

技术与方法

EL转染试剂转染食管鳞癌细胞的条件优化

俞晓炜¹ 李婷² 李周儒¹ 王炳皓¹ 马静媛¹ 张浩洋³ 章耀³ 蔡红星^{1*}

(¹徐州医科大学基础医学院法医学教研室, 徐州 221000; ²徐州医科大学公共平台实验中心, 徐州 221000;
³徐州医科大学临床学院, 徐州 221000)

摘要 该文探讨了关于EL转染试剂转染Hsa-miR-6743质粒至食管鳞癌细胞转染效果的影响因素。以食管鳞癌细胞株Eca-109、TE-1和Eca-9706为研究对象, *GFP*标记的Hsa-miR-6743为报告基因, 通过倒置荧光显微镜检测荧光信号优化转染试剂和质粒比值。结果表明, 食管鳞癌细胞的种类影响EL转染试剂的转染效果, EL转染试剂在Eca-109细胞株中的转染效果最好, 在另外两种细胞中转染效果不佳。在Eca-109细胞株中, 转染效果最佳检测时间为转染36 h时, 细胞存活情况不受转染试剂影响。EL转染试剂与Hsa-miR-6743质粒最佳转染比例范围为1:4~1:2。EL转染试剂的转染效果受细胞种类、转染试剂与质粒比值以及转染时间的影响。

关键词 食管鳞癌细胞; 阳离子聚合物转染试剂; 基因转染; 细胞内吞; 细胞种类

Optimization of Transfection Condition of the EL Transfection Reagent in Esophageal Squamous Cells

YU Xiaowei¹, LI Ting², LI Zhouru¹, WANG Binghao¹, MA Jingyuan¹,
ZHANG Haoyang³, ZHANG Yao³, CAI Hongxing^{1*}

(¹Department of Forensic Medicine, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221000, China; ²Public Experimental Research Center, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221000, China; ³Clinical College, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221000, China)

Abstract This study aimed to explore the influencing factor on the transfection effects of EL transfection reagent, which was used to transfect Hsa-miR-6743 plasmid into esophageal squamous cells. The esophageal squamous cells Eca-109, TE-1 and Eca-9706 were chosen as the research objects. Hsa-miR-6743 marked by *GFP* (green fluorescent protein) was selected as a reporter gene. The fluorescence signals were detected by inverted fluorescence microscopy to optimize the proportion of transfection reagent and plasmid. The results turned out that the transfection efficiency of EL transfection reagent was influenced by cell types of esophageal squamous cells. The transfection efficiency of EL transfection reagent in Eca-109 cells was better than that in other two cells. The best detection time-point of the optimal transfection efficiency was at 36 h in Eca-109 cells, and cell viability was not affected by EL transfection reagent. The optimal transfection ratio of EL transfection reagent to Hsa-miR-6743 plasmid ranged from 1:4 to 1:2. The transfection efficiency of EL transfection reagent was affected by cell types, the ratio of trans-

收稿日期: 2020-06-03 接受日期: 2020-11-23

上海市法医学重点实验室暨司法部司法鉴定重点实验室开放课题(批准号: KF202004)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0516-5580717, E-mail: yccaihx1962@126.com

Received: June 3, 2020 Accepted: November 23, 2020

This work was supported by the Fund of Shanghai Key Laboratory of Forensic Science and Key Laboratory of Academy of Forensic Science (Grant No.KF202004)

*Corresponding author. Tel: +86-516-5580717, E-mail: yccaihx1962@126.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5463>

fection reagent to plasmid, and transfection time.

