

• 基础实验研究 •

# CTGF shRNA 表达质粒对翼状胬肉成纤维细胞的转染条件优化\*

罗丽卿, 吴平<sup>△</sup>, 刘艳艳, 何惠娟, 王思捷, 吴伟全  
(广东医学院附属医院临床医学研究中心, 广东湛江 524001)

**摘要:**目的 用 CTGF shRNA 表达质粒转染翼状胬肉成纤维细胞, 筛选质粒与脂质体的最佳比例, 确定最佳转染方案。方法 组织块法培养人眼翼状胬肉成纤维细胞, 经细胞免疫组化法(SP 法)鉴定, 取 2~3 代细胞, 将 CTGF shRNA 表达质粒与脂质体转染试剂 Lipofectamin 2000 以不同的比例进行转染, 24 h 后应用流式细胞仪检测转染效率。测定各组的转染效率, 筛选出质粒与脂质体的最适比例。结果 质粒与脂质体的转染比例为 1:2.5 时, 转染效率最高, 达(56.7±1.5)%。结论 本实验为有效地进行体外胬肉成纤维细胞转染及进一步研究重组质粒 CTGF shRNA 对翼状胬肉干扰奠定了基础。

**关键词:**翼状胬肉; 成纤维细胞; 结缔组织生长因子; 短发夹 RNA

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.01.021 文献标识码:A 文章编号:1673-4130(2012)01-0049-02

## Optimization of transfection conditions of CTGF shRNA plasmids into pterygium fibroblasts\*

Luo Liqing, Wu Ping<sup>△</sup>, Liu Yanyan, He Huijuan, Wang Sijie, Wu Wei-quan  
(Research Center of Medical Science, Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang Guangdong 524001, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the optimal ratio of plasmids to Lipofectamin 2000 after CTGF shRNA plasmids were transfected to pterygium fibroblasts. **Methods** The primary pterygium fibroblasts were cultured using the method of attachment tissues, and identified with immunohistochemical SP method. Cells of the second or third generation were transfected by using different ratios of CTGF shRNA plasmids to Lipofectamin 2000. After 24 h, the cell transfection efficiency was analyzed by flow cytometry. Then the optimal ratio of plasmids to Lipofectamin 2000 was determined according to the highest transfection efficiency. **Results** The optimal ratio of plasmids to Lipofectamin 2000 was 1:2.5, and the transfection efficiency was (56.7±1.5)%. **Conclusion** This experiment might lay the foundation for performing efficient in vitro transfection into cultured cells and further research on RNA interfere of CTGF gene.

**Key words:** pterygium; fibroblasts; connective tissue growth factor; short hairpin RNA

翼状胬肉是眼科常见病和多发病, 是局部球结膜及其下纤维血管组织呈三角形膜样增生而侵犯角膜的一种慢性眼表疾病<sup>[1]</sup>。翼状胬肉的治疗方法虽多, 但治疗效果都不甚理想, 术后易复发, 而且预防复发的药物有较多的不良反应。结缔组织生长因子(CTGF)是一种新发现的促纤维化细胞因子, 是 TGF- $\beta_1$  致纤维化作用的直接下游效应介质<sup>[2]</sup>。CTGF 参与促进成纤维细胞的活化、转化、增殖及迁移, 或参与胶原合成及其他细胞外基质的表达等, 与各器官组织的纤维化过程密切相关<sup>[3]</sup>。近年研究发现<sup>[4]</sup>, CTGF 与翼状胬肉的发生、发展有密切关系。RNA 干扰是将双链 RNA 导入细胞引起特异基因 mRNA 降解的一种反应现象, 能特异地介导同源基因沉默, 抑制同源基因表达, 从而下调相应蛋白水平及其功能<sup>[5]</sup>。本研究旨在应用结缔组织生长因子短发夹 RNA(CTGF shRNA)表达质粒转染翼状胬肉成纤维细胞, 研究其对 CTGF mRNA 和蛋白表达的影响及对细胞外基质分泌的影响。但 CTGF shRNA 表达质粒对翼状胬肉成纤维细胞的转染效率是实验关键, 因此, 本文主要研究其转染效率, 并将研究情况报道如下。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 主要试剂** pGenesil-CTGF shRNA 表达质粒由上海吉玛制药技术有限公司合成; DMEM 低糖培养基(Gibco 公

