



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2014.07.014
http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract3957.shtml

· 基础研究 ·

不同方法 HBx 基因表达质粒转染肝癌 HepG2 细胞的效果比较

任建军, 孟兴凯, 牛剑祥

(内蒙古医科大学附属医院 普通外科, 内蒙古 呼和浩特 010059)

摘要

目的: 比较 Lipo2000、磷酸钙法和 Lonza 电转法转染乙型肝炎病毒 X (HBx) 基因的表达质粒 pHA-HBx 至 HepG2 肝癌细胞的转染效率及其细胞毒性。

方法: 分别用 Lipo2000、磷酸钙法和 Lonza 电转法将绿色荧光蛋白 (GFP) 标记的 pHA-HBx 转染至 HepG2 肝癌细胞, 以荧光显微镜及流式细胞仪检测转染效率, RT-PCR 鉴定 HBx 基因在 HepG2 细胞基因组的整合, Annexin V/PI 法检测细胞的存活情况。

结果: RT-PCR 结果显示, 外源性 HBx 基因通过 3 种转染方法均可导入 HepG2 细胞并表达; Lipo2000 和 Lonza 电转法的转染效率均高于磷酸钙法 (均 $P < 0.05$), 而 Lipo2000 和 Lonza 电转法的转染效率间差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 细胞存活率从高到低依次为 Lonza 电转法、Lipo2000、磷酸钙法 (均 $P < 0.05$)。

结论: Lonza 电转法转染 pHA-HBx 至 HepG2 肝癌细胞转染效率高, 且细胞毒性小, 是较好的转染方法。

[中国普通外科杂志, 2014, 23(7):936-940]

关键词

癌, 肝细胞; 乙型肝炎病毒 X; 转染
中图分类号: R735.7

Comparison of different methods for HBx gene transfection into HepG2 cells

REN Jianjun, MENG Xingkai, NIU Jianxiang

(Department of General Surgery, Affiliated Hospital, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010059, China)

Corresponding author: NIU Jianxiang, Email: dr_rjj@126.com

ABSTRACT

Objective: To compare the transfection efficiency and cytotoxicity among Lipo2000 reagent, calcium phosphate method, and Lonza electroporation in transfection of hepatitis B virus X (HBx) gene expression plasmid (pHA-HBx) into the HepG2 cells.

Methods: Green fluorescent protein (GFP)-tagged pHA-HBx was transfected into the HepG2 cells by Lipo2000 reagent, calcium phosphate method, and Lonza electroporation-based delivery, respectively. Then, the

基金项目: 内蒙古医学院 2011 科技百万工程资助项目 (NY2011bw004); 内蒙古卫生厅医疗卫生科研计划资助项目 (2010038); 内蒙古医学院外科博士点立项建设一般资助项目 (NYFYZDBJ2010003); 内蒙古自治区高等学校科学研究资助项目 (NJZY13416)。

收稿日期: 2014-04-21; **修订日期:** 2014-06-09。

作者简介: 任建军, 内蒙古医科大学附属医院副主任医师, 主要从事肝、胆、胰疾病诊治方面的研究。

通信作者: 牛剑祥, Email: dr_rjj@126.com

transfection efficiency was determined by flow cytometry and fluorescence microscopy, the HBx gene integration into the genome of the HepG2 cells was identified by RT-PCR method, and the cell survival status was examined and analyzed by Annexin V/PI staining, respectively.

Results: RT-PCR results indicated that exogenous HBx gene was integrated into the genome and expressed in the HepG2 cells after either of the three transfection methods. The transfection efficiency of Lipo2000 reagent and Lonza electroporation-based delivery were higher than that of calcium phosphate method (both $P < 0.05$), but it had no statistical difference between the first two methods ($P > 0.05$). The high-to-low order of cell survival rate was Lonza electroporation, Lipo2000 reagent and calcium phosphate method, respectively (all $P < 0.05$).

Conclusion: Lonza electroporation for pHA-HBx transfection into HepG2 cells has high transfection efficiency and less cytotoxicity, so it is a relatively satisfactory transfection method.

