

## 脂质-鱼精蛋白-DNA 复合物的构建及其对细胞的体外转染

孙 逊, 张志荣\*

(四川大学 华西药学院, 四川 成都 610041)

**摘要:** 目的 研究新型非病毒载体脂质-聚阳离子-DNA (LPD) 复合物的制备方法及其对体外细胞的转染率。方法 用薄膜-挤压法制备空白阳离子脂质体, 与鱼精蛋白-DNA 复合物在室温孵育后, 得到 LPD; 用透射电镜观察其形态, 用激光粒度仪测定其粒径和 zeta 电位; LPD 与 DNA 酶 I 溶液在 37 °C 下孵育不同时间后, 用琼脂糖凝胶电泳观察其降解情况; 用荧光法测定其包封率; 用 X-gal 染色法考察了 LPD 对张氏 (Chang) 肝细胞, HepG2 肝癌细胞和 SMMC-7721 肝癌细胞的转染率。结果 LPD 的形态近似于球体, 平均粒径为 143.5 nm, 平均 zeta 电位为 +32.6 mV; 37 °C 下核酸酶作用 2 h 后, LPD 中的 DNA 几乎无降解; 平均包封率为 93.42%; LPD 对张氏 (Chang) 肝细胞、HepG2 肝癌细胞和 SMMC-7721 肝癌细胞的转染率分别为 (69 ± 6)%, (43 ± 7)% 和 (96.2 ± 1.8)%。结论 LPD 是一种制备工艺简单、体外稳定性好、转染率高, 具有应用潜力的非病毒载体系统。

**关键词:** 非病毒载体系统; 脂质-鱼精蛋白-DNA 复合物; 转染率

中图分类号: R943.5; R943.42 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2004)10-0792-05

## Preparation of lipid-protamine-DNA complexes and evaluation of their transfection efficiencies *in vitro*

SUN Xun, ZHANG Zhi-rong\*

(West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

**Abstract:** **Aim** To develop a novel non-viral gene delivery systems lipid-polycation-DNA complexes (LPD) and investigate their transfection efficiencies *in vitro*. **Methods** LPD were prepared as follows by first mixing the plasmid DNA and protamine together, then the resulted polyplexes were incubated for 10 min at room temperature, followed by addition of preformed cationic liposomes. The morphology of LPD was observed by transmission electron microscopy. The diameter and surface charge of LPD were measured by photon correlation spectroscopy (PCS). The nuclease protection ability of LPD was evaluated by agarose gel electrophoresis. Estimation of transfection efficiency was performed by galactosidase assay in Chang, HepG2 and SMMC-7721 cells. **Results** The average diameter and the zeta potential of LPD were 143.5 nm and 32.6 mV, respectively. LPD could protect the plasmid DNA from nuclease degradation after 2 hours incubation at 37 °C while the naked DNA degraded rapidly. The average transfection efficiencies were (69 ± 6)%, (43 ± 7)% and (96.2 ± 1.8)% in Chang cells, HepG2 cells and SMMC-7721 cells respectively. **Conclusion** LPD could be prepared easily with small particle sizes and high transfection activities. LPD may be good non-viral vectors for applications in gene delivery.

**Key words:** non-viral gene delivery systems; lipid-protamine-DNA complexes; transfection efficiency

基因治疗中的一个重大问题是选择合适的基因

载体, 即寻找对病变组织有选择性、高转染率、低毒性的载体以协助目的基因进入靶组织。目前, 广泛使用的基因转移系统主要分为病毒载体系统和非病毒载体系统。非病毒载体系统因其具有使用方便、安全性高、可大规模生产和无免疫原性等优点而备受关注。其中, 阳离子脂质体-DNA 复合物是目前

收稿日期: 2003-12-29.

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 资助项目 (2001AA218021).

