

· 论 著 ·

转染试剂 JetPEI 和 Lipofectamine Plus 对 NIH3T3 转染效果及毒性的比较和评价

张世新, 杨康, 廖克龙, 王海东, 吴蔚[△], 刘鸿翔, 张现普, 吴涛

(第三军医大学西南医院胸心外科, 重庆 400038)

摘要:目的 比较及评价两种转染试剂 JetPEI 和 Lipofectamine Plus 对小鼠胚胎成纤维细胞(NIH3T3)的转染效果及毒性。方法 分别用阳离子聚合物 JetPEI 和阳离子脂质体 Lipofectamine Plus 将表达绿色荧光蛋白(GFP)的质粒转染 NIH3T3, 24 h 后, 用流式细胞仪检测转染效率; 分别用 JetPEI 和 Lipofectamine Plus 将 75 nM 24 bp 的双链寡脱氧核苷酸(ODN)转染 NIH3T3, 12 h 后, 用激光共聚焦显微镜观察 ODN 在细胞内的分布; 分别将转染相同量 DNA 的 JetPEI 和 Lipofectamine Plus 加入细胞培养基中, 48 h 后, 用 WST-8 试剂检测其对细胞的毒性。结果 对于大分子质粒, JetPEI 的转染效率更高; 对于小分子 ODN, JetPEI 包裹 ODN 后形成的颗粒更小, 更易于进入细胞核内; 转染相同量的 DNA, JetPEI 对细胞的毒性更小。结论 对于转染 NIH3T3, JetPEI 是一种更理想的转染试剂。

关键词:转染; 成纤维细胞; 毒性

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.12.008

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)12-1164-03

Comparison and evaluation of transfection efficiency and toxicity of two transfection reagents: JetPEI and Lipofectamine Plus in NIH3T3

Zhang Shixin, Yang Kang, Liao Kelong, Wang Haidong, Wu Wei[△], Liu Hongxiang, Zhang Xianpu, Wu Tao
(Department of Cardiothoracic Surgery, Southwest Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To comparison and evaluation of transfection efficiency and toxicity of two transfection reagents: JetPEI and Lipofectamine Plus in NIH3T3. **Methods** Vector expressing GFP was transfected into NIH3T3 cells mediated by JetPEI or Lipofectamine Plus. 24 hours later, transfection rate was detected by flow cytometry. 75nM Oligodeoxynucleotide(ODN) was transfected into NIH3T3 cells mediated by JetPEI or Lipofectamine Plus. 12 hours later, the distribution of ODN in the cells was investigated by laser scanning confocal fluorescence microscope. NIH3T3 cells were transfected with JetPEI and Lipofectamine Plus respectively. 48 hours later, the toxicity of transfection reagent to cells was examined by WST-8. **Results** JetPEI had higher transfection rate than Lipofectamine Plus when NIH3T3 cells were transfected with macromolecule vector. To micromolecule ODN, It seems that transfection rate was no difference between JetPEI and Lipofectamine Plus, but the DNA particles that JetPEI compacted were smaller than Lipofectamine Plus compacted, so it was easier for ODN to enter the cell nucleus. JetPEI had lower cell toxicity than Lipofectamine Plus when NIH3T3 cells were transfected with 200nM ODN. **Conclusion** JetPEI has higher transfection rate and lower toxicity than Lipofectamine Plus to NIH3T3.

Key words: transfection; fibroblasts; toxicity

基因转染是指将外源分子如 DNA、RNA 等导入细胞, 它是研究基因表达调控、基因功能、信号转导等的常规工具。基因转染需要一定的转染试剂将带有目的基因的载体运送到细胞内。阳离子脂质体和阳离子聚合物是目前比较常用的细胞试剂^[1-2]。选取生物安全性好、转染效率高、细胞毒性小、操作简便的转染试剂, 对实验往往能起到事半功倍的效果。小鼠胚胎成纤维细胞(NIH3T3)是纤维化相关疾病、恶性肿瘤等体外研究的重要载体细胞^[3-4]。作者选取目前实验室常用的 2 种转染试剂: 阳离子脂质体 Lipofectamine Plus 和阳离子聚合物 JetPEI, 比较其对 NIH3T3 细胞的转染效率及毒性, 以寻找出 NIH3T3 细胞转染的较佳方法。

1 材料与与方法

1.1 材料 小鼠胚胎成纤维细胞 NIH3T3 购自中科院上海生命科学学院细胞库, DMEM 高糖培养基(美国 Gibco 公司),

10% 的胎牛血清(FBS)(美国 Hyclon 公司), 寡脱氧核苷酸(ODN)的合成与修饰(美国 Invitrogen 公司), pEGFP-N1 质粒(美国 ClonTech 公司), 阳离子转染试剂 JetPEI 试剂盒(法国 Polyplus-transfection 公司), Lipofectamine Plus 试剂盒(美国 Invitrogen 公司), CCK-8 细胞计数试剂盒(日本 Dojindo 公司), 共聚焦激光扫描显微镜(日本 OLYMPUS 公司), 流式细胞仪(B&D 公司)。

