

阳离子脂质体介导人小梁细胞基因转染实验研究

毛晓春, 黄刚, 张少维, 王根国

作者单位:(441021)中国湖北省襄樊市,华中科技大学同济医学院附属襄樊医院(襄樊市中心医院)眼科

作者简介:毛晓春,男,在读博士研究生,副主任医师,从事眼科临床工作10余年,对眼科常见病及疑难杂病的诊断及治疗有丰富的临床经验,主要对眼前段疾病有较深入的基础和临床研究,特别擅长各种白内障手术治疗、眼部整形手术等,研究方向:白内障发病机制与临床手术治疗的基础及临床研究、角膜损伤与治疗的研究及义眼台植入的相关研究。

通讯作者:王根国,男,副主任医师,擅长白内障超声乳化吸出和人工晶状体植入手术,研究方向:白内障诊断及治疗方面的基础和临床研究。wsfyywb@163.com

收稿日期:2009-03-04 修回日期:2009-05-22

Liposome mediated gene transfer into human trabecular meshwork cells

Xiao-Chun Mao, Gang Huang, Shao-Wei Zhang, Gen-Guo Wang

Department of Ophthalmology, Xiangfan Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Xiangfan 441021, Hubei Province, China

Correspondence to: Gen-Guo Wang, Department of Ophthalmology, Xiangfan Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Xiangfan 441021, Hubei Province, China. wsfyywb@163.com

Received:2009-03-04 Accepted:2009-05-22

Abstract

• AIM: To evaluate the efficiency of liposome mediated gene transfer to trabecular endothelial cells and cells damage caused by liposome.

• METHODS: The ratio of cationic liposome to green fluorescein protein (GFP) expression plasmid for high efficacy of transfection was tested *in vitro*. The GFP expression was observed by using fluorescence microscopy.

• RESULTS: The GFP expression in trabecular endothelial cells was observed, However, high concentration liposome caused the death and falling off of trabecular endothelial cells.

• CONCLUSION: Liposome seems to be able to deliver genes to trabecular endothelial cells with efficacy, but high concentration liposome used here is to some extent harmful to corneal endothelial cell.

• KEYWORDS: trabecular endothelial cells; liposomes; transfection

Mao XC, Huang G, Zhang SW, et al. Liposome mediated gene transfer into human trabecular meshwork cells. *Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi)* 2009;9(6):1056-1057

摘要

目的:观察脂质体是否能介导目的基因转移至人小梁细胞

及脂质体潜在的毒副作用。

方法:通过体外细胞转染实验优化阳离子脂质体与质粒DNA的比例,荧光显微镜观察目的基因的表达。

结果:小梁细胞内可见脂质体介导的绿色荧光蛋白表达,高浓度脂质体导致细胞死亡和脱落。

结论:阳离子脂质体可有效介导目的基因转移至小梁细胞内。但高浓度对正常的细胞有一定的毒副作用。

关键词:小梁细胞;脂质体;转染

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2009.06.012

毛晓春,黄刚,张少维,等.阳离子脂质体介导人小梁细胞基因转染实验研究.国际眼科杂志2009;9(6):1056-1057

0 引言

原发性开角型青光眼(primary open angle glaucoma, POAG)是最常见的致盲眼病之一,其主要的病理变化就是小梁细胞数目减少以及细胞外基质增多。应用基因转染技术,增加小梁细胞数量有望为治疗POAG提供一种新的治疗手段,但实现这一愿望需要解决基因转移及基因表达调控两个关键问题^[1]。我们尝试利用阳离子脂质体包裹质粒DNA介导报告基因转移至小梁细胞,通过观察外源基因在小梁细胞内的表达以及脂质体对小梁细胞的毒性,探索脂质体应用于小梁细胞基因转染的安全浓度范围,从而为阳离子脂质体载体应用于小梁细胞的基因治疗奠定实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料 标本与试剂标本为同济医院眼库排除眼部疾患的捐献者的眼球,于死后24h内取材。主要试剂:Lipofectamine™2000(Invitrogen公司);pEGFP-N1(美国Clontech公司);DMEM/F-12培养基及胎牛血清(Gibco公司);质粒快速提取试剂盒(博大泰克公司)。

