

- [3] Duncan, M. D. et al., 1994, *Digestive Diseases Sci.* **39**: 2197-2201.
- [4] Ichiba, H. et al., 1992, *Bio Neonate*, **61**:47-53.
- [5] Straus, D. S., 1984, *Endocr Rev*, **5**:356-369.
- [6] Young, G. P., 1990, *Digestion*, **46**(suppl2):240-247.
- [7] Prosser, C. G. et al., 1987, *Endocrinology*, **120**:1411-1416.
- [8] Westergaard, H., 1989, *Am J Physiol*, **256**:G911-918.
- [9] Czech, M. P., 1989, *Cell*, **59**:235-239.
- [10] Bird, A. R. et al., 1996, *J Anim. Sci*, **74**:2523-2540.

EFFECTS OF INSULIN AND IGF-I ON THE PROLIFERATION AND FUNCTIONAL MATURATION OF CALF INTESTINAL EPITHELIAL CELLS *IN VITRO*

MA Yu Min* WANG Tian* and XU Ruo Jun**

(* College of Animal Science & Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing, 210095, China

** Department of Zoology, The University of Hong Kong, Hong Kong, China)

ABSTRACT

The calf intestinal epithelial cells *in vitro* (CIEC) were selected to evaluate the trophic actions of insulin and IGF-I. The cell proliferation and glucose absorption were investigated. Results showed that insulin with a dosage of 10 μ g/ml and IGF-I with 100ng/ml both had strong stimulating effects on the proliferation and glucose absorption of CIEC ($P < 0.01$), while insulin with a dosage of 50 μ g/ml inhibited the proliferation and glucose absorption of CIEC ($P < 0.01$). IGF-I with concentration exceeded 100ng/ml (500ng/ml and 1000ng/ml in this experiment) showed saturated effect. This suggested that IGF-I at a dosage of 100ng/ml, 500ng/ml or 1000ng/ml had similar actions. The results suggested that natural growth factors in colostrum had significantly effects on the growth and functional development of intestinal epithelial cells *in vitro*.

Key words: Insulin, IGF-I, Intestinal epithelial cells

阳性脂质体介导反义寡聚核苷酸转染 HeLa 细胞的效果研究

陶茂莹*

高久洋**

(* 中国预防医学科学院 协和公共卫生学院 北京 100021)

(** 日本千叶工业大学生物化学系 千叶 275-0016)

阳性脂质体 (Cationic Liposomes) 是一系列本身带有正电荷的脂质物质, 近年来被广泛用作介导核酸类物质 (或药物等) 转染细胞的载体, 并被尝试性地用于临床上的基因治疗^[1]。本研究利用荧光素 (Fluorescein Isothiocyanate, FITC) 标记和流式细胞技术 (Flow Cytometry, FCM), 对目前几种较为常用的阳性脂质体介导反义寡聚核苷酸转染 HeLa 细胞的效果进行了研究和分析。

材料与方法

一、材料

1. 细胞株 选用人宫颈癌上皮细胞 (HeLa, 源于 Takaku 实验室), 培养于含 15% 牛血清的 DMEM 培养基 (GIBCO) 中。

2. 寡聚核苷酸 用 19 个碱基的寡聚核苷酸 (Phosphodiester Oligodeoxynucleotides, ODN19) 和同样序列但经化学修饰的寡聚核苷酸 (Phosphorothioate Oligodeoxynucleotide, S-

ODN19) 作为转染物质。两种寡聚核苷酸是 BioS (JAPAN) 公司经 FITC 标记合成并经高效液相层析精制纯化后提供的标准品, 其序列为 5'-CTC AGT TAG GGT TAG ACA A-3'。

3. 阳性脂质体 四种阳性脂质体分别为: Lipofectin (GIBCO)、LipofectAmine (GIBCO)、FuGENE6 (Boehringer Mannheim Co.) 和 DMRIE-C (GIBCO)。

