胞；基因转染
中图法分类号：R394－33　　**文献标识码**：B

参考文献：

[1] 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.

[2] Rudolph C, Plank C, Lausier J, *et al*. Oligomers of the arginine-rich motif of the HIV-1 TAT protein are capable of transferring plasmid DNA into cells[J]. J Biol Chem, 2003, 278(13): 11411－11418.

[3] Ignatovich I A, Dizhe E B, Pavlotskaya A V, *et al*. Complexes of plasmid DNA with basic domain 47－57 of the HIV-1 Tat protein are transferred to mammalian cells by endocytosis-mediated pathways[J]. J Biol Chem, 2003, 278(43): 42625－42636.

[4] Vives E, Brodin P, Lebleu B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus[J]. J Biol Chem, 1997, 272(25): 16010－16017.

[5] Liu Z, Li M, Cui D, *et al*. Macro-branched cell-penetrating peptide design for gene delivery[J]. J Control Release, 2005, 102 (3): 699－710.

[6] Miyazaki M, Obata Y, Abe K,*et al*. Gene transfer using nonviral delivery systems [J]. Perit Dial Int, 2006, 26(6): 633－640.

[7] Alton E W, Stern M, Farley R, *et al*. Cationic lipid-mediated CFTR gene transfer to the lungs and nose of patients with cystic fibrosis: a double-blind placebo-controlled trial[J]. Lancet, 1999, 353(9157): 947－954.

[8] Tung C H, Mueller S, Weissleder R. Novel branching membrane translocational peptide as gene delivery vector[J]. Bioorg Med Chem, 2002, 10(11): 3609－3614.

[9] Nakanishi M, Eguchi A, Akuta T, *et al*. Basic peptides as functional components of non-viral gene transfer vehicles[J]. Curr Protein Pept Sci, 2003, 4(2): 141－150.

[10] Hellgren I, Gorman J, Sylven C. Factors controlling the efficiency of Tat-mediated plasmid DNA transfer[J]. J Drug Target, 2004, 12 (1): 39－47.

[11] Li S, Huang L. *In vivo* gene transfer *via* intravenous administration of cationic lipid-protamine-DNA (LPD) complexes[J]. Gene Ther, 1997, 4(9): 891－900.

[12] Siprashvili Z, Scholl F A, Oliver S F,*et al*. Gene transfer via reversible plasmid condensation with cysteine-flanked, internally spaced arginine-rich peptides[J]. Hum Gene Ther, 2003, 14(13): 1225－1233.

[13] Torchilin V P, Levchenko T S, Rammohan R, *et al*. Cell transfection in vitro and in vivo with nontoxic TAT peptide-liposome-DNA complexes[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(4): 1972－1977.

[14] Romoren K, Thu B J, Bols N C, *et al*. Transfection efficiency and cytotoxicity of cationic liposomes in salmonid cell lines of hepatocyte and macrophage origin[J]. Biochim Biophys Acta, 2004, 1663(1－2): 127－134.

（编辑　栾　嘉）