

# 胆固醇嵌入式阳离子脂质体运载基因研究

赵轶男<sup>1,2</sup> 张树彪<sup>2\*</sup> 崔韶晖<sup>2</sup> 张淑芬<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>大连理工大学精细化工国家重点实验室, 大连 116012; <sup>2</sup>大连民族学院生物技术与资源利用

国家民委-教育部重点实验室, 大连 116600)

**摘要** 阳离子脂质体是一种有临床应用潜力的抗肿瘤药物递药系统, 助类脂能起到稳定双层膜和降低阳性成分毒性的作用, 同时提供阳性类脂的细胞渗透功能。为了进一步发掘助类脂的应用潜力, 该文采用胆固醇(cholesterol)作为助类脂制备阳离子脂质体, 测定了脂质体的粒径及Zeta电位, 脂质体的平均粒径为100~140 nm, Zeta电位为45~60 mV。脂质体分别与绿色荧光蛋白基因(pGFP-N2)、荧光素酶基因(pGL3)结合, 形成脂质体/DNA复合物, 通过载入人喉癌细胞(Hep-2), 考察了其转染效率和细胞毒性。结果表明, 阳离子类脂与胆固醇以1:1、1:2和1:4摩尔比例混合制备脂质体均能高效转染Hep-2细胞。毒性实验显示, 阳离子类脂单独存在时对癌细胞具有一定的细胞毒性, 随着胆固醇的加入, 脂质体对细胞的毒性明显减小, 与商品试剂DOTAP和Lipofectamine 2000相当。

**关键词** 阳离子脂质体; 胆固醇; 基因转运; 细胞毒性

## The Development of Cholesterol Embedded Cationic Liposomes for Gene Transfer

Zhao Yinan<sup>1,2</sup>, Zhang Shubiao<sup>2\*</sup>, Cui Shaohui<sup>2</sup>, Zhang Shufen<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>State Key Laboratory of Fine Chemicals, Dalian University of Technology, Dalian 116012, China; <sup>2</sup>SEAC-ME Key Laboratory of Biotechnology and Bio-resources Utilization, Dalian Nationalities University, Dalian 116600, China)

**Abstract** The cationic liposomes are a kind of anti-tumor drug delivery systems with potential clinical applications. Co-lipids can stabilize the double membrane of cationic liposomes, reduce the toxicity of cationic lipids, and improve cell penetration of cationic lipids. In this article, cholesterol was chosen to prepare cationic liposomes. The size, zeta potential and morphology of cationic liposomes were determined. The sizes of these liposomes were from 100 to 140 nm. Zeta potentials were in the range of 45~60 mV. Lipoplexes formed by the combination of cationic liposomes with pGFP-N2 and pGL3 were evaluated in terms of gene-transferring efficiency and cytotoxicity in Hep-2 cells. Our results convincingly demonstrated that cholesterol embedded cationic liposomes could condense DNA to form lipoplexes. The results showed high transfection efficiency in Hep-2 cells at the ratios of lipid to cholesterol 1:1, 1:2 and 1:4. Toxicity experiments showed that the cytotoxicity of lipids against cells increased, while cholesterol could reduce the cytotoxicity of liposomes to some extent.

**Key words** cationic liposomes; cholesterol; gene transfection; cytotoxicity

收稿日期: 2014-04-02 接受日期: 2014-05-29

国家自然科学基金(批准号: 20876027、21176046), 国家高新技术研究发展计划(批准号: 2014AA020707)和中央高校自主科研基金(批准号: DC12010104)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0411-87656141, E-mail: zsb@dlnu.edu.cn; Tel: 0411-84986265, E-mail: zhangshf@dlut.edu.cn

Received: April 2, 2014 Accepted: May 29, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.20876027, 21176046), the National Hightechnology Research and Development Program of China (Grant No.2014AA020707) and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (Grant No.DC12010104)

\*Corresponding authors. Tel: +86-411-87656141, E-mail: zsb@dlnu.edu.cn; Tel: +86-411-84986265, E-mail: zhangshf@dlut.edu.cn

