

Hela细胞对阳离子脂质体/DNA复合体的摄取机制

丁会芹^{1,2} 崔韶晖² 王冰² 洪洋¹ 张树彪^{2*}¹中国医科大学基础医学院, 沈阳 110001; ²大连民族学院生命科学院国家民委-教育部重点实验室, 大连 116600

摘要 该文主要研究了Hela细胞对阳离子脂质体/DNA复合体的摄取机制。通过使用抑制剂抑制真核细胞跨膜运输的相关路径, 再通过阳离子脂质体将绿色荧光蛋白基因、荧光素酶报告基因转染到细胞中。利用荧光显微镜、微光检测仪定性以及定量检测不同抑制剂浓度下转染效率的差异, MTT法检测各浓度下的细胞存活率, 确定对相应路径的依赖性。结果显示, 在细胞存活率保持在60%以上的前提下, 镜下观察到随着药物浓度的升高, 荧光强度明显减弱, 微光检测数据显示随着药物浓度增加, 基因表达的效率具有明显的下降趋势。因此推测, Hela细胞主要通过网格蛋白以及小窝蛋白介导的路径摄取脂质体/DNA复合体, 对于微管微丝介导的巨胞饮作用也具有一定的依赖性。

关键词 阳离子脂质体; 基因转染; 抑制剂; 摄取机制

阳离子脂质体以其高效性、低毒性、低免疫原性、可生物降解等优点, 成为近年来基因转运中的常用载体^[1]。但关于阳离子脂质体运载质粒DNA进入细胞的路径尚不明确^[2]。本实验应用氯丙嗪(chlorpromazine)^[3]、渥曼青霉素(wortmannin)^[4]、高金雀花碱(genistein)^[5]、长春花碱(vinblastine)^[6]等能够作用于细胞膜表面的化学抑制剂, 作用于Hela细胞, 使细胞膜上相应的运输通道受到抑制, 在保持细胞具有较高存活率的前提下, 利用阳离子脂质体Lipofectamine2000运载绿色荧光蛋白基因^[7]和荧光素酶报告基因^[8]进行细胞转染, 然后定性以及定量检测目的基因表达效率的变化, 从而得出相应摄取路径在阳离子脂质体介导的基因转染中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株以及培养方法 人宫颈癌细胞株Hela细胞(中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所), 培养于含有10%胎牛血清、青霉素各为100 U/mL的RPMI1640培养基中, 置37 °C、5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养, 每2~3 d用0.25%的胰蛋白酶消化传代一次, 并随时观察细胞形态。

1.1.2 主要试剂 脂质体Lipofectamine2000 (美国Invitrogen), 质粒pGL-3 (美国Promega)、pGFP-N2 (美国Clontech), MTT (美国Sigma), 底物发光

液Bright-Glo™ Luciferase Assay System (美国Promega), 抑制剂chlorpromazine (美国Sigma)、wortmannin (美国Acros)、genistein (美国Acros)、长春花碱(上海生工生物工程技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 抑制细胞的跨膜运输路径 取对数生长期的Hela细胞, 用0.25%胰蛋白酶消化后计数, 按每孔1×10⁵个细胞接种于96孔培养板上, 培养16~24 h, 使细胞密度达到70%~80%。每种抑制剂按不同浓度加入到培养板中, 每组设3个平行样, 作用时间为1 h。

1.2.2 转染绿色荧光蛋白基因, 定性检测抑制作用对转染效率的影响 将Hela细胞接种到透明的96孔培养板中, 细胞密度达到70%~80%后进行抑制。将0.3 μg质粒pGFP-N2和0.9 μg脂质体Lipofectamine2000分别稀释于25 μL低糖DMEM中, 然后将脂质体稀释液滴加到质粒稀释液中, 室温静置20 min。移去原先的培养基, 用无血清双抗的RPMI 1640清洗一遍并替换后, 将脂质体/DNA混合液(50 μL)加入到培养板中。4 h后换含有10%血清和100 U/mL双抗的RPMI 1640培养基继续培养。48 h后用倒置荧光显微镜观察绿