\* 通讯作者 Tel: 86-28-85501566, Fax: 86-28-85456898, E-mail: zrzsl@vip.sina.com

研究得最为广泛的非病毒载体系统<sup>[1]</sup>。其优点在于:制备工艺简便,可运载大小不同的基因片段和质粒 DNA,还可运载染色体或细胞核,其内容大大超过其他载体;可抵御核酸酶的作用,延缓基因降解。脂质与细胞融合后,重组基因导入细胞,脂质体即被降解,磷脂可被细胞生物膜利用。因此,美国重组 DNA 委员会已批准非病毒载体——阳离子脂质体作为介导基因转移的方法用于临床基因治疗。

脂质-聚阳离子-DNA 复合物 (lipid-polycation-DNA lipopolyplexes, LPD) 是近年来在阳离子脂质体-DNA 复合物的基础上,发展起来的又一种新型非病毒载体。与阳离子脂质体-DNA 复合物相比,LPD 能更有效地缩合 DNA,在体内外实验中显著提高细胞的转染率,是基因治疗临床应用中一种更具前景的载体系统<sup>[2-4]</sup>。这方面的研究国外报道不多,国内尚未见报道。经典的 LPD 传递系统使用的聚阳离子是多聚赖氨酸;本文以 FDA 已批准可供临床使用的鱼精蛋白为聚阳离子成分,对 LPD 的构建方法及其对体外细胞的转染能力进行了研究。

## 材料与方 法

**仪器与试剂** pORFlacZ (3.54 kb) 质粒购自美国 Invivogen 公司;β-半乳糖苷酶报告基因染色试剂盒,鱼精蛋白硫酸盐,二甲基双十八烷基溴化铵 (DDAB),二油酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE) 均为 Sigma 公司产品;Hoechst 33258 (上海华舜生物工程有限公司);质粒扩增试剂盒购自美国 Qiagen 公司;Lipofectamine (美国 Invitrogen 公司);胎牛血清 (杭州四季青生物制品公司);RPMI 1640, DMEM 培养基 (Gibco 公司)。JEM-100SX 透射电子显微镜 (日本电子公司);激光粒度测定仪 Malvern zetasizer 3000 HS (英国 Malvern 公司);RF-5000 荧光分光光度计 (日本岛津);倒置显微镜 (Olimpus, 日本)。

**质粒 DNA 的扩增和纯化** 质粒 pORFlacZ 是 3.54 kb 真核表达载体,包含有报告基因 lacZ, EF-1α/HTLV 杂交启动子。采用 E. coli 菌株 DH5-α 扩增质粒和 EndoFree Qiagen Giga 试剂盒,分离纯化质粒,并用紫外分光光度法和凝胶电泳法对质粒的纯度和含量进行了测定,纯度符合要求。

**LPD 的制备** 取一定量的 DOPE 和 DDAB,用适量的氯仿溶解,经旋转蒸发和真空干燥后得到脂质薄膜;用 10 mmol · L<sup>-1</sup> Hepes 缓冲液 (pH 7.4) 水合脂膜后得到空白阳离子脂质体,再分别挤压通过 200 和 100 nm 的聚碳酸脂膜。将等体积的 DNA 和

鱼精蛋白的 Hepes 溶液混合, DNA 的终质量浓度为 30 μg · mL<sup>-1</sup>, 轻微振荡后,室温孵育 10 min, 得到 DNA-聚阳离子复合物;在轻微振荡下,将适量的空白阳离子脂质体加入该复合物中,室温孵育后即得到 LPD。

**形态、粒径和 zeta 电位** DNA-聚阳离子复合物或 LPD 样品经适当稀释后,滴加在覆盖碳膜的铜网上,用 2% 磷钨酸负染,在透射电镜下观察微粒的形态和大小。

DNA-聚阳离子复合物和 LPD 的粒径及表面电荷用激光粒度仪测定。取样品 20 μL 用 10 mmol · L<sup>-1</sup> Hepes 缓冲液 3 mL 稀释后加入样品池,在 25 °C 下重复测定 3 次。

