

阳离子脂质材料和聚乙二醇对脂质体细胞转染率及膜流动性的影响

严文伟¹, 齐宪荣^{1*}, 魏来², 费然², 丛旭², 王宇²

(1. 北京大学药学院药剂系, 北京 100083; 2. 北京大学人民医院肝病研究所, 北京 100044)

摘要: 目的 制备包封荧光素钠(FS)的脂质体,考察阳离子脂质材料(DC-chol)和聚乙二醇(PEG)对脂质体包封率、细胞转染率及膜流动性的影响。方法 以FS作为模型物质,制备并分离脂质体,测定脂质体包封率;通过观察荧光光谱的变化考察FS与脂质体膜之间的相互作用;以HepG₂ 2.2.15为细胞模型观察脂质体对FS细胞转染率的影响;通过荧光偏振技术考察阳离子脂质材料和PEG对脂质体膜流动性的影响。结果 阳离子脂质材料和PEG能提高脂质体包封率(0.64%~86.57%)、细胞转染率(2.18%~48.46%)及脂质体膜流动性,PEG分子质量的增大有利于包封率、转染率的提高,并增加脂质体膜的流动性。结论 在脂质体处方中加入阳离子脂质材料和高分子量的PEG有利于提高包封率、细胞转染率及增加脂质体膜的流动性。

关键词: 阳离子脂质体;聚乙二醇;细胞转染率;荧光素钠;膜流动性

中图分类号: R943.5 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2003)09-0698-04

Cationic lipid and polyethylene glycol enhance liposomes-mediated cell transfection and increase the fluidity of liposomes membranes

YAN Wen-wei¹, QI Xian-rong^{1*}, WEI Lai², FEI Ran², CONG Xu², WANG Yu²

(1. Department of Pharmaceutics, School of Pharmaceutical Science, Peking University, Beijing 100083, China;

2. Institute of Hepatology, People's Hospital, Peking University, Beijing 100044, China)

Abstract: **Aim** To prepare fluorescein sodium (FS) cationic liposomes and investigate the influence of cationic lipid (DC-chol) and polyethylene glycol (PEG) with different molecule weight (MW) on cationic liposome incorporation efficiency, cellular delivery and fluidity of liposome membrane. **Methods** Using FS as a model material for encapsulation, the liposomes were prepared and separated (by sephadex G-50 1 cm×20 cm column), and the liposome incorporation efficiencies was measured. The interaction between the FS and cationic liposomes was investigated by measuring the change of fluorescent spectrum. The cellular uptake of different liposome forms by choosing HepG₂ 2.2.15 as an *in vitro* cell culture assay model, and the influence of PEG on the fluidity of liposome membrane with the technique of fluorescence polarization were investigated. **Results** Cationic lipid and different PEGs showed great effects on increasing liposome incorporation efficiency (from 0.64% to 86.57%), cellular uptake (from 2.18% to 48.46%) and fluidity of liposome membrane. The effect of PEG was MW dependent, and with the increase of MW, the incorporation efficiency and transfection was improved, and the fluidity of liposome membrane increased. **Conclusion** Addition of cationic lipid and high MW PEG into cationic liposomes can enhance the cellular delivery and fluidity of cationic liposomes. Also, they can improve the incorporation efficiency of cationic liposomes.

Key words: cationic liposomes; polyethylene glycol; transfection efficiency; fluorescein sodium; fluidity of membrane

基因治疗作为一种有效的治疗方法已应用于各

类疾病的临床治疗,自1990年以来已有2 000多名患者接受了通过病毒或非病毒载体介导的基因治疗^[1]。尽管病毒载体在体内外对基因的转移效率都较高,但存在免疫反应和安全问题,从而限制了在临

收稿日期: 2002-09-09.

* 通讯作者 Tel: 86-10-62091584,

E-mail: Qixr2001@yahoo.com.cn

床中的应用。非病毒基因传递系统因有安全性高、制备简单等优点,受到国内外科工作者的关注。阳离子脂质体介导的基因传递系统是其中最前景的非病毒传递系统之一。

研究表明脂质体与细胞的吸附是限制脂质体传递基因效率的主要步骤^[2],一旦脂质体与细胞发生吸附,将很容易被吞噬进入细胞内。PEG是生物化学和生物学中广泛应用的无毒高分子聚合物,游离的PEG能增强脂质体的膜流动性从而促进脂质体与细胞膜的融合^[3],提高转染效率。本文以水溶性荧光素钠(FS)为模型物质,制备高包封率的阳离子脂质体,考察了阳离子脂质材料(DC-chol)及不同分子质量的PEG对脂质体包封率、细胞转染率、脂质体膜流动性及FS的油/水分配系数的影响。

材料与amp;方法

材料和仪器 Hiachi 850 荧光分光光度检测仪;细胞流式仪(美国BD公司);Napco series 5400 CO₂ 培养箱;Eppendorf centrifuge 5810 R 细胞离心机。

3β-[N-(N',N'-二甲基胺乙基)胺基甲酰基]胆固醇(DC-chol)(本实验室合成);胆固醇(ch)(特级,日本和光纯药工业株式会社);二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)(日本油脂株式会社);1,6-二苯基-1,3,5-己三烯(DPH)(特级,日本和光纯药工业株式会社);荧光素钠、D(+)-无水葡萄糖、三氯甲烷、PEG_{2,000}、PEG_{4,000}和PEG_{6,000}等均为分析纯。

