

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.07.047

外源基因转染细胞技术的研究进展*

王月丽 魏继楼 程红蕾 刘芳 罗素梅 王若雨[△]

(大连大学附属中山医院肿瘤科 辽宁 大连 116001)

摘要:细胞转染技术是分析细胞内基因及基因产物功能的重要工具。它不仅是基因功能研究、基因免疫的理论和技術基础,也是研究基因表达调控、突变分析等的常规工具。同时也是体内应用的重要过程,比如基因治疗、疫苗接种、药物开发等。在过去的40年里,已开发了多种外源基因转染细胞的方法。主要包括以病毒介导的外源基因转染细胞方法和非病毒介导的细胞转染方法。其具体可细分为三类:即生物学方法、化学方法、物理方法。这些方法的提出使外源分子如DNA、RNA等导入特定细胞并表达目的基因及产生特定功能的蛋白质分子得以实现。理想的细胞转染方法应该具有较好的生物降解性、稳定性、靶向性强、有助于基因的表达并能应用于基因方面疾病的治疗。但每种方法都有自己的优势和不足,应根据具体实验的设计和目的来选择最佳细胞转染方法。

关键词:细胞;转染技术;基因

中图分类号:R-331 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)07-1382-03

Advances in Technology of Heterologous Genes Transfecting Cells*

WANG Yue-li, WEI Ji-lou, CHENG Hong-lei, LIU Fang, LUO Su-mei, WANG Ruo-yu[△]

(Department of Oncology, Affiliated Zhongshan Hospital of Dalian University, Dalian, Liaoning, 116001, China)

ABSTRACT: Transfection is a powerful analytical tool enabling study of the function of genes and gene products in cells. It is the theoretical and technical basis of the study of gene function, genetic immunization theory; it is also conventional tools of gene expression and regulation, mutation analysis; and even is a critical process for in vivo applications such as gene therapy, vaccination, and drug development. Over the last 40 years, multiple different methods of nucleic acid delivery have been developed. These include viral methods and non-viral methods, which can be further subdivided into three groups: biological, chemical, and physical. These methods have advanced to make it possible to deliver foreign nucleic acids (DNAs and RNAs) into the special cells and express the aim gene and protein. An ideal gene delivery system should be biodegradable, nontoxic, stable, and target-specific, should assist to improve gene expression, and be able to be used to treat genetic diseases. However, each method has its own advantages and disadvantages so the optimum method depends on experimental design and objective.

Key words: Cells; Transfection technology; Gene

Chinese Library Classification(CLC): R-331 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)07-1382-03

前言

细胞转染指真核细胞由于外源DNA或RNA掺入而获得新遗传标志的过程。它是分析细胞内基因、基因产物、蛋白表达功能的重要分析工具。根据外源基因在细胞中表达时间的长短可将细胞转染技术分为瞬时转染和稳定转染(永久转染)两类。瞬时转染时外源DNA/RNA不整合到宿主染色体中且只持续很短的时间^[1],转染进的遗传物质可能随着环境因素的改变及细胞分裂而丢失。相反稳定转染的外源DNA/RNA可以整合到宿主细胞染色体上且宿主细胞可以长期表达目的基因及蛋白^[2]。因此可根据实验目的来选择瞬时转染或稳定转染。细胞转染的主要目的是通过增强或抑制细胞中特定基因的表达来研究基因、基因产物及重组蛋白的功能^[3]。例如:通过基因疗法将目的

基因转染进细胞来治疗疾病或改善患者的症状;小干扰RNA的敲除过程;通过中国仓鼠卵巢细胞获得的人组织纤溶酶原激活物^[3-6]。

1 细胞转染方法的多样性

为研究真核表达质粒在真核细胞中的生物学特性,人们一直在研究传递质粒DNA的有效途径。常根据不同的细胞类型及实验目的来选择细胞转染的方法。理想的细胞转染方法应该具有较高的转染效率,低细胞毒性,对细胞的正常生理特性影响较小,且便于实施及具有较好的可重复性。常用的方法有:生物学方法(即以病毒为载体的转染法)、化学方法(磷酸钙共沉淀法、DEAE-葡聚糖法、阳离子脂质体法、阳离子聚合物法)、物理方法(显微注射法、基因枪法、电穿孔法、激光照射法、声孔

