

# 阳离子脂质体介导基因转染肿瘤细胞

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

<sup>1</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;

<sup>2</sup>大连理工大学精细化工国家重点实验室, 大连 116012)

**摘要** 使用基因转运载体运载肿瘤细胞进行转染是基因治疗的关键环节之一。Lipofectamine 2000和DOTAP作为商品转染试剂, 具有较高的转染效率。为了进一步发掘其作为基因转运载体的应用潜力, 该文研究了Lipofectamine 2000和DOTAP的粒径、Zeta电位及形态, 并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)和人肺癌细胞(NCI-H460), 考察了其转染效率和细胞毒性。结果表明, 脂质体Lipofectamine 2000与DOTAP都能有效压缩DNA, 形成复合物。Lipofectamine 2000与DOTAP相比, 转染效率高, 与DNA最佳转染比例范围为2:1~4:1。毒性实验显示, 在N/P大于3/1时, Lipofectamine 2000与DOTAP对癌细胞具有一定的细胞毒性。细胞种类对脂质体的转染效率有很大影响, Lipofectamine 2000对Hep-2细胞的转染效率比NCI-H460高。

**关键词** 阳离子脂质体; 脂质体/DNA复合物; 基因转运; 细胞毒性

## Transfection of Genes into Cancer Cells Mediated by Cationic Liposomes

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

<sup>1</sup>Key Laboratory of Biotechnology and Bioresources Utilization, The State Ethnic Affairs Commission-Ministry of Education, Dalian Nationalities University, Dalian 116600, China; <sup>2</sup>State Key Laboratory of Fine Chemicals, Dalian University of Technology, Dalian 116012, China)

**Abstract** The transfection of gene vectors into cancer cells is a key step for gene therapy. Lipofectamine 2000 and DOTAP are two commonly used transfection reagents as they have relatively higher transfection efficiency. The size, zeta potential and morphology of Lipofectamine 2000 and DOTAP were researched. Lipoplexes formed by the combination of cationic liposomes with pGFP-N2 were evaluated in terms of transfection efficiency and cytotoxicity by using two types of cells (Hep-2 and NCI-H460). The results indicated that both of Lipofectamine 2000 and DOTAP could condense DNA to form lipoplexes. Lipofectamine 2000 showed higher transfection efficiency compared to DOTAP with an optimal mass ratio range of 2/1 to 4/1. Lipofectamine 2000 and DOTAP showed cytotoxicity to some degree under the optimal transfection conditions. Cell type was important influence factor for transfection, and Hep-2 cell was easier to be transfected than NCI-H460 with Lipofectamine 2000.

**Key words** cationic liposomes; liposomes/DNA lipoplex; gene transfection; cytotoxicity

肿瘤是威胁人类健康的重大疾病, 肿瘤药物递送系统的研发已成为目前医药领域的热点方向。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

收稿日期: 2013-06-25 接受日期: 2013-08-15

国家自然科学基金(批准号: 20876027、21176046)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: 0411-87656430, E-mail: zsb@dlnu.edu.cn

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

Received: June 25, 2013 Accepted: August 15, 2013

\*Corresponding author. Tel: +86-411-87656430, E-mail: zsb@dlnu.edu.cn

网络出版时间: 2013-09-25 11:32 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130925.1132.002.html>

基因片段的生物活性,而且操作简单,重复性好,是一种有临床应用潜力的抗肿瘤药物递药系统之一<sup>[1]</sup>。Lipofectamine 2000是一种常用的阳离子脂质体转染试剂,它由几种阳离子类脂组成,在多种细胞系中具有极高的转染效率和较高水平的重组蛋白表达,在转染肿瘤细胞的研究中已有很多报道<sup>[2-4]</sup>。DOTAP是由单阳离子-N,N,N-三甲胺丙烷甲基硫酸盐以1 mg/mL的浓度在无菌水中制备而成的,是典型的商品化阳离子类脂,其三维结构模型如图1所示。DOTAP转染DNA包括酵母人工染色体,在有血清的情况下,均可稳定地表达基因。另外, DOTAP还适合转染寡核苷酸、核酸、核苷酸、核糖体蛋白复合物和蛋白质。大多数情况下,在无血清条件下能得到较高的转染率。因此,人们常用它们作为对照转染试剂应用于体内和体外,大大降低了实验成本。

