

多聚乙烯亚胺介导肿瘤细胞基因转染

鲁悦^{1,2}, 杨航², 袁林², 徐国平², 姚志峰², 刘永彪^{2*}

(¹南京医科大学附属肿瘤医院放疗科, 江苏 南京 210009; ²南京医科大学第一附属医院放疗科, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:利用阳离子多聚物多聚乙烯亚胺(PEI)纳米凝胶将增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescence protein, EGFP)转入同步化的肿瘤细胞中并检测绿色荧光蛋白的表达率,探讨PEI作为载体介导肿瘤细胞基因转染中细胞周期对转染效率的影响。方法:通过6 MV X线照射及药物阻滞使Hela及A549细胞同步化,在5个PEI/DNA梯度比(2/2、4/2、6/2、8/2、10/2 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$)下利用PEI介导EGFP报告基因转染进入上述同步化细胞,流式细胞仪和荧光显微镜下测定绿色荧光蛋白表达率,通过梯度试验分析细胞周期时相与表达率之间的关系。结果:在不同增殖状态及PEI/DNA比值梯度下,一定剂量-时间的X射线和顺铂可以使Hela细胞同步化于S期,一定剂量-时间的艾素可以使A549细胞同步化于G2/M期,而血清饥饿法培养则可以使细胞阻滞于G0/G1期,在不同细胞周期时相下EGFP的转染效率不同,两种同步化细胞均表现出S期及G2/M期细胞的转染率显著高于对照组($P < 0.05$)和G0/G1期细胞($P < 0.0001$)。结论:PEI导入基因的表达效率受细胞周期制约,PEI介导的基因转染受到宿主细胞摄取、转运入核及转录能力的影响,而该进程都是细胞周期依赖性的。

[关键词] 多聚乙烯亚胺;转染;细胞周期;Hela细胞;A549细胞

[中图分类号] R730.55

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)12-1684-06

The polyethylenimine-mediated gene transfection in tumor cells

LU Yue^{1,2}, YANG Hang², YUAN Lin², XU Guo-ping², YAO Zhi-feng², LIU Yong-biao^{2*}

(¹Department of Radiotherapy, the Affiliated Cancer Hospital of NJMU, Nanjing 210009; ²Department of Radiotherapy, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the feasibility of gene transfection of Hela and A549 cells mediated by cationic polymer-polyethylenimine (PEI) and evaluate the effect of cell cycle status on efficiency of PEI-mediated gene delivery. **Methods:** Hela and A549 cells were synchronized into different phases of the cell cycle by 6 MV X ray radiation or drugs or serum deprivation. The synchronized cells were transfected using PEI carrier at various PEI/DNA ratio ($P/D=2/2, 4/2, 6/2, 8/2, 10/2 \mu\text{g}/\mu\text{g}$), and the transient transfection efficiency of enhanced green fluorescence protein (EGFP) gene in these cells was determined by flow cytometry and fluorescent microscopy. The relationship between cell cycle status and the efficiency of transgene expression was analyzed. **Results:** Hela cell could be synchronized in S phase by X ray radiation or incubation with Cisplatin (PDD), and A549 cell could be synchronized in G2/M phase by incubation with Docetaxel (TXT) at certain dose-time condition. Both Hela and A549 cells were synchronized in G0/G1 phase serum deprivation. Transfection efficiency in synchronized cells was different at different phases of the cell cycle. PEI showed the minimal transfection efficiency at G0/G1 phase and the medium at G2/M phase and the maximum at S phase ($P < 0.05$, S, G2/M phase group vs control; $P < 0.0001$, S, G2/M phase group vs G0/G1 phase). **Conclusion:** PEI is an effective and safe carrier for gene delivery. Cell cycle status restricted the expression efficiency of transfection mediated by PEI. Transfection using PEI is influenced by cellular uptake, transportation into nucleus and transcription, and those processes are cell-cycle-dependent.

