

大质粒转染人源心室肌Ac16细胞条件探究

李亚欢 范承昊 向晨莹 廉虹*

(中国医学科学院, 北京协和医学院, 国家心血管病中心, 阜外医院, 动物实验中心,
心血管植入材料临床前研究评价北京市重点实验室, 北京 102300)

摘要 该研究主要针对大质粒转染人源心室肌Ac16细胞的方式及最适条件进行摸索。采用人源心室肌Ac16细胞作为研究模型, 分别用Lip3000转染、核酸脂质体(Hieff Trans™ Liposomal)转染和慢病毒转染三种方法将外源大质粒pLenti-CasRx-EGFP导入Ac16细胞中, 通过统计表达绿色荧光蛋白的阳性细胞比例, 分析外源基因的转染效率, 探索大质粒pLenti-CasRx-EGFP的最佳转染方式和转染条件。结果表明, Lip3000转染Ac16细胞的最适转染条件为: 质粒与Lip3000的比例为1:2; 核酸脂质体转染Ac16细胞的最适条件为: 质粒与脂质体的比例为1:3; 慢病毒感染Ac16细胞的最适MOI值为200; 通过比较三种转染方式的转染效率发现慢病毒的转染效率最高。最后得出大于10 Kb的大型质粒(pLenti-CasRx-EGFP)转染人源心室肌Ac16细胞最适合的方式是利用慢病毒转染, 最佳MOI值为200。

关键词 Ac16细胞; 转染; CasRx

Study on the Condition of Transfection of Human Ventricular Muscle Ac16 Cells with Large Plasmid

LI Yahuan, FAN Chenghao, XIANG Chenying, LIAN Hong*

(Beijing Key Laboratory of Preclinical Research and Evaluation of Cardiovascular Implant Materials,
Animal Experiment Center, Fuwai Hospital, National Center for Cardiovascular Diseases,
Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing 102300, China)

Abstract The aim of this study was to explore the transfection method and optimum condition of large plasmid transfecting human ventricular muscle Ac16 cell. The plasmid pLenti-CasRx-EGFP was transfected into Ac16 cells by three methods: Lip3000 transfection, Hieff Trans™ Liposomal transfection and lentivirus transfection. The transfection efficiency of exogenous gene was determined by analyzing the proportion of positive cells expressing EGFP. Finally, the optimal transfection method and transfection condition of large plasmid pLenti-CasRx-EGFP was explored. For Ac16 cells, the optimum transfection ratio of plasmid to Lip3000 was 1:2; the optimal transfection ratio of plasmid to Hieff Trans™ Liposomal transfection was 1:3; the optimal MOI value infected with lentivirus was 200. The transfection efficiency of lentivirus was the highest by comparing the efficiency of the three transfection methods. It is concluded that lentivirus is the most suitable method for transfection the large plasmid (pLenti-CasRx-EGFP) larger than 10 Kb into Ac16 cells with MOI of 200.

Keywords Ac16 cells; transfection; CasRx

收稿日期: 2021-09-28 接受日期: 2021-11-29

国家自然科学基金(批准号: 81900343)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13651388926, E-mail: lianhong@fuwaihospital.org

Received: September 28, 2021 Accepted: November 29, 2021

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81900343)

*Corresponding author. Tel: +86-13651388926, E-mail: lianhong@fuwaihospital.org

在心血管疾病研究领域, 基于心肌细胞所开展的相关基因表达、信号转导、细胞增殖及细胞凋亡等研究在揭示心脏疾病的发病机制和发现潜在治疗靶点等方面起着不可替代的作用^[1]。然而心肌细胞在退出细胞周期后形成终末分化细胞, 丧失增殖能力^[2]。与其他肌细胞如骨骼肌不同, 心肌细胞没有能在损伤时增殖的卫星细胞, 不具有持续增殖的能力, 因此, 在体外培养寿命有限^[3]。体内分离的原代心肌细胞体外培养仅能维持数周, 细胞的形态和功能随着时间的推移也会发生变化, 除此之外, 还会产生异质性细胞群, 不利于后续的实验研究^[4]。因此, 建立永生化心肌细胞系对于心脏疾病机制的研究至关重要。