本文研究了阳离子脂质体Lipofectamine 2000、DOTAP的尺寸、形态、结构及与DNA在不同比例下结合形成复合物,对Hep-2和NCI-H460细胞的转染效率及毒性的影响,优化两种试剂的使用条件,考察细胞种类对两种脂质体基因转染效率的影响。通过本研究,可为转染肿瘤细胞载体的选择提供依据,为阳离子类脂的合成及生物学评价实验提供依据和理论参考,并进一步挖掘常用转染试剂的应用潜力。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 细胞株及培养方法 人喉癌上皮细胞Hep-2、人肺癌细胞NCI-H460(中国科学院上海生命科学研究院细胞库)分别培养于含10%胎牛血清、100  $\mu$ mL青霉素、100  $\mu$ g/mL链霉素的DMEM及1640培养液中,在37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养,每1~2天更换一次培养液。

1.1.2 主要试剂与仪器 Lipofectamine 2000(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, 美国Clontech公司); 质粒pGL3(含荧光素酶基因, 美国Clontech公司); MTT(美国Sigma公司); Opti-DMEM培养基、1640培养基(美国Gibico公司); 胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司); 超纯水(MiliQ); 倒置荧光显微镜(Olympus IX71, 日本Olympus); 酶标仪(Sunrise Tecan, 澳大利亚); 二氧化碳培养箱(Thermo, 美国); 携Zeta电位测定与纳米激光散射粒度分布仪(HORIBASZ-100, 日本HORIBA公司); 高解析穿透式电子显微镜(JEM-2100, 日本JEOL公司); 高压蒸汽灭菌锅(MLS-3750, 日本三洋公司)。

### 1.2 穿透式电子显微镜检测

阳离子脂质体超声10 min, 400目碳膜铜网吸附脂质体20~30 min, 滴上2%磷钨酸染色30 s, 干燥后在透射电镜下观测并照相, 加速电压200 kV, 检测最小物镜光阑孔为20~30  $\mu$ m, 倍数为30 K。

### 1.3 粒径、Zeta电位检测

阳离子脂质体平均粒径和Zeta电位测定通过携Zeta电位测定与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  $\mu$ L脂质体样品。检测条件为: 氩-氦激光波长630 nm。每个样品测量重复3次。

### 1.4 转染绿色荧光蛋白基因, 定性检测转染效果

将Hep-2细胞种植于96孔细胞培养板中, 每孔加DMEM细胞培养液(含双抗和血清)100  $\mu$ L, 浓度约为 $1.0 \times 10^5$ /孔。将细胞放置在37  $^{\circ}$ 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培养基(无血清)清

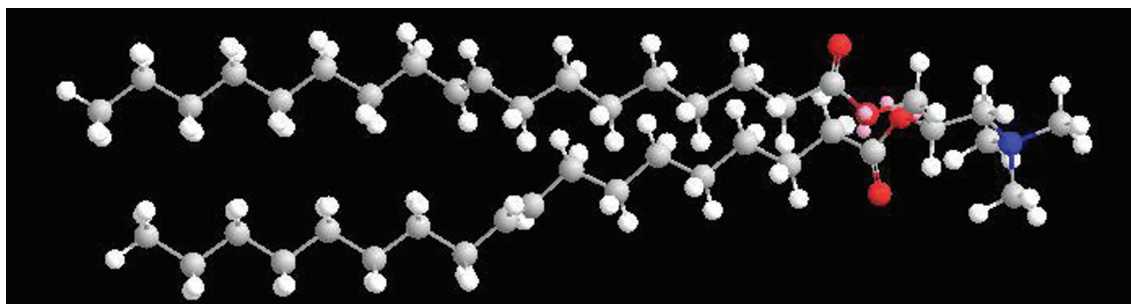


图1 DOTAP的三维结构模型

Fig.1 Structures of DOTAP at minimum energy states (ball and stick models)

洗, 再用等量DMEM培养基(无血清)替换。将酶切质粒0.3  $\mu\text{g}$  DNA(pGFP-N2)及相应比例脂质体分别稀释于25  $\mu\text{L}$  DMEM中, 将脂质体稀释液滴加到质粒稀释液中, 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>[5-6]</sup>。将脂质体/DNA复合物50  $\mu\text{L}$ 加到每孔中, 摇动培养板, 轻轻混匀。在37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%的 $\text{CO}_2$ (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>[7-8]</sup>。利用细胞百分比评估转染效率, 每孔找出3个代表性的视野进行观察计数, 观察倍数200 $\times$ 。

