

## 阳离子膜融合脂质体介导反义寡核苷酸在 HeLa 细胞中的转染实验研究

胡 英<sup>1</sup>, 金 一<sup>1\*</sup>, 王 华<sup>1</sup>, 李敏伟<sup>2</sup>

(1. 浙江大学药学院, 浙江 杭州 310031; 2. 浙江大学医学院附属一院传染病研究所, 浙江 杭州 310003)

**摘要:** 目的 研究阳离子膜融合脂质体(CFL)介导反义寡核苷酸(ASON)的细胞转染效率及影响因素。方法 逆相蒸发法制备3种不同阳离子含量的脂质体(CL),在CL上引入仙台病毒形成CFL,将制得的阳离子膜融合脂质体与反义寡核苷酸混合得到复合物,考察形态学及载药量,用MTT法考察该载体的细胞毒性,流式细胞仪测定阳性细胞百分率和平均荧光强度。结果 制得的CFL形态均匀,粒径为(168±65) nm。载药量随着磷脂/ASON(+/-)电荷比增加而增加。CFL细胞毒性明显低于相同电荷比的CL,细胞转染效率是随阳离子含量、磷脂/ASON(+/-)电荷比增加而增加,血清和低温均对CFL的细胞转染有影响。结论 阳离子膜融合脂质体作为载体在低电荷比条件下可降低细胞毒性并可提高细胞转染效率,可作为该ASON的给药系统而进一步研究。

**关键词:** 阳离子膜融合脂质体; 反义寡核苷酸; 仙台病毒; 转染效率

中图分类号: R943.4 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2002)11-0892-05

基因治疗需将外源性目的基因导入机体细胞中。目的基因(如DNA、RNA及反义核酸等)为高度亲水性的大分子物质,表面带有很强的负电荷,因此难以穿透细胞膜,故转染效率低。非病毒载体介导的基因转染已成为近年来基因治疗领域中的热点,其中阳离子脂质体(cationic liposome, CL)是最具有代表性的一种<sup>[1]</sup>。因为阳离子脂质体中带正电荷的类脂既是增加载药量和转染效率所必需的,同时也是对细胞产生毒性的原因<sup>[2]</sup>。Nakanishi等<sup>[3]</sup>在脂质体基础上引入能与细胞膜融合的病毒——仙台病毒(*Sendai virus*)形成杂合体,即膜融合脂质体(fusogenic liposome, FL),但存在载药量相对低的缺点。本文通过在阳离子脂质体上引入仙台病毒,形成一种新的杂合体——阳离子膜融合脂质体(cationic fusogenic liposome, CFL),并以反义寡核苷酸(antisense, oligodeoxynucleotides, ASON)为基因药物模型,考察其性质及其介导的HeLa细胞转染效率研究。

## 材 料 和 方 法

**药物与试剂** 与端粒酶RNA模板区互补的全硫代修饰的18聚ASON序列为:5'-CTC, AGT, TAG, GGT, TAG, ACA-3',且5'端用荧光素FAM(激发波长为494 nm,发射波长为522 nm)标记,由上海生工生

物有限公司合成。大豆卵磷脂(注射级,德国);胆固醇(广州南方化玻公司进口分装);DC-胆固醇(3β-[N(N',N'-二甲氨基乙基)-羧基]-胆固醇, Sigma公司);三羟甲基胺基甲烷(Tris, 中国医药集团上海化学试剂公司)。RPMI 1640培养基(Gibco公司,美国);噻唑兰(MTT, Amresco, 美国),超级小牛血清(fetal bovine serum, FBS, 杭州四季青生物制品所)。聚碳酸酯膜是由美国Cincinnati大学谢文锐博士惠赠。其他试剂均为分析纯。