* 基金项目:国家自然科学基金项目(30970869)

作者简介:王月丽(1982-),女,硕士研究生,主要研究方向:鼻咽癌的诊断和治疗

[△] 通讯作者:王若雨,男,教授, E-mail:wry1963@sohu.com

(收稿日期:2013-05-14 接受日期:2013-06-07)

效应法、磁性纳米颗粒等)。

2 生物学方法

即以病毒为载体介导的细胞转染,常用的载体病毒有单纯疱疹病毒、腺病毒、牛痘病毒、辛德毕斯病毒等。该方法具有转染效率高、能够持续稳定表达外源基因的特点,且实施方便,在体内外均能有效的转染。但是由于病毒载体需整合到转染细胞的染色体中才能够使外源基因得以表达,因此而具有致癌、致畸的危险。安全性较差这一缺陷已经成为限制病毒载体广泛应用的主要原因^[4,7-9]。

3 化学方法

3.1 磷酸钙法

其原理是将氯化钙、DNA、磷酸缓冲液混合,形成微小的磷酸钙-DNA 复合物颗粒沉淀,粘附到细胞膜表面并通过内吞作用而进入细胞质^[10,11]。DNA-磷酸钙共沉淀物进入细胞的内吞作用机制还不明确,但是最近 Dana Y.E. Olton 等应用磷酸钙纳米颗粒为载体的细胞转染方法转染了 HeLa、COS-7 细胞株,发现磷酸钙介导的基因转运可能是通过依赖网格蛋白和细胞膜小窝的细胞内吞作用来实现的^[12]。影响磷酸钙转染效率的主要因素有:DNA-磷酸钙共沉淀物中的 DNA 数量;共沉淀物与细胞接触的保温时间;以及甘油或 DMSO 等促进因子作用的时间等。有报道称应用硫酸鱼精蛋白包被的磷酸钙纳米颗粒在体积上较传统的磷酸钙颗粒小,更有利于促进基因载体通过胞吞作用进入细胞。并发现鱼精蛋白能增加磷酸钙纳米颗粒的稳定性且能够降低转染时的细胞毒性^[13]。Zhou C 等使用壳-核纳米颗粒即阳离子脂质作为外壳,包被磷酸钙颗粒为核,组成一个新的基因载体,其携带 DNA 的数量可以比单用磷酸钙为载体提高 10 倍^[14]。磷酸钙法转染细胞虽然简单、实用,但对细胞有一定的选择性,使其广泛应用有一定的局限性。

3.2 DEAE-葡聚糖介导法转染

其原理是带正电的 DEAE-葡聚糖与带负电的 DNA 分子结合,粘附在带负电的细胞表面,再通过渗透休克或内吞作用将 DNA 复合物导入细胞。由于该方法的突变率高而仅限于瞬时转染,且转染时要去血清,但具有可重复性好的优点。影响转染效率的主要因素是 DEAE-葡聚糖的浓度及细胞暴露于混合液的时间。

3.3 脂质体介导的细胞转染

脂质体是由天然脂类和类固醇组成的微球,根据其结构所包含的双层膜层数可分为单室脂质体和多室脂质体,含有 1 层类脂双分子层的囊泡称单室脂质体,含有多层类脂双分子层的囊泡称为多室脂质体。脂质体转染法可能的机理是阳离子脂质体与带负电的基因借静电作用形成脂质体基因复合物,此复合物因阳离子脂质体的过剩正电荷而带正电,借助静电作用吸附于带负电的细胞表面,再通过与细胞膜融合或细胞内吞作用而进入细胞内,脂质体基因复合物在细胞质中可能进一步传递到细胞核内释放基因,并在细胞内获得表达^[15]。

脂质体介导的细胞转染包括两个步骤,首先是脂质体与 DNA 形成复合物,然后介导与细胞作用,将 DNA 释放到细胞中。脂质体作为基因转移载体具有以下优点:易于制备,使用方

