文章编号:1000-5404(2010)16-1712-04

论著

聚乙烯亚胺介导 NIH-3T3 细胞体外转染 pEGFP-N1 系统优化

丁爱军,任丽伟,许 峰,秦玉蓉,傅德智,李碧春 (225009 江苏 扬州,扬州大学动物科学与技术学院动物遗传育种与繁殖实验室)

【摘要】 **目的** 优化聚乙烯亚胺(polyethylenimine,PEI)介导的细胞转染以提高目的基因在细胞中的表达强度。**方法** 根据 PEI/DNA 不同的质量比(0:1、0.5:1、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1)利用凝胶阻滞分析结合的情况;不同质量比 PEI/DNA 形成的复合物对 NIH-3T3 细胞的转染通过细胞表达强度获得最佳 PEI/DNA 质量比;比较实验组 1(PEI/DNA 质量比 2:1)、实验组 2(重复 PEI/DNA 质量比 2:1)及实验组 3(PEI/DNA 质量比 4:2)3 种转染方案,探讨重复转染的方法是否提高细胞表达强度。**结果** ①通过凝胶阻滞分析 PEI/DNA 能够稳定结合的质量比是 1:1 ~ 10:1;②PEI/DNA 复合物对 NIH-3T3 细胞进行转染,其荧光表达强度当 PEI/DNA(质量比)≤2 时随着 PEI 的增加而提高,当 PEI/DNA(质量比)>2 时,荧光表达强度反而降低;③采用重复转染的方法实验组 2 细胞荧光表达强度(24.08 ± 0.28)%明显高于实验组 1(8.97 ± 4.02)%和实验组 3(14.24 ± 2.68)%($P<0.05$)。**结论** 在 PEI/DNA(质量比)=2 的条件下,PEI/DNA 复合物转化 NIH-3T3 细胞的效果比较理想,重复转染可以提高细胞转染后荧光表达强度。

【关键词】 聚乙烯亚胺;细胞转染;表达强度

【中图法分类号】 R394-33;R394.2 **【文献标志码】** A

Optimization of *in vitro* transfecting NIH-3T3 cells with pEGFP-N1 by polyethylenimine

Ding Aijun, Ren Liwei, Xu Feng, Qin Yurong, Fu Dezhi, Li Bichun (Laboratory of Animal Genetics and Breeding, College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu Province, 225009, China)

【Abstract】 Objective To optimize the system of transfecting cells with target genes by polyethylenimine (PEI) so as to increase cell expression. Methods On the basis of PEI/DNA at different mass ratios (0:1, 0.5:1, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1 ,6:1, 7:1, 8:1, 9:1, and 10:1), the ability of PEI to combine and protect DNA was investigated by agarose gel electrophoresis retardation assay. Cell fluorescence expression was analyzed after transfecting PEI/DNA complexes at different mass ratios into NIH-3T3 cells in order to obtain the optimal mass ratio of PEI/DNA complex. Comparison of repeat PEI: DNA ratio of 2:1 (w/w), PEI: DNA ratios of 2:1 and 4:2 (w/w) of 3 experiment groups of transfection. Repeating transfection was used ot increase cell expression. Results Agarose gel electrophoresis retardation assay indicated that the quality ratios of forming stable PEI/DNA complexes was in a range of 1:1 to 10:1. Cell expression of PEI/DNA was improved with the increase of PEI: DNA mass ratios and the amount reached the highest at PEI: DNA ratio of 2:1 (w/w), but began to decrease at PEI: DNA mass ratio greater than 2. By the way of repeat transfection, cell expression in the test group (PEI : DNA ratios of 2 : 1) was significantly higher than the other test groups ($P < 0.05$). Conclusion Cell expression reaches the highest at PEI: DNA ratio of 2:1 (w/w) and can be increased by repeating transfection.

