基础研究 文章编号:0253-3626(2009)01-0009-04

影响人脐静脉内皮细胞脂质体转染 pReceiver-M29-PRKCB1 效率因素的探讨

段 炼,周 波,李启富
(重庆医科大学附属第一医院内分泌科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨影响人脐静脉内皮细胞转染效率的因素,为优化外源基因在其中的表达提供实验依据。方法:选用适于转染人脐静脉内皮细胞的脂质体 lipofectin,采用不同的转染条件:脂质体和 DNA 的用量;铺板密度;细胞与 DNA-脂质体复合物孵育时间转染内皮细胞。荧光显微镜、流式细胞仪测定不同转染参数下的转染效率。结果:(1)24 孔板中,铺板密度大于 2×10^4 个/孔和孵育时间超过 4 h,反而使转染效率下降。(2)随质粒质量增加转染效率逐渐上升,达峰后质粒质量的增加并不能显著增高转染效率。(3)转染效率达峰前,随着脂质体用量的增加,转染效率增高;达峰后,脂质体用量的增加,转染效率反降低。当 DNA(μg)和脂质体(μl)的用量比为 1∶6~1∶8 时,获得最高的转染效率:18.62%。结论:采用优化后的转染参数在人脐静脉内皮细胞转染中可获得较优的转染效率。

【关键词】脂质体;转染;人脐静脉内皮细胞
【中国图书分类法分类号】R587.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-01-25

The influencing factors for efficiency of liposome-mediated transfection of pReceiver-M29-PRKCB1 into human umbilical vein endothelial cell

DUAN Lian, et al
(*Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To observe the influencing factors for efficiency of liposome-mediated transfection into human umbilical vein endothelial cell(HUVEC). *Methods*: Transferring HUVECs by distinct conditions, such as ratios of liposome and plasmid, densities of per well and different times of incubation, and transfection rates were observed and calculated by fluorescent microscope and flow cytometry. *Results*: (1) When density of per well exceeded 2×10^4 and times exceeded 4 hours, liposome-mediated transfection efficiency of endothelial cells decreased. (2) With adding plasmid quality, transfection rates increased; while plasmid quality exceeded 1.0 μg, in condition of 2×10^4 per well and liposome volume 2 μl, transfection efficiency reached the peak level. (3) With adding liposome volume, transfection rates increased; while liposome volume was 8 μl, in condition of 2×10^4 per well and plasmid quality 1 μg, transfection efficiency was depressed. When ratios of liposome and plasmid were 1:6 ~ 1:8, the optimal transfection efficiency was 18.62%. *Conclusion*: Using optimal transfection parameter, we obtained the optimal transfection efficiency.

【Key words】 Liposome; Transfection; Human umbilical vein endothelial cell

血管并发症已成为糖尿病患者致残、早亡的重要病因[1,2]。人脐静脉内皮细胞(Human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)作为研究糖尿病血管并发症常用的靶细胞,已广泛用作分子机制研究,细胞转染则是这类研究中强有力的工具。HUVEC 不同于其他细胞的生理功能异质性决定了内皮细胞转染效率不高,故提高其转染效率具有重要的科研价值。本文研究了影响人脐静脉内皮细胞转染效率的多个参数:脂质体和 DNA 的用量,铺板密度及细胞暴露于 DNA-脂质体复合物中的时间。通过荧光显微镜及流式细胞仪检测手段,优化转染条件,提高了 HUVEC 转染效率,为进一步外源基因研究提供了重要工具。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器

人脐静脉内皮细胞株、DH5α 由重庆医科大学基础医学

作者介绍:段 炼(1979-),男,硕士,
研究方向:糖尿病微血管病变的发病机制及防治。
通讯作者:周 波,男,副教授,E-mail:zhoubo915@126.com。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(30570877)。

研究所保存；pReceiver-M29-PRKCB1 为本课题组构建并测序的携带 PRKCB1 目的基因的真核表达质粒。去内毒素质粒抽提试剂盒（博大泰克）；序列分析（上海生工生物工程技术服务有限公司）；lipofectin（Invitrogen）；荧光显微镜（NikonTE2000-U）；流式细胞仪（Becton-Dickinson 公司）。