便,不需要特殊的仪器设备;无毒;与生物膜有较大的相似性和相容性,可生物降解;目的基因容量大,可将 DNA 特异性传递到靶细胞中,使外源基因在体外细胞中有效表达;脂质体转染所需的 DNA 用量与磷酸钙法相比大为减少,而转染效率却高 5-100 倍,具有广谱、高效、快速转染的特点。但也存在不足:表达量较低,持续时间较短,稳定性欠佳。

3.4 阳离子聚合物细胞转染法

原理是带正电的聚合物与核酸带负电的磷酸基团形成带正电的复合物后与细胞表面带负电的蛋白多糖相互作用并通过内吞作用进入细胞。常用的阳离子聚合物有聚 L-赖氨酸(PLL)、聚乙烯亚胺(PEI)、树状高分子聚合物等。Liang Y 等将聚乙二醇-聚乙烯亚胺(PEG-PEI)聚合物作为非病毒载体成功的将小干扰 RNA 转进神经干细胞,且比 Lipofectamine2000 的转染效率高及具有较低的细胞毒性^[16]。Zhao N, Qi J 等将聚 β-氨基酸酯聚合物与包被绿色荧光蛋白的质粒 DNA 合成直径为 200 纳米的聚合物,且成功将质粒 DNA 转进了难转的淋巴瘤细胞及白血病细胞^[17]。也有报道以超声波法将脂质体-聚 L-精氨酸合成的聚合物(PCLs)作为载体成功将质粒 DNA (pEGFP-C2)转染进入宫颈癌细胞及人肝癌细胞,结果显示该聚合物能够安全、有效的改善了基因载体的转运能力,且该载体的转染效率高于聚 L-精氨酸载体的两倍^[18]。

4 物理方法

物理方法是最近提出的使用不同物理工具来转运核酸的方法。常用的包括:显微注射法、基因枪法、电穿孔法、激光转染法等^[19]。

4.1 显微注射法

是基因枪技术最早应用在动物中的一种基因转移方法。这项技术是利用管尖极细(0.1~0.5 μm)的玻璃微量注射针将外源基因片段直接注射到培养的细胞中,然后藉由宿主基因序列可能发生的重组、缺失、复制或移位等现象而使外源基因嵌入宿主的染色体内。这种显微注射术的程序,需有相当精密的显微操作设备,制造长管尖时,需用微量吸管拉长器,注射时需有固定管尖位置的微量操作器。这种技术的优点是任何 DNA 在原则上均可传入任何种类的细胞内。此法已成功运用于包括小鼠、鱼、大鼠、兔子及许多大型家畜,如牛、羊、猪等基因转殖动物。Ikawa 等首先将荧光蛋白基因 GFP 作为筛选标记用于转基因小鼠的研究,在小鼠原核中显微注射 GFP 基因,由荧光显微镜观察确定的荧光胚胎与 PCR 的检测结果符合率达 100%^[20]。Serge Gueroussov 等应用显微注射法将携带目的基因的质粒 DNA 转染进 COS-7 细胞(非洲绿猴肾细胞)^[21]。但是此种方法转染细胞需要特殊的技术及对细胞的损伤较大而不能广泛应用。

4.2 基因枪法

用火药爆炸或者高压气体加速包裹了 DNA 的球形金粉或者钨粉颗粒直接送入细胞中的一种转染方法。弹丸是由 DNA、CaCl₂、亚精胺的混合物制成。该方法因为简单、可靠而被广泛用于细胞的稳定转染和瞬时转染^[22]。但是由于基因枪法需要特殊的设备且价格昂贵及在转染时对细胞具有物理损伤而不能被普及应用。Sergei Svarovsky 等通过将金的微米级微球

包被上带正电的聚乙烯亚胺,使其通过静电作用与带负电的DNA结合,改善了金属微球携带DNA量低的问题^[23]。Uchida M等应用基因枪技术将GFP质粒转染HEK 293, MCF7 and NIH/3T3细胞,发现其转染效率取决于基因枪内氦气的压力、金属颗粒微球的大小、数量、DNA的量;对细胞的损伤程度取决于氦气压力和金属离子的数量^[24]。

