

[文章编号] 1007-385X(2004)01-0046-04

改良鱼精蛋白-脂质体-寡聚核苷酸复合体法转染卵巢癌 SKOV3 细胞

陆建萍¹, 孙红¹, 曹长春², 欧周罗³(1. 复旦大学妇产科医院, 上海 200011; 2. 复旦大学中山医院, 上海 200032; 3. 复旦大学肿瘤医院, 上海 200032)

[摘要] 目的: 优化鱼精蛋白-脂质体-寡聚核苷酸(oligodeoxynucleotides, ODN)复合体(liposome-protamine-ODN, LPD)法以提高 SKOV3 细胞的转染效率, 并探讨该转染法对细胞体外增殖能力的影响。方法: 参照文献设计核转录因子- κ B(NF- κ B)诱捕物 ODN 和对照物 Scrambled ODN, 并用 FITC 标记。LPD 表面 +/ - 电荷比例设计为 1, 2, 4, 6, 并按转染液中是否含有小牛血清分成 2 组。用荧光光度计、流式细胞仪测定转染效率。用 MTT 法观察 LPD 法对 SKOV3 细胞在体外增殖的影响。结果: SKOV3 细胞经 LPD 法转染, +/ - 电荷比例为 4 时转染效率最高, 达 96.41%, 而无鱼精蛋白-脂质体的裸露 ODN 细胞转染效率为 12.87%, 两者差异有统计学上的高度显著性意义。培养液中 10% 小牛血清对转染效率无明显影响。结论: 适宜电荷比例的 LPD 法是一种不受血清影响的高效率转染方法, 有望用于体内转染。

[关键词] 鱼精蛋白-脂质体-寡聚核苷酸转染法; 卵巢肿瘤; 肿瘤细胞

[中图分类号] R737.31 **[文献标识码]** A

A Modified Method for Transfection to SKOV3 Cells with Protamine-DOTAP/Chol Liposome-Oligodeoxynucleotides Complex

LU Jian-ping¹, SUN Hong¹, CAO Chang-chun², OU Zhou-luo³(1. Gynecology and Obstetrics Hospital Fudan University, Shanghai 200011, China; 2. Zhongshan Hospital Fudan University, Shanghai 200032, China; 3. Tumor Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the transfer efficiency of protamine-DOTAP/Chol liposome-oligodeoxynucleotides complex to SKOV3 cells. **Methods:** Synthesized NF- κ B decoy ODNs or scrambled ODNs labeled by FITC on the 5' ends was mixed with ratiomic DOTAP/cholesterol liposome and protamine, making the charge ratio of positive:negative 4. SKOV3 cells were transfected by the complex (1 μ mol/L) and the efficiency were measured by flow cytometry (FCM) and fluorescence meter. The direct effect of NF- κ B decoy ODNs transfer on the growth of SKOV3 cell line *in vitro* was measured by MTT method. **Results:** The efficiency of LPD transfer to SKOV3 cell line was 96.41%, significantly higher than that of naked DNA transfer which was 12.86%. The growth of SKOV3 cell line was not affected by 48h incubation after NF- κ B decoy ODNs or scrambled ODNs transfection. **Conclusion:** LPD method is the one with high transfer efficiency not affected by NBS (newborn bovine serum) with possibility of use *in vivo*.

[Key words] protamine-liposome-oligodeoxynucleotides transfer; ovarian neoplasms; tumor cells

* 基因转移是基因治疗的基础。目前基因转移的方法分物理、化学和生物三大类, 各有优缺点, 并不十分令人满意。虽然包括 DOTAP 在内的一些新型阳离子脂质体转染试剂已在一些实验室采用^[1], 但通过优化试剂和控制实验条件来提高转染效率仍有必要。为此, 本研究选择人卵巢癌 SKOV3 细胞系作为研究对象, 先将鱼精蛋白与寡聚核苷酸相结合, 再与不同浓度的阳离子脂质体混合, 形成复合体(protamine-liposome-