司); 脂质体 Lipofectamin 2000 (Invitrogen 公司)。pGenesil-CTGF shRNA 表达质粒的靶序列: AAA GTG CAT CCG TAC TCC CAA; 正义链: 5' CAC CGA AAG TGC ATC CGT ACT CCC AAT TCA AGA GAT TGG GAG TAC GGA TGC ACT TTT TTT TTG 3'; 反义链: 5' GAT CCA AAA AAA AAG TGC ATC CGT ACT CCC AAT CTC TTG AAT TGG GAG TAC GGA TGC ACT TTC 3'。

**1.1.2 标本来源** 培养组织取自本院眼科翼状胬肉患者手术切除标本。

#### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 在无菌条件下, 将手术切取的胬肉标本剪成(0.5~1)mm<sup>3</sup> 大小的组织块, 接种于 25 cm<sup>2</sup> 的培养瓶, 具体参考 Solomon 等<sup>[6]</sup>报道的方法进行翼状胬肉成纤维细胞的原代和传代培养, 实验选用第 4~9 代细胞。在培养过程中, 逐日使用显微镜观察成纤维细胞原代及传代培养的生长情况, 并定期显微镜下拍照。

**1.2.2 成纤维细胞鉴定** 应用 SP 法检测细胞中波形蛋白表达情况, 以鉴定培养的细胞是否为成纤维细胞。

**1.2.3 质粒转染** 转染前 24 h 传代接种, 转染时细胞达 80%~90% 融合度, 吸去原培养液, 用 PBS 洗 2 次后, 加入适量无血清培养基 Opti-MEM。使用 Lipofectamin 2000 脂质体

\* 基金项目: 广东省科技计划资助项目(2010B031600287)。 <sup>△</sup> 通讯作者, E-mail: wping62@126.com。

转染试剂,按照 pEGFP 质粒,脂质体分别按 1:0.5、1:1.0、1:1.5、1:2.0、1:2.5、1:3.0、1:4.0、1:5.0 的比例配置质粒与脂质体混合液,所用培养液为 Opti-MEM 培养液,以防止血清对转染效率的影响。细胞转染 4~6 h 后,更换含 10% NBS 无抗菌剂 DMEM 培养液,24 h 后测量细胞的转染效率。每组设三个平行孔。

**1.2.4 流式细胞仪检测转染效率** 细胞转染 24 h 后,荧光显微镜下观察阳性细胞。拍照细胞用 PBS 冲洗 2 次,加入胰酶消化;收集细胞,用 PBS 洗涤 2 次,然后用 1 mL PBS 重悬细胞,流式细胞仪检测总细胞中表达绿色荧光蛋白 EGFP 的细胞的比例,以确定其转染效率,筛选出质粒与脂质体的最佳比例,确定最佳转染方案。

## 2 结 果

**2.1 翼状胬肉成纤维细胞的培养和鉴定** 组织块接种后在 24 h 内基本贴壁,1 周后组织块周围可见细胞萌出,呈梭形或不规则三角形,向外伸出 2~3 个长短不同的伪足。2 周后以组织块为中心,呈放射状向周围生长、繁殖,聚集成大小不一的细胞晕,随后,细胞迅速生长并连成片,细胞的生长排列多呈放射状、编织状或旋涡状走行。传代后,成纤维细胞约 6 h 贴壁,6~8 d 后细胞生长成片,很快长满瓶底,形成单层细胞。体外培养的翼状胬肉成纤维细胞经 SP 法染色可见波形蛋白表达阳性,阳性表达位于胞浆,呈现与成纤维细胞长轴方向一致的棕黄色束状或网状结构。

**2.2 pEGFP 重组质粒对成纤维细胞的转染效率** 转染 24 h,倒置荧光显微镜下观察阳性细胞发出绿色荧光。重组质粒的转染效率直接影响基因的沉默效果,故需要筛选到稳定的、最优的转染效率,以得到稳定的转染效果。细胞转染 24 h 后用流式细胞仪进行检测,质粒:脂质体分别为 1:0.5、1:1.0、1:1.5、1:2.0、1:2.5、1:3.0、1:4.0、1:5.0 时,细胞转染效率为(23.2±0.7)%、(29.3±1.5)%、(31.8±1.0)%、(45.7±1.0)%、(56.7±1.5)%、(42.8±1.6)%、(29.1±2.5)%、(22.1±0.9)%,得出质粒与脂质体的最佳比例为 1:2.5,此时转染效率最高。