[Chinese Journal of General Surgery, 2014, 23(7):936-940]

KEYWORDS Carcinoma, Hepatocellular; Hepatitis B Virus X Protein; Transfection

CLC number: R735.7

全球每年有将近 100 多万人死于乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染所导致的严重肝病, 如肝硬化和原发性肝癌^[1]。乙型肝炎病毒 X (hepatitis B virus X protein, HBx) 是 HBV X 基因编码的蛋白产物, 在诱导细胞增殖、细胞信号转导及蛋白质降解等方面具有重要的作用^[2]。肝癌细胞的恶性表型与 HBV 的关系一直是人们关注和研究的热点。为了探讨 HBx 基因对人肝癌细胞的影响, 需将携带 HBx 基因的表达质粒转入肝癌细胞中。转染试剂的选择与转染条件的优化对研究肝癌细胞的恶性表型与 HBV 的关系来说至关重要。Günther 等^[3]采用磷酸钙法转染 HBV 全长基因组获得了较好的转染效果, 但有人认为磷酸钙法转染效率低, 且影响因素多。Lipo2000 为广谱转染试剂, 对 DNA 和 RNA 均可有效转染^[4-5]。Lonza 电转法转染是近年才出现的针对原代细胞及肿瘤细胞的有效转染工具。因此, 本研究观察了 Lipo2000、磷酸钙法和 Lonza 电转法转染 HBx 基因的表达质粒 pHA-HBx 至 HepG2 肝癌细胞的转染效率及其对细胞存活率的影响, 探讨 HepG2 肝癌细胞的有效转染方法。

1 材料与方法

1.1 材料与主要试剂

肝癌细胞株 HepG2 购自中国医学科学院基础医学研究所; 带 GFP 标签的 pHA-HBx 质粒及 Lipo2000 购自 Invitrogen 公司; HBx 引物由上海

生工生物工程有限公司合成; RPMI-1640 培养基购自 Gibco 公司; 胎牛血清购自 Hyclone 公司; 磷酸钙法细胞转染试剂盒购自碧云天公司; Lonza 电转试剂盒购自 Lonza 公司。

1.2 方法

1.2.1 HepG2 细胞培养 细胞以含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 完全培养基进行培养, 培养条件: 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度。以 0.25% 胰蛋白酶 (含 0.02% EDTA) 进行消化传代。

1.2.2 磷酸钙法细胞转染 根据试剂说明书进行操作。具体步骤: 将细胞培养于 6 孔板内, 以长至 70%~80% 满为宜; 转染前 30~60 min, 吸去细胞培养液, 加入新鲜的不含抗生素的完全培养液 2 mL (转染时最好使用新鲜配制且 pH 值经过精心调校的培养液; 转染用的培养液可以在配制后分装冻存, 使用时再解冻); 取 4 μg 质粒 DNA (质粒总体积不宜超过 20 μL), 加入到 100 μL 氯化钙溶液中, 混匀; DNA-氯化钙溶液加入到 100 μL BBS 溶液中, 混匀, 室温孵育 10~20 min; DNA-氯化钙-BBS 混合物均匀滴加到整个 6 孔板内; 置于含 5% CO₂ 的 37 °C 细胞培养箱内培养; 根据实验要求和磷酸钙对于不同细胞的毒性不同, 在 4~16 h 后轻轻晃动培养板数次以充分悬浮一些磷酸钙沉淀, 吸去含磷酸钙沉淀的培养液, 加入 2 mL 新鲜的完全培养液, 继续培养; 转染约 48 h 后检测转染基因表达及转染效率。

1.2.3 Lipo2000 转染法 细胞长至 70%~80% 满时进行转染; 转染前吸去培养基, 以 PBS 洗 2 次,

每孔加入 2 mL Opti-MED 培养基; 准备溶液 A (取 4 μ g 质粒 DNA, 以 200 μ L Opti-MED 稀释) 和溶液 B (取 4 μ g 脂质体, 以 200 μ L Opti-MED 稀释); 将溶液 A 逐滴加入溶液 B 中, 混匀, 并于室温下放置 20~30 min 后加入 6 孔板中; 置于含 5% CO₂ 的 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱内培养; 5 h 后加入含 20% 胎牛血清的 RPMI-1640; 转染后 48 h 收集细胞检测转染基因表达及转染效率。