Keywords esophageal squamous cells; cationic polymer transfection reagent; gene transfection; endocytosis; cell type

细胞转染技术是将外源性的遗传物质导入至真核细胞内并进行基因表达的一项技术。根据对转染载体的区分, 现有的细胞转染技术可分为非病毒载体转染和病毒载体转染。其中病毒载体转染是通过病毒载体, 例如逆转录病毒或腺病毒, 将核酸分子递送至细胞中。病毒载体转染因其具有转染效率高、稳定性高、细胞毒性低的特点而被认为是最先进的转染技术, 但是病毒载体转染操作复杂, 有致癌和感染的可能性等生物安全因素而限制了其应用^[1]。为了解决这一问题, 非病毒载体被用作替代的转染方法, 非病毒载体主要包括阳离子脂质体、阳离子聚合物和阳离子肽, 虽转染效率相对较低, 但其安全性高, 操作简便, 因而被广泛运用于DNA以及RNA的转染中^[2-4]。

阳离子聚合物由于缺乏免疫原性, 在包装不同种类和大小的核酸方面具有灵活性, 因其具有易于大规模合成、便于降解等优点而被广泛用作非病毒基因载体^[5]。阳离子聚合物被运用到多种细胞的转染之中, 携带正电荷的载体通过压缩带负电荷的核酸分子, 在大多数情况下形成体积相对小且稳定的纳米复合物(polyplexes), 使核酸免受核酸酶的降解, 并且可与细胞表面蛋白多糖相互作用从而进入细胞^[6-8]。转染效率受诸多因素影响, 其中包括细胞所处周期、生长状态、铺板密度、载体的化学性质、摄取机制和细胞内递送途径、载体与质粒的配比以及质粒的纯度和浓度等^[9-10]。

在本研究中, 我们着眼于非病毒转染载体, 选择了细胞毒性低、操作灵活、易于合成的EL转染试剂, 通过探索阳离子聚合物转染试剂EL在食管鳞癌三种细胞Eca-109、Eca-9706、TE-1中的转染效果, 检测转染效果显示的最佳时间, 优化该种试剂的使用条件。本项研究可以为肿瘤细胞选择转染试剂提供更丰富的理论依据, 以期在保证转染效率的情况下获得最优的转染效果, 为之后进行细胞系的稳定转染奠定基础。

1 材料方法

1.1 细胞株与主要试剂

人食管鳞癌细胞株 Eca-109、TE-1 购自武汉

Procell公司。Eca-9706细胞株由徐州医科大学形态学实验室保存。TransIntro™ EL Transfection Reagent购自北京全式金生物技术有限公司。质粒中提试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。标记有绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP) Hsa-miR-6743质粒购自 GenePharma公司。Opti-DMEM培养基购自美国Gibco公司。RPMI 1640完全培养基和DMEM高糖培养基购自南京凯基科技有限公司。胎牛血清(fatal bovine serum, FBS)购自美国CLARK公司。CCK-8试剂购自大连美仑生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 质粒载体的扩增 用LB培养基扩大培养含有Hsa-miR-6743质粒的菌液。按照质粒中提试剂盒说明书提取并纯化质粒, 通过紫外分光光度计测定质粒的浓度和纯度。用滤膜(0.22 μm微孔)过滤除菌。

1.2.2 细胞培养 Eca-109、TE-1、Eca-9706细胞培养液成分均为RPMI 1640完全培养基(含10% FBS、1%双抗), 于37 °C、5% CO₂培养箱中培养, 每隔1~2天用0.25%胰酶消化传代。

1.2.3 细胞转染 取处于对数生长期的Eca-109、TE-1、Eca-9706细胞, 经0.25%胰酶消化, 当细胞浓度为 1×10^5 个/mL时, 接种于96孔板中(100 μL/孔)。当每孔细胞密度达到70%左右时进行转染。

转染时移去生长培养基, 用PBS清洗之后加入等量DMEM空培养基(无血清、无双抗)。

以96孔板中1孔为例:

(1) 将0.2 μg Hsa-miR-6743质粒稀释于10 μL Opti-MEM培养基中;

(2) 选取EL转染试剂(μL)与质粒Hsa-miR-6743(μg)比例分别为1:1、1:2、1:3和1:4, 即将0.2、0.4、0.6、0.8 μg Hsa-miR-6743质粒稀释于200 μL Opti-MEM培养基(该步骤用于观察不同质粒比例对Eca-109细胞转染效率的影响实验, 其余实验略过该步骤);