[Key words] polyethylenimine; transfection; cell cycle; Hela cell; A549 cell

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(12): 1684-1689]

基因治疗的兴起及发展为人类治疗多种难治

性疾病尤其是恶性肿瘤、单基因遗传性疾病、艾滋病等带来希望,然而基因治疗的临床应用仍有许多障碍有待克服。选择合适的载体,使目的基因靶向、可控并有效表达,是基因治疗成功的关键。基因载

[基金项目] 国家自然科学基金资助(30870741)

*通讯作者, E-mail: yongbiaoliu@yahoo.com.cn

体可分为病毒载体和非病毒载体两大类,病毒载体转染效率相对较高,但有很多缺点,如有免疫原性、毒性及存在重组隐患等^[1];非病毒载体主要包括脂质体以及阳离子多聚复合物等,其转染效率不如前者,但是有着许多令人关注的优点,如外源基因容量大、无遗传毒性、无免疫原性等。阳离子多聚复合物,特别是多聚乙烯亚胺(polyethylenimine, PEI)凝胶是近来的研究热点^[2-3]。目前对 PEI 的研究多着眼于载体本身,研究载体自身的一些参数,如分子量、电荷、粒径等对转染效率的影响并进而研究如何对载体进行修饰以提高效率和靶向性^[4]。作为宿主的靶细胞也能影响基因转染的效率,其中细胞所处的细胞周期是值得关注的因素。文献报道 PEI 和其他非病毒类载体一样,其转染效率受细胞周期影响,但目前观点尚不一致^[5-6],且细胞周期具体通过哪些环节来影响基因转染,其机制还有待阐明。为此本实验利用辐射和化疗药物将人宫颈鳞癌(Hela 细胞)、人肺腺癌(A549 细胞)同步化于不同的细胞周期,选择不同周期的细胞转染报告基因增强型绿色荧光蛋白(EGFP),比较其转染率的差异,从而探讨 PEI 作为载体介导基因转染时,细胞周期对转染效率的影响,并为将来临床综合应用放、化疗及基因治疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

pEGFP-N1/C1、含人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, CMV)启动子、抗链霉素基因(Neor)及抗氨苄青霉素基因(Amp^r)均购自美国 Clontech 公司。

1.2 方法

1.2.1 铺制琼脂平板

称取 20 g LB 培养基和 1.5 g 琼脂,加入 200 ml 锥形瓶中双蒸水溶解,锡箔封口,高压灭菌 20 min。灭菌置 55℃水浴中,冷却后标记,置 4℃冰箱冷藏备用。

1.2.2 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞的制备

接种 DH5 α 大肠杆菌,置 37℃培养,次日挑取单个菌落接种到 20 ml TYM 培养基中,于 37℃摇床中培养至对数生长期。转移培养物到 2 L 的锥形瓶中,加入 480 ml TYM 培养基继续培养至 $D(600 \text{ nm})$ 为 0.5~0.6,放入冰浴中,快速摇动,使瓶内培养液迅速冷却至 0℃。将培养液转移至 10 个 50 ml 的离心管中,4 200 r/min 离心 15 min,弃去液体收集菌体。每管中加入 2 ml Tfpys II,冰水浴中轻摇悬浮细

菌。分装细菌(每管 0.5 ml),迅速置于液氮中,然后冻存于-70℃备用。

1.2.3 铺制含氨苄青霉素的筛选平板

铺制加入氨苄青霉素的琼脂平板,使终浓度为 100 U/ml。将上述培养基缓缓沿壁倒入培养皿中,冷却后作好标记,倒扣置 4℃冰箱冷藏备用。

1.2.4 转染 DH5 α 大肠杆菌并筛菌

取 1 μl pEGFP 质粒加入 100 μl 预先制备的 DH5 α 感受态细胞,混匀。冰浴 30 min,立即放入 37℃水浴 5 min,加入预热的 LB 培养基 500 μl ,颠倒混匀,37℃水浴 1 h,取 100 μl 涂筛选平板,使其均匀分布于平板表面。

