

阳离子脂质体诱导的细胞氧化应激损伤

韩磊¹ 崔韶晖^{1,2*} 马启晨² 陈星妍² 王玥莹² 张树彪^{2*}

(¹大连工业大学生物工程学院, 大连 116034;

²大连民族大学生命科学院, 生物技术与资源利用教育部重点实验室, 大连 116601)

摘要 人工合成制备的阳离子脂质体作为一种重要的基因和药物载体, 具有很多优点, 但其对细胞的毒性作用机制尚不明确, 严重影响其临床应用。该文对阳离子脂质体是否通过诱导细胞产生氧化应激反应, 进而导致细胞毒性的相关作用机制进行了研究。实验使用人肺癌细胞(NCI-H460)和人胚肺正常细胞(MRC-5), 采用CCK-8法、活性氧簇(ROS)荧光标记形态学观察、流式细胞术定量测定及活性氧簇自由基检测等方法, 研究对比了三种头部结构不同, 连接键和疏水尾部均相同的阳离子脂质体细胞毒性作用机制。这三种脂质体分别由三肽头部的 N,N -双十四烷氧酰胺乙基三聚鸟氨酸酰胺(CDO14)、单季铵盐头部的 N,N -双十四烷氧酰胺乙基- N,N -二甲基碘化铵(CDA14)和双季铵盐头部的1, 2-双- $[N$ -十四烷氧酰胺乙基- N,N -二甲基碘化铵]乙烷(CTA14)制备。研究结果表明, 三种阳离子脂质体诱导的超氧化物、过氧化氢(H_2O_2)、羟自由基($\bullet OH$)、一氧化氮(NO)和丙二醛(MDA)等ROS均与作用剂量呈正相关, 其中CDA14和CTA14高浓度处理组(0.10 $\mu mol/L$ 和0.20 $\mu mol/L$)与低浓度处理组(0.05 $\mu mol/L$ 常规转染浓度)及空白对照组相比差异极显著, 而CDO14只在0.20 $\mu mol/L$ 处理组有显著差异, 且三种脂质体对NCI-H460细胞的氧化应激损伤值均高于MRC-5细胞。因此, 肽头部脂质体CDO14产生的氧化应激损伤远小于单季铵盐头部脂质体CDA14, 而CDA14又小于双季铵盐头部脂质体CTA14。综上所述, 阳离子脂质体诱导的细胞氧化应激损伤与其头部结构和剂量密切相关。该研究为阳离子脂质体的生物安全性及新型阳离子类脂结构设计提供科学参考。

关键词 阳离子脂质体; 载体; 细胞毒性; ROS; 氧化应激

Cell Oxidative Stress Injury Induced by Cationic Liposomes

HAN Lei¹, CUI Shaohui^{1,2*}, MA Qichen², CHEN Xingyan², WANG Yueying², ZHANG Shubiao^{2*}

(¹College of Bioengineering, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China; ²College of Life Sciences, Key Laboratory of Biotechnology and Bioresources Utilization of Ministry of Education, Dalian Minzu University, Dalian 116601, China)

Abstract As an important gene and drug carrier, synthetic cationic liposome has many advantages. Their clinical application was seriously limited due to unclear mechanism of cytotoxicity. This study investigated if oxidative stress in cells could lead to cytotoxicity. Human lung cancer NCI-H460 cells and human embryonic lung normal MRC-5 cells were used in the experiment. The cytotoxic mechanism of three cationic liposomes with different head structures were studied by CCK-8 assay, ROS (reactive oxygen species) fluorescent labeling morphological observation, flow cytometry quantitative determination and ROS free radical detection. The lipids used in this study were N,N -bis-decanethoxamide ethyl trimeric ornithine amide with tripeptide head (CDO14), N,N -bis-decaneth-

收稿日期: 2020-01-16 接受日期: 2020-03-30

国家自然科学基金(批准号: 21908019、21776044、21606041、21503015)和中央高校自主基金(批准号: 0919/110274)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13704268350, E-mail: csh@dlnu.edu.cn; Tel: 13898484611, E-mail: zsb@dlnu.edu.cn

Received: January 16, 2020 Accepted: March 30, 2020

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.21908019, 21776044, 21606041, 21503015) and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (Grant No.0919/110274)

*Corresponding authors. Tel: +86-13704268350, E-mail: csh@dlnu.edu.cn; Tel: +86-13898484611, E-mail: zsb@dlnu.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5240>

oxamide ethyl-*N,N*-dimethyl ammonium iodide with mono quarterly ammonium salt head (CDA14) as well as 1,2-bis-[*N*-tetradecanoxamide ethyl-*N,N*-dimethyl ammonium iodide] ethane with diquaternary ammonium salt head (CTA14). The results showed that ROS level in the cells induced by three different head structures was proportional to the dose. ROS depending on the measurement of superoxide, hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical ($\bullet OH$), and mono-oxidation nitrogen (NO) and malondialdehyde (MDA). High-concentration treatment group of CDA14 and CTA14 (0.10 $\mu mol/L$ and 0.20 $\mu mol/L$) contrasted their low-concentration treatment group (0.05 $\mu mol/L$, conventional transfection concentration) and the blank control group had very significant difference, but CDO14 was only significant at the 0.20 $\mu mol/L$ treatment group. Moreover, the oxidative stress damage of NCI-H460 cells was higher than that of MRC-5 cells. Therefore, oxidative stress injury of the peptide head liposome CDO14 was much smaller than the single quaternary ammonium salt liposome CDA14, and that CDA14 was smaller than the diquaternary ammonium salt liposome CTA14. In conclusion, cationic liposomes induced oxidative stress injury of cells is closely related to its head structure and dose. This study provides a scientific support for the biosafety of the cationic liposomes and the design of novel cationic lipid structures.

Keywords cationic liposome; carrier; cytotoxicity; ROS; oxidative stress

由于阳离子脂质体具有制备简单、低毒性、低免疫原性和类细胞膜结构易在体内可降解等方面的优点,可作为基因和药物载体,用来输送基因或药物分子进入细胞,是一种非常具有临床应用潜力的较低成本的药物递药系统^[1]。近年来,国内外研究者们开发了多种新型的阳离子脂质体,并在药物和基因递送方面取得了一定进展^[2-5]。然而,阳离子脂质体始终存在一定的细胞毒性,而且毒性作用机制尚不明确,严重阻碍了其临床应用^[6-7]。阳离子脂质体对细胞毒性大小的影响因素较多,包括细胞类型、脂质体的粒径大小、阳离子类脂的种类和浓度等,但主要还是与类脂的自身结构和其所带电荷数量有关^[8-9]。

有文献报道,阳离子脂质体的毒性作用是通过使细胞产生氧化应激反应,造成细胞氧化应激损伤而发生的^[6]。氧化应激损伤是由于细胞受到内源性或外源性的伤害后,氧化与抗氧化水平失衡,细胞产生大量的活性氧簇(reactive oxygen specie, ROS)和活性氮簇(reactive nitrogen specie, RNS)自由基^[10]。ROS种类很多,主要包括超氧化物、羟自由基($\bullet OH$)和过氧化氢(H_2O_2)等^[11]。RNS主要包括NO等。在细胞正常生理活动下,ROS和RNS作为信号分子,可介导氧化还原信号传导,对于包括细胞增殖和分化在内的多种基本细胞生命过程的进行是必需的^[12]。但当氧化应激大量产生时,细胞内产生过量的ROS和RNS会造成蛋白质及DNA等的损伤^[13]。过量的ROS一直被认为具有致DNA损伤和致癌效应,即与肿瘤的发生、发展密切相关^[14]。研究表明,不同类型

的肿瘤细胞与正常细胞相比,均显示出较高水平的ROS含量^[15-16]。

本文采用本课题组自主研发的*N,N*-双十四烷氧酰胺乙基三聚鸟氨酸酰胺(CDO14)、*N,N*-双十四烷氧酰胺乙基-*N,N*-二甲基碘化铵(CDA14)和1,2-双-[*N*-十四烷氧酰胺乙基-*N,N*-二甲基碘化铵]乙烷(CTA14)三类脂制备了CDO14、CDA14和CTA14三种阳离子脂质体,类脂结构如图1所示。通过体外培养NCI-H460细胞与MRC-5细胞,采用CCK-8法、ROS的定性和定量及几种自由基指标的检测等,研究了三种类型的阳离子脂质体对NCI-H460细胞与MRC-5细胞的毒性,深入探究三种类型的阳离子脂质体基于诱导细胞氧化应激损伤引发的细胞毒性作用机制,为阳离子脂质体的应用安全性和新型阳离子类脂结构设计提供科学依据。