(3) 取0.2 μL EL转染试剂加入到稀释好的质粒中, 轻柔摇匀, 于室温静置15~20 min, 将质粒转染试剂复合物加入到细胞中。

于37 °C、5% CO₂培养箱中培养4~5 h, 更换新

鲜培养基(含10% FBS和1%双抗),继续培育。

1.2.4 转染效率测定 细胞转染后,采用倒置荧光显微镜进行拍摄,每个视野分别在可见光和488 nm激发光激发下拍照,图像处理工具为Image J,对绿色荧光强度进行统计,每次实验随机选取3个具有代表性的视野进行观察计算(实验独立重复3次)。使用荧光积分光密度(integral optical density, IOD)量化转染效果。荧光积分光密度可反映转染成功的细胞表达的GFP总强度,反映细胞转染总程度。GFP表达阳性细胞越多,荧光强度越强,表明转染成功的程度越高。

1.2.5 细胞存活率测定 细胞转染后于96孔板加入CCK-8试剂(10 μ L/孔),于37 $^{\circ}$ C细胞培养箱中孵育1 h后,使用酶标仪检测450 nm波长处吸光度值。细胞存活率=(转染孔吸光度-对照孔吸光度)/(对照孔吸光度-空白孔吸光度) \times 100%。其中实验孔含细胞、培养基、CCK-8溶液和转染试剂;对照孔含细胞、培养基、CCK-8溶液,不含转染试剂;空白孔含培养基、CCK-8溶液,不含细胞和转染试剂。

1.2.6 统计学处理 数据分析使用SPSS 22统计软件,计量数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组独立样本采用*t*检验,两组以上比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),统计差异设定为 $P<0.05$ 为差异具有统

计学意义。

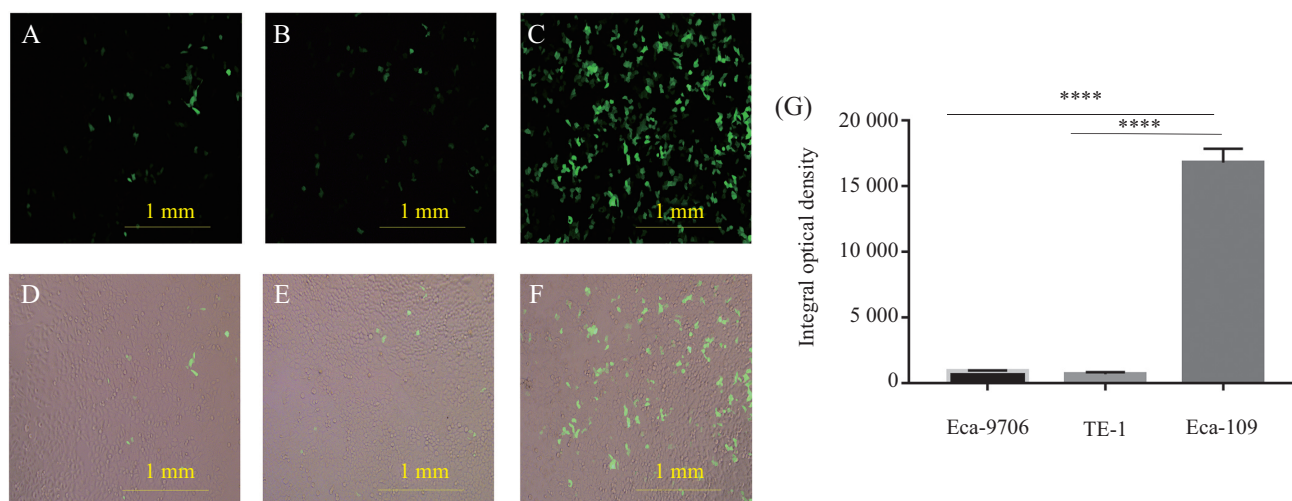
2 结果

2.1 不同食管鳞癌细胞株中的转染差异

为了观察转染细胞的种类是否会影响EL转染试剂的转染效果,将含GFP报告基因的Hsa-miR-6743质粒以EL/DNA复合体形式分别递送至Eca-109、Eca-9706和TE-1三种细胞系,阳性细胞发出明亮的绿色荧光信号。按照EL转染试剂说明书的推荐,转染24 h后,在倒置荧光显微镜下观察到的Eca-109、Eca-9706和TE-1三种细胞的细胞状态以及GFP表达情况如图1所示。三种细胞转染后的生长存活状态均未发生明显改变,Eca-9706、TE-1和Eca-109三种细胞转染后荧光积分光密度分别为900.9、682.8、16 816.3,Eca-109细胞转染程度远高于TE-1和Eca-9706细胞。