【Key words】 polyethylenimine; cell transfection; cell expression percent

Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program, 2007AA100504), the National Natural Science Foundation of China(30871791), the Key Basic Research Program of National Natural Science of Higher Education of Jiangsu Province(08KJA230001), and the Six Projects Sponsoring Talent Summits of Jiangsu Province(2010). Corresponding author: Li Bichun, E-mail: yubcli@yzu.edu.cn

随着基因与蛋白功能研究的深入,转染目前已成为实验室工作中经常涉及的基本方法。转染是利用基因载体携带目的基因运送到细胞内。目前最常用的非病毒转基因载体是阳离子脂质体和阳离子聚合物。1995 年 Boussif 等[1]研究证明聚乙烯亚胺(polyethylenimine, PEI)是一种较高的阳离子电荷密度的有机大分子,PEI 具有很强的结合与浓缩 DNA 的能力,能形成纳米级的 PEI/DNA 复合物[2],利于细胞通过内吞作

【基金项目】 国家高技术研究发展计划(863 计划,2007AA100504);国家自然科学基金(30871791);江苏省高校自然科学重大基础研究项目(08KJA230001);江苏省六大人才高峰项目(2010)

【通信作者】 李碧春,E-mail:yubcli@yzu.edu.cn

用将外源基因携带入细胞[3]，较大程度提高细胞的转化效率。PEI 可用于体内外转染，介导稳定和瞬时表达。本实验以 PEI 为基因载体，增强型绿色荧光蛋白（enhanced green fluorescent protein，EGFP）基因为报告基因，以 NIH-3T3 细胞为受体，旨在研究优化 PEI 介导的细胞转染以提高目的基因在细胞中的表达强度。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 载体 pEGFP-N1 为本实验室保种，DH5α 大肠杆菌购自上海生工公司，NIH-3T3 细胞是由苏州大学医学部王明华教授惠赠。

1.1.2 仪器 超净台（SW-CJ 医用型），PCR 仪、电泳系统及核酸蛋白测定仪（Bio-Rad 公司），凝胶成像系统（Syngene 公司），CO_2 培养箱（RCO3000T-5VBC），荧光倒置显微镜（Olympus 公司），台式高速冷冻离心机、微量加样器（Eppendorf 公司）。

1.1.3 试剂 PEI（25×10^3，Sigma）用生理盐水将 PEI 配制成 10 mg/ml 的储存液（pH = 7.0），经 0.2 μm 微孔滤膜除菌，-20 ℃ 保存备用；高糖的培养基 DMEM（Gibco-BRL）；胎牛血清（杭州四季青产品）。

1.2 方法

1.2.1 质粒 pEGFP-N1 制备 大量质粒提取按照分子克隆的方法进行并去内毒素[4]，D（260）值在 1.8 ~ 1.9 之间，并将其浓度调整为 1 μg/μl。

1.2.2 琼脂糖凝胶电泳阻滞实验 将 PEI 浓度调整为 1 μg/μl，PEI/DNA 按不同质量比（0∶1、0.5∶1、1∶1、2∶1、3∶1、4∶1、5∶1、6∶1、7∶1、8∶1、9∶1、10∶1）进行混合包裹，并将 PEI 设为阴性。每孔上样 15 μl，不足部分用 TE 补足，PEI/DNA 复合物于 0.8% 琼脂糖、电压 100 V 条件下电泳 20 ~ 30 min，用凝胶成像仪观察，采用琼脂糖凝胶电泳阻滞实验进行分析。

1.2.3 细胞转染 将 NIH-3T3 细胞接种于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中进行常规培养。转染前 24 h，在 24 孔培养板内接种以上细胞，当孔内细胞生长达到 60% ~ 70% 融合时开始转染。细胞转染 pEGFP-N1 质粒浓度为 1 μg/孔，PEI 与 DNA 按不同质量比（0∶1、0.5∶1、1∶1、2∶1、3∶1、4∶1、5∶1、6∶1、7∶1、8∶1、9∶1、10∶1）进行包裹，每个质量比设 3 个平行组，37 ℃、5% CO_2 条件下培养 48 h 观察细胞瞬时表达，筛选出 PEI 与 DNA 最佳比例。

1.2.4 重复转染细胞 根据设计 1.2.3 优选最佳 PEI/DNA 质量比，分为 3 组，实验组 1：PEI 与 DNA 最佳比例细胞转染；实验组 2：PEI 与 DNA 最佳比例间隔 24 h 重复转染 1 次；实验组 3：2 倍 PEI 与 DNA 最佳比例细胞转染。均在 48 h 观察细胞荧光表达情况。比较 3 个实验组细胞表达强度，每个实验组设 3 个平行实验。