1.2.4 Lonza 电转法 细胞以 0.25% 胰蛋白酶 (含 0.02% EDTA) 进行消化制成细胞悬液; 转染前以 PBS 洗 2 次, 每个转染条件的细胞用 100 μ L 预先放置于室温的 Nucleofector[®] 电转液重悬 (细胞以电转液重悬后, 后续所有操作必须在 20 min 内完成); 细胞悬液中加入 4 μ g 质粒 DNA; 将上述细胞悬液转入电转杯中 (样品必须覆盖电转杯杯底, 且杯底部分不可有气泡存在), 盖上电转杯盖; 选择电转程序, 并将电转杯放入电转仪中, 运行电转程序; 电转程序结束立即取出电转杯; 使用试剂盒提供的移液管吸 500 μ L 预热的培养基入电转杯中, 并轻轻将细胞转入 12 孔板中, 不可反复吹打细胞; 细胞放入孵箱中继续培养, 6 h 后可更换培养基; 阳性对照可于转染后 8~12 h 用流式细胞仪检测转染效率, 转染后 48 h 收集细胞检测转染基因表达。

1.2.5 RT-PCR 鉴定 HBx 基因整合 引物序列: 上游引物, 5'-TCC TTT GTT TAC GTC CCG T-3'; 下游引物 5'-TGC CTA CAG CCT CCT AAT AC-3'。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 56 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增片段 372 bp。

1.2.6 细胞凋亡检测 收集细胞, 1 000 \times g 离心 5 min, 1% BSA 的 PBS 洗涤 1 次。用 100 μ L 结合缓冲液将细胞重悬, 加入 2 μ L Annexin V 染料和 0.1 μ L PI 染料, 避光 15 min, 流式细胞仪检测。

1.3 统计学处理

以 SPSS 15.0 软件, 采用 *t* 检验的方法对数据进行统计分析。

2 结果

2.1 RT-PCR 扩增结果

转染 HBx 基因的细胞于 372 bp 处可见与设计片段大小相符的阳性扩增条带, 对照组细胞未见阳性扩增条带 (图 1)。

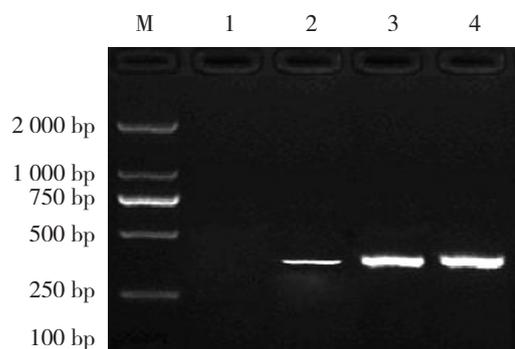


图 1 RT-PCR 检测 HBx 基因在 HepG2 细胞中的表达 M: DNA 标准 (DL2000); 1: GFP 转染对照; 2: 磷酸钙法; 3: Lipo2000 转染法; 4: Lonza 电转法

Figure 1 RT-PCR detection for the HBx gene expression in the HepG2 cells M: DNA markers; 1: GFP transfection control; 2: Calcium phosphate method; 3: Lipo2000 transfection; 4: Lonza electroporation

2.2 转染效率检测

Lipo2000 和 Lonza 电转法的转染效率分别为 77.1% 和 79.6%, 明显高于磷酸钙法的转染效率 (56.5%), 差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$), Lipo2000 和 Lonza 电转法的转染效率间差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 2-3)。