二、方法

1. 细胞转染 HeLa 细胞培养于 6 孔板中 (10⁶ 个细胞/孔/2ml 培养基), 培养至细胞融合度达 80% 时用无血清培养基清洗后备用。将各种阳性脂质体与寡聚核苷酸以 2(μ l) 比 1(μ g) 的比例混匀后, 用无血清 DMEM 培养基 50 μ l 稀释, 置室温 15min 以形成脂质体-寡聚核苷酸复合体。将该复合体溶液分别加入上述已含 2ml 无血清 DMEM 培养基的 HeLa 细胞培养物中 (寡聚核苷酸的最终浓度为 2 μ mol/L), 转染 4h 后更换为含 15% 血清的 DMEM 培养基, 继续培养 16h 收获

本文 2001 年 6 月 12 日收到, 2002 年 1 月 3 日接受。

细胞。

2. 流式细胞仪检测分析 用无血清 DMEM 培养基清洗上述培养物一次; PBS(-)清洗两次; EDTA/Trip 法悬浮并收获细胞。50% 甲醇/PBS 固定细胞 1min 后, 将细胞悬浮于 0.5% 甲醛/PBS 溶液中, 用流式细胞仪 (FACScan system, Germany) 进行检测 (每份样本检测 10000 个细胞), 获得平均 FITC 荧光强度 (2W 氩离子激光, 530/15nm 滤波)。

结 果

流式细胞技术 (FCM) 为寡聚核苷酸转染细胞效果提供了有效的检测方法, 使评价细胞群体中被有效转染的单个细胞的比率和强度成为可能^[2]。

1. 阳性脂质体介导 ODN19 转染 HeLa 细胞

在无脂质体介导的 ODN19 转染 HeLa 细胞时, FITC 均值与荧光本底值 (2.87) 相近, 提示 ODN19 几乎没有 HeLa 细胞转染; 但在有阳性脂质体介导的条件下, 可观察到明显的转染现象。

几种脂质体的促进转染效果有着明显的不同 (图 1), 其中 LipofectAmine 的转染效果较为明显 (FITC 均值为 1946.18), DMRIE-C 次之 (23.42); Lipofectin 和 FuGENE6 无明显的促进转染现象。

2. 阳性脂质体介导的 S-ODN19 转染 HeLa 细胞

在同样的实验条件下, S-ODN19 表现出一定的转染细胞能力, 但在有脂质体介导时, S-ODN19 的转染效果则更为明显 (图 2)。其中, LipofectAmine 介导转染的 FITC 均值 (5203.11) 为单独 S-ODN19 转染 (148.69) 的数十倍。其他三种脂质体也表现出强弱不等的增强转染效果。

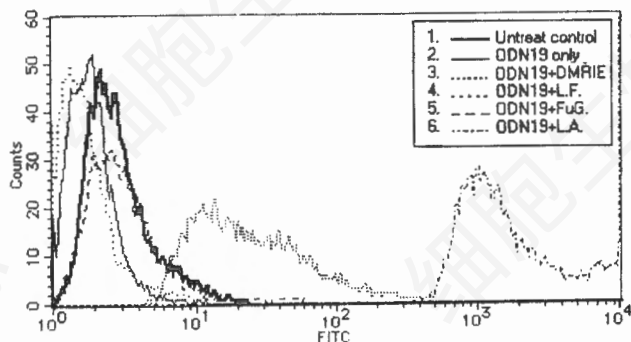


图 1 四种阳性脂质体促进 ODN19 转染 HeLa 细胞的效果比较

1. 未处理细胞对照, FITC=2.87;
2. 单纯 ODN19 转染组, FITC=1.91;
3. DMRIE-C 介导转染组, FITC=23.42;
4. Lipofectin 介导转染组, FITC=1.8
5. FuGENE6 介导转染组, FITC=3.18;
6. LipofectAmine 介导转染组, FITC=1946.18。