1.2　细胞培养

人脐静脉内皮细胞用含 10%小牛血清、青霉素、链霉素的 RPMI1640 培养液培养，培养条件为 37℃，5%CO_2。

1.3　质粒 DNA 制备

按《分子克隆》方法制作 DH5α 感受态，取上述纯化的重组质粒 1 μg 转入感受态细胞中，冰浴，热激后加入 LB 培养基，37℃振荡培养。次日挑取白色单菌落于含 Amp 的 LB 培养液中过夜培养。采用碱裂解 - 中和法及去内毒素质粒抽提试剂盒，结合台式高速离心机抽提质粒，纯化后备用。

1.4　转染细胞

我们用以下方法按影响转染效率的铺板密度、质粒及脂质体用量和比例、孵育时间逐一优化转染条件，优化脂质体（lipofectin，Invitrogen）介导的人脐静脉内皮细胞的瞬时转染。

转染前 1 d 将生长良好的内皮细胞消化后按不同要求接种于无菌 24 孔板上，完全培养基培养。待细胞融合至 50%~60%，使用 Invitrogen 公司推荐的内皮细胞特异转染试剂 lipofectin 转染。

将 0.2 ~ 1.2 μg 质粒 DNA 用 100 μl 双无（LB 培养液去抗生素及血清）培养液稀释于 1.5 ml EP 管中。

脂质体使用前轻混。将 1 ~ 10 μl lipofectin 用 100 μl 双无培养液稀释于 1.5 ml EP 管中，室温下孵育 30 ~ 45 min。

将 2、3 步混合物轻混后于室温下静置孵育 10 ~ 15 min，以利于 DNA- 脂质体复合物形成。

转染前使用双无培养液清洗细胞 2 遍，弃尽培养液。

向每孔中加入 800 μl 双无培养液，混匀后，将孵育好的上述混合物逐滴加入对应的孔中，边加边摇匀。

加好后，将细胞置于 37℃孵箱，孵育时间 2 ~ 8 h 不等。

在不同的孵育时间点，将培养基置换成完全培养液（含 10%的小牛血清）。转染后 48 h，摄像并收集细胞，重悬后上流式细胞仪测定转染效率。

1.5　转染效率

转染后 48 h，使用 0.25%的胰酶消化孔板的细胞，完全培养液（含 10%的小牛血清）终止消化后收集细胞，重悬后上流式细胞仪测定转染效率

2　结　果

2.1　不同观测时间对转染效率的影响

24 孔板上，不同观测时间发现：转染 24 h 后，HUVECs 内始见绿色荧光蛋白表达，48 h 表达最稳定，72 h 可见荧光蛋白淬灭（细胞形态消失）如箭头所示。故而确定转染 48 h 后为转染效率检测的最佳时间窗，见图 1。

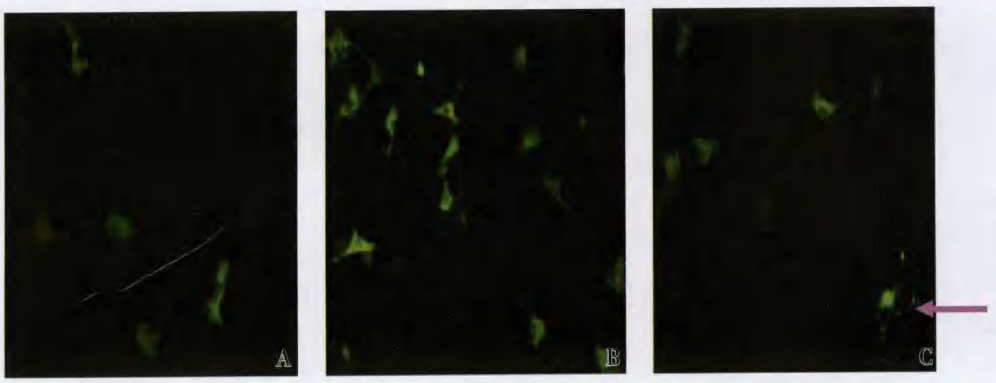


图 1　不同观测时间（A~C：24 h、48 h、72 h），荧光显微镜下荧光蛋白的表达量（×200）

2.2　铺板密度对转染效率的影响

24 孔板上，不同数量的内皮细胞（1×10^4 个/孔、2×10^4 个/孔、4×10^4 个/孔）被 pReceiver-M29-PRKCB1 0.5 μg、2 μl lipofectin 转染，暴露时间固定为 4 h。其转染效率与细胞数关系如图 2 所示。细胞数增加到 2×10^4 个/孔时，转染效率最高，随细胞数进一步增加转染效率反下降。