**细胞模型** HeLa细胞由浙江大学附属一院传染病研究所提供,在含10%超级小牛血清的RPMI 1640培养液,37℃,5% CO<sub>2</sub>的孵箱条件下连续培养。实验细胞均处于对数生长期。

**病毒** 仙台病毒(*Sendai virus*) Z菌种,由日本大阪大学真弓忠范教授惠赠,感染9 d龄鸡胚进行扩增,并测定凝血效价。

**仪器** 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);超声波细胞粉碎仪(宁波新芝仪器研究所);低温高速离心机(MR-15A, 日本);流式细胞仪(Coulter, 美国);JEM120DEX透射电子显微镜;光学显微镜(Olympus, 日本);激光粒径分析仪(Coulter LS-230);分光光度计(Pharmacia Biotech, Gene Quaut II);Nanosep离心管(Ultracentrifuge);低温超高速离心机(Beckman Optima™ Max)。

**CL和CFL的制备** 用逆相蒸发法制备3个处方的CL(表1);以氯仿作为成膜的有机溶剂,然后用乙醚与BSS缓冲液(3:1)(BSS: Balanced salt solution,

收稿日期: 2002-03-08.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(930070896)。

\* 通讯作者 Tel/ Fax: (0571)87217244,

E-mail: jinyizhz@mail.hz.zj.cn

150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl, 1 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA·Na<sub>2</sub>, 10 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 7.3) 成乳, 逆向蒸发得到脂质体混悬液, 定容至 10 mL 后, 充氮气去残留乙醚。探头超声, 经 0.2 μm 的聚碳酸树脂纤维膜过滤, 即得粒径分布均匀、无菌的脂质体。将得到的 3 种 CL 分别与等体积的紫外(2 000 J·M<sup>-2</sup>) 灭活 2 min 的仙台病毒(血凝效价为 15 000 u·mL<sup>-1</sup>) 融合(4 °C, 10 min; 37 °C, 50 min), 轻轻的振荡<sup>[4]</sup>。用 7%, 30% 蔗糖梯度离心(80 000 r·min<sup>-1</sup>, 45 min) 除去多余的病毒<sup>[5]</sup>。

**Table 1 Prescription of three cationic liposomes (CL)**

Prescription	SPC/ mg	Chol/ mg	DC- Chol/ mg
I	50	20	15
II	25	5	15
III	25	5	7.5

SPC: Soybean phosphatidylcholine; Chol: Cholesterol; DC- Chol: 3β[ N-( N', N'-dimethylaminoethane)-carbamoyl] cholesterol

**ASON 脂质体复合物的形成** 按脂质体中所含的阳离子与寡核苷酸的电荷比率将磷脂/ ASO<sub>N</sub> (+/-) 以 0.5:1, 2:1, 4:1, 8:1 等体积混合。轻轻振荡, 室温放置 25 min。计算寡核苷酸和脂质体的电荷比率, 以脂质体中 DC-Chol 的含量计算正电荷, 即 1 mol 的 DC-Chol 带 1 个单位的正电荷; 负电荷以 ASO<sub>N</sub> 的量计算, 即 1 mol 的 ASO<sub>N</sub> 带 18 个单位的负电荷。

**粒径分析** 室温条件下, 分别取 CL, CFL 混悬液, 用 BSS 缓冲液稀释 20 倍, 用 Coulter 激光粒径分析仪测定粒径分布及平均粒径。

**形态观察** 将 CL 和 CFL 以 BSS 缓冲液稀释 10 倍, 滴到铜网上, 用 1% 的磷钨酸负染, 用透射电镜观察形态并照片。

**载药量测定** 取 ASO<sub>N</sub> 溶液(2.54 μg·mL<sup>-1</sup>) 10 μL, CFL 用 BSS 稀释后, 按磷脂/ ASO<sub>N</sub> (+/-) 电荷比为 0.5:1, 2:1, 4:1, 8:1 制备总体积为 200 μL 的 ASO<sub>N</sub> 脂质体复合物, 精密吸取上述混悬液, 置于 Nanosep 离心管, 10 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 收集离心液, 再用 BSS 缓冲液洗涤, 10 000 r·min<sup>-1</sup>, 离心 5 min, 重复 3 次, 分别收集离心洗涤液, 用分光光度法测定离心液中 A<sub>260</sub> 的值, 以不加脂质体的相同量 ASO<sub>N</sub> 离心液的 A<sub>260</sub> 为对照。以换算系数为 33 计算离心液及各洗涤离心液反义寡核苷酸的量(C<sub>t</sub>)。对照离心液中所含的反义寡核苷酸的量为(C<sub>0</sub>), CL 的载药量为(1 - C<sub>t</sub>/C<sub>0</sub>) × 100%。

