

# 脂质体法和电穿孔法体外转染 SD 大鼠视网膜 Müller 细胞的比较

曾琦, 夏晓波

作者单位: (410008) 中国湖南省长沙市, 中南大学湘雅医院眼科  
作者简介: 曾琦, 女, 在读博士研究生, 研究方向: 青光眼。  
通讯作者: 夏晓波, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 青光眼。  
xbxia@yahoo. com  
收稿日期: 2009-11-19 修回日期: 2010-01-08

## Comparison of electroporation and lipofection efficiency in retinal Müller cells

Qi Zeng, Xiao-Bo Xia

Department of Ophthalmology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China

**Correspondence to:** Xiao-Bo Xia. Department of Ophthalmology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China. xbxia@yahoo. com

Received: 2009-11-19 Accepted: 2010-01-08

### Abstract

• **AIM:** To evaluate the possibility of transferring enhanced green fluorescent protein (EGFP) to cultured retinal Müller cells (RMCs) via electroporation and lipofection and to compare the transfection efficiency of electroporation with lipofection in cultured RMCs of rats.

• **METHODS:** First of all, Müller cells were isolated from rat retina, and proliferating cells were expanded in serum-containing medium. Secondly, the third or fourth passage of cells were identified by glutamatespartate transporters (GLAST) and glutamine synthetase (GS). Thirdly, cultured RMCs were transfected either by electroporation or by lipofection using a PEGFP-N1 plasmid. At last, the cells were analyzed 24, 48 hours, 3, 4 days, 1 week and 2 weeks after transfection by fluorescence microscopy.

• **RESULTS:** Ninety-five percent cultured RMCs were positively reacted for GLAST and GS. Twenty-four hours after transfection there are only few cells transfected in these two groups. However, the percentage of transfected cells was significantly higher when electroporation was used as compared with lipofection in forty-eight hours after transfection. At this time, the transfection efficiency was superior with electroporation ( $31.0\% \pm 2.8\%$ ) as compared to lipofection ( $10.5\% \pm 2.4\%$ ). And there were significant differences between them ( $P < 0.01$ ). The expression of EGFP could be detected for at most 1 week after lipofection and more than 2 weeks after electroporation.

• **CONCLUSION:** Our results show the feasibility of a gene transfer into RMCs via electroporation and lipofection. Electroporation is superior to lipofection in RMCs.

This study may provide a novel tool for our future targeted gene therapy on RMCs.

• **KEYWORDS:** lipofection; electroporation; gene transfection; retinal Müller cells; enhanced green fluorescent protein

Zeng Q, Xia XB. Comparison of electroporation and lipofection efficiency in retinal Müller cells. *Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi)* 2010;10(2):247-249

### 摘要

**目的:** 探讨脂质体法及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 Müller 细胞的可行性和区别。

**方法:** 体外培养出生后 7~10d 的 SD 大鼠视网膜 Müller 细胞, 免疫荧光染色法鉴定 95% 以上为视网膜 Müller 细胞。分别用阳离子脂质体 Lipofectamine 2000 介导的脂质体转染法和电穿孔法将质粒 PEGFP-N1 转染视网膜 Müller 细胞, 荧光显微镜下检测转染后 1, 2, 3, 4d 的转染效率, 并持续观察至转染后 14d, 比较两者基因表达持续时间。

**结果:** 荧光显微镜下检测转染后 1d, 两组均可见少量细胞表达 EGFP 绿色荧光蛋白。转染后 2d, 两者转染效率均达到最大, 并且电穿孔法介导质粒 PEGFP-N1 转染 Müller 细胞效率约为  $31.0\% \pm 2.8\%$ , 较脂质体法转染效率 ( $10.5\% \pm 2.4\%$ ) 更高。两者比较有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。随后, 两者转染效率均逐渐降低。电穿孔转染后的 PEGFP-N1 可在视网膜 Müller 细胞内持续表达近 14d, 而脂质体转染后仅能表达约 7d。