1.2.5 细胞荧光表达强度统计 通过荧光显微镜观察并用 40 倍摄片，用 Photoshop 6.0 软件对图片进行绿色荧光像素点计算从而获得转染后细胞荧光表达强度。图片像素点统计方法为：用 Photoshop 软件打开图片，选择“绿色”通道，再在“图像”工具中选择“直方图”，在“直方图”中选择色阶范围，并获得像素点数（绿色荧光像素点数表示 EGFP 蛋白表达量）及所占比例（百分比）即为细胞荧光表达强度。本实验色阶范围为“30 到 255”。

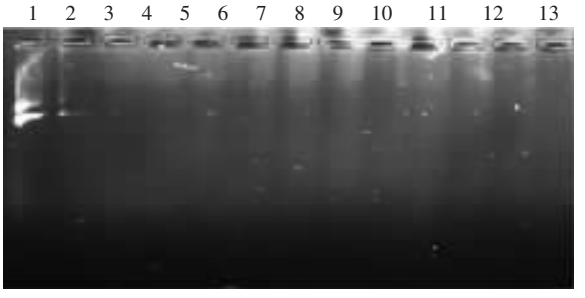
1.3 统计学分析

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，用 SPSS 17.0 统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 琼脂糖凝胶电泳阻滞实验

图 1 结果显示：不同质量比条件下 PEI 与 DNA 的结合程度不同，PEI/DNA 质量比为 0.5∶1，表明 PEI 对 DNA 未完全包裹，结合不稳定；而质量比分别为 1∶1、2∶1、3∶1、4∶1、5∶1、6∶1、7∶1、8∶1、9∶1 和 10∶1 时，泳道中无 DNA 条带，表明 PEI 与质粒 DNA 稳定结合。通过琼脂糖凝胶电泳阻滞实验，可判断 PEI 对 DNA 完全包裹形成复合物的最小质量比为 1∶1。



1：0∶1；2：0.5∶1；3：1∶1；4：2∶1；5：3∶1；6：4∶1；7：5∶1；8：6∶1；9：7∶1；10：8∶1；11：9∶1；12：10∶1；13：15∶0

图 1 不同 PEI/DNA 质量比琼脂糖凝胶电泳阻滞实验

2.2 PEI/DNA 质量比对细胞荧光表达强度的影响

PEI 可以携带 DNA 进入细胞中，并瞬时表达出绿色荧光蛋白；PEI/DNA < 2 时荧光表达强度随着 PEI 的增加而提高；PEI/DNA = 2 时荧光表达强度达到最高；PEI/DNA > 2 以后，荧光表达强度反而降低，可能由于随着 PEI 含量的增加从而加大对细胞的伤害；PEI/DNA = 10 时，显微镜下观察多数细胞已破裂或变形及完全没有绿色荧光发出。结果表明，PEI/DNA 复合物转染 NIH-3T3 细胞的效果最佳 PEI/DNA 质量比为 2∶1（图 2）。

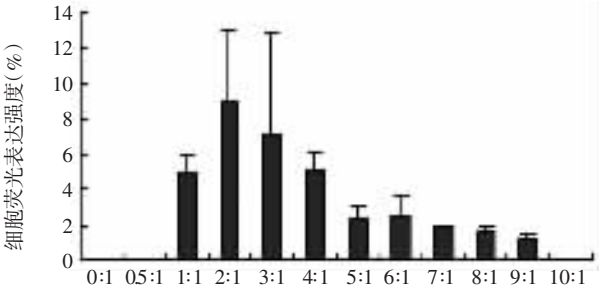
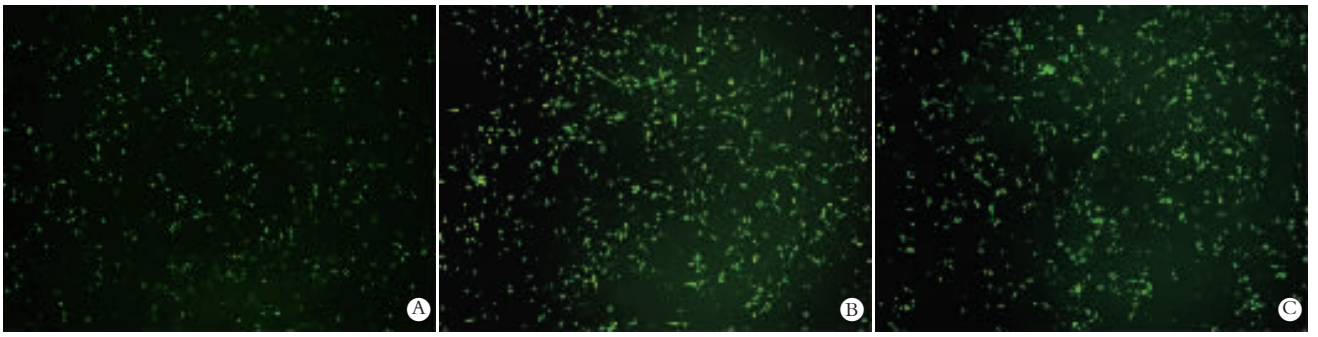