1.2 方法 取材与细胞培养:眼球在无菌条件下,沿角膜缘后5mm处剪开眼球,将眼前段倒置于手术台上,暴露出房角结构,用刀片小心分离表面的小梁组织,用显微镊子夹出,分成小块后接种于培养瓶里,置培养箱内培养。第1wk内不用换液,让组织块稳定并适应环境,1wk以后换液,1次/wk,细胞开始长出后2次/wk。细胞基本覆盖瓶底时用胰酶消化法传代,如此直到第3代(图1)。pEGFP-N1质粒制备:pEGFP-N1转化大肠杆菌DH5 α ,卡那霉素(50 μ g/mL)筛选阳性菌落,LB培养基扩大培养,用质粒提取试剂盒提取pEGFP-N1基因。所得质粒A260/A280为1.812,含量为0.5~1.5 μ g/ μ L。Lipofectamine™2000/pEGFP-N1转染培养的人小梁细胞:取第3~4代细胞,转染前分别将 1×10^5 个小梁细胞分别接种于3个直径为35mm的细胞培养皿中,转染当天细胞生长至70%~80%融合。转染前用无血清Opti-MEM洗涤细胞两次,参照脂质体转染细胞的操作说明书进行细胞转染,取2 μ g质粒DNA溶于250 μ L的Opti-MEM培养基中,分别加入含有4,6,8 μ L的Opti-MEM,将质粒DNA与脂质体轻轻混匀后



图1 体外培养的人小梁细胞(×100)

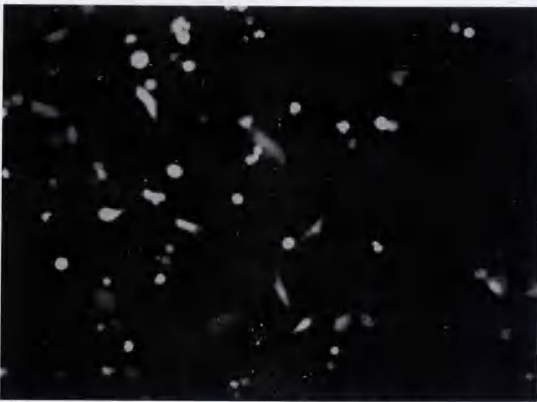


图2 脂质体转染小梁细胞24h后镜下观察的结果

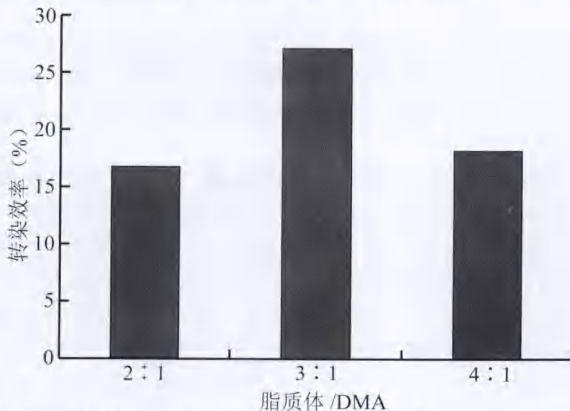


图3 不同比例脂质体/DNA复合物的转染效率的差别

室温下静置20min。使脂质体充分包裹,然后均匀加入细胞中,37℃孵育5h。吸去培养基后加入等体积含100mL/L血清不含抗生素的培养基培养。培养24h后荧光显微镜观察GFP表达,然后用2.5g/L胰蛋白酶消化成单细胞,重悬于PBS中,流式细胞仪检测GFP阳性细胞的百分率。

2 结果

Lipofectamine™2000介导pEGFP-N1质粒DNA转染体外培养的小梁细胞24h后,在荧光显微镜下用蓝色光为激发光,可观察到20%~30%的小梁细胞中绿色荧光表达(图2),流式细胞仪检测同样可见经pEGFP-N1转染细胞中约有20%~30%表达GFP。在细胞融合度相同,每孔2μg质粒DNA量为2μg时,按照DNA:脂质体为1:2,1:3,1:4的比率进行细胞转染,各组转染效率差别(图3),在DNA:脂质体为1:3时细胞的转染效率最高。显微镜下见4μL脂质体及6μL脂质体组细胞存活状态较好,而8μL脂质体组细胞形态发生改变,表现为细胞内颗粒增加,细胞膜变的不清楚,显示细胞状态不佳,甚至

