



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.08.012
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2015.08.012
Chinese Journal of General Surgery, 2015, 24(8):1116-1120.

· 基础研究 ·

电穿孔法和化学法在多药耐药胃癌细胞转染中的效果比较

杨蔚^{1,2}, 张毅³, 钟玲⁴, 吴边², 杨金伟², 赵四晖², 陈嘉勇³

(1. 昆明医科大学, 云南昆明 650500; 云南省第一人民医院 2. 普外二科 4. 急诊 ICU, 云南昆明 650032; 3. 昆明医科大学第二附属医院 急诊科, 云南昆明 650101)

摘要

目的: 比较电穿孔法和化学法在多药耐药 (MDR) 胃癌细胞中转染效果。

方法: 将表达抑癌基因 WTX 的质粒分别用电穿孔法和两种化学法 (Lipofectamine2000、Attractene) 转染 MDR 胃癌 SGC7901/VCR 细胞, 观察转染后细胞中增强型绿色荧光蛋白 (eGFP) 和目的基因 WTX mRNA 的表达情况。

结果: eGFP 分析结果显示, 与无耐药的亲代 SGC7901 细胞比较, 两种化学转染法对 SGC7901/VCR 细胞的转染效率明显降低 (均 $P < 0.05$), 而电穿孔转染法未见明显降低 ($P > 0.05$), 且明显高于两种化学转染法对 SGC7901/VCR 细胞的转染效率 (均 $P < 0.05$)。RT-PCR 结果显示, 电穿孔转染的 SGC7901/VCR 细胞中 WTX mRNA 表达量明显高于两种化学法转染的 SGC7901/VCR 细胞中的 WTX mRNA 表达量 (均 $P < 0.05$)。

结论: 对于 MDR 胃癌细胞, 电穿孔转染法不易受其细胞膜成分的影响, 可以保持较好的转染效率。

关键词

胃肿瘤; 转染; 电穿孔; 多药耐药相关蛋白质类

中图分类号: R735.2

Comparison of electroporation and chemical agent transfection in gastric cancer cells with multidrug resistance

YANG Wei^{1,2}, ZHANG Yi³, ZHONG Ling⁴, WU Bian², YANG Jinwei², ZHAO Sihui², CHEN Jiayong³

(1. Kunming Medical University, Kunming 650500, China; 2. The Second Department of General Surgery 4. Department of Emergency ICU, Yunnan First People's Hospital, Kunming 650032, China; 3. Department of Emergency Medicine, the Second Affiliated Hospital, Kunming Medical University, Kunming 650101, China)

Abstract

Objective: To compare the transfection efficiency of electroporation and chemical transfection agents in multidrug-resistant (MDR) gastric cancer cells.

Methods: MDR gastric cancer SGC7901/VCR cells were transfected with plasmids bearing tumor suppressor gene WTX through electroporation method and two chemical agents (Lipofectamine2000 and Attractene), respectively. Then, the expression of enhanced green fluorescent protein (eGFP) and the WTX mRNA in the cells after transfection were examined.

Results: Results of eGFP analysis showed that in SGC7901/VCR cells compared with the parental non-drug-

基金项目: 云南省科技厅-昆明医科大学联合专项基金资助项目 (2010CD165); 云南省卫生科技计划资助项目 (2012NS046); 云南省应用基础研究重点资助项目 (2011FA029); 云南省应用基础研究面上项目 (2013FZ295)。

收稿日期: 2015-06-03; **修订日期:** 2015-07-17。

作者简介: 杨蔚, 昆明医科大学博士研究生 / 云南省第一人民医院主治医师, 主要从事胃肠道肿瘤方面的研究。

通信作者: 陈嘉勇, Email: 24795812@qq.com

resistant SGC7901 cells, the transfection efficiencies of both chemical methods were significantly decreased (both $P < 0.05$), but the transfection efficiency of electroporation exhibited no significant decrease ($P > 0.05$), which was significantly higher than that of either chemical agent (both $P < 0.05$). Results of RT-PCR showed that the WTX mRNA expression level in SGC7901/VCR cells undergoing electroporation transfection was significantly higher than that in those transfected by the two chemical agents (both $P < 0.05$).

