

阴离子脂质体-阳离子脂质体复合物介导的基因转染

孙 霁, 陈 琰, 鲁 莹, 钟延强 (第二军医大学药学院, 上海 200433)

[摘要] 目的 评价阴离子脂质体-阳离子脂质体复合物介导质粒转移至 HepG2 肝癌细胞中及其毒副作用。方法 制备携带表达绿色荧光蛋白质质的阳离子脂质体, 与阴离子脂质体形成复合物。测定脂质体复合物的 zeta 电位, 凝胶阻滞实验考察质粒包封情况, 流式细胞仪测量各阴离子脂质体-阳离子脂质体复合物的转染效率, MTT 法检测细胞毒性。结果 复合物能完全包裹质粒, 其 zeta 电位低于阳离子脂质体 zeta 电位; 脂质体复合物介导的转染效率略低于阳离子脂质体, 其细胞生存率高于阳离子脂质体。结论 阴离子脂质体-阳离子脂质体复合物在降低细胞毒性的同时, 可实现对 HepG2 细胞较高的转染效率。

[关键词] 阴离子脂质体; 阳离子脂质体; 脂质体复合物; 基因转染; 细胞毒性

[中图分类号] R944 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2011)04-0265-04

Study on transfection efficiency mediated by the complexes of lipoplexes and anionic liposomes

SUN Ji, CHEN Yan, LU Ying, ZHONG Yan-qiang (School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the efficiency of different complexes of lipoplexes and anionic liposomes which mediated gene transfection to hepatoma cells (HepG2). **Methods** Cationic liposomes encapsulating report gene were prepared by reverse-evaporation method, which were pipetted into anionic liposomes to form complexes. The zeta potentials were measured by Zetasizer Nano ZS. Report gene expressing green fluorescent protein (GFP) was used in order to evaluate transfection efficiency of different complexes. MTT was used to measure the cytotoxicity. **Results** The anionic liposomes contributed to lower zeta potentials while could not effect the capability of pDNA load efficiency. The transfection efficiency of complexes was lower than that of cationic liposomes, however, the complexes presented higher cell viability. **Conclusion** In relation to the low cytotoxicity of the complexes, their transfection efficiency was relatively high.

[Key words] anionic liposomes; cationic liposomes; complexes; transfection efficiency; cytotoxicity

作为非病毒基因载体之一, 阳离子脂质体由于其较高的基因携带能力和细胞摄取率而受到青睐。但由于阳离子脂质体表面带有大量正电荷, 血循环中容易与体环境中的聚阴离子发生反应, 从而引起较大的细胞毒性^[1-3]。本实验尝试利用包封质粒 (plasmid, pDNA) 的阳离子脂质体与阴离子脂质体形成复合物, 转染 HepG2 细胞^[4], 考察细胞毒性, 从而为双脂质体复合物用于基因治疗奠定实验基础。

1 材料与仪器

1.1 实验材料 3 β -[N-(N', N'-二甲氨基乙基)] 氨甲酰基-胆固醇 (DC-Chol) (美国 Avanti Polar Lipids 公司), 二油酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE) (德国 Lipoid 公司), 胆甾醇半琥珀酸酯 (CHEMS) (美国 Sigma 公司), 无血清培养基 MEM (美国 Hyclone 公

司), 磷酸盐缓冲液 (PBS) (美国 Hyclone 公司), 胎牛血清 (美国 GIBCO 公司), 4-羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES) 粉末 (美国 Sigma 公司), pGPH1/GFP/NeO 质粒 (上海吉玛制药), HepG2 细胞 (中科院上海生命科学研究院细胞资源中心)。

1.2 仪器 R 系列旋转蒸发器 (上海申生科技有限公司), LF-1 薄膜挤出器 (加拿大 Avestin 公司), Zeta Sizer Nano ZS 激光粒度分析仪 (英国 Malvern 公司), XW-80 型涡旋混合器 (上海第一医学仪器厂), FA1004 万分之一天平 (上海天平仪器厂), 凝胶成像仪 (上海复日科技有限公司)。

1 方法

2.1 阳离子脂质体制备 精密称取适量脂质体膜材料 (3 β -[N-(N', N'-二甲氨基乙基)] 氨甲酰基-胆固醇、二油酰磷脂酰乙醇胺), 按摩尔比 1 : 1 混合后溶于适量氯仿中, 将该溶液加入到梨形烧瓶, 充氮气 3 次, 减压旋蒸 12 h 除去氯仿, 得到干燥脂质薄

[作者简介] 孙 霁 (1986-), 女, 硕士研究生. Tel: (021) 81871288, E-mail: helen_sun.129@163.com.