1 材料与amp;方法

1.1 仪器与试剂

仪器包括:HERAcell 150i细胞培养箱(美国Thermo公司)、DK-600A电热恒温水槽(上海恒科技有限公司)、MLS-3750全自动高压灭菌锅(日本Sanyo公司)、Millipore超纯水仪(美国基因有限公司)、Olympus IX71倒置荧光显微镜(日本Olympus公司)、Axiovert 25倒置荧光显微镜(德国Zeiss公司)、BCH-1360II A/B2生物安全柜(哈尔滨市东联电子技术开发有限公司)、Sunrise酶标仪(奥地利Tecan公司)、SZ-100激光散射粒度仪(日本HORIBA公司)、

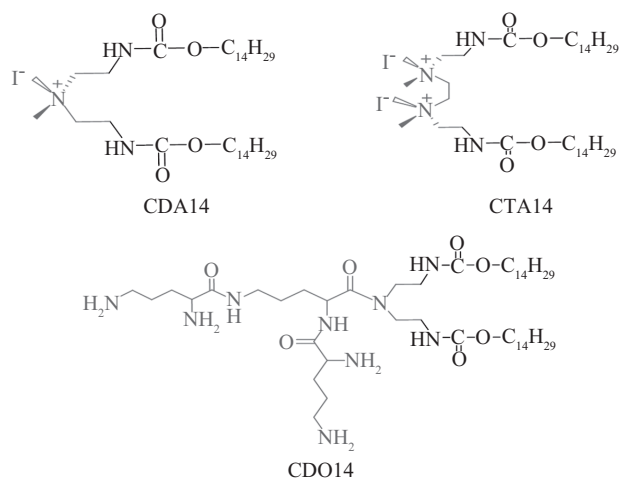


图1 三种不同头部的阳离子类脂结构式

Fig.1 Structures of the three cationic lipids with different heads

Accuri C6流式细胞仪(美国BD公司)、TEM-2100F透射电子显微镜(日本JEOL公司)、TGL-20M高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)、CP114电子天平(上海奥豪斯仪器有限公司)。

试剂包括:胎牛血清、1640培养液(美国Gibco公司)、青霉素、链霉素、胰蛋白酶(生工生物工程(上海)股份有限公司)、CDO14、CDA14、CTA14阳离子脂质体(自制)、DOPE助类脂(瑞士Roche公司)、氯仿(大连凯美化工试剂公司)、羟自由基检测试剂盒(南京建成生物工程研究所)、CCK-8试剂盒、活性氧检测试剂盒、超氧化物检测试剂盒、一氧化氮检测试剂盒、脂质氧化(MDA)检测试剂盒、过氧化氢检测试剂盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术研究所)。

1.2 细胞培养

选用NCI-H460细胞和MRC-5细胞(购于中科院上海细胞库)培养于RPMI-1640培养液中,内含10% FBS和1%青/链霉素,于37 °C、5.0% CO₂的培养箱内进行常规传代培养,用于后续实验。

1.3 阳离子脂质体的制备

精确称取阳离子类脂CDO14、CDA14和CTA14各1 mg,分别加入到5 mL离心管中,各加入1 mL氯仿,置于超声振荡器中超声溶解30 min,按阳离子类脂与助类脂摩尔比为1:1的比例分别加入浓度为10 mg/mL的DOPE 100.64 μL、73.90 μL和80.30 μL,并用漩涡振荡器充分振荡混匀10 min。利用氮气吹膜系统吹出均匀的膜。吹干后将5 mL离心管置于真空干燥箱内干燥12 h。取出离心管,加入200 μL无水

乙醇和800 μL超纯水在45~55 °C温度下,反复超声振荡2 h左右至澄清。使用200 nm滤膜的脂质体挤出器来控制制备的三种阳离子脂质体粒径大小。置于冰箱内4 °C保存备用。

1.4 阳离子脂质体的粒径和Zeta电位检测

取制备好的三种脂质体各20 μL稀释到1 mL超纯水中,粒径检测时,取1 mL稀释后的样品加入样品池内,需设置光强度至300左右,介质水的折光率为1.333,黏度为0.933 mPa/s,设定每个样品重复测定3次。测电位时,取1 mL稀释后的样品加入电位测定池内,确保无气泡,放入仪器内,每个样品重复测定3次。

1.5 阳离子脂质体的形态观察

取10 μL制备好的脂质体滴加到400目带有碳膜的铜网上静置30 min,之后滴加2.0%磷钨酸染色静置30 s,吸去多余磷钨酸,将铜网晾干,使用透射电镜(transmission electron microscope, TEM)拍照观察。

1.6 CCK-8法检测细胞存活率

收集对数生长期NCI-H460细胞和MRC-5细胞,以每孔 5×10^3 个细胞的密度接种到96孔板中培养,待每孔细胞密度达到80%左右时,弃去培养液,加入不同浓度的CDO14、CDA14和CTA14阳离子脂质体(0.05、0.10、0.20 μmol/L)的培养液在培养箱中孵育24 h后(每个处理设置3个重复孔),每孔加入10 μL的增强型CCK-8溶液,继续避光孵育2 h,使用酶标仪检测450 nm波长下的吸光度(D)值,计算细胞存活率。

1.7 ROS定性和定量检测

收集对数生长期NCI-H460细胞和MRC-5细胞,

以每孔 2.5×10^5 个细胞的密度接种到24孔板中培养,待每孔细胞密度达到80%左右时,弃去培养液,加入含不同浓度的CDO14、CDA14和CTA14阳离子脂质体(0.05、0.10、0.20 $\mu\text{mol/L}$)的培养液孵育24 h(每个处理设置3个重复孔),PBS洗2遍,按照1:1 000比例用无血清培养液稀释DCFH-DA,使终浓度为10 $\mu\text{mol/L}$,每孔加入300 μL DCFH-DA稀释液,37 $^\circ\text{C}$ 孵育20 min后,PBS洗3遍,用倒置荧光显微镜观察荧光强度并拍照。

分别收集与定性检测做相同处理的细胞,300目细胞筛网过滤后,用流式细胞仪定量检测细胞内ROS的荧光强度。

1.8 氧化应激相关自由基检测

1.8.1 超氧化物检测 细胞的培养方法同1.6,每孔加入200 μL 超氧化物检测工作液,37 $^\circ\text{C}$ 孵育3 min,然后加入含不同浓度的CDO14、CDA14和CTA14阳离子脂质体(0.05、0.10、0.20 $\mu\text{mol/L}$)的培养液作用2 h(每个处理设置3个重复孔)。使用酶标仪检测450 nm波长下的吸光度(D)值,630 nm作为参考波长进行双波长测定,计算细胞超氧化物含量。

1.8.2 过氧化氢检测 细胞的培养和脂质体处理方法同1.6,首先收集细胞培养液作为测定胞外培养液中 H_2O_2 含量的样品;再收集细胞,PBS清洗细胞,每孔加入100 μL 过氧化氢检测裂解液,4 $^\circ\text{C}$ 下充分匀浆以破碎细胞,12 000 $\times g$ 离心3 min,取上清作为测定胞内 H_2O_2 含量的样品;在96孔板内每孔加入50 μL 样品和标准品,再加入100 μL 过氧化氢检测试剂,混匀,室温放置30 min。使用酶标仪检测560 nm波长下的吸光度(D)值,根据标准曲线分别计算出胞外培养液和胞内样品中过氧化氢的浓度。

1.8.3 羟自由基测定 细胞的培养和脂质体处理方法同1.7,收集细胞,PBS清洗细胞,每孔加入100 μL 细胞裂解液,4 $^\circ\text{C}$ 下充分匀浆以破碎细胞,离心取上清,在96孔板内每孔加入20 μL 样品和标准品,在每个孔内加入40 μL 检测试剂;轻轻振荡,室温混匀静置20 min。设置空白组、标准孔组,每组设置3个复孔,使用酶标仪检测550 nm波长下的吸光度(D)值,计算羟自由基浓度。

