

· 基础研究 ·

## MicroRNA 磁性纳米微粒反向转染法提高 HepG2 转染效率的应用\*

陈 罡<sup>1</sup>, 党裔武<sup>1</sup>, 罗殿中<sup>1,2</sup>

(广西医科大学:1. 第一附属医院病理科;2. 研究生学院, 南宁 530021)

**摘要:**目的 筛选并优化介导微小 RNA(miRNA)-221 阻遏物转染肝癌 HepG2 细胞的方法。方法 使用 7 种转染试剂介导 miRNA-221 阻遏物在 24 孔板转染肝癌 HepG2 细胞。实时定量 RT-PCR 检测 HepG2 细胞的 miRNA-221, 计算敲除 miRNA 率, 继而进行不同试剂用量、不同 miRNA 阻遏物浓度、正反向转染的对比。结果 Lipofectamine 2000, siPORT Amine transfection 及 combiMAGnetofection 在转染 40 nmol/L miRNA 阻遏物 72 h 后到均达到了超过 50% 的 miRNA 敲除率, 其中 combiMAGnetofection 敲除率最高(55±8)%。转染条件优化后发现反向转染, 2 μL combiMAGnetofection 及 200 nmol/L miRNA 阻遏物的组合 miRNA-221 沉默效率最高(89±4)%, 其细胞存活率为(92±7)%, 转染率超过 85%。结论 介导 miRNA-221 阻遏物转染 HepG2 细胞的最佳试剂是 combiMAGnetofection, 优化转染条件为使用 2 μL 的 combiMAGnetofection 反向转染 200 nmol/L 的 miRNA 阻遏物 72 h。

**关键词:** 微 RNA; 转染; 肝癌; 微小 RNA-221; 实时定量 RT-PCR

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.33.026

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)33-3386-03

## Enhancement of MicroRNA transfection efficiency in HepG2 cells by reverse nanoparticles magnetofection system\*

Chen Gang<sup>1</sup>, Dang Yiwu<sup>1</sup>, Luo Dianzhong<sup>1,2</sup>

(1. Department of Pathology, First Affiliated Hospital; 2. Graduate College, Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China)

**Abstract: Objective** To select and optimize the transfection approach of miRNA-221 inhibitor into HepG2 hepatocarcinoma cells. **Methods** Seven different transfection reagents were tested to transfect miRNA-221 inhibitor into HepG2 cells with 24-well-plates. Real time quantitative RT-PCR was performed to detect the miRNA-221 level and ratio of miRNA knock-down was calculated. Then different amount of the transfection reagent and different concentration of miRNA inhibitor were investigated. Furthermore, reverse-transfection method was compared to the forward-transfection. **Results** Lipofectamine 2000, siPORT Amine transfection and combiMAGnetofection all achieved more than 50% miRNA knock-down at 72 h with 40 nmol/L miRNA inhibitor, among which combiMAGnetofection gained the highest silencing(55±8)%. At 72 h post-transfection, the knock-down ratio was the most potent with a combination of reverse transfection with 2 μL combiMAGnetofection and 200 nmol/L miRNA inhibitor(89±4)%. The cell viability rate was(92±7)% and the transfection efficiency was higher than 85%. **Conclusion** The transfection reagent combiMAGnetofection was found to yield the highest percentage of miRNA silencing in HepG2 cells (Reverse transfection/2 μL combiMAGnetofection/200 nmol/L miRNA inhibitor/24 well format). This will allow the study of the biological effects of the corresponding miRNA in this cell line.