1.2.5 质粒的扩增、提取和纯化

参照试剂说明书和文献。

1.2.6 Hela 细胞及 A549 细胞的同步化

利用辐射和化学药物使 Hela 及 A549 细胞同步化,根据文献选择如下同步化方法^[7-10]:辐射法:Hela、A549 细胞接种于 6 孔板中,每孔接种 5×10^5 个细胞,待对数生长期时利用直线加速器分别行 0、1、2、4、8、16 Gy 的 X 射线一次性辐射(室温下照射,源皮距 100 cm,照射面积为 10 cm \times 15 cm,剂量率 100 cGy/min)。药物阻滞法:Hela、A549 细胞接种于 24 孔板中,每孔接种 5×10^4 个细胞。达到 60%饱和密度时 Hela 细胞接受顺铂(DDP)处理,浓度为 3 $\mu\text{g/ml}$ 和 9 $\mu\text{g/ml}$,分别作用 72 h 和 24 h;A549 细胞接受艾素(TXT)处理,浓度为 10 ng/ml 和 50 ng/ml,分别作用 48 h 和 24 h。血清饥饿法:Hela、A549 细胞达到 60%饱和密度时,弃去生长液,PBS 洗涤 2 次,加入含 0.1%血清的 RPMI1640 继续培养,每 12 h 换液 1 次,共培养 72 h。

上述各处理因素皆重复 6 孔,并设对照组。按照文献中时间点取样进行下列 3 项实验,以测定细胞周期分布及细胞存活率。

1.2.7 同步化细胞的细胞周期及存活率测定

上述同步化细胞利用流式细胞仪检测细胞周期,并进行 MTT 实验,得到各个处理因素下细胞周期及存活率的数据。实验步骤参照试剂说明书和文献细胞相对存活率=处理组吸光度值/对照组吸光度值 \times 100%。对同步化细胞的细胞周期及细胞存活率数据进行统计分析后,选择既能产生周期阻滞又无明显细胞损伤且细胞存活率 $> 80\%$ 的辐射和药物剂量进行转染实验。

1.2.8 同步化细胞的转染

A549 细胞与 Hela 细胞的细胞周期分布大致相

同,每个细胞周期为21~23 h,G₀/G₁期持续约7 h,S期约9 h,G₂/M期约6 h^[11]。其中S期又可以分为3个阶段,即早S期、中S期及晚S期,各3 h。同步化细胞在去除阻滞因素后会加速通过此周期时相,故各同步化细胞须在其相应时间内进行转染,其中S期一般选择在中S期转染。所以本试验中通过血清饥饿法阻滞于G₀/G₁期的细胞在进入生长液后4 h转染,阻滞于S期的细胞在去除阻滞因素进入生长液后4~6 h转染,阻滞于G₂/M期的细胞在去除阻滞因素进入生长液后3 h转染。各组同步化细胞转染的时间点各异但转染步骤相似,由于PEI/DNA的比值影响到PEI介导的转染效率,故根据本课题组此前的试验结果设定5个质量梯度比(DNA每孔皆为2 μg,PEI/DNA=2/2、4/2、6/2、8/2、10/2)。每种细胞均进行5个PEI/DNA下的转染,每个都重复6个孔。取最高的作为该细胞的转染率。正常培养的Hela细胞与A549细胞在对数生长期(70%丰度)时进行转染,其转染率作为正常对照;未进行转染的Hela、A549细胞作为阴性对照。

1.3 统计学方法

所有数据采用SPSS10.0软件进行统计分析,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,配对设计的多组均数比较使用成组设计的方差分析,各组细胞之间的转染效率比较采用方差分析,取 $\alpha = 0.05$ 作为检验水准。