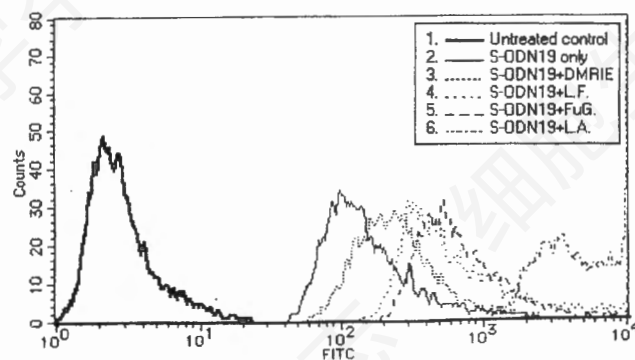


图 2 四种阳性脂质体促进 S-ODN19 转染 HeLa 细胞效果比较

1. 未处理细胞对照, FITC=2.87;
2. 单纯 S-ODN19 转染组, FITC=148.69;
3. DMRIE-C 介导转染组, FITC=241.58;
4. Lipofectin 介导转染组, FITC=618.06;
5. FuGENE6 介导转染组, FITC=662.57;
6. LipofectAmine 介导转染组, FITC=5203.11。

3. 转染时间对脂质体介导寡聚核苷酸转染的影响

脂质体 FuGENE6 介导 S-ODN19 转染 HeLa 细胞时, 随着转染时间的延长, 被转染细胞的 FITC 均值也明显增加 (图 3), 转染时间为 240 分的转染效果较为理想 (FITC 均值为 423.8)。

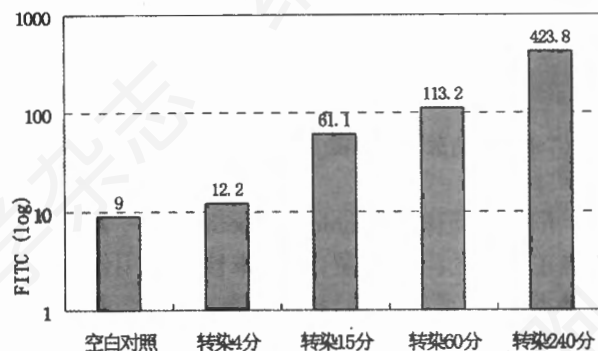


图 3 FuGENE6 介导的寡聚核苷酸转染时间对转染效果的影响

讨 论

在以疾病治疗为目的的研究中, 寡聚核苷酸是否具有明确的疗效, 不仅取决于选择有效的碱基序列, 还取决于细胞对寡聚核苷酸的摄入程度、寡聚核苷酸在细胞内的分布和在胞浆内被酶所降解的程度^[3-6]。对于具有负电性的寡聚核苷酸而言, 由于其不易与胞膜融合而进入细胞内, 因而进入细胞内的量很小。如能增加寡聚核苷酸进入细胞的总量和在胞浆内的稳定性, 其生物效能也将大为增强。

研究采用 FITC 标记的修饰和未经修饰的两种 19-mer 反义寡聚核苷酸序列 (ODN19 和 S-ODN19) 作为转染物质,对几种常用阳性脂质体的促进 HeLa 细胞转染效果进行了比较。研究结果显示(图 1),对于未经化学修饰的 ODN19 转染而言, LipofectAmine 和 DMRIE-C 的促进转染作用相对较强,而其他两种脂质体的促进作用并不明显。但在对于 S-ODN19(经化学修饰)的转染实验中(图 2),四种阳性脂质体均具有促进 S-ODN19 转染作用,但仍以 LipofectAmine 表现为最强,其转染效果 (FITC 均值为 5203.11) 为不加脂质体介导组的数十倍。四种阳性脂质体的促进转染作用排序为: LipofectAmine > FuGENE6 > Lipofectin > DMRIR-C。这种排序在某种程度上也为其他研究所印证, Claire MD 等^[7]用阳性脂质体介导质粒 DNA 转染脂肪细胞时, LipofectAmine 的介导强度相对大于 Lipofectin 和其他两种阳性脂质体。但是,在另一组以人上皮癌细胞为靶细胞的实验中, LipofectAmine 的效果却小于 Lipofectin^[8]。说明在体外细胞学实验中,阳性脂质体的介导效果也因转染细胞的种类不同而不同。

同时,即使是同一种类的靶细胞,同一脂质体对不同的转染物质 (DNA 或药物等) 的促进转染效果也有明显的不同。实验采用碱基序列和长度完全相同而碱基间连接方式有所不同的两种 19-mer 寡聚核苷酸 (ODN19 和 S-ODN19) 转染 HeLa 细胞,同种阳性脂质体表现为不同的介导效果 (见图 4)。S-ODN19 与 ODN19 的不同之处在于前者用 S 原子取代了原 ODN19 分子磷酸基团中的一个 O 原子,从而大为增强了其对于细胞膜的透过性和对核酸酶降解的稳定性^[9,10],并且其转染效果也易于为阳性脂质体所增强。