图 2 不同 PEI/DNA 质量比细胞荧光表达强度的变化

2.3 重复转染对细胞荧光表达强度的影响

实验组 1 的 PEI/DNA 质量比为 2∶1，细胞荧光表达强度为（8.97 ± 4.02）%；实验组 3 的 PEI/DNA 质量比为 4∶2，细胞荧光表达强度为（14.24 ± 2.68）%；实验组 3 细胞荧光表达强度明显高于实验组 1（$P < 0.05$）。实验组 2 细胞荧光表达强度为（24.08 ± 0.28）%，明显高于实验组 1 和实验组 3（$P < 0.05$，图 3）。结果表明，重复转染可以提高细胞转染后荧光表达强度。



A:实验组1;B:实验组2;C:实验组3

图3 荧光倒置显微镜观察3种转染方案对细胞荧光表达强度的影响 (×40)

3 讨论

PEI属于一种阳离子聚合物,其富含氨基氮可以与DNA链上负电性的磷酸根通过静电作用缔合成复合物,比原来DNA的分子大,在琼脂糖凝胶电泳中阻滞了DNA的迁移,使复合物滞留在点样孔中,而未与PEI结合或未完全包裹的DNA可以从点样孔中迁移出形成条带。因此,可以通过这种方法鉴定DNA是否与PEI结合及结合程度。

PEI对DNA进行包裹后形成PEI/DNA复合物,DNA被高度压缩成纳米球,复合物大小为50~200 nm,电荷略接近中性时,可增强对细胞膜的穿透作用[5],使其免遭细胞中核酸酶的降解,从而使PEI/DNA复合物更容易进入细胞核,即能提高转化效率又可以增强表达水平[6]。PEI介导的细胞转染同时也对细胞存在毒性,研究表明,PEI在细胞内大量聚集,产生高密度的阳离子电荷是引发细胞毒性的主要原因[7,8],同时,PEI强的渗透作用,也表现出一定的细胞毒性。本实验结果显示,只有DNA完全被PEI包裹才能被细胞吞噬,保持质粒结构完整其目的基因才能得到表达;当PEI/DNA(质量比)≤2时,随着PEI的增加而荧光表达强度提高,而PEI/DNA(质量比)>2时,随着PEI含量的增加对细胞的伤害也随之加大,其荧光表达强度逐渐降低,当PEI/DNA(质量比)=10时,细胞已破裂或变形,荧光消失。这与之前用PEI作为转染剂研究结果一致[9]。

细胞荧光表达强弱与EGFP蛋白表达量呈正相关,增加蛋白表达量可通过增加EGFP基因的拷贝数来实现。为了使更多的目的基因的拷贝数进入细胞进行表达,可提高PEI/DNA的比例,但过多PEI能对细胞产生毒性,从而降低细胞的蛋白表达量。本实验采用细胞重复转染的方法,探讨其是否提高细胞的目的蛋白表达量和减少PEI对细胞的毒性,实验结果显示,细胞重复转染的方法可提高目的基因的表达量。除转染方法之外,影响目的基因表达量的因素还与细胞系、细胞状态、细胞密度及质粒纯度等有关。本实验采用荧光表达强度来确定细胞转染的优劣,这与传统细胞转染率统计有所区别,这主要是研究对象不同。本实验所采用的统计方法存在一定的局限性,只能应用于有荧光标记的蛋白的统计。对于没有荧光标记的蛋白,如果结合间接免疫荧光的方法,此统计方法也可适用。