**结论:** 脂质体法和电穿孔法均适用于视网膜 Müller 细胞的基因转染, 但电穿孔法效率更高, 表达时间更长。

**关键词:** 脂转染; 电穿孔; 基因转染; 视网膜 Müller 细胞; 增强型绿色荧光蛋白基因

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2010.02.015

曾琦, 夏晓波. 脂质体法和电穿孔法体外转染 SD 大鼠视网膜 Müller 细胞的比较. 国际眼科杂志 2010;10(2):247-249

### 0 引言

Müller 细胞是人和哺乳动物视网膜中最主要的神经胶质细胞, 该细胞从内界膜一直延伸到外界膜, 贯穿于整个视网膜, 其突起广泛分布于视网膜内各类神经元胞体和纤维之间, 与各神经元密切接触, 正是这种与视神经元细胞之间的广泛联系使得其在维持视网膜神经元正常功能和各种视网膜病理变化中发挥着重要的作用<sup>[1]</sup>。基因治疗是近年来兴起的一种治疗方法, 过去在各种肿瘤和基因缺陷病的研究中应用广泛, 而目前以 Müller 细胞为载体进行的基因治疗也已开始起步。我们用脂质体和电穿孔两种方法分别将真核表达质粒 PEGFP-N1 转染视网膜 Müller 细胞, 荧光显微镜下检测瞬时转染效率, 比较两种方法转