**LPD 的抗核酸酶能力** 裸 DNA 或 LPD 分别与 DNA 酶 I 溶液 (0.32 U · μg<sup>-1</sup> DNA) 在 37 °C 下孵育不同时间,用 0.5 mol · L<sup>-1</sup> EDTA 溶液终止反应,并加入终浓度为 1% 的 Triton X-100 溶液以破坏脂质层和 0.9% 的肝素溶液以释放出鱼精蛋白-DNA 复合物中的 DNA。将样品用 0.8% 的琼脂糖进行电泳,溴化乙锭 (EB) 染色,紫外灯下观察。

**包封率测定** 将 LPD 胶体溶液于 4 °C, 45 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 3 h, 精密量取上清液 250 μL, 用 0.15 μg · mL<sup>-1</sup> 的 Hoechst 33258 染液在荧光分光光度计上测定其中质粒 DNA 的含量<sup>[5]</sup>。激发波长 365 nm, 发射波长 454.4 nm。包封率 (%) = [(X<sub>1</sub> - X<sub>2</sub>)/X<sub>1</sub>] × 100%, 其中 X<sub>1</sub> 为未经包封前 DNA 的总量, X<sub>2</sub> 为上清液中 DNA 的量。

**体外细胞转染** 张氏 (Chang) 肝细胞, SMMC-7721 肝癌细胞和 HepG2 肝癌细胞分别用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基或含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基进行常规培养。转染前 24 h, 在 24 孔培养板上接种细胞数为 2 × 10<sup>5</sup>/孔。转染时细胞约达到 70% 融合。用 PBS 冲洗细胞 2 次, 每孔中加入无血清、无抗生素的培养基 0.5 mL 和含有 pORF-lacZ 质粒 5 μg 的 LPD。于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养 5 h, 移去介质, 用 PBS 冲洗细胞 2 次, 加入含有 10% 胎牛血清的培养基培养 48 h, 使进入细胞内的基因得以表达。同时用商品化的阳离子脂质体 Lipofectamine 作为阳性对照, 操作按试剂盒说明书进行。

**X-gal 染色** 用 β-半乳糖苷酶报告基因染色试剂盒检测 lacZ 基因的表达情况。根据说明书的要求, 用甲醛和戊二醛固定细胞, 加 20 mg · mL<sup>-1</sup> X-gal 染色 4 h, 然后在显微镜下每孔随机选取 5 个

视野,记录蓝色细胞占总细胞的百分率。每组设 3 个复孔。

### 结果

#### 1 聚阳离子-DNA 复合物的形成

LPD 制备的第一步,是聚阳离子-DNA 复合物的形成。在适当的比例下,带正电荷的鱼精蛋白能够缩合 DNA,形成稳定的聚阳离子-DNA 复合物。由图 1 可见,当鱼精蛋白与 DNA 的重量比大于或等于 1.5 时,鱼精蛋白可充分缩合 DNA,形成带正电荷的微粒,其粒径在 70 - 150 nm,多分散指数为 0.20 - 0.32。为提高 LPD 的载药量,作者在制备 LPD 时,将鱼精蛋白与 DNA 的重量比确定为 1.5,得到的鱼精蛋白-DNA 复合物如图 2(A)所示。

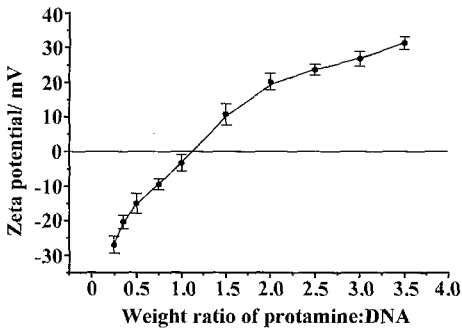


Figure 1 Zeta potential measurements of protamine-DNA complexes at different weight ratios

#### 2 LPD 的形态、粒径和 zeta 电位

由图 2(B)可见,LPD 的结构近似于球体,球体中间凹陷,这是磷脂双分子膜包裹鱼精蛋白-DNA 复合物所致。LPD 的平均粒径为 143.5 nm,多分散指数 0.35。LPD 的平均 zeta 电位为 +32.6 mV。