2005年, 研究人员将人源心室心肌细胞与经过SV40转化的无线粒体DNA的成纤维细胞融合而构建出Ac16细胞系, 该细胞系不仅能够在体外稳定增殖, 同时还具有心肌细胞的超微结构及其分子遗传和免疫细胞等化学特征^[5]。目前此细胞系已经被用于多个方面的研究。2012年MAHMOODZADEH等^[6]在 *Cardiovascular Research* 发表文章, 利用Ac16细胞研究NPPA与E2/ER α 的相互作用; 2018年ZHANG等^[7]在 *Circulation* 发表文章, 利用Ac16细胞分析比较SIRT3^{-/-}和miRNA-195过表达的乙酰化水平; 2020年PALOMER等^[8]在 *Signal Transduction and Targeted Therapy* 发表文章, 利用Ac16细胞研究SIRT3在心脏炎症和纤维化中的作用; 2021年YAO等^[9]在 *EMBO Molecular Medicine* 发表文章, 利用Ac16细胞发现miR-574可调节FAM210A的表达, 进而影响心力衰竭时的心脏重塑; 2021年TSENG等^[10]在 *Small* 发表文章, 利用Ac16细胞研究超分子纳米颗粒包装的Cas9-sgRNA核糖核蛋白复合物在细胞中的传递情况。

综上所述, Ac16细胞是研究心脏疾病致病机制及药理条件探索的一个有利的体外细胞模型, 已经被广泛应用于心血管疾病研究中。高效转染Ac16细胞的条件摸索对于基于此细胞系进行科学研究的研究者来说非常重要, 因此本研究主要围绕Ac16细胞的转染方式进行探索。

1 材料与方法

1.1 材料

Ac16细胞由本实验室保存; *pLenti-CasRx-EGFP*质粒, 其分子量大小为12 991 bp, 慢病毒包装

的相关质粒*PMD2.G*、*psPAX2*均来自于本实验室; 脂质体核酸转染试剂盒(Hieff TransTM Liposomal)购买于上海翊圣生物科技有限公司; Lip3000转染试剂盒购买于美国Gibco公司。

1.2 细胞培养

将冻存的成人心室肌细胞Ac16从液氮中取出, 置于37℃细胞复苏仪中复苏细胞, 将复苏的Ac16细胞用含有10%胎牛血清的DMEM的培养基进行重悬, 随后置于37℃、5% CO₂培养箱中培养。

1.3 细胞转染

1.3.1 Lip3000转染 转染前24 h将细胞种于12孔板(2×10⁵个/孔), 并于细胞密度80%左右进行质粒转染。为了探究*pLenti-CasRx-EGFP*质粒转染Ac16细胞的最适条件, 我们将质粒的量固定为3 μ g, 设置NC组, 质粒质量与Lip3000体积比分别是1:1、1:2、1:3和1:4, 共五组。根据转染增强剂p3000的浓度为2 μ L/ μ g, 每组分别加入一定比例的p3000。

转染方法如下: 用Opti-MEM无血清培养基各50 μ L, 分别稀释一定比例的Lip3000和相应浓度的质粒与p3000的混合物, 室温放置5 min后, 将二者轻轻吹打混匀, 室温静置15 min后加入12孔板, 摇匀后于37℃、5% CO₂培养箱中培养6~9 h后更换新鲜的培养基, 48 h后在荧光显微镜下观察转染情况, 进行拍照。

1.3.2 核酸脂质体(Hieff TransTM Liposomal)转染 同样如1.3.1方法进行细胞种板, 转染前24 h将细胞种于12孔板, 待细胞密度达到80%左右, 利用Hieff TransTM Liposomal转染。为了探究转染的合适条件, 转染质粒3 μ g, 加入不同比例的脂质体, 设计不同的分组, 分组情况如下: NC组, 转染质粒质量与脂质体体积比为1:1、1:2、1:3、1:4、1:5, 共6组。

转染方法如下: 用Opti-MEM无血清培养基各100 μ L, 分别稀释一定比例的脂质体和相应浓度的质粒, 室温放置5 min后, 将二者轻轻吹打混匀, 室温静置20 min后加入12孔板, 摇匀后于37℃、5% CO₂培养箱中培养6~9 h, 更换新鲜的培养基, 48 h后在荧光显微镜下观察转染情况, 进行拍照。

1.3.3 慢病毒包装及转染 采用二代慢病毒包装系统, 将*pLenti-CasRx-EGFP*和编码病毒包膜以及外壳的质粒*PMD2.G*和*psPAX2*通过脂质体共转入HEK293T细胞中, 进行慢病毒的自组装, 分别在转染后48 h和72 h两个时间点收集上清, 并将两次收集到的上清进