就转染时间而言, FuGENE6 介导 S-ODN19 转染 HeLa 细胞的效果随转染时间的延长而明显增强 (图 3)。在实际研究工作中,本研究小组曾用 FuGENE6 介导端粒酶抑制序列 (ODN19/S-ODN19) 转染 HeLa 细胞四小时,以达到对 HeLa 细胞端粒酶活性的抑制作用^[11]。其结果显示,对于几种抑制序列而言, FuGENE6 对 S-ODN19 的促进转染效果表现得十分明显,引发了 HeLa 细胞端粒酶活性的明显抑制;而对未经修饰的 ODN19, FuGENE6 并未表现出有效的介导转染效果。

总之,阳性脂质体在一定的实验条件下是提高细胞转染率的有效载体。但必须根据转染物质和转

染细胞的种类等实验条件选用适宜的阳性脂质体,以期达到理想的转染效果。

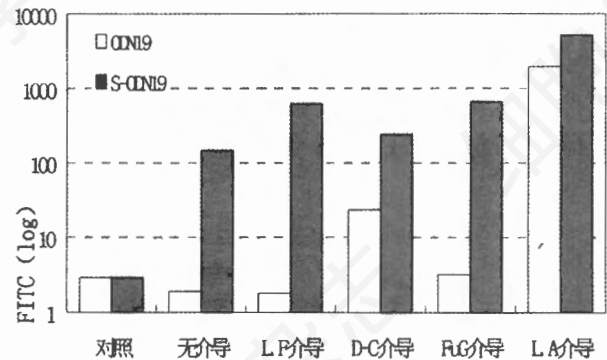


图 4 阳性脂质体介导 ODN19 或 S-ODN19 转染 HeLa 细胞

对照: HeLa 细胞; 无介导: 单纯 ODN19 或 S-ODN19 转染; L. F: Lipofectin 介导; D-C: DMRIE-C 介导; FuG: FuGENE6 介导; L. A: LipofectAmine 介导。

摘要

采用 FITC 标记的未经修饰的和经过修饰的两种 19-mer 反义寡聚核苷酸序列 (ODN19 和 S-ODN19) 作为转染物质,用流式细胞技术 (FCM) 研究比较几种常用阳性脂质体介导的寡聚核苷酸转染 HeLa 细胞的效果及适宜的转染时间。未经化学修饰的 ODN19 转染结果显示, LipofectAmine 和 DMRIE-C 增强转染的作用相对较强,而其他两种脂质体的作用并不明显。对于经过修饰的 S-ODN19 转染而言,四种阳性脂质体均具有增强 S-ODN19 转染作用,但以 LipofectAmine 的效果最为明显,其转染效果 (FITC 均值为 5203.11) 为无脂质体介导对照的数十倍。四种阳性脂质体的增强转染作用排序为: LipofectAmine > FuGENE6 > Lipofectin > DMRIR-C。另外,在用 FuGENE6 介导寡聚核苷酸转染时,采用 4 小时转染时间可获较好转染效果。

关键词: 脂质体 细胞转染 寡聚核苷酸 HeLa 细胞

参考文献

- [1] 卢大儒,等 1996, 国外医学,遗传学分册,19:1-3.
- [2] Bennett, C F. et al., 1992, *Mol Pharmacol.*, **41**:1023-33.
- [3] Stein, C A. et al., 1993, *Science*, **261**:1004-12.
- [4] Ho, S P. et al., 1996, *Nucleic Acids Res.*, **24**:1901-7.
- [5] Kronenmett, R. et al., 1996, *J. Mol. Biol.*, **259**:632-44.
- [6] Lima, W F. et al., 1997, *J. Biol. Chem.*, **272**:626-38.
- [7] Meunier-Durmort, C. et al., 1996, *Eur. J. Biochem.*,

- 237:660-7.
 [8] Farhood, H. et al., 1995, *Anal. Biochem.*, **225**:89-93.
 [9] Hoke, G. D. et al., 1991, *Nucleic Acids Res.*, **19**:5743-8.
 [10] Campbell, J. M. et al., 1990, *J. Biochem. Biophys. Meths.*, **20**:259-67.
 [11] Tao, M. et al., 1999, *FEBS Lett.*, **454**:312-6.