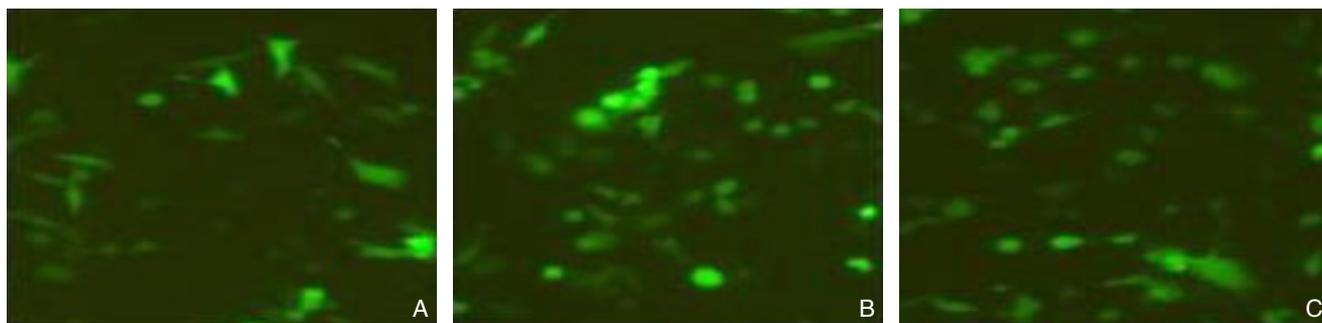


图 2 荧光显微镜观察转染后 HepG2 细胞中荧光蛋白表达 A: 磷酸钙法; B: Lipo2000 转染法; C: Lonza 电转法
Figure 2 Fluorescence microscope observation for the GFP expression in the HepG2 cells after transfection A: Calcium phosphate method; B: Lipo2000 transfection; C: Lonza electroporation

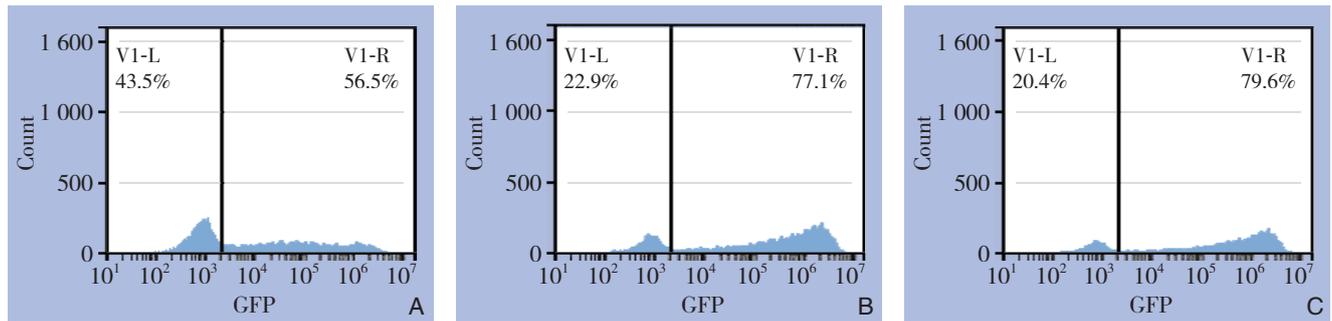


图3 流式细胞术检测转染效率 A: 磷酸钙法; B: Lipo2000 转染法; C: Lonza 电转法

Figure 3 Flow cytometry measurements for transfection efficiency A: Calcium phosphate method; B: Lipo2000 transfection; C: Lonza electroperation

2.3 HepG2 细胞存活率检测

Lipo2000 和 Lonza 电转法中, Annexin V/PI 阳性细胞比例明显低于磷酸钙法 (均 $P < 0.05$), 而 Lonza 电转法中, Annexin V/PI 阳性细胞比例低于 Lipo2000 转染法 ($P < 0.05$) (图 4)。

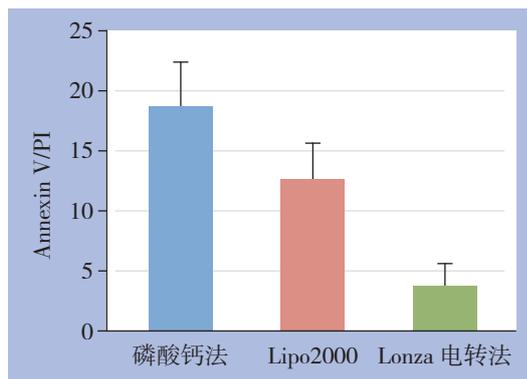


图4 细胞存活率检测结果

Figure 4 Results of the cell survival rate determination

3 讨论

HBx 是 HBV X 基因编码的蛋白产物^[6], 它是 HBV 感染机体后启动和维持病毒复制不可或缺的因素^[7-9]。尽管目前针对 HBV 的分子生物学研究极其广泛, 但是关于 HBx 在 HBV 相关性疾病的发生和发展中所起的作用和确切功能仍然不是很清楚。成功将 HBx 转入肝癌细胞中是研究 HBx 在 HBV 相关性疾病发生和发展中所发挥的作用的重要环节。目前常用的转染方法有磷酸钙法、Lipo2000 脂质体转染法和电穿孔法等^[10-16]。