4.3 电穿孔法

是利用脉冲电场在细胞膜上形成空洞,从而使外源基因进入细胞的一种物理方法^[25]。具有操作方便、低毒性、转染效率高、使用细胞种类广泛的优点,当最佳实验条件确定后能够大批量的转染细胞。有研究报道使用电穿孔法介导增强型绿色荧光蛋白(EGFP)基因转染体外培养的视网膜Miller细胞,获得了较高的转染效率且表达时间更长^[26]。Rita Arabsolghar等应用电穿孔法将siRNA转染体外培养的乳腺癌细胞,转染率高达97%,经MTT法检测转染后24h细胞存活率为72%^[27]。有研究报道通过调整电穿孔法的各项参数可改善难转染性细胞及原代细胞的转染率^[28]。

4.4 激光介导的转染法

采用脉冲激光照射使细胞膜上形成一个短暂的孔隙,由于细胞内外的渗透压不同质粒DNA转进细胞内。该方法可以用于单个细胞的转染且可在细胞的任何部位开口。由于这种转染方法是用激光钻孔所以适用于非常小的单个细胞的转染且具有较高的转染效率,但是由于该方法需要的激光纤维系统设备非常昂贵,使得此法的广泛应用得到了限制。

4.5 声孔效应介导的细胞转染法

即超声微泡介导的细胞转染法,其原理是超声造影剂是一种以白蛋白、脂质、多聚体等为外壳的含气体的微泡,在一定能量的声场中,微泡随着声波频率产生压缩和扩张并伴随着气泡内压力和体积的反复变化,这个过程叫做超声空化。而在较高的声场中,气泡因急剧压缩、闭合破裂而形成微流、冲击波及射流等激烈过程使周围组织的细胞膜上出现可逆性或不可逆性小孔,使细胞膜通透性增高,促进外源基因进入细胞内^[29]。Somphop Rodamporn等应用声孔效应系统成功将pEGFP-N1基因导入HeLa细胞,细胞转染率可达到78%^[30]。

4.6 磁性纳米颗粒介导的转染法

是将磁性颗粒与某些生物大分子通过化学共价键或物理粘附作用相结合,形成具有磁性的微粒。通过磁性微粒的表面活性与病毒或非病毒载体耦联再与目的基因相结合,或者直接与目的基因相结合,构成载附基因的磁性微球。在外加梯度磁场的作用下,磁性微球会随着磁场力的导向集中于细胞表面,在细胞的内存作用下,磁性微球进入细胞内从而使目的基因载入。该方法具有靶向强、转染效率高的优点。

5 展望

细胞转染的方法正在迅速的发展,即使同一种方法每年也会推出改善细胞转染效率及降低细胞毒性的新产品和新技术。未来的转染技术要朝两个方向发展,从精确的亚细胞转染领域到整个个体的转染。将外源基因(特别是mRNA)转送到亚细胞位点(如轴突或树突)和细胞器(如线粒体、高尔基体或细胞核)的能力将为基因研究开创一个新纪元,因为它将改变我们思考

和评价细胞内基因功能的方式。除了一个细胞的整体基因表达图谱外,基因表达产物的定位对发现细胞的功能起着重要作用^[31]。同时安全可靠的转染方法可以应用于人类疾病的基因治疗。

总之,转染方法已经迅速发展并表现出多元化,因此我们根据实验目的可选择最佳的转染方法。然而随着细胞的研究进展将需要更先进的转染技术。

参考文献(References)