网络出版时间: 2014-08-20 17:06 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.09.0108.html>

阳离子脂质体是一种非病毒基因载体,具有类细胞结构和生物膜的特性,在体内可降解,可以保护其运载基因片段的生物活性,而且制备简单,重复性好,是一种有临床应用潜力的抗肿瘤药物递药系统<sup>[1-3]</sup>。阳离子脂质体由阳离子类脂组成,阳离子类脂可以单独形成脂质体,也经常和助类脂一起使用,如二油酰磷脂酰乙醇胺(dioleoylphosphatidylethanolamine, DOPE)、磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine, PC)和胆固醇(cholesterol)等,这些中性助类脂能起到稳定双层膜和降低阳性成分毒性的作用,同时提供阳性类脂的细胞渗透功能。DOPE作为助类脂制备的脂质体,转染效率高,但是毒性相对较大。胆固醇是许多天然生物膜的重要成分,结构式如图1所示,能以1:1甚至2:1的摩尔比插入磷脂膜中。胆固醇嵌入式脂质体可以改变脂质体膜的相变,增加其稳定性,且对生物体无毒。该脂质体的体外转染活性低于DOPE为助类脂的脂质体,而在体内转染试验中,结果恰恰相反,以胆固醇为助类脂形成的脂质体/DNA复合物表现出了较高的转染活性<sup>[4]</sup>。Huang等<sup>[5]</sup>将含有双胆固醇的小分子化合物制备脂质体用作药物载体,结果发现,含有双胆固醇的脂质体具有较好的载药性。孔德领等<sup>[6]</sup>将胆固醇用于低分子量聚乙烯亚胺(low molecular weight polyethyleneimine, LMWPEI)的修饰,将其与聚(L-天冬酰胺-co-L-赖氨酸)接枝后得到的材料具有良好的基因载体性能。因此,胆固醇嵌入式阳离子脂质体作为基因载体在介导基因转运方面具有广阔的应用前景。本文选取实验室自制的双子型阳离子类脂G12(图2)与胆固醇以不同比例结合制备脂质体,考察了脂质体的尺寸、Zeta电位,以及脂质体对人喉癌细胞(Hep-2)的转染效率和毒性的影响。通过本研究,进一步挖掘胆固醇作为转染助类脂的应用潜力,为阳离子脂质体的制备

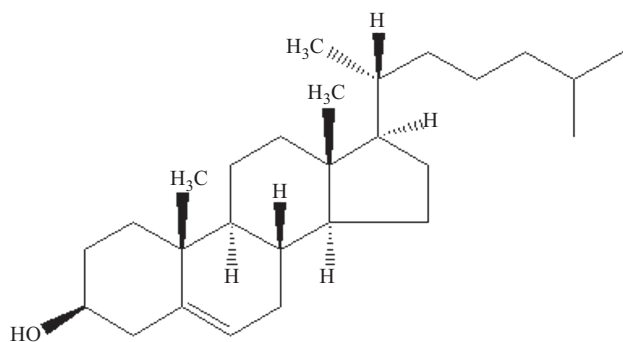


图1 胆固醇的结构式

Fig.1 Structure of cholesterol

及生物学评价实验提供理论依据和参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 仪器与试剂

试剂:类脂G12(分子量为755.49,课题组合成);人喉癌上皮细胞Hep-2、人肺腺癌细胞NCI-H460(中国科学院上海细胞库);Lipofectamine 2000(简称Lipo2000,美国Invitrogen公司);1,2-二油烯氧基-3-三甲氨基丙烷(1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (chloride salt), DOTAP, 美国Roche公司);质粒pGFP-N2(含绿色荧光蛋白基因,实验室提取);质粒pGL3(含荧光素酶基因,实验室提取);磷酸盐缓冲液(DPBS, 生工生物工程(上海)股份有限公司);Bright-Glo荧光素酶评价体系(E151A, Promega公司);Pierce BCA Protein Assay试剂盒(美国Thermo公司);MTT(美国Sigma公司);Opti-DMEM培养基、RPMI1640培养基(美国Gibco公司);胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司)。

