

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2013.02.013

病毒及非病毒载体对 U937 单核细胞的转染效果

张艳君¹, 贾秀红¹, 李建厂¹, 徐酉华²

(1. 滨州医学院附属医院儿科, 滨州 256603; 2. 重庆医科大学附属儿童医院肿瘤实验室, 重庆 400014)

【摘要】目的:比较研究腺病毒、慢病毒和 Lipofectamine 2000 3 种方法转染 U937 细胞的效果差异,以寻找一种简便、高效转染 U937 细胞的方法。**方法:**分别采用 Lipofectamine 2000 介导质粒载体(pGPHI/GFP/Neo),腺病毒(Adv-GFP-NC)和慢病毒(LV-GFP-NC)3 种方法转染 U937 细胞,于脂质体转染 48 h 后、腺病毒和慢病毒转染 96 h 后在荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白(green fluorescence protein, GFP)表达情况,并收集细胞以流式细胞仪检测 GFP 阳性细胞的比例。台盼蓝染色法计数不同转染方法对细胞活力的影响。**结果:**Lipofectamine 2000 介导质粒载体转染组、腺病毒转染组 GFP 阳性细胞极少,流式细胞仪检测 GFP 阳性细胞均<4%;慢病毒转染组 GFP 阳性细胞满视野,感染复数=100 时, GFP 阳性细胞约占 90%。台盼蓝染色法显示腺病毒、慢病毒组活细胞率明显高于脂质体组,差异具有统计学意义($P<0.01$)。**结论:**慢病毒不仅使 Lipofectamine 2000 和腺病毒能有效地将外源基因导入 U937 细胞内表达,也是转染 U937 细胞的理想载体。

【关键词】U937;腺病毒;慢病毒;质粒;转染效率**【中国图书分类法分类号】**R725.5**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2012-04-29

Transfection efficiency of virus and non-viral vectors against U937 monocytes

ZHANG Yanjun¹, JIA Xiuhong¹, LI Jianchang¹, XU Youhua²

(1. Department of Pediatrics, the Affiliated Hospital, Binzhou Medical University; 2. Laboratory of Hematology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To compare the transfection efficiencies among adenovirus, lentivirus and Lipofectamine 2000 and to explore an efficient way for U937 cells transfection. **Methods:** U937 cells were transfected with Lipofectamine 2000-plasmid(pGPHI/GFP/Neo), adenovirus vector(Adv-GFP-NC) and lentivirus vector(LV-GFP-NC), respectively. Expressions of green fluorescence protein(GFP) were detected under fluorescence microscopy respectively at 48 h after Lipofectamine 2000 transfection, at 96 h after adenovirus vector(Adv-GFP-NC) transfection and at 96 h after lentivirus vector transfection. U937 cells were collected for GFP-positive cells count with flow cytometry. Meanwhile, Trypan blue staining was employed to determine the cell viability. **Results:** GFP-positive cells were rare in Lipofectamine 2000 group and adenovirus vector group, with percentages of GFP-positive cells less than 4%. But in lentivirus group, the percentage of GFP-positive cells was about 90%(multiplicity of infection=100). Trypan blue staining showed that the ratios of living cells were significantly higher in adenovirus group and lentivirus group than in Lipofectamine 2000 group($P<0.01$). **Conclusions:** Lentivirus, other than Lipofectamine 2000 or adenovirus, can efficiently transfect exogenous genes into U937 cells for gene expression and it is an ideal vehicle for U937 cell transfection.

【Key words】U937;adenovirus;lentivirus;plasmid;transfection efficiency

U937 细胞系由 Sundstrom 和 Nilsson 在 1974 年建立,取材于患组织细胞淋巴瘤病人的胸水,是急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)的单核细胞株,具有悬浮生长的特性。U937 细胞高表达同源盒 A9(homeoboxA9, HOXA9)、HOXA10 等基因,广泛用于基因功能及药物敏感性的研究,是探讨 HOXA9、HOXA10 与 AML 关系的理想工具细胞^[1-2]。U937 细胞悬浮生长,难于转染,国内潘俊杰等^[3]用