2 结果

2.1 同步化细胞的细胞周期及存活率

辐射法: Hela细胞的周期时相经1、2 Gy X射线辐射后未见到显著的变化,经4 Gy的X射线辐射后6 h可见到细胞周期阻滞于S期且细胞无明显损伤($P < 0.01$);而经8、16 Gy X射线辐射后6 h细胞周期阻滞于G₂/M期($P < 0.01$),但细胞损伤明显,细胞存活率低于80%(表1)。

A549细胞的周期时相经1、2、4 Gy的X射线辐射后未见到具统计学意义的改变,经8、16 Gy的X射线辐射后12 h都可见到细胞周期阻滞于G₂/M期(与对照组相比,G₂/M期细胞比例增高明显, $P < 0.001$)但细胞损伤明显,存活率低于80%(表2)。

药物阻滞法: Hela细胞S期细胞比例随DDP浓度及作用时间增加而增高,经3 μg/ml DDP作用24 h S期细胞比例增高尚不明显($P > 0.05$),经3 μg/ml DDP作用72 h即可将细胞周期阻滞于S期且细胞无明显损伤(与对照组相比,S期比例增高明显, $P < 0.05$),此后更高浓度和更长时间组S期细胞比例继续增高,但细胞损伤亦明显增高,细胞存活率 $< 80%$ (表3)。

A549细胞G₂/M期细胞比例随TXT浓度及作用时间增加而增高,10 ng/ml × 24 h组G₂/M期细胞比例增高尚不明显($P > 0.05$);经10 ng/ml TXT

表1 Hela细胞经不同剂量X射线辐射后细胞周期及相对存活率变化

Table 1 The cell cycle status and survival fraction of Hela cells received radiation ($\bar{x} \pm s, \%, n = 6$)

组别	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	存活率
对照组	68.46 ± 4.32	17.87 ± 2.31	13.67 ± 2.68	100.00
1 Gy	65.06 ± 4.52	18.73 ± 2.26	16.16 ± 4.06	97.48
2 Gy	62.73 ± 2.64	20.73 ± 2.79	16.54 ± 3.74	95.64
4 Gy	53.19 ± 3.44	29.57 ± 2.38*	17.39 ± 3.18	91.45
8 Gy	54.16 ± 2.60	24.84 ± 2.76	20.99 ± 2.33*	72.72
16 Gy	53.05 ± 2.67	23.88 ± 3.45	23.07 ± 2.55*	50.26

与对照组比较,* $P < 0.01$ 。

表2 A549细胞经不同剂量X射线辐射后细胞周期及相对存活率变化

Table 2 The cell cycle status and survival fraction of A549 cell received radiation ($\bar{x} \pm s, \%, n = 6$)

组别	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	存活率
对照组	69.07 ± 3.87	20.63 ± 4.91	10.30 ± 2.68	100.00
1 Gy	67.96 ± 4.32	19.98 ± 4.74	12.06 ± 4.21	98.15
2 Gy	66.93 ± 2.99	19.40 ± 4.34	14.05 ± 2.53	91.52
4 Gy	65.51 ± 7.25	19.71 ± 6.32	14.78 ± 1.06	84.78
8 Gy	57.33 ± 12.70	21.04 ± 8.85	21.63 ± 4.15*	65.64
16 Gy	46.88 ± 12.68	26.94 ± 10.95	26.18 ± 6.73*	54.42

与对照组比较,* $P < 0.01$ 。

表 3 HelA 细胞经不同剂量-时间的顺铂作用及血清饥饿法培养后细胞周期及相对存活率变化

Table 3 The cell cycle status and survival fraction of HeLa cells cultured with PDD ($\bar{x} \pm s, \%, n = 6$)