仪器:倒置荧光显微镜(IX71, 日本Olympus公司);多功能酶标仪(BioTek Synergy2, 美国Gene公司)酶标仪(澳大利亚Sunrise Tecan公司);二氧化碳培养箱(美国Thermo公司);携Zeta电位测定与纳米激光散射粒度分布仪(SZ-100, 日本HORIBA公司);高压蒸汽灭菌锅(MLS-3750, 日本三洋公司);超纯水仪(美国Millipore公司)。

### 1.2 细胞培养

人喉癌上皮细胞Hep-2(人肺腺癌细胞NCI-H460)培养于含10%胎牛血清、100 μg/mL青霉素、100 μg/mL链霉素的DMEM(RPMI1640)培养液中,在37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养,每1~2 d更换1次培养液。

### 1.3 脂质体的制备

准确称取阳离子类脂G12 0.001 g,加1 mL CHCl<sub>3</sub>溶解,按摩尔比分别为1:0、3:1、2:1、1:1、1:2

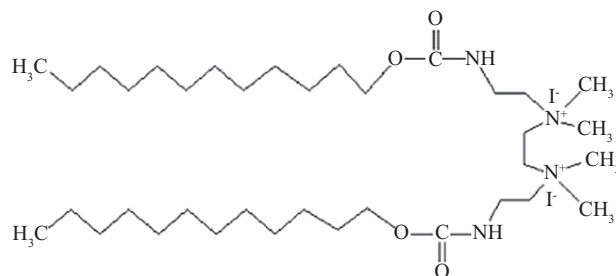


图2 阳离子类脂G12的结构式

Fig.2 Structure of cationic lipid G12

和1:4比例取胆固醇加到溶液中,用振荡器使其充分溶解。在N<sub>2</sub>下吹干,形成均匀膜,置于真空干燥箱4~5 h。向干燥好的膜准确加入1 mL双蒸水,45 °C左右超声并反复多次振荡,使壁上膜充分溶解以至澄清得到浓度为1 mg/mL脂质体,置于冰箱4 °C保存。

#### 1.4 脂质体/DNA复合物的制备

将0.3 μg pGFP-N2质粒(或pGL3)及相应比例脂质体分别稀释于25 μL DMEM中,将质粒稀释液滴加到脂质体稀释液中,用漩涡振荡器使其充分混匀,室温温育15 min,得到脂质体/DNA复合物<sup>[7-8]</sup>。

#### 1.5 粒径、Zeta电位检测

阳离子脂质体平均粒径和Zeta电位测定通过纳米激光散射粒度分布仪测量,测定前将脂质体超声处理,用超纯水稀释,1 mL超纯水加入20 μL脂质体样品。检测条件为氦-氖激光,波长630 nm。每个样品测量重复3次。

#### 1.6 脂质体/DNA复合物体外细胞转染

1.6.1 转染绿色荧光蛋白基因 将Hep-2细胞或NCI-H460细胞种植于96孔细胞培养板中,每孔加DMEM(RPMI1640)细胞培养液(含双抗和血清)100 μL,浓度约为1.0×10<sup>5</sup>/孔。将细胞放置在37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中孵育24 h,使在转染日细胞密度达80%~90%。移去生长培养基,用等量DMEM(RPMI1640)培养基(无血清)清洗,再用等量DMEM(RPMI1640)培养基(无血清)替换。将50 μL脂质体/DNA复合物加到每孔中,摇动培养板,轻轻混匀。放在37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养4~5 h,更换含10%血清和抗生素的培养基,培育48 h。采用倒置荧光显微镜进行基因表达分析<sup>[7]</sup>,观察倍数20×10。

1.6.2 转染荧光素酶报告基因 细胞转染方法参

见1.6.1。转染后将细胞用DPBS洗1次,每孔加入600 μL裂解液,20 min后移至96孔白板上,每孔加20 μL,再加80 μL检测液,利用多功能酶标仪检测相对酶活力。同时以Pierce BCA Protein Assay试剂盒为标准对照测定总蛋白含量。即其A组分和B组分按照50:1的比例混合,取250 μL加到96孔透明板中(平底),取裂解液5 μL加到每孔中,37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中孵育20 min。使用酶标仪在570 nm下分析蛋白含量。转染效率可表示为:RLU/mg蛋白。