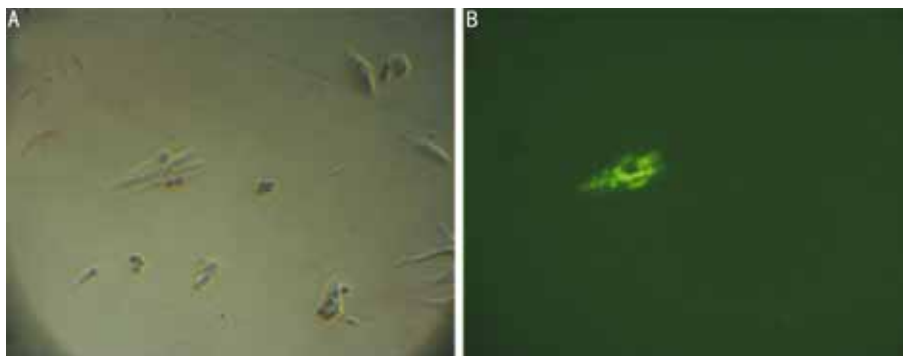


图1 脂质体介导 PEGFP-N1 质粒转染视网膜 Müller 细胞(倒置显微镜×100) A,转染 48h;B,转染效率为 10.5% ±2.4%。

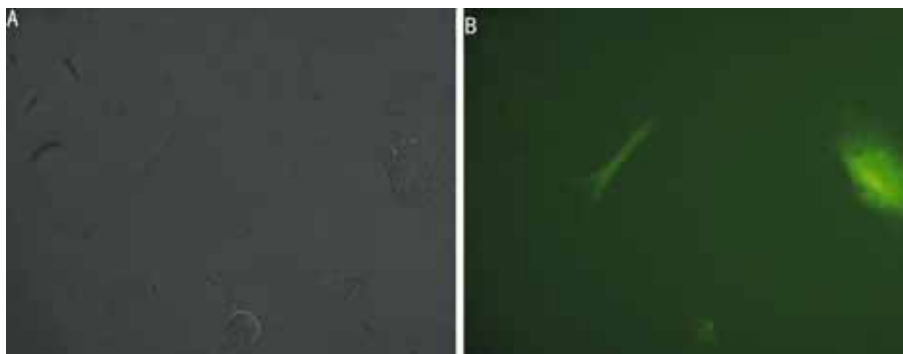


图2 电穿孔介导 PEGFP-N1 质粒转染视网膜 Müller 细胞(倒置显微镜×100) A,转染 48h;B,转染效率为 31.0% ±2.8%。

染效率的区别,以寻找更为高效的 Müller 细胞转染方法,为 Müller 细胞为载体的基因治疗奠定基础。

### 1 材料和方法

**1.1 材料** DMEM(美国 GIBCO 公司)、胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司)、胰酶、多聚赖氨酸和 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)(美国 Sigma 公司)、兔抗鼠谷氨酸转运体 GLAST 多克隆抗体和兔抗鼠谷氨酰胺合成酶 GS 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司)、兔抗 Cy3 荧光单抗(美国 KPL 公司)、PEGFP-N1 真核细胞表达质粒(美国 Clontech 公司)、脂质体 Lipofectamine 2000 和 Opti-MEM(美国 Invitrogen 公司)、0.4cm 电转杯(美国 Biosmith 公司)、CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 Thermo Forma 公司)、Axiovert 2000 倒置荧光显微镜(德国 ZEISS 公司)、ELWD 0.3 倒置显微镜(日本 Nikon 公司)、Gene Pulser II 电穿孔仪(美国 Bio-Rad 公司)。取出生后 7~10d 的新生 SD 大鼠(中南大学实验动物学部提供)视网膜组织,参照文献<sup>[2,3]</sup>方法进行 Müller 细胞的培养。取第 3~4 代 Müller 细胞,胰酶消化后以  $1 \times 10^5$ /L 的密度接种于预置有盖玻片(0.1g/L 多聚赖氨酸包被)的 24 孔板中,待 Müller 细胞融合达 80%~90% 时行免疫荧光染色进行细胞鉴定。步骤:吸出 24 孔板中各孔内培养基,加入 37g/L 多聚甲醛,静置 15min,1g/L Triton-X 100,渗透 10min,50g/L BSA 封闭 30min,50g/L BSA 稀释的一抗(GS 或 GLAST)孵育 1h,PBS 漂洗 5 次,50g/L BSA 再封闭 20min,50g/L BSA 稀释的二抗孵育 1h,PBS 漂洗 7 次,各孔加入终浓度为 1mg/L DAPI,1min 后 PBS 漂洗 2 次,一蒸水漂洗 1 次,甘油封片。磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作阴性对照。组织块法培养 24~48h 后见有细胞从组织块边缘爬出,以后逐渐增大呈多角形、星形或梭形,胞质丰富,胞膜清楚,胞核呈椭圆形,多位于细胞中央,7~10d 后细胞基本融合成细胞单层,呈镶嵌样排列。以后每 2~3d 换液 1 次,每 5~7d 按 1:2 传代 1 次。传至 7~8 代后细胞逐渐衰老。取

第 3~4 代的视网膜 Müller 细胞行免疫荧光染色鉴定,95% 以上细胞谷氨酸转运体 GLAST 抗体和谷氨酰胺合成酶 GS 抗体染色阳性,显示红色荧光。

### 1.2 方法

**1.2.1 脂质体转染** 转染前 24h,24 孔板中接种视网膜 Müller 细胞,调整细胞密度至  $1 \times 10^5$ /孔。吸出各孔内培养基,无血清 DMEM 培养基漂洗 1 次,各孔内加入 Opti-MEM 200 $\mu$ L。在新的 1.5mL EP 管中准备溶液 A、溶液 B。A 液:Opti-MEM 50 $\mu$ L + PEGFP-N1 质粒 2 $\mu$ g,室温下静置 5min,B 液:Opti-MEM 50 $\mu$ L + 脂质体 Lipofectamine 2000 4 $\mu$ L,室温下静置 5min。将 A、B 两种液体混合,室温下再静置 20min 后加入 24 孔板中,轻轻摇晃使之与细胞均匀接触。37 $^{\circ}$ C 50mL/L CO<sub>2</sub> 培养箱培养 2~3h 后,弃去原培养液,改由含 200mL/L 胎牛血清的完全培养基继续培养,每 2~3d 换液 1 次。转染后 1,1.5,2,3,4,7,14d 后倒置荧光显微镜下观察,取 10 个不同视野分别计数表达增强型绿色荧光蛋白的细胞和总细胞数,计算转染效率。转染效率(%) = 荧光显微镜下有荧光表达细胞数/总细胞数  $\times$  100%。

**1.2.2 电穿孔法转染** 取生长良好的视网膜 Müller 细胞转染,吸尽培养液,胰酶消化 3min,含 200mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养基终止消化,吹打悬浮细胞,调整细胞密度至  $2.0 \times 10^6$ /700 $\mu$ L,吸出细胞悬液移入 1.5mL EP 管,室温下 1000r/min 离心 5min,弃上清,加入电转缓冲液(PBS 200mL 中含 272mmol/L 蔗糖、10mmol/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,1mmol/L MgCl<sub>2</sub>,PH = 7.4)重悬细胞。以  $3.5 \times 10^{10}$  个细胞/g 质粒的浓度,将细胞悬液及 PEGFP-N1 质粒加入 4mm 电转杯中,混合均匀,冰浴 5~10min。将电转杯放入电转槽,电转仪电击,参照 Webster 等<sup>[4]</sup>的方法设置转染条件:电压 450V,电容 500 $\mu$ F。操作完毕后,将电转杯取出,再次冰浴 5~10min,小心将细胞转移到 24 孔培养板中,每孔加入含 200mL/L 胎牛血清的完全培养基 1mL,置于 37 $^{\circ}$ C 50mL/L CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养。24h 后换液 1 次,之后每 2~3d