组 别	G0/G1	S	G2/M	存活率
对照组	68.46 ± 4.31	17.87 ± 2.31	13.67 ± 2.68	100.00
3 μg/ml × 24 h	65.22 ± 2.06	20.43 ± 1.74	14.36 ± 2.24	96.15
3 μg/ml × 72 h	58.22 ± 3.26	27.08 ± 1.31*	14.69 ± 2.63	90.85
9 μg/ml × 24 h	55.79 ± 2.49	28.98 ± 3.36**	15.24 ± 4.08	78.78
9 μg/ml × 72 h	42.84 ± 3.43	44.82 ± 3.51**	12.35 ± 4.71	62.64
血清饥饿组	87.44 ± 3.55***	7.62 ± 2.68	4.94 ± 1.43	88.54

与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

作用 48 h 可将细胞周期阻滞于 G2/M 期且细胞无明显损伤($P < 0.05$), 更高浓度和更长时间组 G2/M 期细胞比例显著增高, 但细胞损伤亦明显, 细胞存活率 < 80%(表 4)。

血清饥饿法培养: 本组结果显示血清饥饿法培养的 HeLa、A549 细胞皆可细胞周期阻滞于 G0/G1 期(表 3、4)且细胞存活率 > 80%。

2.2 同步化细胞的转染结果

根据上述同步化试验后细胞周期分布数据及细胞存活率数据的统计分析结果, 选择经 4Gy 的 X 射线辐射、3 μg/ml DDP 作用 72 h 的 HeLa 细胞(同步化于 S 期)和经 10 ng/ml TXT 作用 48h 的 A549 细胞(同步化于 G2/M 期)以及经血清饥饿法培养的此两种细胞(同步化于 G0/G1 期)进行转染试验, 并分别以正常培养的 HeLa 及 A549 细胞作为对照。

同步化细胞的转染结果也以镜下转染率和流式转染率 2 个指标体现。2 指标基本相似, 以流式细胞仪所测值进行统计分析。

对照组 HeLa 细胞在 5 种 PEI/DNA 比值下皆可

见绿色荧光蛋白表达, 以 6/2 组转染效率最高, 约 26%(表 5)。

HeLa 细胞经 4 Gy 的 X 射线辐射同步化于 S 期进行转染, 5 个质量比都可见表达, 和正常对照组一样也是在 PEI/DNA 为 6/2 组转染率最高, 转染率为 62%左右, 峰值可达对照组的 3 倍($P < 0.01$, 表 5), 并且表达很早, 在转染后 12 h 就可以看到绿色荧光。

HeLa 细胞经 3 μg/ml DDP 作用 72 h 细胞周期阻滞于 S 期, 进入完全培养基 6 h 后进行转染, 5 个质量比都可见表达, PEI/DNA 为 6/2 组转染率最高, 为 32%左右, 高于对照组($P < 0.05$, 表 5)。

对照组 A549 细胞转染后在 PEI/DNA 比值组未见表达, 后 4 组中亦以 6/2 组效率最高, 约 23%(表 6)。A549 细胞经 10 ng/ml TXT 作用 48 h 细胞周期阻滞于 G2/M 期, 进入完全培养基 4 h 后进行转染, 5 个质量比都可见表达, PEI/DNA=8/2 组转染率最高, 约 42%($P < 0.05$, 表 6)。

血清饥饿法培养得到的 G0/G1 期 HeLa 及 A549 细胞, 进入完全培养基 4 h 后转染 EGFP, 24 h

表 4 A549 细胞经不同剂量-时间的艾素作用及血清饥饿法培养后细胞周期及相对存活率变化

Table 4 The cell cycle status and survival fraction of A549 cell cultured with TXT ($\bar{x} \pm s, \%, n = 6$)