### 1.5 转染荧光素酶报告基因, 定量检测转染效果

转染后将细胞用DPBS洗1次, 每孔加入600  $\mu\text{L}$ 裂解液, 20 min后移至96孔白板中, 每孔加20  $\mu\text{L}$ , 再加80  $\mu\text{L}$ 普洛麦格E151A检测液。使用Bright-Glo荧光素酶评价体系(Promega公司), 利用Synergy 2多功能酶标仪(BioTek)检测相对酶活力。以热电公司的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  $\mu\text{L}$ 加到每孔中, 取裂解液5  $\mu\text{L}$ 加到96孔透明板中(平底), 37  $^{\circ}\text{C}$ 孵育20 min。使用酶标仪在570 nm下分析蛋白含量。蛋白质测定后, 转染效率可表示为:

$\text{RLU}/\text{mg}$ 蛋白。

### 1.6 阳离子脂质体的细胞毒性检测

采用MTT法测定Hep-2细胞存活率<sup>[9]</sup>。将复合物加入细胞中, 置于37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ (培养箱)中培养24 h。每孔加入5 mg/mL MTT 20  $\mu\text{L}$ , 于37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ (培养箱)中培养4 h, 弃去培养液, 加入150  $\mu\text{L}$  DMSO溶解细胞, 用酶标仪测定 $D_{570}$ 。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。

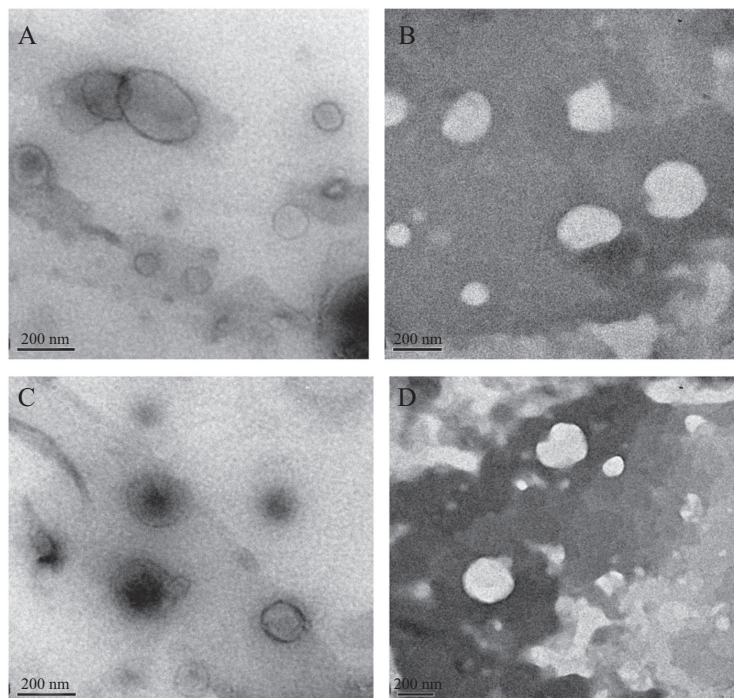
## 2 结果

### 2.1 DOTAP和Lipofectamine 2000的尺寸、Zeta电位

本文使用激光粒度仪测定了脂质体及脂质体/DNA复合物的粒径和Zeta电位, 结果显示两种脂质体的平均粒径都在100~120 nm之间, 尺寸及Zeta电位见表1。由表1可知, DOTAP的平均粒径要比Lipofectamine 2000小, 所带正电荷数多。当两种脂质体与DNA结合形成复合物后, 粒径均增大, Zeta电位值降低。

### 2.2 DOTAP和Lipofectamine 2000透射电镜检测

本论文采用负染色透射电子显微镜法对阳离子脂质体Lipofectamine 2000和DOTAP进行形态研究, 从而可以获得脂质体粒子的微观信息。结果如图2



A: Lipo2000; B: DOTAP; C: Lipo2000/DNA; D: DOTAP/DNA. 100 kV.