Conclusion: In MDR gastric cancer cells, electroporation transfection will not be influenced easily by their cell membrane components, and can maintain its transfection efficiency.

Key words Stomach Neoplasms; Transfection; Electroporation; Multidrug Resistance-Associated Proteins

CLC number: R735.2

胃癌是我国常见恶性肿瘤,发病率居于第2位,仅次于肺癌,而病死率居第3位,术后长期生存率也不高^[1-3]。化疗是胃癌综合治疗中一种重要的方法,而肿瘤细胞对化疗药物产生多药耐药(multidrug resistance, MDR)是化疗失败及胃癌复发的重要原因。笔者^[4]前期实验以MDR胃癌细胞SGC7901/VCR为模型研究一个新的抑癌基因WTX(Wilms'tumor gene on the X-chromosome)。在进行WTX质粒转染时发现SGC7901/VCR转染效率明显低于非耐药的亲代SGC7901,分析原因可能是耐药株高表达的P-gp“泵”将转染试剂和质粒排出细胞,降低了转染效率。本研究将电穿孔法和两种化学转染法进行对比,探讨电穿孔转染法在化学试剂难以转染的细胞系中的应用。

1 材料与方法

1.1 实验材料与设备

人耐药胃癌细胞SGC7901/VCR和亲代细胞SGC7901由西安第四军医大学肿瘤生物学国家重点实验室提供。SGC7901/VCR细胞培养时加入1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的VCR以维持其耐药性。携带WTX基因的质粒(大小为12 087 bp)和空载体质粒(均带有增强型绿色荧光蛋白, eGFP)由本实验组保存。

Opti-MEM培养液(No: 31985-070, GIBCO), RPMI 1640培养液(No: C11875500BT, GIBCO)。胎牛血清FBS(No: 10099-141, GBICO)。Lipofectamine 2000(No: 11668-09, invitrogen), Attractene Transfection Reagent(No: 301005, QIAGEN), 总RNA抽提试剂盒(No: K0731, Thermo), 反转录试剂盒(No: K1622, Thermo)。PCR仪(iCycler Thermal Cycler, BIO-RAD)和凝胶图像分析系统(Biosens

SC710, BIOTOP), 荧光倒置显微镜(Ti-S, Nikon)。GenePulser Xcell电穿孔仪和电击槽(Bio-Rad), 使用2 mm石英电转杯。所有无菌操作均在Thermo生物安全柜内进行。

1.2 方法

1.2.1 分组和转染 分别将SGC7901和SGC7901/VCR细胞分为Lipofectamine转染组、Attractene转染组和电穿孔转染组。将对数生长期的细胞接种于六孔板中,每孔约 2×10^5 个细胞。接种后培养12 h,待细胞贴壁后开始转染。

1.2.2 化学法转染 Lipofectamine 2000和Attractene转染均按说明书标准流程进行操作,48 h后荧光显微镜下观察,拍照。Attractene转染过程中无需换液。

1.2.3 电穿孔转染 (1)细胞处理:SGC7901/VCR制成细胞悬液。计数后分组,每组约 5×10^6 个细胞。800 r/min离心5 min,去上清后用400 μL 的电转液(无血清无抗生素的Opti-MEM)重新悬起。(2)质粒用量:电穿孔转染法的质粒用量比较大,根据预实验结果每组选择加入20 μg 质粒。(3)电转方法:将细胞悬液和质粒混匀后,移至灭菌处理的电转杯内,冰上静置40 min。将电转杯置于电击槽中,按测量值设定电阻。根据说明书和笔者前期实验确定的条件,设定电压250 V,电容300 μF ,单次脉冲电击。电击后室温下静置10 min,冰上静置10 min。将细胞悬液吸入2 mL EP管内,加入1 mL的1640完全培养液,600 r/min离心10 min。弃上清,4 mL完全培养液(含15%~20% FBS)悬起,放入六孔板继续培养。48 h后荧光显微镜下观察,拍照。

1.2.4 转染效率的测定 经试剂和电穿孔转染的细胞培养48 h后,消化、离心收集细胞,将细胞悬液滴加入细胞计数板。以200倍的视野为标准,2人同时独立观察相同视野,在光镜下计数细胞总