收稿日期: 2011-07-16 接受日期: 2011-09-16

国家自然科学基金(No.20876027, No.21046008)、教育部新世纪优秀人才支持计划(No.NCET-08-0654)和中央高校基本科研业务费专项资金(No.DC10020103)资助项目

*通讯作者。Tel: 0411-87656141, Fax: 0411-87656141, E-mail: zsb@dlnu.edu.cn

色荧光蛋白信号。

1.2.3 转染荧光素酶报告基因, 定量检测抑制作用对转染效率的影响 将Hela细胞接种到白色的96孔培养板中, 细胞密度达到70%~80%后加入抑制剂, 作用1 h。将0.3 μg 质粒pGL-3和0.9 μg 脂质体Lipofectamine2000用低糖DMEM稀释后混匀, 加入到培养板中, 4 h后换含血清双抗的培养基继续培养。48 h后用微孔发光仪每孔加入100 μL 底物发光液, 检测RUL值, 即荧光素酶报告基因的表达情况。

1.2.4 MTT法检测加入抑制剂后的细胞存活率^[9] 将Hela细胞培养于透明的96孔培养板上, 24 h后加入抑制剂作用1 h, 24 h后用MTT法检测酶标仪波长为570 nm处各孔的吸光度(D)值, 以药物浓度为横坐标,

细胞相对存活率为纵坐标绘制折线图。

2 结果

2.1 绿色荧光蛋白的检测

质粒pGFP-N2中含有绿色荧光蛋白基因, 其表达的产物绿色荧光蛋白能激发峰值为508 nm的绿色荧光, 用倒置荧光显微镜观察, 阳性细胞发出明亮的荧光, 阴性细胞不发光, 观察倍数 20×10 。空白对照组只加入脂质体和质粒, 不加药物, 荧光信号较强。实验组加入不同浓度的抑制剂, 随着药物浓度的增大, 荧光强度明显减弱(图1)。氯丙嗪浓度在20, 60, 80, 100 $\mu\text{mol/L}$ 时细胞存活率较高, 绿色荧光依次下降为70%, 60%, 20%, 10%; 渥曼青霉素浓度为