1.8.4 NO检测 细胞的培养和脂质体处理方法同1.7,首先收集细胞培养液作为测定胞外培养液中NO含量的样品;再收集细胞,PBS清洗细胞,每孔加入100 μL 一氧化氮裂解液,4 $^\circ\text{C}$ 下充分匀浆以破碎

细胞,离心取上清作为测定胞内NO含量的样品;在96孔板内每孔加入50 μL 样品和标准品,再每个孔内依次加入50 μL Griess Reagent I液和II液,混匀,室温放置30 min。使用酶标仪检测540 nm波长下的吸光度(D)值,根据标准曲线计算出胞外培养液和胞内样品中NO的浓度。

1.8.5 丙二醛(MDA)测定 细胞处理同1.7,收集细胞,PBS清洗细胞,每孔加入100 μL 细胞裂解液,4 $^\circ\text{C}$ 下充分匀浆以破碎细胞,离心取上清;在96孔板内每孔加入50 μL 样品和标准品,在每个孔内加入100 μL MDA检测试剂;设置空白组,每组设置3个复孔,混匀后,100 $^\circ\text{C}$ 沸水浴加热15 min。水浴冷却至室温,1 000 $\times g$ 室温离心10 min。取200 μL 上清加入到96孔板中,使用酶标仪检测532 nm波长下的吸光度(D)值,设定450 nm为参考波长,计算出样品中MDA浓度。

1.9 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示,经SPSS 17.0统计软件分析。采用单因素方差分析比较组间的显著性差异。 $P < 0.05$ 为具有显著性差异; $P < 0.01$ 为具有极显著性差异。

2 结果

2.1 阳离子脂质体的制备及物化性质表征

2.1.1 粒径和Zeta电位 本研究制备的三种阳离子脂质体均澄清透明且性能稳定,使用激光粒度散射仪检测了粒径和Zeta电位。结果如图2所示,三种阳离子脂质体的平均粒径在180~200 nm之间,CDO14电位均值为65 mV,CDA14电位均值为81 mV,CTA14电位均值为84 mV,其中CDO14脂质体的平均电位相对较低。

2.1.2 阳离子脂质体的形态观察 使用透射电镜(TEM)对制备的阳离子脂质体CDO14、CDA14和CTA14的微观形貌进行观察。由图3的TEM照片可见三种脂质体纳米粒子基本为球形,平均粒径大约在150 nm,粒径均匀,分散性良好。

2.2 阳离子脂质体对细胞存活率的影响

为了明确三种阳离子脂质体对细胞存活率的影响,采用CCK-8法检测不同浓度脂质体作用NCI-H460细胞和MRC-5细胞24 h后的存活率。如图4所示,在0.05 $\mu\text{mol/L}$ (常规转染浓度)下,两种细胞的存活率与Ctrl相比无显著差异,均在85%以上。在0.10 $\mu\text{mol/L}$ 时,对于NCI-H460细胞(图4A),与Ctrl相

比, CDO14无显著差异, CDA14下降到70%, 有显著差异($P<0.05$), 而CTA14下降至60%以下, 有极显著差异($P<0.01$); 对于MRC-5细胞(图4B), 与Ctrl相比, CDO14和CDA14有显著差异($P<0.05$), 而CTA14

降低至60%以下, 有极显著差异($P<0.01$)。当浓度增加到0.20 $\mu\text{mol/L}$ 时(图4A和图4B), 三种脂质体对两种细胞的存活率与Ctrl相比均有极显著差异($P<0.01$)。结果表明, 在高浓度下, 三种脂质体对

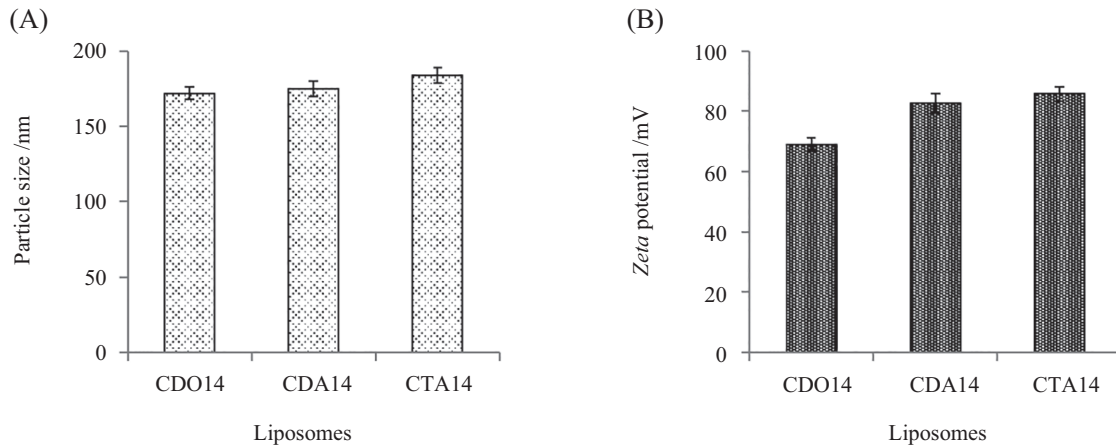


图2 三种阳离子脂质体的粒径和Zeta电位

Fig.2 Particle sizes and Zeta potentials of the three cationic liposomes

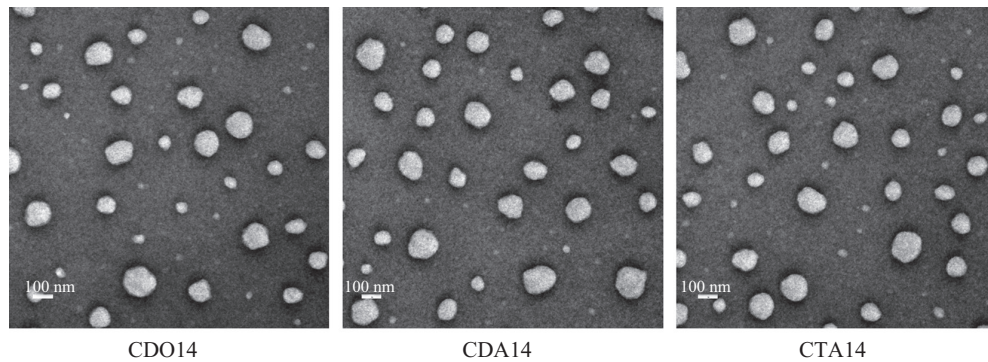
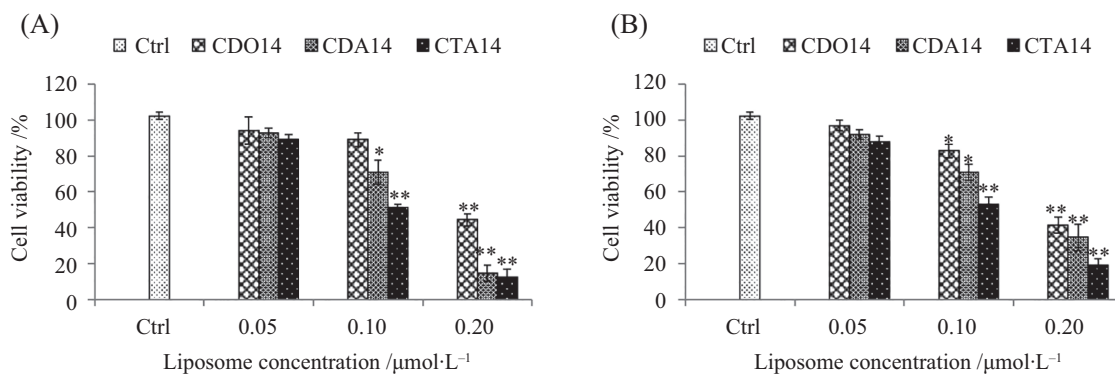


图3 三种阳离子脂质体透射电镜照片

Fig.3 TEM images of the three cationic liposomes



A: NCI-H460细胞的存活率; B: MRC-5细胞的存活率; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与Ctrl组比较。

A: cell viability of NCI-H460 cells; B: cell viability of MRC-5 cells; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with Ctrl group.

