DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.09.024
第 21卷第 9期 第 三 军 医 大 学 学 报 Vol. 21, No. 9
674 1999年 9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 1999

# 技术方法

## 一种稳定、有效的表皮细胞基因导入方法的确立*

## The establishment of a stable and efficient method of epidermis gene transfection

杜太超** 赵雄飞 路淑珍 王 旭 黎 鳌 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所) 重庆, 400038

提 要 目的: 探讨一种表皮细胞基因转染的稳定有效方法。方法: 我们用五种方法将报告基因 pSVβ转染培养的表皮细胞,用原位染色方法检测并结合图像分析比较这五种方法的转染后表达情况。结果: 转染后 24 h表皮细胞开始表达报告基因,72 h达到高峰,脂质体结合 10% 甘油休克法的转染效率可达到 4.2%。结论: 表皮细胞难于转染,脂质体结合 10% 甘油休克法是一种稳定、有效的转染方法。

基因转染细胞的方法目前有多种,大多是针对成株细胞系或肿瘤细胞,但人表皮细胞是正常生长细胞,外源基因的导入非常困难。本实验中我们选择了 5种转染方法,以报告基因 pSVβ作为表达载体,观察转染表皮细胞后的β-半乳糖酐酶的表达情况,探讨适合人表皮细胞基因转染的稳定有效方法。

### 1 材料与方法

#### 1.1 试剂

报告基因表达载体 pSVβ购自美国 PROMEGA公司。脂质体(LipofectAMINE)试剂盒购自美国 GiBCO BRL公司。

#### 1.2 原代培养人表皮细胞

采用新鲜的门诊手术包皮,行组织块接种法培养表皮细胞。

#### 1.3 10% 甘油休克液

10 ml甘油(已灭菌)加入至 9 ml DMEM/$F_{12}$培养基充分混匀,置 4℃保存。

#### 1.4 27% 二甲基亚砜(DMSO)休克液

取 99.5% DMSO 5.43 ml加入 DMEM/$F_{12}$ 14.57 ml中,充分混匀,用孔径 0.22μm滤膜抽滤除菌。

#### 1.5 溴化乙二甲胺溶液(0.5μg/μl)

称取 10 mg溴化乙二甲胺,溶于 20 ml DMEM/$F_{12}$培养基内,充分溶解混匀后用孔径 0.22μm滤膜抽滤除菌,分装至 1 ml Ependorf管内,-20℃冻存。

#### 1.6 多聚鸟氨酸溶液(1μg/μl)

称取 5 mg多聚鸟氨酸,溶于 5 ml DMEM/$F_{12}$培养基内,充分溶解混匀后用孔径 0.22μm滤膜抽滤除菌,分装至 1 ml Eeppendorf管内,-20℃冻存。

#### 1.7 表皮细胞基因转染

1.7.1 脂质体直接转染法[1] 取生长状态良好,增殖活跃,40%~60% 融合成片的表皮细胞,用无血清 DMEM/$F_{12}$清洗细胞 2次,加入按试剂盒制备好的转染液,置 37℃ 5% $CO_2$孵箱中 24 h,间断观察细胞形态,及时除去转染液,加入无抗生素含 10% 小牛血清的 DMEM/$F_{12}$培养液,继续培养 24 h后选择细胞用于表达观察。

1.7.2 脂质体结合甘油休克转染法[1,2] 取用 LipofectAMINE转染液转染 2 h后的细胞,吸去转染液,用 10% 甘油休克液休克细胞 4 min后吸去休克液,用生理盐水洗细胞 2次,加入适量表皮细胞培养基,继续培养以观察表达效果。

1.7.3 溴化乙二甲胺转染法[3] 取溴化乙二甲胺转染液 1 ml加入吸去培养基的平皿内,轻荡使转染液与细胞充分接触,置入 37℃,5% $CO_2$孵箱内继续培养,转染期间每 2 h振荡平皿 1次,5 h后吸去转染液,用生理盐水洗去转染液,加入表皮细胞培养基继续培养。