[通讯作者] 钟延强. Tel: (021) 81871205.

膜。加入一定体积的4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液(20 mM, pH7.4), 缓缓震荡, 将脂质薄膜从瓶壁洗下, 得到脂质体混悬液, 使充分水合后, 通过薄膜挤出器分别通过400、200、100 nm聚碳酸酯膜, 各10遍, 即得阳离子脂质体。

2.2 阴离子脂质体制备 精密称取适量脂质体膜材料(胆甾醇半琥珀酸酯、二油酰磷脂酰乙醇胺), 按摩尔比4:6混合后溶于适量氯仿中, 将该溶液加入到梨形烧瓶, 充氮气3次, 减压旋蒸除去氯仿, 真空维持12 h, 得到干燥的脂质薄膜, 加入以一定体积的20 mM HEPES 缓冲液(pH7.4), 缓缓震荡, 将脂质薄膜从瓶壁洗下, 得到脂质体混悬液, 使充分水合后, 通过薄膜挤出器分别通过400、200、100 nm聚碳酸酯膜, 各10遍, 即得阴离子脂质体。

2.3 pDNA/阳离子脂质体的制备 取1 μ g 质粒用 HEPES 缓冲液稀释至20 μ l, 静置5 min。取一定体积的阳离子脂质体, 用缓冲液稀释至20 μ l, 静置5 min。然后两者混合, 静置25 min 按材料中正电荷与质粒负电荷比为4(n/p=4)的要求制备 pDNA / 阳离子脂质体。

2.4 阴离子脂质体-阳离子脂质体复合物的制备 取一定体积阴离子脂质体, 用 HEPES 缓冲液稀释至20 μ l, 与“2.3”中制备的 pDNA / 阳离子脂质体涡旋滴加复合, 静置25 min。按照不同正负电荷比(+/-=1/0.5, 1/1, 1/1.5, 1/2, 1/2.5, 1/3)的要求, 制备阴离子脂质体-阳离子脂质体复合物。

2.5 复合物的表征 取10 μ l 正负电荷比为1/1的复合物于云母片上, 在扫描频率为1 Hz, 扫描范围为2.5 μ m \times 2.5 μ m的条件下进行原子力扫描, 观察复合物形态特征。

2.6 凝胶阻滞实验 称取适量琼脂糖, 加入约100 ml 电泳缓冲液, 加热溶解, 配制1.0% 琼脂糖凝胶溶液, 室温冷却至约60 $^{\circ}$ C, 加入5 μ l 溴化乙锭溶液(500 μ g/ml) 插入 DNA 染色, 灌胶。将“2.4”中制备的复合物加入孔道中, 在缓冲液中以80 V 电压泳动50 min 后, 用全自动紫外与可见分析装置进行观察。

2.7 复合物 zeta 电位测定 分别取“2.4”中制备的复合物50 μ l 用去离子水稀释至1 ml 后加入样品池进行测量, 每个样品重复测量3次。

2.8 细胞转染 取肝癌 HepG2 细胞在含有10% 胎牛血清、非必需氨基酸的培养液中连续培养(5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C 培养箱)。取对数生长期细胞, 胰酶消化后用 MEM 培养基稀释, 按每孔 2×10^5 个细胞接种于24孔培养板, 孵箱内(5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C 培养箱) 预培养24 h。细胞培养24 h后, 弃去培养基, 将“2.4”