图4 不同浓度的三种阳离子脂质体作用于NCI-H460细胞和MRC-5细胞的存活率

Fig.4 Cell viability in NCI-H460 cells and MRC-5 cells treated with different concentrations of the three cationic liposomes

细胞存活率的影响均呈剂量依赖性, CDO14对细胞存活率的影响明显小于CDA14和CTA14。

2.3 阳离子脂质体诱导细胞产生ROS

2.3.1 ROS形态学观察 利用荧光探针DCFH-DA对细胞内ROS进行标记, 通过倒置荧光显微镜进行观察拍照。结果如图5(NCI-H460细胞ROS荧光图)和图6(MRC-5细胞ROS荧光图)所示, Ctrl组中仅可见微弱的绿色荧光, 在0.05 $\mu\text{mol/L}$ 下, 三种脂质体诱导下细

胞的ROS荧光信号较Ctrl组有所增强, 在0.10 $\mu\text{mol/L}$ 时显著增强, 当浓度增加到0.20 $\mu\text{mol/L}$ 时, ROS荧光信号极显著增强, 且CTA14组相对与CDO14组荧光信号显著增强。两种细胞系相比较, NCI-H460细胞中荧光信号强度整体高于MRC-5细胞。因此, 三种阳离子脂质体诱导细胞产生ROS的含量也呈剂量依赖性。相同脂质体浓度下, CDO14、CDA14和CTA14脂质体诱导细胞产生ROS含量依次增加, 且NCI-H460细胞

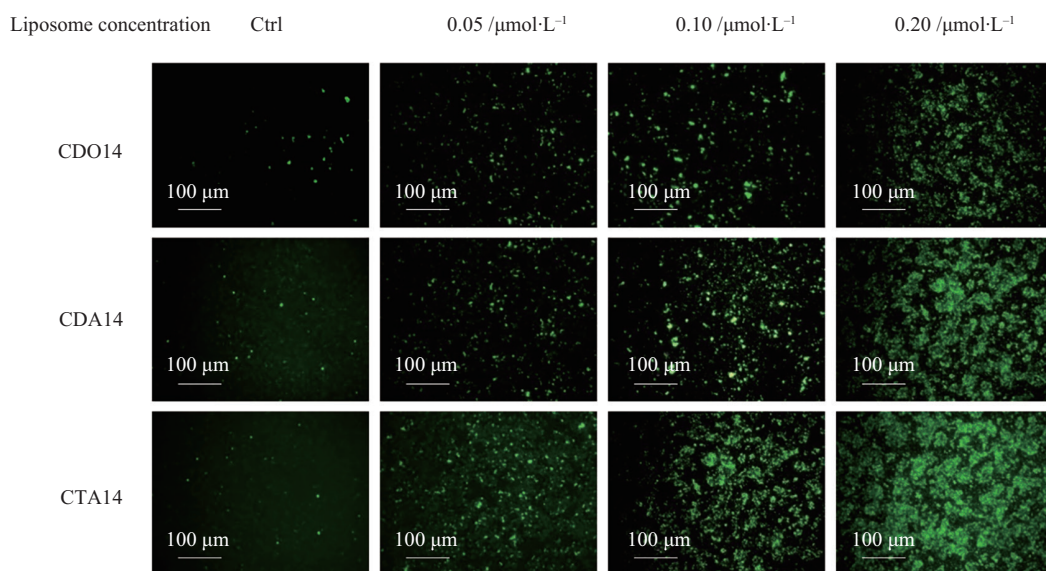


图5 不同浓度的三种阳离子脂质体作用于NCI-H460细胞的ROS倒置荧光显微镜照片

Fig.5 Inverted fluorescence microscopy photographs of ROS in NCI-H460 cells treated with different concentrations of the three cationic liposomes

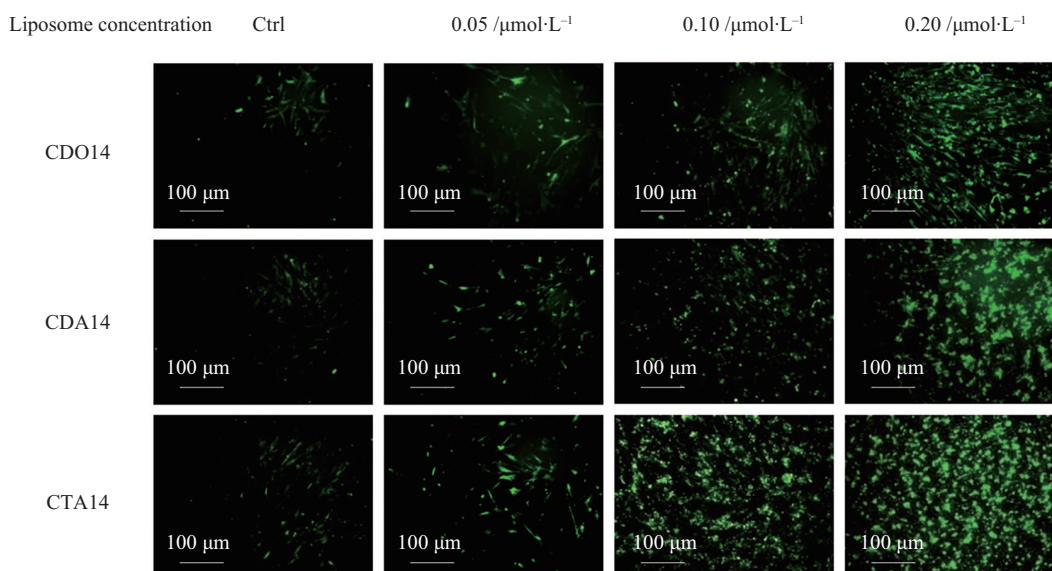


图6 不同浓度的三种阳离子脂质体作用于MRC-5细胞的ROS倒置荧光显微镜照片

Fig.6 Inverted fluorescence microscopy photographs of ROS in MRC-5 cells treated with different concentrations of the three cationic liposomes

产生ROS的整体水平高于MRC-5细胞。

2.3.2 ROS流式定量检测 用流式细胞仪检测细胞内ROS的含量, 结果如图7(NCI-H460细胞ROS流式图)和图8(MRC-5细胞ROS流式图)所示。采用统计学方法分析了三次重复实验数据, 结果见图9, 在

0.05 $\mu\text{mol/L}$ 下, 对于NCI-H460细胞和MRC-5细胞, 三种脂质体诱导细胞产生的ROS含量无显著差异。在0.10 $\mu\text{mol/L}$ 时, 对于NCI-H460细胞, 三种脂质体诱导细胞产生的ROS量与Ctrl相比均有极显著差异 (图9A, $P < 0.01$), 其中CDA14和CTA14与CDO14相

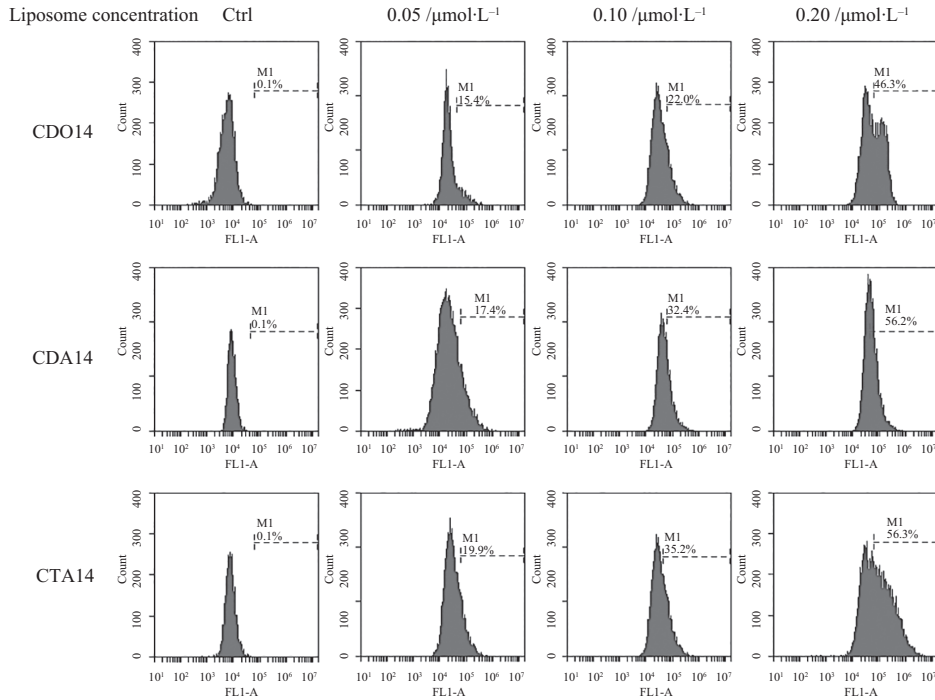


图7 不同浓度的三种阳离子脂质体作用于NCI-H460细胞的ROS流式图

Fig.7 ROS flow cytometry of NCI-H460 cells treated with different concentrations of the three cationic liposomes