**CL 和 CFL 的毒性考察** 由预实验知, CL 和

CFL 中的 DC-Chol 是对细胞产生毒性的原因, 故选用其中一个处方(表 1, II) 来考察 DC-Chol 的用量对细胞生长的影响。24 孔培养板, 接种 Hela 细胞每孔 2 × 10<sup>5</sup> 个, 37 °C, CO<sub>2</sub> 孵箱培养 12 h, 待细胞贴壁后, 每孔中加入处方(II) 的 CL 及所形成的 CFL, 每孔加入量根据细胞转染实验, 即当每孔中所含 ASO<sub>N</sub> 为 2.54 μg, 且按磷脂/ ASO<sub>N</sub> (+/-) 电荷比(0.5:1, 2:1, 4:1, 8:1) 时每孔所加的载体的量。最终的工作体系为 750 μL。每一梯度做 3 个复孔, 培养 7.5 h 后, 每孔加 MIT 溶液 80 μL(50 μg·L<sup>-1</sup>), 继续培养 4 h, 弃上清液, 每孔加二甲基亚砷 600 μL, 酶联免疫测定 490 nm 处各孔吸光度(A), 以无血清培养基为空白对照, 取平均值, 并计算细胞生长抑制率 % = (对照组平均 A 值 - 实验组平均 A 值)/对照组平均 A 值 × 100%。

**体外细胞转染试验** 考察 DC-Chol 含量对 CFL 对体外细胞转染效率的影响, 以及 CL 和 CFL 两种脂质体在不同电荷比、温度、血清条件下对转染效率的影响。即在 24 孔培养板上接种每孔 2 × 10<sup>5</sup> 个 Hela 细胞, 按常规培养, 待贴壁后, 用 PBS 冲洗 2 次, 加无血清培养基, 用 CL 和 CFL 两种脂质体与 ASO<sub>N</sub> 形成不同电荷比的复合物, 每孔含 ASO<sub>N</sub> 2.54 μg, 且整个工作体系体积为 750 μL。37 °C, CO<sub>2</sub> 孵箱培养 7.5 h 后, 收集细胞, 离心, 去上清液, 用 PBS 洗涤 2 次, 上流式细胞仪检测细胞的阳性染色率 α, 细胞内平均荧光强度(mean fluorescence intensity, MFI), 并计算进入细胞内的总荧光强度(total fluorescence intensity, TFI), 即 TFI = 10 000 × α × MFI。同时设立不加脂质体的 ASO<sub>N</sub> 作对照。每份标本分析 10 000 个细胞。

## 结 果

### 1 CL 和 CFL 的粒径和形态

用逆向蒸发法制备的 CL 及其 CFL, 形态圆整, 大小均匀。透射电镜的照片见图 1。用激光散射法测定 CL 的粒径分布为(124 ± 19) nm, CFL 的粒径分布为(168 ± 65) nm, 90% 的粒子粒径分别小于 187, 251 nm。

### 2 载药量的测定

当电荷比为 0.5:1, 2:1, 4:1, 8:1 时载药量分别为(34.8 ± 1.2)%, (74.9 ± 1.5)%, (89.3 ± 1.9)%, (94.7 ± 1.2)%。表明载药量随着电荷比的增加而增大, 当电荷比大于 2:1 时, 有较高的载药率。