组 别	G0/G1	S	G2/M	存活率
对照组	66.40 ± 2.52	18.96 ± 1.15	14.64 ± 1.85	100.00
10 ng/ml × 24 h	65.77 ± 3.94	18.15 ± 1.68	16.08 ± 2.55	94.54
10 ng/ml × 48 h	58.96 ± 4.96	20.22 ± 2.18	20.82 ± 3.03*	88.85
50 ng/ml × 24 h	42.01 ± 8.08	21.31 ± 3.08	36.73 ± 6.89**	70.78
50 ng/ml × 48 h	28.86 ± 4.50	8.51 ± 1.57	62.63 ± 5.21**	58.64
血清饥饿组	88.51 ± 1.92***	6.50 ± 1.28	4.98 ± 1.32	90.78

与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

表 5 各组 HeLa 细胞的转染表达率

Table 5 The transfection efficiency of HeLa cell in each group

($\bar{x} \pm s, \%, n = 6$)

组 别	对照组	辐射组	DDP 组	血清饥饿组
镜下转染率	25.73 ± 4.25	60.38 ± 5.43	31.71 ± 4.89	2.67 ± 1.20***
流式转染率	26.02 ± 4.10	62.21 ± 5.40***	31.57 ± 1.66*	4.01 ± 0.92***

与对照组比较, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 。

表 6 各组 A549 细胞的转染表达率

Table 6 The transfection of efficiency A549 cell in each group

 $(\bar{x} \pm s, \%, n = 6)$

	对照组	TXT 组	血清饥饿组
镜下转染率	21.31 ± 2.41	39.33 ± 3.71	1.06 ± 0.58
流式转染率	23.17 ± 2.41	42.79 ± 3.32**	1.89 ± 0.86***

与对照组比较,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

后几乎看不到绿色荧光蛋白表达,48 h 两组均在 PEI/DNA 为 6/2 组见弱表达,HeLa 细胞检测表达率约为 4.01%;A549 细胞检测表达率约为 1.89%。辐射组同步化于 S 期的 HeLa 细胞的表达率约是同步化于 G0/G1 期 HeLa 细胞的 20 倍 ($P = 0.000$),而 TXT 组同步化于 G2/M 期的 A549 细胞的表达率约是同步化于 G0/G1 期 A549 细胞的 40 倍 ($P = 0.0001$)。

3 讨论

本组结果显示辐射主要使细胞同步化于 G2/M 期,在本研究中由于流式细胞仪很难区分 G2 和 M 期,所以将二者作为紧密联系的一个时相进行观察讨论。一定剂量-时间的顺铂可使 HeLa 细胞同步化于 S 期,这是由于顺铂具有类似烷化剂双功能基团的作用,主要与 DNA 链的碱基相互作用,引起 DNA 复制障碍,从而停滞于 S 期。艾素能使细胞微管系统过稳定并抑制微管解聚,使细胞停滞于 M 期。但是放疗手段除了使细胞同步化外更多表现为细胞毒性,那些被杀伤的靶细胞虽然不能转染外源性基因,但在流式细胞仪检测时仍被计数,故必然会降低转染率测定结果,这就会干扰我们对真正同步化细胞转染率的判断。为避免这种情况我们必须选择既有细胞周期阻滞效果又无明显细胞损伤的辐射及药物剂量-时间。根据作者预实验结果选择细胞存活率 >80% 的同步化细胞进行转染。

本实验同步化细胞的转染结果表明:阻滞于 S 期或 G2/M 期的细胞转染效率明显高于 G0/G1 期细胞,提示细胞周期能影响 PEI 介导的基因转染效率。细胞周期通过影响外源性基因的摄取、胞内转运入核以及在核内的复制、转录和翻译等多个环节来影响 PEI 的转染效率。Mannisto 等^[12]通过共聚焦显微镜也发现宿主细胞在 G1 期对外源性基因摄取很少,而在 S、G2/M 期则显著增高。Wang 等^[13]同样发现两种亚型的人骨髓间充质干细胞(hMSCs)的基因转染效率与 S 期细胞所占百分比呈线性相关。这种摄取能力的差异可能和细胞周期依赖性的胞吞作用有关,已有文献表明,细胞的胞吞作用随着 G1、S、