1.6.3 胆固醇嵌入式阳离子脂质体的细胞毒性检测采用MTT法测定Hep-2细胞的存活率。将复合物加入细胞中,置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养24 h。每孔加入MTT 20 μL,于37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养4 h,弃去培养液,加入150 μL DMSO溶破细胞,用酶标仪测定D<sub>570</sub>。以未转染细胞的光密度为对照,计算基因转染后细胞存活的百分率。

## 2 结果

### 2.1 阳离子脂质体的稳定性

采用薄层分散与超声分散相结合的方法制备脂质体。由于薄层分散法的操作比较简单,所以应用较为普遍,用漩涡震荡可制成较大的多层膜囊泡,而超声处理可显著降低脂质体的粒径与粒度分布,形成适于基因转染的小的单层膜囊泡。本研究制备的6个比例下的阳离子脂质体在4 °C存放3个月,以1:0、3:1、2:1、1:1和1:2比例制备的脂质体无沉淀析出,以1:4比例制备的脂质体有沉淀,但使用前经超声处理,即可澄清。

### 2.2 粒径、Zeta电位检测

本文使用激光粒度仪测定了类脂与胆固醇以

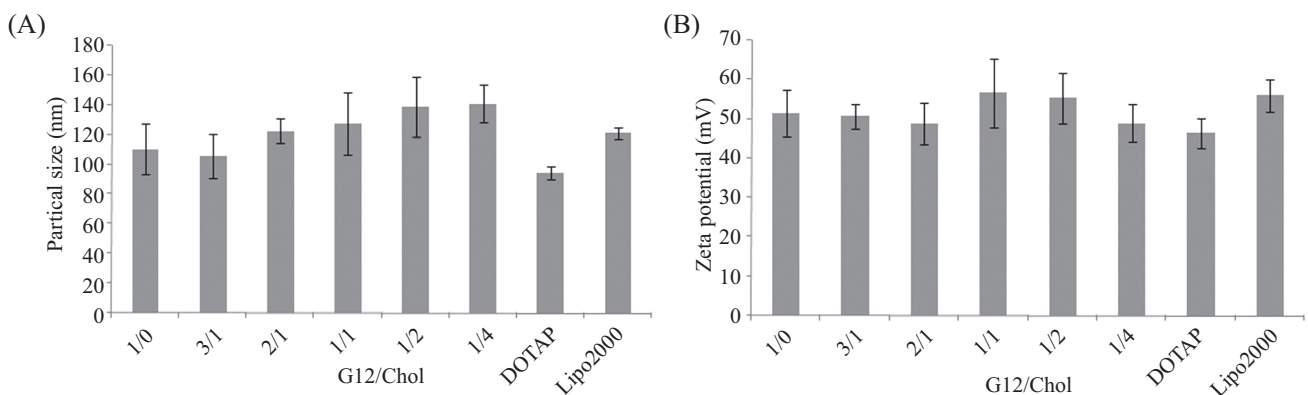
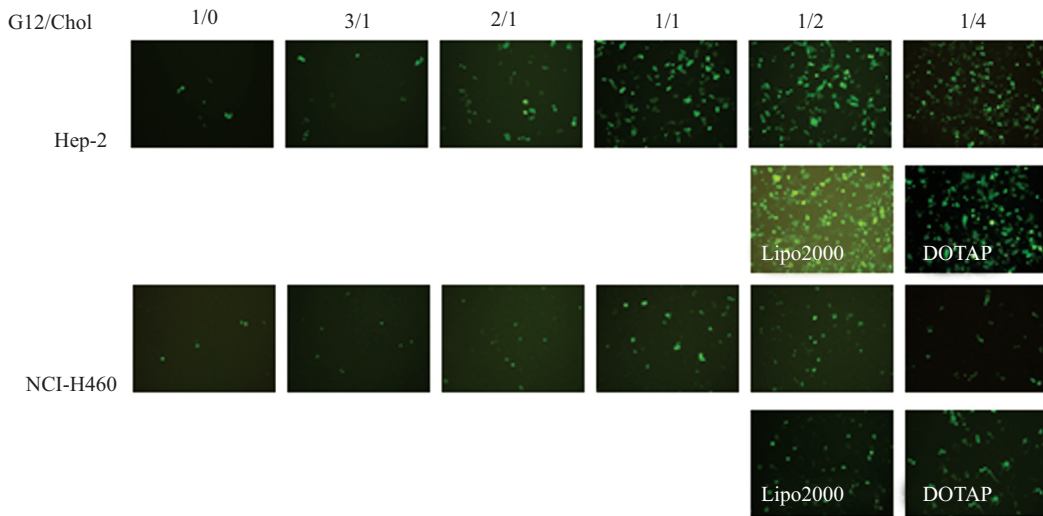


