

## 技术与方法

## 离心法增加HaCaT细胞的基因转染效率

徐云飞<sup>1</sup> 孟莎莎<sup>1</sup> 周卫辉<sup>1\*</sup> 李红梅<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>重庆医科大学附属儿童医院儿科研究所, 儿童发育疾病研究教育部重点实验室,  
认知发育与学习记忆障碍转化医学重庆市重点实验室, 儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地;

<sup>2</sup>重庆医科大学附属儿童医院皮肤科, 重庆 400014)

**摘要** HaCaT细胞是自发性的人永生化表皮细胞株, 常用于皮肤功能与疾病的相关研究, 但常规脂质体法转染该细胞的效率极低。该研究主要探讨离心是否能够增加脂质体法转染HaCaT细胞的效率。以Lipofectamine<sup>®</sup> 2000为脂质体转染试剂, pEGFP-C1为质粒转染HaCaT细胞后分别使用常规法和离心法处理, 利用荧光倒置显微镜和流式细胞仪测定转染效率; 细胞增殖活力实验检测离心是否对细胞活力产生影响; 荧光素酶报告基因、Western blot实验检测离心法实际效应对目的基因表达的影响。结果表明, 离心法处理组所测得的转染效率均高于常规法处理组, 差异有统计学意义。荧光素酶报告基因实验、Western blot实验则进一步证实了转染后离心的性价效能增加目的基因的表达, 具有较高的实用性。综上所述, 常规转染步骤后离心能够增加HaCaT细胞的基因转染效率。

**关键词** 离心; 转染效率; HaCaT细胞

## Centrifugation Increases the Gene Transfection Efficiency of HaCaT Cells

Xu Yunfei<sup>1</sup>, Meng Shasha<sup>1</sup>, Zhou Weihui<sup>1\*</sup>, Li Hongmei<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>Pediatric Research Institute, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, Chongqing Key Laboratory of Translational Medical Research in Cognitive Development and Learning and Memory Disorders, China International Science and Technology Cooperation Base of Child Development and Critical Disorders, Chongqing 400014, China;

<sup>2</sup>Department of Dermatology, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

**Abstract** HaCaT cells are spontaneous human immortalized epidermal cell lines that are commonly used in the study of skin function and disease but the efficiency of conventional liposome transfection of the cells is extremely low. This study is aimed to investigate whether centrifugation can increase the efficiency of liposomal transfection of HaCaT cells. Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 was used as a liposomal transfection reagent, and pEGFP-C1 was used as a plasmid, and HaCaT cells were transfected by conventional method and centrifuged method respectively. Transfection efficiency was observed by inverted fluorescence microscope, quantitatively determined by flow cytometry. Cell proliferation activity was measured to determine whether centrifugation affect cell viability. The luciferase reporter assay and Western blot were carried out to detect the effect of centrifugation on the expression

收稿日期: 2018-01-24 接受日期: 2018-03-21

重庆医科大学附属儿童医院临床科研项目(批准号: lcyj2014-6)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 023-63637854, E-mail: zhouweihui@aliyun.com; hongmei69@hotmail.com

Received: January 24, 2018 Accepted: March 21, 2018

This work was supported by the Clinical Research Project of Children's Hospital of Chongqing Medical University (Grant No.lcyj2014-6)

\*Corresponding author. Tel: +86-23-63637854, E-mail: zhouweihui@aliyun.com; hongmei69@hotmail.com

网络出版时间: 2018-05-30 10:10:57

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180530.1010.002.html>

of the target gene. The results showed that the transfection efficiency of centrifugation treatment was higher than that of the conventional treatment. The difference was statistically significant. Luciferase reporter gene assay and Western blot experiment further confirmed that the centrifugation after transfection could promote the expression of the target gene, which had high practicability. In summary, the transfection efficiency of HaCaT cells can be increased by centrifugation after conventional transfection procedures.

**Keywords** centrifugation; transfection efficiency; HaCaT cells

角质形成细胞是表皮的重要组成部分, 其与皮肤的更新修复、屏障和免疫作用有关, 在维持皮肤的正常形态和生理功能中起着非常重要的作用。HaCaT细胞是自发性的人永生化表皮细胞株, 因其生物学特性与原代角质形成细胞相同而成为研究人表皮细胞的主要细胞模型<sup>[1-3]</sup>。在细胞学实验中, 常需要将外源的分子如DNA、RNA等导入到细胞内, 目前常用于外源分子导入HaCaT细胞的方法主要包括物理介导、化学介导和生物介导三类途径。物理介导中以电穿孔转染方法使用较多, 但其往往会损伤细胞, 降低细胞活性<sup>[4]</sup>。生物介导主要是以病毒为载体, 将目的DNA导入细胞, 由于病毒能够识别细胞膜上的受体, 故而该方法导入效率较高。但由于构建病毒载体及制备病毒技术要求高、过程繁琐、所需要周期较长, 病毒载体所携带的DNA片段大小受限<sup>[5]</sup>以及对生物安全设施的要求较高等<sup>[6-7]</sup>问题限制了它的应用, 因此目前应用最广泛的还是化学介导的转染方法。其中, 脂质体转染法因其转染效率相对较高、操作简单而被广泛运用于体外细胞转染实验<sup>[8-12]</sup>。然而对于HaCaT细胞而言, 使用脂质体常规的转染方式转染该细胞所达到的转染效率偏低。Teagle等<sup>[13]</sup>的研究表明, 使用脂质体转染HaCaT细胞所表现出的转染效率很低, 只有0.85%~2.56%; 王丽华等<sup>[14]</sup>在研究不同基因转染法对HaCaT细胞导入效率的影响实验中发现, 脂质体转染法所表现出的转染效率最低, 推论出采用该方法较难将外源性基因导入该细胞。这些研究说明, 采用脂质体常规的转染方式会限制科研人员在HaCaT这一细胞中的相关研究。