换液 1 次。于不同时间点观察细胞并计算转染效率。

统计学分析:采用 SPSS12.0 统计学软件对数据进行统计学分析,计量资料所有数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示。脂质体转染组和电穿孔转染组转染效率的比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 脂质体转染** 增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)为报告基因,荧光显微镜下转染成功的细胞胞质或胞核内即可见到强度均匀的绿色荧光。阳离子脂质体 Lipofectamine 2000 介导转染 24h 后,荧光显微镜下观察可见部分细胞变圆漂浮死亡,贴壁细胞中有部分细胞质内可见散在荧光表达,强度较弱。之后变圆死亡的细胞数无明显变化,阳性细胞数及细胞内荧光强度均显著增强,48h 时达到最大,可见细胞质内呈强阳性表达,此时转染效率约为  $10.5\% \pm 2.4\%$  (图 1A,B)。随着转染时间的延长,荧光表达细胞数逐渐减少,转染成功细胞内荧光强度逐渐减弱,至转染后 7d 仅有极少数散在弱荧光存在。

**2.2 电穿孔法转染** 转染 1d 后即可见大部分细胞已贴壁,少部分细胞仍呈圆形或细胞死亡,核固缩呈黑色。倒置荧光显微镜下见极少量细胞发出绿色荧光。2d 时贴壁细胞已基本伸展成多角形、星形、梭形,同正常视网膜 Müller 细胞形态,表达绿色荧光蛋白基因(EGFP)阳性细胞数增多,强度增强,绿色荧光多分布在细胞质内,胞质内荧光强度均匀明亮(图 2A,B)。此时转染效率最高,约为  $31.0\% \pm 2.8\%$ ,明显高于脂质体转染组( $t = 8.08, P < 0.01$ )。转染 3~4d 后,视网膜 Müller 细胞仍继续表达 EGFP,且荧光表达量及强度变化不大。7d 后,表达绿色荧光的细胞数减少,荧光强度减弱。到 14d 时,仍可见少量散在的荧光表达。

## 3 讨论

基因转染正逐渐成为各种人类疾病病因研究和临床治疗中重要的手段与策略。许多研究者一直都在致力于寻找效率更高而毒性更低的基因转染靶细胞的方法。Müller 细胞是视网膜的主要神经胶质细胞,具有维持视网膜正常结构、营养视网膜神经元、参与调节神经突触传递、构成血-视网膜屏障等多种生理功能。此外,许多研究还表明 Müller 细胞在例如青光眼、增生性玻璃体视网膜病变、视网膜脱离、增生性糖尿病视网膜病变等缺氧缺血性视网膜病变的发生发展中起重要作用,包括可分泌多种生长因子,影响视网膜的代谢状况,参与视网膜神经细胞的损伤过程等<sup>[1]</sup>。由于 Müller 细胞在视网膜的病理、生理过程中的特殊作用,Müller 细胞正逐渐成为眼科病因研究及治疗领域的重要靶细胞。而有关 Müller 细胞作为靶细胞进行的基因转染及比较研究还为之甚少。我们首先选择经典的 Müller 细胞培养方法进行细胞培养,结果发现培养的细胞均具有 Müller 细胞的一般形态。谷氨酸转运体 GLAST 和谷氨酰胺合成酶 GS 均是视网膜 Müller 细胞公认的细胞标记物。通过对培养的细胞进行以上两种抗体的免疫荧光染色,结果可以证实我们培养的视网膜 Müller 细胞纯度可达 95% 以上。目前将外源基因导入真核细胞的方法有很多种,大体可分为两大类:病毒转染法和非病毒转染法。病毒转染法具有很高的转染效率,但其存在安全和技术方面的缺点,例如携带的基因长度有限、可能引起错误的免疫应答与毒性反应、可能影响转染细胞的增殖与分化,具有潜在的致癌性等,从而限制了病毒转染法在基因治疗方面的广泛应用<sup>[5,6]</sup>。而非病毒转染法