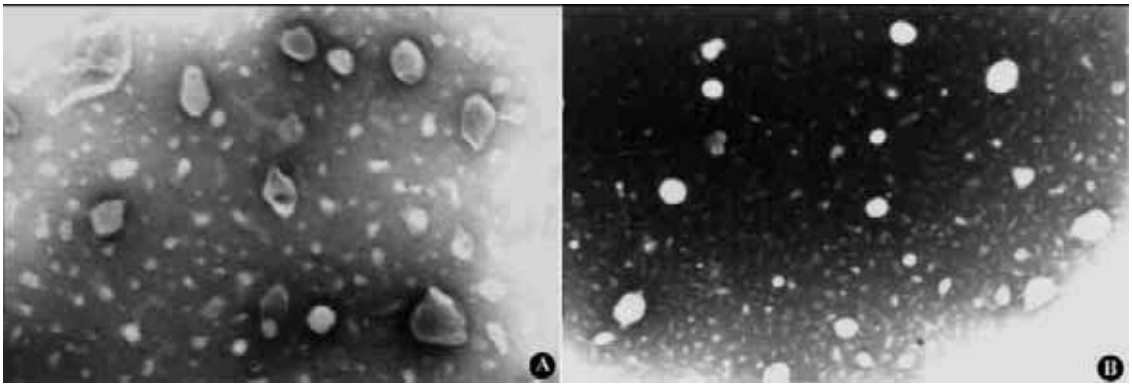


Figure 1 Transmission electron microphotography of cationic fusogenic liposome (CFL) (A) and cationic liposome (CL) (B) ( × 54 000)

### 3 MTT 检测细胞生长的抑制率

CL 或 CFL 对细胞生长的抑制率随着电荷比的增加而增加,在同电荷条件下,CFL 的毒性低于 CL。当磷脂/ ASON( + / - ) 电荷比为 8: 1 时,CL 对细胞抑制率是 2.84 倍。结果见图 2。

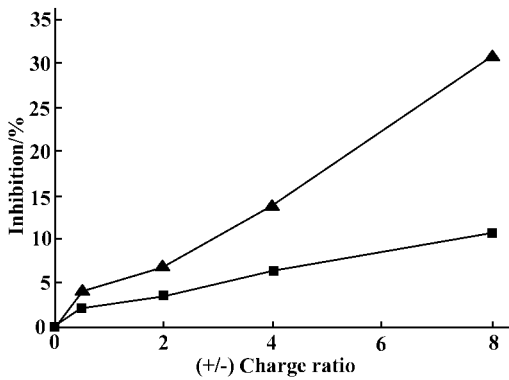


Figure 2 Effect of concentration of carriers on the growth of HeLa cells. The different ( + / - ) charge ratio of ASON/CFL or ASON/CL complexes achieved by absorption  
 ■ —■ CFL + ASON; ▲ —▲ CL + ASON

### 4 体外细胞转染

4.1 DC-Chol 含量对 CFL 的细胞转染的影响 3 种不同 DC-Chol 含量的 CFL,当磷脂/ ASON( + / - ) 电荷比为 0.5: 1 或 2: 1 对细胞的转染效率均随着 DC-Chol 含量增加而增大。当 DC-Chol 含量为 33.3 % 时,胞内的总荧光强度比对照组提高了 133.3 倍。结果见图 3。

4.2 不同磷脂/ ASON( + / - ) 电荷比对细胞转染的影响 根据以上结果选择 DC-Chol 含量为 33.3 % 的 CF 和 CFL,分别与 ASON 形成不同电荷比的复合物介导 ASON 转染 HeLa 细胞的影响。结果(图 4) 可见,两种脂质体介导的 ASON 转染 HeLa 细胞的胞内总荧光强度均随磷脂/ ASON( + / - ) 电荷比例的增加

而增强。此外,当磷脂/ ASON( + / - ) 电荷比为 0.5: 1,2: 1,4: 1 和 8: 1 时,相应 CFL 组的胞内总荧光强度分别为 CF 组的 2.23,1.90,1.03 和 0.84 倍,表明相同电荷条件下 CL 和 CFL 对 ASON 的转染效率不一样。在低电荷比时,CFL 的作用比 CL 明显;而高电荷比时 CL 的作用较 CFL 明显。