1.7.4 溴化乙二甲胺结合甘油休克法[3,4] 取溴化乙二甲胺转染 5 h后的细胞,加入 10% 甘油休克液,室温静置 4 min后终止休克,用生理盐水洗去休克液,加入表皮细胞培养基继续培养。

1.7.5 多聚鸟氨酸结合 27% DMSO休克法[5] 取 2 ml转染液加入平皿内,37℃,5% $CO_2$孵箱内培养 4 h,轻轻摇晃平皿 1次,4 h后移去转染液,加入 27% DMSO的 DMEM/$F_{12}$,置室温 4 min迅速移去休克液,用生理盐水洗去休克液,加入完全培养基继续培养。

#### 1.8 转染细胞表达鉴定

取转染后继续培养 24 48 72 96 h 5 d的细胞,弃去培养液,用 0.01 mmol/L PBS洗涤 2次,0.3% 戊二醛固定 10~15 min,0.01 mol/L PBS洗 2次,加入新鲜配制的β半乳糖酐酶显色液 1 ml,于 37℃条件下放置过夜,倒置显微镜下观察结果,报告基因表达细胞被染成蓝绿色,常呈簇分布,见图 1。

* 国家自然科学基金资助项目, No. 394707078
** 杜太超,男,31岁,主治医师,硕士,北京黄寺美容外科医院 北京, 100000

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

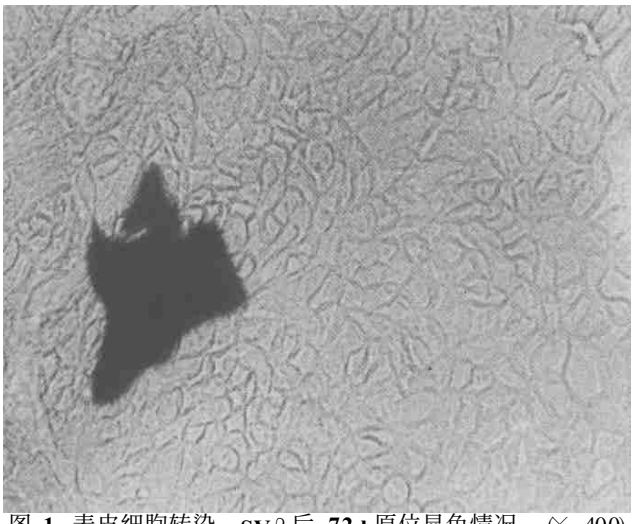


图 1　表皮细胞转染 pSV-β后 72 h原位显色情况　(× 400)

### 1.9　基因转染率计算[6]

于图像分析仪显微镜下摄取图像 ,每次取 5个视野 ,放大 40倍 ,将图像投射至分析仪荧光屏上进行基因转染细胞和总细胞计算 ,然后按下列公式计算转染率。

$$基因转染率=\frac{视野阳性细胞数/转染\ DNA量(\mu g)}{视野总细胞数}\times 100\%$$

## 2　结果

在实验中 ,通过对报告基因表达产物 β半乳糖苷酶的原位显色检测 ,分别观察了脂质体 ,脂质体结合甘油休克 ,溴化乙二甲胺 ,溴化乙二甲胺结合甘油休克 ,多聚鸟氨酸结合二甲基亚砜休克等五种转移基因的化学方法在转染后不同的时相点的报告基因表达情况 ,转染后 24 h可检测到基因表达产物 ,48 h基因表达有所增加 , 72 h到达高峰 ,见表 1,细胞形态良好 ,呈克隆分布 ,高倍镜下可见转染细胞的正常分裂相 ,表现出瞬时表达载体的特性 ,随着继续培养时间的增加 ,染色阳性细胞的克隆数逐渐减少及染色逐渐变浅 ,图像分析处理显示了不同转染条件下、不同转染时间的基因转染效率。脂质体结合甘油休克的转染效率是单纯脂质体转染法的 3倍 ,是溴化乙二甲胺的 35倍 ,是溴化乙二甲胺结合甘油休克转染法的 30倍 ,是多聚鸟氨酸结合二甲基亚砜转染法的 6倍 ,见表 2