**Key words:** microRNAs; transfection; liver neoplasms; microRNA-221; real time quantitative RT-PCR

微小 RNA(microRNA, miRNA)是一种微小的内源性非编码 RNA 分子,由 21~25 个核苷酸组成。这些 miRNA 可靶向一个或者多个 mRNA,通过翻译水平的抑制或断裂靶标 mRNA 而调节基因的表达<sup>[1-2]</sup>。随着成百上千的 miRNA 的成功鉴定,通过抑制或升高细胞中 miRNA 的表达水平来研究其功能已迅速发展为一个重要的研究领域<sup>[3]</sup>。miRNA 阻遏物及模拟物的转染方法众多,如磷酸钙沉淀法、电穿孔法、脂质体法、显微注射法、逆转录病毒法等<sup>[4]</sup>。不同细胞类型或不同细胞系需要不同的转染方法和转染条件,故成功的 miRNA 阻遏物或模拟物转染实验需要进行必要的条件优化。新近发展起来的磁性转染(magnetofection)方法使用磁性纳米微粒(nanoparticles)与 miRNA 阻遏物或模拟物结合成磁性 miRNA 复合物,在磁力的作用下进行转染,该方法还可与其他转染方法如脂质体法结合使用,提高转染效率<sup>[5]</sup>。本实验使用 miRNA-221 阻遏物转染肝癌细胞 HepG2,并对比了磁性纳米微粒转染法与其他转染方法的优势,继而转染条件进行了优化,同时

检测了其反向转染的效果,探讨最佳的 miRNA-221 阻遏物的转染方法,现报道如下。

## 1 材料与方 法

**1.1 miRNA 阻遏物转染** HepG2 细胞置于含 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养基,37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养,传代。miRNA-221 阻遏物及阳性、阴性 miRNA 阻遏物对照购自 Applied Biosystems 公司。按说明书使用不同转染试剂进行转染,见表 1。初始细胞接种密度为每孔 5×10<sup>4</sup> 个(24 孔板),miRNA 阻遏物终浓度为 40 nmol/L。改进的正向磁性纳米微粒转染步骤简述如下:(1)接种细胞,培养 24 h,细胞达到 40%~50% 饱和度;(2)细胞换液;(3)按实验要求稀释 miRNA 阻遏物的同时,根据试剂说明书及实验分组稀释磁性纳米微粒;(4)混合 miRNA 阻遏物及磁性纳米微粒溶液,室温孵育 20 min 后加 200 μL 混合液至每孔细胞中;(5)将 24 孔板至于自制磁板上于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中作用 30 min 后移走磁板;(6)常规培养,于 24、48 及 72 h 收获细胞进行后续实验。继而对磁性纳

\* 基金项目:广西自然科学基金资助项目(桂科青 1013059)。

表 1 不同转染试剂对 miR-221 敲除率对比( $\bar{x} \pm s, \%$ )

试剂	公司	miRNA 敲除率		
		24 h	48 h	72 h
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen Merelbeke, 比利时	12±3	38±5	52±2
siPORT™ Amine Transfection Agent	Ambion, Inc., Lennik, 比利时	15±2	38±15	52±8
ICAFectin™ 442 siRNA transfection reagent	Eurogentec S. A., Liege, 比利时	8±4	20±8	42±10
N-TER™ Nanoparticle siRNA Transfection System	Sigma-Aldrich, Inc. N. V. Bornem, 比利时	9±2	18±3	28±7
X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent	Roche Applied Science, Mannheim, 德国	5±4	23±9	34±8
polyMagnetofection™ -100	Chemiceil, GmbH, Berlin, 德国	4±2	23±10	41±5
combiMAGnetofection™ reagent-500	Chemiceil, GmbH, Berlin, 德国	19±4	48±7	55±8
Mock 对照	—	1±2	0±8	0±15
空白对照	—	3±1	9±5	8±11

注:miRNA 阻遏物浓度为 40 nmol/L;Mock 对照为加入相应 miRNA 稀释液 Opti-Mem,但无转染试剂或磁粒;空白对照仅为细胞。—,表示无此项。

米微粒转染法进行不同磁粒用量,miRNA 阻遏物浓度以及正反向转染测试。其中传统正向转染的时机为细胞接种贴壁后 24 h,反向转染则在消化细胞,调整细胞浓度后,将细胞悬液加入含有 miRNA 阻遏物混合液以及磁性纳米微粒溶液的培养板中。转染与细胞增殖无关的 miRNA-191 阻遏物后,使用 CellTiter96 AQueous One Solution 试剂盒(Promega)检测磁性纳米微粒反向转染法的细胞存活率,同时使用 siGLO Transfection Indicators 和 TOX Transfection 阳性对照试剂盒(Thermo Scientific Dharmacon)检测磁性纳米微粒反向转染法的转染效率,磁性纳米微粒转染原理见插 II 图 1,自制的 24 孔磁板见图 2。