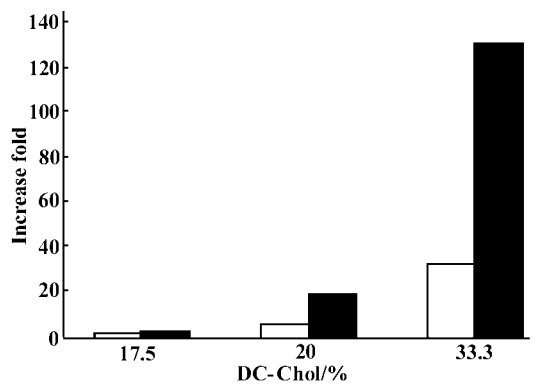


Figure 3 Comparison of the content of DC-Chol in CFL on transfection efficiency. The lipid/ ASON ( + / - ) charge ratio of ASON/CFL complexes is 0.5: 1 and 2: 1  
 □ 0.5: 1 ; ■ 2: 1

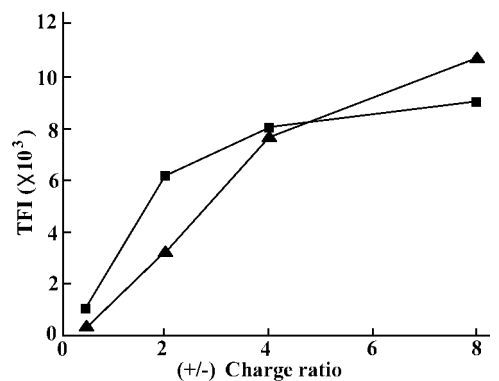


Figure 4 Change of total fluorescence intensity (TFI) in the cytoplasm of HeLa based on CL and CFL at different lipid/ ASON ( + / - ) charge ratio with ASON  
 ■ —■ CFL + ASON; ▲ —▲ CL + ASON

4.3 温度对细胞转染影响 根据以上结果选择磷脂/ASON( +/ - )电荷比2:1进行比较。4℃条件下,两种载体的细胞转染效率比37℃均有不同程度的降低,结果见图5。同一电荷比的CL比CFL转染效率降低明显。

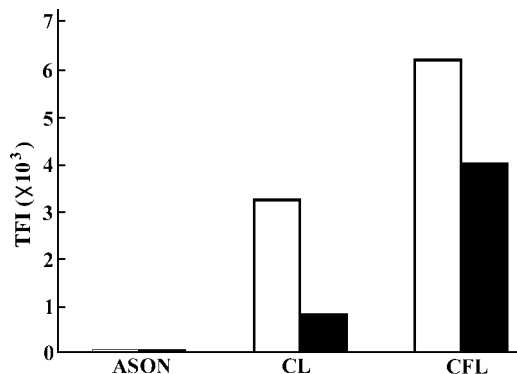


Figure 5 Effect of the uptake of ASON in HeLa cells mediated by CFL and CL on the different temperatures (4℃ and 37℃)

□ 37℃; ■ 4℃

4.4 血清对转染的影响 与无血清的转染介质相比,当培养基中加入10%的FBS时,CL和CFL介导的ASON转染HeLa细胞的能力均有所下降,其中以CL下降较为明显,胞内总荧光强度比无血清时降低了76%,而CFL仅降低18.6%。说明血清对CL的影响更显著。

## 讨 论

本实验旨在CL基础上引进仙台病毒形成CFL,考察其形态、包封率、细胞毒性及阳离子含量、转染介质中的血清、转染温度对其转染效率的影响。由于一般的FL在制备过程中需将基因药物包裹于脂质体中,存在包封率低,以及在制备过程中超声、过滤等步骤有可能使药物损失等问题<sup>[6]</sup>。本实验在CL的基础上引入仙台病毒,利用CL能与带有负电荷的基因药物直接混合的优点,并通过静电吸附提高脂质体的载药量。但是,几乎所有的阳离子脂质都会对细胞有一定毒性,在高浓度用量时尤为明显,并且容易受到血清等因素的影响,因此限制了它在某些方面的应用<sup>[2]</sup>。本实验结果表明同一电荷比条件下CFL的细胞毒性明显低于CL,而且在低电荷比下CFL的转染效率高于CL,这是由于CFL上引入的仙台病毒是一种RNA逆转录酶,属于副粘病毒科,具有生物膜融合特征,在中性pH条件下利用仙台病毒上的F和HN两个膜蛋白能迅速与细胞膜融