中制备的复合物依次加入培养孔中, 37 $^{\circ}$ C 孵育5~6 h 后, 吸去培养基, 用 PBS 洗两遍后每孔加入等体积含血清培养基。培养48 h 后用胰蛋白酶消化成单细胞, 重悬于 PBS 中, 流式细胞仪检测 GFP 阳性细胞的百分率。

2.9 细胞毒性实验 细胞培养24 h 后, 将“2.4”中制备的复合物加入96板孔中, 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C 条件下连续培养48 h。每孔加入20 μ l 溴化四唑蓝(MTT) 溶液(5 mg/ml, 即0.5% MTT), 继续培养4 h。终止培养, 小心吸去孔内培养液。每孔加入150 μ l 二甲基亚砜, 置摇床上低速振荡10 min, 使结晶物充分溶解。在酶联免疫 OD490 nm 处测量各孔的吸光值。每组设复孔3个。

3 结果

3.1 复合物 zeta 电位 zeta 电位可以用来衡量微粒体系表面带电情况, 阴离子脂质体-阳离子脂质体复合物的 zeta 电位明显低于阳离子脂质体的 zeta 电位, 说明阴离子脂质体的加入能有效降低复合物的表面电位。刚加入阴离子脂质体时, 其复合物 zeta 电位下降趋势明显; 随着阴离子脂质体加入量不断越多, 其复合物 zeta 电位下降趋势平缓。结果见图1。

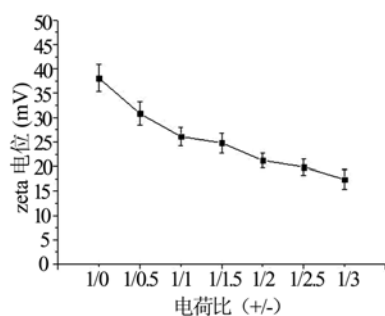


图1 不同处方复合物的 zeta 电位

3.2 原子力扫描图 从图2可看出复合物呈圆球形, 粒径在200~300 nm。

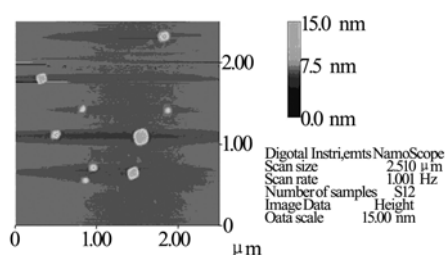


图2 复合物的原子力扫描图

3.3 质粒包封情况 阳离子脂质体能中和核酸的负电荷,因此当阳离子脂质体/DNA 复合物形成后,核酸在琼脂糖凝胶中的泳动能力大大减少甚至丧失,在紫外灯下无法观察到白色亮条带。阴离子脂质体-阳离子脂质体复合物的质粒包封情况见图3。由图3可知,未被载体包裹的裸质粒 DNA 在紫外灯下可见白色亮条带,仅被阳离子脂质体包裹的质粒 DNA 未见白色亮条带,而被不同阴离子脂质体-阳离子脂质体复合物包裹的质粒 DNA 也均未见白色亮条带。说明与阳离子脂质体一样,阴离子脂质体-阳离子脂质体复合物可以将质粒完全包裹。

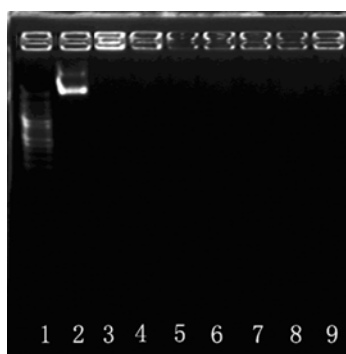


图3 不同比例复合物的质粒包封情况

1-标记物;2-裸 DNA ;3-阳离子脂质体/pDNA($n/p=4$);
4~9-阴离子脂质体与质粒/阳离子脂质体的复合物($n/p=4$),
正负电荷比分别为1/0.5,1/1,1/1.5,1/2,1/2.5,1/3。

3.4 转染效率测定 转染效率高是衡量基因载体体的重要指标之一,良好的基因载体应具有较高的转染效率。如图4所示,复合物的转染效率均没有阳离子脂质体(电荷比($+/-$)=1/0)转染效率高,其中正负电荷比为1/0.5的复合物转染效率与阳离子脂质体的转染效率最接近;随着复合物中阴离子脂质体比例的增加,转染效率呈下降趋势,表明阴离子脂质体的加入对转染效率有一定影响。