**1.2 转染效果的检测** 使用实时定量 RT-PCR 技术检测 miRNA 敲除率。miRNA 检测引物、探针、逆转录试剂盒及实时定量 RT-PCR 试剂盒购自 Applied Biosystems 公司。收获各组细胞,用 ABI PRISM 6100 prepsation 法抽提各实验组细胞的总 RNA,使用 ND-1000 NanoDrop 检测 RNA 质量及浓度。取总 RNA 各 200 ng,加入到含特异引物的 15 μL 的 RT 反应体系中进行 miRNA 逆转录反应。取 2 μL cDNA 样本使用 ABI-Prism 7900HT PCR 仪(Applied Biosystems)行实时定量 PCR 检测。所有实验重复 3 次。采用  $\Delta\Delta C_p$  法分析敲除结果,RNU6B 与 let-7a 的  $C_p$  平均值为实验内参照,其中 miRNA-221 的  $\Delta C_p = C_{p_{miRNA-221}} - C_{p_{内参照}}$ ,  $\Delta\Delta C_p = \Delta C_{p_{miRNA组}} - \Delta C_{p_{对照组}}$ 。miRNA 敲除率 =  $(1 - 1/2^{\Delta\Delta C_p}) \times 100\%$ 。使用 CellTiter96 AQueous One Solution 试剂盒检(Promega)测转染 miRNA-221 阻遏物后细胞增殖情况。使用 Apo-ONE Homogeneous Caspase-3/7 试剂盒(Promega)检测 caspase3/7 活性变化。使用 Hoechst 33342 和碘化丙啶(PI)双重染色荧光显微镜下观察细胞凋亡情况。

**1.3 统计学处理** 用 SPSS19.0 软件进行多样本的单因素方差分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,两两比较采用 LSD 法,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 不同转染试剂 miRNA 敲除效果对比** 在 7 种检测的转染试剂中,按试剂说明书建议用量进行操作,结果显示各转染方法的 miRNA 敲除率随着转染时间的延长而升高,其中 Lipofectamine 2000, siPORT Amine transfection 及 combiMAGnetofection 在转染 40 nmol/L miRNA 阻遏物 72 h 后均超过 50% 的 miRNA 敲除率,其中 combiMAGnetofection 敲除率最高,见表 1。

**2.2 combiMAGnetofection 不同转染条件对比** 分别使用

combiMAGnetofection 0.5、1.0 和 2.0 μL,miRNA 阻遏物浓度 8、40 和 200 nmol/L,结果显示 72 h 后,2 μL combiMAGnetofection 及 200 nmol/L miRNA 阻遏物的组合 miRNA-221 沉默效率最高,高浓度 miRNA 阻遏物并未出现敲除抑制作用。逆向转染时,2 μL combiMAGnetofection 及 200 nmol/L miRNA 阻遏物的组合基因沉默效率最高,明显高于同条件正向转染效果( $P < 0.05$ ),见表 2、插 II 图 3。

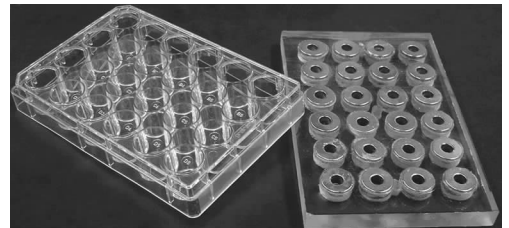


图 2 自制 24 孔磁板

表 2 combiMAGnetofection 不同转染条件对比( $\bar{x} \pm s, \%$ )

combiMAGnetofection (μL)	miRNA-221 阻遏物浓度(nmol/L)	miRNA 敲除率		
		24 h	48 h	72 h
0.5	8	2±4	13±10	22±6
0.5	40	5±8	12±10	28±11
0.5	200	20±8	43±6	66±2
1	8	3±5	18±2	33±8
1	40	6±7	48±7	55±8
1	200	24±8	69±2	79±5
2	8	5±4	15±10	32±7
2	40	18±2	48±3	64±2
2	200	30±8	68±2	72±3
2(逆向转染)	200	43±9	83±2	89±4
2	200(阴性 miRNA 阻遏物)	2±2	1±2	2±2
0	200	1±1	3±1	3±1
2	0	1±2	2±2	3±3