2.3　DNA 质量对转染效率的影响

24 孔细胞培养板上固定下列参数：细胞数 2×10^4 个/孔；脂质体用量 2 μl；作用时间 4 h，观察转染不同量的 pReceiver-M29-PRKCB1（0.2 μg、0.4 μg、0.6 μg、0.8 μg、1.0 μg、1.2 μg）质粒入内皮细胞的转染效率。结果如图 3 所示，随质粒质量增加转染效率逐渐上升，当质粒质量为 1.0 μg 可得到最高转染效率。之后随着质粒质量的增加转染效率无明显增高。

2.4　脂质体剂量对转染效率的影响

当用 24 孔细胞培养板培养 HUVECs，固定下列参数：每孔细胞数 2×10^4 个；质粒用量 1 μg；作用

时间4 h，本文探讨了不同量的 lipofectin（1 μl、2 μl、3 μl、5 μl、8 μl、10 μl）转染内皮细胞，对转染效率的影响。结果如图 4 所示，脂质体用量增加到 8 μl 时转染效率最高，之后随脂质体用量增加转染效率逐渐下降。

2.5 孵育时间（DNA-脂质体复合物与细胞作用时间）对转染效率的影响

当用 24 孔细胞培养板培养 HUVECs，固定下列参数：每孔细胞数 2×10^4 个；质粒用量 0.5 μg；脂质体用量 2 μl；本实验观察了不同的孵育时间（2 h，4 h，6 h，8 h）对转染效率的影响。结果如图 5 所示（其中图③可见分裂象细胞），当作用时间达 4 h 时，转染效率最高，以后随作用时间延长，细胞漂浮增加，转染效率反下降。箭头所示为正常的贴壁（红色）及漂浮（蓝色）的内皮细胞。