#### 3 LPD 抗核酸酶能力

如图 3 所示,裸 DNA 于 37 °C 在 DNA 酶 I 的作用下,5 min 几乎全部降解;而 LPD 中的 DNA,37 °C 核酸酶作用 2 h,质粒 DNA 几乎无降解,表明 LPD 对 DNA 有很好的保护作用。此外,LPD 中的质粒 DNA 很好地保持了其超螺旋结构。



Lane 1: Naked DNA; Lane 2: Naked DNA incubates with DNase for 5 min; Lane 3: LPD incubates with DNase for 5 min; Lane 4: LPD incubates with DNase for 30 min; Lane 5: LPD incubates with DNase for 1 h; Lane 6: LPD incubates with DNase for 2 h

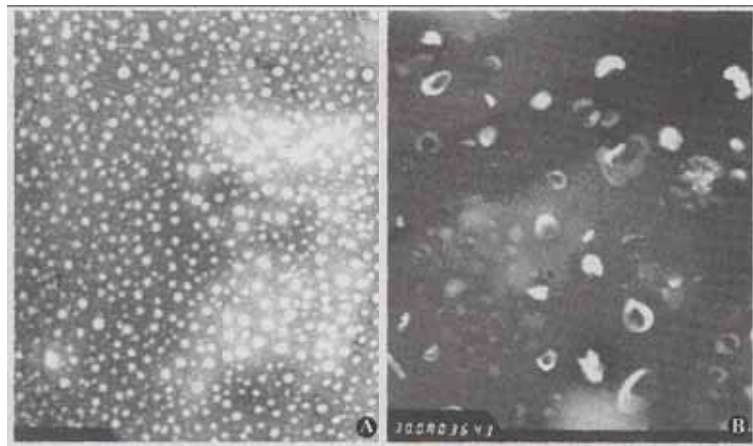
Figure 3 Agarose gel electrophoresis of naked DNA and LPD subjected to DNase degradation

#### 4 包封率测定

用荧光法测得平均包封率为 93.42%。

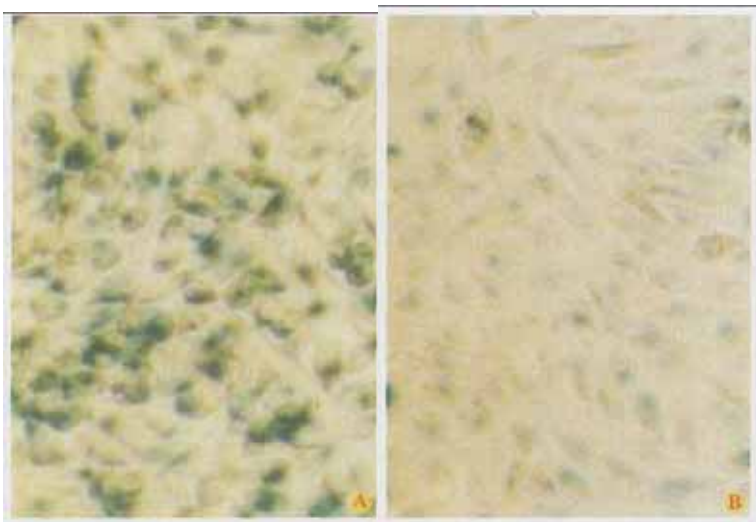
#### 5 体外细胞转染

如图 4 - 6 所示,与阳性对照 Lipofectamine 相比,LPD 对张氏 (Chang) 肝细胞, HepG2 肝癌细胞和 SMMC-7721 肝癌细胞均有较高的转染率。LPD 对 3 种细胞的转染率分别为 (69 ± 6)%, (43 ± 7)% 和 (96.2 ± 1.8)%;而 Lipofectamine 对 3 种细胞的转染率分别为 (46 ± 6)%, (37 ± 4)% 和 (18 ± 9)%。