合,故可将包裹于脂质体中的药物直接导入胞浆中,从而大大减少由于内吞途径而被溶酶体降解<sup>[7]</sup>。CL的细胞毒性高,可能的原因是阳离子与细胞膜的持续作用引起细胞破膜<sup>[8]</sup>,而CFL中仙台病毒膜带有负电荷,中和CL上的部分阳离子。高电荷比时CL的转染效率高于CFL可能的解释是由于大量的阳离子脂质的作用,对细胞膜的通透性大大增加,细胞膜去稳定化<sup>[8]</sup>。由此可见,在CL上引入的仙台病毒可以在较少的阳离子脂质用量的情况下,增加转染效果,同时也降低对细胞的毒性。

本实验将两种不同类型的脂质体结合在一起,得到的CFL同时具有上述两种脂质体的优点。据文献<sup>[9]</sup>报道,普通的阳离子脂质体携带的生物大分子物质主要是通过内吞途径进入细胞,易被溶酶体中的核酸酶降解。这种内吞需要消耗能量,4℃的低能量条件下,细胞处于“休眠”状态,其内吞途径被抑制,而细胞的融合并不受影响。本实验同时在4℃和37℃条件下进行转染,发现4℃条件下CL和CFL两种载体的细胞摄取率相对于37℃均有下降,而CL下降相对明显。可见CFL介导ASON的机理同时包含内吞和融合,其转染的机理有待于进一步研究。在完全血清培养基中CFL的转染效率下降的幅度比CL小,其原因是CL依靠静电的作用与ASON结合,因此在有血清蛋白的存在下,可产生竞争性作用,故影响了转染效率<sup>[10]</sup>。随着阳离子电荷比的增加其毒性增加。而仙台病毒的融合作用受血清影响甚微,因此扩大其适用范围。

端粒酶是一种特殊逆转录酶,是由RNA和蛋白质两部分组成的核糖核蛋白,能以自身的RNA为模板逆转录出端粒重复序列,维持染色体末端稳定。现研究认为端粒酶活性增加与恶性肿瘤发生、发展密切相关,正常的细胞无端粒酶活性,因此,应用端粒酶反义寡核苷酸抑制端粒酶活性使肿瘤细胞内端粒丢失,进而促进肿瘤细胞凋亡来治疗肿瘤是一种非常诱人的基因治疗新靶点<sup>[11]</sup>。本实验结果表明,CFL在低电荷比时,低细胞毒性及转染效率明显提高的前提下,进一步研究CFL介导端粒酶ASON诱导细胞凋亡具有一定的意义。

## REFERENCES:

- [1] Son KK, Tkach D, Hall KJ. Efficient *in vivo* gene delivery by the negatively charged complexes of cationic liposomes and plasmid DNA [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 29(1-2): 6-10.
- [2] Mario CF, Nigel CP. Major limitations in the use of cationic