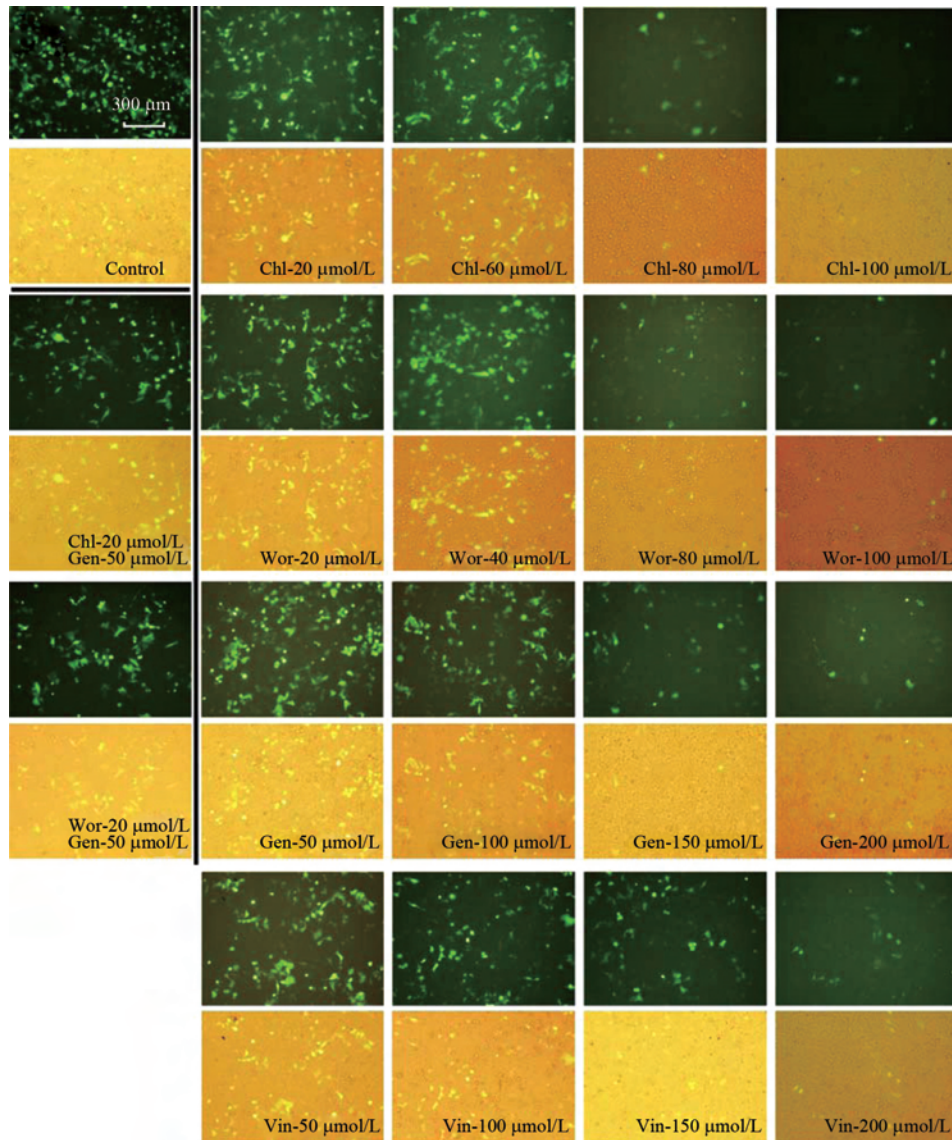


图1 荧光检测结果及相应细胞图片

Fig.1 The results of fluorescence detection and the corresponding cell images

20, 40, 80, 100 nmol/L时, 绿色荧光比例依次为70%, 60%, 40%, 30%; 高金雀花碱浓度为50, 100, 150, 200 $\mu\text{mol/L}$ 时, 荧光比例为80%, 60%, 40%, 30%; 长春花碱的浓度为50, 100, 150, 200 nmol/L时, 对应的荧光表达比例为70%, 60%, 50%, 30%。

同时加入网格蛋白抑制剂氯丙嗪和小窝蛋白抑制剂高金雀花碱, 检测抑制作用后的绿色荧光表达强度。结果发现, 在细胞存活率较高并且均衡的前提下, 与单独加入一种抑制剂相比, 同时加入两种抑制剂的抑制作用更强, 绿色荧光表达率更低。单独加入氯丙嗪20 $\mu\text{mol/L}$ 、渥曼青霉素20 nmol/L或者高金雀花碱50 $\mu\text{mol/L}$ 时, 荧光强度均为70%~80%, 而同时加入相应浓度的氯丙嗪和高金雀花碱或者渥曼青霉素和高金雀花碱后, 荧光强度降至50% (图1)。

2.2 荧光素酶报告基因的定量检测以及细胞存活率结果

质粒pGL-3中含有荧光素酶报告基因, 其表达的产物荧光素酶与底物发光液反应后可以发出荧光, 用多功能酶标仪检测相对光单元(RUL值), 即可获得对应的荧光素酶的表达量。以药物的浓度梯度为横坐标, 含量值为纵坐标做柱形图, 并同时用MTT法测得的相应细胞存活率以折线图的形式整合到图中(图2~图5), 对比发现保证细胞存活率保持在60%的前提下, 加入不同浓度的抑制剂, 荧光素酶含量随着药物浓度的增加而减少。对于不同浓度下的荧光素酶蛋白含量值与对应的细胞存活率做比值, 得到相对均等的存活率下, 不同浓度抑制剂作用后的RUL值曲线(图6)。通过曲线可以看出, 在相对平均的细胞存活率下, 随着抑制剂浓度的增大, 蛋白表达的含量总体呈下降趋势。

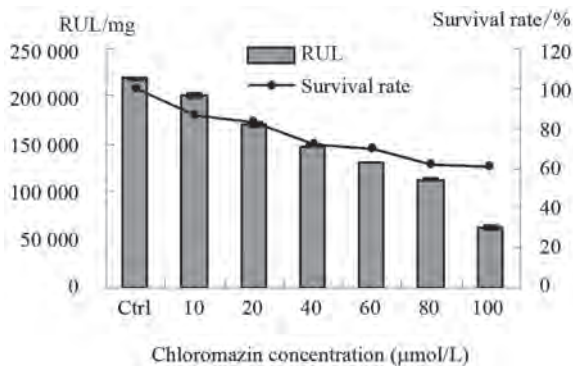


图2 氯丙嗪相应荧光素酶含量及细胞存活率

Fig.2 The content of the luciferase and cell viability with different concentrations of chlorpromazine