1.2 ODN 的设计合成 设计合成单链 48 b ODN(上海英骏公司), 序列为: 5'-CTG ACT GAC TTT TTA GTC AGT CAG TCA GTC AGT CTT TTG ACT GAC TGA-3'。部分碱基用 6-羧基荧光素(6-carboxy-fluorescein, FAM)标记。加水溶解 ODN, 94 °C 水浴 5 min, 缓慢降至室温, 以退火形成哑铃形双链 ODN, 再加入 T4 DNA 连接酶(大连 TaKaRa 公司), 16 °C 反应 24 h, 以闭合缺口。-20 °C 冰箱保存备用。

[△] 通讯作者, Tel: (023) 68765332; E-mail: wuweiyahoo@sohu.com。

1.3 细胞培养与转染 用 DMEM 高糖培养基培养小鼠胚胎成纤维细胞 NIH3T3, 培养基中含 10% 的胎牛血清 (FBS)、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素, 于 37 °C、5% CO₂ 孵箱内培养。细胞的转染根据 JetPEI 及 Lipofectamine Plus 转染试剂说明书完成。

1.4 流式细胞仪检测 pEGFP-N1 质粒转染效率 于 12 孔板中接种 NIH3T3, 第 2 天细胞融合约 80%, 用 pEGFP-N1 质粒转染 NIH3T3, 转染质粒量为 2 μg。JetPEI-pEGFP-N1 混合物分别按照 N/P = 5 和 8 计算转染所需 JetPEI 的量。Lipofectamine Plus-pEGFP-N1 混合物中 Lipofectamine 和 Plus 的量分别是 1, 2 μL, 1, 3 μL, 1, 4 μL。24 h 后, 收集细胞, 用流式细胞仪检测质粒的转染效率。

1.5 激光共聚焦显微镜观察 ODN 在细胞内的分布 NIH3T3 接种在盖玻片上, 待细胞生长至 60% 汇合时, 用 FAM 标记哑铃形 ODN 转染 NIH3T3, 转染 ODN 终浓度为 75 nM。12 h 后, 4% 多聚甲醛固定细胞, DAPI 染色, 用激光共聚焦显微镜观察 ODN 在细胞内的分布。

1.6 细胞毒性的检测 于 24 孔板中接种 NIH3T3, 第 2 天细胞融合约 60%, 分别用 25、50、100、200 nM ODN 与 JetPEI 试剂 (N/P=5) 和 Lipofectamine Plus 试剂 (1:3) 混合后转染 NIH3T3, 每组设 6 个孔, 并设一组空白对照组 (只有细胞和 ODN, 不加脂质体)。4 h 后, 吸去培养基, 加入新鲜含 10% FBS 的 DMEM, 继续培养。48 h 后, 吸去培养基, 每孔加入 200 μL 新鲜 DMEM 和 10 μL WST-8 试剂 (日本 Dojindo 公司), 37 °C 培养箱内培养 1 h, 450 nm 处测吸光值。细胞存活率 (%) = 实验组光吸收值 / 对照组光吸收值 × 100%。

1.7 统计学处理 采用 SigmaPlot, v. 10.0 统计绘图软件对资料进行统计分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 哑铃形 ODN 的设计及合成 合成单链 ODN, 退火形成哑铃形双链 ODN, 用 T4 DNA 连接酶连接缺口, 形成闭环结构 (图 1)。



↑ 处为退火后缺口, 用 T4 DNA 连接酶连接, T 为 FAM 标记位点。

图 1 哑铃形 ODN

2.2 pEGFP-N1 质粒转染效率检测 用 2 μg pEGFP-N1 质粒转染 NIH3T3 细胞, 24 h 后, 收集细胞, 以只加质粒不用转染试剂组为空白对照, 用流式细胞仪检测质粒的转染效率 (图 2)。结果发现, 当转染试剂 JetPEI N/P=5 时质粒转染效率最高, 为 56.98%; 当 N/P=8 时转染效率反而下降 (45.54%)。对于 Lipofectamine Plus 转染试剂, 当 Lipofectamine 的用量为 1 μL 时, 改变 Plus 的量 (2, 3, 4 μL), 转染效率并无明显改变, 分别是 35.05%、31.79%、33.27%。总体来说, JetPEI 的转染效率高于 Lipofectamine Plus。