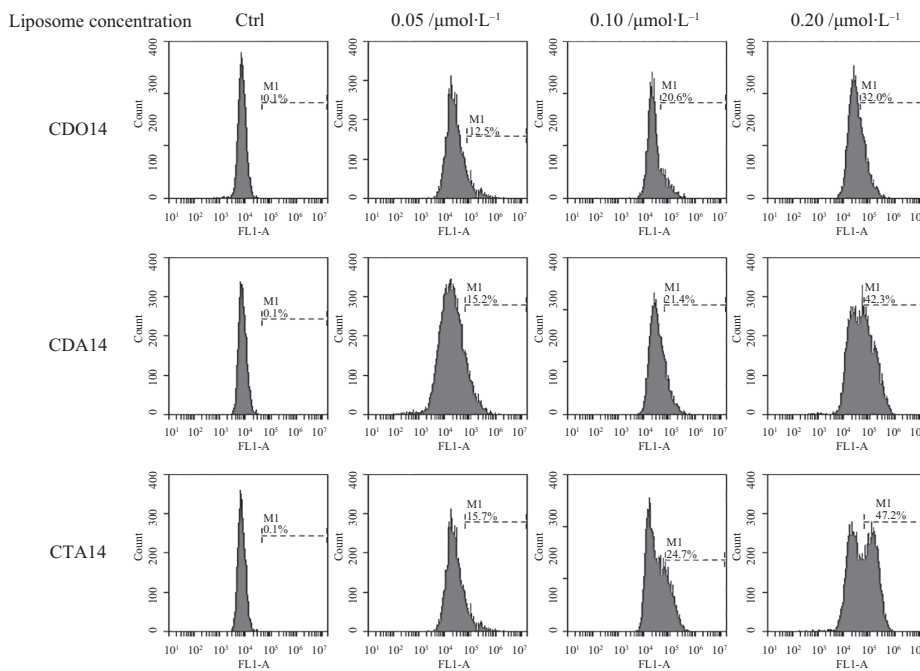


图8 不同浓度的三种阳离子脂质体作用于MRC-5细胞的ROS流式图

Fig.8 ROS flow cytometry of MRC-5 cells treated with different concentrations of the three cationic liposomes

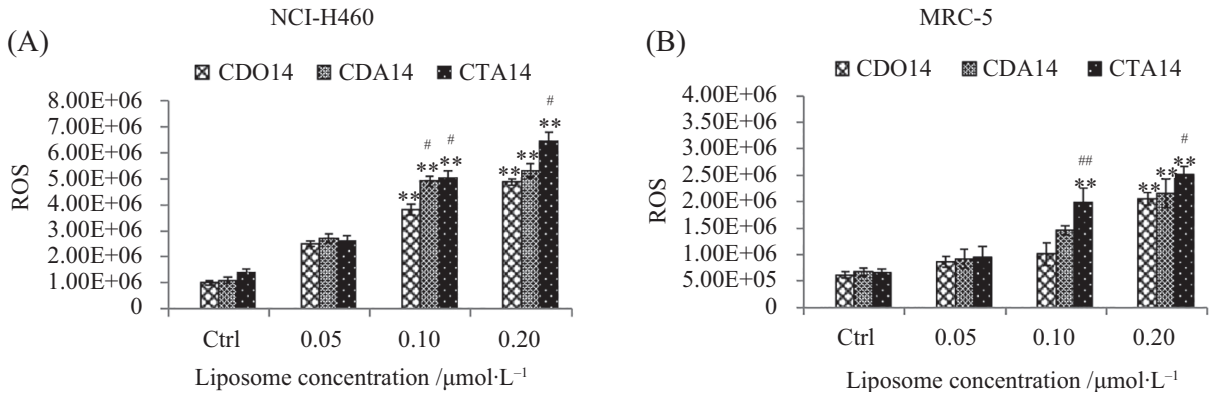
比较有显著差异($P<0.05$); 对于MRC-5细胞, 与Ctrl相比, CDO14无显著差异, CDA14有显著差异(图9B, $P<0.05$), 而CTA14有极显著差异 ($P<0.01$), 其中CTA14与CDO14相比较有极显著差异($P<0.01$)。当浓度达到0.20 $\mu\text{mol/L}$ 时, 三种脂质体诱导细胞产生的ROS含量与Ctrl相比均有极显著差异(图9A和图9B, $P<0.01$), 其中CTA14与CDO14相比较均有显著差异($P<0.05$)。

此外, 与MRC-5细胞相比, NCI-H460细胞整体ROS含量水平升高较多, 在同种浓度下产生的ROS含量是MRC-5细胞的3倍左右。由此可见, 细胞ROS的含量与阳离子脂质体浓度呈剂量依赖性, 且CDO14、CDA14和CTA14脂质体对细胞产生ROS作用依次增

强。在相同条件下, CDO14脂质体诱导细胞产生的ROS含量与CDA14和CTA14脂质体相比相对较低。

2.4 阳离子脂质体对细胞内超氧化物含量的影响

超氧化物是ROS生成的主要前体物质, 为了明确三种阳离子脂质体对细胞氧化应激作用产生的超氧化物水平的影响, 采用超氧化物检测试剂盒法分别检测不同浓度脂质体作用于NCI-H460细胞和MRC-5细胞后的超氧化物含量, 结果如图10所示。在0.05 $\mu\text{mol/L}$ 下, 两种细胞系的超氧化物含量与Ctrl组相比均无显著差异(图10A和图10B)。当浓度增加到0.20 $\mu\text{mol/L}$ 时, 对于NCI-H460细胞(图10A), 与Ctrl相比, CDA14和CTA14有极显著差异 ($P<0.01$), 且CDA14相比于CDO14有显著差异 ($P<0.05$),

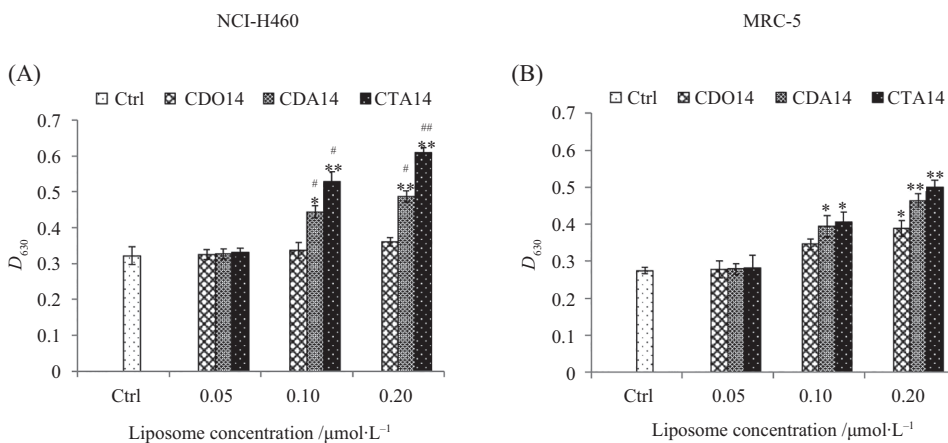


A: NCI-H460细胞的ROS含量; B: MRC-5细胞的ROS含量; ** $P<0.01$, 与Ctrl组比较; * $P<0.05$, ## $P<0.01$, 与CDO14组比较。

A: ROS content of NCI-H460 cells; B: ROS content of MRC-5 cells; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with Ctrl group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$ compared with the CDO14 group.

图9 不同浓度的三种阳离子脂质体作用于NCI-H460细胞和MRC-5细胞的ROS含量

Fig.9 ROS contents in NCI-H460 cells and MRC-5 cells treated with different concentrations of the three cationic liposomes



A: NCI-H460细胞的超氧化物含量; B: MRC-5细胞的超氧化物含量; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与Ctrl组比较; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, 与CDO14组比较。

A: superoxide contents of NCI-H460 cells; B: superoxide contents of MRC-5 cells; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with Ctrl group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$ compared with the CDO14 group.