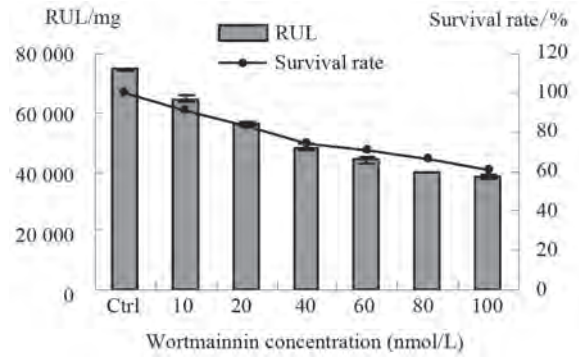


图3 渥曼青霉素相应荧光素酶含量及细胞存活率

Fig.3 The content of the luciferase and cell viability with different concentrations of wortmannin

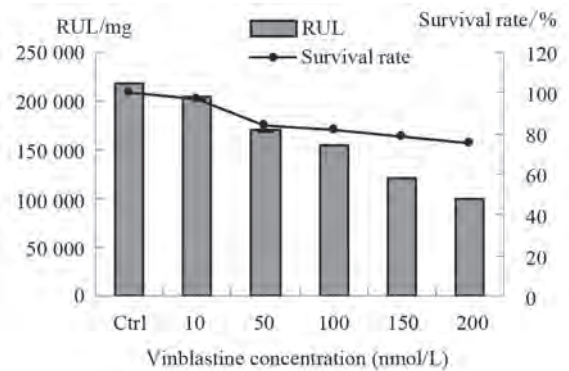


图4 高金雀花碱相应荧光素酶含量及细胞存活率

Fig.4 The content of the luciferase and cell viability with different concentrations of genistein

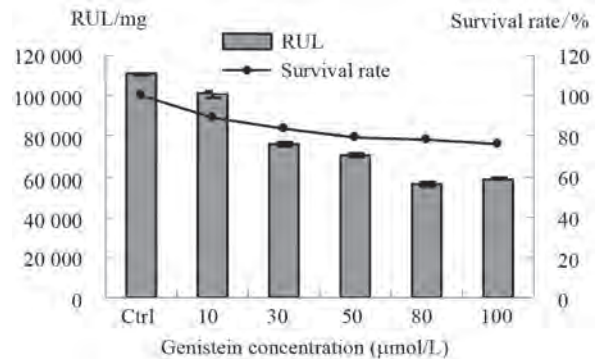


图5 长春花碱相应荧光素酶含量及细胞存活率

Fig.5 The content of the luciferase and cell viability with different concentrations of vinblastine

3 讨论

氯丙嗪、渥曼青霉素是网格蛋白抑制剂, 氯丙嗪通过抑制网格蛋白包被小窝在膜上的聚集^[10]抑制网格蛋白介导的摄取路径。渥曼青霉素通过影响内体双层外壳的形成来减少细胞内内体囊泡^[11]从而抑

