文章编号:1000-5404(2005)02-0139-04

论著

新型阳离子脂质体的制备及其转染效率的测定

雷 撼,钱桂生,吴国明,黄桂君 (第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究所重点实验室,重庆 400037)

提 要: 目的 制备以新型细胞转染素为阳性成分的阳离子脂质体,作为基因载体,用于基因转染的实验研究和肺部疾病的基因治疗。**方法** 用薄膜法制备 N^4-精胺胆固醇羰酰氨阳离子脂质体,通过电镜观察和电泳,检测其形态、结构和细胞转染条件,并对 SPC 肿瘤细胞进行转染,评估其转染效率。**结果** 制备的新型阳离子脂质体具有良好的微囊形态,当脂质体:质粒为(6~8):1 时,其转染效率可达 60%。**结论** 成功制备了新型阳离子脂质体,在适当条件下其具有较高的转染活性,为以后的基因转染和基因治疗打下基础。

关键词: N^4-精氨胆固醇羰酰氨;阳离子脂质体;细胞转染素;基因转染;基因载体
中图法分类号: O621.3; R394-3; R914 **文献标识码**: A

Preparation of a new cationic liposome and determination of its gene transfection rate

LEI Han, QIAN Gui-sheng, WU Guo-ming, HUANG Gui-jun (Institute of Respiratory Diseases of PLA, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To preparation a new cationic liposome of which the positive component is a new cytofectin as a gene delivery vehicle for laboratory research of gene transfection and gene therapy in lung diseases. **Methods** The new cationic liposome was prepared by film. Electron microscopy and gel electrophoresis were employed to define the condition for transfection. The prepared cationic liposome was used in the transfection of a fluorescence plasmid to lung cancer cell line SPC and the rate of the transfection was evaluated. **Results** The prepared new cationic liposome was global microcapsule in size of 100 nm – 1 μm. The highest transfection rate of 60% was attained when the liposome was in a ratio of (6 – 8):1 with plasmid. **Conclusion** The new cationic liposome is prepared with cytofectin N^4-spermine cholesteryl carbamate as its positive component, and sound transfection activity is observed under a certain circumstance. It provides a basis for gene transfection and gene therapy.

Key words: N^4-spermine cholesteryl carbamate; cationic liposome; cytofectin; gene delivery vehicle; gene transfection

基因治疗面临的首要技术问题是基因的载体,目前用于基因治疗的载体主要分为 2 大类:病毒载体和非病毒载体。非病毒载体中最具典型的是阳离子脂质体(cationic liposome)载体,它具有可自然降解、无免疫原性、可重复转染等优点,在介导基因转染上具有广阔的发展空间和前景,被称为基因治疗领域内最有希望的基因转染载体。阳离子脂质体通常是由一个单一的阳离子两亲化合物和一个中性脂质组成,前者又称为细胞转染素(cytofectin),一般由带有一个或数个氨基的长链亲水基团(带正电)与疏水基团组成[1,2]。随着对阳离子脂质体研究的进一步深入,人们发现细胞转染素的结构和种类,它与中性脂质混合构成阳离子脂质体的组合方式、脂质体与质粒的比例等,都对脂质体介导的基因转染效率有着非常重要的影响[3]。

为此,我们在化学合成新型细胞转染素——N^4-精胺胆固醇羰酰氨的基础上[4],通过薄膜法制备以其为阳性成分的阳离子脂质体,对新型阳离子脂质体的形态、结构、细胞转染条件以及转染效率进行初步的检测和评估,从实验应用方面进一步验证所合成物质的性质及功能,为以后的基因转染研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 质粒、细胞株 人肺腺癌细胞 SPC 为我所保存细胞

基金项目:重庆市科委基金资助项目(990247)
Supported by the Research Foundation of Scientific Committee of Chongqing (990247)

作者简介:雷 撼(1965-),男,重庆市人,博士,主治医师,讲师,主要从事基因转染方面的研究。现在上海浦东东方医院呼吸科工作,电话:(021)58446069

收稿日期:2004-01-25;修回日期:2004-03-20

株;增强型绿色荧光蛋白基因(enhance green fluorescent protein, EGFP)的真核表达重组载体 pIRES2-EGFP-MyoD 由第三军医大学西南医院血液科张勇博士惠赠。

