

多聚乙烯亚胺介导小鼠 IL-12 基因转染人骨肉瘤细胞的细胞

叶树楠, 杨述华, 吴强, 杨操, 李进, 许伟华

Polyethylenimine AS A Nonviral Vector for Murine Interleukin-12 Gene Transfer to the Mouse Osteosarcoma Cells

YE Shu-nan, YANG Shu-hua, WU Qiang, YANG Cao, LI Jing, XU Wei-hua

Department of Orthopaedics, Xiehe Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China

Abstract: **Objective** To investigate the best condition of polyethylenimine (PEI) for murine interleukin-12 gene transfer to MG63 cells. **Methods** The cytotoxicity of PEI was evaluated by MTT. In different conditions, using PEI as the vector, MG63 cells were transfected with luciferase gene and murine interleukin-12 (mIL-12) gene. Expression efficiency of the transduced gene was monitored. **Results** The cytotoxicity of PEI was low. When N/P ratio equalled to 8, the transfection efficiency was highest, and mIL-12 gene could also be successfully transferred to MG63 cells with PEI as the vector. **Conclusion** PEI is low cytotoxicity, and high efficiency vector. It can be widely used in the area of gene therapy.

Key words: Polyethylenimine; Gene transfer; Osteosarcoma; Interleukin-12

摘要: **目的** 确定多聚乙烯亚胺 (polyethylenimine, PEI) 最佳的转染条件。以 PEI 为载体, 将 mIL-12 基因导入 MG63 细胞。 **方法** 以 MTT 法检测 PEI 的细胞毒性。以 PEI 为载体, 在不同的条件下, 将荧光素酶基因和 mIL-12 基因导入 MG63 细胞, 分别检测其转染效率。 **结果** PEI 的细胞毒性较低。当 N/P 比值为 8 时, PEI 的转染效率最高。PEI 可以成功的将 mIL-12 基因导入 MG63 细胞。 **结论** PEI 是一种低毒性、高效率的 DNA 载体, 可以广泛应用于体内外基因治疗的试验。

关键词: 多聚乙烯亚胺; 基因转染; 骨肉瘤; 白细胞介素-12

中图分类号: R738.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2005)02-0096-03

0 引言

本研究通过检测聚乙烯亚胺 (polyethylenimine, PEI) 的细胞毒性, 并且使用 PEI 为载体, 将小鼠 IL-12 基因及荧光素酶基因在体外转入人骨肉瘤细胞, 来评价 PEI 替代其他介导剂的可能性, 为进一步研究骨肉瘤的基因治疗奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试剂 PEI 分子量 25 KD 购自 Sigma 公司 (Aldrich, Milwaukee, WI)。将 PEI 溶于 PBS 中, 制成 4.3 mg/ml 的储存液 (含有 0.1 M 的氮原子), 用 1 mol/L 的 HCL 调 pH 值至 7.0, 经 0.2 μm 的微孔滤膜除菌, 4℃ 保存备用^[1]。DMEM 培养基、新生牛血清、TRIZOL 试剂盒、两步法逆转录-聚合酶链反应试剂盒、Lipofect AMINE 转染试剂盒为 GIBCO BRL 公司产品。荧光素酶检测全套试剂购于美国 Promega 公司。DNA marker、重组 TaqDNA 聚

合酶、T4DNA 连接酶均为 Takara 宝生物工程有限公司产品。mIL-12 p70 的 ELISA 蛋白定量检测试剂盒购于 Endogen 公司。大鼠抗小鼠 mIL-12 p70 单克隆抗体为 Biosource 公司产品。广谱即用型 SP 免疫组化试剂盒及 DAB 显色试剂盒均购于北京中山生物技术有限公司。

1.2 质粒 质粒 pORF-mIL-12elasti (4.8 Kb) 购于 InvivoGen 公司, 含有荧光素酶报告基因的质粒 pM-AMneoLuc 来源于美国 Clontech 公司。按照常规碱裂解法提取 DNA, 制成 1g/L 的水溶液, -20℃ 保存备用。