行混合后冻于-80℃,即为粗病毒。随后将293T细胞按每孔 1×10^6 个细胞接种于6孔板中,待细胞密度达到70%~90%时,按病毒原液250 μL、500 μL、1 000 μL、2 000 μL将病毒加入293T细胞。感染48 h后收集细胞,用流式细胞仪检测EGFP阳性率。选取荧光比例为10%~20%的孔,按如下公式进行病毒滴度计算:

$$\text{病毒滴度(TU/mL)} = \frac{\text{感染时293T细胞数} \times \text{EGFP细胞阳性率} \% \times \text{稀释倍数}}{\text{加入病毒体积(mL)}}$$

测定包装得到的慢病毒滴度。根据公式计算所需添加的病毒量:

$$\text{MOI值} = \frac{\text{病毒滴度 (TU/mL)} \times \text{病毒体积 (mL)}}{\text{细胞个数}}$$

探究Ac16细胞最合适的病毒MOI值,设计不同MOI值即25、50、100、200、400,计算相应病毒含量,感染Ac16细胞,72 h后在荧光显微镜下观察慢病毒感染情况。

1.4 统计学分析

所有统计分析均采用GraphaPad Prism 8.0软件进行。 $P<0.05$ 表示具有统计学差异。

2 结果与分析

2.1 Lip3000转染

将pLenti-CasRx-EGFP质粒、对应的Lip3000和相应量的转染增强剂p3000共转染到Ac16细胞,培养48 h后在倒置荧光显微镜下观察带有绿色荧光的细胞并进行拍照(图1)。转染结果显示:与NC组相比,转染质粒与Lip3000比例为1:3荧光数量占比最多,其转染效率为23.33%。

2.2 Hieff Trans™ Liposomal转染

同样转染3 μg质粒,根据转染质粒质量与脂质体体积比为1:1、1:2、1:3、1:4、1:5分组进行转染,结果(图2)表明:当质粒与脂质体的比例为1:3时的转染效率最高为7.33%;当提高脂质体核酸转染试剂的量时,由于脂质体本身的毒性过大,造成细胞在转染6 h后出现大量细胞死亡,因此造成转染效率过低。

2.3 慢病毒制备及滴度测定

根据二代慢病毒包装系统要求进行慢病毒的包装,将pLenti-CasRx-EGFP和病毒包装质粒PMD2.G和psPAX2通过脂质体共转293T细胞,进行粗病毒包装。分别在转染后48 h和72 h两个时间点收集上