磷酸钙转染试剂相对来说较为低廉, 易于获取, 然而有人认为磷酸钙法转染效率低, 且影响因素多。阳离子脂质体是目前比较常用且有效的

转染试剂^[17-20], 具有操作简单、细胞毒性小等特点, 而 Lipo2000 是目前公认的较为常用的转染效果较佳的阳离子脂质体。Lonza 电转法是近几年新出现的针对原代细胞和肿瘤细胞的高效转染试剂, 具有操作简单、操作时间短、转染效率高、对细胞毒性小等特点。

笔者对 3 种转染试剂转染 pHA-HBx 至 HepG2 肝癌细胞的转染效率检测结果显示, 转染 pHA-HBx 至 HepG2 肝癌细胞时, Lipo2000 和 Lonza 电转法的转染效率均显著高于磷酸钙法 ($P < 0.05$), 而 Lipo2000 和 Lonza 电转法的转染效率间无统计学差异 ($P > 0.05$)。在细胞毒性方面, 采用 Lipo2000 和 Lonza 电转法的细胞存活率均显著高于磷酸钙法 ($P < 0.05$), 而 Lonza 电转法的细胞存活率高于 Lipo2000 转染法 ($P < 0.05$)。提示, Lonza 电转法是较适合转染 pHA-HBx 至 HepG2 肝癌细胞的方法, 其转染效率高, 且细胞毒性小, 可用于 HepG2 肝癌细胞的转染。

参考文献

- [1] Neuveut C, Wei Y, Buendia MA. Mechanisms of HBV-related hepatocarcinogenesis[J]. J Hepatology, 2010, 52(4):594-604.
- [2] Keng VW, Tschida BR, Bell JB, et al. Modeling hepatitis B virus X-induced hepatocellular carcinoma in mice with the Sleeping Beauty transposon system[J]. Hepatology, 2011, 53(3):781-790.
- [3] Günther S, Li BC, Miska S, et al. A novel method for efficient amplification of whole hepatitis B virus genome permits rapid functional analysis and reveals deletion mutants in immunosuppressed patients[J]. J Virol, 1995, 69(9):5437-5444.
- [4] Ebadi P, Karimi MH, Pourfathollah AA, et al. The efficiency of CD40 down regulation by siRNA and antisense ODN: comparison of lipofectamine and FuGENE6[J]. Iran J Immunol, 2009, 6(1):1-11.