转染试剂、电穿孔等非病毒的方法转染 U937 细胞,转染效率均低于 50%且对细胞活力影响较大。Roddie 等^[4]发现反转录病毒[感染复数(multiplicity of infection, MOI)=10]对 U937 细胞的转染效率约为 39%,而腺病毒(MOI=40)的转染效率约为 62%;在聚凝胺作用下用慢病毒对 THP-1(单核细胞白血病细胞株)和 U937 的转染效率可高达 97%(MOI=10),提示腺病毒、慢病毒对 U937 细胞的转染效率优于逆转录病毒^[5]。本研究拟比较梯度 MOI 下腺病毒和慢病毒对 U937 细胞的转染效率的差异,并与非病毒转染方式作对比,旨在寻找转染 U937 细胞的最佳方法。

作者介绍:张艳君, Email: 15192313735@163.com,

研究方向:小儿血液病学。

通信作者:贾秀红, Email: jiaxiuhong001@163.com。

基金项目:山东省科学技术发展计划资助项目(编号:2010GSF10264)。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

人急性髓系白血病细胞株 U937 (购自中国科学院细胞库); RPMI1640 (Hyclone 公司), GIBCO 胎牛血清 (美国 Invitrogen 公司); 脂质体 (Lipofectamine) 2000 (Invitrogen 公司); 慢病毒 (LV-GFP-NC) (购自上海吉凯基因化学技术有限公司); 腺病毒 (Adv-GFP-NC) (重庆医科大学附属儿童医院肿瘤实验室保存); 无内毒素质粒小量制备试剂盒 (北京百泰克生物技术研究所有限公司); 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 细胞培养

U937 细胞在含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 U/ml 链霉素的 RPMI1640 培养液, 37 °C、5% CO₂、饱和湿度条件下进行培养。细胞生长良好, 隔天换液并传代 1 次, 实验均选用对数生长期细胞。

1.3 Lipofectamine 2000 介导质粒转染 U937 细胞

U937 细胞接种到 6 孔细胞培养板中, 接种之前用无血清无抗生素的 RPMI1640 培养基 (双无培养基) 轻柔的洗 2 遍, 每孔 2 ml 细胞悬液, 约 6×10^5 个细胞, 接种后紧接转染。设未转染质粒细胞为阴性对照, 每个样本设 3 个复孔。取 250 μ l 双无培养基分别稀释 1 000 ng 质粒和 5 μ l Lipofectamine 2000, 室温孵育 5 min, 之后两者混合, 静置 20 min 后将脂质体-质粒混合物加入孔内, 用双无培养基培养 5 h 后, 将孔板离心, 弃去上清改为完全培养基继续培养, 48 h 后在倒置荧光显微镜下观察转染效果。

1.4 慢病毒、腺病毒转染 U937 细胞

取对数生长期的 U937 细胞接种到 24 孔培养板, 每孔 500 μ l 细胞悬液, 约 1.5×10^5 个细胞, 分别加入腺病毒和慢病毒 (MOI 取值 10、20、50、100、200), 并设未转染病毒的细胞为阴性对照, 每个样本设 3 个复孔, 转染 8 h 后更换培养基, 培养 48 h 后换液并转移至 6 孔板继续培养, 转染 96 h 后在倒置荧光显微镜下观察转染效率。

1.5 流式细胞仪检测阳性细胞比例

荧光显微镜下观察 3 种方法的转染效果, 采集图片后 1 500 r/min 离心 5 min 收集细胞, 用 PBS 洗涤细胞 2 遍, 再次重悬后经流式细胞仪检测各样本中绿色荧光蛋白 (green fluorescence protein, GFP) 阳性细胞的比例, 本实验重复 3 次。

1.6 台盼蓝染色检测各组细胞活力

分别于质粒 Lipofectamine 2000 转染 48 h 后、腺病毒和

慢病毒转染 96 h 后, 收集孔板内细胞 1 500 r/min 离心 10 min, 弃上清, 用 1 ml 培养基重悬细胞, 取 100 μ l, 加入 100 μ l 台盼蓝染色液 (2 $\times$), 轻轻混匀, 染色 3 min。吸取 10 μ l 经过染色的细胞, 用细胞计数板计数, 得到蓝色细胞数和细胞总数。重复计数 3 次取其均值, 并独立重复 3 次。细胞存活率 = (细胞总数 - 蓝色细胞数) / 细胞总数 $\times$ 100%。