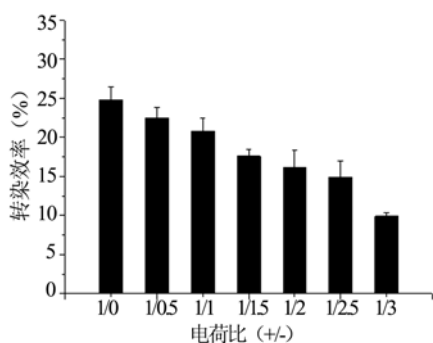


图4 不同处方复合物的转染效率

3.5 细胞毒性实验 理想的基因载体除了要有较

高的转染效率外,还应具有良好的生物相容性,对细胞的毒性相对较低。如果载体的细胞毒性过大,就可能会降低其转染效率,从而影响目的基因的表达。如图5所示,复合物的细胞毒性均小于阳离子脂质体(电荷比($+/-$)=1/0)的细胞毒性,说明阴离子脂质体的加入能一定程度上降低细胞毒性;复合物正负电荷比为1/1.5~1/2.0范围时,细胞成活率最高;随着阴离子脂质体的加入量不断增大,其细胞成活率呈下降趋势。

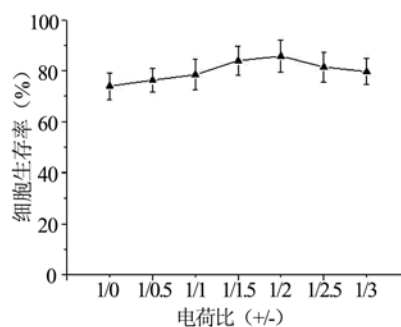


图5 不同处方复合物的细胞生存率

4 讨论

阳离子是目前公认的转染效率较高的非病毒载体之一,而且由于其表面带有大量正电荷,因此产生较大的细胞毒性。本实验在阳离子脂质体中加入一定量的阴离子脂质体,有效降低了阳离子脂质体表面电荷量。通过凝胶阻滞实验发现,阴离子的加入并没有影响阳离子脂质体对质粒的携载能力,质粒仍完全包封在阳离子脂质体中。

实验结果显示阴离子脂质体对阳离子脂质体的转染效率有一定降低作用,这是由于复合物的表面电荷没有单纯阳离子脂质体的高,影响了粒子与细胞膜的结合能力^[5],从而降低了转染效率。但是,正是由于复合物表面的低电荷,使得其细胞毒性小于阳离子脂质体;当然,阴离子脂质体本身也会产生一定的细胞毒性,因此,复合物正负电荷比在某一范围时呈现出最小的细胞毒性,随着阴离子脂质体比例继续增加,复合物的毒性增大。

本实验结果还表明,与阴离子脂质体复合后使阳离子脂质体的细胞毒性降低,同时双脂质体复合物能保持质粒的包封以及对 HepG2 肝癌细胞的转染,为阳离子结构改造提供新的可行性。

【参考文献】

[1] Marika R, Markku T, Urtti A. Cell-surface glycosaminoglycans

inhibited cation-mediated gene transfer[J]. *J Gene Med*, 2004, 6(4):405.

[2] Reinisalo M, Ruponen A, Urtti A. Polyplex-mediated gene transfer and cell cycle; effect of carrier on cellular uptake and intracellular kinetics and significance of glycosaminoglycans[J]. *J. Gene Med*, 2007, 9(6):479.

[3] Charudharshini S, Diane B. Optimization and characterization of anionic lipoplexes for gene delivery[J]. *J. Controlled Release*, 2009, 136(1):62.

[4] Mignet N, Richard C, Scherman D, et al. Anionic pH-sensitive polyplexes to deliver DNA to tumors[J]. *Int J Pharm*, 2008, 361(1-2):194.