在以往的研究中, 对于转染效率低的细胞, 不同的学者使用了不同的方法来增加其转染效率<sup>[15-17]</sup>, 其中离心法操作简单且能显著增加转染效率。Verma等<sup>[18]</sup>使用离心和容量减少的方法增加了Cos-1细胞的转染效率。Naoki等<sup>[19]</sup>采用离心的方法促进腺病毒导入树突状细胞。Majumdar等<sup>[20]</sup>使用低速离心增

加了外周血单核细胞的转染效率。而对于难转染的HaCaT细胞而言, 离心法是否能够增加其转染效率尚无文献报道。故而本文主要探讨脂质体法常规转染步骤后离心是否能够增加HaCaT细胞的基因转染效率, 为在这一细胞中进行研究的学者提供相关依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

HaCaT细胞(人永生化表皮细胞株)和pEGFP-C1质粒为本实验室保存; 腺病毒pAD-kan由ViGene Biosciences公司赠送; Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 Reagent(Lip2000)、DMEM、Opti-MEM、胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶均购自Invitrogen公司; 青/链霉素混合液购于Solarbio公司; pmirGLO质粒、PureYield<sup>™</sup> Plasmid Midiprep System、CellTiter 96<sup>®</sup> AQ ueous One Solution Cell Proliferation Assay、Dual-Glo<sup>®</sup> Luciferase Assay System均购自Promega公司; Pierce<sup>™</sup> BCA Protein Assay Kit购自Thermo公司; Monoclonal Anti- $\beta$ -Actin购自Sigma公司; anti-GFP抗体购自上海碧云天生物技术有限公司; Goat anti-Mouse IRDye<sup>®</sup> 680CW和Goat anti-Rabbit IRDye<sup>®</sup> 680CW均购自Odyssey公司; 24孔板、48孔板、96孔板均购自Corning Incorporated公司; 孔板离心机购自Beckman公司; 荧光素酶报告基因检测仪(GloMax20/20)购自Promega公司; 流式细胞仪(FACSCanto<sup>™</sup>)购自BD公司; 双色激光红外扫描成像系统(LI-COR)购自Odyssey公司。

### 1.2 方法

1.2.1 质粒的提取 按照PureYield<sup>™</sup> Plasmid Midiprep System说明书进行操作提取pEGFP-C1和pmirGLO质粒, 核酸蛋白测定仪进行浓度测定后, -20 °C保存。

1.2.2 细胞培养 HaCaT细胞培养方式, 即用10%胎牛血清的DMEM完全培养基, 含青霉素100 U/mL、

链霉素100 mg/L, 置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养, 细胞贴壁生长到约90%时, 0.25%(w/v)Trypsin-0.53 mmol/L EDTA消化传代培养, 待细胞传代2~3代后取对数期细胞进行接种。

**1.2.3 细胞转染** 常规组转染: HaCaT细胞以 $1.5 \times 10^5$ 个/孔接种于24孔板中, 于细胞培养箱中培养12~15 h, 细胞融合度到达70%~80%时进行细胞转染, 转染试剂和pEGFP-C1用量按照各组实验需要进行调整, 转染方法按照Lip2000试剂说明书进行。转染完成后, 将24孔板直接放回细胞培养箱, 37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养。

离心组转染: HaCaT细胞以 $1.5 \times 10^5$ 个/孔接种于24孔板中, 于细胞培养箱中培养12~15 h, 细胞融合度到达70%~80%时进行细胞转染, 转染试剂和pEGFP-C1用量按照各组实验需要进行调整, 转染方法按照Lip2000试剂说明书进行。转染完成后将24孔板置于孔板离心机, 37 °C、300 ×g离心10 min后放回细胞培养箱, 37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养<sup>[18]</sup>。

**1.2.4 荧光倒置显微镜观察转染效率** 根据实验设计方案, 转染质粒pEGFP-C1 24 h后, 在荧光倒置显微镜下观察转染效率。按照荧光倒置显微镜操作说明书, 拍摄24孔板中细胞的明场和荧光照片。

**1.2.5 流式细胞仪测定转染效率** 将用荧光倒置显微镜观察后的细胞置于超净台中, 吸掉上清培养基, 加入200 μL 0.25%(w/v)Trypsin-0.53 mmol/L EDTA消化后, 再加入200 μL完全培养基终止消化, 将细胞悬液转入1.5 mL EP管中, 室温800 ×g离心4 min, 弃上清。加入200 μL 1×PBS, 重悬细胞后, 用流式细胞仪进行转染效率的测定。

测定条件: 选择FITC通道, 以488 nm作为激发光波长, 530 nm作为检测光波长, 每管检测3万个细胞。对第一管(空白管)进行检测, 以该管细胞所检测到的荧光强度的范围作为一个门, 该门内的细胞表示未转染上的细胞, 图中以红色点表示; 而将大于该范围的荧光强度作为另外一个门, 命名为GFP, 该门内的细胞则表示为转染成功的细胞, 图中以绿色点表示。

**1.2.6 荧光素酶报告基因实验** 常规组转染: HaCaT细胞以 $6 \times 10^4$ 个/孔接种于48孔板中, 于细胞培养箱中培养12~15 h, 细胞融合度到达70%~80%时进行细胞转染, 转染试剂Lip2000和质粒pimirGLO用量按照说明书进行操作。即250 ng pimirGLO质粒

稀释于12.5 μL Opti-MEM无血清培养基中, 0.5 μL Lip2000转染试剂稀释于12.5 μL Opti-MEM无血清培养基中, 5 min后将两者混合均匀, 静置20 min后滴入细胞。转染完成后, 将48孔板直接放回细胞培养箱, 37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养24 h后裂解细胞, 用试剂Dual-Glo<sup>®</sup> Luciferase Assay System按照说明书测定荧光素酶活性。