数, 荧光显微镜下计数发出绿色荧光的细胞数, 每孔共计5个高倍镜视野。发绿色荧光的细胞数与总数相比就是转染率: 转染率 = (绿色荧光细胞数 / 细胞总数) × 100%, 取5个视野平均值, 每组3孔均值为转染效率最终结果。

1.2.5 RT-PCR 检测 WTX mRNA 的表达 分别收集各组细胞, 裂解细胞, 提取总 RNA, 反转生成 cDNA。WTX 正义引物: 5'-GAC AAT AAC CGG GCT AGG AAC-3', 反义引物: 3'-GCC ATC GTG GGT CTT GCT CTT G-5', 退火温度 58.7 °C, 产物长度 426 bp; GAPDH 正义引物: 5'-CAA GGT CAT CCA TGA CAA CTT TG-3', 反义引物: 5'-GTC CAC CAC CCT GTT GCT GTA G-5', 退火温度 57 °C, 产物长度 496 bp。PCR 扩增条件: 95 °C 4 min, 95 °C 30 s, 58.7 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环, 72 °C 延伸 10 min。RT-PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统拍照, 分析灰度值。实验重复 3 次。

1.3 统计学处理

实验所得数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 应用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。多组间比较采用方差分析或秩和检验, 进一步两组间比较采用 q 检验或秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 荧光显微镜下观察与转染效率的比较

前期实验发现转染后 48 h 绿色荧光蛋白表

达最强, 故均观察转染 48 h 后细胞的形态和绿色荧光蛋白表达^[5]。SGC7901 细胞贴壁生长良好, 形态正常; SGC7901/VCR 细胞形态与 SGC7901 稍有不同。SGC7901 的 Lipofectamine 转染组和 Attractene 转染组有荧光表达, 而 SGC7901/VCR 的 Lipofectamine 转染组和 Attractene 转染组荧光表达明显减弱(表 1)。SGC7901 和 SGC7901/VCR 的电穿孔转染组均有明显的绿色荧光蛋白表达, 以 SGC7901/VCR 的电穿孔转染组为明显(图 1)。

转染效率分析显示, 3 种转染方式对 SGC7901 细胞的转染效率差异无统计学差异 ($P > 0.05$), 但两种化学转染法对 SGC7901/VCR 细胞的转染效率明显降低, 与 SGC7901 细胞比较有统计学差异 (均 $P < 0.05$), 而电穿孔转染对 SGC7901/VCR 细胞的转染效率, 与 SGC7901 细胞比较无统计学差异 ($P > 0.05$), 明显高于两种化学转染法对 SGC7901/VCR 细胞的转染效率 (均 $P < 0.05$)。

2.2 RT-PCR 检测转染后 WTX mRNA 表达情况

各组中阴性对照没有任何条带出现, 阳性对照各组 GAPDH 产物为 496 bp, 条带位置正确, 亮度一致。WTX 组产物为 426 bp, 条带位置正确, 对照组和空载体组都有淡条带出现, 说明 WTX 在 SGC7901/VCR 细胞中有表达。而转染 WTX 质粒后条带亮度明显增加(图 2)。灰度比值结果显示, Lipofectamine 转染后 WTX mRNA 表达上调不明显, Attractene 转染和电穿孔转染后 WTX mRNA 表达有明显增加, 而电穿孔组的 WTX mRNA 表达量均高于前两者 (均 $P < 0.05$) (表 2)。