1.1.2 主要试剂 细胞转染素 N^4-精胺胆固醇羰酰氨为前期合成,二油酰磷脂酰乙醇胺(dioleoylphosphatidylethanolamine, DOPE)为 Fluka 公司产品;PRMI 1640 培养基、小牛血清购于 hyclone 公司,胰蛋白酶、琼脂糖、酵母提取物、胰蛋白胨购于加拿大 Sangon;饱和酚、氯仿、SDS、LiCl 等试剂均为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 阳离子脂质体的制备[5,6] 在聚苯乙烯管中用氯仿溶解 N^4-精胺胆固醇羰酰氨,加入相应体积的 DOPE,室温下混匀,构成 1:2 摩尔比的混合体,除去氯仿,无菌条件下按 1、0.5、0.25、0.2 mg/ml 的浓度加入消毒去离子水,室温放置 10~20 min,旋涡振荡器振荡 10 min,再用超声振荡仪超声处理 30 min。

1.2.2 脂质体的电镜观察 取不同浓度的阳离子脂质体悬液滴于 200 目铜网上,10 min 后吸去上清,2%磷钨酸染色后透射电镜观察。

1.2.3 脂质体与质粒比例的确定[7] 取聚苯乙烯管 6 个,各加入 pIRES2-EGFP-MyoD 重组荧光质粒 5 μg,按阳离子脂质体:质粒(质量比)为 1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1,依次加入已制好的阳离子脂质体水悬液,混匀后室温放置 15 min 以上,行 1%琼脂糖凝胶电泳。

1.2.4 SPC 细胞株的培养 SPC 细胞用含 10%小牛血清的 1640 培养基培养,无菌条件下移入 100 ml 的培养瓶中,CO_2 浓度 5%,温度 37 ℃。倒置显微镜下观察细胞铺满瓶底后,用 37 ℃预温的 0.25%的胰蛋白消化,加入含 10%小牛血清的 1640 培养基反复吹打,制成细胞悬液。等量移入放有盖玻片的无菌六孔板中,每个培养孔中加入 1×10^5 个,5% CO_2、37 ℃条件下过夜培养,换液去掉悬浮细胞,3~4 d 换液 1 次,当其融合至 60~80%时进行基因转染。

1.2.5 基因转染[8] 取聚苯乙烯管 12 只,依次编号,先各加入 Opti-MEM 1 ml,然后按不同比例(表 1),分别先后加入质粒 DNA 和阳离子脂质体,充分混匀,置室温 15~30 min。

表 1 各转染液中脂质体/质粒的不同比例

Tab 1 Different proportions of cationic liposome with plasmid in transfection liquor

Number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Liposome (μg)	10	15	20	25	30	35	40	45	50	0	25	0
Plasmid (μg)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	0

将六孔板培养皿中上清弃掉,并用 Opti-MEM 洗涤 1 次,吸尽洗液,按编号依次将转染液加入相应培养皿中,5% CO_2、37 ℃条件下反应 5 h。吸尽转染液,加入含 20%小牛血清的 PRMI 1640 培养基 2 ml,5% CO_2、37 ℃条件下继续培养 48 h。

1.2.6 转染效率的测定 取出盖玻片,Opti-MEM 洗 1 次,置于载玻片上,在荧光显微镜下观察 EGFP 的绿色荧光并计数发荧光细胞数量,除以普通光学显微镜下相同视野的细胞数量,即得转染效率。

$$转染效率=\frac{计数发荧光细胞的数量}{相同视野下的细胞数量}\times100\%$$

2 结果

2.1 阳离子脂质体的制备

分别溶于氯仿中的 N^4-精胺胆固醇羰酰氨和 DOPE 均为无色溶液,将两者按 1:2 摩尔比进行混合,真空抽吸 2 h 后溶剂消失,可见在管壁上出现一层透明薄膜。然后加水水化,经旋涡振荡和超声水浴处理后薄膜消失,溶液呈微浊的悬浮液,根据制备的脂质体水悬浮液浓度的不同,混浊度也不同,浓度高的较为混浊,1 mg/ml 的样本中有很少的微小颗粒。