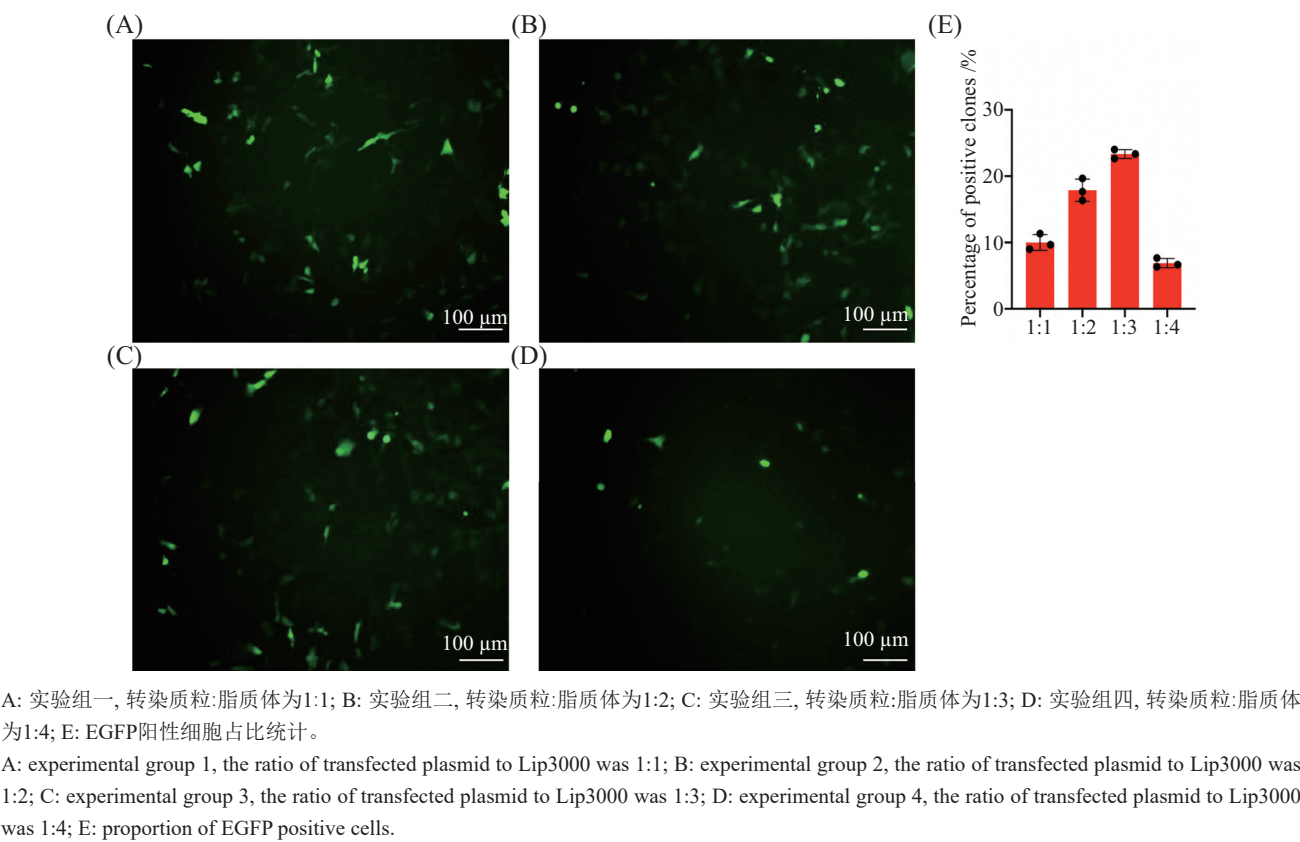
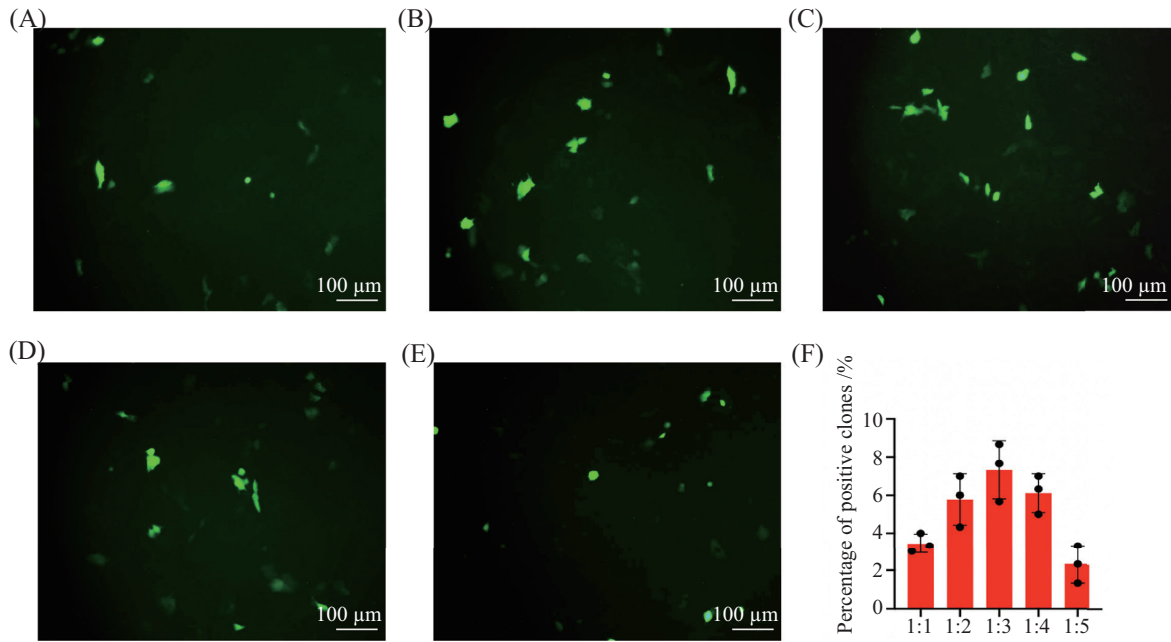


图1 Lip3000转染Ac16细胞效率分析
Fig.1 Efficiency analysis of Lip3000 transfected Ac16 cells