2.3 ODN 在细胞内分布 用荧光标记的 ODN 转染 NIH3T3 细胞, 12 h 后, 在激光共聚焦显微镜下观察 ODN 在细胞内的

分布。比较发现, JetPEI 和 Lipofectamine Plus 都能将 ODN 高效转入细胞内, 但 JetPEI 转染的 ODN 以分布在细胞核内为主, 且荧光呈散在分布, 而 Lipofectamine Plus 转染的 ODN 以分布在细胞浆内为主, 荧光信号聚集成团。

2.4 细胞毒性检测 用 JetPEI 和 Lipofectamine Plus 试剂分别转染 25、50、100、200 nM ODN。48 h 后, 用 MTT 法检测细胞存活率。JetPEI 试剂转染组细胞活力依次为: (1.050 7 ± 0.070 4)、(0.988 9 ± 0.115 7)、(0.872 3 ± 0.166 2)、(0.664 6 ± 0.053 5); Lipofectamine Plus 试剂转染组细胞活力依次为: (0.986 6 ± 0.064 1)、(0.933 9 ± 0.041 0)、(0.797 1 ± 0.106 4)、(0.397 9 ± 0.030 1)。可见, 随转染试剂浓度的增加, 细胞存活力逐渐下降, 当转染 200 nM ODN 时, 转染试剂 Lipofectamine Plus 对细胞的毒性更大 ($P < 0.01$), 见图 2。

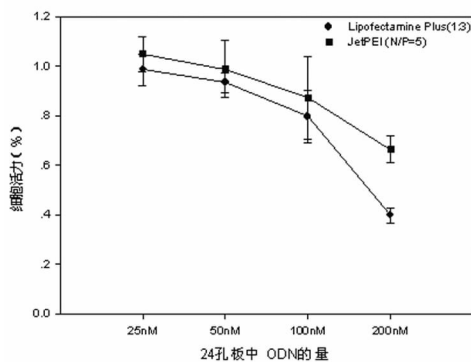


图 2 细胞毒性检测

3 讨 论

基因治疗的关键是如何高效地将目标基因安全递送到目的细胞内^[5]。基因递送载体包括病毒载体和非病毒载体。病毒引起的免疫毒性及致癌性等潜在危害阻碍其在临床的应用^[6]。高效、低毒、生物相容性好的非病毒载体逐步成为基因治疗相关研究的热点。目前, 常用的非病毒载体主要是阳离子脂质体和阳离子聚合物, 它们通过自身的阳离子与核酸结合, 形成带正电荷的复合物与带负电荷的细胞膜融合, 通过内吞作用将 DNA、RNA 导入细胞^[7-8]。阳离子脂质体具有类细胞结构和生物膜的特性, 在体内可降解, 同时可以保护其运载基因片段的生物活性^[9]。但这类化合物因会迅速从血清中被清除并在肺部聚集, 诱导炎症反应, 导致高水平的毒性等限制了其进一步的应用^[10-11]。新一代转染试剂阳离子聚合物能在细胞内涵体中形成吸收质子的“海绵”, 使之崩解, 而使 DNA 免受内涵体酶解^[12]。且具有细胞毒性很低、很稳定、不被血清清除等特点, 日益受到重视。

哑铃形 ODN 能抵抗核酶裂解, 无毒, 并能保持双链 DNA 的天然构象^[13]。本实验以哑铃形 ODN 为转染对象, 能防止 ODN 在细胞内酶解, 有利于观察 ODN 在细胞内的分布情况, 同时排除 ODN 自身对细胞的毒性影响, 保证实验结果的准确性。通过观察 ODN 在细胞内分布, 作者发现在相同的转染条件下, JetPEI 和 Lipofectamine Plus 对 ODN 都有很高的转染效率, 但 Lipofectamine Plus 包裹 ODN 后形成的复合物更大, 以聚集在细胞核外周为主, 而 JetPEI 介导的转染, ODN 能均匀分布在核内, 这点对于今后根据转染目的基因作用的靶位点而选择相应的转染试剂有很好的指导意义。对于转染大分子

质粒, JetPEI 在 N/P=5 时的转染效率最高, 接近 60%, 而 Lipofectamine Plus 试剂, 调整 Plus 剂量, 转染效率并无明显改变, 在 35% 左右。另外, 随转染试剂浓度的增加, JetPEI 和 Lipofectamine Plus 均表现出对细胞的毒性, 当转染 200 nM ODN 时, 转染试剂 Lipofectamine Plus 对细胞的毒性更大 ($P < 0.01$)。

参考文献:

- [1] Niidome T, Huang L. Gene therapy progress and prospects: non-viral vectors[J]. *Gene Ther*, 2002, 9(24): 1647-1652.
- [2] Mark ED. Non-viral gene delivery systems[J]. *Curr Opin Bio-technol*, 2002, 13(2): 128-131.
- [3] Kitamura H, Yamamoto S, Nakase H, et al. Role of heat shock protein 47 in intestinal fibrosis of experimental colitis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 40(5): 599-604.
- [4] Shao HY, Miao ZY, Hui-Chen, et al. Nucleophosmin gene mutations promote NIH3T3 cell migration and invasion through CXCR4 and MMPs[J]. *Exp Mol Pathol*, 2011, 90(1): 38-44.
- [5] Verma IM, Somia N. Gene therapy-promises, problems and prospects[J]. *Nature*, 1997, 38(2): 239-241.
- [6] Marshall E. Gene therapy death prompts review of adenovirus vector[J]. *Science*, 1999, 28(10): 1244-1246.