表 1　脂质体结合甘油休克转染 $10^4$个细胞不同时间基因表达情况 ($\bar{x}\pm s$)

| 时间 | 克隆 |
|---|---|
| 24 h | 28± 5.68* |
| 48 h | 72± 3.62* |
| 72 h | 82± 4.17 |
| 96 h | 60± 2.43* |
| 5 d | 20± 1.07* |

*: $P<0.05$与 72 h比较

表 2　$10^4$个细胞转染 72 h后不同转染法基因表达情况 ($\bar{x}\pm s$)

| 方法 | 克隆 | 转染率 (%) |
|---|---|---|
| 脂质体 | 40± 4.56* | 1.35± 0.04* |
| 脂质体+ 甘油 | 84± 7.50 | 4.2± 0.07 |
| 溴化乙二甲胺 | 20± 2.31* | 0.114± 0.03* |
| 溴化乙二甲胺+ 甘油 | 29± 3.07* | 0.148± 0.13* |
| 多聚鸟氨酸+ 二甲基亚砜 | 32± 5.40* | 0.62± 0.02* |

*: $P<0.01$与脂质体+ 甘油休克法比较

## 3　讨论

pSV-β的 β-半乳糖酐酶基因编码 β-半乳糖酐酶 ,能通过特殊的原位染色而易于检测它的存在 ,多用于定性 ,定量检测转染细胞的存在及数量 ,常用作探讨基因转染方法的报告基因。

表皮细胞是一种培养条件要求苛刻 ,增殖缓慢 ,具有终末分化特点的上皮细胞 ,许多公认有效基因转染方法对原代培养的表皮细胞都显得不很稳定和有效 ,因为原代表皮细胞对它的生长介质要求特别严格 ,抗拒外源基因的摄入 ,使短时的基因表达研究难以进行。

高效率的基因表达 ,依赖于表达载体的类型 ,基因转移方法和靶细胞选择 ,其中基因转移技术是外源目的基因高效表达和稳定整合入靶细胞基因组的关键。表皮细胞的生长、增殖缓慢和难于转染的特性更是需要建立一种安全高效的基因转移技术 ,使为数众多的原代表皮细胞得到转染并稳定表达进而影响整个细胞群体的细胞生物学特性而达到整个实验的目的[6,7]。

脂质体转染法是目前基因治疗研究运用较多的方法 ,它是利用包裹 DNA的脂性膜结构与细胞膜相融合 ,导入外源 DNA,本实验中使用的脂质体 LipofectAMINE是新一代脂质体 ,它是将一种特殊的阳离子脂类与中性脂类按一定比例混合而成 ,其转染效率已大为提高。

溴化乙二甲胺与多聚鸟氨酸都是一种多聚阳离子化合物 ,利用与带负电荷的 DNA分子结合介导细胞膜吸收 DNA 多聚阳离子作为中间桥梁连接均带负电荷的 DNA分子和细胞膜 ,然后细胞通过内吞摄入外源 DNA进入细胞内而完成转染[3]。

在实验中有机溶剂甘油与二甲基亚砜的应用 ,这一方法是促进细胞在接触 DNA分子时易于接受 ,同时较长时间的接触能使细胞处于休克状态 ,细胞的跨膜运动中止 ,进入细胞内的 DNA分子有充分的机会进入细胞核与靶细胞基因组 DNA进行整合 ,避免使

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

本身就难于进入细胞浆的外源 DNA通过跨膜运动使既得 DNA又外出丢失,进而提高了细胞的基因转移效率。

pSVβ这种瞬时表达载体进入细胞内的表达情况主要与载体的属性相关,转染方法主要影响表达载体进入细胞内的数量,选择 Lipofect AMINE结合 10%甘油休克转染 pSVβ,观察表皮细胞内 pSVβ表达情况。图像处理结果表明,基因转染后细胞表达报告基因的高峰时期在 72 h。统一将 72 h作为检测报告基因表达载体的不同转染方法的转染效率是最佳的时相点,能够得到真实的转染率。