1.3 细胞系 人骨肉瘤细胞系 MG63 (来源于 ATCC) 购于武汉大学典型培养物保藏中心。L929 成纤维细胞购于中国人民解放军第四军医大学实验动物中心。

1.4 实验方法

1.4.1 PEI 对 L929 成纤维细胞增殖毒性的影响 将 L929 成纤维细胞按浓度 1×10^4 / ml 接种到 96 孔板, 每孔接种细胞悬液 200 μl。实验时分别向已接种 L929 细胞的 96 孔板内加入不同浓度的 PEI, 置

收稿日期: 2004-03-01; 修回日期: 2004-05-26

作者单位: 430022 武汉, 华中科技大学同济医学院附属协和医院骨科

37 5%CO₂条件下培养 1、3d 后,弃培养液加入噻唑蓝(5mg/ml) PBS, 每孔 15μl, 37 孵育 4h 显微镜下可见黑色结晶形成,加入二甲基亚砷 100ml,振荡至结晶溶解,避光 10min,酶标仪 490nm 波长计吸光度值(A)。计算细胞相对增殖率(RGR): RGR(%) = 实验组吸光度值/阴性对照组吸光度值 × 100%。按六级毒性分级法确定材料毒性^[2]。

1.4.2 基因转染 N/P 比值指的是 DNA/PEI 复合物中 PEI 分子所含的 N 原子与 DNA 分子中所含的 P 原子的摩尔比^[3]。1μg 的 DNA 分子中含有 3nmol 的 P 原子。按照不同的 N/P 比值调整 PEI 溶液(4.3mg/ml)的使用量,见表 1。

表 1 不同 N/P 比值的 PEI 溶液的使用量

	N/P=4	N/P=6	N/P=8	N/P=10
DNA(μg)	5	5	5	5
PEI(μl)	0.6	0.9	1.2	1.5

注:上表指的是转染六孔板中一个孔所需要的 DNA 量和 PEI 量。

分别使用质粒 pMAMneoluc 和质粒 pORF-mIL-12elasti 进行转染。将 5μgDNA 溶于 200μl 的 5%葡萄糖溶液中,此为溶液 A; 将相应体积的 PEI 溶于 200μl 的 5%葡萄糖溶液,此为溶液 B; 将溶液 B 加入到溶液 A 中,混匀后室温静置 15~30min,此为溶液 C; 在溶液 C 中加入 1ml 无血清 DMEM 培养基,并将其移入单层培养 MG63 细胞的六孔板内,置于 CO₂ 培养箱内 4~6h; 加入含 20%小牛血清的 DMEM 完全培养液 1ml,继续培养 48h^[4]。同时以 LipofectAMINE 作为对照。

1.4.3 荧光素酶表达的检测 按荧光素酶检测系统的说明,在 Beckman LS-5000 液体闪烁计数器上利用单光子计数程序,测定往反应系统加入待测样品后的 1min 内反应系统释放的光子数(cpm),以此来评价样品中所含荧光素酶的量。

1.4.4 逆转录-聚合酶链反应(reversetranscription PCR, RT-PCR) 按照 TRIZOL 总 RNA 提取试剂盒说明书提取转染 mIL-12 基因 MG63 细胞的总 RNA,为模板进行两步法逆转录-聚合酶链反应。反应条件: 42 逆转录 60min,然后 95 10min 终止反应备用。10μl 逆转录产物用于 PCR。mIL-12 p35 正义引物: 5'-ACACGGGACCAAACCA GCA-CAT;反义引物: 5'-GCTGAA GCGTGAA GCA G-GATG。mIL-12 p40 正义引物: 5'-CA GGGACA T-CATCAAACCA GAC;反义引物: 5'-ACTTGCTG-CATGA GGAATTGTA。PCR 反应条件: 95 预变性 5min、94 变性 50s、扩增 p35 于 63 退火

60s,扩增 p40 于 59 退火 60s、72 延伸 70s,循环 35 次,72 总延伸 7min。

1.4.5 mIL-12 p70 蛋白的表达鉴定 各组 MG63 细胞在转染了质粒 pORF-mIL-12elasti 后,于 2ml 含有 10%小牛血清的 DMEM 完全培养液中继续培养 48h。按照 mIL-12 p70 的 ELISA 蛋白定量检测试剂盒说明操作,测定培养液上清中 mIL-12 p70 蛋白的含量。

1.4.6 免疫组化法检测 mIL-12 p70 蛋白的表达 免疫组化染色用 S-P 法,操作方法按照 S-P 试剂盒说明书进行,DAB 染色,普通显微镜下观察。