**2.3 细胞存活率及转染效率** 使用 2 μL combiMAGnetofection 及 200 nmol/L 反向转染 miRNA-191 阻遏物后检测 24、48 和 72 h 的细胞存活率分别为 (94±5)%、(93±8)% 及 (92±7)% ,与转染阴性 miRNA 对照组及空白对照组的细胞存活率比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),证明该转染方法细胞毒性小。同时使用该反向转染条件,经 siGLO 转染后荧光显微镜计数法和 TOX 阳性试剂盒转染后检测活细胞数法证实,转染

率 24 h 均超过 65%, 48 h 均超过 77%, 72 h 均超过 85%。

### 3 讨 论

高效的 miRNA 阻遏物转染是研究 miRNA 生物学作用的基本途径, 故选择最合适的转染方法是整个实验成败的第一步。目前, miRNA 阻遏物转染的方法众多, 但各有优缺点。磷酸钙沉淀法重复性差、转染效率低, 电穿孔法无法避免高水平的细胞毒性, 显微注射法技术要求高、操作繁琐、工作效率低、装置昂贵, 逆转录病毒法耗时且价格昂贵, 尤其不适合于有效片段的筛选实验, 且需考虑安全因素<sup>[4]</sup>; 阳离子脂质体试剂可形成微小的(平均大小约 100~400 nm)单层脂质体。这些脂质体带正电, 可以靠静电作用结合到 DNA 的磷酸骨架上以及带负电的细胞膜表面, 故其容易透过细胞膜, 在各种体外培养细胞的 RNA 干扰实验中得到了广泛的应用<sup>[6]</sup>, 但仍有一定的细胞毒作用, 而且对于原代细胞、悬浮细胞仍存在转染效率低的情况。本实验使用的磁性转染方法将磁性纳米微粒与 miRNA 阻遏物结合成磁性 miRNA 复合物, 在磁力的作用下进行转染, 该方法还可与其他转染方法结合, 提高 miRNA 阻遏物转染效率<sup>[5]</sup>, 为了探讨最佳的将 miR-221 阻遏物转染至 HepG2 细胞的方法, 本实验对比了 7 种转染试剂的 miRNA-221 敲除率, 结果显示在各个时间段, Magnetofection 联合 lipofectamine 2000(即 combiMAGnetofection)均获得了比其他方法更强的 miRNA 敲除, 为 miRNA 阻遏物转染提供了新的选择。

miRNA 敲除率由多种因素共同支配, 如转染方法、转染细胞状态、miRNA 阻遏物浓度、转染试剂的用量、转染复合物的孵育时间、培养液中血清和抗生素含量等<sup>[4]</sup>。转染试剂与转染物使用过量可引起细胞形状改变、脱落、甚至死亡, 直接影响着转染的效率, 故对转染条件进行优化是成功的 miRNA 干扰实验的前提。本实验对比了 combiMAGnetofection 不同的用量以及不同 miRNA 阻遏物浓度的 miRNA 敲除效果。结果显示最佳的实验条件是: 2  $\mu$ L combiMAGnetofection/200 nmol/L miRNA 阻遏物/24 孔板/72 h, miRNA 敲除率为 72%。由于 miR-221 本身对细胞增殖有影响<sup>[7]</sup>, 故本实验使用与细胞增殖无关的 miR-191 阻遏物来检验 combiMAGnetofection 转染系统的细胞活力。结果显示细胞活性高, 证明 combiMAGnetofection 转染系统操作过程对细胞损伤小, 细胞毒性效应低。

