

肝细胞靶向 pH 敏脂质体的制备及性质分析

文思远 王小红 林莉 管伟 王升启*

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 为了制备具有肝细胞特异靶向性和 pH 敏感性的脂质体, 设计并合成了四种带有半乳糖残基的导向分子, 与具有 pH 敏感性的 DC-*chol*/DOPE 混合制备脂质体, 通过质粒转染实验、受体竞争抑制实验和红细胞溶血等实验选出最佳转染活性的十八醇-半乳糖甙 (18-*gal*) 脂质体, 并证明其具有肝细胞特异受体介导的靶向性和 pH 敏感性, 且细胞毒性较小, 可以作为一种潜在的肝细胞靶向转运系统得到进一步发展.

关键词 脂质体, 靶向性, pH 敏感性, 核酸药物, 基因转运

学科分类号 Q503

核酸药物被认为是治疗基因相关疾病^[1,2]的有效途径. 但因其不易被细胞摄取、稳定性差以及缺乏组织特异性等原因, 制约了这项技术的深入研究和实际应用. 脂质体技术是首选的解决方法, 目前的研究致力于在一种脂质体上集成 pH 敏感性和细胞特异的靶向性. 肝细胞特异表达大量高亲和性的去唾液酸糖蛋白受体, 可识别带有半乳糖残基的配体分子并介导其内吞作用^[3~5]. 为了制备具有肝细胞特异靶向性和 pH 敏感性的脂质体, 我们设计并合成了四种带有半乳糖残基的导向分子, 与具有 pH 敏感性的 N, N'-二甲基乙二胺基氨甲酰基胆固醇/二油酰磷脂酰乙醇胺 (DC-*chol*/DOPE) 混合制备脂质体, 通过质粒转染实验、受体竞争抑制实验和红细胞溶血等实验选出最佳转染活性的 18-*gal* 脂质体, 并证明其具有肝细胞特异受体介导的靶向性和 pH 敏感性, 且细胞毒性较小, 可以作为一种潜在的肝细胞靶向转运系统得到进一步发展.

1 材料与方

1.1 材料

氯甲酰胆固醇、二油酰磷脂酰乙醇胺、水解乳糖为 Sigma 公司产品, N, N'-二甲基乙二胺为 Merck 公司产品. DC-*chol* 按照文献 [6] 方法合成. 实验所用各种酶、载体、荧光素酶检测试剂盒、细胞毒性测定试剂盒等均为 Promega 公司产品. 报告基因为荧光素酶基因, 整合在 pHCV-neo4 质粒上, 质粒的构建见文献 [7]. 其他试剂为国产分析纯.

1.2 方法

1.2.1 导向分子的合成: 我们设计合成了四种带

有半乳糖残基的两性分子, 作为脂质体配方中的导向分子. 亲水基是半乳糖、乳糖, 疏水基是十八醇、胆固醇. 糖甙合成按照 Smits 等^[8]及 Lubineu 等^[9]的方法并做了改进. 结构通过元素分析, 核磁共振氢谱及质谱等确证 (数据略).

Table 1 Targeting molecules with galactose residue

Hydrophobic/hydrophilic	Galactose	Lactose
Octodecyl alcohol	Octodecyl galactoside	Octodecyl lactoside
Cholesterol	Cholesteryl galactoside	Cholesteryl lactoside

1.2.2 脂质体的制备: 将 DC-*chol*: DOPE (各 5 mg, 摩尔比为 6:4) 和不同量的导向分子溶于乙醇: 氯仿 (体积比 1:1) 混合溶剂中, 减压旋转蒸发成薄膜, 真空去除残余有机溶剂, 用 10 ml 无菌 PBS 缓冲液 (pH 7.4) 水化、振摇过夜, 混悬液超声 30 min (浴式超声仪), 过聚碳酸酯膜 (孔径 0.4 μm) 除菌并保持粒度均一性, 调整脂质浓度为 1 g/L. 4℃ 保存备用.