2 结果

2.1 MTT 法检测 PEI 对 L929 成纤维细胞增殖毒性的结果见表 2、3。

表 2 MTT 法检测 PEI 与 L929 成纤维细胞共培养 24 小时的增殖毒性

PEI 浓度(μg/ml)	A 值	RGR (%)	毒性级
1	0.257 ±0.0086	100	0
2	0.251 ±0.0094	97	1
3	0.247 ±0.0083	96	1
4	0.237 ±0.0075	92	1
5	0.223 ±0.0081	86	1
6	0.214 ±0.0076	83	1
7	0.189 ±0.0064	73	2
8	0.162 ±0.0074	63	2
9	0.146 ±0.0073	57	2
10	0.139 ±0.0081	54	2
12	0.135 ±0.0069	52	2
14	0.084 ±0.0067	33	3
16	0.060 ±0.0078	23	4
18	0.054 ±0.0083	21	4
20	0.048 ±0.0079	19	4
25	0.052 ±0.0063	20	4
30	0.051 ±0.0083	20	4
阴性对照	0.258 ±0.0089	100	0

2.2 使用美国 Promega 公司提供的荧光素酶检测试剂盒检测体外基因转染 48 小时后荧光素酶的表达,见图 1。

结果显示,N/P 比值对 PEI 介导基因转染的效率影响显著。当 N/P = 8 时荧光素酶的活性最强,为 9.31 ×10⁴cpm。

2.3 RT-PCR 结果 如图 2 所示,转染后的 MG63 细胞可检测到 p35mRNA 片段及 p40mRNA 片段,说明 PEI 介导的 mIL-12 基因转染 MG63 细胞,p35、p40 在 mRNA 水平均能有效表达。

表 3 MTT 法检测 PEI 与 L929 成纤维细胞共培养 72 小时的增殖毒性

PEI 浓度 (μg/ml)	A 值	RGR (%)	毒性级
1	0.493 ±0.0094	96	1
2	0.471 ±0.0086	92	1
3	0.462 ±0.0091	90	1
4	0.451 ±0.0065	88	1
5	0.423 ±0.0087	83	1
6	0.397 ±0.0079	78	1
7	0.352 ±0.0075	69	2
8	0.301 ±0.0068	59	2
9	0.269 ±0.0077	53	2
10	0.243 ±0.0092	47	3
12	0.213 ±0.0085	42	3
14	0.161 ±0.0074	31	3
16	0.105 ±0.0063	21	4
18	0.087 ±0.0083	17	4
20	0.089 ±0.0098	17	4
25	0.074 ±0.0071	14	4
30	0.083 ±0.0069	16	4
阴性对照	0.512 ±0.0073	100	0

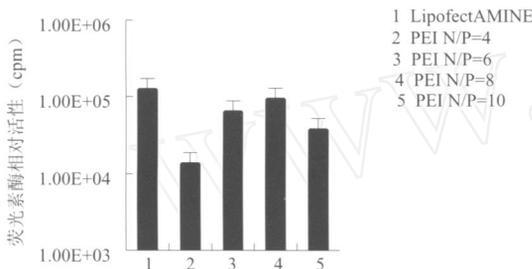


图 1 转染 48 小时后荧光素酶的表达

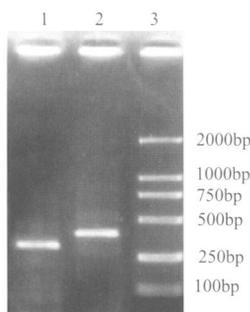


图 2 RT-PCR 分析 mIL-12 基因修饰的 MG63 细胞中基因的表达

1 为 mIL-12p40RT-PCR 产物,为 295bp;2 为 mIL-12p35RT-PCR 产物,为 386bp;3 为 DNA marker

2.4 ELISA 法检测 mIL-12 的表达 ELISA 法检测转 pORF-mIL-12elasti 48h 后 mIL-12 的表达量,见图 3。可以看出,当 N/P = 8 时 mIL-12 的产量最大。

2.5 免疫组化法检测 mIL-12p70 蛋白的表达 在 400 ×普通光镜视野下可见 mIL-12 阳性细胞,细胞浆中可见粗大棕色颗粒,见图 4。说明 PEI 介导 mIL-12 基因转染 MG63 细胞, p70 在蛋白质水平