图3 阳离子脂质体的粒径(A)及Zeta电位(B)

Fig.3 Partical size (A) and Zeta potential (B) of cationic liposomes



使用类脂G12与胆固醇以不同比例制备脂质体(N/P质量比为3:1)。DOTAP和Lipofectamine 2000为对照, N/P质量比为3:1。  
Using liposomes at different G12/Chol ratios (N/P weight ratio: 3:1). As controls, DOTAP and Lipofectamine 2000 were used at the N/P ratio of 3:1.

图4 阳离子脂质体介导pGFP-N2质粒转染Hep-2、NCI-H460细胞绿色荧光蛋白表达(200×)  
Fig.4 Green fluorescent protein expression of pGFP-N2 plasmid in Hep-2 cells and NCI-H460 cells in the presence of liposomes (200×)

不同比例结合制备的脂质体的粒径(图3A)和Zeta电位(图3B)。6个脂质体的平均粒径都在100~140 nm之间, PDI值分别为0.255、0.301、0.364、0.283、0.255和0.239, Zeta电位在45~60 mV之间, 脂质体的多分散系数PDI在0.2~0.4范围内, 脂质体颗粒分散比较均匀。

### 2.3 脂质体/DNA复合物体外细胞转染

质粒pGFP-N2中含有绿色荧光蛋白基因, 基因表达的产物含有绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP), 阳性细胞发出明亮的绿色荧光, GFP阳性细胞越多, 信号越强, 表明转染效率越高, 可以定性分析脂质体/DNA复合物的转染效率。运载荧光素酶质粒pGL3转染细胞, 48 h后检测细胞总蛋白含量和荧光发光强度, 可以定量分析脂质体/DNA复合物

的转染效率。选取脂质体/DNA(N/P)比例为3:1转染处于对数增殖期的Hep-2细胞, 定性定量分析6种阳离子脂质体的转染效率。6种比例下制备的脂质体对Hep-2细胞的转染效率相差很大, 随着胆固醇加入量的逐渐增加, 脂质体的转染效率逐渐提高。类脂G12与胆固醇以1:1、1:2和1:4摩尔比制备的脂质体能高效转染Hep-2细胞, 在类脂与胆固醇1:2和1:4比例结合时与商品转染试剂Lipofectamine 2000和DOTAP转染效率相当(图4和图5)。

转染细胞的种类会影响到阳离子脂质体基因转染效率。本实验同时转染对数增殖期的人肺腺癌细胞(NCI-H460), 与Hep-2细胞的转染效率进行比较。脂质体对Hep-2细胞的转染效率高于NCI-H460细胞(图4)。

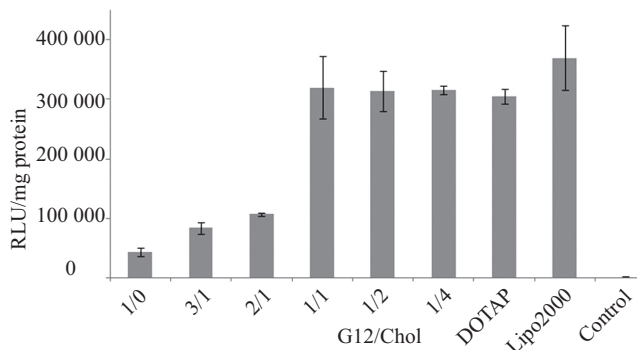


图5 阳离子脂质体介导pGL3质粒转染Hep-2细胞荧光素酶表达

Fig.5 Luciferase expression of pGL3 plasmid in Hep-2 cells in the presence of liposomes