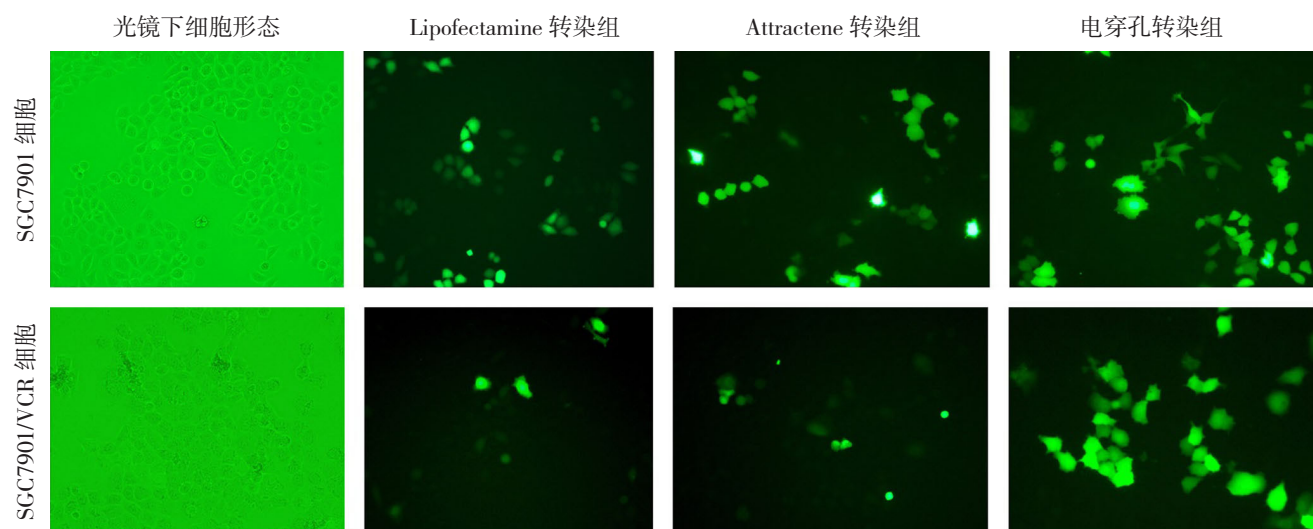


图 1 镜下各组细胞形态及转染后 48 h 荧光表达 (×200)

Figure 1 Cell shapes and fluorescence expressions 48 h after transfection in each group (×200)

表 1 不同转染方法转染率的比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of the transfection efficiencies among different transfection methods (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	SGC7901	SGC7901/VCR
Lipofectamine 转染组	24.98 ± 2.80	11.46 ± 3.63 ^{1), 2)}
Attractene 转染组	30.09 ± 3.34	16.98 ± 1.40 ^{1), 2)}
电穿孔转染组	34.17 ± 4.38	32.13 ± 2.59

注: 1) 与电穿孔转染组比较, $P < 0.05$; 2) 与 SGC7901 细胞比较, $P < 0.05$

Note: 1) $P < 0.05$ vs. electroporation transfection group; 2) $P < 0.05$ vs. SGC7901 cells

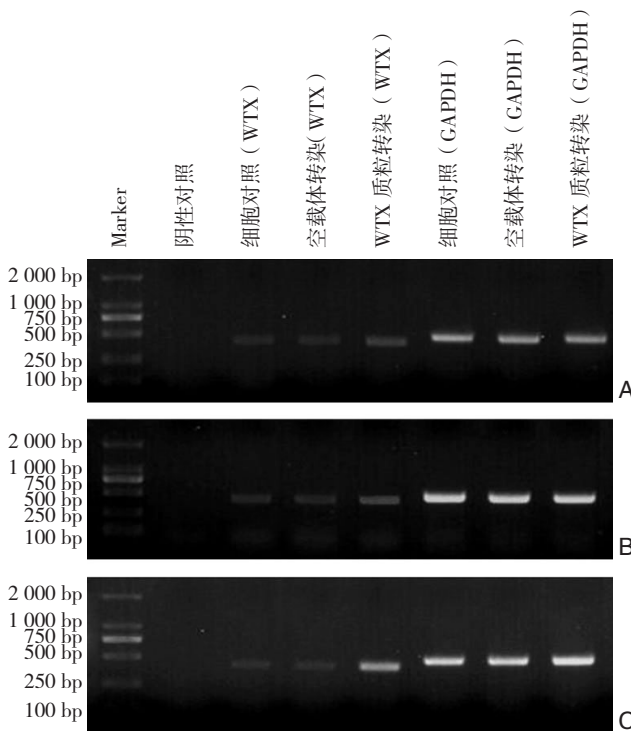


图 2 琼脂糖凝胶电泳结果 A: Lipofectamine 转染组, B: Attractene 转染组, C: 电穿孔转染组

Figure 2 Agarose gel electrophoresis A: Lipofectamine transfection; B: Attractene transfection; C: Electroporation transfection