PEI是目前受到关注最多的非病毒载体,其介导的转染因转染效率高、安全、无免疫原性、操作简单、适用范围广、重复性好等成为研究者常用的转染方法。目前,PEI介导体外转染已经在HeLa、COS-7、XDC293[10]、CHO-K1[9]、293T[11]等动物细胞和植物细胞[5]进行了研究,同时,PEI也开始在基因工程疫苗[12]和基因药物治疗[13]等方面应用于体内转染的研究。PEI作为一种转染试剂,其应用潜力将会越来越大。

参考文献:

[1] Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta M A, *et al*. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo*: polyethylenimine [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(16): 7297-7301.

[2] Tiyaboonchai W, Woiszwillo J, Middauch C R. Formulation and characterization of DNA-polyethylenimine-dextran sulfate nanoparticles [J]. Eur J Pharm Sci, 2003, 19(4): 191-202.

[3] Oh Y K, Suh D, Kim J M, *et al*. Polyethylenimine-mediated cellular uptake, nucleus trafficking and expression of cytokine plasmid DNA [J]. Gene Ther, 2002, 9(23): 1627-1632.

[4] 张泉,袁燕,袁维峰,等. 动物用质粒DNA内毒素去除方法的建立及其质量检验[J]. 中国兽医学报, 2009, 29(1): 63-66, 96.

[5] Kakizawa Y, Kataoka K. Block copolymer micelles for delivery of gene and related compounds [J]. Adv Drug deliv Rev, 2002, 54(2): 203-222.

[6] Godbey W T, Barry M A, Saggau P, *et al*. Poly(ethylenimine)-mediated transfection: a new paradigm for gene delivery [J]. J Biomed Mater Res, 2000, 51(3): 321 – 328.
[7] 李颖, 崔海信, 宋瑜, 等. PEI 介导外源基因进入植物细胞的瞬时表达[J]. 中国农业科学, 2009, 42(6): 1918 – 1923.
[8] 尉继征, 林磊, 熊伟, 等. 新型阳离子基因传递载体 PEI-PBLG 的细胞转染研究[J]. 生物工程学报, 2007, 23(2): 229 – 234.
[9] 杨淑梅, 杨晓梅. CHO-K1 细胞中基因瞬时转染的条件优化[J]. 现代生物医学进展, 2009, 9(2): 265 – 267.
[10] Reed S E, Staley E M, Mayginnes J P, *et al*. Transfection of mammalian cells using linear polyethylenimine is a simple and effective means of producing recombinant adeno-associated virus vectors [J]. J Virol Methods, 2006, 138(1/2): 85 – 98.
[11] Devitt G, Thomas M, Klibanov A M, *et al*. Optimized protocol for the large scale production of HIV pseudovirions by transient transfection of HEK293T cells with linear fully deacylated polyethylenimine [J]. J Virol Methods, 2007, 146(1/2): 298 – 304.
[12] 邓斌, 余东游, 李卫芬, 等. DNA 疫苗体内转染方法[J]. 中国兽医杂志, 2009, 45(6): 87 – 88.
[13] Ganta S, Devalapally H, Shahiwala A, *et al*. A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery [J]. J Control Release, 2008, 126(3): 187 – 204.