离心组转染: HaCaT细胞以 $6 \times 10^4$ 个/孔接种于48孔板中, 于细胞培养箱中培养12~15 h, 细胞融合度到达70%~80%时进行细胞转染, 转染试剂Lip2000和质粒pimirGLO用量按照说明书进行操作。即250 ng pimirGLO质粒稀释于12.5 μL Opti-MEM无血清培养基中, 0.5 μL Lip2000转染试剂稀释于12.5 μL Opti-MEM无血清培养基中, 5 min后将两者混合均匀, 静置20 min后滴入细胞。转染完成后, 将48孔板置于孔板离心机, 37 °C、300 ×g离心10 min后放回细胞培养箱, 37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养24 h后裂解细胞, 用试剂Dual-Glo<sup>®</sup> Luciferase Assay System按照说明书测定荧光素酶活性。

**1.2.7 细胞增殖活力的测定** 将HaCaT细胞以 $5 \times 10^3$ 个/孔接种于2个96孔板中, 培养12~15 h, 进行细胞转染, pEGFP-C1质粒用量为100 ng/孔, 转染方法同Lip2000说明书。每个孔板分别转染Lip2000:pEGFP-C1为0:1(μL:μg)、2:1(μL:μg)、3:1(μL:μg)三组, 转染后将其中一个96孔板直接放于37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养, 记为常规组; 另一个96孔板则经过37 °C、300 ×g离心10 min后放回细胞培养箱, 37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养, 记为离心组。24 h后, 向每孔加入20 μL CellTiter 96<sup>®</sup> AQ ueous One Solution Reagent, 混匀后放回细胞培养箱37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养1 h, 然后用多功能微孔板检测仪于490 nm处读取吸光度的值。

**1.2.8 Western blot实验** HaCaT细胞以 $6 \times 10^5$ 个/孔接种于2个6孔板中, 于细胞培养箱中培养12~15 h, 细胞融合度到达70%~80%时进行细胞转染。转染试剂Lip2000和质粒pEGFP-C1用量按照说明书进行操作。即2.5 μg pEGFP-C1质粒稀释于100 μL Opti-MEM无血清培养基中, 5 μL Lip2000转染试剂稀释于100 μL Opti-MEM无血清培养基中, 5 min后将两者混合均匀, 静置20 min后滴入细胞。转染完成后, 将其中一个6孔板直接放回细胞培养箱, 37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养, 记为常规组; 另一个6孔板经37 °C、300 ×g

离心10 min后,放回细胞培养箱,37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养,记为离心组。24 h后取出6孔板用预冷的1×PBS洗涤细胞,然后每孔加入100 μL RIPA裂解液,于冰上用细胞刮刮取裂解的细胞装于EP管中。随后用20%超声强度超声细胞,每次5 s,重复3次。37 °C、16 000 ×g离心10 min后吸取上清即为提取的总蛋白。将提取的总蛋白用Pierce™ BCA Protein Assay Kit试剂盒进行蛋白浓度测定,然后将蛋白配制成2 μg/μL浓度的混合液。95 °C金属浴5 min对蛋白进行变性,取出蛋白混合液,准备蛋白上样。

取15 μL(含30 μg)蛋白样品进行10% SDS-PAGE胶电泳,转膜、封闭后进行抗体孵育,其中一抗为anti-GFP(1:1 000稀释)抗体,anti-β-Actin抗体(1:10 000稀释),孵育后将PVDF膜放于4 °C冷库摇床上孵育过夜。二抗则孵育Goat anti-Mouse IRDye® 680CW(1:10 000稀释),Goat anti-Rabbit IRDye® 680CW(1:10 000稀释),将PVDF膜放于摇床,避光,室温孵育90 min后对PVDF膜进行荧光显影。

### 1.3 数据处理及统计学分析

运用Excel 2007、GraphPad Prism 7(GraphPad Software, USA)处理数据,实验数据以均数±标准误差表示,组间差异用非配对*t*检验评估, $P < 0.05$ 表明差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 不同剂量下常规组与离心组转染效率比较图

根据Lip2000试剂说明书可知,转染24孔板中每一孔细胞所需要的DNA量为500 ng, Lip2000的用量优化范围为(2~5):1(μL:μg)。故而我们将pEGFP-C1的用量定为500 ng/孔, Lip2000:pEGFP-C1按照2:1(μL:μg)、3:1(μL:μg)、4:1(μL:μg)、5:1(μL:μg)的剂量转染24孔板中的HaCaT细胞。然后将24孔板按照常规转染步骤直接放置于细胞培养箱中培养,24 h后用荧光倒置显微镜观察转染效率,随后将细胞用胰酶消化并用流式细胞仪定量检测转染效率。结果显示,按照常规转染方式转染HaCaT细胞所得到的转染效率均较低,只有1.63%~1.93%,如图1A中c、g、k、o和图1B中a、b、c、d所示。于是我们按照同样的剂量转染另一个24孔板的HaCaT细胞,然后将24孔板置于孔板离心机中,37 °C、300 ×g离心10 min后将24孔板放置于细胞培养箱中培养,24 h后用荧光倒置显微镜观察转染效率,随后将细胞用