图10 不同浓度的三种阳离子脂质体作用于NCI-H460细胞和MRC-5细胞的超氧化物含量

Fig.10 Superoxide contents in NCI-H460 cells and MRC-5 cells treated with different concentrations of the three cationic liposomes

CTA14相比于CDO14有极显著差异($P<0.01$); 对于MRC-5细胞(图10B), 与Ctrl相比, CDO14有显著差异($P<0.05$), CDA14和CTA14有极显著差异($P<0.01$)。而且, NCI-H460细胞整体超氧化物含量水平高于MRC-5细胞。

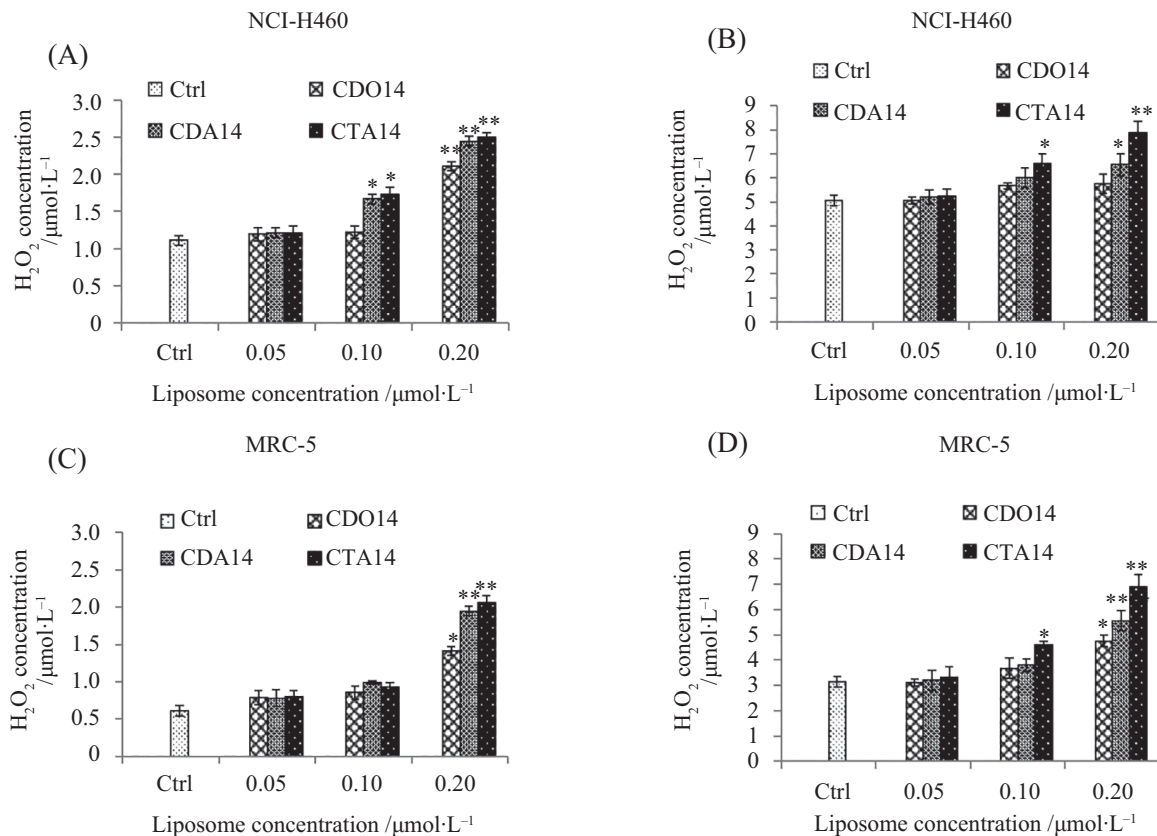
2.5 阳离子脂质体对细胞 H_2O_2 水平的影响

细胞内氧化应激产生的超氧化物大部分会转换为 H_2O_2 , H_2O_2 是氧化应激反应的一个重要产物。本实验测定不同浓度脂质体作用NCI-H460细胞和MRC-5细胞后胞内及胞外培养液中 H_2O_2 含量, 结果如图11所示, 在 $0.05 \mu\text{mol/L}$ 下, 两种细胞系胞内及培养液中的 H_2O_2 含量与Ctrl组相比均无显著差异(图11A~图11D)。当浓度增加到 $0.20 \mu\text{mol/L}$ 时, 对于NCI-H460细胞(图11A), 三种脂质体诱导细胞产生的 H_2O_2 含量与Ctrl相比均有极显著差异($P<0.01$); 而在细胞培养液中(图11B), 只有CTA14有极显著差异($P<0.01$), CDA14有显著差异($P<0.05$), 而

CDO14无显著差异; 对于MRC-5细胞内(图11C)及培养液(图11D), CDO14有显著差异($P<0.05$), 而CDA14和CTA14有极显著差异($P<0.01$)。结果表明, NCI-H460细胞整体 H_2O_2 含量水平高于MRC-5细胞, 而且三种阳离子脂质体诱导细胞 H_2O_2 的生成呈剂量依赖性, 其中CDO14显著低于CDA14和CTA14。

2.6 阳离子脂质体对细胞羟自由基水平的影响

在细胞内, 部分 H_2O_2 会与 Fe^{2+} 发生Fenton反应从而生成 $\bullet\text{OH}$, $\bullet\text{OH}$ 化学性质活泼, 被认为是ROS中对细胞造成损伤的主要因素^[15]。如图12所示, 用 $0.05 \mu\text{mol/L}$ 的三种脂质体诱导NCI-H460细胞和MRC-5细胞产生的 $\bullet\text{OH}$ 与Ctrl组相比均无显著差异; 当浓度增加到 $0.20 \mu\text{mol/L}$ 时, 对于NCI-H460细胞(图12A), 与Ctrl组相比, CDO14无显著差异, 而CDA14组和CTA14组有极显著差异($P<0.01$); 对于MRC-5细胞(图12B), 与Ctrl相比, CDO14组无显著差异,



A: NCI-H460细胞内的 H_2O_2 含量; B: NCI-H460细胞培养液的 H_2O_2 含量; C: MRC-5细胞内的 H_2O_2 含量; D: MRC-5细胞培养液的 H_2O_2 含量; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与Ctrl组比较。

A: H_2O_2 content in NCI-H460 cells; B: H_2O_2 content of NCI-H460 cell culture medium; C: H_2O_2 content in MRC-5 cells; D: H_2O_2 content of MRC-5 cell culture medium; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with Ctrl group.

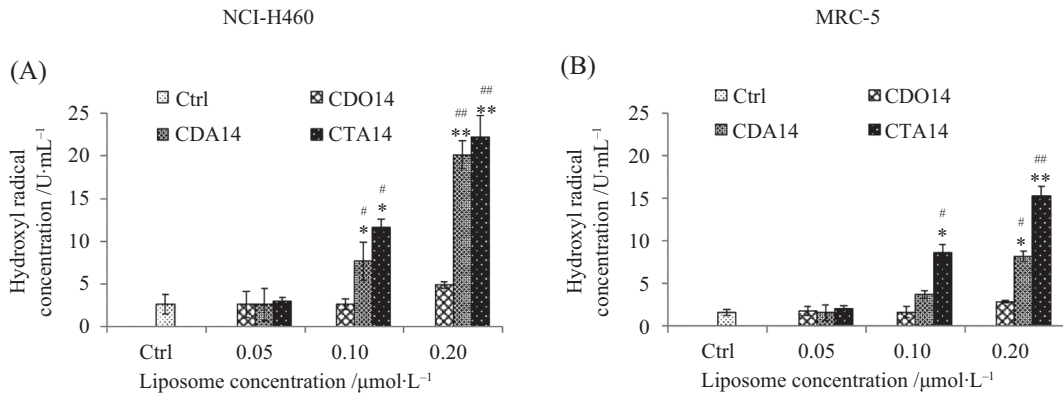
图11 不同浓度的三种阳离子脂质体作用于NCI-H460和MRC-5细胞内和培养液的 H_2O_2 含量

Fig.11 H_2O_2 contents in NCI-H460 cells and MRC-5 cells treated with different concentrations of the three cationic liposomes

CDA14组有显著差异($P<0.05$), 而CTA14组有极显著差异($P<0.01$)。实验结果表明, NCI-H460细胞与MRC-5细胞相比 $\cdot\text{OH}$ 含量升高较多, 尤其在高浓度下CDA14和CTA14诱导细胞 $\cdot\text{OH}$ 的含量呈显著的剂量依赖性升高, 并与同剂量的CDO14组相比具有显著性和极显著性差异。