[5] Julia Lehtinen, et al. Glycosaminoglycan-resistant and pH-sensitive lipid-coated DNA complexes produced by detergent removal method[J]. *J. Controlled Release*, 2008, 131(2):145.

[收稿日期]2011-01-04

[修回日期]2011-03-15

(上接第262页)

表2 咖啡因含量测定的回收率实验结果

加入量 (mg)	基底值 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
80%	19.8	27.76	47.79	101.18	
	19.8	27.76	47.91	101.77	
	19.8	27.76	46.96	96.98	
100%	25.9	26.43	51.06	95.08	
	25.9	26.43	51.76	97.80	98.41
	25.9	26.43	52.01	98.75	2.06
120%	30.1	26.83	56.29	97.88	
	30.1	26.83	56.31	97.96	
	30.1	26.83	56.43	98.33	

表3 咖啡因含量测定稳定性实验结果

间隔时间(h)	峰面积	平均值(峰面积)	RSD(%)
0	6 796 785		
2	6 392 848		
4	6 342 218	6 462 479	2.92
6	6 375 117		
8	6 405 428		

2.3.6 样品的含量测定 ①供试品溶液制备:取本品8片,剪碎混匀,精密称取适量(约相当于咖啡因25 mg),于100 ml锥形瓶中,加入25 ml热水(温度为90℃),摇匀后立即放入沸水浴中1 h,然后趁热过滤,残渣用少量热水冲洗2~3次后。待溶液冷却后一并滤入至100 ml的容量瓶中,用蒸馏水稀释至刻度,摇匀备用。②对照品溶液制备:精密称取常温减压干燥至恒重的咖啡因对照品50 mg,置于250 ml量瓶中,用蒸馏水溶解并稀释至刻度,摇匀;即得每1 ml含0.2 mg咖啡因的对照品溶液。分别取供试品溶液和对照品溶液各20 μl,注入高效液相色谱仪,记录色谱图,按外标一点法计算供试品中咖啡因的含量。

3批样品的含量测定结果分别为标示量的100.87%,103.37%,101.45%,结果表明本研究所制备的3批咖啡因口香糖样品含量符合规定。

3 结论

3.1 军人面临许多增加不眠的情况,包括:站岗、展开相关的活动、在紧急情况时的空运、雷达和声纳监测、潜水艇值班和战斗,这些任务的表现受到长期不能睡觉的影响,在这些情况之下,个人必须表现出复杂的认知能力。大量的研究表明咖啡因能够改善睡眠剥夺的症状、增强认知表现,增强工作的准确度、减少听觉和视觉不眠症的药效存在剂量依赖性,而且,还能显著增强活力和减少疲倦、低落和敌意。我军有必要借鉴美军军队营养研究委员会(CMNR)的科学结论,在执行长时间任务时使用咖啡因制剂。鉴于国人的饮食习惯中,咖啡因采用食品形式摄取不易实现,口香糖形式的给药方式较为可行。

3.2 采用沸水浴条件下加热提取1 h来提取口香糖中的咖啡因,相比超声提取和超声后再浸泡提取而言,操作简单易行,提取完全,耗时短。并参照美国药典,使用HPLC法对咖啡因的有关物质和含量测定,该方法分离效果好,灵敏度和准确度均较高,适用于口香糖中咖啡因含量的测定。

【参考文献】

[1] 中国药典2010版.二部[S].2010:461.

[2] 刘职瑞,叶显撑,王芳,等.咖啡因口崩片的研究[J]. *药学实践杂志*, 2009, 27(3):179.

[3] Gary H K, Chetan S K, Ronald O, et al. The rate of absorption and relative bioavailability of caffeine administered in chewing gum versus capsules to normal healthy volunteers[J]. *Int J Pharm*, 2002, 234(1-2):159.

[4] 李楠,杨明.清咽口香糖的研制[J]. *食品工业科技*, 2006, 27(01):107.

[5] 施燕支,郭雪清,余启荣,等. HPLC示差折光分析法测定口香糖中的木糖醇等多种糖醇的含量[J]. *首都师范大学学报(自然科学版)*, 2005, 26(1):62.

[收稿日期]2011-01-27

[修回日期]2011-02-21