

大鼠血管内皮细胞 siRNA 转染条件的优化

郭昭涵, 李银河, 庞振凌, 彭明星, 黄冉涛, 王燕华

(南阳师范学院 生命科学与技术学院, 河南 南阳 473000)

摘要:目的:旨在优化 siRNA 转染大鼠血管内皮细胞的转染条件.方法:将 0.75 μL 和 1.5 μL 的脂质体 LipofectamineTM3000 分别与 20、40、60、80 nmol 带荧光标记的 FAMsiRNA 组合,转染 6、12、18、24 h 后,用荧光显微镜计数阳性细胞率、MTT 法检测各浓度条件下内皮细胞的存活率,筛选最优转染条件.结果:(1)转染 12 h 后,用荧光显微镜检测 20、40、60、80 nmol 各组,均可观察到绿色荧光(2)siRNA 浓度为 60 nmol/L,脂质体为 1.5 μL 的组合转染效率最高,继续增加 siRNA 的浓度,转染效率提高不明显.(3)转染时间超过 24 h,各组细胞荧光减弱,细胞死亡率显著增加.结论:结果表明,以 1.5 μL LipofectamineTM3000 与 60 nmol/L 的 siRNA 浓度组成转染混合物转染 12 h 可以实现对大鼠血管内皮细胞高效转染并保持较高的细胞活性.

关键词:血管内皮细胞;脂质体;siRNA;转染

中图分类号:Q291

文献标志码:A

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是指在进化过程中高度保守的、由双链 RNA 诱发的、同源 mRNA 高效特异性降解的现象^[1-3]. RNA 干扰具有高效、稳定、快速、序列特异性强等优点. siRNA 技术已经在乙型肝炎、恶性肿瘤及病毒性感染类疾病中广为应用.同时, RNAi 对阐明信号传导通路、新型药物开发等方面有着重要指导意义^[4].在 RNAi 实验中,其关键因素在于转染载体的选择以及提高转染效率.阳离子脂质体是介导基因转染实验中较为常用的转染载体,其中 LipofectamineTM3000 作为广谱转染试剂,具有转染效率高,重复性好,细胞毒性小,适用性广,生物安全性高等优点,而且对 DNA 和 RNA 均可高效转染^[5],但目前该载体运用于大鼠血管内皮细胞转染效率的研究鲜见.本实验旨在探究并优化利用大鼠血管内皮细胞转染条件,以阳离子脂质体 LipofectamineTM3000 为转染载体,将人工合成的带绿色荧光的 siRNA 高效转染至内皮细胞内,筛选脂质体与 siRNA 浓度配比,进而探讨了 siRNA 浓度与脂质体的最佳比值以及最佳转染时间,为进一步基因功能的研究提供实验依据.

1 材料与方法

1.1 材料

SD 大鼠 200~250 g,共 10 只,SPF 级,雄性,购于武汉大学动物实验中心,饲养温度稳定在(28±3)℃,湿度 50%±20%.

1.1.1 主要试剂与仪器

LipofectamineTM3000(美国 Invitrogen 公司)、FAM-siRNA(上海吉玛基因公司)、EBM 内皮细胞培养基(美国 LONZA 公司)、Opti-MEM Reduced Serum Media(美国 Gibco 公司)、噻唑蓝(MTT)(上海 SERVA 公司)、MCO-17A 型 CO₂ 恒温培养箱(日本 Sanyo 公司)、TE 2000-U 型倒置光学显微镜(日本 Nikon 公

收稿日期:2015-09-10;修回日期:2015-10-20.

基金项目:国家自然科学基金项目(11101092);国家自然科学基金(81260266);河南省教育厅自然科学基金基础研究项目(12B130003);南阳师范学院高层次人才科研启动项目(zx2013025).

第 1 作者简介:郭昭涵(1987-),男,河南开封人,南阳师范学院硕士研究生,研究方向:心血管疾病病理研究,E-mail:250142165@qq.com.

通信作者:王燕华,女,博士,讲师,E-mail:nywyhua@hotmail.com.

