

从而使休克进一步发展。

整体动物实验虽能较好地模拟临床治疗过程,但也仅能从全身作用了解各 M 受体亚型拮抗剂在抗休克治疗作用中的权重,全身给予 M 受体拮抗剂治疗休克可能存在多个靶点。在随后的研究中可通过局部血管内给药精确地确定微循环 M 受体亚型的分布和功能。

总之,本实验进一步探讨了大剂量非选择性 M 受体拮抗剂(以阿托品为代表)治疗休克时起主要作用的 M 受体亚型,并发现了各 M 受体拮抗剂各自的全身综合效应,可为临床针对性用药提供参考。若在临床上能够选用对 M₁ 受体选择性更强的 M 受体拮抗剂,则其正向治疗作用不会受到 M₂、M₃ 受体的负向作用干扰,可更有效地治疗休克,并减少由于多种作用位点带来的不良反应。本研究为揭示 M 受体拮抗剂抗休克的机制提供了一定的整体实验依据,对于开发选择性更高的 M 受体亚型拮抗剂有一定启示意义。

参考文献

- 1 Eglen RM. Overview of muscarinic receptor subtypes[J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2012, 208(1):3-28
- 2 史一鸣,钮因尧,陆阳. M 受体及相关选择性药物研究进展[J]. *国际药学研究杂志*, 2009, 36(5):355-361
- 3 张巍,岳峰,郭炯. 小鼠脑低血流灌注缓解随后失血性休克所致

- 变化[J]. *基础医学与临床*, 2000, 20(4):52-54
- 4 郑建普,曹永孝,徐仓宝,等. 阿托品对大鼠肠系膜动脉的舒张作用及机制[J]. *药理学学报*, 2005, 40(5):402-405
- 5 Zhao T, Li DJ, Liu C, *et al*. Beneficial effects of anisodamine in shock involved cholinergic anti-inflammatory pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2011, 2(23):1-3
- 6 Gerickle A, Sniatecki JJ, Mayer VG, *et al*. Role of M₁, M₃, and M₅ muscarinic acetylcholine receptors in cholinergic dilation of small arteries studied with gene-targeted mice[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011, 300(5):1602-1608
- 7 Rönn T, Lendemann S, de Groot H, *et al*. A new model of severe hemorrhagic shock in rats[J]. *Comp Med*, 2011, 61(5):419-426
- 8 宋洪礼. 大剂量阿托品治疗感染性休克 147 例[J]. *吉林医学*, 1987, 8(6):58
- 9 Schmid WS, Modlin IM, Tang LH, *et al*. Telenzepine-sensitive muscarinic receptors on rat pancreatic acinar cells[J]. *Am J Physiol*, 1998, 274(4):G734-G741
- 10 Lin BQ, Ji H, Li P, *et al*. Selective antagonism activity of alkaloids from bulbs fritillariae at muscarinic receptors: functional studies[J]. *Eur J Pharmacol*, 2006, 551(1-3):125-130
- 11 马满玲,刘艳,王玲. 胆碱对大鼠和家兔心脏 M₃ 受体作用实验研究[J]. *哈尔滨医科大学学报*, 2008, 37(4):302-304
- 12 李磊,王振杰. 创伤失血性休克的治疗进展[J]. *解剖与临床*, 2010, 15(6):448-451
- 13 杨宝峰. *药理学*[M]. 7 版. 北京:人民卫生出版社, 2011:7

(收稿日期:2013-10-24)

(修回日期:2013-11-11)

阳离子脂质体介导的 A20 基因转染人外周血单核细胞的可行性

徐 丹 曲 鹏 高 静 崔 影

摘 要 **目的** 探讨阳离子脂质体介导的 A20 基因转染人外周血单核细胞的可行性及最佳转染条件。**方法** 采用脂质体 Lipofectamine TM 2000 包裹 pCAGGS-GFP/A20 质粒转染人外周血单核细胞,通过荧光显微镜检测 GFP 报告基因,RT-PCR 检测 A20 基因表达。**结果** 应用 Lipofectamine TM 2000 介导的 A20 基因转染人外周血单核细胞,在 2×10^6 /L 细胞接种浓度,脂质体与质粒的量之比为 4 μ l:3 μ g 时,转染效果最佳,RT-PCR 证实成功获得 A20 目的基因的表达式。**结论** 脂质体转染法可介导 A20 基因在人外周血单核细胞获得表达,该研究为 A20 基因转染的相关实验研究提供参考依据。