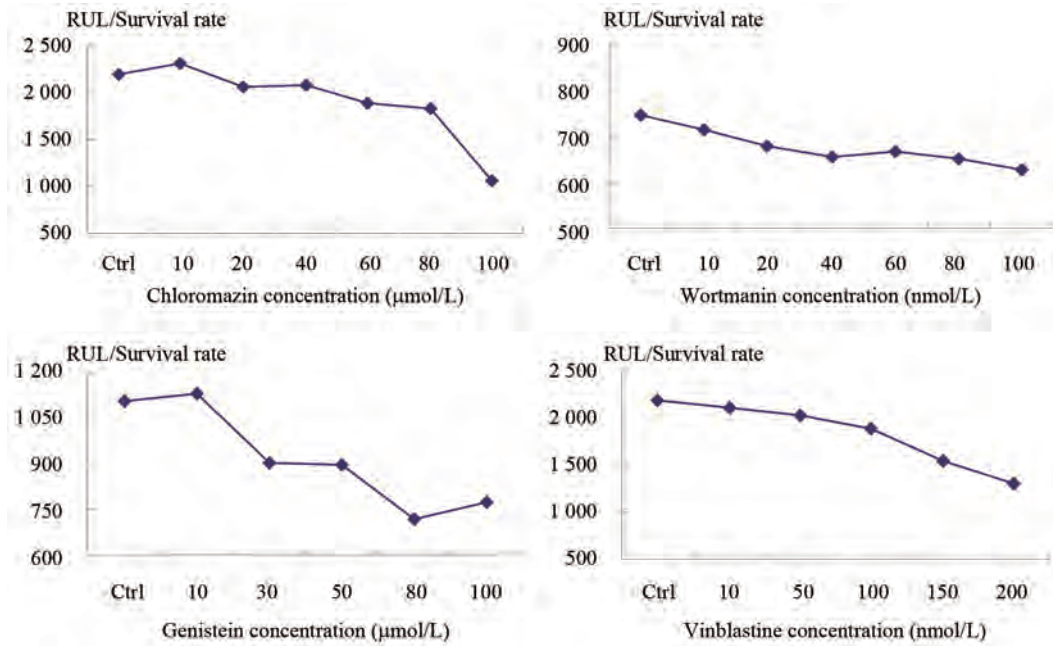


图6 加入抑制剂后的荧光素酶含量RUL值与相应细胞存活率的比值曲线
Fig.6 The ratio curves of luciferase and cell viability with different inhibitors

制摄取过程。绿色荧光蛋白检测结果(图1)显示,随着药物浓度的增大,荧光数量逐渐减少,而可见光下的细胞照片可以看出细胞的存活状态并没有明显变化。因此可以说网格蛋白受到抑制作用导致了绿色荧光的减少。为了定量说明这个问题,又选用荧光素酶报告基因,定量检测加入抑制剂后所表达的荧光素酶含量,即RUL值。同时用MTT法检测所对应的细胞存活率,结果清楚地表明,在细胞存活率普遍保持在60%以上时,RUL值随着药物浓度的增加逐渐减小(图2和图3)。为了比较在均衡细胞存活率的情况下,加入抑制剂后RUL值的变化,将RUL值与相对应的细胞存活率相比,得到的曲线也均呈下降趋势(图6)。因此Hela细胞对复合体的摄取对网格蛋白介导的路径有很大依赖性。

高金雀花碱是小窝蛋白抑制剂,能够通过调节启动小窝蛋白的信号通路抑制小窝蛋白所介导的摄取路径^[12]。绿色荧光蛋白基因的表达结果(图1)以及荧光素酶报告基因检测结果(图4)均显示,在细胞存活率较高的前提下,目的基因表达的含量随着药物浓度的增加明显下降。因此小窝蛋白介导的跨膜路径也是Hela细胞摄取复合体的主要途径之一。

长春花碱能够影响肌动蛋白骨架正确聚合成肌动蛋白微丝并促进肌动蛋白微丝骨架解离^[6],因

此能够抑制微管微丝介导的摄取路径。加入不同浓度的长春花碱后,细胞生存率几乎都维持在80%以上(图5),而绿色荧光强度和荧光素酶含量下降趋势明显,因此微管微丝介导的吞噬作用对Hela细胞对复合体的摄取也有一定的调节作用。

然而,同时加入两种抑制剂后检测基因转染效率,结果发现荧光强度都有一定的降低,但与单独加入一种抑制剂的结果相比,不同抑制剂之间没有太大差别。因此还不能明确说明Hela细胞摄取复合体所涉及的途径中对哪一种具有更大的依赖性。并且Hela细胞对脂质体/DNA复合体的摄取究竟是通过细胞膜上的哪种受体进行的尚不清楚,这都需要进行进一步的研究。

参考文献 (References)

- 1 Resina S, Prevot P, Thierry AR. Physico-chemical characteristics of lipoplexes influence cell uptake mechanisms and transfection efficacy. *PLoS One* 2009; 4(6): e6058.
- 2 Duan Y, Zhang S, Wang B, Yang B, Zhi D. The biological routes of gene delivery mediated by lipid-based non-viral vectors. *Expert Opin Drug Deliv* 2009; 6(12): 1351-61.
- 3 Ivanov AI. Pharmacological inhibition of endocytic pathways: Is it specific enough to be useful? *Methods Mol Biol* 2008; 440: 15-33.
- 4 Zheleznova NN, Nikol'skii NN, Kornilova ES. Effect of wortmannin on endocytosis of epidermal growth factor receptors.