1.2.3 转染实验: HepG2 肝癌细胞接种于 96 孔板, 2×10^4 个/孔, 用含 10% 小牛血清 (FBS, 中国医学科学院血液学研究所) 的 DMEM 培养液培养, 24 h 后, 将脂质体与质粒按不同比例混合, 在无血清条件下与细胞共孵育进行转染, 5 h 后换成含 10% FBS 的 DMEM, 继续培养 36 h. 细胞用 PBS 洗两次, 每孔细胞加细胞裂解液 $1 \times 30 \mu\text{l}$, 室

* 通讯联系人.

Tel: 010-66932211, E-mail: sqwang@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 1999-11-04, 接受日期: 2000-01-14

温下裂解 10 min, 加荧光素酶作用底物 100 μ l, 混匀后立即在检测仪 (Wallac 1420 Multilable Counter) 上测 1 s 发光强度. 每个实验做三孔. 导向分析时, 半乳糖溶液在加脂质体前 5 min 加入, 其他操作相同.

1.2.4 红细胞溶血实验: 为检测 pH 敏感性, 将脂质体与鸡红细胞在不同 pH 值条件下混合, 考察细胞膜溶解 (血红素释放) 情况. 实验按文献 [10] 方法并加以改进. 操作程序如下: 按 1.0 pH 值梯度配制 pH 4.0~ 8.0 的 0.1 mol/L PBS 缓冲液. 取 100 μ l PBS 缓冲液, 加入 1% (体积百分比) 新鲜制备的鸡红细胞悬液 100 μ l 和脂质体 20 μ l (10 g/L), 37 $^{\circ}$ C 振摇, 在不同时间点取悬液, 1 000 g 离心, 取上清加到 96 孔板, 在酶标仪 (Multiscan MS) 上测定 A_{540} 值. 同时设置平行对照: 100 μ l PBS 缓冲液+ 100 μ l 1% (体积百分比) RBC+ 20 μ l 生理盐水; 阴性对照: 120 μ l 生理盐水+ 100 μ l 1% (体积百分比) RBC; 阳性对照: 100 μ l 生理盐水+ 100 μ l 1% (体积百分比) RBC + 20 μ l 10% TritonX-100.

1.2.5 细胞毒性实验: 细胞毒性用 MTS 法评价. 细胞接种于 96 孔板, 2×10^4 个/孔, 加入脂质体/DNA 复合物和 100 μ l DMEM 培养液保温 6 h, 加入 MTS [3- (4, 5-二甲基氮唑-2-基) -5- (3-酰甲氧基苯基) -2- (4-磺酰苯基) -2H-四唑内盐] 溶液 (0.5 g/L) 保温 4 h. 37 $^{\circ}$ C 用 10% SDS 溶液裂解过夜, 测定吸收值. 实验组波长 570 nm, 对照组波长 660 nm. 结果显示脂质体在有效转染剂量对细胞毒性较低.

2 结 果

2.1 脂质体转染活性的分析

DC-cho/DOPE 本身可作为一种具有较高转染效率的脂质体, 但缺乏细胞特异的靶向性. 将导向分子与 DC-cho/DOPE 按 1: 10 (质量比) 的比例混合, 制得四种脂质体分别命名为十八醇-半乳糖甙 (18-gal)、胆固醇-半乳糖甙 (chof gal)、十八醇-乳糖甙 (18-lac) 和胆固醇-乳糖甙 (chof lac). 其介导的质粒 DNA 转染活性与未加导向分子的 DC-cho/DOPE 相比, 18-gal 转染活性有明显增加, chof gal 活性与对照相当, 而两种乳糖甙型脂质体的转染活性则有较大幅度下降 (图 1).