2.2 转染效果最佳观测时间

为了观察Eca-109细胞进行转染之后转染效果随时间变化的情况,本实验选取转染18、24、30、36、48、60、72、96 h时对Eca-109的转染效果进行检测,图2所示为转染后不同时间点倒置荧光显微镜下观察到的GFP表达及细胞状态照片。然后对荧光强度进行分析,荧光平均光密度(mean optical den-

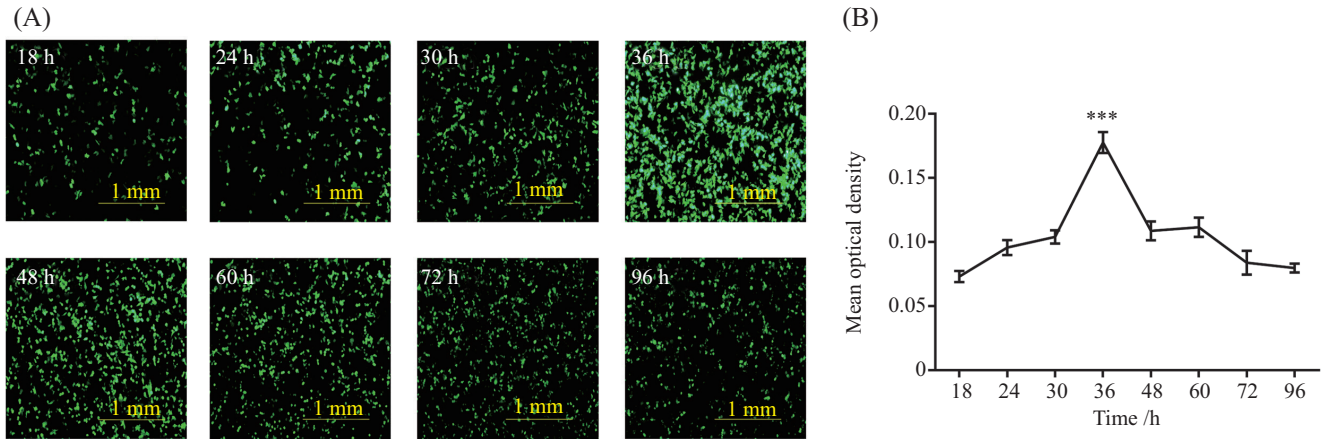


A: Eca-9706细胞GFP表达图; B: TE-1细胞GFP表达图; C: Eca-109细胞GFP表达图; D: Eca-9706细胞状态图; E: TE-1细胞状态图; F: Eca-109细胞状态图; G: 转染后Eca-9706、Eca-109以及TE-1荧光积分光密度。**** $P<0.0001$ 。

A: fluorescence microscopic image of GFP expression in Eca-9706 cells; B: fluorescence microscopic image of GFP expression in TE-1 cells; C: fluorescence microscopic image of GFP expression in Eca-109 cells; D: cell morphology of Eca-9706 cells; E: cell morphology of TE-1 cells; F: cell morphology of Eca-109 cells; G: the integral optical densities of Eca-9706, Eca-109 and TE-1 cells after transfection. **** $P<0.0001$.