## 3 讨 论

翼状胬肉是眼科较为常见的眼表疾病之一,其临床表现为呈三角形增厚的球结膜组织病变,其头部侵袭生长至角膜,体部位于睑裂区的一侧,大多生长在鼻侧。增生的组织肥厚,血管扩张,不仅影响美容,如向角膜中央生长可引起角膜散光而导致视力下降,如进入瞳孔区则严重影响视力。翼状胬肉的病理特点主要是异常增生的成纤维细胞及新生血管,伴有炎细胞浸润和细胞外基质过度沉积<sup>[7]</sup>,是一种纤维化病变。

翼状胬肉组织块原代培养生长出的细胞主要是成纤维细胞,也有一部分上皮细胞。本实验通过传代时两种细胞对胰蛋白酶的耐受性不同、再次贴壁难易差别及细胞不同时期增殖活性的差异,进行 2、3 次细胞传代,即可获得纯化成纤维细胞,进一步采用免疫组织化学法对细胞进行鉴定。5 种细胞骨架中间丝蛋白的表达具有组织特异性,上皮细胞常用细胞角蛋白作标志,成纤维细胞则可用波形蛋白作标志。本实验培养的成纤维细胞对波形蛋白表达阳性,结合组织来源及细胞生长特性可以确认为成纤维细胞。

目前研究发现<sup>[8]</sup>,翼状胬肉组织中有许多细胞因子的表达增加,如 IL-1、IL-6、IL-8、TNF-α、FGF-2、VEGF、Hb-EGF、

TGF-β、PDGF 及 CTGF 等的表达,其中 CTGF 在翼状胬肉的发生、发展中起重要作用。已有大量研究表明,CTGF 靶向 siRNA 可以通过阻抑 CTGF 的表达,进而阻止纤维化疾病的进展。Xiao 等<sup>[9]</sup>在对系统性硬化症患者的皮肤成纤维细胞研究中,首次发现 CTGF 靶向 siRNA 能抑制 CTGF 和 I、Ⅲ型胶原的表达。赵平和李世荣<sup>[10]</sup>在对人瘢痕疙瘩的治疗研究中发现,针对 CTGF 基因的 siRNA 干扰质粒转染瘢痕疙瘩成纤维细胞后能明显抑制 CTGF mRNA 表达,降低 CTGF 蛋白含量及胶原蛋白分泌水平。还有研究表明<sup>[11]</sup>,CTGF 靶向 siRNA 能高效、特异地抑制大鼠肝星状细胞中 CTGF 基因的表达,显著抑制肝星状细胞的活化、增殖,减少 I、Ⅲ型胶原的合成。这些研究结果提示,siRNA 介导的 CTGF 基因沉默对纤维化疾病具有治疗潜力。因此,本实验应用 CTGF shRNA 表达质粒转染翼状胬肉成纤维细胞,研究其影响作用。

脂质体作为一种体内和体外输送载体的工具,已有较多研究,它适用于把 DNA 或 RNA 转染入悬浮或贴壁细胞中,是目前条件下最方便且转染率高的转染方法之一<sup>[12]</sup>。已有报道其对很多细胞系如 HEK-293、COS-7、CHO、PC12、MDCK 以及人成纤维细胞都有良好的转染效果<sup>[13-15]</sup>。转染过程中,脂质体和质粒的用量比例应适当。脂质体用量太少,不能将外源 DNA 完全包裹,形成脂质体 DNA 复合物;用量过多,增大对细胞的毒性,破坏细胞的生长状态<sup>[16]</sup>。本实验研究表明,在质粒:脂质体分别为 1:0.5、1:1.0、1:1.5、1:2.0、1:2.5、1:3.0、1:4.0、1:5.0 时,细胞转染 24 h 后,转染效率最高的质粒与脂质体的比例为 1:2.5,转染效率为(56.7±1.5)%。

本实验通过加入重组质粒与不同比例的脂质体形成复合物,转染翼状胬肉成纤维细胞摸索出最适宜条件,不仅为胬肉成纤维细胞转染提供依据,也为体外其他成纤维细胞转染提供参考。