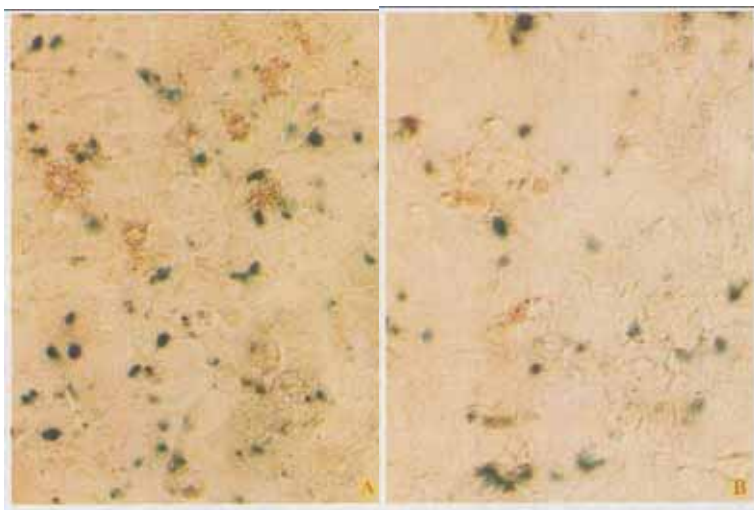
A: Protamine-DNA complexes; B: Lipid-polycation-DNA (LPD)

Figure 2 Electronic transmission microscopy (×30 000)



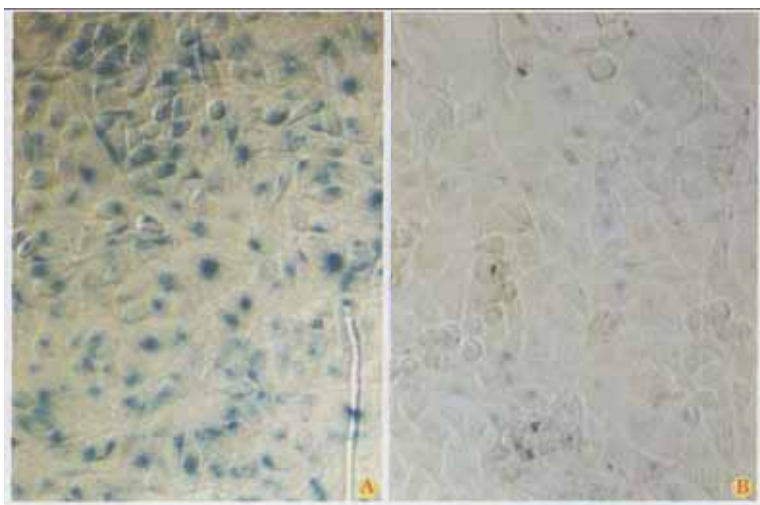
A: Chang hepatocytes transfected with LPD; B: Chang hepatocytes transfected with Lipofectamine

Figure 4 Comparison on transfection efficiency with LPD and Lipofectamine in Chang hepatocytes



A: HepG2 hepatoma cells transfected with LPD; B: HepG2 hepatoma cells transfected with Lipofectamine

Figure 5 Comparison of transfection efficiency between LPD and Lipofectamine in HepG2 hepatoma cells



A: SMMC-7721 hepatoma cells transfected with LPD; B: SMMC-7721 hepatoma cells transfected with Lipofectamine

Figure 6 Comparison of transfection efficiency between LPD and Lipofectamine in SMMC-7721 hepatoma cells

## 讨论

LPD 的结构类似于病毒,含有一个带有遗传物质的核和一个脂质外壳<sup>[6]</sup>。脂质层可促进 LPD 与细胞膜的融合,其中的二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)具有很强的细胞膜去稳定化作用,可提高 LPD 进入细胞内的能力,从而提高转染率。在酸性条件下,DOPE 可由双层  $L_{\alpha}$  相转变为逆转的六角形相(又称  $H_u$  相),其辅助转染活性更为明显<sup>[7]</sup>。