关键词 脂质体 细胞转染 人外周血单核细胞

[中图分类号] R393 [文献标识码] A

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30670836)

作者单位:116100 大连市金州区第一人民医院心内科

通讯作者:曲鹏,博士生导师,电子信箱:qupeng777@aliyun.com

Feasibility of Human Peripheral Blood Mononuclear Cell Transfected by Cationic Liposome Mediated A20 Gene. Xu Dan, Qu Peng, Gao Jing, Cui Ying. Department of Cardiology, The First People's Hospital of Jinzhou District, Liaoning 116100, China

Abstract Objective The feasibility and the optimal transfection conditions of human peripheral blood mononuclear of cationic liposome mediated A20 gene transfection were investigated in this paper. **Methods** Human peripheral blood mononuclear cells were transfected by pCAGGS - GFP/A20 plasmid encapsulated by liposome Lipofectamine TM 2000. GFP reporter gene was detected by fluorescence microscopy expression of A20 gene was detected by RT - PCR. **Results** Transfection effect was best when cells inoculation concentration was $2 \times 10^6/L$ and liposome and plasmid ratio was $4\mu l:3\mu g$ by applying Lipofectamine TM 2000 mediated A20 gene to transfect blood mononuclear cells of human peripheral. RT - PCR confirmation successfully achieved the expression of A20 objective gene. **Conclusion** The method of liposome transfection mediated A20 gene in human peripheral blood mononuclear cells was expressed. Such study provides a reference for related experimental study of A20 gene transfection.

Key words Liposome; Cell transfection; Human peripheral blood mononuclear cell

阳离子脂质体转染技术是当前研究特定基因表达调控及基因治疗的重要技术之一,其优越性主要表现在简单、安全、毒性低、不限制所携带 DNA 的大小、易大量制备等多个方面,已经被广泛应用于各种原代细胞及细胞系的转染^[1]。人外周血单核细胞是参与免疫炎症反应重要的功能细胞,是在医学基础研究及临床检验中常用的一类细胞,目前国内外关于人外周血单核细胞的转染方法及转染效率的报道相对较少。本研究组采用绿色荧光蛋白 (greenfluorescent protein, GFP) 作为报告基因,通过脂质体 Lipofectamine TM 2000 包裹 A20 基因,体外转染人外周血单核细胞,探讨脂质体介导 A20 基因转染人外周血单核细胞的可行性及最佳转染条件,作为我们研究组的预实验,为外源性 A20 基因后续体外及动物干预试验研究奠定基础。

材料与方法

1. 材料:高效真核表达载体 pCAGGS - GFP/A20 由比利时根特大学分子生物学系 Dr K. Heyninck 和 Prof. R. Beyaert 提供;Lipofectamine TM 2000 转染试剂购自 Invitrogen 公司;pCAGGS 质粒、pCAGGS - GFP 质粒、RT - PCR 试剂盒以及引物的设计、合成由宝生物工程 (大连) 有限公司构建;胎牛血清购自中美合资兰州民海生物工程有限公司;DMEM 培养基购自 GIBCO 公司;Ficoll 细胞分离液购自上海普非生物有限公司。

2. 技术路线:(1) Ficoll 淋巴细胞分离液分离正常人外周血单个核细胞。(2) pCAGGS - GFP/A20 重组质粒的鉴定:将获得的 pCAGGS - GFP/A20 质粒菌保涂 Amp 抗性的平板后,过夜培养。挑单菌落于 3ml Amp 抗性的 LB 培养基中 37℃ 摇床中过夜培养,集菌后,使用 TaKaRa MiniBEST Plasmid Purification Kit 进行小量质粒提取,并使用 EcoR V/Sma I 进行双酶切鉴定,酶切产物 1% 琼脂糖凝胶电泳。(3) 无内毒素质粒的大量提取:将鉴定好的 pCAGGS - GFP/A20 质粒菌保接种于 100ml Amp 抗性的 LB 培养基中过夜培养后,使用 QIAGEN 公司的 Endo - Free Plasmid Maxi kit 进行无内毒素质粒的提