反向转染法与传统正向转染法的区别是传统方法需在转染前 1 d 接种细胞铺板, 培养 24 h 后再加转染复合物进行转染; 而反向转染则是先加入转染试剂和 miRNA 阻遏物混合物在培养板上共同温育数 10 min, 然后加入细胞铺板培养, 其优点可节约培养时间<sup>[8]</sup>。避免传统正向转染方法培养条件的频繁变化对细胞表达可能产生的影响; 对于某些贴壁重叠生长的细胞, 可使细胞更完全的接触转染混合物, 提高转染效率。本实验发现反向转染法的 miRNA 敲除率明显高于传统正向转

染法, 有可能因为 hepG2 细胞部分可重叠生长, 在传统的正向转染中, 并非所有的细胞都能均匀的接触转染混合物, 从而影响了 miRNA 的敲除效率。反向转染法使用细胞悬液进行转染, 同时在磁力及脂质体的双重作用下, miRNA 阻遏物可以更彻底的接触细胞, 得以高效的转入细胞中。本课题组也对比了正反向转染数个 miRNA 模拟物(miR-221, miR-224, miR-146a 等)的实验, 发现反向转染的效果均优于正向转染(结果未示)。该转染条件可用于后续的 miRNA 在肝癌中生物学作用的研究。

综上所述, 本实验结果提示人肝癌细胞适合应用磁性纳米微粒反向转染法进行化学合成 miRNA 阻遏物及模拟物的转染, miRNA 阻遏物及模拟物浓度、磁性纳米微粒用量、转染时间及反向转染的使用是转染的重要影响因素。

(致谢: 感谢比利时安特卫普大学 Phillippe Delcamte 博士提供相关仪器设备及技术支持。)

### 参考文献:

- [1] Siegrist F, Singer T, Certa U. MicroRNA expression profiling by bead array technology in human tumor cell lines treated with interferon-alpha-2a[J]. Biol Proced Online, 2009, 11(1): 113-129.
- [2] 刘强, 郑秀峰, 辛永红. miRNA 研究进展[J]. 重庆医学, 2009, 38(15): 1970-1972.
- [3] Hunt EA, Goulding AM, Deo SK. Direct detection and quantification of microRNAs[J]. Anal Biochem, 2009, 387(1): 1-12.
- [4] Lee SH, Sinko PJ. siRNA-getting the message out[J]. Eur J Pharm Sci, 2006, 27(5): 401-410.
- [5] Pickard M, Chari D. Enhancement of magnetic nanoparticle-mediated gene transfer to astrocytes by 'magnetofection': effects of static and oscillating fields[J]. Nanomedicine, 2010, 5(2): 217-232.
- [6] 张园, 李志樑, 邱健, 等. 优化阳离子脂质体介导的组织因子小干扰 RNA 转染 HEK-293 的转染条件[J]. 广西医科大学学报, 2009, 26(2): 176-179.
- [7] Gramantieri L, Fornari F, Ferracin M, et al. MicroRNA-221 targets Bmf in hepatocellular carcinoma and correlates with tumor multifocality[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(16): 5073-5081.
- [8] 杨萍, 严金川, 刘培晶. siRNA 反向转染法提高原代悬浮细胞转染效率的应用[J]. 江苏大学学报: 医学版, 2010, 20(3): 267-269.

(收稿日期: 2011-06-09 修回日期: 2011-08-12)

(上接第 3385 页)

- [12] Yamaguchi M, Suzuki R, Kwong YL, et al. Phase I study of dexamethasone, methotrexate, ifosfamide, L-asparaginase, and etoposide (SMILE) chemotherapy for advanced-stage, relapsed or refractory extranodal natural killer (NK)/T-cell lymphoma and leukemia[J]. Cancer Sci,

2008, 99(5): 1016-1020.

- [13] Cheson BD, Pfistner B, Juweid ME, et al. Revised response criteria for malignant lymphoma[J]. J Clin Oncol, 2007, 25: 579-586.

(收稿日期: 2011-08-24 修回日期: 2011-09-22)