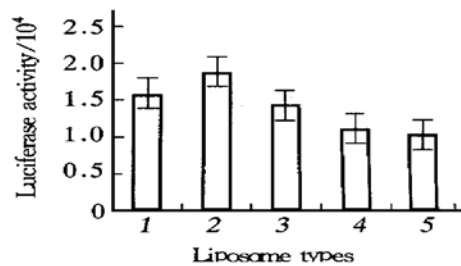


Fig. 1 Effect of targeting molecules on the transfection activity
1: DC-cho; 2: 18-gal; 3: chof gal; 4: 18-lac; 5: chof lac.
 $\bar{x} \pm s, n = 3.$

用 18-gal 继续进行以下实验. 为确定靶向脂质体的最佳转染条件, 改变组成脂质的比例, 发现随着十八醇-半乳糖甙所占比例逐渐增大 (质量百分比 5%、10%、20%、30%、40%、50%), 脂质体的转染活性呈一条钟型曲线 (图 2), 在 20% 左右活性最高. 随着浓度的增加 (20% 以上), 所形成的脂质体外观性状及稳定性差, 胶体溶液易发生凝聚, 形成混浊或沉淀, 转染效率迅速下降. 故靶向分子占 DC-cho/DOPE 的比例最大不宜超过 20%. 将固定量的质粒 DNA (0.2 μ g/孔) 与 5% 的 18-gal 脂质体按照不同比例 (质量比为 1: 2.5、1: 5、1: 10、1: 20) 混合, 发现二者间比例为 1: 5~1: 10 时转染效果最佳 (图 3).

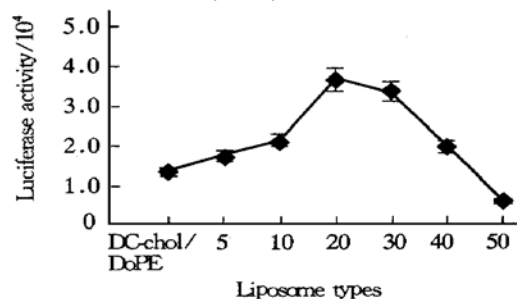


Fig. 2 Effect of on the transfection activity of the different ratios of targeting molecules in liposome composition
 $\bar{x} \pm s, n = 3.$

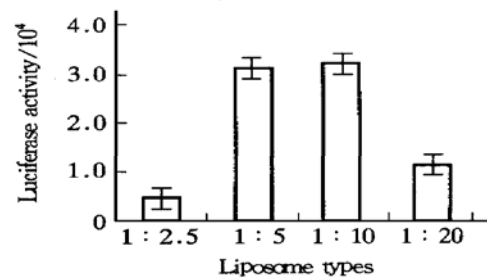


Fig. 3 Transfection activity of DNA/liposome complexes at various ratios (m:m) in HepG2 cells
DNA concentrations was fixed at 0.5 mg/L in all experiments.
 $\bar{x} \pm s, n = 3.$

2.2 脂质体靶向性分析

为检测 18-gal 脂质体的细胞吞噬作用是否为受体介导, 用半乳糖竞争抑制受体, 考察其对转染效率有无影响. 结果显示出不同浓度 (10、20、30 mmol/L) 的半乳糖溶液对 5% 的 18-gal 脂质体的抑制作用 (图 4). 在浓度为 20、30 mmol/L 时有相近的显著的抑制作用, 抑制率达 38% 左右. 用 20 mmol/L 的半乳糖溶液对不同组成配比的靶向脂质体 (靶向分子占 DC-choI/DOPE 的比例分别为 5%、10%、20%) 及 DC-choI/DOPE 进行质粒 DNA 转染抑制实验, 可以看出靶向脂质体的转染效率都被显著抑制, 抑制率分别为 35%、28%、46%, 在靶向分子所占比例高时 (20%), 抑制率最大 (达 46%). 而 DC-choI/DOPE 在有半乳糖溶液存在的情况下转染效率无显著差异 (图 5).