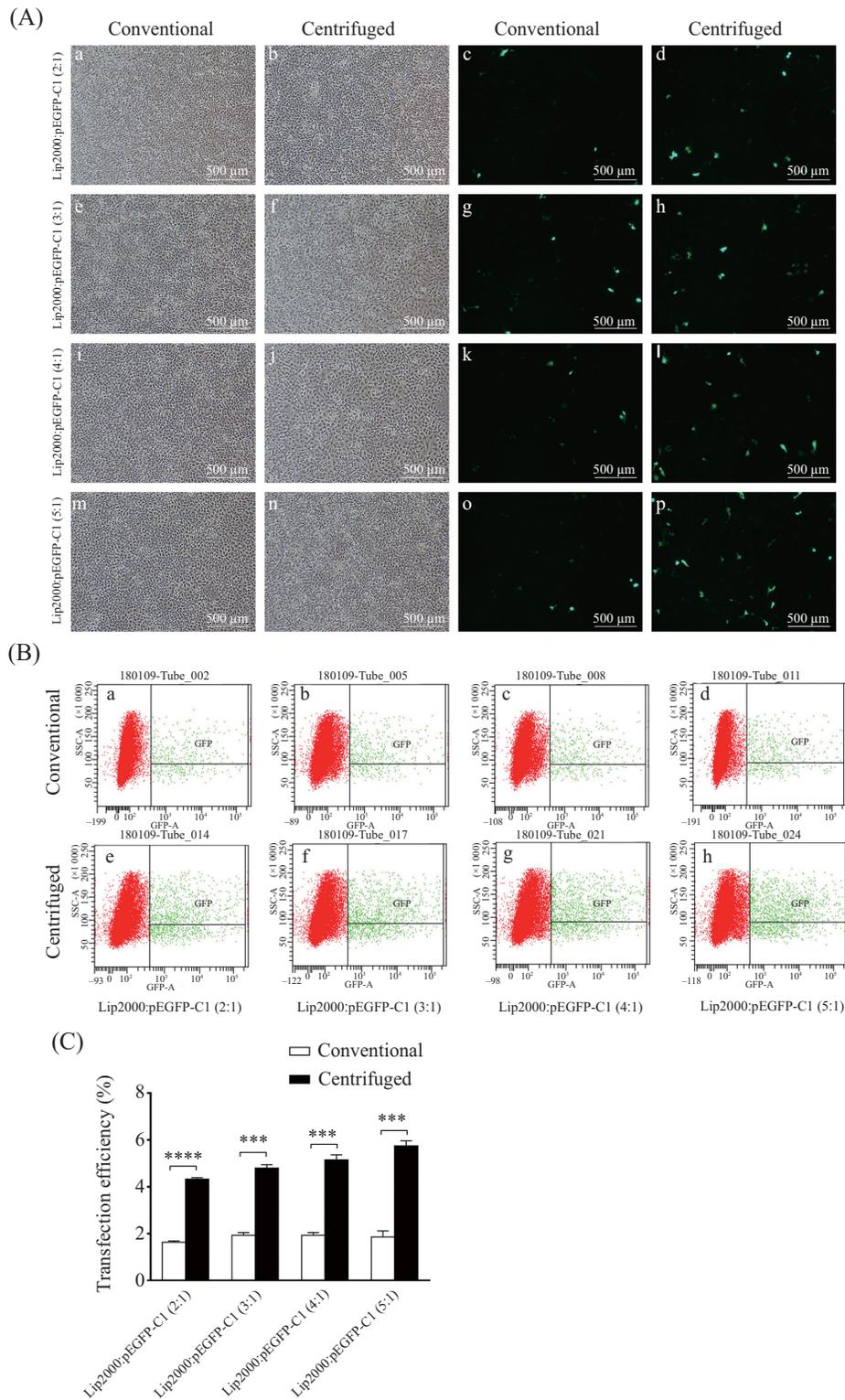
胰酶消化并用流式细胞仪定量检测转染效率。结果表明,无论Lip2000:pEGFP-C1的比值怎么改变,离心组表达荧光蛋白的细胞数均高于常规组(图1A)。流式定量结果也表明,离心组转染效率均高于常规组,且差异有统计学意义。当Lip2000:pEGFP-C1为5:1(μL:μg)时,离心组细胞达到最高转染效率(5.75%±0.15%),显著高于常规组转染效率(1.87%±0.15%),差异具有统计学意义(图1B和图1C)。结果表明,转染后离心可显著增加HaCaT细胞的转染效率。

### 2.2 不同转染方式的效率比较

为了探讨转染后离心增加HaCaT细胞转染效率的程度,我们将GFP(绿色荧光蛋白)对照腺病毒pAD-kan感染HaCaT细胞作为对照组设计了如下实验。按照Lip2000:pEGFP-C1为5:1(μL:μg)的剂量转染24孔板中的HaCaT细胞后使用常规法和离心法处理;腺病毒组则以1 μL/孔,滴度为 $2.0 \times 10^{10}$  PFU/mL的病毒液感染24孔板中的细胞。转染或感染24 h后用荧光倒置显微镜观察转染效率,然后用胰酶消化,并用流式细胞仪定量测定转染效率。结果显示,腺病毒组表达荧光的细胞数最多,其次为离心组,最少为常规组,背景值作为阴性对照,表示未转染的HaCaT细胞并不表达绿色荧光蛋白(图2A)。流式细胞仪测得的对应的转染效率分别为96.95%±0.95%、5.65%±0.05%、2.15%±0.05%,背景值则表示为0(图2B和图2C)。结果表明,虽然转染后离心的方式能够增加HaCaT细胞的转染效率,但并未到达病毒感染的效率程度。

### 2.3 离心对HaCaT细胞活力的影响

为了探讨转染的HaCaT细胞经过离心后,其增殖活力是否受到了影响,我们进行了相关的细胞增殖活力检测实验。根据试剂盒原理,活细胞的数量与该溶液在490 nm吸光度成正比,因此,细胞吸光度越高代表活细胞数量越多,提示细胞增殖活力越强,反之则越弱。结果表明,当Lip2000:pEGFP-C1比值为0:1(μL:μg)时,常规组细胞所测得的吸光度与离心组细胞所测得的吸光度无差异,这说明转染后离心这种方式本身并不抑制细胞增殖活力。而常规组细胞在Lip2000:pEGFP-C1比值为2:1(μL:μg)或3:1(μL:μg)时,其所测得的吸光度均小于相应的比值为0:1(μL:μg)的组,且差异有统计学意义,说明Lip2000试剂对细胞增殖有一定的抑制作用。另