2.2 电镜观察

电镜下显示,经处理的阳离子脂质体为微囊泡结构,多为圆形或椭圆形,也有形状不规则,以单层膜为主,大小在 100 nm 至 1.0 μm,以 200~500 nm 占多数;当脂质体浓度在 0.25 mg/ml 左右时,形态及大小较为规则、均匀,与文献报道相符,具有阳离子脂质体的结构形态(图 1)。但随着浓度越高,则呈网片样等不规则形状的结构越多(图 2)。

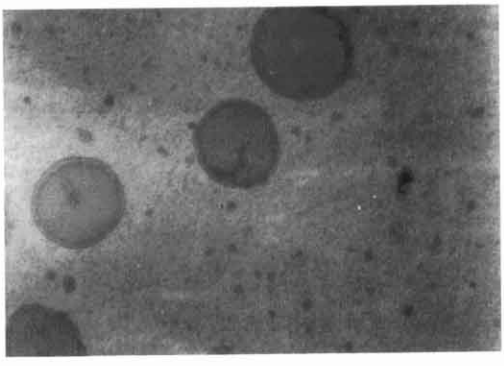


图 1 阳离子脂质体呈微囊泡结构,多为圆形或椭圆形,以单层膜为主 (TEM ×27 000)

Fig 1 Vesiculate cationic liposome in round or oval form, mainly single membrane (TEM ×27 000)

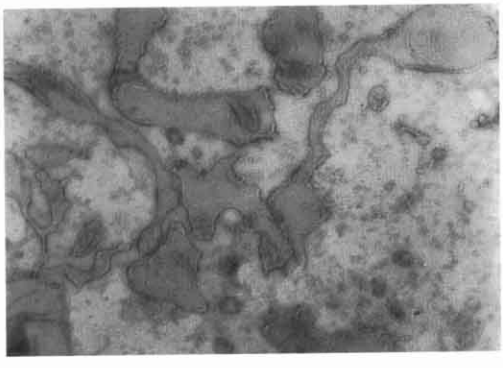


图 2 阳离子脂质体浓度为 1 mg/ml 时,其结构形态呈网片样等不规则形 (TEM×20 000)

Fig 2 Cationic liposome showed erose form when the concentration of cationic liposome was 1 mg/ml (TEM×20 000)

2.3　脂质体/质粒复合体的构成

不同比率脂质体/质粒复合体的凝胶电泳结果显示，在脂质体:质粒为 1:1 ~ 4:1 时，质粒条带几乎在同一位置；当比例为 5:1 时，质粒条带明显后移，比例大于 6:1 时则无条带出现（图 3）。说明新合成的细胞转染素以及由其制备的阳离子脂质体具有阳性电荷，对质粒的迁移有影响，在质量比为 6:1 左右时可完全中和质粒 DNA 的负电荷。



1 - 6: The proportions of liposome with plasmid: 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, and 6:1

图 3　不同比例脂质体/质粒复合体电泳图

Fig 3　Electrophoretic results of compound of liposome with plasmid in different proportions

2.4　新型阳离子脂质体转染效率的测定

不同比率脂质体与质粒混合物对 SPC 细胞进行转染，48 h 后荧光显微镜下观察到细胞胞体内有绿色荧光出现（图 4）。第 4 和第 5 组[比例(6 ~ 8):1]中发荧光细胞较多，表明新型的阳离子脂质体具有转染活性，pIRES2-EGFP-MyoD 质粒被转进 SPC 细胞并获得表达。以第 4 和第 5 组为标准，随机计数 5 个视野下 751 个细胞，有 457 个细胞发荧光，其转染效率为 60.5%。

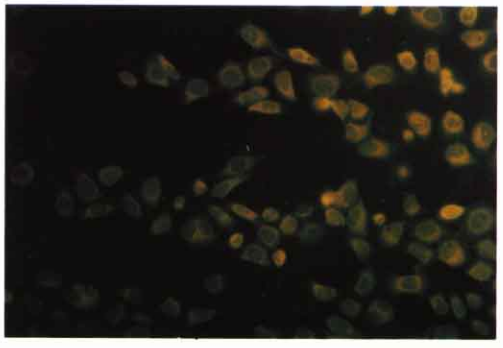


图 4　转染荧光质粒的 SPC 细胞，48 h 后细胞胞体内有绿色荧光出现　（×200）

Fig 4　Appearance of green fluorescence in SPC cells at 48 h after transfection　（×200）