- [7] Niidome T, Urakawa M, Sato H, et al. Gene transfer into hepatoma cells mediated by galactose-modified alpha-helical peptides[J]. *Biomaterials*, 2000, 21(17): 1811-1813.
- [8] 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): 527-529.
- [9] 刘启光, 吴曼, 沈子威, 等. 包裹质粒 DNA 及线状 DNA 脂质体的制备[J]. *中国医学科学院学报*, 1992, 14(3): 220-224.
- [10] Ishiwata H, Suzuki N, Ando S, et al. Characteristics and biodistribution of cationic liposomes and their DNA complexes[J]. *J Control Release*, 2000, 3(1): 139-141.
- [11] Filion MC, Phillips NC. Toxicity and immunomodulatory activity of liposomal vectors formulated with cationic lipids toward immune effector cells[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1997, 23(2): 345-356.
- [12] Brown MD, Schatzlein AG, Uchegbu IF. Gene delivery with synthetic(non viral) carriers[J]. *Int J Pharm*, 2001, 29(1): 19-21.
- [13] Lee IK, Ahn JD, Kim HS, et al. Advantages of the circular dumbbell decoy in gene therapy and studies of gene regulation[J]. *Current Drug Targets*, 2003, 4(5): 619-623.

(收稿日期: 2010-12-10 修回日期: 2011-02-10)

(上接第 1163 页)

- [1] 缝合器行管状胃成形在胸段食管癌手术中的应用[J]. *山东医药*, 2009, 49(1): 53-55.
- [2] 杨丹宁, 张光远, 李鸿雁, 等. 全机械化吻合管状胃成形在食管癌切除术中的应用[J]. *现代医学*, 2009, 37(3): 353-355.
- [3] Homma S, Shimakage N, Yagi M, et al. Electrogastrography prior to and following total gastrectomy, subtotal gastrectomy, and gastric tube formation[J]. *Digestive Diseases and Sciences*, 1995, 40(6): 893-895.
- [4] Giacomo TD, Francioni F, Venuta F, et al. Complete mechanical cervical anastomosis using a narrow gastric tube after esophagectomy for cancer[J]. *European Journal of Cardiothoracic Surgery*, 2004, 26(7): 881-883.
- [5] 余向东, 张晓. 食管癌切除术后管状胃纳入食管床原位移植食管重建 75 例[J]. *郑州大学学报: 医学版*, 2010, 45(3): 370-372.
- [6] Nobuhiko O, Soji O, Yuko K, et al. Metachronous gastric carcinoma from a gastric tube after radical surgery for esophageal carcinoma[J]. *Ann Thorac Surg*, 2004, 77(9): 1189-1191.
- [7] 徐晓晗, 骆金华, 张石江, 等. 管状胃在食管癌根治术中的应用[J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2010, 30(9): 1327-1329.

- [8] 何冬雷, 许荣华, 郑武平, 等. 管状胃与食管侧侧吻合在食管癌手术治疗中的应用[J]. *广东医学*, 2010, 31(15): 1996-1998.
- [9] Hayashi E, Yuasa N, Sasaki E, et al. Right gastroepiploic artery occlusion test for resection of recurrent lesion after esophageal reconstruction using a gastric tube[J]. *The American Journal of Surgery*, 2004, 187(3): 446-448.
- [10] Martin KS, Daniel M, Claudio R, et al. Circulatory and anatomic differences among experimental gastric tubes as esophageal replacement[J]. *World Journal of Surgery*, 1997, 21(8): 992-994.
- [11] 张灿斌, 李简, 郑建, 等. 胃管成形术在食管重建中的可行性研究[J]. *河南科技大学学报: 医学版*, 2005, 23(3): 175-177.
- [12] 黄建豪, 付俊慧, 王卫光. 管状胃代替食管对食管癌术后肺功能的影响[J]. *临床和实验医学杂志*, 2008, 7(1): 29-31.
- [13] 车嘉铭, 项捷, 陈凯. 管状胃在食管、贲门癌手术中的临床应用[J]. *中国胸心血管外科临床杂志*, 2010, 17(1): 96-98.
- [14] 李勇, 施巩宁, 马红冰. 管状胃对食管癌术后围术期呼吸功能的影响[J]. *临床医学*, 2010, 30(1): 61-63.

(收稿日期: 2010-12-10 修回日期: 2011-02-10)