A: 质粒与脂质体的比例1:1组; B: 质粒与脂质体的比例1:2组; C: 质粒与脂质体的比例1:3组; D: 质粒与脂质体的比例1:4组; E: 质粒与脂质体的比例1:5组; F: EGFP阳性细胞占比统计。

A: the ratio of transfected plasmid to liposome was 1:1; B: the ratio of transfected plasmid to liposome was 1:2; C: the ratio of transfected plasmid to liposome was 1:3; D: the ratio of transfected plasmid to liposome was 1:4; E: the ratio of transfected plasmid to liposome was 1:5; F: proportion of EGFP positive cells.

图2 Hieff Trans™ Liposomal转染Ac16细胞效率分析

Fig.2 Efficiency analysis of Hieff Trans™ Liposomal transfected Ac16 cells

清, 并将两次上清进行混合后冻于 -80°C , 即为粗病毒。制备粗病毒转染293T细胞, 依次加入250 μL 、500 μL 、1 000 μL 、2 000 μL 不同浓度的粗病毒(图3), 通过流式分析EGFP阳性率分别为3.6%、7.8%、13.7%、21.8%, 即病毒的滴度值为 1×10^5 TU/mL。

2.4 慢病毒感染

根据制备粗病毒的滴度, 设计感染病毒的不同MOI值, 即25、50、100、200进行6孔板细胞的感染, 72 h后进行荧光倒置显微镜拍照及进行阳性细胞统计(图4), 结果表明, Ac16细胞进行慢病毒感染的最适MOI值为200, 此条件下其转染效率为64.33%。