2.7 阳离子脂质体对细胞NO水平的影响

NO属于活性氮族中的一种, 也是氧化应激反应的一个重要指标, 本实验测定了NCI-H460和MRC-5两种细胞的胞内及培养液中NO的含量。结果如图13所示, 在0.05 $\mu\text{mol/L}$ 下, 两种细胞胞内及培养液中的NO含与Ctrl组相比无显著差异(图13)。当

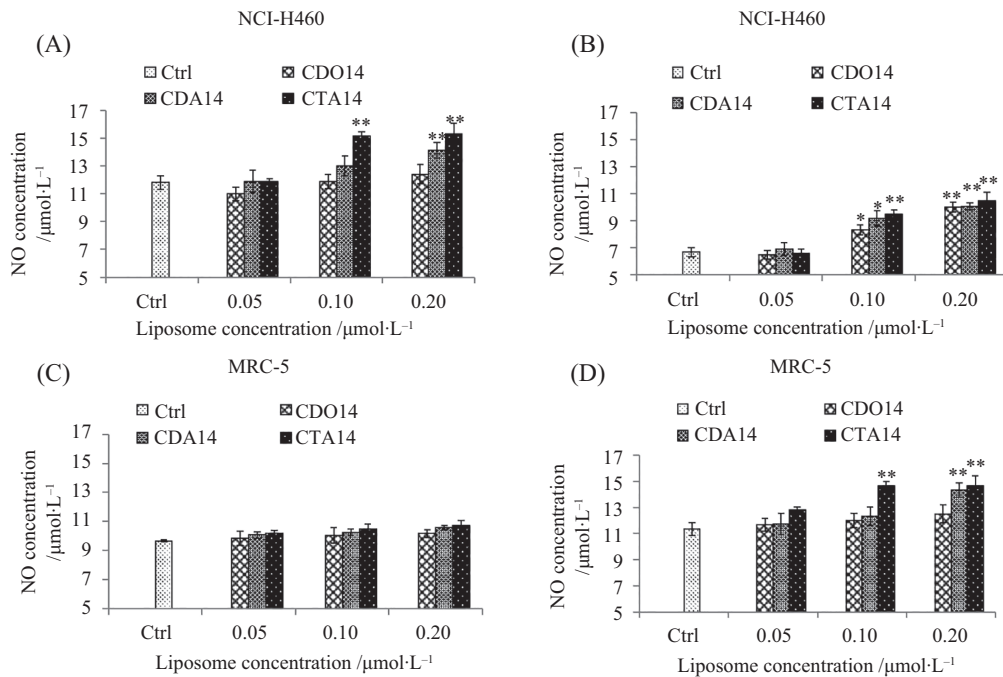


A: NCI-H460细胞的 $\cdot\text{OH}$ 含量; B: MRC-5细胞的 $\cdot\text{OH}$ 含量; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与Ctrl组比较; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, 与CDO14组比较。

A: $\cdot\text{OH}$ content of NCI-H460 cells; B: $\cdot\text{OH}$ content of MRC-5 cells; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with Ctrl group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$ compared with the CDO14 group.

图12 不同浓度的三种阳离子脂质体作用于NCI-H460细胞和MRC-5细胞的羟自由基含量

Fig.12 Hydroxyl radical contents in NCI-H460 cells and MRC-5 cells treated with different concentrations of the three cationic liposomes

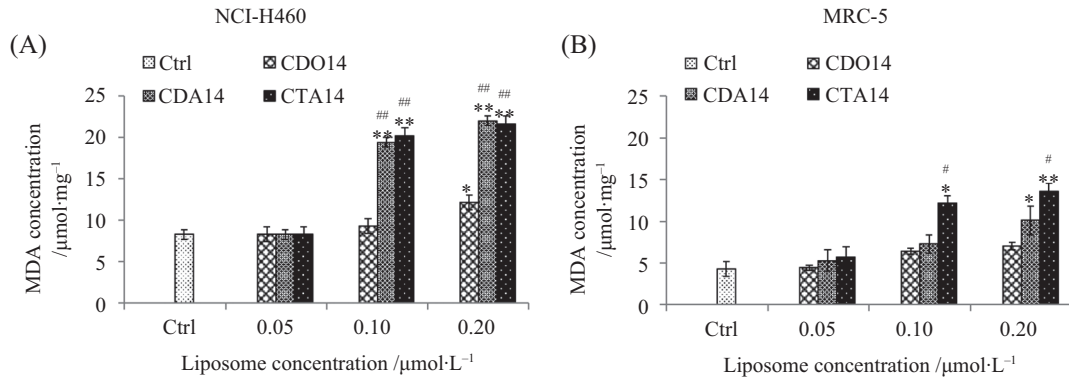


A: NCI-H460细胞内的NO含量; B: NCI-H460细胞培养液的NO含量; C: MRC-5细胞内的NO含量; D: MRC-5细胞培养液的NO含量; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与Ctrl组比较。

A: NO content in NCI-H460 cells; B: NO content of NCI-H460 cell culture medium; C: NO content in MRC-5 cells; D: NO content of MRC-5 cell culture medium; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with Ctrl group.

图13 不同浓度的三种阳离子脂质体作用于NCI-H460和MRC-5细胞内和培养液中的NO含量

Fig.13 NO contents in NCI-H460 cells, MRC-5 cells and culture medium treated with different concentrations of the three cationic liposomes



A: NCI-H460细胞的MDA含量; B: MRC-5细胞的MDA含量。* $P<0.05$, ** $P<0.01$,与Ctrl组比较; # $P<0.05$, ## $P<0.01$,与CDO14组比较。

A: MDA content of NCI-H460 cells; B: MDA content of MRC-5 cells. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with Ctrl group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$ compared with CDO14 group.

图14 不同浓度的三种阳离子脂质体作用于NCI-H460细胞和MRC-5细胞的MDA含量

Fig.14 MDA contents in NCI-H460 cells and MRC-5 cells treated with different concentrations of the three cationic liposomes

浓度增加到0.20 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 时,在NCI-H460细胞内(图13A),CDA14和CTA14有极显著差异($P<0.01$);在NCI-H460细胞培养液中(图13B),三种脂质体诱导细胞产生的NO含量与Ctrl相比均有极显著差异($P<0.01$);在MRC-5细胞内(图13C),NO含量与Ctrl组相比无显著差异;对于MRC-5细胞培养液(图13D),CDA14和CTA14有极显著差异($P<0.01$)。这两种细胞的胞内NO含量比较,NCI-H460细胞NO含量水平明显高于MRC-5细胞;但在细胞培养液中,NCI-H460细胞NO含量水平要明显低于MRC-5细胞。结果表明,在高浓度下,对于NCI-H460细胞内的NO水平,CDO14没有显著性差异,而CDA14和CTA14有极显著差异;对于NCI-H460细胞培养液的NO水平,三种阳离子脂质体均有极显著性差异。对于MRC-5细胞内的NO水平,三种阳离子脂质体均无明显差异,而对于MRC-5细胞培养液的NO水平,CDA14和CTA14均有极显著差异,但是CDO14没有显著性差异。

2.8 MDA含量检测

丙二醛(malondialdehyde, MDA)是一种生物体脂质氧化的天然产物,通过检测MDA的水平即可检测脂质氧化的水平,间接地反映出细胞损伤的程度,实验结果如图14所示。在0.05 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 下,对于NCI-H460细胞和MRC-5细胞,三种脂质体诱导细胞产生的MDA含量无显著差异。当浓度增加到0.20 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 时,对于NCI-H460细胞(图14A),与Ctrl相比,CDO14组有显著差异($P<0.05$),CDA14组和CTA14组有极显著差异($P<0.01$),且CDA14组

和CTA14组相对于CDO14有极显著差异($P<0.01$)。对于MRC-5细胞(图14B),与Ctrl相比,CDO14组无显著差异,CDA14组有显著差异($P<0.05$),CTA14组有极显著差异($P<0.01$),且CTA14组相对于CDO14有显著差异($P<0.05$)。另外,两种细胞系相比较,NCI-H460细胞MDA含量明显高于MRC-5细胞系。