1.7 统计学分析

应用 SPSS 13.0 进行统计分析。所有数据均以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两独立样本的比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 多个均数间两两比较采用 *LSD-t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$, 以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

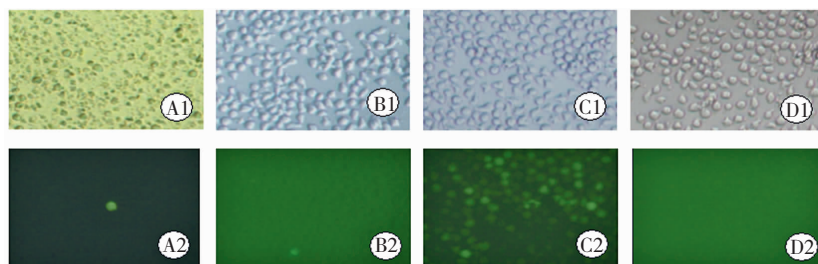
2 结果

2.1 荧光显微镜下 U937 细胞转染效果

可见慢病毒转染组 GFP 阳性细胞满视野, 而质粒转染组和腺病毒转染组 GFP 阳性细胞较少, 脂质体介导的质粒转染对 U937 细胞的毒性较大, 可见大量细胞凋亡, 而腺病毒和慢病毒对细胞毒性较小, 细胞形态没有明显改变, 生存状态良好 (图 1)。

2.2 流式细胞术检测结果

分别于质粒转染后 48 h 和慢病毒、腺病毒转染后 96 h 收集细胞以流式细胞仪检测 GFP 阳性细胞比例。如图 2 所示, 图 2A 为阴性对照细胞 GFP 阳性率, 脂质体转染后阳性细胞比例最高为 2.17% (图 2B), MOI=20 时腺病毒对 U937 细胞转染效率最高, 阳性细胞比例为 3.47% (图 2C), MOI=100 时慢病毒转染效率最高, 阳性细胞比例为 90.27% (图 2D)。3 次重复实验结果显示脂质体的转染效率为 $(2.22 \pm 0.16)\%$, 腺病毒 (MOI=20) 的转染效率为 $(3.22 \pm 0.37)\%$, 慢病毒 (MOI=100) 的转染效率为 $(90.04 \pm 0.23)\%$, 阴性对照细胞 GFP 阳性率为 $(0.86 \pm 0.55)\%$ 。慢病毒转染组 (MOI=100) 转染效率与腺病毒转染组 (MOI=20)、Lipofectamine 2000 组、阴性对照组相比, 组间差异具有统计学意义 ($F=44.546, P=0.000$); *LSD* 法两两比较显示慢病毒转染组与其它 3 组的转染效率差异明显 ($P=0.000 < 0.01$), 其它 3 组之间差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 但转染效率均较低。MOI 取相同值时慢病毒的转染效率高与腺病毒 (表 1), 差异具有统计学意义 (MOI=10: $t=42.74$; MOI=20: $t=177.92$; MOI=50: $t=266.04$; MOI=100: $t=503.72$, 所有组 $P=0.000 < 0.01$)。以上提示 3 种方法中仅有慢病毒能有



A. Lipofectamine 2000 组 (48 h); B. 腺病毒转染组 (96 h); C. 慢病毒转染组 (96 h); D. 阴性对照组 (96 h)

A1~D1 为白光照片; A2~D2 为荧光照片

图 1 细胞转染后白光和荧光照片 (100 $\times$)

Fig.1 White light and fluorescence photographs after transfection (100 $\times$)

效地将外源性基因转入 U937 细胞内进行表达。

2.3 转染后各组细胞活力情况

腺病毒转染、慢病毒转染 96 h 后细胞存活率分别为 $(93.94 \pm 1.79)\%$ 、 $(97.03 \pm 0.4)\%$, Lipofectamine 2000 组转染 48 h 后细胞存活率为 $(77.32 \pm 2.53)\%$, 腺病毒转染、慢病毒转染组细胞存活率高于脂质体组, 组间差异具有统计学意义 ($F=103.4, P=0.000$), LSD 法多重比较显示腺病毒、慢病毒之间差异无统计学意义 ($P=0.081$); 腺病毒转染、慢病毒转染分别与 Lipofectamine 2000 组相比差异具有统计学意义 ($P=0.000$)。