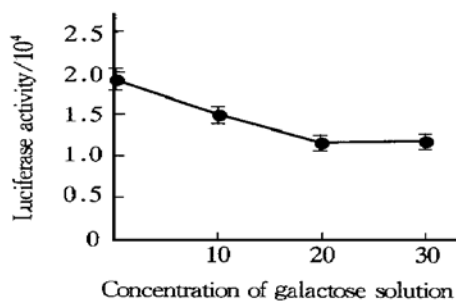


Fig. 4 Effect of the copresence of different concentrations of galactose solution on transfection activity of DNA / liposome complexes
 $\bar{x} \pm s, n = 3.$

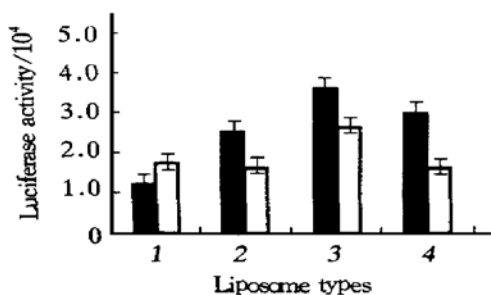


Fig. 5 Effect of the copresence of 20 mmol/L galactose on transfection activity of liposome with different composition 1~4 represent liposomes in which targeting molecule ratio is 0%, 5%, 10%, 20% respectively. ■: galactose absent; □: galactose present.
 $\bar{x} \pm s, n = 3.$

2.3 脂质体的 pH 敏感性分析

四种脂质体在不同 pH 值条件下与鸡红细胞混合, 分别在 1.5 h (图 6a) 和 2.5 h (图 6b) 测定红细胞膜融合 (血红素释放) 情况. 如图 6 所示,

红细胞在不同 pH 值的 PBS 缓冲溶液中释放血红素量并无显著差别, 都与阴性对照相近 (1.5 h, 阴性对照平均值为 0.072; 2.5 h, 阴性对照平均值为 0.103). 而红细胞在不同 pH 条件下与脂质体发生膜融合作用则有显著的 pH 值依赖性. 在 pH=6 前后两段区间内血红素释放量有显著性差异, 在 pH 小于 6 的酸性环境中, 血红素大量释放, 最大值接近阳性对照 (1.5 h, 阳性对照均值为 0.625; 2.5 h, 阳性对照均值为 0.709). 结果表明制得脂质体具有显著的 pH 敏感性, 并且脂质体与细胞膜的作用在一定时间后趋于饱和, 随时间变化不明显.

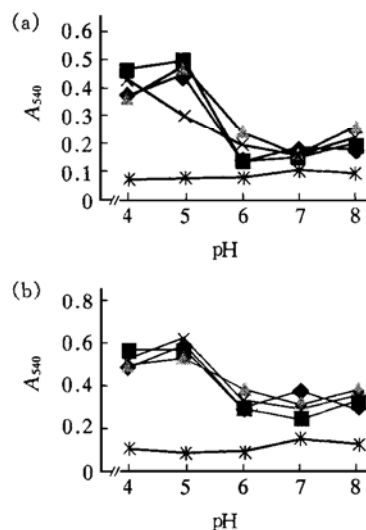


Fig. 6 Confusion with red blood cells of liposomes with different composition at various pH values

Fig(a), (b) represent effects at 1.5, 2.5 hours respectively. Release of heme is distinctly different before and after pH 6. ◆—◆: DC-choI/DOPE 5%; ■—■: DC-choI/DOPE 10%; ▲—▲: DC-choI/DOPE 20%; ×—×: DC-choI/DOPE; *—*: PBS. Each value represents the mean.

3 讨 论

DC-choI/DOPE 是一种具有较高转染效率和低细胞毒性的阳离子型脂质体, 已被应用于反义核酸药物的临床实验阶段^[11]. 为提高其对特异细胞的靶向性, Kawakami 等^[12]证明向脂质体配方中加入肝细胞半乳糖受体特异的导向分子, 可极大增强脂质体对肝细胞的选择性. 本实验所制备的脂质体, 在对肝细胞和肺细胞的转染实验中, 转染效率也表现出很大差异 (数据略).