- liposomes for DNA delivery [ J ]. *Int J Pharm*, 1998, **162**(1 - 2) :159 - 170 .
- [ 3 ] Nakanishi M, Uchida T, Sugawa H, *et al*. Efficient introduction of contents of liposomes into cells using HVJ ( *Sendai virus* ) [ J ]. *Exp Cell Res*, 1985, **159**( 2 ) :399 - 409 .
- [ 4 ] Mizuguchi H, Nakanishi M, Nakanishi T, *et al*. Application of fusogenic liposomes containing fragment A of diphtheria toxin to cancer therapy [ J ]. *Br J Cancer*, 1996, **73**( 4 ) :472 - 476 .
- [ 5 ] Mizuguchi H, Nakanishi T, Kondoh M, *et al*. Fusion of *Sendai virus* with liposome depends on only F protein, but not HN protein [ J ]. *Virus Res*, 1999, **59**( 2 ) :191 - 201 .
- [ 6 ] Dzau VJ, Mann MJ, Morishita R, *et al*. Fusogenic viral liposome for gene therapy in cardiovascular diseases [ J ]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**( 21 ) :1421 - 1425 .
- [ 7 ] Nakanishi M, Mizuguchi H, Ashihara K, *et al*. Gene transfer vectors based on *Sendai virus* [ J ]. *J Controlled Release*, 1998, **54**( 1 ) :61 - 68 .
- [ 8 ] Gao X, Huang L. A novel cationic liposome reagent for efficiency transfection of mammalian cells [ J ]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, **179**( 1 ) :280 - 285 .
- [ 9 ] Lee KD, Nir S, Papahadjopoulos D. Quantitative analysis of liposome-cell interactions *in vitro*: rate constants of binding and endocytosis with suspension and adherent J774 cells and human monocytes [ J ]. *Biochemistry*, 1993, **32**( 3 ) :889 - 899 .
- [ 10 ] Mizuguchi H, Nakagawa T, Nakanishi M, *et al*. Efficient gene transfer into mammalian cells using fusogenic liposome [ J ]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, **218**( 1 ) :402 - 407 .
- [ 11 ] Naka K, Yokozaki H, Yasai W, *et al*. Effect of antisense human telomerase RNA transfection on the growth of human gastric cancer cell lines [ J ]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, **255**( 5 ) :753 - 758 .

## STUDY ON THE TRANSFECTION EFFICIENCY OF ANTISENSE OLIGODEOXYNUCLEOTIDE AGAINST TELOMERASE BY CATIONIC FUSOGENIC LIPOSOME

HU Ying<sup>1</sup>, JIN Yi<sup>1</sup>, WANG Hua<sup>1</sup>, LI Minwei<sup>2</sup>

( 1. College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China; 2. Infectious Disease Laboratory, The First Affiliated Hospital, College of Medical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310003, China)

**ABSTRACT:** **AIM** To investigate the factors affecting transfection efficiency of antisense oligodeoxynucleotides (ASON) by cationic fusogenic liposome (CFL). **METHODS** Three types of cationic liposomes (CL) were prepared by reverse-phase evaporation vesicles and cationic fusogenic liposomes (CFL) were obtained through fusion with *Sendai virus*. The CFL/ASON complexes were formed by physical absorption. Transmission electron microscope was used to observe its morphology. Drug loading capacity was examined by Nanosep centrifuge tube. The cellular damage of two vectors was determined by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MIT) assay. Transfection efficiency was estimated with the use of fluorescein phosphoramidite (FAM)-antisense oligodeoxynucleotides by flow cytometric analysis. **RESULTS** The mean diameter of CL and CFL was (124 ± 19) nm and (168 ± 65) nm, respectively. The drug loading capacity was depended on the charge of the ratio of lipid/ASON (+/-) and the cationic charge density on the lipid membrane. The cellular damage of CFL was obviously inferior to the same lipid/ASON (+/-) charge ratio of CL. The fluorescence intensity was shown to enhance the content of 3β-[N(N',N'-dimethylaminoethane) carbamoyl] cholesterol (DC-Chol) and lipid/ASON (+/-) charge ratio. However, the transfection efficiency mediated by CFL at low lipid/ASON (+/-) charge ratio increased about two fold than that by CL. Later, both serum and temperature affect the capacity of cellular uptake by CL or CFL. The effect of the transfection efficiency using CFL was much weaker. **CONCLUSION** Cationic fusogenic liposome (CFL) improved transfection efficiency and decreased cellular damage at the condition of low lipid/ASON (+/-) charge ratio. So, the vector need further study as ASON delivery system.

**KEY WORDS:** cationic fusogenic liposome; antisense oligodeoxynucleotides; *Sendai virus*; transfection efficiency