能有效表达。

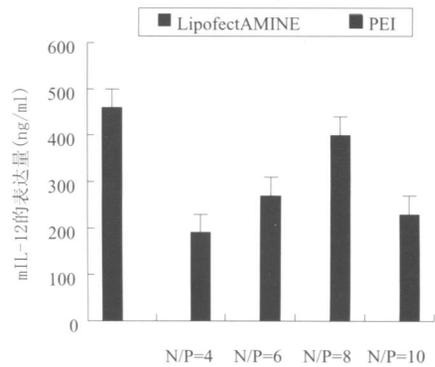


图 3 转染 48 小时后 mIL-12 的表达量



图 4 免疫组化法检测 mIL-12 基因修饰的 MG63 细胞中基因的表达

在 400 ×普通光镜视野下可见 mIL-12 阳性细胞,细胞浆中可见粗大棕色颗粒。

3 讨论

PEI 是目前研究的热点,它的结构特点为每隔 3 个原子即出现氨基氮,这就构成了多聚网状结构,从而与 DNA 结合。同时,PEI 具有较强的缓冲能力,能够避免 DNA 在溶酶体的酸性条件下水解失活,因此具有较高的表达效价^[5]。PEI 偶联上配体,通过受体介导的内吞途径进入靶细胞,还可以显著增加转染效率和靶向性^[6]。实验证明,PEI 是非常有希望的基因治疗载体。在设计更复杂的基因载体中,PEI 可做为核心组成成分。本试验采用 MTT 法检测 PEI 对 L929 成纤维细胞增殖的毒性。结果表明分子量为 25 KD 的 PEI 是一种毒性较低的基因转染载体。在正常的转染条件下,35mm 培养板需要 1~5μg 质粒,按 N/P = 10、转染液体积为 1ml 来计算,最终所需要的 PEI 浓度为 1.29~6.45μg/ml。在此浓度范围内,PEI 对于细胞增殖的毒性均很低,毒性评级为 0~1 级。在体外基因转染过程中,也未观察到大量细胞中毒的现象。同时,25 KD 的 PEI 还是一种高效的 DNA 载体,当 N/P = 8 时,它的转染效率最高,与 LipofectAMINE 相近。本实验为进一步研究出以 PEI 为核心的、具有肿瘤靶向性的基因载体提供了依据。

(下转第 104 页)

治疗方面的临床新策略^[4-6]。Fernandez 等^[7]报道 18 例乳头状腺癌包括微腺癌和转移组织,其胞质的 Galectin-3 免疫组化染色均为阳性,但存在着程度的差异。Orlandi 等^[8]将免疫组化与传统的病理组织学检查进行了比较,得出 Galectin-3 诊断乳头状腺癌的灵敏度和特异度分别是 100%和 89.65%^[8]。

本实验 64 例胃癌中,-半乳糖苷结合蛋白-3 阳性表达的有 55 例,总阳性率为 85.9%,46%表现出核染色。-半乳糖苷结合蛋白-3 在正常组织中的阳性表达率为 23.79%,在不同分化程度的胃癌组织中都呈强阳性表达,并在中等分化胃癌组织中 -半乳糖苷结合蛋白-3 阳性细胞数最多,它在正常组织和癌组织中的表达具有显著性差异 ($P < 0.001$)。此外,随着分化程度降低,-半乳糖苷结合蛋白-3 平均吸光度值不断增大,染色程度不断加深,见图 1~4,有淋巴结转移的病例比无淋巴结转移的病例表现出更强的染色。因此,-半乳糖苷结合蛋白-3 阳性表达细胞增多以及染色强度增加与胃癌的发生、发展、浸润以及淋巴结转移密切相关。

本组研究表明 -半乳糖苷结合蛋白-3 在不同分化程度胃癌组织中都强阳性表达,并与胃癌淋巴结转移有关。因此,-半乳糖苷结合蛋白-3 是判断胃癌浸润程度和淋巴结潜在转移,尤其在一定的组织学类型中是非常有用的肿瘤标志物^[9]。

(本文图见封 3)

参考文献:

[1] Perillo NL, Marcus ME, Baum LG. Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death[J]. *J Mol Med*, 1998, 76(6):402-412.