司)、iMark-15789型酶标仪。

1.2 方法

1.2.1 内皮细胞的培养

内皮细胞的原代培养采用文献^[6]的方法。原代内皮细胞培养于EBM培养基中,置于含5% CO₂的37℃细胞培养箱中培养。细胞密度至70%左右时进行传代。传至2~3代的细胞,按每孔密度 1×10^5 个,接种于24孔板内。每孔加入EBM培养基200 μL,转染时细胞密度达到50%~70%。

1.2.2 siRNA脂质体转染复合物的配制

首先,用无血清OptiMEM培养液稀释siRNA,使siRNA终浓度为20 nmol/L、40 nmol/L、6 nmol/L、80 nmol/L。其次,用OptiMEM培养液分别稀释0.75、1.5 μL LipofectamineTM3000试剂,并在室温下孵育5 min。最后将两组稀释完成的LipofectamineTM3000分别与各浓度的siRNA充分混合,室温下孵育20 min,即可获得相应的转染混合物。

1.2.3 转染

转染细胞前,先将培养基移去,并用灭菌过的PBS洗涤细胞2~3次,加入200 μL EBM培养基。然后,将各组不同浓度的复合物加入各孔中,混匀,放入培养箱中培养。培养6 h后,更换新鲜的EBM培养基,继续培养。在转染6 h、12 h、18 h、24 h后,在倒置荧光显微镜下观察各组细胞,并拍照及计数分析。

1.2.4 转染效率测定

用倒置荧光显微镜,在转染6 h、12 h、18 h、24 h后观察各组细胞siRNA荧光显色情况。观察时,每孔寻找3个具有代表性视野,每个视野内观察100个细胞,计数阳性细胞率。

1.2.5 四甲基偶氮唑盐(MTT)试验

将内皮细胞接种于96孔板内(各孔细胞的数目、LipofectamineTM3000、siRNA的量均为24孔板的1/4),每组设5个复孔,1个只加培养液的空白对照组。另设5个阴性对照孔(不进行转染)。转染24 h后,移去各孔培养液并用PBS洗涤细胞3~5次。洗涤完毕后,向每孔中加入200 μL EBM培养基,并加入10 μL MTT溶液,37℃、5%CO₂继续孵育培养3~4 h。孵育完成后,移去每孔内培养上清液并加入100 μL DM-SO。将96孔板置于酶标仪中,震荡10 min,选择波长为490 nm。酶标仪调零后,测量每孔吸光度。细胞存活率(%)=实验组光吸收值/对照组光吸收值 $\times 100\%$

1.3 统计学处理

采用SPSS19.0统计软件进行数据分析,统计结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为统计学有显著差异。

2 结果

2.1 荧光显微镜观察 siRNA 转染内皮细胞

FAMsiRNA为绿色荧光标记。转染后可根据细胞内绿色荧光的细胞数量,来判断阳性细胞的数量。通过荧光显微镜观察,20 nmol/L、40 nmol/L、60 nmol/L、80 nmol/L的各siRNA转染组均可见绿色荧光(图1中,a,b,c,d分别为siRNA各浓度下转染6 h后观察结果),表明FAMsiRNA可以成功转染大鼠内皮细胞。在同倍数视野中,随siRNA浓度增加,荧光细胞数量呈正相关,siRNA浓度超过60 nmol/L后,荧光细胞数目增加不明显,见图1。

2.2 不同浓度的 siRNA 对内皮细胞转染效率的影响

实验结果显示,随着siRNA浓度增高,细胞转染效率成正相关。但siRNA浓度大于60 nmol/L后,转染效率无明显增加。此外,相同浓度的siRNA,1.5 μL的LipofectamineTM3000脂质体转染效率高于0.75 μL,两组差异有统计学意义($P < 0.05$)。当siRNA浓度为60 nmol/L时,阳性细胞率达81.56%,转染效率最高,见表1。

2.3 不同时间对内皮细胞转染效率的影响

由于60 nmol/L siRNA进行转染内皮细胞的效率较高,所以检测6 nmol/L的siRNA转染细胞6 h,

12 h, 18 h, 24 h 后的细胞的存活率情况, 采用 MTT 法检测各时间点 EC 的吸光度, 从而计算细胞存活率. 检测结果显示, 内皮细胞转染 6 h, 12 h 后, 细胞存活率分别为 95%, 91%, 转染 18 h, 24 h 后, 细胞存活率分别为 77%, 71%. 可知, 转染时间超过 12 h 后, 细胞凋亡率增加, 细胞存活率显著下降, 见图 2.



图1 荧光显微镜观察各组转染结果 ($\times 40$)

表1 不同浓度 siRNA 组的转染效率比较
($\bar{x} \pm s, \%, n=3$)

siRNA 浓度 ($\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	0.75 μL		1.5 μL	
	Lipofectamine 组		CLipofectamine 组	
20	24.58 \pm 0.071		28.45 \pm 1.129	
40	58.71 \pm 1.432		63.09 \pm 0.746 *	
60	76.84 \pm 1.335		81.56 \pm 1.031 *	
80	72.70 \pm 0.578		74.36 \pm 2.204	

注: * $P < 0.05$, 在相同 siRNA 浓度下, 分别与 0.75 μL 脂质体组比较.