实验结果表明, 十八醇-半乳糖甙在一定比例内 (低于 20%) 对 DC-choI/DOPE 的转染效率有

显著的促进作用,可能与受体介导的细胞吞噬作用有关.而当半乳糖甙的比例过大(大于20%)或即使用小量乳糖甙(10%)作为成膜材料,所得脂质体转染效率明显降低,外观性状及稳定性差,易出现混浊或沉淀.可能是由于大量电中性的导向分子降低了阳离子脂质的正电荷密度,因而影响阳离子脂质体的转染效率及稳定性;同时,糖甙分子在有机溶剂中溶解性差(乳糖甙溶解时需加热)以及成膜性差,也会在一定程度上影响脂质体的制备及其性质.另外,在脂质体的配方中,DC-cho/DOPE应保持在一定水平,否则也会导致转染效率下降.

一定比例内(小于20%)十八醇-半乳糖甙的加入会大幅度增强脂质体的转染效率(最大可达近3倍),这种效果可能是由于受体介导的细胞吞噬作用引起的.采用受体竞争抑制实验(抑制剂为半乳糖)可证实以上判断.半乳糖溶液对5%的18-gal脂质体有明显的抑制作用,且浓度在20 mmol/L以上时抑制作用达到饱和.用20 mmol/L的半乳糖溶液对不同组成配比的靶向脂质体及DC-cho/DOPE进行质粒DNA转染抑制实验,可以看出靶向脂质体的转染效率都被显著抑制,而DC-cho/DOPE在有半乳糖存在的条件下转染效率略有升高但变化不显著.由以上两个实验结果证明,18-gal脂质体能被肝细胞去唾液酸糖蛋白受体识别并介导其吞噬作用.

较大颗粒被细胞摄取后,进入胞内体,进一步转化生成溶酶体,被其中的多种酶所降解.为防止脂质体及包封的核酸类药物进入溶酶体降解,特针对胞内体内环境pH值逐渐降低的生理过程,选用对pH值变化敏感的成膜材料制备脂质体. DC-cho/DOPE在酸性环境下易与胞内体膜发生融合、破碎,进而促使所包封的核酸类药物释放进入细胞质或细胞核中发挥治疗作用.在红细胞溶血实验中,鸡红细胞在等渗的不同pH值的PBS缓冲液中不发生溶血现象(与阴性对照结果相近).而加入脂质体后,溶血结果有显著的pH依赖性.以pH=6为分界点,在酸性环境中血红素释放的量远大

于在中性或碱性条件下的释放量.表明所制备的脂质体具有显著的pH敏感性.