G2 期而逐渐增强,到分裂开始前又迅速下降^[14],本实验的结果符合这一规律,同步化于 S、G2/M 期细胞的绿色荧光蛋白表达要明显高于 G0/G1 期细胞 ($P = 0.000$),前者可达后者的 20~40 倍。

细胞在 M 期核膜会短暂破裂从而允许外源性 DNA(如质粒)进入细胞核内,一般来说分裂期的细胞比非分裂的分化细胞更容易转染,甚至有人认为核分裂是转染的前提条件^[15]。本实验结果表明同步化于 S 期的细胞转染效率比 G2/M 期要高,这和其他一些学者的研究结果相符合^[6,16]。S 期转染率较高的原因有多个,首先与 S 期核膜上的小孔(核膜孔)开放有关,由于核膜开放外源性基因容易进入核内,并且此时相 DNA 聚合酶、DNA 连接酶以及 RNA 聚合酶活性最强,容易整合进入宿主 DNA 链并作为模板被复制和转录,并进而较早得到较高表达;而 G2/M 期的细胞虽然核膜开放程度更高,但外源性基因不能及时参与合成反应,须等到下一细胞周期才能转录并表达。所以本实验中辐射组 HeLa 细胞转染后 12 h 即可观察到绿色荧光蛋白表达,而同步化于 G2/M 组则在 24 h 后才见到表达;其次与 S 期细胞的 DNA 修复能力有关。细胞对不同周期时相下损伤的修复能力是有区别的。和 G2/M 期相比较,S 期细胞更能转染并表达外源性基因。这就意味着 M 期并不是转染最重要的影响因素,核分裂对转染的重要性此前可能被过高评价了。认识这一点的意义在于,那些能使细胞阻滞于 S 期而不是 G2/M 期的药物或辐射剂量将来可能用于临床放、化疗和基因治疗。

由于同步化细胞在去除阻滞因素后会出现加速再群体化(accelerated repopulation)的现象,所以本实验中同步化细胞转染后 48 h 测定表达率时细胞已经经历了 1~2 个周期,也就意味着有些报告基因是在接近正常细胞分裂周期状态下入核、转录及表达。尽管这样,同步于 S、G2/M 期的细胞还是比正常对照组的转染率要高,同样 Brunner 等^[16]利用离心洗提法将肿瘤细胞分成 8 个细胞周期时相亚群,分别采用 lipofectin、聚 L-赖氨酸 (PLL)、PEI 进行转染,在转染后 45 h 检测荧光素酶表达发现 S 期、G2/M 期的转染效率是 G1 期的 30~500 倍,这提示

细胞周期对转染效率的影响是很强的,能在相当长时间内影响转染效率。

本实验中,HeLa 细胞经辐射和顺铂作用都能同步化于 S 期,但辐射组转染效率明显高于顺铂组,这种转染效率的差异首先可能与辐射组 S 期细胞比例高于顺铂组[(29.57 ± 2.38)% vs (27.08 ± 1.31)%]有关,其次还可能因为低剂量的辐射仅影响 DNA 复制使细胞周期停滞于 S 期,并且此时相辐射引起的染色单体断裂可迅速有效地被修复,并不影响蛋白质合成(基因表达),而金属类化疗药顺铂有类似烷化剂的作用,能抑制 DNA 复制及蛋白质合成。此外, Jain 等^[17]还发现电离辐射可以通过增加细胞主动摄取外源性物质的能力而增加基因转染效率。可见和化疗药物相比,辐射法同步化细胞更有利于随后的基因转染,而且临床上放射治疗是靶区局部受照,全身的不良反应较小。据此本文提出假设,未来对肿瘤进行放、化疗及基因治疗的综合治疗时,对有放疗适应症的患者可以选择放疗杀灭肿瘤并使残余瘤细胞同步化于 S 期,再辅以基因治疗。当然进一步的分析仍需要更多的实验来证实和完善。