3 讨论

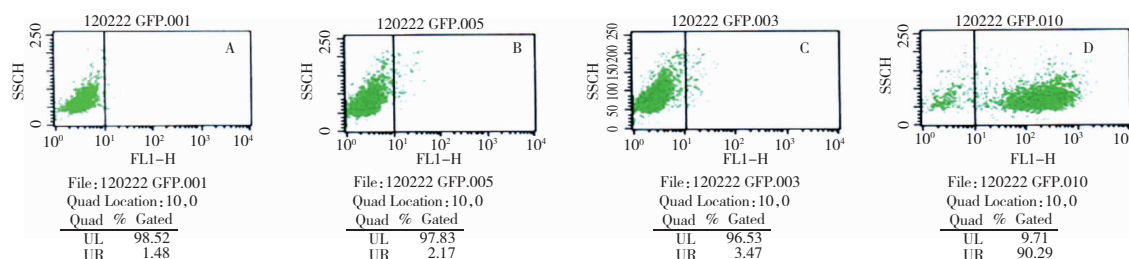
U937 细胞系人 M5 型单核细胞白血病细胞株, 悬浮生长, 与 HL-60、NB4、K562、Jurkat 细胞同属于人白血病细胞株, 它们的共同特点是很难被转染。有的学者用电穿孔的方法转染 U937 细胞构建稳转细胞株, 电击对细胞的损伤比较大, 细胞死亡过半, 除此以外腺病毒和慢病毒是比较常用的转染载体, 它们均对很多细胞具有较高的转染效率, 但各有优缺点。

腺病毒具有易制备、滴度高、高效转染静止和分裂期的细胞、不产生插入突变等优点; 缺点是腺病毒载体不与目的细胞染色体整合, 转入基因得不到长期表达, 因而作用会衰减, 其次, 腺病毒的免疫源性较慢病毒强^[6]。目前, 多数腺病毒载体来源于 C 型腺病毒的 2 血清型和 5 血清型 (即 Ad2 和 Ad5), 因为研究的较多, 而且核苷酸序列已知, 但二者对静止期的血液细胞转染效率非常低^[7]。Segerman 等^[8]研究发现腺病毒 B 亚属的 2 个血清型 Ad11p 和 Ad35p, 它们对血液细胞的结合效率非常高。Ad5 基

因序列的末端被 Ad35 的纤毛序列代替形成新的亚型 Ad5F35, Nilsson 等^[9]发现 Ad5F35 对原代白血病细胞的转染效率高于 Ad5, 提示 F35 纤毛蛋白对腺病毒转染效率的高低起着至关重要的作用。Na 和 Fan^[10]构建了含双启动子的 Ad5F35, 它调控双基因表达作用强于单启动子的 Ad5F35, 且双启动子 Ad5F35 可调控髓系祖细胞的分化, 提示它可能对髓系白血病细胞的增值和分化具有调控作用, 对白血病具有一定的治疗意义。Ad5F35 对于瞬时转染血液细胞的研究带来新的希望。

慢病毒载体也可以高效转染分裂细胞和非分裂细胞, 其携带的目的基因可在宿主细胞内长期表达, 目前慢病毒多被用来作为基因干扰载体, 可使被干扰基因长期不表达或低表达, 但慢病毒干扰载体产生的脱靶效应对细胞产生毒性, 并且 siRNA 会干扰内源性的微小 RNA (micro-RNA, miRNA) 对基因表达的调节^[11]。Lee 和 Reiner^[5]用包膜上嵌合了水泡口炎病毒 (vesicular stomatitis virus, VSV)-G 蛋白的慢病毒载体转染 THP-1 (单核细胞白血病细胞株) 和 U937, 转染效率高达 97% (MOI=10), p110 α (PI3 激酶的亚型) 基因被持久而稳定的沉默掉, 慢病毒对血液细胞转染效率的显著提高与 VSV-G 蛋白密切相关, 它可以提高慢病毒对目的细胞的亲和力。本次实验慢病毒对 U937 细胞的转染效率 (MOI=10) 为 $(50.67 \pm 2.00)\%$, 低于上述转染效率, 考虑与未加入聚凝胺有关, 聚凝胺可显著增强慢病毒对细胞的转染效率。