oligodeoxynucleotides, LPD), 观察复合体表面电荷和小牛血清对转染的影响, 并取得了满意的转染效果。

[基金项目] 上海市卫生局“百人计划”基金 98BR040 赞助

[作者简介] 陆建萍(1968-), 浙江省慈溪市人, 女, 硕士, 副主任医师, 主要从事妇科肿瘤方面的研究。现在浙江省慈溪市人民医院工作

1 材料与方法

1.1 细胞株

人浆液性上皮性卵巢癌细胞株 SKOV3, 来自本院实验室。

1.2 主要试剂

20 OD 硫代磷酸化的 FITC-NF- κ B 诱捕物寡聚核苷酸(oligodeoxynucleotides, ODN), 其中包含 P65 和 P50 的专一性结合位点(下划线部分)序列^[3]为 5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCCAGG C-3', 3'- TCA ACT CCC CTG AAA GGG TCC G-5'; 20 OD 硫代磷酸化的对照物寡聚核苷酸(scrambled ODN), 序列为 5'TTG CCG TAC CTG ACT TAG CCG T 3', 3'AAC GGC ATG GAC TGA ATC GGC A 5', 由上海生物工程公司合成; 1% 鱼精蛋白; 1 mmol/L DOTAP/Chol 脂质体, 由中山医院丁小强教授惠赠; DMEM 培养基, 购自 GIBCO 公司; 新生小牛血清(NBS), 购自杭州四季青公司, 使用时在培养基中加入 10% 小牛血清; IL-1 β (5 μ g, R&D 公司), 按指示稀释成 1 μ g/ml, 放 -70 $^{\circ}$ C 冰箱备用; HEPES 缓冲液(HBS 10 mmol/L HEPES, 145 mmol/L NaCl, pH 7.4)。

1.3 主要仪器

荧光光度计, 日本岛津公司; 细胞培养箱, 美国 SHEL LAB 公司产品; 超净工作台, 由苏州净化厂生产; 流式细胞仪(FCM), 美国 Beckton Dickenson 公司产品; 酶标仪: ELx 800 Universal Microplate Reader (BIOTEK INSTRUMENTS, INC)。

1.4 确定 1 μ mol/L FITC-NF- κ B-ODN 在电荷比例 1, 2, 4, 6 下的转染效率以及 10% 小牛血清对转染的影响

每孔 2×10^5 /L 总体积为 2 ml 的细胞接种到 6 孔培养板, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱培养, 铺满率达 50% ~ 80%。1.5 ml EP 管中配制以下溶液: 用 HEPES 缓冲液将 FITC-NF- κ B ODN 稀释到 660 μ g/ml (约 100 μ mol/L) \times 1 ml; 与 1% 鱼精蛋白混合(96:4), 使 protamine: ODN = 6:10, 置室温下 10 min。

1.5 ml EP 管, A 管加入不含 NBS DMEM 980 μ l, B 管加入含 10% NBS DMEM 980 μ l, 然后各加入上述鱼精蛋白-ODN 混合液 20 μ l, 按表 1 所示分别配制成电荷比例各为 1, 2, 4 或 6 的溶液。加入 A 管液的为 NBS⁻实验液, 加入 B 管液的为 NBS⁺实验液。配制时均将它们轻轻混匀, 置室温 15 min, 复合物可能呈现混浊, 但不影响转染。

弃去细胞培养板中的培养基, 并用 2 ml 的无血清培养基冲洗细胞; 将上述鱼精蛋白-脂质体-DNA 复合物(LPD)混匀, 分别加入到培养板细胞中, 使 ODN 终浓度为 1 μ mol/L。每种转染液均做 3 复孔。

表 1 转染液配制方法

Tab. 1 Preparation of transfer complex

Charge ration(+/-)	1	2	4	6
No.	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4
DOTAP/Chol(μ l)	2.7	13.6	35.4	57.2
DMEM(NBS ⁻)(μ l)	247.3	236.4	214.6	192.8
Liguid A(μ l) (or liguid B)	250	250	250	250
Total vol(μ l)	500	500	500	500

2 h 后弃转染液, 并用无血清培养基冲洗后收集细胞, 用荧光光度计测定荧光密度, 代表转染效率。激发光波长 495 nm, 发射光波长 525 nm。所有实验过程注意避光。

实验重复 3 次。

1.5 +/- 电荷比例为 4 的阳离子脂质体-鱼精蛋白介导 NF- κ B 诱捕物转染 SKOV3 细胞效率测定

细胞培养、转染方法同上, 但细胞接种于 6 cm 培养皿, LPD 复合体表面正负电荷比例设计为 4, 转染 2 h 后收集培养皿细胞, 用 FCM 测定荧光细胞占所有细胞的比例, 代表转染效率。实验重复 3 次。

1.6 MTT 法观察 LPD 法转染 NF- κ B ODN 诱捕物对 SKOV3 细胞体外增殖的影响

细胞培养和 LPD 法转染同上, LPD 复合体表面电荷比例设计为 4, 转染 2 h 后转染组吸弃转染液, 对照组弃去培养基, 均加入 DMEM 培养基 1 ml, 继续培养 48 h; 各孔分别加入 MTT(5 mg/ml) 200 μ l, 继续培养 5 h; 取出培养板, 弃培养基, 各孔分别加入 DMSO 1 ml, 微振荡至结晶溶解, 在 ELx-800 酶标仪上波长 490 nm 处比色得吸光度值, 取 4 复孔的平均值进行统计分析。实验重复 3 次。

$$\text{细胞活力}(\%) = \frac{\text{实验孔吸光度} - \text{空白孔吸光度}}{\text{对照孔吸光度} - \text{空白孔吸光度}} \times 100\%$$