## 参考文献

- [1] Golu T, Mogoanta L, Streba CT, et al. Pterygium: histological and immunohistochemical aspects[J]. Rom J Morphol Embryol, 2011, 52(1):153-158.
- [2] Kim KH, Park GT, Lim YB, et al. Expression of connective tissue growth factor, a biomarker in senescence of human diploid fibroblasts, is up-regulated by a transforming growth factor-beta-mediated signaling pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 318:819-825.
- [3] 田海霞, 王超英. 结缔组织生长因子在眼科疾病中的研究进展[J]. 临床误诊误治, 2010, 23(2):184-186.
- [4] Setten G, Aspiotis M, Blalock TD, et al. Connective tissue growth factor in pterygium: simultaneous presence with vascular endothelial growth factor-possible contributing factor to conjunctival scarring[J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2003, 241(2):135-139.
- [5] 刘津杉, 朱明才. RNAi 抑制 VEGF 表达在肿瘤治疗中的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(1):60-61.
- [6] Solomon A, Lid Q, Lees B, et al. Regulation of collagenase, stromelysin, and urokinase-type plasminogen activator in primary pterygium body fibroblasts by inflammatory cytokines[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000, 41(8):2154-2163.
- [7] Di Girolamo N, Chui JT, Coroneo M, et al. Pathogenesis of pterygia: role of cytokines, growth factors, and matrix (下转第 68 页)

- [6] Riskin M, Tel-Vered R, Frasconi M, et al. Stereoselective and chiroselective surface plasmon resonance (SPR) analysis of amino acids by molecularly imprinted Au-nanoparticle composites[J]. Chem Eur J, 2010, 16(24): 7114-7120.
- [7] Yao X, Li X, Toledo F, et al. Sub-attomole oligonucleotide and p53 cDNA determinations via a high-resolution surface plasmon resonance combined with oligonucleotide-capped gold nanoparticle signal amplification[J]. Anal Biochem, 2006, 354(2): 220-228.
- [8] Kim S, Lee J, Lee SJ, et al. Ultra-sensitive detection of IgE using biofunctionalized nanoparticle-enhanced SPR[J]. Talanta, 2010, 81(4/5): 1755-1759.
- [9] Liu X, Sun Y, Song DQ, et al. Enhanced optical immuosensor based on surface plasmon resonance for determination of transferin[J]. Talanta, 2006, 68(3): 1026-1031.
- [10] Pieper-Fürst U, Stöcklein WFM, Warsinke A. Gold nanoparticle-enhanced surface plasmon resonance measurement with a highly sensitive quantification for human tissue inhibitor of metalloproteinases-2[J]. Anal Chim Acta, 2005, 550(1/2): 69-76.
- [11] Law W, Yong K, Baev A, et al. Sensitivity improved surface plasmon resonance biosensor for cancer biomarker detection based on plasmatic enhancement[J]. ACS Nano, 2011, 5(6): 4858-4864.
- [12] Debotton N, Zer H, Parnes M, et al. A quantitative evaluation of the molecular binding affinity between a monoclonal antibody conjugated to a nanoparticle and an antigen by surface plasmon resonance[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2010, 74(2): 148-156.
- [13] Yuan J, Oliver R, Aguilar M, et al. Surface plasmon resonance assay for chloramphenicol[J]. Anal Chem, 2008, 80(21): 8329-8333.
- [14] Frasconi M, Tel-Vered R, Riskin M, et al. Surface plasmon resonance analysis of antibiotics using imprinted boronic acid-functionalized Au nanoparticle composites[J]. Anal Chem, 2010, 82(6): 2512-2519.
- [15] Yuan J, Deng DW, Lauren DR, et al. Surface plasmon resonance biosensor for the detection of ochratoxin A in cereal and beverages[J]. Anal Chim Acta, 2009, 656(1/2): 63-71.
- [16] Joung H, Lee N, Lee SK, et al. High sensitivity detection of 16S rRNA using peptide nucleic acid probes and a surface plasmon resonance biosensor[J]. Anal Chim Acta, 2008, 630(2): 168-173.
- [17] Baccara H, Mejri MB, Hafaiedha I, et al. Surface plasmon resonance immunosensor for bacteria detection[J]. Talanta, 2010, 82(2): 810-814.
- [18] Riskin M, Tel-Vered R, Lioubashevski O, et al. Ultrasensitive surface plasmon resonance detection of trinitrotoluene by a bis-aniline-cross-linked Au nanoparticles composite[J]. J Am Chem Soc, 2009, 131(21): 7368-7378.
- [19] Riskin M, Tel-Vered R, Willner I. Imprinted Au-nanoparticle composites for the ultrasensitive surface plasmon resonance detection of hexahydro-1, 3, 5-trinitro-1, 3, 5-triazine (RDX) [J]. Adv Mater, 2010, 22(12): 1387-1391.
- [20] Riskin M, Ben-Amram Y, Tel-Vered R, et al. Molecularly imprinted Au nanoparticles composites on Au surfaces for the surface plasmon resonance detection of pentaerythritol tetranitrate, nitroglycerin, and ethylene glycol dinitrate[J]. Anal Chem, 2011, 83(8): 3082-3088.
- [21] Wang L, Li T, Du Y, et al. Au NPs-enhanced surface plasmon resonance for sensitive detection of mercury (II) ions[J]. Biosens Bioelectron, 2010, 25(12): 2622-2626.
- [22] Teramura Y, Arima Y, Iwata H. Surface plasmon resonance-based highly sensitive immunosensing for brain natriuretic peptide using nanobeads for signal amplification[J]. Anal Biochem, 2006, 357(2): 208-215.
- [23] Wang J, Sun Y, Wang LY, et al. Surface plasmon resonance biosensor based on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Au nanocomposites[J]. Colloid Surface B, 2010, 81(2): 600-606.
- [24] Liu LJ, Zhang F, Xi FN, et al. Highly sensitive biosensor based on bionanomultilayer with water-soluble multiwall carbon nanotubes for determination of phenolics[J]. Biosens Bioelectron, 2008, 24(2): 306-312.
- [25] Lee EG, Park KM, Jeong JY, et al. Carbon nanotube-assisted enhancement of surface plasmon resonance signal[J]. Anal Biochem, 2011, 408(2): 206-211.