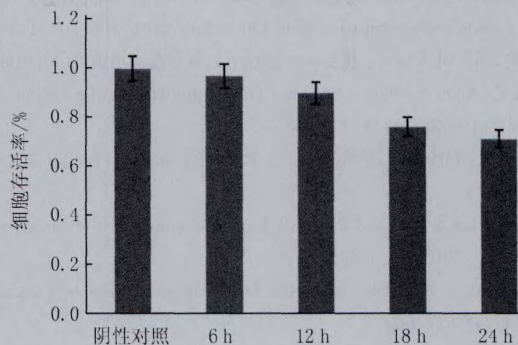


图2 MTT法检测60 nmol/L的siRNA转染不同时间的细胞存活率

3 讨论

RNA 干扰 (RNA interference RNAi) 是指生物体内由双链 RNA 诱发的、高度保守的同源 mRNA 特异性降解的现象. 宿主细胞进行转录时, 会产生一些双链 RNA (double stranded RNA, dsRNA), 细胞质中的核酸内切酶将 dsRNA 切割成多个具有特定功能的小片段 RNA 即 siRNA. siRNA 和胞内多种核酸酶之间相互作用, 形成沉默复合物 (RNA-induced silencing complex, RISC). RISC 与 mRNA 同源区特异性结合, 使得 RISC 具有切割 mRNA 的功能, 从而诱发宿主细胞针对 mRNA 的降解反应. RNAi 是转录后水平的基因沉默机制, 通常又称为转录后基因沉默 (post-transcriptional gene silencing, PTGS)^[7-8]. RNAi 作为一种高效的特异性去除和沉默基因技术, 在基因功能探究领域发展极为迅速. 同时为感染性疾病、肿瘤、自身免疫性疾病等诸多疾病的治疗和预防开辟了新的思路^[9].

在 RNA 干扰的研究中, 实验成功的重点在于如何将外源性的 siRNA 高效、快速转染进目的细胞. 因此, 转染载体的选择尤为关键. 目前研究表明, 阳离子脂质体作为载体, 具有重复性强, 实验结果可靠等优点, 是转染实验中较为常见的载体工具^[10-12]. 脂质体在细胞内可以迅速地同带阴离子的 DNA、RNA 相结合, 形

成带正电荷的脂质体复合物。复合物与细胞膜融合后通过内吞作用将 DNA、RNA 导入目的细胞^[13]。本实验选择阳离子脂质体 Lipofectamine™ 3000 作为转染载体,通过正交实验,筛选脂质体用量与 siRNA 浓度的最适配比,最终确定大鼠内皮细胞低毒性、高转化率的最佳转染条件^[14-17]。

本实验发现,采用 0.75 mL、1.5 μ L 两种体积的 Lipofectamine™ 3000 进行转染其转染内皮细胞效率差异明显,当 siRNA 的浓度为 60 nmol/L 时其转染效率最高。转染时间超过 12 h,细胞存活率降低趋势明显。在细胞转染实验中,确保转染后细胞有较高的存活率也是十分重要的。因为大部分细胞功能的测定,只能在有活性的细胞上进行才有意义。本实验结果显示,当 Lipofectamine™ 3000 体积为 1.5 μ L、siRNA 的浓度为 60 nmol/L、转染时间为 12 h 时,大鼠血管内皮细胞的转染效率大于 80%,细胞的生存率也大于 80%,为最佳转染条件。提高 siRNA 浓度或延长转染时间均会导致细胞死亡率上升,进而使转染率下降。本实验筛选并优化大鼠血管内皮细胞转染条件,为相关动物细胞实验的深入研究提供实验依据。