图1 细胞种类对EL转染试剂转染效率的影响

Fig.1 Effects of cell types on transfection efficiency of EL transfection reagent

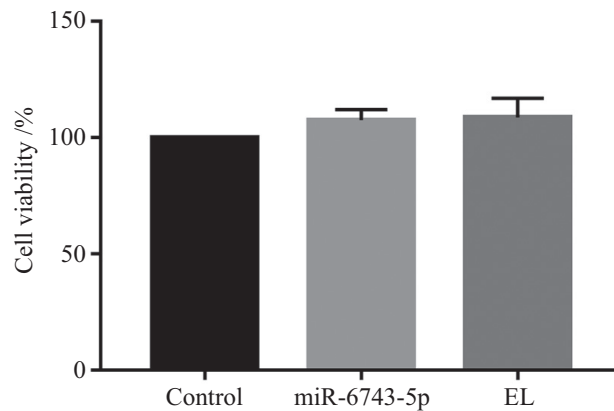


A: EL转染试剂转染miR-6743-5p后不同时间点Eca-109细胞GFP表达图; B: EL转染试剂转染miR-6743-5p后不同时间点荧光平均光密度。*** $P < 0.001$, 与其他时间点相比。

A: fluorescence microscopic images of GFP expression of miR-6743-5p transfected by EL transfection reagent at different time points in Eca-109 cells; B: fluorescence mean optical density of miR-6743-5p transfected by EL transfection reagent at different time points in Eca-109 cells. *** $P < 0.001$ compare with other time points.

图2 EL转染试剂转染miR-6743-5p后不同时间点转染效果

Fig.2 Transfection efficiency of miR-6743-5p transfected by EL transfection reagent at different time points



EL: 添加EL转染试剂组; miR-6743-5p: 添加Hsa-miR-6743-5p质粒组; control: 对照组。

EL: the group with EL transfection reagent; miR-6743-5p: the group with Hsa-miR-6743-5p plasmid; control: control group without EL transfection reagent and Hsa-miR-6743-5p plasmid.

图3 EL转染试剂对细胞存活率影响

Fig.3 Effects of EL transfection reagent on cell viability

sity, MOD)是每个细胞的GFP表达强度的指标, 对应于每个细胞转染的程度。EL转染试剂在转染18、24、30、36、48、60、72、96 h时荧光平均光密度分别为0.073、0.096、0.104、0.178、0.109、0.112、0.084、0.078, 由结果可知, EL转染试剂对Eca-109细胞转染的最佳观测时间为转染36 h时。