- [5] 支德福, 王冰, 崔韶辉, 等. 两种阳离子脂质体介导基因转染的比较研究[J]. 药学学报, 2009, 44(5):553-557.
- [6] 杨建青, 吕新生. HBx 在肝细胞癌发生发展中的作用机制[J]. 中国普通外科杂志, 2008, 17(3):277-279.
- [7] Lucifora J, Arzberger S, Durantel D, et al. Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection[J]. J Hepatology, 2011, 55(5):996-1003.
- [8] Sung WK, Lu Y, Lee CW, et al. Deregulated direct targets of the hepatitis B virus (HBV) protein, HBx, identified through chromatin immunoprecipitation and expression microarray profiling[J]. J Biol Chem, 2009, 284(33):21941-21954.
- [9] Feng H, Zhang J, Li X, et al. HBX-mediated migration of HBV-replicating HepG2 cells: insights on development of hepatocellular carcinoma[J]. J Biomed Biotechnol, 2009, 930268. doi: 10.1155/2009/930268.
- [10] Colosimo A, Goncz KK, Holmes AR, et al. Transfer and expression of foreign genes in mammalian cells[J]. Biotechniques, 2000, 29(2):314-318.
- [11] 焦德敏, 于慧慧, 张铸业, 等. 磷酸钙法将 MMP-2、MMP-3 双基因干扰载体转入 HEK293T 细胞的效率观察[J]. 贵州大学学报: 自然科学版, 2009, 26(6):60-62.
- [12] 李永伟, 卢建溪, 郭云蔚, 等. 磷酸钙法与脂质体法转染 HBV 全基因组的比较[J]. 中国热带医学, 2010, 10(6):656-657.
- [13] 杨云延, 付崇罗. 阳离子脂质体 Lipofectamine 2000 对 PC12 细胞转染效率的研究[J]. 生物技术通报, 2011, 26(5):231-235.
- [14] 钱亚芳, 谷满仓. 阳离子脂质体在基因转染载体中的研究进展[J]. 中国药师, 2008, 11(9):1041-1043.
- [15] 菅辉玲, 董瑾, 程江, 等. 脂质体及电穿孔法对大鼠雪旺细胞转染效率的比较与分析[J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2013, 34(6):826-829.
- [16] 金娟, 王保龙, 完晓菊, 等. 人肺腺癌细胞总 RNA 电穿孔法转染的树突状细胞疫苗的体外抗肿瘤效应研究[J]. 中国输血杂志, 2011, 24(5):405-410.
- [17] Saeboe-Larssen S, Fossberg E, Gaudernack G. mRNA-based electrotransfection of human dendritic cells and induction of cytotoxic T lymphocyte responses against the telomerase catalytic subunit(hTERT)[J]. J Immunol Methods, 2002, 259(1/2):191-203.
- [18] 李艳, 张必良. VEGFR1 基因特异性 siRNA 的筛选[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(18):7862-7864.
- [19] Li SD, Huang L. Gene therapy progress and prospects: non-viral gene therapy by systemic delivery[J]. Gene Ther, 2006, 13(18):1313-1319.
- [20] Davis ME. Non-viral gene delivery systems[J]. Curr Opin Biotechnol, 2002, 13(2):128-131.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 任建军, 孟兴凯, 牛剑祥. 不同方法 HBx 基因表达质粒转染肝癌 HepG2 细胞的效果比较[J]. 中国普通外科杂志, 2014, 23(7):936-940. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.07.014
Cite this article as: REN JJ, MENG XK, NIU JX, et al. Comparison of different methods for HBx gene transfection into HepG2 cells[J]. Chin J Gen Surg, 2014, 23(7):936-940. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.07.014

关于一稿两投和一稿两用问题处理的声明

本刊编辑部发现仍有个别作者一稿两投和一稿两用, 为了维护本刊的声誉和广大读者的利益, 本刊就一稿两投和一稿两用问题的处理声明如下。

1. 一稿两投和一稿两用的认定: 凡属原始研究的报告, 同语种一式两份投寄不同的杂志, 或主要数据和图表相同、只是文字表达可能存在某些不同之处的两篇文稿, 分别投寄不同的杂志, 属一稿两投; 一经为两杂志刊用, 则为一稿两用。会议纪要、疾病的诊断标准和防治指南、有关组织达成的共识性文件、新闻报道类文稿分别投寄不同的杂志, 以及在一种杂志发表过摘要而将全文投向另一杂志, 不属一稿两投。但作者若要重复投稿, 应向有关杂志编辑部作出说明。

2. 作者在接到收稿回执后满 3 个月未接到退稿通知, 表明稿件仍在处理中, 若欲投他刊, 应先与本刊编辑部联系。

3. 编辑部认为文稿有一稿两投或两用嫌疑时, 应认真收集有关资料并仔细核对后再通知作者, 在作出处理决定前请作者就此问题作出解释。编辑部与作者双方意见发生分歧时, 由上级主管部门或有关权威机构进行最后仲裁。

4. 一稿两投一经证实, 则立即退稿, 对该作者作为第一作者所撰写的论文, 2 年内将拒绝在本刊发表; 一稿两用一经证实, 将择期在杂志中刊出作者姓名、单位以及该论文系重复发表的通告, 对该作者作为第一作者所撰写的论文, 2 年内拒绝在本刊杂志发表。本刊将就此事向作者所在单位和该领域内的其他科技期刊进行通报。

中国普通外科杂志编辑部