表 2 各组 WTX mRNA 表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of the WTX mRNA expression levels among groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞对照	空载体转染	WTX 转染
Lipofectamine 转染组	0.448 ± 0.016	0.464 ± 0.023	0.514 ± 0.020 ¹⁾
Attractene 转染组	0.355 ± 0.019	0.346 ± 0.013	0.517 ± 0.024 ¹⁾
电穿孔转染组	0.420 ± 0.023	0.417 ± 0.009	0.835 ± 0.026

注: 1) 与电穿孔转染组比较, $P < 0.05$

Note: 1) $P < 0.05$ vs. electroporation transfection group

3 讨 论

细胞转染对细胞生物学和分子生物学以及

肿瘤防治等科学研究有十分重要的意义^[6-7]。转染方法主要包括病毒法和非病毒载体法。非病毒载体转染法中运用最广泛的主要有阳离子脂质体 Lipofectamine2000 和电穿孔法。若化学法转染某些类型细胞的效率不高或有毒性时, 电穿孔法是一种有用的方法^[8]。脂质体法的转染效率受下列因素影响: (1) 转染时质粒的量^[9]; (2) 质粒和脂质体的比例^[10]; (3) 随插入片段长度的增加, 报告基因表达降低^[11]。与 Lipofectamine2000 相比较, 本实验采用的另一种转染试剂是 Attractene, 其操作更简单, 细胞毒性更低。但 Attractene 可能也不适用于某些特殊细胞的转染^[12]。电穿孔 (electroporation) 可促进非渗透性外源性大分子物质, 如基因、药物等进入细胞^[13]。电穿孔技术具有可重复性、高效、大量样本处理等优点, 对化学法转染效率低的细胞具有较好的效果^[14]。本实验研究的 WTX 蛋白由 1 135 个氨基酸组成^[15], 合成质粒中编码区 (CDS) 约 3 408 bp, 质粒构建后大小约 12 087 bp。实践证明, 脂质体法转染很难获得高转染效率。

SGC7901/VCR 是具有以 P170 糖蛋白 (P-gp) 高表达为特点的典型的肿瘤 MDR 细胞, 是 MDR 相关研究和实验良好的细胞模型^[16]。P-gp 是一个能量依赖的膜结合蛋白, 属于三磷酸腺苷结合盒 (ABC) 转运子^[17], 高表达的 P-gp 被认为是 MDR 的主要原因^[18-19], 其表达程度与肿瘤预后密切相关^[20]。前期实验中应用 Lipofectamine2000 和 Attractene 在转染耐药细胞 SGC7901/VCR 发现转染效率很低, 影响了进一步实验的继续进行。分析原因可能是: 其高表达的 P-gp 将转染试剂和质粒泵出细胞而降低了细胞内质粒的浓度, 影响了转染效率。与文献^[21]报道相似, 本实验亦证实电穿孔这样的物理方法能明显提高耐药细胞的转染效率, 可满足实验的需要, 为进一步的研究 WTX 在耐药胃癌细胞中的作用创造了条件。

不同电击条件转染效率不同, 随电击强度上升, 转染效率也可提高, 但细胞死亡率也随之增高。需通过对比不同的电击条件对细胞转染效率和死亡率的影响, 选择合适的电击条件。另外, 电击前后置于冰水浴低温条件下、提高初始细胞浓度、转染后提高培养液中 FBS 含量 (15%~20%) 等方法均有利于保证电击后存活细胞量足够满足实验要求。

综上所述, 化学转染法在操作方面比电穿

孔法优越,大多数细胞用化学转染法就可以获得较高的转染率。而电穿孔法对细胞种类的适用性方面比化学转染法产^[22]。新一代的转染试剂 Attractene 对于普通细胞的转染优于传统的阳离子脂质体 Lipofectamine 2000。而对于耐药细胞等特殊细胞的转染,电穿孔转染法则不易受细胞膜成分的影响,能显著提高转染效率,满足实验要求。