(收稿: 2010-01-22 修回: 2010-04-07)
(编辑　汪勤俭)

文章编号: 1000-5404(2010)16-1715-01

个案与短篇

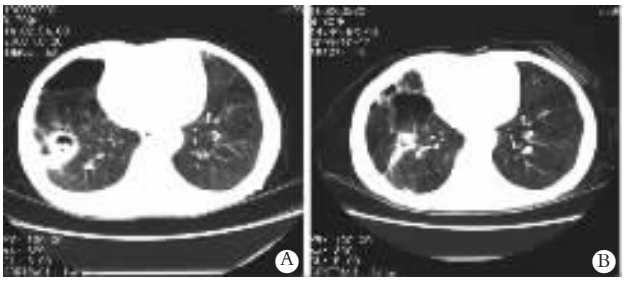
弥漫大 B 细胞淋巴瘤并肿瘤标志物增高 1 例

刘　瑜, 王　劲　(400042 重庆, 第三军医大学大坪医院野战外科研究所血液科)

【关键词】 淋巴瘤; 肿瘤标志物
【中图法分类号】 R733.41　【文献标志码】 B

1　临床资料

患者, 男性, 80 岁, 2008 年 8 月体检发现肿瘤标志物增高(CEA 71.42 ng/ml、CA-199 959 U/ml、CA-125 161.2 U/ml), 入住我院肝胆外科, 查体无异常。胃镜检查: 糜烂性胃炎, 胃底、十二指肠球部多发息肉。结肠镜检查无异常。胸部 CT 示(图 1A): 右下肺片状影伴空洞形成, 考虑霉菌感染; 右侧胸腔积液伴胸膜增厚粘连。右下肺占位性病变 CT 定位穿刺活检: 黏膜慢性炎。胸膜活检示: 纤维组织增生, 慢性炎。腹部 CT: 下腔静脉右及右侧心膈角处结节影, 性质待定。前列腺超声: 前列腺异常回声结节。前列腺穿刺活检: 前列腺组织增生, 未见癌组织。全身 PET 检查: 全身 FDG-PET 显像见右下肺近肋隔角处、纵隔异常 FDG 代谢增高灶, 结合病史考虑右下肺癌合并纵隔淋巴结转移。住院期间, 患者出现左大腿下段及左小腿上段疼痛。双膝关节、下踝关节 X 光检查: 左股骨下段转移性骨肿瘤可能性大。ECT 检查: 双下肢有不均匀增强影存在, 多发成骨活动异常增强灶。全下肢 MRI 检查: 左侧股骨下端及胫骨上端骨质破坏, 考虑转移瘤。血常规无异常。于 2008 年 9 月在硬膜外麻醉下行左股骨下段肿瘤剜除术, 植骨术, 术后病理示: (左股骨下段内、外侧)非霍奇金淋巴瘤, 结合免疫组化首先考虑弥漫大 B 细胞淋巴瘤。免疫组化: CD 20(+)、CD 5(+)、CD8(+)、bcl-2(+)、CD 79a(+)、Ki-67(>10%)、CD 10(+)。骨髓穿刺检查无异常。淋巴瘤诊断明确转入我科, 给予 R-CTOP 联合化疗五疗程, 予以 R-CTOPE 联合化疗三疗程, 肿瘤标志物进行性下降。2009 年 5 月(最低 1 次): CEA 15.76 ng/ml、CA-199 > 224.2 U/ml、CA-125 108.2 U/ml。2009 年 12 月 10 日胸部 CT 示: 右下肺空洞并结节影, 但病变较前明显吸收好转(图 1B)。患者年龄大, 为避免化疗药物毒副作用, 化疗间隙期延长至 3 个月, 患者出现咳嗽、咳痰, 抗炎治疗无效, 并逐渐出现吞咽梗阻症状, 胃镜检查食道无新生物。胸部 CT 示: 肺部病变无明显变化, 纵隔淋巴结增大, 压迫食道; 肿瘤标志物增高: CEA 72.12 ng/ml、CA-199 > 1 000 U/ml、CA-125 116.1 U/ml。再次 CHOPE 方案化疗后, 咳嗽、咳痰、吞咽梗阻症状消失, 肿瘤标志物定量下降。



A: 治疗前; B: 治疗后

图 1　弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者治疗前后肺部 CT 表现

2　讨论

肿瘤标志物是指特征性存在于恶性肿瘤细胞或由恶性肿瘤细胞异常产生的物质, 或是宿主对肿瘤反应而产生的物质; 现在所指的肿瘤标志物是肿瘤组织和相应组织相比, 升高明显且有显著意义的物质[1]。癌胚抗原(CEA)是最具特异性的癌

(下转 1719 页)

【通信作者】 刘　瑜, 电话: (023)68757133, E-mail: cqyuliu@163.com