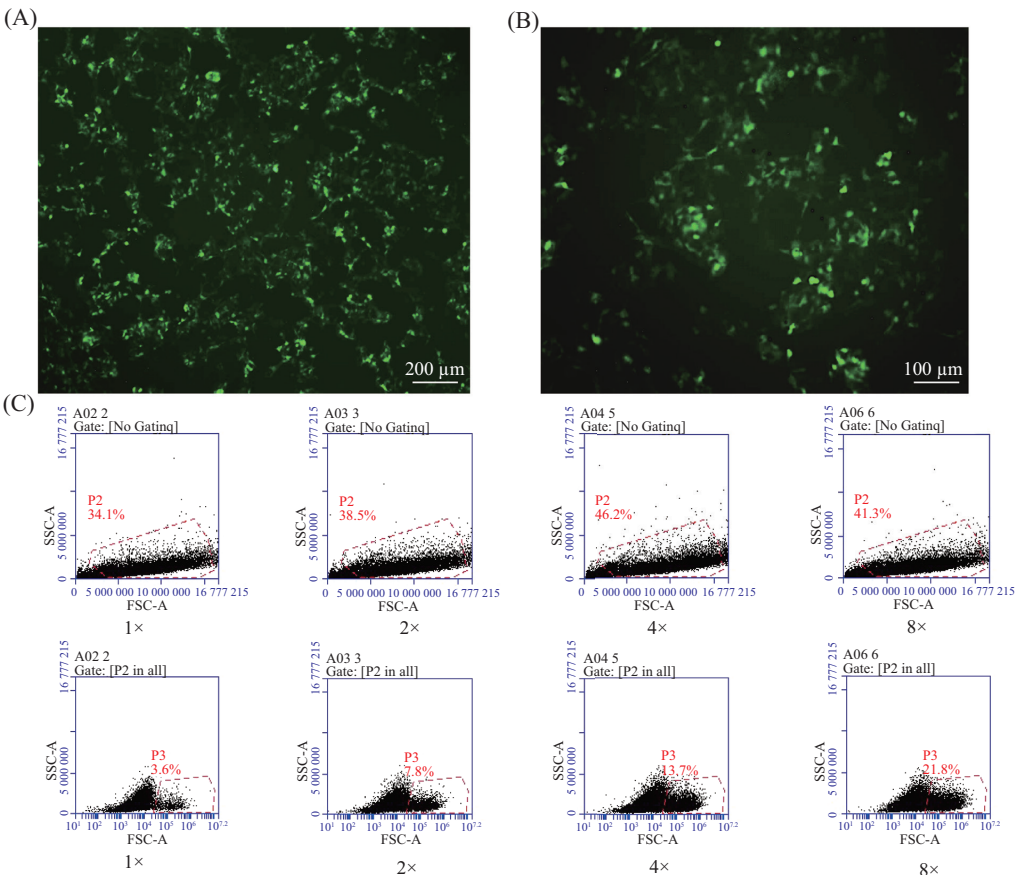
3 讨论

心血管疾病已经成为危害人类健康的重要病因之一, 对于心血管疾病的病理和致病机制的研究越来越受到关注^[11]。但对于心血管研究最困难的因素之一是心肌细胞不能够在体外进行无限次数的增殖, 而开发的Ac16细胞, 其具有稳定增殖的特性, 并且具有心肌细胞的超微结构、分子遗传学和免疫细胞化学特征, 是用来代替原代心肌细胞, 用于体外研究的一个有利的细胞模型^[5]。为了解Ac16细胞在进

行体外转染及抗生素使用方面的特性, 我们通过进行不同的外界质粒转入的方法进行实验探究。

外源基因导入细胞一般有三种方式: 电穿孔/显微注射等物理方法、阳离子脂质体介导的化学方法和病毒介导的生物方法^[12]。脂质体介导的化学方法的原理是: 利用阳离子与带阴离子的DNA相结合, 形成稳定的复合物后, 通过细胞的内存作用进入细胞质, 实现目的基因的瞬时表达^[13]。因此对于小于10 Kb的DNA分子, 其与脂质体形成的复合物相对较均匀, 与细胞膜融合度较高, 并且相对于慢病毒转染来说操作更加简单。综合考虑, 对于小于10 Kb的DNA分子转染一般采用阳离子脂质体介导的转染系统^[14]。因此本研究主要针对大于10 Kb的DNA分子转染Ac16细胞的最合适的转染方式进行探索。

本研究选用化学方法中的脂质体转染及病毒转染的生物方法从转染效率及细胞毒性方面探索针对大于10 Kb的质粒转染Ac16细胞的最适合方式。结果表明, 从转染效率的角度分析, 慢病毒的转染效率最高, 72 h之后基本上所有的细胞均表达绿色荧光蛋白, 而对于化学方法转染, 在最合适的范围内, Lip3000的转染效率明显高于Hieff Trans™ Liposo-

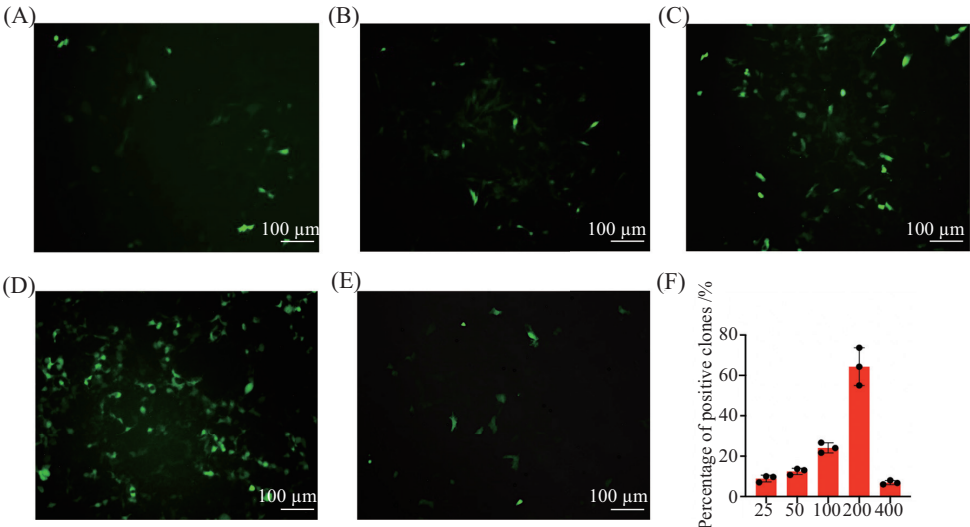


A: 荧光显微镜50倍下293T细胞包被慢病毒时EGFP的表达情况; B: 荧光显微镜100倍下293T细胞包被慢病毒时EGFP的表达情况; C: 不同浓度慢病毒感染293T细胞后, 流式细胞仪检测EGFP的阳性细胞率。

A: expression of EGFP in 293T cells coated with lentivirus under fluorescence microscope at 50 times; B: expression of EGFP in 293T cells coated with lentivirus under fluorescence microscope at 100 times; C: EGFP positive rate was detected by flow cytometry after 293T cells were infected with different concentrations of lentivirus.