3　讨论

阳离子脂质体作为转染载体，是通过静电作用与目的基因相结合，具有可携带的外源基因容量大、构成成分是天然磷脂或人工合成的类磷脂而不含抗原成份、可被机体降解并能多次反复转染的特点，因此成为一种有临床应用潜力的基因转染载体。阳离子脂质体虽然具有明显的基因转染功能，但其也有很多不确定性，在不同细胞、不同时间、不同结构及比例等方面，可获得不同的转染效果，说明阳离子脂质体介导的基因转移受诸多因素的影响[3]。因此在获得新型细胞转染素后，需要对阳离子脂质体的制备、基因转染的条件等进行进一步摸索，以求获得最佳结果。

大多数阳离子脂质体是由细胞转染素和一种中性磷脂或其他兼性辅助脂如 DOPE、二油酰磷脂酰胆碱、胆固醇等组成，中性磷脂起到稳定脂质双分子层膜和降低阳性成分毒性的作用，同时提供细胞转染素的细胞渗透功能。DOPE 是应用最广泛的中性磷脂，它具有很强的细胞膜去稳定化作用，并可通过促进核内体释放质粒 DNA 来提高外源基因的表达，因此 DOPE 的加入对细胞转染素的转染活性具有重要意义。实验中我们参照文献[9]报道，将 N^4-精胺胆固醇羰酰氨和 DOPE 按 1:2 摩尔比混合，除去溶剂后可见有薄膜形成，此后应继续真空抽吸，以使溶剂排除完全，避免对转染细胞产生毒性。在制成不同浓度的脂质体水溶液中，由于脂类是不溶于水的，因此阳离子脂质体经涡旋振荡和超声振荡作用后成为颗粒样囊泡悬浮于水中，形成外观上略呈乳状浑浊的悬浮液，并随着浓度升高而浑浊加深。电镜观察显示制备的阳离子脂质体呈粒径 0.1 ~ 1.0 μm 圆形或椭圆型的小囊泡形态，表明制备方法和过程正确，进一步证实以新合成的细胞转染素为阳性成分的脂质体转染体系制备成功。对不同浓度脂质体悬液的电镜观察发现，浓度在 0.25 mg/ml 左右时，脂质体微囊的形态及大小较为规则均匀，说明适当浓度的脂质体悬液有助于脂质体微囊泡结构的形成。

在诸多影响因素中，阳离子脂质体与质粒的比例是影响基因转染率的重要因素之一。进行转染时将两者混合，阳离子脂质体表面的正电荷与 DNA 磷酸盐骨架的负电荷通过静电作用结合，形成脂质体/质粒复合体，在复合体中 DNA 被压缩包进脂质体囊泡中，这利于其被细胞摄取并免于核酸酶的降解。有研究显示阳离子脂质体与质粒的不同比例（实际是电荷比）对脂质体/质粒复合体的大小和形态有影响，并进一步影响到基因的转染效率，当质粒/脂质复合体中阳离子脂质体的正电荷与核酸的负电荷在 1:1 或以上时，核酸转运的效果最佳[10]。因此，当两者比率相等即电荷比为 1:1时，DNA 的负电荷就被中和，在琼脂糖凝胶电泳中则表现为 DNA 的零迁移率，这样可为基因转染实验提

供比例范围。本研究的结果显示，两者在质量比为6:1时，质粒电泳无迁移，表明此时两者的电荷比在1左右，因此在进行细胞转染时应将脂质体与质粒的质量比定为6:1左右。而随后进行的基因转染的实验也证明了这一点，当脂质体:质粒在(6～8):1时转染效率最高。

转染细胞的种类以及细胞本身的生理状态会影响到阳性脂质体介导的基因转染率[11]，研究表明，细胞群体倍增时间越短，细胞分裂越快，则脂质体/质粒复合物越易进入细胞，基因转染效率就越高，因此我们选择肺腺癌细胞株SPC细胞作为实验中的转染细胞。