3 讨论

阳离子脂质体作为一种高效的药物递送载体,目前,因其细胞毒性机制还不十分清楚,在很大程度上限制了其开发应用。研究显示,除了作用的细胞类型外,阳离子脂质体自身的化学结构、浓度、粒径及所带电荷量是影响其细胞毒性大小的关键因素。有研究表明,阳离子脂质体能够诱导细胞产生氧化应激反应造成损伤而产生毒性作用^[6]。本文深入研究了实验室自主设计合成的三种不同头部结构的阳离子脂质体CDO14、CDA14和CTA14通过诱导细胞氧化应激损伤而产生的毒性作用机制。实验制备了三种阳离子脂质体,用激光粒度仪测得的平均粒径比TEM测得的粒径结果偏大,这是因为电镜为极少的点面静态颗粒测量,粒度仪是立体的、大量的动态测量,所以TEM得到的粒径数据比粒度仪测得的数据要小。为了减少粒径对结果的影响,采用脂质体挤出器控制三种脂质体的粒径基本一致,以保证脂质体的作用只与其本身的结构性质有关。

氧化应激反应是生物体普遍存在的生物反应,

反应生成的产物主要包括ROS与RNS。ROS积累不仅会导致线粒体损伤和功能紊乱,还会造成DNA损伤和细胞凋亡及坏死。细胞内ROS升高能直接攻击DNA等生物大分子,并造成DNA断裂、DNA交联和DNA加合物形成等细胞病变^[17]。在各种氧自由基中,超氧化物具有比较特殊的地位,是最基本也是绝大多数ROS的生成前体^[18]。本实验结果证明,细胞在高剂量脂质体诱导下发生氧化应激反应并生成超氧化物,0.20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下超氧化物含量相比于0.10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度有明显提升。 H_2O_2 是由SOD催化超氧化物所生成的,具有膜通透性,本研究证明阳离子脂质体诱导细胞产生的大部分 H_2O_2 透过细胞膜进入细胞培养上清液中。 H_2O_2 能通过芬顿反应生成的 $\cdot\text{OH}$ 是氧化应激反应的一个重要指标,因为 $\cdot\text{OH}$ 是一种氧化能力很强的自由基性质活泼,细胞产生过量的 $\cdot\text{OH}$ 容易与DNA、蛋白质和脂质等反应,造成DNA和蛋白质损伤及脂质氧化产生过量MDA等,本实验证明,细胞在高剂量脂质体诱导下生成了过量的 $\cdot\text{OH}$ 和MDA进而产生氧化应激损伤。NO是RNS中最主要的一种,当阳离子脂质体浓度达到0.20 $\mu\text{mol/L}$ 时,NCI-H460细胞胞内和培养液中及MRC-5细胞培养上清液中NO含量都显著升高,表明高浓度下RNS含量升高产生氧化应激损伤。但在癌细胞培养液中,NO含量相对较低,这一结果具体原因尚不明确。两种细胞相比较,在相同条件下NCI-H460细胞产生的超氧化物、 H_2O_2 、MDA及 $\cdot\text{OH}$ 含量均高于MRC-5细胞,且CDO14脂质体诱导细胞产生的ROS含量要低于CDA14和CTA14脂质体。实验测定CDO14、CDA14和CTA14三种脂质体的电位依次增加,这也与它们毒性大小顺序相一致。本课题组前期工作同样证明,脂质体电位越高其细胞毒性也越大^[9],并且通过CCK-8法检测细胞存活率,结果同样显示,三种脂质体对细胞毒性依次增强。

综上所述,阳离子脂质体能够通过诱导细胞发生氧化应激反应,进而产生细胞毒性作用,且具有剂量依赖性。在高浓度下,NCI-H460和MRC-5细胞ROS含量显著升高,其中的氧化应激指标也均显著升高,细胞毒性明显增强。阳离子脂质体诱导细胞产生的氧化应激损伤与其头部结构和剂量密切相关,其中肽头部脂质体CDO14诱导细胞产生的ROS含量显著低于CDA14和CTA14,因此,CDO14的毒性作用远小于单季铵盐头部脂质体CDA14,而CDA14

的毒性又小于双季铵盐头部脂质体CTA14,而且对于癌细胞的作用强度要高于正常细胞。因此,肽头部的阳离子脂质体细胞毒性较小,具有较好的应用前景,值得进一步研究开发。

参考文献 (References)

- [1] MICHEL T, LUFT D, ABRAHAM M, et al. Cationic nanoliposomes meet mRNA: efficient delivery of modified mRNA using hemocompatible and stable vectors for therapeutic applications [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 9(8): 459-68.
- [2] LOTFABADI N N, KOUCHESFEHANI H M, SHEIKHHA M H, et al. Development of a novel cationic liposome: evaluation of liposome mediated transfection and anti-proliferative effects of miR-101 in acute myeloid leukemia [J]. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2018, 45(10): 196-202.
- [3] EŞ I, OK M T, PUENTES-MARTINEZ X E, et al. Evaluation of siRNA and cationic liposomes complexes as a model for *in vitro* siRNA delivery to cancer cells [J]. *Colloid Surface A*, 2018, 555(3): 280-9.
- [4] ZHANG C, ZHANG S, ZHI D, et al. Cancer treatment with liposomes based drugs and genes co-delivery systems [J]. *Curr Med Chem*, 2018, 25(28): 3319-32.
- [5] BULBAKE U, KOMMINENI N, BRYSEWSKA M, et al. Cationic liposomes for co-delivery of paclitaxel and anti-Plk1 siRNA to achieve enhanced efficacy in breast cancer [J]. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2018, 48: 253-65.
- [6] ROURSGAARD M, KNUDSEN K B, NORTHEVED, et al. *In vitro* toxicity of cationic micelles and liposomes in cultured human hepatocyte (HepG2) and lung epithelial (A549) cell lines [J]. *Toxicol In Vitro*, 2016, 36: 164-71.
- [7] 魏霞蔚, 张志荣. 用作基因传递系统的阳离子纳米载体的细胞毒性及其机制研究进展[J]. *药学进展*(WEI X W, ZHANG Z R. Research advances in cytotoxicities of cationic nanocarriers as gene delivery systems and the mechanisms thereof [J]. *Prog Pharm Sci*), 2016, 40(4): 243-9.
- [8] 付莹, 崔韶晖, 张树彪, 等. 表面电荷对阳离子基因载体的影响[J]. *生命的化学*(FU Y, CUI S H, ZHANG S B, et al. Effect of surface charges on cationic gene vectors [J]. *Chemistry of life*), 2019, 39(4): 744-52.
- [9] 林泉, 崔韶晖, 赵轶男, 等. 阳离子脂质体的细胞毒性[J]. *生命的化学*(LIN X, CUI S H, ZHAO Y N, et al. The cytotoxicity of cationic liposomes [J]. *Chemistry of life*), 2016, 36(1): 50-6.
- [10] HELMUT S. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine [J]. *Redox Biol*, 2015, 4: 180-3.
- [11] HELMUT S. On the history of oxidative stress: concept and some aspects of current development [J]. *Curr Opin Toxicol*, 2018, 7: 122-6.
- [12] MITTLER R. ROS are good [J]. *Trends Plant Sci*, 2017, 22(1): 11-9.
- [13] GALADARI S, RAHMAN A, PALLICHANKANDY S, et al. Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress [J]? *Free Radic Biol Med*, 2017, 104: 144-64.
- [14] 段坦然, 孟春春, 唐兆新, 等. 活性氧在肿瘤发展和治疗中的作用[J]. *中国细胞生物学学报*(DUAN T R, MENG C C, TANG Z X, Ding Chan. Role of reactive oxygen species in tumor develop-

- ment and therapy [J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2016, 38(10): 1295-301.
- [15] MOLONEY J N, COTTER T G, ELSEVIER L. ROS signalling in the biology of cancer [J]. Semin Cell Dev Biol, 2018, 80: 50-64.
- [16] PANIERI E, SANTORO M M. Ros homeostasis and metabolism: A dangerous liason in cancer cells [J]. Cell Death Dis, 2016, 7(6): e2253.
- [17] DAVALLI P, MARVERTI G, LAURIOLA A, et al. Targeting oxidatively induced DNA damage response in cancer: opportunities for novel cancer therapies [J]. Oxid Med Cell Longev, 2018, 2018: 1-21.
- [18] DIEBOLD L, CHANDEL N S. Mitochondrial ROS regulation of proliferating cells [J]. Free Radic Biol Med, 2016, 100: 86-93.