- [1] Recillas-Targa F. Multiple strategies for gene transfer, expression, knockdown, and chromatin influence in mammalian cell lines and transgenic animals[J]. Mol Biotechnol, 2006, 34(3): 337-354
- [2] Glover DJ, Lipps HJ, Jans DA. Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans[J]. Nat Rev Genet, 2005, 6(4): 299-310
- [3] Wurm FM. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells[J]. Nat Biotechnol, 2004, 22(11): 1393-1398
- [4] Pfeifer A, Verma IM. Gene therapy: promises and problems [J]. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2001, 2: 177-211
- [5] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors[J]. Cell, 2006, 126(4): 663-676
- [6] Hamilton AJ, Baulcombe DC. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants [J]. Science, 1999, 286(5441): 950-952
- [7] Hacein-Bey-Abina S. Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy [J]. N Engl J Med, 2002, 346(16): 1185-1193
- [8] Roesler J, Brenner S. Third-generation, self-inactivating gp91(phox) lentivector corrects the oxidase defect in NOD/SCID mouse-repopulating peripheral blood-mobilized CD34⁺ cells from patients with X-linked chronic granulomatous disease[J]. Blood, 2002, 100(13): 4381-4390
- [9] Woods NB, Muessiq A. Lentiviral vector transduction of NOD/SCID repopulating cells results in multiple vector integrations per transduced cell: risk of insertional mutagenesis[J]. Blood, 2003, 101(4): 1284-1289
- [10] Alam J, Cook JL. Reporter genes: application to the study of mammalian gene transfection[J]. Anal Biochem, 1990, 188(2): 245-245
- [11] Chen CA, Okayama H. Calcium phosphate mediated gene transfer: a highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA[J]. Biotechniques, 1988, 6(7): 632-638
- [12] Olton DY, Close JM, et al. Intracellular trafficking pathways involved in the gene transfer of nano-structured calcium phosphate-DNA particles[J]. Biomaterials, 2011, 32(30): 7662-7670
- [13] Liu Y. An efficient calcium phosphate nanoparticle-based nonviral vector for gene delivery[J]. Int J Nanomedicine, 2011, 6: 721-727
- [14] Zhou C, Yu B. Lipid-coated nano-calcium-phosphate (LNCP) for gene delivery[J]. Int J Pharm, 2010, 392(1-2): 201-208
- [15] Dubey SK, Tripathi AK, Upadhyay SN, et al. Exploration of soil bacterial communities for their potential as bioresource [J]. Bioresource Technology, 2006, 97: 2217-2224
- [16] Liang Y, Liu Z. Delivery of cationic polymer-siRNA nanoparticles for gene therapies in neural regeneration [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 421(4): 690-695

- shRNA and siRNA by Tat fusion peptide targeting bcr-abl fusion gene in Chronic Myeloid Leukemia cells[J]. *J Control Release*, 2010, 145 (3): 272-280
- [6] Salcher EE, Wagner E. Chemically Programmed Polymers for Targeted DNA and siRNA Transfection [J]. *Top Curr Chem*, 2010, 296: 227-249
- [7] Yu H, Wagner E. Bioresponsive polymers for nonviral gene delivery [J]. *Curr Opin Mol Ther*, 2009, 11: 165-178
- [8] Wang YQ, Su J, Wu F, et al. Biscarbamate cross-linked polyethylenimine derivative with low molecular weight, low cytotoxicity and high efficiency for gene delivery [J]. *Int J Nanomedicine*, 2012, 7: 693-704
- [9] 王玉强, 臧怡, 蔡文玮, 等. 交联聚乙烯亚胺衍生物的构建及其转染 COS-7 细胞的研究[J]. *现代生物医学进展*, 2012, 12(10): 1805-1807
Wang Yu-qiang, Zang Yi, Cai Wen-wei, et al. Construction of Cross-linked Polyethylenimine Derivative and Its Transfection in COS-7 Cells[J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2012, 12(10): 1805-1807
- [10] Ashihara E, Kawata E, Maekawa T. Future prospect of RNA interference for cancer therapies [J]. *Curr Drug Targets*, 2010, 11 (3): 345-360
- [11] Wu Y, Wang W, Chen Y, et al. The investigation of polymer-siRNA nanoparticle for gene therapy of gastric cancer in vitro [J]. *Int J Nanomedicine*, 2010, 5: 129-136
- [12] Srinivas R, Samanta S, Chaudhuri A. Cationic amphiphiles: promising carriers of genetic materials in gene therapy [J]. *Chem Soc Rev*, 2009, 38(12): 3326-3338
- [13] Park TG, Jeong JH, Kim SW. Current status of polymeric gene delivery systems[J]. *Adv. Drug Deliv Rev*, 2006, 58(4): 467-486
- [14] Mintzer MA, Simanek EE. Nonviral vectors for gene delivery [J]. *Chem Rev*, 2009, 109(2): 259-302
- [15] Thomas M, Klivanov AM. Non-viral gene therapy: polycation-mediated DNA delivery[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, 62(1): 27-34
- [16] Wang YQ, Su J, Cai WW, et al. Hepatocyte-targeting gene transfer mediated by galactosylated poly (ethylene glycol)-graft-polyethylenimine derivative[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2013, 7: 211-221
- [17] Liang B, He ML, Xiao ZP, et al. Synthesis and Characterization of Folate-PEG-Grafted-Hyperbranched-PEI for Tumor-targeted Gene Delivery, *Biochem[J]. Biophys Res Commun*, 2008, 367: 874-880
- [18] Li SD, Huang L. Gene therapy progress and prospect: non-viral gene therapy by systemic delivery [J]. *Gene Ther*, 2006, 13(18): 1313-1319
- [19] Dobson J. Gene therapy progress and prospects: magnetic nanoparticles-based gene delivery[J]. *Gene Ther*, 2006, 13(4): 283-287