叶双梅等^[12]取健康人外周血分离得到单核细胞, 分别用脂质体、腺病毒、慢病毒转染单核细胞, 发现腺病毒对单核细胞的转染效率优于脂质体和慢病毒, 而本研究发现慢病毒对单核细胞白血病细胞株



A. 阴性对照组; B. Lipofectamine 2000 组; C. 腺病毒转染组; D. 慢病毒转染组

图 2 流式细胞仪检测各组 GFP 阳性细胞率 (%)

Fig.2 GFP positive cell rates detected by flowcytometry (%)

表 1 MOI 取不同值时腺病毒、慢病毒对 U937 细胞的转染效率

Tab.1 Transfection efficiency of adenovirus and lentivirus against U937 cells at different MOI values

组别	MOI				
	10	20	50	100	200
腺病毒转染组	1.14 ± 0.27	3.22 ± 0.37	1.79 ± 0.15	2.05 ± 0.19	1.72 ± 0.39
慢病毒转染组	50.67 ± 2.00 ^a	61.22 ± 0.42 ^a	79.34 ± 0.48 ^a	90.04 ± 0.23 ^a	—

注: a, MOI 取相同值时腺病毒和慢病毒对 U937 细胞的转染效率差异具有统计学意义 ($P=0.000 < 0.01$); —, 没有检测

U937 细胞转染效率明显高于腺病毒,与上述实验结论不同的原因可能在于:①健康人外周血分离得到单核细胞贴壁生长,易于转染,而单核细胞白血病细胞株 U937 悬浮生长,较难转染,悬浮细胞难以转染的具体机制尚不明确。②所用腺病毒类型不同,如 Ad5 与 Ad5F35 对血液细胞的转染效率存在较大差别,本实验所用腺病毒为 Ad5 型。潘俊杰等^[3]研究发现 Lipofectamine 2000 介导的质粒转染 U937 细胞的效率为 $(13.63 \pm 1.47)\%$,与本实验结果稍有出入,可能与细胞传代次数、细胞状态、质粒与 Lipofectamine 2000 的比例不同有关。

Lipofectamine 2000、腺病毒、慢病毒 3 者转染效率不同可能与它们对 U937 细胞的亲嗜性不同有关。脂质体是通过细胞的内存作用将其携带的 DNA 导入细胞内,其转染效率差且对细胞的毒性作用大。Ad5 型腺病毒成功、高效转染目的细胞,需要细胞表面高表达柯萨奇腺病毒受体(coxsackie adenovirus receptor, CAR),但是血液细胞和白血病细胞表面 CAR 的表达量非常少, U937 细胞较难被 Ad5 型腺病毒转染可能与其表面 CAR 低表达有关^[13-15]。本实验所用慢病毒载体系统由 pGC-LV 载体、pHelper1.0 载体和 pHelper2.0 载体 3 质粒组成, pHelper2.0 载体中含有 VSV-G 基因,它可以提供病毒包装所需要的包膜蛋白, VSV-G 是一种糖蛋白,可显著提高慢病毒对目的细胞的转染效率及扩大被转染的细胞种类,其机制可能是 VSV-G 提供的抗原表位可与细胞表面分子结合,增加细胞被慢病毒转染的机会^[16]。

本研究发现 Ad5 型腺病毒随着感染复数的增高,转染效率变化不大,所以提高 Ad5 型腺病毒的 MOI 值,转染效率也很难得到显著提高;慢病毒随着 MOI 的增高,转染效率逐渐增高,提示 MOI>100 时转染效率还会增加;慢病毒转染 U937 细胞的效率高,而且对细胞的毒性作用小,几乎不影响细胞的生长,故转染效果最好。总之, Ad5 型腺病毒对 U937 转染效率非常低,但经过改造的 Ad5F35 对血液细胞的转染效果较好,腺病毒在 293T 工具细胞内可大量扩增,容易获得,可很好的满足瞬时转染目的细胞的研究需要;慢病毒对 U937 细胞转染效率高,而且携带的基因可在目的细胞内稳定而持久的表达,是实现长期 RNAi 的理想载体。