实验证明,脂质体结合 10%甘油休克转染表皮细胞是一种高效率的表皮细胞基因转染方法,同时也证实了甘油,二甲亚砜等的应用对原有方法的转染效率均有明显的影响。

关键词 表皮细胞;基因转染
中图法分类号 R394-3

## 参考文献

1 Hawley N P, Ciccarone V, Gebeyhu G, *et al*. Lipofect AMINE reagent a new higher efficiency polycationinc liposone transfection reagent. Focus, 1993, 15: 73
2 Felgner P L, Gadek T P, Holm M, *et al*. Lipofection A highly efficient, lipid-mediated DNA transfection procedure. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84(21): 7413
3 Jiang C K, Connolly D, Blumenberg M, *et al*. Comparison of methods for transfection of human epidermal keratinocytes. J Invest Dermatol, 1991, 97(6): 969
4 Sheila C D, Thomas R B, Louisue T C, *et al*. Regulation of human papiuomavirus type 11 E6 promoter by viral and host trarscription factors in primary human keratinocytes. Journal of Virology, 1993, 67(3): 1722
5 Nead N A, Micheel A N. Dennis J M, *et al*. Poly-L-ornithine-mediated transfection of human keratincytes. J Invest Dermatol, 1995, 105(5): 688
6 Staedel O, Cathys, Jean, S R, *et al*. High-efficiency transfection of Primary human keratinocytes with positively charged lipopolyamine. DNA Complexes. Jinvest Dermatol, 1994, 102(5): 769
7 Harper J R. Greenhalgh B A. Yuspa S H, *et al*. Expression of transfected DNA by primary murine keratinocytes. J Invest Dermatol, 1988, 91(2): 151

(收稿: 1998-06-21;修回: 1999-01-18)
(编辑 冷怀明)

# 荧光探针法测定原代培养家兔肾脏内髓集合管细胞内 pH

# Fluorenscent measurements of intracellular pH in primary cultured inner medullary collecting duct cells of rabbit kidney

夏前明* 黄 坚 赵志强 钱桂生 (第三军医大学附属新桥医院全军呼吸研究所) 重庆, 400037

提 要 目的:建立稳定的原代培养肾脏内髓集合管(Inner medullary collecting duct, IMCD)细胞的 pHi测定方法,为进一步研究 IMCD细胞功能奠定基础。方法:将家兔肾脏 IMCD细胞用盖玻片培养成细胞单层,制备 IMCD细胞 pHi标准曲线,然后测定 IMCD细胞的 BCECF/AM的荧光强度比值(FIR),进而将 FIR转换为 IMCD细胞的 pHi。结果:本实验观察到 IMCD细胞的 FIR在 pH 6.8~7.8范围内呈显著正相关,回归方程为 $Y = 0.848 \pm 1.089X$ ($r = 0.988$, $P < 0.01$)。15份标本的 pHi结果为 7.255±0.030,与 Mankus等报告的结果最接近。结论:以上结果表明 BCECF/AM荧光探针法测定 IMCD细胞的 pHi,具有简单、可靠、经济等优点,IMCD细胞 pHi测定是研究 IMCD细胞功能的基础测定之一。

细胞功能活动的许多过程是 pH敏感的,全面评价细胞内 pH(pHi)变化对细胞功能活动的影响需要了解 pHi详细的调节机制。反之,通过测定 pHi的快速变化,也可推知细胞的功能活动。因而,pHi测定久已为人们所重视[1,2]。肾脏内髓集合管细胞是哺乳动物肾小管的最末节段,有"尿液 pH的最终调节器"之称。IMCD细胞的 pHi测定是研究 IMCD细胞多种离子交换功能的基础[3~5],国内尚未见报道。我们采用 2′,7′-双(2羧乙基)-5(6)羧基荧光素三乙酰甲酯酶[2′,7′-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxy-fluorescein triacetoxymethyl ester, BCECF/AM]荧光探针,成功地进行了 IMCD细胞的 pHi测定,现将结果报告如下。

* 夏前明,男,43岁,副主任医师,博士,现在成都军区总医院呼吸内科 成都, 610083

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net