取,溶于试剂盒中的 TE 缓冲液,并使用 EcoR V/Sma I 进行双酶切鉴定,酶切产物 1% 琼脂糖凝胶电泳。将质粒 DNA 提取物按适当比例稀释,置核酸浓度测定仪内,测定 DNA 浓度,并用真空浓缩机将质粒浓度调整至 $1\mu g/\mu l$ 。(4) pCAGGS - GFP/A20 质粒转染条件的筛选:根据表 1 及表 2 对 Lipofectamine TM 2000 转染试剂和 pCAGGS - GFP/A20 质粒稀释,分别取 $20\mu l$ 于稀释的转染试剂与 $25\mu l$ 稀释质粒的混合,在室温保温 15min,然后将混合后的复合物加到 24 孔板的细胞中,轻轻混匀。在孵箱中孵育 5h,5h 后,弃去含有复合物的培养基,加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基。转染 48h 后在倒置荧光显微镜下观察 GFP 的表达情况,计算表达 GFP 单核细胞数与所有细胞数的比值,多张片子多个角度取平均值,选取单核细胞 GFP 表达强度最强,表达数量最多的一组确定最佳转染条件,详见图 1。(5) 目的基因的检测:将实验设 A1 组 (空白对照组);A2 组 (转染试剂组,培养液中加入 Lipofectamine TM 2000 $4\mu l$,作用 48h);A3 组 (pCAGGS 组,转染空质粒 $3\mu g$ 作用 48h);A4 组 (pCAGGS - GFP 组,转染不含目的基因的质粒 $3\mu g$ 作用 48h);A5 组 (pCAGGS - GFP/A20 组,转染含有目的基因 A20 的质粒 $3\mu g$ 作用 48h),加入脂质体转染试剂及质粒含量按筛选出的最佳转染条件进行,通过荧光显微镜检测各组 GFP 报告基因,RT - PCR 检测目的基因 A20 的表达。(6) 反转录聚合酶链式反应 (RT - PCR):PCR 引物及扩增片段:外源性 A20 引物:上游引物:5' - TTT GAG CAA TAT GCG GAA AGC - 3';下游引物:5' - AGT TGT CCC ATT CGT CAT TCC - 3',扩增片段长度 319bp; β - actin 引物,上游

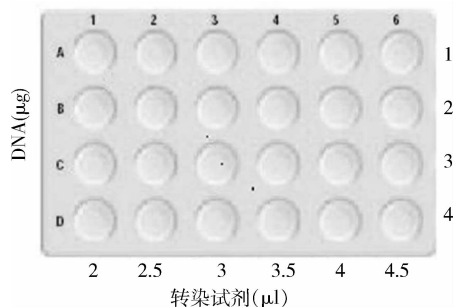


图 1 pCAGGS - GFP/A20 质粒与转染试剂筛选比例

表 1 Lipofectamine TM 2000 转染试剂的稀释方法(μl)

管号	无血清培养基	Lipofectamine TM 2000
1	115	10
2	112.5	12.5
3	110	15
4	107.5	17.5
5	105	20
6	102.5	22.5

表 2 质粒的稀释方法

管号	质粒(μg)	无血清培养基(μl)
a	7	140
b	14	140
c	21	140
d	28	140

引物:5'-AAC GAG CGG TTC CGA TGC CCT GAG-3',下游引物:5'-TGT CGC CTT CAC CGT TCC AGT T-3',扩增片段长度为 249bp;外源性 A20 反应条件:94℃ 5min,94℃ 50s,60℃ 58s,72℃ 60s,共进行 30 个循环,最后 72℃ 8min。

结 果

1. pCAGGS - GFP/A20 质粒转染条件的优化:在倒置荧光显微镜下,以 488nm 激发光波长激发荧光,察绿色荧光蛋白(green fluorescence protein,GFP)的