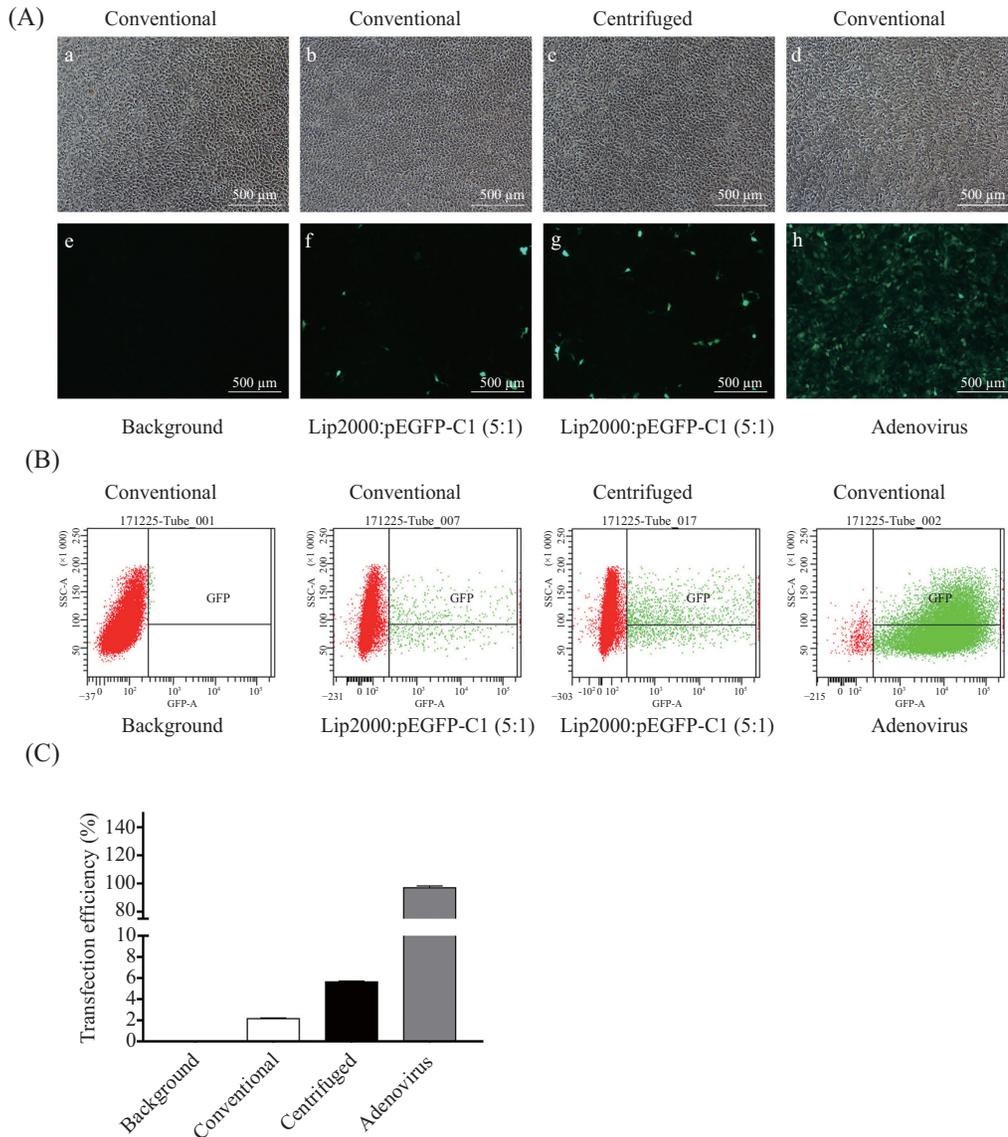


A: 转染效率荧光图。a、b、e、f、i、j、m、n表示荧光倒置显微镜观察的明场图,c、d、g、h、k、l、o、p则表示与明场相同视野下的荧光图; B: 流式细胞仪检测的转染效率图。其中绿色点表示表达GFP的细胞,红色点表示不表达GFP的细胞; C: 转染效率统计图。所有的结果均表示为均值±标准误( $n=3$ ),  $***P<0.001$ ,  $****P<0.0001$ 。

A: transfection efficiency fluorogram. a, b, e, f, i, j, m and n represent bright field images observed under a fluorescence inverted microscope. c, d, g, h, k, l, o and p indicate the fluorescence images in the same field as the bright field; B: flow cytometry-detected transfection efficiency of HaCaT cells. The green dots indicate cells that express GFP, and the red dots indicate cells without expression of GFP; C: statistical analysis chart of transfection efficiency. All results are expressed as means±S.E.M. ( $n=3$ ),  $***P<0.001$ ,  $****P<0.0001$ .

图1 不同剂量下常规组与离心组转染效率比较图

Fig.1 Comparison of transfection efficiencies between routine and centrifugal groups under different conditions



A: 转染效率荧光图。a、b、c、d表示荧光倒置显微镜观察的明场图，e、f、g、h则表示与明场相同视野下的荧光图；B: 流式细胞仪检测的转染效率图。其中绿色点表示表达GFP的细胞，红色点表示不表达GFP的细胞；C: 转染效率统计图。所有的结果均表示为均值±标准误( $n=3$ )。

A: transfection efficiency fluorogram. a, b, c and d are bright field images observed under a fluorescence inverted microscope. e, f, g and h are fluorescence images in the same field as the bright field; B: flow cytometry-detected transfection efficiency of HaCaT cells. The green dots indicate cells that express GFP, and the red dots mean cells without expression of GFP; C: statistical analysis chart of transfection efficiency. All results are expressed as means±S.E.M. ( $n=3$ ).