1.7 统计方法

结果以均数 \pm 标准差表示, 用 SPSS10.0 软件统计, 方法为 *t* 检验。

2 结果

2.1 1 μ mol/L FITC-NF- κ B-ODN 在不同电荷比例 1, 2, 4, 6 下的转染效率以及 10% 小牛血清(NBS)对转染的影响

本实验以 +/- 电荷比例 = 1, 2, 4, 6 的鱼精蛋白-DOTAP/Chol-FITC-NF- κ B-ODN(LPD)转染 SKOV3 细胞, 转染效率较裸露 DNA 被动转染显著增高, *P*

<0.001,其中又以 +/-电荷比例为 4 组效率最高,与电荷比例为 1、2 组相比差异有显著性意义($P < 0.05$),但与 +/-电荷比例 = 6 组比较差异无显著性意义。10% 小牛血清对各组转染效率无明显影响(表 2)。

2.2 +/-电荷比例为 4 的阳离子脂质体-鱼精蛋白介导 NF- κ B 诱捕物(LPD 法)转染 SKOV3 细胞效率

实验结果(流式细胞仪)显示,LPD 法转染 SKOV3 细胞效率高,可达 96.41%,与裸露 DNA 组(转染效率为 12.86%)比较差异有极显著性, $P < 0.001$ (图 1,2)。

2.3 LPD 法转染 NF- κ B ODN 诱捕物对 SKOV3 细胞体外增殖的影响(MTT 法)

体外培养的 SKOV3 细胞在脂质体转染 NF- κ B ODN 诱捕物或 Scrambled ODN 48 h 后其细胞活力无明显改变,与未转染对照组比较,统计学处理差异无显著性意义(表 3)。

表 2 不同电荷比例的 DOTAP/Chol 脂质体转染效率比较表(转染 2 h)
Tab. 2 Efficiency of liposome-mediated gene transfer with different charge ratio(2 h)

Group	Fluorescence intensity(NBS-)	Fluorescence intensity(NBS+)
1	0.56 ± 0.10	0.60 ± 0.16
2	3.26 ± 0.17 [#]	3.25 ± 0.24 [#]
3	3.98 ± 0.12 [#]	4.07 ± 0.21 [#]
4	4.53 ± 0.28 ^{#*}	4.63 ± 0.29 ^{#*}
5	4.23 ± 0.11 [#]	4.17 ± 0.19 [#]

1: Control group: Naked DNA transfer; 2-5: LPD method (charge ratio: 2. +/- = 1; 3. +/- = 2; 4. +/- = 4; 5. +/- = 6). # $P < 0.01$, compared with control group; * $P < 0.05$, compared with next group. NBS-: Transferred liquid without NBS; NBS+: Transferred liquid with 10% NBS.

图 1 SKOV3 细胞转染效率流式细胞图

Fig. 1 FCM analysis of the transfer efficiency of SKOV3 cell

表 3 SKOV3 细胞脂质体转染后细胞活力变化

Tab. 2 SKOV3 cell growth after LPD method transfer

Groups	Control	LPD-NF- κ B ODN	LPD-Scrambled ODN
Transfer time(h)	0	48	48
Cell growth(%)	100	96.6 ± 3.5	97.1 ± 3.9

3 讨论

基因转移的方法分物理、化学和生物三大类,包括物理学的 DNA 直接注射、电穿孔等,化学的脂质体转染、受体介导、多聚阳离子介导等,生物学的逆转录病

图 2 裸露 DNA 法和 LPD 法转染 SKOV3 细胞效率比较

Fig. 2 FCM analysis of the transfer efficiency of SKOV3 cell

* $P < 0.001$

毒、腺病毒、腺相关病毒、痘苗病毒等。病毒方法转染效率高,但其安全性受到怀疑。目前阳离子脂质体介导的 DNA 转染在基因治疗领域受到重视。阳离子脂质体表面带有正电荷,能与带有负电荷的 DNA 磷酸盐骨架相互作用,促进 DNA 浓缩,并将其包裹,并同样能被表面带有负电荷的细胞膜所吸附。由于阳离子脂质体介导的基因转染效率较高,因而倍受关注。与病毒载体相比,脂质体介导的基因表达为暂时性,不容易整合到细胞染色体中,也不会增殖。而且脂类都具有生物可降解性,没有免疫原性,生物安全性高。但是,应用于体内转染时,由于与血清蛋白、细胞外基质等相互作用,影响脂质体-DNA 复合体稳定性,使转染效率降低^[1,4]。同时,DNA 虽然被细胞内吞而进入胞浆,仍很容易被胞浆内的酶类所降解,而难于进入核内发挥作用。因此研制高效稳定的脂质体是研究的热点。