图2 脂质体Lipofectamine 2000和DOTAP的透射电镜图

Fig.2 TEM images of Lipofectamine 2000 and DOTAP liposomes



表1 脂质体及复合体粒径和Zeta电位  
Table 1 Particle size and Zeta potential of cationic liposomes and lipoplexes

脂质体(复合物)	平均粒径(nm)	分散度	Zeta电位(mV)
Liposomes(lipoplexes)	Z-average(nm)	PDI	Zeta potential(mV)
Lipofectamine 2000	121.1	0.306	46.4
Lipo2000/DNA	200.4	0.467	5.2
DOTAP	94.2	0.242	56.0
DOTAP/DNA	189.4	0.365	10.7

所示, 脂质体溶液经磷钨酸负染色后在电镜下观察, 可以观察到两种脂质体均基本为球形, 粒径有一定的分布。两类脂质体与DNA结合形成复合物后, 尺寸均变大。

### 2.3 脂质体/DNA结合比例对Hep-2细胞转染效率的影响

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(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。选取脂质体/DNA(N/P)比例分别为 1:1、2:1、3:1、4:1、6:1和8:1, 转染Hep-2细胞, 48 h后检测绿色荧光蛋白(图3)。Lipofectamine 2000的转染效率要高于DOTAP。N/P $\leq$ 4:1时, 两种脂质体转染效率随N/P的增加而提高, 当N/P $>$ 4:1时, 转染效率逐渐降低。当N/P为3:1、4:1时, 转染达到最高转染效率。

### 2.4 荧光素酶报告基因的定量检测

采用荧光素酶质粒pGL3进行荧光素酶报告基因的定量检测。选取脂质体/DNA(N/P)比例为3:1, 转染Hep-2和NCI-H460细胞, 48 h后检测细胞总蛋白含量和荧光发光强度, 转染效率表示为: RLU/mg蛋白。由图4可知, Lipofectamin 2000对两种细胞的转染效率高于DOTAP, 两种脂质体对Hep-2细胞转染效果要好于NCI-H460。

### 2.5 细胞毒性实验

阳离子脂质体由于能和细胞表面带负电的多糖

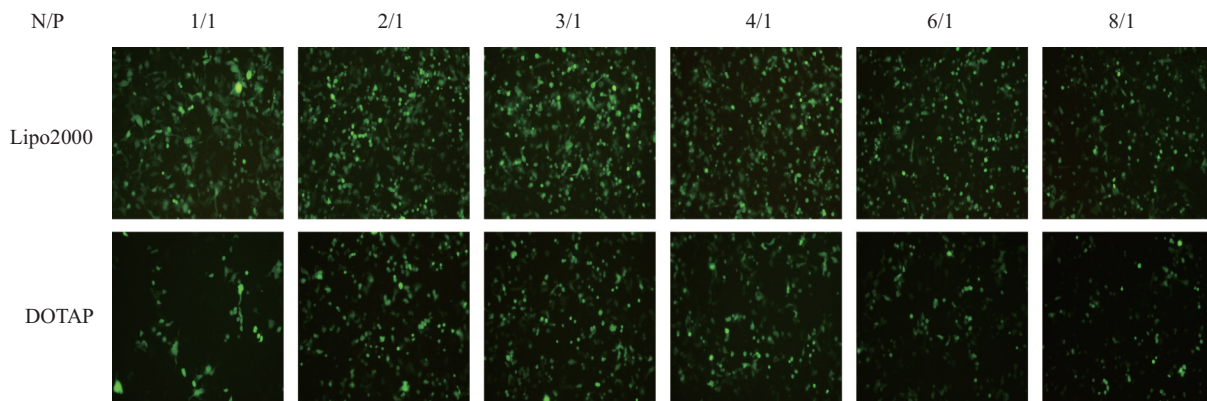


图3 脂质体Lipofectamine 2000和DOTAP转染Hep-2细胞绿色荧光图(200 $\times$ )

Fig.3 Fluorescence microscopic images of GFP expression in Hep-2 cells using Lipofectamine 2000 and DOTAP (200 $\times$ )