图2 不同转染方式的转染效率比较图

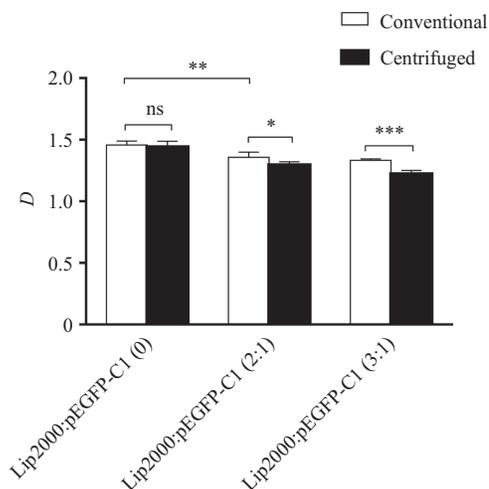
Fig.2 Comparison of transfection efficiencies of different transfection methods

一方面当Lip2000:pEGFP-C1比值为2:1( $\mu\text{L}:\mu\text{g}$ )或3:1( $\mu\text{L}:\mu\text{g}$ )时,常规组细胞所测得的吸光度均高于离心组细胞,虽然差异有统计学意义,但离心组降低的幅度并不高,只分别降低了5.1%和8.3%,提示转染后离心只轻微增加了转染试剂Lip2000对细胞增殖活力的抑制作用(图3)。

#### 2.4 离心增加荧光素酶测定结果读取的准确性

由于常规转染后离心的方式虽然能显著增加HaCaT细胞转染效率,但同时也轻微增加了转染试

剂Lip2000对细胞增殖活力的抑制作用,为了探讨常规转染后离心增加HaCaT细胞转染效率的方法是否能有效改善实际的研究方案,我们将Lip2000与报告基因质粒pmirGLO按照2:1( $\mu\text{L}:\mu\text{g}$ )的比例转染48孔板中的HaCaT细胞后使用常规法和离心法处理,转染24 h后将细胞裂解,用于检测荧光素酶的表达式。结果表明,常规组的海肾荧光素酶活性较低,只有约为473.7个光强单位,当荧光素酶活性越接近背景值时,误读数值的几率越大,结果越不可信。而离心组

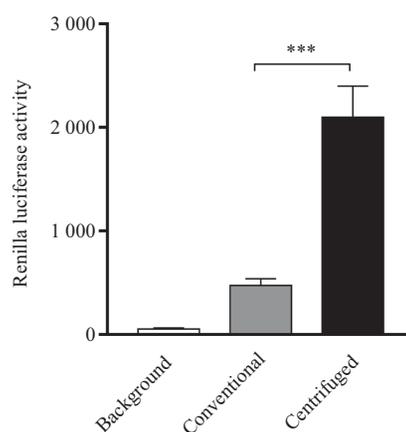


所有的结果均表示为均值±标准误( $n=3$ ),  $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ ,  $***P<0.001$ 。

All results are expressed as means±S.E.M. ( $n=3$ ).  $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ ,  $***P<0.001$ .

图3 离心对HaCaT细胞活力的影响

Fig.3 Effects of centrifugation on HaCaT cell viability

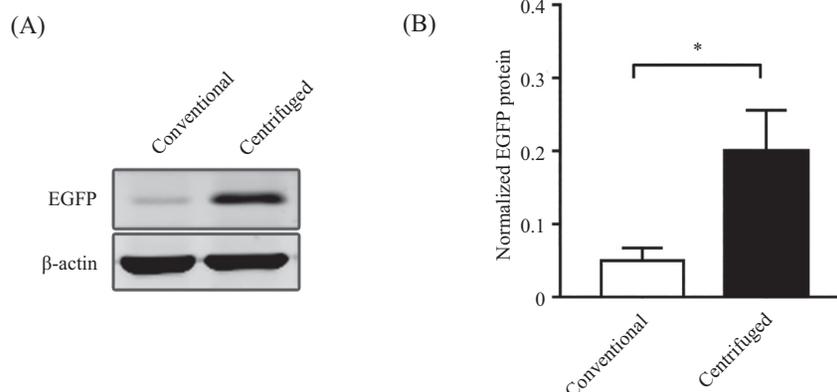


所有的结果均表示为均值±标准误( $n=3$ ),  $***P<0.001$ 。

All results are expressed as means±S.E.M. ( $n=3$ ),  $***P<0.001$ .

图4 离心增加荧光素酶测定结果读取的准确性

Fig.4 Centrifugation increases the reading accuracy of luciferase assay results



A: 目的蛋白的免疫印迹图; B: 蛋白免疫印迹的统计分析图。所有的结果均表示为均值±标准误( $n=3$ ),  $*P<0.05$ 。

A: Western blot map of the protein of interest; B: statistical analysis of Western blot. All results are expressed as means±S.E.M. ( $n=3$ ),  $*P<0.05$ .