THE TRANSFECTION EFFICIENCY OF OLIGONUCLEOTIDES TRANSFECTION MEDIATED BY CATIONIC LIPOSOMES IN HELA CELLS

TAO Mao Xuan* TAKAKU Hiroshi**

(* Union School of Public Health, Chinese Academy of Preventive Medicine, Peijing (100021), China)

(** Department of Industrial Chemistry, Chiba Institute of Technology,
2-17-1 Tsudanuma, Narashino, Chiba (275-0016), Japan)

ABSTRACT

The enhance effect of oligonucleotide transfection mediated by cationic liposomes (Lipofectin, LipofectAmine, FuGENE6 and DMRIE-C) were investigated using flow cytometry in HeLa cells. Two 19-mer molecules, phosphodiester oligonucleotide (ODN19) and phosphorohioate oligonucleotides (S-ODN19), were employed, which are labeled with Fluorescein isothiocyanate(FITC) and have the same sequence. The results show that, for the unmodified ODN19 molecules, LipofectAmine and DMRIE-C can obviously improve the transfection, but no improving effect were observed in other two liposome. For the S-ODN19 transfection, all of the 4 cationic liposomes possess the observed ability to enhance the transfection, of which the LipofectAmine was more efficient than three others. The mean FITC density (5203.11) of LipofectAmine mediated transfection was several decades times comparable to the control cultures without mediated liposome. The improving effect of liposomes mediated transfection was ranked as LipofectAmine > FuGENE6 > DMRIE-C > lipofectin. Meanwhile. The experiment also suggested that, when transfection procedure was performed for about 4 hours, a high efficiency can be expected in FuGENE6 mediated oligonucleotides transfection.

Key words: Cationic liposome; Transfection; Oligonucleotide; HeLa cell

抗人 Leptin 单克隆抗体的制备、鉴定及初步应用

董秀华 赵跃然* 张建华 王郡甫 张捷 刘伟** 张彩 田志刚

(山东省肿瘤生物治疗研究中心 山东省医学科学院基础医学研究所 **放射医学研究所 济南 250062)

Leptin 是近年来发现的调节机体内分泌和能量代谢的最重要的肽类激素^[1]。它由脂肪细胞分泌后进入血液循环,与特异性运输蛋白结合,通过血脑屏障,作用于下丘脑的 Leptin 受体,促进下丘脑神经肽的分泌,或直接作用于靶细胞的 Leptin 受体,产生广泛的生物学效应^[2,3]。Leptin 具有调节食欲、能量消耗及体内脂肪贮存等生物效应。研究发现,Leptin 不仅与肥胖发生直接相关,而且与糖尿病的发生、发展及其并发症的出现关系密切。转基因动物研究显示 Leptin 高水平表达能改善糖尿病鼠的糖耐量状况,提高对胰岛素的敏感性,延迟糖代谢异常所致并发症的发生,促进糖尿病的康复^[4]。提示 Leptin 有可能用于糖尿病的治疗。为进一步探讨 Leptin 的生物学功能,我们在进行了人 Leptin 原

核、真核系统的表达及其生物学活性研究的基础上^[5,6],制备了抗人 Leptin 单克隆抗体,对其免疫学特性进行了鉴定,并通过免疫印迹、免疫组化和免疫荧光技术,对获得的单抗进行了初步应用的研究。结果报道如下。

材料与amp;方法

1. 材料

重组人 Leptin(rh-Lep)及鼠伤寒沙门氏菌由本室制备;小鼠骨髓瘤细胞 Sp2/0 由本室冻存;Leptin 标准品为美国 R&D 公司产品;BALB/c 小鼠购自山东大学动物中心;HAT、8-氮杂鸟嘌呤为 Sigma 公司产品;辣根过氧化物酶

本文 2001 年 12 月 19 日收到,2002 年 3 月 18 日接受。

* 通讯作者。