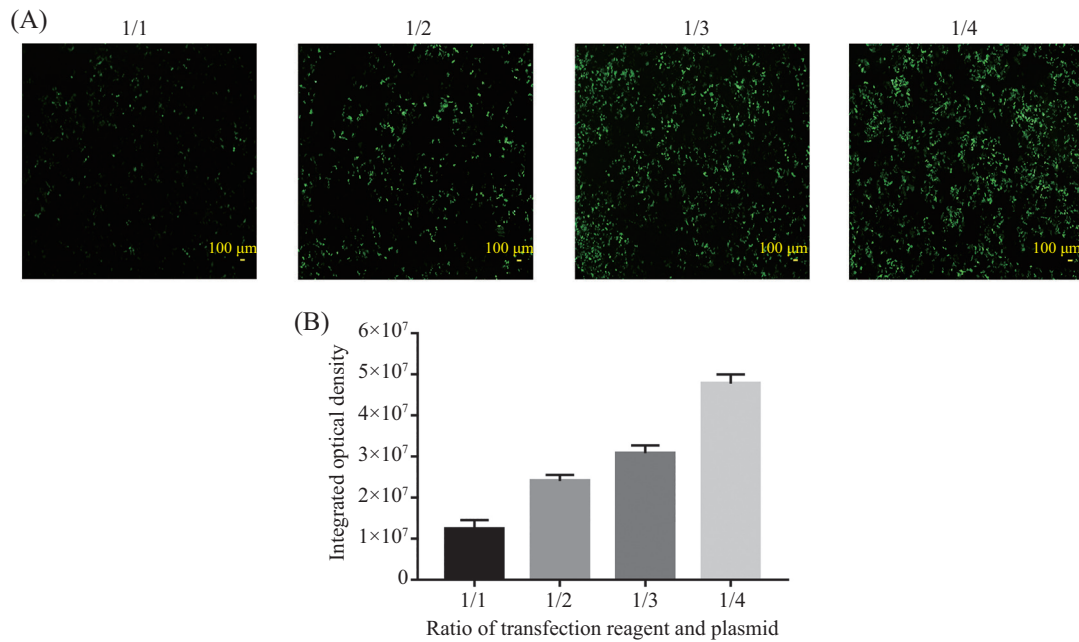
2.3 EL转染试剂对细胞存活率的影响

如图3所示, 在转染36 h时通过CCK-8检测Eca-109细胞存活率表明, 只添加EL转染试剂组细胞与

空白对照组相比存活率超过100%, 结果无统计学差异。这证明了EL转染试剂对细胞存活率无影响。

2.4 EL转染试剂与Hsa-miR-6743质粒比例对Eca-109细胞转染效率的影响

为选择合适的转染试剂与质粒的比例, 选取EL转染试剂(μL)与Hsa-miR-6743质粒(μg)比例分别为1:1、1:2、1:3和1:4, 转染入Eca-109细胞, 转染36 h后检测绿色荧光蛋白(图4A)。结果(图4B)显示, 通过荧光积分光密度定量分析, 得出当其比例为1:1、



A: EL转染试剂转染Eca-109细胞GFP表达图; B: 转染试剂与质粒不同比例转染后荧光积分光密度。1/1~1/4分别为1:1~1:4组。

A: fluorescence microscopic images of GFP expression in Eca-109 cells transfected by EL transfection reagent; B: integral optical density transfected by different ratios of transfection reagent to plasmid. 1/1-1/4 correspond to the groups of 1:1-1:4.

图4 EL转染试剂与质粒的比例对转染效果的影响

Fig.4 Effects of the ratio of EL transfection reagent to plasmid on transfection efficiency

1:2、1:3和1:4时, 荧光积分光密度分别为 1.237×10^7 、 2.403×10^7 、 3.084×10^7 和 4.777×10^7 , 由上数据可知, EL转染试剂转染效果随质粒比例的增加而增强。为保证转染效果和降低成本, 我们后期实验将选择EL转染试剂(μL)与质粒Hsa-miR-6743(μg)比例为1:2进行。

3 讨论

为了确定Eca-109、Eca-9706和TE-1三种食管鳞癌细胞株中的转染差异, 通过将含GFP报告基因的Hsa-miR-6743质粒以EL/DNA复合物形式递送至三种细胞系中, 比较转染后细胞表达的荧光积分光密度, 可知与Eca-9706、TE-1细胞相比, Eca-109细胞更容易被转染。如前所述, IOD其定义为测量标本结构范围内各个像素点光密度之和, 在本文中荧光积分光密度是指已转染和转录成功的细胞发出的绿色荧光总强度。因此, Eca-109细胞转染效果比另外两种细胞更高的这一事实, 表明Eca-109细胞可能在吸收EL/DNA复合体以及运输这些复合物和/或转录DNA的效率比另外两种细胞更高。有研究表明, 转染细胞的种类会影响转染试剂介导的转染效率,

但其具体原因尚不清楚^[6]。考虑阳离子转染色剂原理是带正电的阳离子聚合物通过静电相互作用与带负电的基因(DNA以及RNA)形成载体/核酸复合物, 如图5所示, 这些纳米级别的复合物颗粒主要是通过胞吞作用形成内涵体(endosome)进入细胞, 核酸从内涵体释放至细胞质中, 通过膜受体进入细胞核内进行转录、翻译^[6,11-12]。我们从三个方面分析其可能原因, 在Eca-9706、TE-1细胞中, (1) EL/DNA复合物难以逃脱溶酶体的降解; (2) EL/DNA复合物难以在细胞质中运输; (3) EL/DNA复合物难以进入细胞核。

在Eca-9706、TE-1细胞中观察到较慢内化的一个可能原因可能是由于它们过量产生黏蛋白^[13]。之前相关转染研究表明, 黏蛋白可能成为基因传递和复合物颗粒摄取的物理屏障, 因为它们倾向于与局部培养基中的阳离子聚合物/DNA复合物结合并诱导聚集体形成。黏蛋白通常可以通过破坏聚阳离子聚合物和聚阴离子DNA之间的静电相互作用来诱导聚合复合物的增加聚集^[14]。因此, 黏蛋白与EL/DNA复合物在Eca-9706、TE-1细胞中的相互作用可能导致这些复合物聚集到足以产生足够的溶酶体膜