图5 离心法增加目的基因的蛋白表达量

Fig.5 Centrifugation increases protein expression of target gene

与常规组相比, 其海肾荧光素酶活性显著增高, 约有 2 099 个光强单位, 差异有统计学意义(图4)。因此可以得出结论, 虽然转染后离心增加了Lip2000对细胞增殖活力的抑制效果, 但其总效应能够增加目的基因的表达, 即增加了荧光素酶在HaCaT细胞中的表达量, 从而减少荧光素酶活性数值的误读几率, 增加了荧光素酶测定结果读取的准确性。

## 2.5 离心法增加目的基因的蛋白表达量

为了进一步讨论离心法对于常规实验的适用性, 本文设计了如下实验: 以Lip2000:pEGFP-C1比值为2:1( $\mu\text{L}:\mu\text{g}$ )的剂量转染6孔板中的HaCaT细胞,

随后使用常规法与离心法的方式处理细胞, 24 h后提取细胞总蛋白, 使用Western blot实验对目的蛋白进行定量检测。结果显示, 常规转染方式所检测到的EGFP(增强型绿色荧光蛋白)的量很低, 说明目的蛋白的表达丰度很低, 从而限制了科研人员对于该蛋白的研究。而通过离心法处理后, EGFP表达量显著增加, 且差异有统计学意义(图5)。这说明通过离心法的处理方式能够增加目的基因的蛋白表达丰度, 从而有利于这一蛋白的研究, 这提示离心法对于常规的Western blot实验也具有较好的适用性。

### 3 讨论

皮肤, 由于其位于体表容易获得的特点, 已经成为研究疾病和基因治疗的重要靶点。角质形成细胞是皮肤的主要细胞, 所以对于该细胞的研究受到越来越多学者的关注。而HaCaT细胞生物学特性与原代角质形成细胞相同, 故而其已经成为研究皮肤类疾病和基因治疗的理想体外细胞模型。然而HaCaT细胞作为一种难转染的细胞株, 使用最常用的脂质体转染方式转染该细胞所达到的转染效率偏低, 从而限制了对该细胞的研究<sup>[4]</sup>。

针对这一问题, 本文主要探讨转染后通过离心的方式是否能够增加HaCaT细胞的转染效率。结果表明, 使用常规的转染方法转染HaCaT细胞得到的转染效率较低, 只有1.63%~1.93%。而通过结合转染后离心的方式, HaCaT细胞的转染效率有了显著的提高。最近有文献报道, 脂质体复合物进入细胞的方式主要是通过细胞内吞作用<sup>[21]</sup>, 因此我们猜测通过转染后离心的方式, 缩短了脂质体复合物游离到细胞膜表面的时间, 使得脂质体复合物与细胞膜接触的时间增加, 从而促进了细胞膜对于脂质体复合物的内吞作用, 因此提升了细胞的转染效率。同时我们发现, 当脂质体Lip2000与pEGFP-C1用量比值在5:1( $\mu\text{L}:\mu\text{g}$ )的条件下转染细胞, 经过离心法处理后所达到的转染效率最高, 可能这与HaCaT细胞膜内吞作用的载量有关。既然转染后结合离心的方式能够增加HaCaT细胞的转染效率, 那么我们想知道其增加的程是否到达了病毒转染的水平。结果表明, 虽然转染后离心的处理方式能够增加HaCaT细胞的转染效率, 但还不能到达病毒所表现出的转染效率水平, 这可能是由于脂质体复合物与病毒颗粒进入细胞的机制不同所导致的, 因此转染后结合离心的处理方式还不能完全取代病毒转染。但对于一些不能使用病毒载体的实验, 如Tao等<sup>[22]</sup>在组织工程皮肤的研究中对于构建皮肤组织替代物时, 需要考虑病毒载体的免疫原性、致癌性等特点; Hu等<sup>[2]</sup>在烧伤小鼠模型中研究皮肤组织替代物时, 也需要考虑病毒载体的致病性以及重组病毒对于临床长期的未知的影响。因此, 这些情况下, 研究者则采用了脂质体转染法, 但常规的脂质体转染方式所表现出的效率较低, 鉴于此, 转染后离心则是一种简单可行的增加细胞转染效率的方式。同时我们发现, 离心这种方式本身并不抑制细胞增殖活力, 但轻微增

加了转染试剂Lip2000对细胞增殖活力的抑制作用, 因此我们需要探讨以Lip2000作为转染试剂的转染后离心是否能够增加目的基因的实际表达量。我们设计了相应的荧光素酶报告基因实验, 结果说明常规转染方式所得到的海肾荧光素酶活性偏低, 仅约为473.7个光强单位, 当所测得的荧光素酶活性数值接近背景值时会增加其被误读的几率, 从而导致其不适合作为内参报告基因来校准实验。如Osborne和Tonissen等<sup>[23]</sup>在研究中发现, 完全删切掉启动子的质粒(由于荧光素酶活性太低而不能当作报告基因实验的内参质粒)不利于实验的研究。而本文通过离心处理后, 海肾荧光素酶活性显著增高, 到达约2 099个光强单位, 说明此种方式能够减少荧光素酶测定结果因数值太低而造成的误读, 从而提高结果的准确性。这或许能够解决内参质粒因数值太低而不能作为校准依据的问题。同时该实验说明, 转染后离心的方式能够提高难转染的HaCaT细胞的转染效率, 其性价效应能够增加目的基因的表达。为了进一步说明转染后离心的方式对于常规实验的适用性, 本文设计了Western blot实验进行目的蛋白的检测。结果显示, 常规转染方式所得到的目的蛋白因转染效率太低而导致其表达丰度很低, 这难以满足科研人员的研究需求, 此种情况下有学者通过构建病毒载体的方式来提高目的基因的转染效率, 虽然这种方式所到达的效率较高, 但其也需要花费更多的时间和经济<sup>[24]</sup>。本文通过离心的方式, 使目的蛋白表达丰度显著增加, 能够满足Western blot实验对于目的蛋白的检测, 且与病毒转染方式相比更加省时与经济, 所以该方法具有较好的适用基础。

本实验首次在HaCaT细胞中验证了转染后离心的方式能够增加该细胞的基因转染效率, 且成功地应用于荧光素酶报告基因实验, 提高了荧光素酶测定结果读取的准确性。通过Western blot实验进一步说明, 转染后离心的方式对于目的基因蛋白表达的实用性, 为在这一细胞株中进行相关实验的学者提供了依据。