图3 慢病毒滴度检测

Fig.3 Lentivirus MOI detection



A: 转染病毒MOI值为25; B: 转染病毒MOI值为50; C: 转染病毒MOI值为100; D: 转染病毒MOI值为200; E: 转染病毒MOI值为400; F: EGFP阳性细胞占比。

A: MOI was 25; B: MOI was 50; C: MOI was 100; D: MOI was 200; E: MOI was 400; F: proportion of EGFP positive cells.

图4 慢病毒感染细胞效率分析

Fig.4 Efficiency analysis of lentivirus transfection Ac16 cells

mal试剂。慢病毒相较于脂质体转染效率高, 主要是因为病毒载体进入宿主细胞的方式不同, 病毒主要是通过通过与细胞膜表面的蛋白相结合, 改变细胞膜的结构, 从而能够高效地进入宿主细胞, 并将目的基因整合到宿主细胞的基因组中, 实现目的基因的稳态表达, 并且病毒同样可以感染正在分裂的细胞, 这也是病毒转染效率高的原因之一。而脂质体转染的化学方法是利用细胞膜的内吞作用, 使包裹目的基因的脂质体进入细胞质中, 实现目的基因表达的。其转染效率受到脂质体-DNA复合物与细胞膜融合程度影响, 因此针对不同的脂质体, 转染效率也不尽相同^[15]。本研究中Lip3000比Hieff Trans™ Liposomal试剂转染效率略高的原因, 可能是在Lip3000试剂盒中添加了一种促进脂质体与DNA相融合的转染增强剂(p3000), 在一定程度上增强了转染效率。

RNA干扰长期以来一直被用作特定基因沉默的有力工具, 其优势在于可操作性强, 但其稳定性、效率、特异性和可重复性等因素, 限制了其在许多生物系统中的应用^[16-17]。Cas13系统作为基因敲除的新型研究工具已成功被用于生物体的特异性RNA敲低。另外, 并且无核酸酶活性的dCas13保留了与RNA结合的能力, 作为可编辑的RNA结合蛋白, 使得各种RNA操作如编辑、修改、可视化成为可能^[18-20]。目前, 最新报道的Cas13d家族, RfxCas13d(CasRx)有着比Cas13a、Cas13b更高效的剪切效率, 且极低的脱靶效率, 以及适合包装病毒应用于体内的基因干扰和临床治疗等优势 and 前景, 受到很高的关注^[21-23]。本研究中, 探索表达CasRx的质粒转染Ac16细胞的合适转染方式, 为今后将CasRx系统应用到心肌细胞中实现特定基因的敲低提供一定的技术支持。

本研究结果证明, 大于10 Kb的质粒转染Ac16细胞最高效的方法是慢病毒转染法, 此方法具有高效转染、稳定表达、可长期观察等特征; 而构建短期表达外源基因时, 可选用Lip3000脂质体转染方法, 条件为质粒3 μg 和脂质体6 μL , 此方法具有操作简单、价格低廉的优势。以上结论为心血管领域利用人源心室肌Ac16细胞进行病理和致病机制研究提供了可靠的方法学指导。

参考文献 (References)

[1] ALI S R, MONTES I M, WARSHAW J, et al. Homotypic fusion generates multinucleated cardiomyocytes in the murine heart [J].

Circulation, 2020, 141(23): 1940-2.

[2] LI Y, FENG J, SONG S, et al. Gp130 controls cardiomyocyte proliferation and heart regeneration [J]. Circulation, 2020, 142(10): 967-82.

[3] BEISAW A, KUENNE C, GUENTHER S, et al. AP-1 contributes to chromatin accessibility to promote sarcomere disassembly and cardiomyocyte protrusion during zebrafish heart regeneration [J]. Circ Res, 2020, 126(12): 1760-78.

[4] LEACH J P, HEALLEN T, ZHANG M, et al. Hippo pathway deficiency reverses systolic heart failure after infarction [J]. Nature, 2017, 550(7675): 260-4.

[5] DAVIDSON M M, NESTI C, PALENZUELA L, et al. Novel cell lines derived from adult human ventricular cardiomyocytes [J]. J Mol Cell Cardiol, 2005, 39(1): 133-47.

[6] MAHMOODZADEH S, PHAM T H, KUEHNE A, et al. 17 β -estradiol-induced interaction of ER α with NPPA regulates gene expression in cardiomyocytes [J]. Cardiovascular Res, 2012, 96(3): 411-21.