- Tsitologia 2001; 43(2): 156-65.
- 5 Monteiro da Silva JL, Andreotti PF, Benard G, Soares CP, Miranda ET, *et al.* Epithelial cells treated with genistein inhibit adhesion and endocytosis of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2007; 92(1): 129-35.
- 6 Morgan EH, Iacopetta BJ. Vinblastine but not other microtubule inhibitors block transferrin endocytosis and iron uptake by reticuloocytes. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1987; 14(2): 119-26.
- 7 Hasegawa S, Yang M, Chishima T, Miyagi Y, Shimada H, Moosasa AR, *et al.* *In vivo* tumor delivery of the green fluorescent protein gene to report future occurrence of metastasis. *Cancer Gene Ther* 2000; 7(10): 1336-40.
- 8 Ge J, Cheng B, He P, Wen H, Lu H, Chen X, *et al.* Construction and identification of recombinant firefly luciferase report vector containing human acylcoenzyme A: Cholesterol acyltransferase 1 gene P7 promoter. *J Biomed Engineering* 2008; 25(6): 1381-4.
- 9 van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Biol* 2011; 731: 237-45.
- 10 Marchesi C, Dall'Asta V, Rotoli BM, Bianchi MG, Maggini C, Gazzola GC, *et al.* Chlorpromazine, clozapine and olanzapine inhibit anionic amino acid transport in cultured human fibroblasts. *Amino Acids* 2006; 31(2): 93-9.
- 11 Yorek MA, Dunlap JA, Lowe WL Jr. Wortmannin and LY294002 inhibit myo-inositol accumulation by cultured bovine aorta endothelial cells and murine 3T3-L1 adipocytes. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1497(3): 328-40.
- 12 Zhang DY, Wu W, Deng XL, Lau CP, Li GR. Genistein and tyrphostin AG556 inhibit inwardly-rectifying Kir2.1 channels expressed in HEK 293 cells via protein tyrosine kinase inhibition. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1808(8): 1993-9.

The Uptake Mechanism of Cationic Liposome/DNA Complex in HeLa Cells

Ding Huiqin^{1,2}, Cui Shaohui², Wang Bing², Hong Yang¹, Zhang Shubiao^{2*}

(¹College of Basic Medical Science, China Medical University, Shenyang 110001, China; ²Key Laboratory of State Ethnic Affairs Commission-Ministry of Education, College of Life Sciences, Dalian Nationalities University, Dalian 116600, China)

Abstract The aim of this paper is to study the uptake mechanism for the cationic liposome/DNA complex by HeLa cells. Eukaryotic cell membrane transport-related pathways were inhibited by inhibitors, and the gene with green fluorescent protein or luciferase was transfected into cells by cationic liposome. The transfection efficiency with different concentrations of inhibitors was detected by fluorescence microscope and low light level detector qualitatively or quantitatively. The MTT assay was used to detect the cell viability in order to evaluate the dependence on the pathways. The results suggested that when the cell viability remained at 60% or more, the fluorescence intensity significantly decreased and the efficiency of gene expression declined with the increase of the concentration of inhibition. This showed that the liposome/DNA complex was uptaken through the pathway which mediated by clathrin or caveolin and also through the phagocytosis that mediated by microtubule filaments.

Key words cationic liposome; gene transfection; inhibitor; uptake mechanism

Received: July 16, 2011 Accepted: September 16, 2011

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.20876027, No.21046008), the New Century Excellent Talents (No.NCET-08-0654) and the Central University Special Fund Basic Research and Operating Expenses (No.DC10020103)

*Corresponding author. Tel: 86-411-87656141, Fax: 86-411-87656141, E-mail: zsb@dlnu.edu.cn