DNA 和阳离子聚合物发生相互作用,从以下几个方面可提高转染率:聚阳离子能够增加由内吞途径产生的内化作用;阳离子聚合物能够保护 DNA 对抗核酸酶的作用;阳离子聚合物还能够提高 DNA 向细胞核的转运<sup>[3]</sup>。此外,作者选择鱼精蛋白硫酸盐为阳离子聚合物,因为它是由海洋鱼类提取得到的天然产物,已被美国 FDA 批准用于一种胰岛素缓释制剂和中和术后病人过量的肝素,有长期的临床应用史,其抗原性弱,安全性好<sup>[3]</sup>;鱼精蛋白还被认为含有特定的核定位信号,有助于聚阳离子-DNA 复合物向核内的转运<sup>[8,9]</sup>。

Zeta 电位是微粒类给药系统的一个重要参数,通过 zeta 电位的测定可以确定微粒的表面特征,还可了解微粒的结构组成。在 LPD 的制备中,聚阳离子-DNA 复合物形成后,微粒表面略带正电荷;加入阳离子脂质体后,微粒的 zeta 电位提高至 32.6 mV,具有较好的胶体稳定性。

在 LPD 中的 DNA 不能直接用凝胶电泳检测,因为该复合物阻碍了 DNA 与溴化乙锭的结合。因此,研究中采用 Triton X-100 溶液以破坏脂质双层。另外,还需将 DNA 从聚阳离子-DNA 复合物中释放出来,本文采用 0.9% 肝素溶液释放出鱼精蛋白-DNA 复合物中的 DNA<sup>[10]</sup>。肝素是一种阴离子多糖,足量的肝素能通过电荷相互作用,把鱼精蛋白-DNA 复合物中的 DNA 解离出来。该法简单,不会破坏质粒的完整性。

## References:

- [1] Audouy SAL, Lou FMH, Leij H, *et al.* *In vivo* characteristics of cationic liposomes as delivery vectors for gene therapy [J]. *Pharm Res*, 2002, **19**(8): 1599-1605.
- [2] Lee RJ, Huang L. Folate-targeted, anionic liposome-entrapped polylysine-condensed DNA for tumor cell-specific gene transfer [J]. *J Biol Chem*, 1996, **271**(14): 8481-8487.
- [3] Tsai JT, Furstoss KJ, Michnick T, *et al.* Quantitative physical characterization of lipid-polycation-DNA lipopolyplexes [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2002, **36**(1): 13-20.
- [4] Ueno NT, Bartholomeusz C, Xia W, *et al.* Systemic gene therapy in human xenograft tumor models by liposomal delivery of the *EIR* gene [J]. *Cancer Res*, 2002, **62**(11): 6712-6716.
- [5] Sun X, Wang Y, Qiao XY, *et al.* Determination of DNA in nonviral vectors for gene therapy by fluorospectrophotometry [J]. *West China J Pharm Sci* (华西药理学杂志), 2003, **18**(6): 412-415.
- [6] Tagawa T, Manvell M, Brown N, *et al.* Characterisation of LMD virus-like nanoparticles self-assembled from cationic liposomes, adenovirus core peptide u ( $\mu$ ) and plasmid DNA [J]. *Gene Therapy*, 2002, **9**(5): 564-576.
- [7] Sudimack JJ, Guo W, Tjarks W, *et al.* A novel pH-sensitive liposome formulation containing oleyl alcohol [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, **1564**: 31-37.
- [8] Li S, Rizzo MA, Bhattacharya S, *et al.* Characterization of cationic lipid-protamine-DNA (LPD) complexes for intravenous gene delivery [J]. *Gene Therapy*, 1998, **5**(8): 930-937.
- [9] Arango MA, Düzgünes N, Ilarduya CT. Increased receptor-mediated gene delivery to the liver by protamine-enhanced-asialofetuin-lipopolyplexes [J]. *Gene Therapy*, 2003, **10**(1): 5-14.
- [10] Sun X, Zhang HW, Zhang ZR. A high transfection efficiency of pORF lacZ plasmid lipopolyplexes to hepatocyte and Hepatoma cells [J]. *World J Gastroenterol*, 2004, **10**(4): 531-534.