表达,同一视野同时在荧光显微镜下及普通光镜下观察及摄片,计算表达 GFP 细胞数与所有细胞数的比值,多张片子的多个视野取平均值,可见 5C 孔表达最强,详见图 2,即对于 24 孔板的亚融合细胞来说,最佳脂质体与质粒的量之比为 4μl:3μg,确定了优化条件后就可以根据培养板表面积线性放大,进行本研究的干预实验。

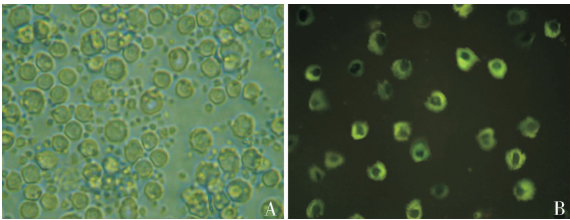


图 2 pCAGGS - GFP/A20 质粒转染条件筛选结果

A. 普通显微镜下(×400);B. 荧光显微镜(×400)

2. 单核细胞转染后 GFP 表达:荧光显微镜可见(图 3):A1 组(空白对照组),A2 组(转染试剂组)及 A3 组(pCAGGS 组)单核细胞胞质内均未见 GFP 表达,而 A4 组(pCAGGS - GFP 组),A5 组(pCAGGS - GFP/A20 组),两组单核细胞胞质内可见 GFP 表达,提示真核表达载体 pCAGGS 在单核细胞内转染成功。



图 3 GFP 表达的特异性检测结果(×400)

A1. 空白对照组;A2. 转染试剂组;A3. pCAGGS 组;A4. pCAGGS - GFP 组;A5. pCAGGS - GFP/A20 组

3. RT - PCR 检测目的基因 A20mRNA 表达:外源性 A20mRNA 与 β - actin RT - PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳可见(图 4),A1 组(空白对照组)、A2 组(转染试剂组)、A3 组(pCAGGS 组)、A4 组(pCAGGS - GFP 组)各组均未检测到外源性 A20mRNA 的表达,而 A5(pCAGGS - GFP/A20 组)组可检测到目的基因 A20mRNA 的表达,提示 Lipofectamine TM 2000 介导的 pCAGGS - GFP/A20 质粒转染可获得目的基因 A20 的表达。

讨 论

新鲜分离的健康人外周血单核细胞是处于 G₀ 期、非分裂的原代细胞,这种细胞特性至少维持到体

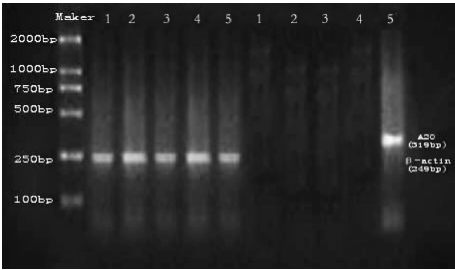


图 4 外源性 A20mRNA 与 β - actinRT - PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳图

1. A1 组(空白对照组);2. A2 组(转染试剂组);3. A3 组(pCAGGS 组);4. A4 组(pCAGGS - GFP 组);5. A5 组(pCAGGS - GFP/A20 组)

外分离后 3 天以上,因此很难将外源基因导入单核细胞内,并获得高效表达^[2,3]。作为真核细胞转染方法,脂质体转染技术的优越性主要表现在毒性低、对于所携带 DNA 的大小无特殊要求、易大量制备等方面^[4]。

更为重要的是,脂质载体的免疫原性通常较低,允许在体内转染实验时使用与体外实验相同的载体。阳离子脂质体通过静电作用与携带外源性目的基因的治疗结合形成脂质体复合物,然后被表面带负电荷的细胞膜吸附,再通过融合或细胞内吞作用进入溶酶体,内吞后脂复合体在细胞内形成的包涵体,在二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)作用下,细胞膜上的阴离子脂质因膜的不稳定而失去原有的平衡扩散进入复合物,与阳离子脂质中的阳离子形成中性离子对,使原来与脂质体结合的 DNA 游离出来,进入细胞质,进而通过核孔进入细胞核,最终进行转录并表达^[5-7]。其转染效率与脂质体与 DNA 的比例、细胞状态、转染时间以及靶细胞的选择性作用有关。一般认为,环状 DNA 的转染效率高于线状 DNA,越小的基因其转染效率越高^[8-10]。