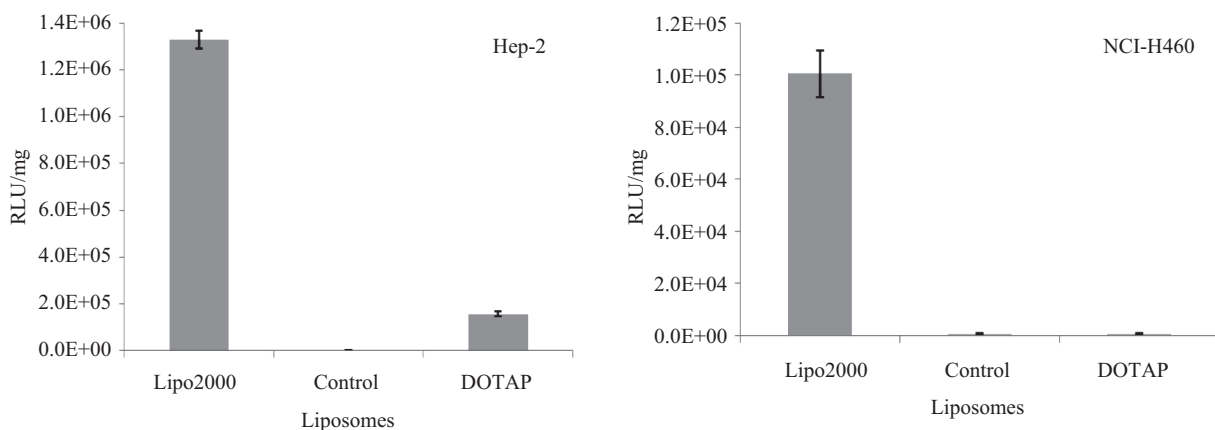
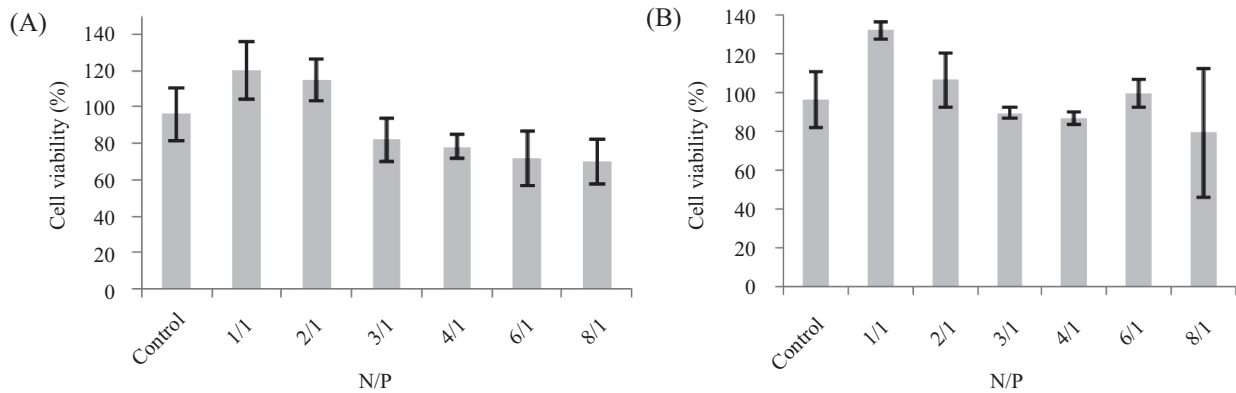


图4 脂质体DOTAP和Lipofectamine 2000转染Hep-2、NCI-H460细胞荧光素酶表达(N/P=3/1)