被认为是更安全和更适用于临床应用的转染方法,主要包括磷酸钙沉淀法、DEAE-葡萄糖法、脂质体转染法和电穿孔法等。我们选择采用由 Lipofectamine 2000 介导的脂质体转染法和电穿孔转染法分别将 PEGFP-N1 质粒转染入视网膜 Müller 细胞。脂质体法是一种化学方法,主要是通过阳离子脂质体试剂与靶 DNA 的磷酸骨架结合生成复合物而通过细胞膜的,由于细胞内屏障作用往往脂质体法转染效率并不高<sup>[7]</sup>;而电穿孔法则是利用脉冲电场在细胞膜上形成孔洞,从而使外源基因进入细胞的一种物理方法。大量对哺乳动物细胞的体外基因转移实验均显示电穿孔法较脂质体转染法具有更高效的转染效率<sup>[8]</sup>。我们的实验也同时证明,脂质体和电穿孔法均能使 PEGFP-N1 质粒进入 Müller 细胞,之后利用 Müller 细胞中转录及翻译所需的酶表达 EGFP。随着进入 Müller 细胞内的 PEGFP-N1 质粒数量逐步增多,细胞内 EGFP 的表达逐渐增多,于转染后 48h 出现 EGFP 表达高峰。此时电穿孔法转染效率明显高于脂质体转染法,约为后者的 3 倍。随后 EGFP 表达量逐渐下降,至转染后 7d,脂质体法转染组仅见极少量 EGFP 荧光表达而电穿孔组荧光表达可一直持续到转染后 2wk 以上,其可能原因为 DNA/脂质体复合物对细胞有毒性作用,当进入细胞内的 DNA 量增加以及 DNA/脂质体复合物作用时间延长时,细胞毒性也逐渐加重,细胞存活率下降,细胞转染率随之下降<sup>[9]</sup>。我们是参照 Webster 等<sup>[4]</sup>电转大脑小胶质细胞的方法来进行 Müller 细胞电穿孔转染的,如后期再优化转染参数和方法,将可能得到更高的转染效率。另外,我们的实验还发现转染 24h 后,两组 Müller 细胞均有一部分变圆漂浮死亡,说明两种转染方法均具有一定的细胞毒性作用,而对两者细胞存活率及细胞功能改变等的比较还有待我们的进一步研究。

目前有关电穿孔法介导基因转染视网膜 Müller 细胞的研究还鲜有报道,而我们通过实验证明脂质体法和电穿孔法均能有效的将外源性 DNA 转移入视网膜 Müller 细胞内,并且电穿孔法较脂质体法的转染效率更强、基因表达时间更长。这将可能为未来开展的视网膜 Müller 细胞基因转染研究和基因治疗临床应用提供更好更新的手段。

### 参考文献

- 1 Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, et al. Müller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res* 2006;25(4):397-424
- 2 Hicks D, Courtois Y. The growth and behaviour of rat retinal Müller cells *in vitro*. 1. An improved method for isolation and culture. *Exp Eye Res* 1990;51(2):119-129
- 3 Sarthy VP, Brodjian SJ, Dutt K, et al. Establishment and characterization of a retinal Müller cell line. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39(1):212-216
- 4 Webster SD, Park M, Fonseca MI, et al. Structural and functional evidence for microglial expression of C1qR(P), the C1q receptor that enhances phagocytosis. *J Leukoc Biol* 2000;67(1):109-116
- 5 Yang Y, Nunes FA, Berencsi K, et al. Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91(10):4407-4411
- 6 Imai E, Akaqi Y, Isaka Y. Towards gene therapy for retinal diseases. *Nephrologie* 1998;19(7):397-402
- 7 Ma H, Liu Q, Diamond SL, et al. Mouse embryonic stem cells efficiently lipofected with nuclear localization peptide result in a high yield of chimeric mice and retain germline transmission potency. *Methods* 2004;33(2):113-120
- 8 Micka B, Trojanek B, Niemitz S, et al. Comparison of nonviral transfection methods in melanoma cell primary cultures. *Cytokine* 2000;12(6):828-833
- 9 钱锋,肖成组.脂质体法和电穿孔法转染哺乳动物细胞研究. *生物化学与生物物理进展* 1999;26(3):289-291