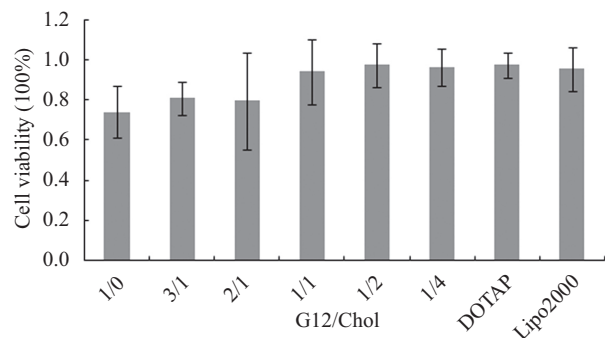


图6 胆固醇嵌入式阳离子脂质体对Hep-2的细胞毒性

Fig.6 Cytotoxicity of the cationic liposomes at different G12/Chol ratios

## 2.4 脂质体/DNA复合物的细胞毒性

阳离子脂质体由于能和细胞表面带负电的多糖蛋白质复合物发生静电作用, 因此常会引起对细胞膜的毒性。采用MTT法测定了不同G12/Chol摩尔比脂质体对Hep-2细胞的毒性。由于胆固醇是动物组织细胞所不可缺少的重要物质, 因此脂质体中加入胆固醇会降低脂质体对细胞的毒性。结果表明, 在G12/Chol为1:1、1:2和1:4时, 细胞存活率能达到80%以上, G12/Chol为1:2时, 细胞存活率稍高于商品试剂DOTAP和Lipofectamine 2000(图6)。

## 3 讨论

有研究表明, 带较多正电荷的脂质体具有均匀的粒度分布, 平均直径为100~200 nm<sup>[9]</sup>, 此种脂质体与DNA复合能够完全压缩DNA。脂质体Zeta电位的绝对值大于30 mV时, 具有较好的静电稳定性, 绝对值大于60 mV, 已经相当稳定, 而绝对值小于30 mV容易产生融合并发生聚集。从粒径和Zeta电位结果可见, 所制备的胆固醇嵌入式阳离子脂质体的粒径在100~140 nm之间, 多分散系数PDI指粒径分布的均匀性, PDI值越小, 粒径分散越均匀。本研究中, 脂质体的PDI值均在0.2~0.4范围内, 粒径分散均匀, 满足作为基因转染载体的条件, 具有适于体内转染的应用潜力。

由于胆固醇具有刚性稠环结构和亲脂性, 在阳离子脂质体中可以起到稳定双层膜的作用, 可以使阳离子脂质体顺利通过质膜, 同时提供阳离子类脂的细胞渗透功能, 因此本实验中, 脂质体中加入胆固醇可以提高脂质体的转染效率, 当阳离子类脂与胆固醇以1:1、1:2和1:4摩尔比混合制备的脂质体能够高效转染肿瘤细胞。本研究中, 脂质体对Hep-2细胞转染效率要高于NCI-H460细胞, 可能是因为细胞内吞作用越强, 转染率越高, 而处于分裂间期的细胞通过胞吞作用摄取阳离子脂质体的数量较有丝分裂期细胞多。细胞处于不同的细胞分裂间期, 内吞作用不同, 从而造成了转染效率的不同<sup>[10]</sup>。脂质体在介导基因转染时的细胞毒性通常与脂质体的使用剂量相关, 脂质体的使用剂量大会增大各类细胞的毒性<sup>[11]</sup>。脂质体尺寸大和Zeta电位高都会增大脂质体对细胞的毒性<sup>[12]</sup>。另外, 胆固醇是许多天然生物膜的重要成分, 因此脂质体中加入胆固醇可以降低阳离子脂质体的阳性成分毒性。