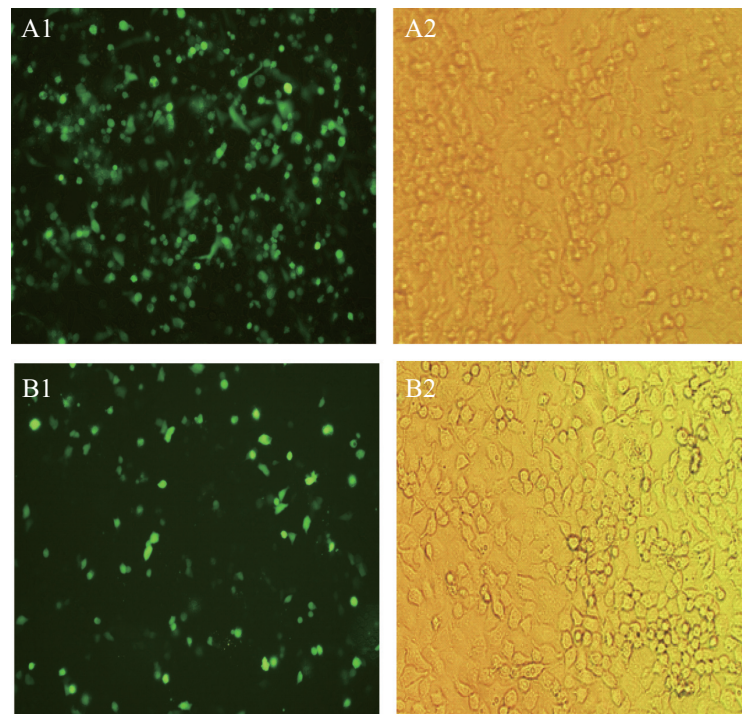
Fig. 4 Luciferase expression in Hep-2 and NCI-H460 cells in the presence of DOTAP and Lipofectamine 2000 at an N/P weight ratio of 3:1



A: Lipofectamine 2000; B: DOTAP.

图5 脂质体Lipofectamine 2000和DOTAP对Hep-2细胞毒性

Fig.5 Cytotoxicity of the Lipofectamine 2000 and DOTAP against Hep-2 cells



A1: Hep-2细胞绿色荧光图; A2: Hep-2细胞状态图; B1: NCI-H460细胞绿色荧光图; B2: NCI-H460细胞状态图。

A1: green photofluorogram of Hep-2 cells; A2: cell morphology of Hep-2; B1: green photofluorogram of NCI-H460 cells; B2: cell morphology of NCI-H460.

图6 细胞种类对脂质体Lipofectamine 2000 转染效率的影响

Fig.6 The influence of cell types on transfection efficiency of Lipofectamine 2000

蛋白质复合物发生静电作用, 因此常会引起细胞膜的毒性。为此采用MTT法测定了不同N/P的复合物对Hep-2细胞的毒性(图5)。结果表明, 随着N/P增加, 细胞毒性增大。在 $N/P \leq 2/1$ 时, 两种脂质体对Hep-2细胞几乎无毒性, 在 $N/P > 2/1$ 时, 两种脂质体对Hep-2细胞具有一定毒性, 细胞存活率能达到80%以下。

## 2.6 细胞株种类对转染效率的影响

转染细胞的种类会影响到阳离子脂质体基因

转染效率, 为了进一步证明Lipofectamine 2000的转染效果, 本实验选取转染的N/P为3/1, 通过Hep-2和NCI-H460两种细胞对其进行了检测。图6所示为转染48 h后倒置荧光显微镜下观察到的绿色荧光蛋白及细胞状态照片。由图6可知, 脂质体Lipofectamine2000对Hep-2细胞转染效率高于NCI-H460细胞, 两种细胞转染后的状态均未发生明显改变。

### 3 讨论

阳离子类脂与DNA的相对比例决定了复合物的性质,即大小、表面电荷(Zeta电位)、复合的功效、胶态稳定性与生物学活性。最近的研究表明,带较多正电荷(即阳离子类脂与DNA的相对比例大)的复合物具有均匀的粒度分布,平均直径为100~450 nm<sup>[10]</sup>,在此种复合物中DNA被完全压缩。Lee等<sup>[11]</sup>对不同摩尔比的阳离子脂质体/DNA对基因转染效率的影响作了较详细的研究,认为不同的阳离子脂质体有其最佳的DNA结合摩尔比。本研究表明,当阳离子脂质体与DNA在2:1~4:1时结合形成复合物,核酸转运的效果最佳。

脂质体在介导基因转染时的细胞毒性通常与脂质体/DNA复合物的正电性及使用剂量相关,电荷比高的往往也会增大各类细胞的毒性<sup>[12]</sup>。另外,脂质体的细胞毒性很大程度上也取决于复合物的尺寸大小以及复合物表面的Zeta电位高低,复合物的尺寸大以及Zeta电位高都会增大其细胞毒性<sup>[13]</sup>。本研究显示,脂质体Lipofectamine 2000和DOTAP均能有效地转染Hep-2细胞及NCI-H460细胞,细胞存活率可达80%以上, DOTAP的细胞毒性比Lipofectamine 2000更低。