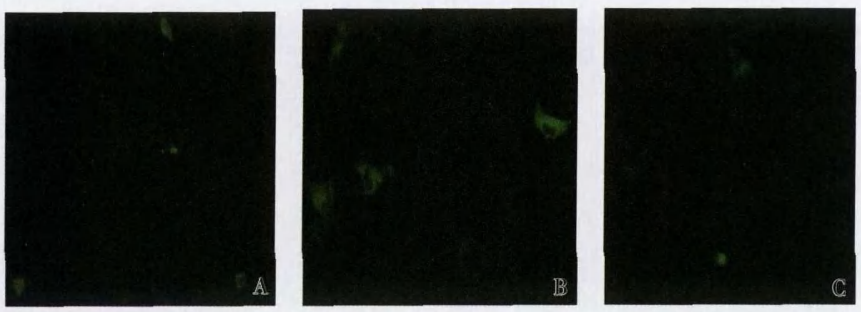


图 2 不同铺板密度（A~C：1×10^4 个/孔、2×10^4 个/孔、4×10^4 个/孔），荧光显微镜下荧光蛋白的表达量（×200）

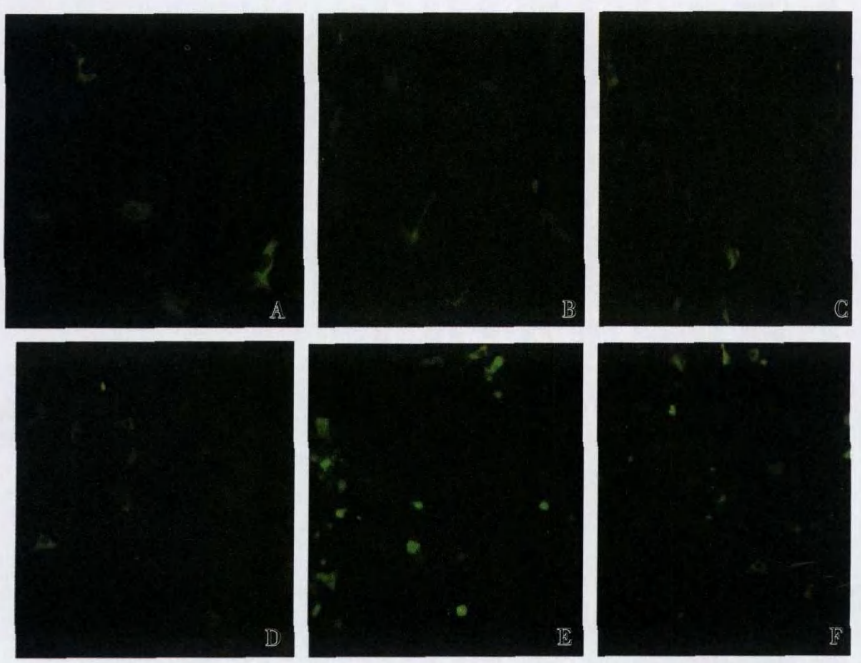


图 3 不同量质粒质量（A~F：0.2 μg、0.4 μg、0.6 μg、0.8 μg、1.0 μg、1.2 μg），荧光显微镜下荧光蛋白的表达量（×100）

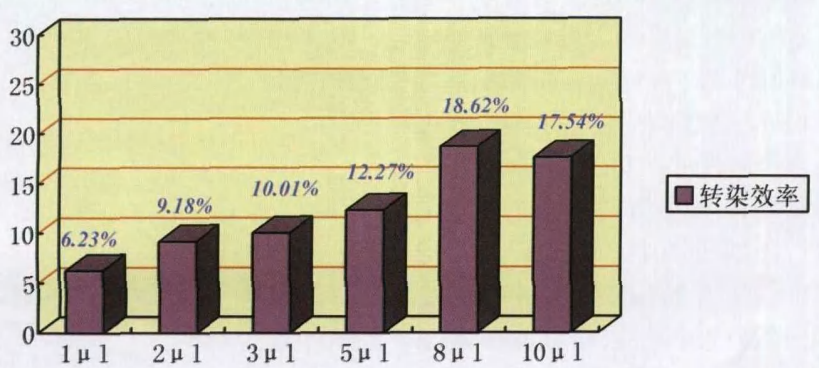


图 4 不同用量的脂质体（1 μl、2 μl、3 μl、5 μl、8 μl、10 μl），流式细胞仪 测定的转染效率

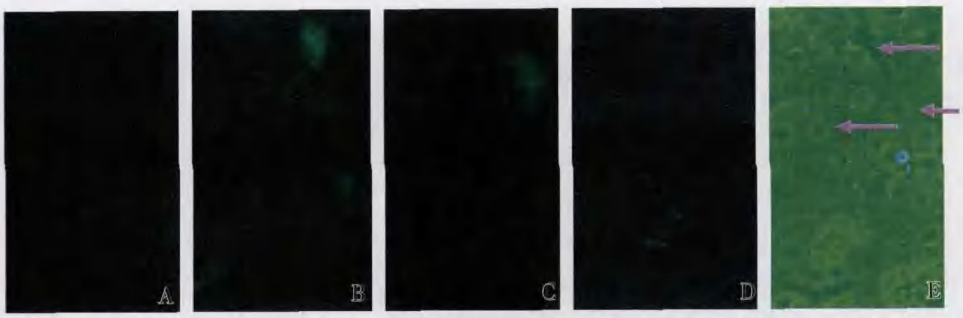


图 5　不同孵育时间（A~D：2 h、4 h、6 h、8 h），荧光显微镜下荧光蛋白的表达量（×200），E 为转染 8 h 后部分内皮细胞漂浮（×200）

3　讨　论

真核细胞转染常用：电穿孔法、磷酸钙法、DEAE-葡聚糖法、病毒介导法及阳离子脂质体法[3]。阳离子脂质体与 DNA 通过静电作用构成脂质体/质粒复合物；而后，复合体通过膜内吞作用进入细胞内[4]；最终，在细胞内释放质粒 DNA，使外源基因得以表达[5]。该法介导的真核细胞转染，因其具有毒性小、操作简便、可重复性好、对包裹的基因没有限制、又没有病毒作载体引发生物变异和癌变可能的特点，故受到研究者青睐。但脂质体法转染效率较低，限制了其应用，故优化、提高其转染效率可增加此法应用范围。由于不同细胞其胞膜成分的异质性，对不同细胞，需采取特异转染条件，才能在最低毒性时获得最高转染效率。

在 Invitrogen 推荐的针对人脐静脉内皮细胞的特异性脂质体-lipofectin 介导下，本文探讨了影响人脐静脉内皮细胞转染效率的多个因素：如铺板密度、脂质体的用量、DNA 与脂质体的比例及 DNA-脂质体复合物与细胞作用时间。研究发现：①铺板细胞数增加到 2×10^4 个/孔时转染效率最高，随细胞数增加转染效率反逐渐下降；②固定脂质体量及铺板密度，随着质粒量增加转染效率逐渐上升，DNA 剂量为 1.0 μg 时可获得最高的转染效率，之后随着量的增加转染效率无明显增高；③固定质粒量及铺板密度，脂质体用量增加到 8 μl 时转染效率最高，以后随脂质体用量增加转染效率逐渐下降；④固定质粒量及脂质体体积，当作用时间达 4 h 时，转染效率最高，以后随作用时间延长，细胞漂浮增加，转染效率反下降。故而得出：在 24 孔板中，当铺板密度为 2×10^4 个/孔，孵育时间为 4 h，质粒（μg）/lipofectin（μl）之比在 1:6~1:8 之间时转染效率最高，达 18.62%，48 h 后表达最稳定。