[7] ZHANG X, JI R, LIAO X, et al. MicroRNA-195 regulates metabolism in failing myocardium via alterations in Sirtuin 3 expression and mitochondrial protein acetylation [J]. Circulation, 2018, 137(19): 2052-67.

[8] PALOMER X, ROMAN-AZCONA M S, PIZARRO-DELGADO J, et al. SIRT3-mediated inhibition of FOS through histone H3 deacetylation prevents cardiac fibrosis and inflammation [J]. Signal Transduct Target Ther, 2020, 5(1): 14.

[9] WU J, VENKATA SUBBAIAH K C, JIANG F, et al. MicroRNA-574 regulates FAM210A expression and influences pathological cardiac remodeling [J]. EMBO Mol Med, 2021, 13(2): e12710.

[10] BAN Q, YANG P, CHOU S J, et al. Supramolecular nanosubstrate-mediated delivery for CRISPR/Cas9 gene disruption and deletion [J]. Small, 2021, 17(28): e2100546.

[11] 刘真, 杨志玲, 刘晓艳. 新生SD大鼠心肌成纤维细胞的原代培养方法[J]. 中西医结合心脑血管病杂志(LIU Z, YANG Z L, LIU X Y. Primary culture of myocardial fibroblasts from newborn SD rats [J] Chinese Journal of Integrative Medicine on Cardio-/Cerebrovascular Disease), 2021, 19(5): 3.

[12] 叶双梅, 阚淳一, 杨丽兰, 等. 人外周血单核细胞3种不同转染方法的比较[J]. 华中科技大学学报: 医学版(YE S M, KAN C Y, YANG L L. Comparison of three different transfection methods of human peripheral blood mononuclear cells [J]. Acta Med Univ Sci Technol Huazhong), 2011, 40(2): 196-9.

[13] DALBY B, CATES S, HARRIS A, et al. Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications [J]. Methods, 2004, 33(2): 95-103.

[14] SCHIMROSCZYK K, SONG Y H, VYKOUKAL J, et al. Liposome-mediated transfection with extract from neonatal rat cardiomyocytes induces transdifferentiation of human adipose-derived stem cells into cardiomyocytes [J]. Scand J Clin Lab Invest, 2008, 68(6): 464-72.

[15] 刘晓昌, 赵英华, 杨子松, 等. 慢病毒介导重组质粒转染兔下颌骨髓间充质干细胞[J]. 中国组织工程研究(LIU X C, ZHAO Y H, YANG Z G, et al. Human nerve growth factor beta-modified bone marrow mesenchymal stem cells from the rabbit mandible by transfection of lentiviral vectors [J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Resea), 2014, 18(37): 5911-5.

- [16] GILBERT L A, LARSON M H, MORSUT L, et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes [J]. *Cell*, 2013, 154(2): 442-51.
- [17] BIRMINGHAM A, ANDERSON E M, REYNOLDS A, et al. 3' UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets [J]. *Nat Methods*, 2006, 3(3): 199-204.
- [18] YI W, LI J, ZHU X, et al. CRISPR-assisted detection of RNA-protein interactions in living cells [J]. *Nat Methods*, 2020, 17(7): 685-8.
- [19] XU D, CAI Y, TANG L, et al. A CRISPR/Cas13-based approach demonstrates biological relevance of vlinc class of long non-coding RNAs in anticancer drug response [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 1794.
- [20] ZHAO J, LIB, MA J, et al. Photoactivatable RNA N(6)-methyladenosine editing with CRISPR-Cas13 [J]. *Small*, 2020, 16(30): e1907301.
- [21] KONERMANN S, LOTFY P, BRIDEAU N J, et al. Transcriptome engineering with RNA-targeting type VI-D CRISPR effectors [J]. *Cell*, 2018, 173(3): 665-76.
- [22] YAN W X, CHONG S, ZHANG H, et al. Cas13d is a compact RNA-targeting type VI CRISPR effector positively modulated by a WYL-domain-containing accessory protein [J]. *Mol Cell*, 2018, 70(2): 327-39.
- [23] ZHANG C, KONERMANN S, BRIDEAU N J, et al. Structural basis for the RNA-guided ribonuclease activity of CRISPR-Cas13d [J]. *Cell*, 2018, 175(1): 212-23, e217.