参 考 文 献

- Alama A, Barbieri F, Cagnoli M, *et al.* Antisense oligonucleotides as therapeutic agents. *Pharmacol Res*, 1997, **36** (3): 171~ 178
- Wagner R W, Flanagan W M. Antisense technology and prospects for therapy of virus infections and cancer. *Mol Med Today*, 1997, **3** (1): 31~ 38
- Wu G Y, Wu C H. Evidence for targeted gene delivery to HepG2 hepatoma cells *in vitro*. *Biochemistry*, 1988, **27** (3): 887~ 892
- Wu G Y, Wu C H. Receptor-mediated *in vivo* gene transformation by a soluble DNA carrier system. *J Biol Chem*, 1987, **262** (10): 4429~ 4432
- Hara T, Aramaki Y, Kawasawa H, *et al.* Effects of fusogenic and DNA-binding amphiphilic compounds on the receptor-mediated gene transfer into the hepatic cell by asialofetuin-labeled liposomes. *Biochim Biophys Acta*, 1996, **1278** (1): 51~ 58
- Gao X, Huang L. A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, **179** (1): 280~ 285
- 王小红, 王升启, 李梦东, 等. HCV5 NCR 转基因细胞模型的建立. *病毒学报*, 1998, **14** (4): 296~ 301
Wang X H, Wang S Q, Li M D, *et al.* *Chin J Virol*, 1998, **14** (4): 296~ 301
- Smits E, Ernberts F N, Kellogg R M, *et al.* Reliable method for the synthesis of aryl β -D-glucopyranosides, using boron trifluoride diethyl ether as catalysts. *J Chem Soc Perkin Trans*, 1996, **1** (24): 2873~ 2877
- Lubineu A, Queneau Y. Aqueous cycloadditions using glucorganic substrates 1. stereochemical course of the reaction. *J Org Chem*, 1987, **52** (6): 1001~ 1009
- Plank C, Oberhauser B, Mechtler K, *et al.* The influence of endosome disruptive peptides on gene transfer using synthetic virus-like gene transfer system. *J Biol Chem*, 1994, **269** (17): 12918 ~ 12924
- Hui K M, Ang P T, Huang L, *et al.* Phase I study of immunotherapy of cutaneous metastases of human carcinoma using allogeneic and xenogeneic MHC DNA-liposome complexes. *Gene Therapy*, 1997, **4** (8): 783~ 790
- Kawakami S, Yamashita F, Nishikawa M, *et al.* Asialoglycoprotein receptor mediated gene transfer using novel galactosylated cationic liposomes. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, **252** (1): 78~ 83

Preparation and Evaluation of a Hepatocyte Targeting pH-Sensitive Liposome

WEN Si-Yuan, WANG Xiao-Hong, LIN Li, GUAN Wei, WANG Sheng-Qi*

(Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Science, Beijing 100850, China)

Abstract In order to obtain liposomes with properties of hepatocyte-specificity and pH-sensitivity, four galactosylated derivatives were synthesized. A series of liposomes were prepared by mixing the galactosylated derivatives with DC-cholesterol/DOPE respectively. The liposome 18-gal was proven to have favorable gene transfer efficiency to human hepatoma HepG2 cells, which was significantly inhibited in the presence of galactose solution, indicating that the liposomal transfection activity was mediated by asialoglycoprotein receptors. The liposome showed prominent pH-sensitivity and low cytotoxicity. Its optimum gene transfer conditions were also determined. The results showed that the liposome may be developed as a potential hepatocyte targeting pH-sensitive delivery system for nucleic acid drugs.

Key words liposome, targeting, pH-sensitivity, nucleic acid drugs, gene transfer

* Corresponding author. Tel: 86-10-66932211, E-mail: sqwang@nic.bmi.ac.cn

Received: November 4, 1999 Accepted: January 14, 2000

《遗传》杂志网址开通

<http://www.ycjournal.com>

《遗传》杂志(刊号:ISSN 0253-9772, CN11-1913/R)为中国科学院主管、中国科学院遗传研究所和中国遗传学会主办的科技期刊(双月刊),全国自然科学核心期刊。主要报道人类与医学遗传、动植物遗传与育种及分子与微生物遗传等领域的最新成果与进展。主要栏目有:研究报告、技术与方法、争鸣与讨论、遗传学教学、综述与专论、重点实验室介绍、品种介绍、成果交流、会议信息、图书信息等。读者对象为基础医学、生物制药、农林牧渔、细胞学、生物化学、生物技术等专业的科研、教学、开发、管理人员,大专院校生物系师生与中学生物教师等。欢迎供稿,欢迎订阅,欢迎刊登广告。广告价黑白版面1000元,彩版每面2000元。

《遗传》为大16开本,80页,每期定价10.00元,全年60.00元。国内外公开发行,国内邮发代号:2-810,国外发行代号:BM62。个人直接向编辑部自费订阅7折优惠,汇款120元可订3年杂志。

《遗传》编辑部地址:北京市安定门外大屯路917大楼;邮编:100101;联系人:李绍武;电话:010-64889348;手机:(0)13601221912; <http://www.ycjournal.com>