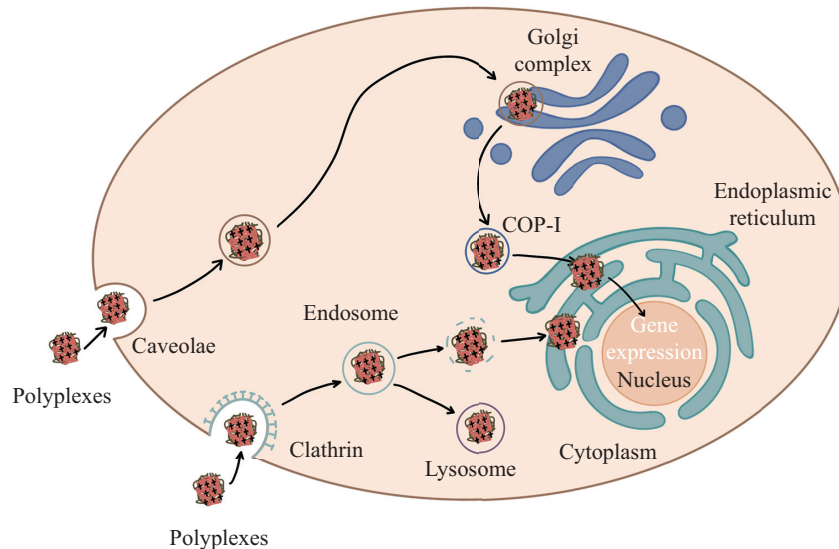


图5 阳离子聚合物/DNA的内吞作用和细胞内运输步骤示意图

Fig.5 Endocytosis and intracellular trafficking steps of cationic polymer-DNA

透化作用的点,使已经递送到Eca-9706、TE-1细胞中的EL/DNA复合物颗粒在内涵体逃逸后于细胞质中被捕获,无法进入细胞核的复合物而后被降解。

成功内化到细胞后,阳离子聚合物/DNA复合物必须通过胞吞途径才能进入细胞质,然后被转运至细胞核。复合物的内化通常由网格蛋白和小窝蛋白介导的胞吞作用产生。胞吞作用越强,细胞的转染效率越高^[3,9]。有研究通过使用药物内吞抑制剂和共聚焦显微镜分析,发现小窝蛋白/筏介导的内吞作用是导致阳离子聚合物核转运和有效表达的主要途径^[11-12,15]。细胞在有丝分裂间期摄入阳离子聚合物转染试剂的量高于有丝分裂期。细胞所处分裂间期不同,胞吞作用不同,导致转染效率也不同^[6,16-17]。

另外,EL转染试剂说明书中对于转染的最佳观测时间建议为转染24 h时,由于相关实验项目此时间点检测效果不佳,于是我们通过量化荧光强度,得到经过EL转染试剂转染Hsa-miR-6743质粒的Eca-109细胞转染效果检测最佳的时间点为转染36 h时,并且在此时间点,EL转染试剂对Eca-109细胞生存率未产生影响,因而,我们后续相关实验将会选择此时间点进行。本研究表明,EL转染试剂与转染质粒的比例为1:4~1:2时形成的纳米颗粒,转染效果较好,与试剂说明书所推荐使用量相符。

我们目前的工作优化了EL转染试剂转染Hsa-miR-6743质粒的条件,可为转染食管鳞癌肿瘤细胞载体的选择提供依据。

参考文献 (References)