参 考 文 献

- [1] Fiskus W, Pranpat M, Balasis M, et al. Histone deacetylase inhibitors deplete enhancer of zeste 2 and associated polycomb repressive complex 2 proteins in human acute leukemia cells[J]. *Mol Cancer Ther*, 2006, 5(12): 3096-3104.
- [2] Gemelli C, Orlandi C, Zanocco Marani T, et al. The Vitamin D3/Hox-A10 Pathway Supports MafB Function during the Monocyte Differentiation of Human CD34⁺Hemopoietic Progenitors[J]. *J Immunol*, 2008, 181(8): 5660-5672.
- [3] 潘俊杰, 施海明, 罗心平, 等. U937 单核细胞几种不同转染方法的比较[J]. *复旦学报(医学版)*, 2010, 37(5): 594-597.
- [4] Pan J J, Shi H M, Luo X P, et al. Comparison of the transfection efficiency of U937 monocytes by different methods[J]. *Fudan University Journal of Medical Science*, 2010, 37(5): 594-597.
- [5] Roddie P H, Paterson T, Turner M L. Gene transfer to primary acute myeloid leukemia blasts and myeloid leukemia cell lines[J]. *Cytokines Cell Mol Ther*, 2000, 6(3): 127-134.
- [6] Lee J S, Reiner N E. Stable lentiviral vector-mediated gene silencing in human monocytic cell lines[J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 531: 287-300.
- [7] Järäs M, Brun A C, Karlsson S, et al. Adenoviral vectors for transient gene expression in human primitive hematopoietic cells: applications and prospects[J]. *Exp Hematol*, 2007, 35(3): 343-349.
- [8] Cantwell M J, Sharma S, Friedmann T, et al. Adenovirus vector infection of chronic lymphocytic leukemia B cells[J]. *Blood*, 1996, 88(12): 4676-4683.
- [9] Segerman A, Lindman K, Mei Y F, et al. Adenovirus types 11p and 35 attach to and infect primary lymphocytes and monocytes, but hexon expression in T-cells requires prior activation[J]. *Virology*, 2006, 349(1): 96-111.
- [10] Nilsson M, Ljungberg J, Richter J, et al. Development of an adenoviral vector system with adenovirus serotype 35 tropism; efficient transient gene transfer into primary malignant hematopoietic cells[J]. *J Gene Med*, 2004, 6(6): 631-641.
- [11] Na M, Fan X. Design of Ad5F35 vectors for coordinated dual gene expression in candidate human hematopoietic stem cells[J]. *Exp Hematol*, 2010, 38(6): 446-452.
- [12] Manjunath N, Wu H, Subramanya S, et al. Lentiviral delivery of short hairpin RNAs[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61(9): 732-745.
- [13] 叶双梅, 阚淳一, 杨丽兰, 等. 人外周血单核细胞 3 种不同转染方法的比较[J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2011, 40(2): 196-199.
- [14] Ye S M, Kan C Y, Yang L L, et al. Comparison of transfection efficiency of monocytes from human peripheral blood by three different methods[J]. *Acta Med Univ Sci Technol Huazhong*, 2011, 40(2): 196-199.
- [15] Rebel V I, Hartnett S, Denham J, et al. Maturation and lineage-specific expression of the coxsackie and adenovirus receptor in hematopoietic cells[J]. *Stem Cells*, 2000, 18(3): 176-182.
- [16] Wang Y, Xue S, Hallden G, et al. Virus-associated RNA I-deleted adenovirus, a potential oncolytic agent targeting EBV-associated tumors[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(4): 1523-1531.
- [17] Medina D, Sheay W, Goodell L, et al. Adenovirus mediated cytotoxicity of chronic lymphocytic leukemia cells[J]. *Blood*, 1999, 94(10): 3499-3508.
- [18] Farley D C, Iqbal S, Smith J C, et al. Factors that influence VSV-G pseudotyping and transduction efficiency of lentiviral vectors—in vitro and in vivo implications[J]. *J Gene Med*, 2007, 9(5): 345-356.

(责任编辑:关蕴良)