我们研究中应用的目的基因 A20 为比利时根特大学分子生物学教研室构建的环状 DNA,根据本课题组后续的动物实验需要,我们应用了阳离子脂质体转染方法对人外周血单核细胞进行外源性基因 A20 的转染实验,在本试验条件下, Lipofectamine TM 2000 转染试剂与 pCAGGS - GFP/A20 质粒比例为 4 μ l: 3 μ g 转染效果最佳,研究中我们发现,转染试剂本身的毒性会对体外培养的人外周血单核细胞的生长状态产生一定的影响,在转染过程中需要更换新的培养基以降低转染试剂对单核细胞的毒性,换液时间过早,脂质体/DNA 复合物因不能有效被内吞至胞体内而导致转染率相对较低,而换液时间过晚则会因为转染试剂的不良反应影响细胞状态,甚至会导致单核细胞活性降低,甚至是大量死亡,转染效率也会降低在本试验条件下,当转染后 5h 更换培养液可获得相对较高的转染效率。本实验作为研究组的预

实验,通过阳离子脂质体转染方法使得外源性 A20 基因在单核细胞获得了瞬时表达,未进行抗菌素的筛选。

本研究应用阳离子脂质体 Lipofectamine TM 2000 介导外源性 A20 基因转染人外周血单核细胞,通过 GFP 报告基因以及 RT - PCR 检测证实 pCAGGS - GFP/A20 组转染后经培养至 48h,获得了 A20 基因的表达,从而证实了表达载体 pCAGGS - GFP/A20 的有效性,为外源性 A20 基因干预单核细胞炎症反应的研究以及动物干预实验打下良好基础。

参考文献

- 1 Zhang S, Zhao B, Jiang H, *et al.* Cationic lipids and polymers mediated vectors for delivery of siRNA [J]. J Control Release, 2007, 123 (1): 1 - 10
- 2 Muhlebach MD, Wolfrum N, Schule S, *et al.* Stable transduction of primary human monocytes by simian lentiviral vector PBj [J]. Mol Ther, 2005, 12 (6): 1206 - 1216
- 3 Wolfrum N, Muhlebach MD, Schule S, *et al.* Impact of viral accessory proteins of SIVsmmPBj on early steps of infection of quiescent cells [J]. Virology, 2007, 364 (2): 330 - 341
- 4 钱亚芳, 谷满仓. 阳离子脂质体在基因转染载体中的研究进展 [J]. 中国药师, 2008, 11 (9): 1041 - 1043
- 5 Tresset G. The multiple faces of self - assembled lipidic systems [J]. PMC Biophysics. 2009, 2 (1): 3
- 6 Wasungu L, Hoekstra D. Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes [J]. Control Release, 2006, 116 (2): 255 - 264
- 7 黄柯鑫, 赵斌. 阳离子脂质体的转染效率影响因素的研究进展 [J]. 医学理论与实践, 2012, 25 (5): 1704 - 1710
- 8 杨硕晔, 陈西敬. 阳离子脂质体用做基因传递载体的研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2010, 9 (20): 1866 - 1870
- 9 Madeira C, Ioura LM, Prieto M, *et al.* Liposome complexation efficiency monitored by FRET: effect of charge ratio, helper lipid and plasmid size [J]. Eur Biophys J, 2007, 36 (6): 609 - 620
- 10 Yang Y, Zhang Z, Chen L, *et al.* Effect of multifold charge groups and imidazole - 44-carboxaldehyde on physicochemical characteristics and transfection of cationic polyphosphazenes/DNA complexes [J]. Int J Pharm, 2010, 390 (2): 191 - 197

(收稿日期: 2013 - 10 - 15)

(修回日期: 2013 - 10 - 30)