可见较多的细胞脱落或死亡。

3 讨论

脂质体介导基因转染的机制及特点:脂质体介导基因进入细胞的原理,是通过包裹DNA,共缩合成脂囊,与细胞表面的唾液酸结合,经细胞的胞饮或受体介导的胞饮作用进入细胞内。在脂质体的磷脂成分中加入带有正电荷的磷脂分子,使其外部带正电荷,由于细胞膜及DNA分子都带负电荷,故用阳离子脂质体作为基因的载体,既有利于包裹DNA分子,也使脂质体易与细胞膜融合^[2-4]。阳离子脂质体用于小梁细胞基因转染的安全性:一种基因转染载体能否应用与临床,首先取决于其安全性。许多实验已经证明阳离子脂质体对培养的动物细胞很少或没有影响,反复应用也不会引起免疫反应^[5],然而,有些研究报道了高浓度的脂质体可以对细胞的增殖能力及细胞活性产生不利影响,这些影响与脂质体的化学构成有关,过高浓度的脂质体能够对细胞内的各种酶的代谢产生不利影响,从而导致细胞死亡^[6,7]。同时不同组织来源的细胞也存在耐受性的差异,不同种类的阳离子脂质体的细胞毒性也存在较大差异。脂质体与DNA的比例对转染效率的影响:由于转染时脂质体与DNA是形成小单层脂质体包裹DNA的复合物,给予适当比例的脂质体/DNA可以使得脂质体/DNA复合物稳定,增加复合物被细胞内吞的效率。而脂质体与DNA的比例不当,使得无效的脂质体增加,同时游离的DNA分子会影响脂质体/DNA复合物的稳定性。而游离的脂质体则可增加细胞毒性,对细胞的代谢产生影响,使细胞表达外源基因受到影响,最终降低细胞的转染效率。

本实验以培养的人小梁细胞为外源基因转移对象,采用脂质体为介导体,pEGFP-N1含有编码绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的cDNA,用作报告基因以评价质粒DNA的转染效率与表达水平。pEGFP-N1的启动子来源于人巨细胞病毒即早抗原基因调控顺序,能启动下游的目的基因在各种真核细胞内表达。本实验结果证实,阳离子脂质体载体Lipofectamine™2000能有效的将外源基因转入体外培养小梁细胞,转染效率可达到20%~30%,但脂质体/DNA复合物比例必须控制在合适的范围之内,比例过高或过低都会影响转染效率。

总之,阳离子脂质体能有效介导质粒携带的外源基因在小梁细胞的表达,当脂质体/DNA复合物比例时可以达到相当高的效率而不引起明显的细胞毒性。阳离子脂质体作为一种应用方便、无细胞毒性、无免疫原性的基因治疗载体,有望在小梁细胞的基因治疗中发挥重要作用。

参考文献

- 1 Friedman T. Overcoming the obstacles to gene therapy. *Sci Am* 1997; 276(6):96-101
- 2 Hu Y, Zhang H, Xiong X. Inhibitory effect of tissue transglutaminase (tTG) antisense oligodeoxynucleotides on tTG expression in cultured bovine trabecular meshwork cells. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2005;25(6):729-731
- 3 Felgner PL. Nonviral strategies for gene therapy. *Sci Am* 1997;276(6):102-106
- 4 Hudde T, Apitz J, Bordes-Alonso R, et al. Gene transfer to trabecular meshwork endothelium via direct injection into the Schlemm canal and *in vivo* toxicity study. *Curr Eye Res* 2005;30(12):1051-1059
- 5 Ropert C. Liposomes as a gene delivery system. *Braz J Med Biol Res* 1999;32(2):163-169
- 6 毛晓春,李贵刚,张虹. 脂质体介导外源基因体外转染兔角膜内皮细胞条件的优化. *国际眼科杂志* 2008;8(7):1353-1355
- 7 Abul-Hassan K, Walmsley R, Boulton M. Optimization of non-viral gene transfer to human primary retinal pigment epithelial cells. *Curr Eye Res* 2000;20(5):361-366