(上接第 1384 页)

- [17] Zhao N, Qi J. Transfecting the hard-to-transfect lymphoma/leukemia cells using a simple cationic polymer nanocomplex [J]. *J Control release*, 2012, 159(1): 104-110
- [18] Opanasopit P, Tragulpakseerojn J. The development of poly-L-arginine-coated liposomes for gene delivery [J]. *Int J Nanomedicine*, 2011, 6: 2245-2252
- [19] Mehier-Humbert S, Guy RH. Physical methods for gene transfer: improving the kinetics of gene delivery into cells [J]. *Adv Drug Del Rev*, 2005, 57(5): 733-753
- [20] Ikawa M, Kominami K, Yoshimura Y, et al. A rapid and non-invasive selection of transgenic embryos before implantation using green fluorescent protein (GFP)[J]. *FEBS Lett*, 1995, 375(1-2): 125-128
- [21] Gueroussov S, Tamawsky SP. Analysis of mRNA nuclear export kinetics in mammalian cells by microinjection [J]. *J Vis Exp*, 2010, (46): 2387-2395
- [22] Klein, RM, Wolf ED, et al. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells [J]. *Biotechnology*, 1992, 24: 384-386
- [23] Svarovsky S, Borovkov A, Sykes K. Cationic gold microparticles for biolistic delivery of nucleic acids [J]. *Biotechniques*, 2008, 45(5): 535-540
- [24] Uchida M, Li XW, Mertens P. Transfection by particle bombardment: delivery of plasmid DNA into mammalian cells using gene gun[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1790(8): 754-764
- [25] Inoue T, Krumlauf R. An impulse to the brain-using in vivo electroporation[J]. *Nat Neurosci*, 2001, 4 Suppl: 1156-1158
- [26] Zeng Qi, Xia Xiao-bo. Comparison of electroporation and lipofection efficiency in retinal Müller cells [J]. *Int J Ophthalmol*, 2010, 10(2): 247-249
- [27] Rita Arabsolghar, Mozghan Rasti. Optimal electroporation condition for small interfering RNA transfection into MDA-MB-468 cell line [J]. *Iran J Med Sci*, 2012, 37(3): 187-193
- [28] Elizabeth T Jordan, Michelle Collins. Optimizing electroporation conditions in primary and other difficult-to-transfect cells [J]. *J Biomol Tech*, 2008, 19(5): 328-334
- [29] Liu Yi-li. Compared ultrasonics [M]. Beijing: People's Health Publishing House, 2006: 247-256
- [30] Rodamporn S, Harris NR. HeLa cell transfection using a novel sonoporation system[J]. *IEEE Trans Biomed Eng*, 2011, 58(4): 927-934
- [31] Barrett LE. Region-directed phototransfection reveals the functional significance of a dendritically synthesized transcription factor [J]. *Nat Meth*, 2006, 3(6): 455-460