(收稿日期: 2011-06-28)

(上接第 50 页)

- metalloproteinases[J]. Progress in Retinal and Eye Research, 2004, 23: 195-228.
- [8] Chui J, Di Girolamo N, Wakefield D, et al. The pathogenesis of pterygium; current concepts and their therapeutic implications[J]. The Ocular Surface, 2008, 6(1): 24-43.
- [9] Xiao R, Liu FY, Luo JY, et al. Effect of small interfering RNA on the expression of connective tissue growth factor and type I and III collagen in skin fibroblasts of patients with systemic sclerosis[J]. Br J Dermatol, 2006, 155(6): 1145-1153.
- [10] 赵平, 李世荣. RNA 干扰对人瘢痕疙瘩成纤维细胞 CTGF 表达和胶原合成的影响[J]. 中国美容医学, 2008, 17(5): 683-685.
- [11] Li GM, Li DG, Xie Q, et al. RNA interfering connective tissue growth factor prevents rat hepatic stellate cell activation and extracellular matrix production[J]. J Gene Med, 2008, 10(9): 1039-1047.
- [12] Schenborn ET, Oler J. Liposome-mediated transfection of mammalian cells[J]. Methods Mol Biol, 2000, 130: 155-164.
- [13] Dalby B, Cates S, Harris A, et al. Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent; primary neurons, siRNA, and high-throughput applications[J]. Methods, 2004, 33(2): 95-103.
- [14] 李佩玲, 胡春杰, 李长民, 等. 脂质体介导的 DCC 基因对卵巢上皮性癌细胞生长的抑制作用[J]. 中华妇产科杂志, 2006, 41(3): 186-189.
- [15] Yang D, Goga A, Bishop JM. RNA interference (RNAi) with RNase III-prepared siRNAs[J]. Methods Mol Biol, 2004, 252: 471-482.
- [16] 吕颖慧, 王启钊, 刁勇, 等. 脂质体转染人肝星状细胞和肝细胞条件优化[J]. 华侨大学学报, 2010, 31(1): 49-52.

(收稿日期: 2011-09-08)