胆固醇作为除了DOPE以外的另一种广泛应用的助类脂, 能与阳离子脂质体作用形成稳定的脂质体。该类阳离子脂质体具有毒性小、转染效率高、转染范围广的优势, 更适合用于基因治疗, 可能为治疗多种疾病提供新的基因转载体, 并为其他阳离子类脂的性能改进及表面修饰提供参考价值。

## 参考文献 (References)

- 1 丁会芹, 崔韶晖, 王冰, 洪洋, 张树彪. Hela细胞对阳离子脂质体/DNA复合体的摄取机制. 中国细胞生物学学报(Ding Hui-qin, Cui Shaohui, Wang Bing, Hong Yang, Zhang Shubiao. The uptake mechanism of cationic liposomes/DNA complex in Hela cells. Chinese Journal of Cell Biology) 2011; 33(12): 1331-5.
- 2 Zhao YN, Zhang SB, Cui SH, Wang B, Zhang SF. Peptides-based cationic liposomes-mediated gene delivery. Expert Opin Drug Delivery 2012; 9(1): 127-39.
- 3 Zhang SB, Zhao YN, Zhao BD, Wang B. Hybrids of nonviral vectors for gene delivery. Biocon. Chemistry 2010; 21: 1003-9.
- 4 Hong KL, Zheng WW, Baker A, Papahadjopoulos D. Stabilization of cationic liposome-plasmid DNA complexes by polyamines and poly (ethylene glycol)-phospholipid conjugates for efficient *in vivo* gene delivery. FEBS Lett 1997; 400: 233-7.
- 5 Huang Z, Jaafari MR, Szoka FC Jr. Disterolphospholipids: Nonexchangeable lipids and their application to liposomal drug delivery. Angew Chem Int Ed Engl 2009; 48(23): 4146-9.
- 6 王燕铭, 张振方, 于琦, 王连永, 孔德领, 俞耀庭. 固醇修饰的低分子量聚乙烯亚胺接枝化聚[L-天冬酰胺-co-L-赖氨酸]作为基因载体的性能研究. 高等学校化学学报(Wang Yan-ming, Zhang Zhenfang, Yu Qi, Wang Lianyong, Kong Deling, Yu Yaoting. Properties of poly [L-(aspartic acid)-co-L-lysine] grafted with cholesterol conjugated low molecular weight poly (ethylenimine) for gene delivery. Chemical Journal of Chinese Universities) 2008; 29(10): 2011-4.
- 7 Zhi DF, Zhang SB, Qureshi F, Zhao YN, Cui SH, Wang B, *et al.* Structure-activity relationship of carbamate-linked cationic lipids bearing hydroxyethyl headgroup for gene delivery. Colloids Surf B Biointerfaces 2013; 112(1): 537-41.
- 8 Zhi D, Zhang S, Qureshi F, Zhao Y, Cui S, Wang B, *et al.* Synthesis and biological activity of carbamate-linked cationic lipids for gene delivery *in vitro*. Bioorg Med Chem Lett 2012; 22(11): 3837-41.
- 9 赵轶男, 张树彪, 崔韶晖, 张传敏, 张淑芬. 阳离子脂质体介导pGFP-N2基因转染肿瘤细胞. 中国细胞生物学学报(Zhao Yinan, Zhang Shubiao, Cui Shaohui, Zhang Chuanmin, Zhang Shufen. Transfection of genes into cancer cells mediated by cationic liposomes. Chinese Journal of Cell Biology) 2013; 35(10): 1459-64.
- 10 Prasad TK, Rangaraj N, Rao NM. Quantitative aspects of endocytic activity in lipid-mediated transfections. FEBS Lett 2005; 579(12): 2635-42.
- 11 Dass CR. Vehicles for oligonucleotide delivery: Therapeutic applicability against tumors. J Pharm Pharmacol 2002; 54(1): 3-27.
- 12 Friend DS, Papahadjopoulos D, Debs RJ. Endocytosis and intracellular processing accompanying transfection mediated by cationic liposomes. Biochim Biophys Acta 1996; 1278(1): 41-50.