参 考 文 献

- [1] Seo S J, Kim T H, Choi S J, et al. Gene delivery techniques for adult stem cell-based regenerative therapy[J]. *Nanomedicine*, 2013, 8(11): 1875-1891.
- [2] Shiha S K. RNAi-mediated gene silencing[J]. *Physiol Mol Biol Plants*, 2010, 16(4): 321-322.
- [3] Ilarraza-Lomeli R, Cisneros-Vega B, Cervantes Goncez J, et al. Dp71, ulrophin and beta-dysroglycan expression and dislribution in PC12/L6 cell cocuhures[J]. *Neuroreport*, 2007, 18(16): 1657-1661.
- [4] Tesfaye S, Selvarajah D. Advances in the epidemiology, pathogenesis and management of diabetic peripheral neuropathy[J]. *Diabetes Melab Res Rev*, 2012, 28(1): 8-14.
- [5] El Boghdady N A, Badr G A. Evaluation of oxidative stress markers and vascular risk factors in patients with diabetic peripheral neuropathy[J]. *Cell Biochem Funct*, 2012, 30(4): 328-334.
- [6] 杨翠燕,王金凤,张艳萍,等.大鼠胸主动脉血管内皮细胞的分离培养和纯化鉴定[J]. *解放军医学杂志*, 2010, 35(2): 195-197.
- [7] Ehrlich S F, Quesenberry C J, Van Den Eeden S K, et al. PaLiens diagnosed with diabetes are all increased risk for asthma, chronic obstructive pulmonary disease, pulmonary fibrosis, and pneumonia bluntly lung cancer[J]. *Diabetes Care*, 2010, 33(1): 55-60.
- [8] Deng S, Wang J, Hou L, et al. Annexin A1, A2, A4 and A5 play important roles in breast cancer, pancreatic cancer and laryngeal carcinoma, alone and synergistically[J]. *Oncol Lett*, 2013, 5(1): 107-112.
- [9] 李连喜,胡仁明. RNA 干扰在疾病治疗中的研究及应用进展[J]. *国际内科学杂志*, 2007, 34(7): 400-403, 431.
- [10] Koga T, Xiang S, Park J S, et al. Differential effects of myocilin and optineurin, two glaucoma genes on neurite out-growth[J]. *Am J Pathol*, 2010, 176(1): 343-352.
- [11] Honma K, Mishima E, Sharma A. Role of Tannerella forsythia NanH sialidase in epithelial cell attachment[J]. *Infect Immun*, 2011, 79(1): 393-401.
- [12] Lee J T, Lee S D, Lee J Z, et al. Expression analysis and clinical significance of CXCL16/CXCR6 in patients with bladder cancer[J]. *Oncol Lett*, 2013, 5(1): 229-235.
- [13] Gottumukkala S N, Dwarakanath C D, Sudarsan S. Ribonucleic acid interference induced gene knockdown[J]. *J Indian Soc Periodontol*, 2013, 17(4): 417-422.
- [14] 张园,李志樑,邱健,等.优化阳离子脂质体介导的组织因子小干扰 RNA 转染 HEK-293 的转染条件[J]. *广西医科大学学报*, 2009, 26(2): 176-179.
- [15] 杨萍,严金川,刘培晶. siRNA 反向转染法提高原代悬浮细胞转染效率的应用[J]. *江苏大学学报(医学版)*, 2010, 20(3): 267-269.
- [16] 崔焯,王璐,孙琼,等.寡肽阳离子脂质体的体外研究[J]. *中国药科大学学报*, 2013, 44(4): 328-333.
- [17] Cseh B, Doma E, Baccarini M. The 'RAF' neighborhood: Protein-protein interaction in the Raf/Mek/Erk pathway[J]. *FEBS Lett*, 2014, Aug 1; 588(15): 398-406.

Optimization of Transfection Conditions for Tranfecting siRNA to Rats Vascular Endothelial Cells

GUO Zhaohan, LI Yinhe, PENG Mingxing, HUANG Rantao, WANG Yanhua

(School of Life Science and Technology, Nanyang Normal University, Nanyang 473000, China)

Abstract: Objective: This work aims to optimize the transfection parameters for transfecting siRNA (small interfering

RNA) to rats vascular endothelial cells(EC). Methods: Using the 0.75 μL and 1.5 μL of LipofectamineTM 3000 diluted with FAM-siRNA (20 nmol, 40 nmol, 60 nmol, 80 nmol) were mixed with different concentrations of fluorescein-labeled siRNA to form a series of mixtures to transfect EC cells. At the time point of 6 h, 12 h, 18 h, 24 h after transfection, under fluorescent microscope to observe and determine the percentage of the cells transfected under each condition. The cell viability was determined by using MTT assay to achieve the optimal conditions. Results: (1) Green fluorescence was discovered under the fluorescence microscope after transfection 12 h. (2) The highest transfection efficiency can be obtained in 60 nmol/L siRNA with the 1.5 μL of Lipofectamine transfected EC cells. No differences were found in transfection efficiency and cell viability whether using the higher concentration of siRNA. (3) Twenty-four hours later, the transfection efficiency could not be further increased by elevating the concentration of siRNA, and the cell death rate increased significantly. Conclusions: The results showed that the transfection efficiency and cell viability are dependent on the correct LipofectamineTM 3000(1.5 μL)-siRNA(60 nmol/L) ratio after transfection 12 h.

Keywords: Liposome; siRNA; transfection; endothelial cell