参考文献

- [1] 邹小农,孙喜斌,陈万青,等. 2003—2007年中国胃癌发病与死亡情况分析[J]. 肿瘤, 2012, 32(2):109-114.
- [2] 代敏,任建松,李霓,等. 中国2008年肿瘤发病和死亡情况估计及预测[J]. 中华流行病学杂志, 2012, 33(1):57-61.
- [3] Henning GT, Schild SE, Stafford SL, et al. Results of irradiation or chemoradiation following resection of gastric adenocarcinoma[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2000, 46(3):589-598.
- [4] Rivera MN, Kim WJ, Wells J, et al. An X chromosome gene, WTX, is commonly inactivated in Wilms tumor [J]. Science, 2007, 315(5812): 642-645
- [5] 杨蔚,张毅,钟玲,等. 抑癌基因WTX对胃癌SGC-7901细胞增殖、凋亡及细胞周期的影响[J]. 中国普通外科杂志, 2015, 24(4):511-516.
- [6] 张舟,邵一鸣. 体内电穿孔技术在DNA疫苗及基因治疗领域的应用进展[J]. 中国热带医学, 2013, 13(3):371-374.
- [7] 于哲,耿捷,戴霞,等. 异体肿瘤mRNA电转染DC疫苗的特异性抗骨肉瘤免疫学效应[J]. 免疫学杂志, 2013, 29(2):93-98.
- [8] Takei H, Baba Y, Hisatsune A, et al. Glycyrrhizin inhibits interleukin-8 production and nuclear factor- κ B activity in lung epithelial cells, but not through glucocorticoid receptors[J]. J Pharmacol Sci, 2008, 106(3):460-468.
- [9] 许期年,王秀云,左剑玲,等. 3种脂质体介导法转染大鼠小胶质细胞的比较研究[J]. 山东医药, 2011, 51(4):35-37.
- [10] 段艳,王冰,崔韶辉,等. 阳离子脂质体转染Hela细胞的实验[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(11):2119-2122.
- [11] Yin W, Xiang P, Li Q. Investigations of the effect of DNA size in transient transfection assay using dual luciferase system[J]. Anal Biochem, 2005, 346(2):289-294.
- [12] 路君,赵红州,陈津,等. 新型化学转染试剂对人脐带间充质干细胞的转染优化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(49):9151-9154.
- [13] Jaroszeski MJ, Dang V, Pottinger C, et al. Toxicity of anticancer agents mediated by electroporation in vitro[J]. Anticancer Drugs, 2000, 11(3):201-208.
- [14] 窦立萍,刘军华,王畅,等. 电穿孔转染K562细胞的效率研究[J]. 军医进修学院学报, 2008, 29(5):420-421.
- [15] 覃创,陈嘉勇,梁道明. WTX基因在肿瘤中的研究进展[J]. 重庆医学, 2012, 41(5):502-504.
- [16] 蔡学君,张学庸,樊代明,等. 胃癌多药耐药细胞株的建立及其生物学特征[J]. 中国肿瘤临床, 1994, 21(S1):73-75.
- [17] Loo TW, Clarke DM. Recent progress in understanding the mechanism of P-glycoprotein-mediated drug efflux[J]. J Membr Biol, 2005, 206(3):173-185.
- [18] Gillet JP, Efferth T, Remacle J. Chemotherapy-induced resistance by ATP-binding cassette transporter genes[J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1775(2):237-262.
- [19] Krech T, Scheuerer E, Geffers R, et al. ABCB1/MDR1 contributes to the anticancer drug-resistant phenotype of IPH-926 human lobular breast cancer cells[J]. Cancer Lett, 2012, 315(2):153-160.
- [20] Rao ChV, Li X, Manna SK, et al. Human chorionic gonadotropin decreases proliferation and invasion of breast cancer MCF-7 cells by inhibiting NF- κ B and AP-1 activation[J]. J Biol Chem, 2004, 279(24):25503-25510.
- [21] 张禾璇,单可人,何燕,等. 脂质体法与电穿孔法转染两种细胞效率的比较[J]. 重庆医学, 2014, 43(33):4432-4433.
- [22] 钱锋,肖成祖. 脂质体法和电穿孔法转染哺乳动物细胞研究[J]. 生物化学与生物物理进展, 1999, 26(3):289-291.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 杨蔚,张毅,钟玲,等. 电穿孔法和化学法在多药耐药胃癌细胞转染中的效果比较[J]. 中国普通外科杂志, 2015, 24(8):1116-1120. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.08.012

Cite this article as: YANG W, ZHANG Y, ZHONG L, et al. Comparison of electroporation and chemical agent transfection in gastric cancer cells with multidrug resistance[J]. Chin J Gen Surg, 2015, 24(8):1116-1120. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.08.012