转染细胞的种类会影响到阳离子脂质体介导的基因转染效率,但引起这种影响的原因目前并不清楚。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>[14]</sup>。对同一细胞来说, Lipofectamine 2000的转染效率明显优于DOTAP,这两种转染试剂性质的差异是由其结构的不同决定的。Lipofectamine 2000作为混合型阳离子脂质体,分子中正电荷密度相对DOTAP较高,因而与DNA结合能力较DOTAP强,能较多地结合DNA,形成的复合物有利于细胞的吸收从而表现出较高的转染效率。

综上所述,通过优化转染条件,两类阳离子脂质体转染肿瘤细胞均可以得到较高的转染效率,但两类试剂各有优缺点,相对来讲, Lipofectamine 2000试剂对多数细胞转染效率较高,但由于细胞种类对脂质体的特殊选择性, DOTAP试剂仍有较好的应用

前景。本研究可为转染肿瘤细胞载体的选择提供依据,为阳离子类脂的合成及生物学评价实验提供依据和理论参考,并进一步挖掘常用转染试剂的应用潜力。

### 参考文献 (References)

- 姜云霞,王冰,崔韶晖,赵轶男,杨宝灵,段艳,等. 阳离子脂质体基因载体的细胞转染研究. 安徽农业科学(Jiang Yunxia, Wang Bing, Cui Shaohui, Zhao Yinan, Yang Baoling, Duan Yan, *et al.* Study on the cell transfection of the cationic liposomes gene carrier. Journal of Anhui Agri Sci) 2009; 37(17): 7862-4.
- 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.
- Jiang M, Gan L, Zhu C, Dong Y, Liu J, Gan Y. Cationic core-shell liponanoparticles for ocular gene delivery. Biomaterials 2012; 33(30): 7621-30.
- McGregor C, Perrin C, Monck M, Camilleri P, Kirby AJ. Rational approaches to the design of cationic Gemini surfactants for gene delivery. J Am Chem Soc 2001; 123(26): 6215-20.
- Obata Y, Suzuki D, Takeoka S. Evaluation of cationic assemblies constructed with amino acid based lipids for plasmid DNA delivery. Bioconjug Chem 2008; 19(5): 1055-63.
- Wang B, Zhang S, Cui S, Yang B, Zhao Y, Hao X, *et al.* Chitosan enhanced gene delivery of cationic liposomes via non-covalent conjugation. Biotechnol Lett 2012; 34(1): 19-28.
- Zhang S, Zhao B, Jiang H, Wang B, Ma B. Cationic lipids and polymers mediated vectors for delivery of siRNA. J Control Release 2007; 123(1): 1-10.
- Li J, Yang Y, Huang L. Calcium phosphate nanoparticles with an asymmetric lipid bilayer coating for siRNA delivery to the tumor. J Control Release 2012; 158(1): 108-14.
- 翟昌宝,沈如凌,胡晓珺,徐殿胜,费俭,王庆诚. 豹蛙核酸酶与斑蝥酸钠对肺癌细胞增殖的协同抑制作用. 中国细胞生物学学报(Zhai Changbao, Shen Ruling, Hu Xiaojun, Xu Dian-sheng, Fei Jian, Wang Qingcheng. Synergistic inhibition effect of onconase and sodium cantharidate on the growth of human lung adenocarcinoma cells. Chinese Journal of Cell Biology) 2013; 35(3): 328-33.
- Zhang S, Zhi D, Huang L. Lipid-based vectors for siRNA delivery. J Drug Target 2012; 20(9): 724-35.
- Lee ER, Marshall J, Siegel CS, Jiang C, Yew NS, Nichols MR, *et al.* Detailed analysis of structures and formulations of cationic lipids for efficient gene transfer to the lung. Hum Gene Ther 1996; 7(14): 1701-17.
- Dass CR. Vehicles for oligonucleotide delivery: Therapeutic applicability against tumors. J Pharm Pharmacol 2002; 54(1): 3-27.
- Friend DS, Papahadjopoulos D, Debs RJ. Endocytosis and intracellular processing accompanying transfection mediated by cationic liposomes. Biochim Biophys Acta 1996; 1278(1): 41-50.
- Prasad TK, Rangaraj N, Rao NM. Quantitative aspects of endocytic activity in lipid-mediated transfections. FEBS Lett 2005; 579(12): 2635-42.