近年来，报告基因广泛的用于分子生物学的研究中[12]，如β-半乳糖苷酶基因、β-葡萄糖苷酸酶基因、氯霉素酰基转移酶基因等。EGFP基因是报告基因家族中的新成员，它不同于以往常用的其他报告基因，无需反应底物与辅助因子，其表达的绿色荧光蛋白能够自身催化形成发光结构，并在蓝色激发光下发出绿色荧光，现已证实EGFP基因能够在多种生物，如细菌、粘菌、植物和哺乳动物中表达并发荧光，因此本研究选用此质粒载体作为报告基因。实验结果显示，用EGFP基因对SPC细胞进行转染后48 h，转染细胞发绿色荧光，以发光较多的第4、5组为对象，细胞发荧光率约为60%，表明新型的阳离子脂质体具有很高的转染效率，这为以后的实验研究提供了一个有效的工具。

参考文献：

[1] Miller A D. Cationic liposomes for gene therapy[J]. Angew Chem Int Ed, 1998, 37(11): 1768－1785.

[2] Canz T, Lehrer R I. Defensins[J]. Curr Opin Immunol, 1994, 6(4): 584－589.

[3] Kim Y J, Kim T W, Chung H, *et al*. The effects of serum on the stability and the transfection activity of the cationic lipid emulsion with various oils [J]. Int J Pharm, 2003, 252(1－2): 241－252.

[4] 雷 撼，吴国明，周向东，等. 新型细胞转染素——N^4-精胺胆固醇羰酰氨的合成[J]. 第三军医大学学报，2003，25(4)：319－321.

[5] Lee E R, Marshall J, Siegel C S, *et al*. Detailed analysis of structures and formulations of cationic lipids for efficient gene transfer to the lung[J]. Hum Gene Ther, 1996, 7(14): 1701－1717.

[6] Persons D A, Allay J A, Allay E R, *et al*. Retroviral-mediated transfer of the green fluorescent protein gene into murine hematopoietic cells facilitates scoring and selection of transduced progenitors *in vitro* and identification of genetically modified cells *in vivo*[J]. Blood, 1997, 90(5): 1777－1786.

[7] Densmore C I, Giddings T H, Waldrep J C, *et al*. Gene transfer by guanidinium-cholesterol: dioleoylphosphatidyl-ethanolamine liposome-DNA complexes in aerosol[J]. J Gene Med, 1999, 1(4): 251－264.

[8] 姜 泊，张亚历，周殿元. 分子生物学常用实验方法[M]. 北京：人民军医出版社，1996. 156－157.

[9] Ghosh Y K, Visweswariah S S, Bhattacharya S. Nature of linkage between the cationic headgroup and cholesteryl skeleton controls gene transfection efficiency[J]. FEBS Lett, 2000, 473(3): 341－344.

[10] Dodds E, Dunckley M G, Naujoks K, *et al*. Lipofection of cultured mouse muscle cells: a direct comparison of lipofectamine and DOSPER [J]. Gene Ther, 1998, 5(4): 542－551.

[11] Son K K, Tkach D, Hall K J, *et al*. Efficient *in vivo* gene delivery by the negatively charged complexes of cationic liposomes and plasmid DNA[J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1468(1－2): 6－10.

[12] 张 峰，任 燕，陆长得. 绿色荧光蛋白及其应用[J]. 生命科学，1999，11(2)：61－65.

(编辑 陈聪连)

关于数字的用法

在各种出版物上数字的用法总的原则是：凡是可以使用阿拉伯数字，而且又很得体的地方均应使用阿拉伯数字。以下两种情况必须使用阿拉伯数字：

1 公历世纪、年代、年、月、日和时刻 例如：公元前5世纪，20世纪90年代，1995年6月8日14时30分。

表示年份要写全称，1995年不能写成95年或'95年；1953－1958年不能写成1953－58年。年月日可以写成1995-06-08。时刻用":"分隔的形式。如：13时45分8秒可以写成13:45:08。

2 计数和计量(整数、小数、分数、百分数、均数)包括序数、编号 4位和4位以上的数字采用三位分节法，不用"千分撇"，节与节之间留半个阿拉伯数字的空隙(如2,431改为2 431)。年份、部分代号、仪器型号等非计量数字不用分节，也不加千分撇。尾数"0"多，5位以上的数字，可以用"万""亿"表示，但不得以十、百、千、百万、十亿等汉字表示，例如3 579 000可写成357.9万但不能写成3百57万千或357万9千。

本刊编辑部