[2] Fukumori T, Takenaka Y, Yoshii T, et al. CD29 and CD7 mediate galectin-3-induced type II T-cell apoptosis[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(23):8302-8311.

[3] Miyazaki J, Hokari R, Kato S, et al. Increased expression of galectin-3 in primary gastric cancer and the metastatic lymph nodes[J]. *Oncol Rep*, 2002 9(6):1307-1312.

[4] Rabinovich GA. Galectins: a nevolutionarily conserved family of animal lectins with multi-functional properties; a trip from the gene to clinical therapy[J]. *Cell Death Differ*, 1999, 6(8):711-713.

[5] Rabinovich GA, Riera CM, Lande CA. Galectins: a key intersection between biology and immunology [J]. *Braz J Med Biol Res*, 1999, 32(4):383-385.

[6] 徐莹,俞茂华. 甲状腺肿瘤 Galectin-3 表达及临床意义[J]. *复旦学报(医学版)*, 2002, 29(3):230-231.

[7] Fernandez PL, Merino MJ, Gomez M, et al. Galectin-3 and laminin expression in neoplastic and non-neoplastic thyroid tissue[J]. *J Pathology*, 1997, 181(1):80-86.

[8] Orlandi F, Saggiorato E, Pivano G, et al. Galectin-3 is a presurgical marker of human thyroid carcinoma [J]. *Cancer Res*, 1998, 58(14):3015-3020.

[9] Miyazaki J, Hokari R, Kato S, et al. Increased expression of galectin-3 in primary gastric cancer and the metastatic lymph nodes[J]. *Oncol Rep*, 2002, 9(6):1307-1312.

[编辑:贺文;校对:杨卉]

(上接第 98 页)

肿瘤的细胞因子基因治疗是肿瘤基因治疗的重要部分,在多种细胞因子中,IL-12 的基因治疗最为有效。IL-12 作为一种具有广泛免疫调节作用的多功能细胞因子,是通过促进 NK 细胞和 T 细胞的增殖、活化和杀伤活性,直接诱导干扰素(INF- γ)的产生,启动 TH₀ 细胞向 TH₁ 细胞发育,扩增 CTL 细胞等生物活性,来调节和促进细胞介导的免疫反应的^[7]。本实验使用 PEI 为载体,成功的将小鼠 IL-12 基因导入体外培养的 MG63 细胞,为进一步研究 IL-12 对骨肉瘤细胞的体内外杀伤作用奠定了基础。

所以我们得出结论:PEI 是一种低毒性、高效率的基因转染载体,它可成功的将 mIL-12 基因导入骨肉瘤细胞,在体内外基因治疗的试验中,具有广泛的应用前景。

参考文献:

[1] Jia SF, Worth LL, Densmore CL, et al. Eradication of osteosarcoma lung metastases following intranasal interleukin-12 gene therapy using a nonviral polyethylenimine vector [J].

Cancer Gene Ther, 2002, 9(3):260-266.

[2] Zhang W, Torabinejad M, Li Y. Evaluation of cytotoxicity of MTAD using the MTT-tetrazolium method [J]. *J Endod*, 2003, 29(10):654-657.

[3] Pollard H, Remy JS, Loussouarn G, et al. Polyethylenimine but not cationic lipids promotes transgene delivery to the nucleus in mammalian cells [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(13):7507-7511.

[4] Godbey WT, Barry MA, Saggau P, et al. Poly(ethylenimine)-mediated transfection: a new paradigm for gene delivery[J]. *J Biomed Mater Res*, 2000, 51(3):321-328.

[5] Nguyen TH, Murakami A, Fujiki K, et al. Transferrin-polyethylenimine conjugate, FuGENE6 and TransIT-L T as nonviral vectors for gene transfer to the corneal endothelium[J]. *Jpn J Ophthalmol*, 2002, 46(2):140-146.

[6] Kircheis R, Wightman L, Kursu M, et al. Tumor-targeted gene delivery: an attractive strategy to use highly active effector molecules in cancer treatment [J]. *Gene Ther*, 2002, 9(11):731-735.

[7] Tahara H, Lotze MT. Antitumor effects of interleukin 12 (IL-12): applications for the immunotherapy and gene therapy of cancer[J]. *Gene Ther*, 1995, 2(2):96-106.

[编辑:贺文;校对:杨卉]