DOTAP 即 1, 2-bis(oleoyloxy)-3-(trimethylammonio)propane,是一种带正电荷的一阶阳离子型生物可降解脂,而胆固醇 Chol(cholesterol)能显著提高脂质体的稳定性,以两者为原料制成的阳离子脂质体与其它脂质体相比明显高效稳定。而且 DOTAP/Chol 脂质体能与较大浓度范围的 DNA 混合,在 200 μ l 5 mmol/L 的脂质体中最多加入 82.5 μ g DNA 也没有发生沉淀,显示其高度稳定性。同时改变 DNA:脂质体复合体表面电荷可减低与细胞表面蛋白多糖发生离子反应,从而提高转染效率^[2,3]。

鱼精蛋白(protamine)因富含精氨酸残基而具有强碱性,带正电荷,是用于解救带有大量负电荷的肝素所致出血的特效药。鱼精蛋白在精子与卵子结合过程中可将 DNA 形成精密结构,从而便于 DNA 从胞浆向胞核转移,避免被溶酶体酶降解。据此,有学者将鱼精蛋白与阳离子脂质体和 DNA 一起按一定比例制成 LPD 进行体内转染,提高了基因转染效率^[5]。

本研究首次将高效的 DOTAP/Chol 脂质体与鱼精蛋白结合,同时以不同比例与 DNA 结合,探讨了鱼精蛋白-脂质体-DNA 复合体表面的 +/ -电荷比例对转染体外培养的 SKOV3 细胞效率的影响。研究发现在 LPD 表面 +/ -电荷比例为 4 时效率最高,与比例为 1, 2 者相比有显著提高,但与比例为 6 者相比,效率虽有提高,统计学处理差异无显著性意义。这可能与 SKOV3 细胞表面带有较多的负电荷有关。本法转染效率达 95% 以上,比裸露的 DNA 直接转染效率有极显著的提高,而且其转染不受培养基中 10% 的小牛血清影响。本研究 MTT 法结果显示不论是转染诱捕物还是 Scrambled ODN, SKOV3 细胞的体外增殖能力均无明显改变。本研究表明 LPD 法是一种安全的基因转染方法。鉴于其较高的体外基因转染效率,且易于操作。细胞毒性小,因此也有望用于体内转染。同时通过摸索适当的 LPD 表面 +/ -电荷比例,本法应用于其它细胞系可能也会获得较高的转染效率。

[参考文献]

- [1] 叶胜龙,朱世能,陆世伦. 肿瘤基础理论[M]. 第2版,上海:上海医科大学出版社,2000,388-389.
- [2] Templeton NS, Lasic DD, Frederik PM, et al. Improved DNA: Liposome complexes for increased systemic delivery and gene expression[J]. Nat Biotech, 1997, 15: 647-652.
- [3] Liu Y, Liggitt D, Zhong W, et al. Cationic liposome-mediated intravenous gene delivery[J]. J Biol Chem, 1995, 270: 24864-24870.
- [4] Xing X, Liu V, Xia W, et al. Safety studies of the intraperitoneal injection of E1A liposome complex in mice[J]. Gene Ther, 1997, 4: 238-243.
- [5] Ni YH, Hsu HY, Chen PJ, et al. Protamine enhances the efficiency of liposome-mediated gene transfer in a cultured human hepatoma cell line[J]. J Formos Med Assoc, 1999, 98(8): 562-566.

[收稿日期] 2003-06-06

[修回日期] 2003-09-25

《中国临床医药实用杂志》征稿

《中国临床医药实用杂志》系临床权威性、实用性、指导性的大型综合医学学术性月刊。刊登周期短,国内外发行。具有国际国内标准刊号;内设论著、临床医学、药物疗效、中西医结合、检验、误诊误治、病例(病理)讨论、预防保健、针灸与推拿、护理、美容、性学、社区医学、医药管理等所有与医学相关的内容,稿件以 2000 字为宜,需寄打印件及 A 盘。

征稿对象: 社会各界医疗、卫生、临床、科研教学工作长期征稿。

稿件处理: 免收审稿费,收稿后一周复函,优秀稿件优先、优惠刊登。欢迎为本刊组稿并聘各地编委、栏目主编、驻各地工作站主作,请寄个人简历。

地址: 广东省深圳市布吉邮局 52 号信箱《中国临床医药实用杂志》编辑部收

邮编: 518112; 电话: 0755-25459899; 84185465; 传真: 0755-84185476

网址: www.hkeson.com; E-mail: gqfaaa@163.com; gjqaaa@21cn.com