### 参考文献 (References)

- 1 Schoop VM, Mirancea N, Fusenig NE. Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1999; 112(3): 343-53.
- 2 Hu DH, Zhang ZF, Zhang YG, Zhang WF, Wang HT, Cai WX,

- et al.* A potential skin substitute constructed with hEGF gene modified HaCaT cells for treatment of burn wounds in a rat model. *Burns* 2012; 38(5): 702-12.
- 3 Kontargiris E, Vadalouka A, Ragos V, Kalfakakou V. Zinc inhibits apoptosis and maintains NEP downregulation, induced by ropivacaine, in HaCaT cells. *Biol Trace Elem Res* 2012; 150(1/2/3): 460-6.
- 4 Yong W, Peng D, Wang L, Dong Z, He B. Screening of HaCaT clones for CCL20 gene knockout and preliminary exploration of gene-targeting vector transfection approaches in this cell line. *Med Sci Monit Basic Res* 2015; 21: 21-8.
- 5 Kay MA, Liu D, Hoogerbrugge PM. Gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(24): 12744-6.
- 6 Wasungu L, Hoekstra D. Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes. *J Control Release* 2006; 116(2): 255-64.
- 7 Karmali PP, Chaudhuri A. Cationic liposomes as non-viral carriers of gene medicines: resolved issues, open questions, and future promises. *Med Res Rev* 2007; 27(5): 696-722.
- 8 Saldeen J, Curiel DT, Eizirik DL, Andersson A, Strandell E, Buschard K, *et al.* Efficient gene transfer to dispersed human pancreatic islet cells *in vitro* using adenovirus-polylysine/DNA complexes or polycationic liposomes. *Diabetes* 1996; 45(9): 1197-203.
- 9 Bell H, Kimber WL, Li M, Whittle IR. Liposomal transfection efficiency and toxicity on glioma cell lines: *in vitro* and *in vivo* studies. *Neuroreport* 1998; 9(5): 793-8.
- 10 Madry H, Reszka R, Bohlender J, Wagner J. Efficacy of cationic liposome-mediated gene transfer to mesangial cells *in vitro* and *in vivo*. *J Mol Med (Berl)* 2001; 79(4): 184-9.
- 11 Dalby B, Cates S, Harris A, Ohki EC, Tilkins ML, Price PJ, *et al.* Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods* 2004; 33(2): 95-103.
- 12 Elmadbouh I, Rossignol P, Meilhac O, Vranckx R, Pichon C, Pouzet B, *et al.* Optimization of *in vitro* vascular cell transfection with non-viral vectors for *in vivo* applications. *J Gene Med* 2004; 6(10): 1112-24.
- 13 Teagle AR, Birchall JC, Hargest R. Gene Therapy for pyoderma gangrenosum: optimal transfection conditions and effect of drugs on gene delivery in the HaCaT cell line using cationic liposomes. *Skin Pharmacol Physiol* 2016; 29(3): 119-29.
- 14 王丽华, 彭代智, 周新, 刘敬, 王勇, 何升东, 等. 人角质形成细胞基因导入效率的影响因素研究. *中华烧伤杂志* (Wang Lihua, Peng Daizhi, Zhou Xin, Liu Jing, Wang Yong, He Shengdong, *et al.* Study on influencing factors in efficiency of introducing gene into human keratinocyte (KC). *Zhonghua Shao Shang Za Zhi*) 2009; 25(2): 122-5.
- 15 Brgles M, Santak M, Halassy B, Forcic D, Tomasic J. Influence of charge ratio of liposome/DNA complexes on their size after extrusion and transfection efficiency. *Int J Nanomedicine* 2012; 7: 393-401.
- 16 Magalhaes M, Farinha D, Pedroso de Lima MC, Faneca H. Increased gene delivery efficiency and specificity of a lipid-based nanosystem incorporating a glycolipid. *Int J Nanomedicine* 2014; 9: 4979-89.
- 17 Sork H, Nordin JZ, Turunen JJ, Wiklander OP, Bestas B, Zaghoul EM, *et al.* Lipid-based transfection reagents exhibit cryo-induced increase in transfection efficiency. *Mol Ther Nucleic Acids* 2016; 5: e290.
- 18 Verma RS, Giannola D, Shlomchik W, Emerson SG. Increased efficiency of liposome-mediated transfection by volume reduction and centrifugation. *Bio Techniques* 1998; 25(1): 46-9.
- 19 Nishimura N, Nishioka Y, Shinohara T, Ogawa H, Yamamoto S, Tani K, *et al.* Novel centrifugal method for simple and highly efficient adenovirus-mediated green fluorescence protein gene transduction into human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol Methods* 2001; 253(1/2): 113-24.
- 20 Majumdar M, Ratho R, Chawla Y, Singh MP. Evaluating the role of low-speed centrifugation towards transfecting human peripheral blood mononuclear cell culture. *Indian J Med Microbiol* 2014; 32(2): 164-8.
- 21 Perez Ruiz de Garibay A. Endocytosis in gene therapy with non-viral vectors. *Wiener Wien Med Wochenschr* 2016; 166(7/8): 227-35.
- 22 Tao K, Bai XZ, Zhang ZF, Shi JH, Hu XL, Tang CW, *et al.* Construction of the tissue engineering seed cell (HaCaT-EGF) and analysis of its biological characteristics. *Asian Pac J Trop Med* 2013; 6(11): 893-96.
- 23 Osborne SA, Tonissen KF. pRL-TK induction can cause misinterpretation of gene promoter activity. *Bio Techniques* 2002; 33(6): 1240-2.
- 24 Jiang XP, Zhang DX, Teng M, Zhang Q, Zhang JP, Huang YS. Downregulation of CD9 in keratinocyte contributes to cell migration via upregulation of matrix metalloproteinase-9. *PLoS One* 2013; 8(10): e77806.