本实验结果表明 PEI 作为基因载体其介导转染的效率是细胞周期依赖性的,转染效率的差异主要是由细胞在不同周期时相下对外源性基因的胞吞/摄取和转基因表达的差异所决定的。鳞癌或腺癌是常见的上皮性恶性肿瘤,二者都能在放/化疗手段下被同步化,而且同步化于 S 期及 G2/M 期的细胞在 PEI 介导基因转染时转染效率要明显高于 G0/G1 期的细胞。这为将来临床综合应用放、化疗及基因治疗探索了可能性。

[参考文献]

- [1] Park TG, Jeong JH, Kim SW. Current status of polymeric gene delivery systems [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2006, 58(4): 467-486
- [2] Vicennati P, Giuliano A, Ortaggi G, et al. Polyethylenimine in medicinal chemistry [J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2008, 15(27): 2826-2839
- [3] Hunter AC, Moghimi SM. Cationic carriers of genetic material and cell death: a mitochondrial tale [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1797(6-7): 1203-1209
- [4] Kichler A. Gene transfer with modified polyethylenimines

- [J]. *J Gene Med*, 2004, 6: s3-s10
- [5] Stefaan C De Smedt, Demeester J, Hennink WE. Cationic polymer based gene delivery systems [J]. *Pharmaceutical Res*, 2000, 17(2): 113-126
- [6] Brunner S, Furtbauer E, Sauer T, et al. Overcoming the nuclear barrier: cell cycle independent nonviral gene transfer with linear polyethylenimine or electroporation [J]. *Mol Ther*, 2002, 5(1): 80-86
- [7] Krek W, DeCaprio JA. Cell synchronization [J]. *Meth Enzymol*, 1995, 254: 114-124
- [8] Theron T, Bohm L. Cyclin B1 expression in response to abrogation of the radiation-induced G2/M block in HeLa cells [J]. *Cell Prolif*, 1998, 31(2): 49-57
- [9] 苏旭, 金光辉, 薛丽香, 等. 电离辐射对不同肿瘤细胞细胞周期的影响 [J]. *中华放射医学与防护杂志*, 2000, 20(3): 168-170
- [10] 杨业鹏, 陈冠英, 管增伟, 等. 60Co γ 射线诱发的 MCF-7 细胞周期阻滞 [J]. *辐射研究与辐射工艺学报*, 2002, 20(4): 281-283
- [11] 张卫东, 赵惠儒, 于秉志, 等. 斑蝥素对肺癌 A549 细胞周期阻滞作用机制的观察 [J]. *中国临床肿瘤*, 2004, 31(23): 1372-1374
- [12] Mannisto M, Ronkko S, Matto M, et al. The role of cell cycle on polyplex-mediated gene transfer into a retinal pigment epithelial cell line [J]. *J Gene Med*, 2005, 7(4): 466-476
- [13] Wang W, Li W, Ou L, et al. Polyethylenimine-mediated gene delivery into human bone marrow mesenchymal stem cells from patients [J]. *J Cell Mol Med*, 2011, 15(9): 1989-1998
- [14] Raucher D, Sheetz MP. Membrane expansion increases endocytosis rate during mitosis [J]. *J Cell Biol*, 1999, 144(3): 497-506
- [15] Tseng WC, Haselton FR, Giorgio TD. Mitosis enhances transgene expression of plasmid delivery by cationic liposomes [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1445(1): 53-64
- [16] Brunner S, Sauer T, Carotta S, et al. Cell cycle dependence of gene transfer by lipoplex, polyplex and recombinant adenovirus [J]. *Gene Ther*, 2000, 7(5): 401-407
- [17] Jain PT, Gewirtz DA. Sustained enhancement of liposome mediated gene delivery and gene expression in human breast tumor cells by ionizing radiation [J]. *Int J Radiat Biol*, 1999, 75(2): 217-223

[收稿日期] 2012-07-03