- [1] WANG J, YE X, NI H, et al. Transfection efficiency evaluation and endocytosis exploration of different polymer condensed agents [J]. *DNA Cell Biol*, 2019, 38(10): 1048-55.
- [2] 杨天赐, 陈明桥, 黄革玲. 新一代阳离子聚合物转染试剂(梭华-Sofast)转染效果研究[J]. *厦门大学学报(自然科学版)* (YANG T C, CHEN M Q, HUANG G L. Study on the transfection efficiency of the new cationic polymer transfection reagent: Sofast [J]. *Journal of Xiamen University, Nature Science*), 2004, 21(4): 572-7.
- [3] DAS J, HAN J W, CHOI Y J, et al. Cationic lipid-nanoceria hybrids, a novel nonviral vector-mediated gene delivery into mammalian cells: investigation of the cellular uptake mechanism [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 29197.
- [4] LUO H C, LI N, YAN L, et al. Comparison of the cellular transport mechanism of cationic, star-shaped polymers and liposomes in HaCat cells [J]. *Nanomedicine*, 2017, 12: 1085-96.
- [5] HE B, WANG Y, SHAO N, et al. Polymers modified with double-tailed fluororous compounds for efficient DNA and siRNA delivery [J]. *Acta Biomater*, 2015, 22: 111-9.
- [6] BROWN M D, SCHÄTZLEIN A G, UCHEGBU I F. Gene delivery with synthetic (non viral) carriers [J]. *Pharm*, 2001, 229(1/2): 1-21.
- [7] 张颖, 周志平. 阳离子聚合物基因载体: 进展与展望[J]. *应用化工* (ZHANG Y, ZHOU Z P. Polycations for gene delivery: progress and perspective [J]. *Appl Chem Ind*), 2018, 47(1): 145-9,54.
- [8] KUMAR P, NAGARAJAN A, UCHIL P D. DNA transfection mediated by cationic lipid reagents [J]. *Cold Spring Harb Protoc*, 2019, doi: 10.1101/pdb.prot095414.
- [9] 赵铁男, 张树彪, 崔韶晖, 等. 阳离子脂质体介导基因转染肿瘤细胞[J]. *中国细胞生物学学报* (ZHAO Y N, ZHANG S B, CUI S H, et al. Cationic liposome mediated gene transfection of tumor cells [J]. *Chinese Journal Cell Biology*), 2013, 35(10): 1459-64.

- [10] LIU H, YANG Z, XUN Z, et al. Nuclear delivery of plasmid DNA determines the efficiency of gene expression [J]. *Cell Biol Int*, 2019, 43(7): 789-98.
- [11] MCLENDON P M, FICHTER K M, REINEKE T M. Poly (glycoamidoamine) vehicles promote pDNA uptake through multiple routes and efficient gene expression via caveolae-mediated endocytosis [J]. *Mol Pharm*, 2010, 7(3): 738-50.
- [12] FICHTER K M, INGLE N P, MCLENDON P M, et al. Polymeric nucleic acid vehicles exploit active interorganelle trafficking mechanisms [J]. *ACS Nano*, 2013, 7(1): 347-64.
- [13] 金文波, 周乃康, 郑梦利, 等. 黏蛋白-1和细胞角蛋白-20在食管癌中的表达及意义[J]. *肿瘤研究与临床*(JIN W B, ZHOU N K, ZHENG M L, et al. Expressions and clinical significances of MUC1-mRNA and CK20-mRNA in esophageal cancer [J]. *Cancer Res Clin*), 2011, 25(4): 237-9.
- [14] FLOREA B I, MEANEY C, JUNGINGER H E, et al. Transfection efficiency and toxicity of polyethylenimine in differentiated Calu-3 and nondifferentiated COS-1 cell cultures [J]. *AAPS Pharm Sci*, 2002, 4(3): E12.
- [15] VAN BRUGGEN C, HEXUM J K, TAN Z, et al. Nonviral gene delivery with cationic glycopolymers [J]. *Acc Chem Res*, 2019, 52(5): 1347-58.
- [16] INOH Y, NAGAI M, MATSUSHITA K, et al. Gene transfection efficiency into dendritic cells is influenced by the size of cationic liposomes/DNA complexes [J]. *Pharm Sci*, 2017, 102: 230-6.
- [17] PRASAD T K, RANGARAJ N, RAO N M. Quantitative aspects of endocytic activity in lipid-mediated transfections [J]. *FEBS Lett*, 2005, 579(12): 2635-42.