研究表明，作为糖尿病血管并发症的关键靶细胞，HUVECs 转染效率低下，约 0.45%至 10%不等[6]。除与磷脂双分子层阻碍电荷分子进入的电荷屏障机制有关外，尚有学者认为此亦与内皮细胞保护其下细胞外基质免受外来有害物侵袭，而构成生物屏障的分子功能相关[7]。故提高其转染效率及上调外源基因表达，对阐明血管并发症的分子机制，及细胞水平的精确干预具有重要科研价值。本研究同时亦发现，在优化的转染条件范围内可获得最大的转染效率，而铺板密度增大、质粒 DNA 及脂质体用量增加、孵育时间的延长并不能增加转染效率、甚至破坏了未转染的正常细胞，使转染效率降低。总之，我们使用人脐静脉内皮细胞特异性转染试剂，按优化后的转染参数取得了较高的转染效率，为下一步信号蛋白组学研究和筛选关键蛋白药靶提供分子工具。

参　考　文　献

[1] Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications:a unifying mechanism[J]. Diabetes, 2005, 54(6):1615-1625.

[2] Idris I, Donnelly R. Protein kinase C beta inhibition: A novel therapeutic strategy for diabetic microangiopathy[J]. Diab Vasc Dis Res, 2006, 3(3):172-178.

[3] Tanner F C, Carr D P, Nabel G J, et al. Transfection of human endothelial cells[J]. Cardiovasc Res, 1997, 35(3):522 - 528.

[4] Chaltin P, Margineanu A, Marchand D, et al. Delivery of antisense oligonucleotides using cholesterol-modified sense dendrimers and cationic lipids[J]. Bioconjug Chem, 2005, 16(4):827-836.

[5] Almofti M R, Harashima H, Shinohara Y, et al. Cationic liposome-mediated gene delivery: biophysical study and mechanism of internalization[J]. Arch Biochem biophys, 2003, 410(2):246-253.

[6] Teifel M, Heine L T, Milbredt S, et al. Optimization of transfection of human endothelial cells[J]. Endothelium, 1997, 5(1):21-35.

[7] Kaiser S, Toborek M. Liposome-mediated high-efficiency transfection of human endothelial cells[J]. J Vasc Res, 2001, 38(2):133-143.

（责任编辑：冉明会）