FS标准贮备液及标准曲线的制备 精密称量FS 94.99 mg和葡萄糖 12.5 g,以纯水溶解并定容至250 mL,作为贮备液。精密吸取FS贮备液,用pH 7.2的磷酸盐缓冲液定量稀释成含一系列FS的标准溶液,以pH 7.2的磷酸盐缓冲液为空白对照,在激发波长490 nm和发射波长512 nm处测量FS的荧光吸收强度,以吸光度对浓度作曲线,计算回归方程和线性范围。

FS脂质体的制备 用薄膜水化-超声法制备脂质体。按表1的处方比例精密称量脂材,溶于盛1 mL氯仿的鸡心瓶中,用氮气吹去有机溶剂,室温下在旋转蒸发器上进一步抽干,使脂材在瓶壁上形成一层均匀的膜。取1 mL FS贮备液水化脂膜,涡旋振荡并放入水浴中超声5~10 min制成脂质体。

包封率的测定 取脂质体1 mL加入葡聚糖G-50凝胶柱(1 cm×20 cm)中,以5%葡萄糖溶液洗脱未包封的FS并收集脂质体,得到包封FS的脂质体混悬液。取包封FS的脂质体混悬液0.1 mL,加入

20% Triton X-100溶液10 μL破坏脂质体,以pH 7.2的磷酸盐缓冲液稀释到适宜浓度,测定溶液的荧光强度,由标准曲线回归方程计算脂质体的包封率。脂质体的包封率 = $V_1 C_1 / V_0 C_0 \times 100\%$,其中 V_1 和 C_1 分别为分离后脂质体混悬液的体积和FS浓度; V_0 和 C_0 分别为分离前脂质体的体积和FS浓度。

FS与脂质体膜相互作用的考察 取适宜浓度的FS标准溶液和包封FS的脂质体混悬液,分别扫描其激发波长和发射波长,记录荧光峰位的变化。

脂质体细胞转染的考察 将HepG₂ 2.2.15细胞接种于Costar 96孔板中,每孔细胞数为 1×10^4 ,加入含10%胎牛血清的DMEM培养液200 μL,置于5% CO₂ 孵箱37℃培养。当细胞浓度达到近70%时,弃去上清液,向孔中加入含10%包封FS脂质体混悬液的DMEM培养液,每个取样点设两个复孔,同时设FS溶液对照组。分别经过3,6和24 h培养后取出上清培养液,胰酶消化并用磷酸盐缓冲液洗涤细胞,转入流式细胞测量管中,在流式细胞仪上测定FS的细胞转染率。

细胞转染率 = $\text{FS 转染细胞数} / \text{总细胞数} (\times 100\%)$ 。

1,6-二苯基-1,3,5-己三烯(DPH)贮备液的配制 精密称量1,6-二苯基-1,3,5-己三烯(DPH) 4.65 mg,溶于四氢呋喃10 mL中,制成 $2 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 母液,将DPH母液用 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液(pH 7.2)稀释成 $2 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 贮备液备用。

DPH及FS标记脂质体膜流动性的测定 用荧光偏振法。按表1的处方比例精密称量DPPC, ch, DC-chol及不同分子质量的PEG,以DPH 2 mL贮备液代替1 mL FS贮备液水化脂膜,用上述的薄膜水化-超声法制备包封DPH的脂质体。在激发波长362 nm,发射波长432 nm处测定包峰DPH的不同处方脂质体的荧光偏振强度(I_{DPH})。以相同方法在激发波长490 nm,发射波长512 nm测定分离后的包封FS脂质体的荧光偏振强度(I_{FS})。分别计算DPH标记和FS标记脂质体膜的荧光偏振度(P_{DPH} 和 P_{FS})及各向异性(γ_{DPH} 和 γ_{FS})。

$$G = I_{90,90} / I_{90,0};$$

$$P = (I_{0,0} - G I_{0,90}) / (I_{0,0} + G I_{0,90});$$

$$\gamma = 2P / (3 - P)。$$

其中 $I_{0,0}$, $I_{0,90}$, $I_{90,90}$ 和 $I_{90,0}$ 为各个方向的荧光偏振强度;G为光栅校正因子。

DC-chol含量及不同分子量的游离PEG对FS油/水分配系数的影响 加入 $4 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ FS标

准溶液(C_0) 2 mL 和按表 3 配制的含有不同脂质材料的油相溶液(氯仿/正辛醇 1:19) 2 mL, 密闭, 置于振荡机中, 室温下振荡 4 h, 静置 12 h, 于 3 500 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取水相溶液以 pH 7.2 的磷酸盐缓冲液稀释到适宜浓度, 测定溶液的荧光强度, 代由标准曲线回归方程, 计算分配平衡后 FS 在水相中的浓度(C_w)。按下述公式计算 FS 的氯仿-正辛醇/水的分配系数(P)。

$$P = (C_0 - C_w) / C_w$$

其中($C_0 - C_w$) 为平衡后氯仿-正辛醇中 FS 的浓度。

Table 1 Encapsulation and transfection efficiencies of liposomes with different constituents

Prescription	Lipid constituent(molar ratio)	Encapsulation efficiency/ % ($n = 3$)	Transfection efficiencies/ %($n = 2$)			
			Fluorescein sodium concentration/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	3 h	6 h	24 h
Control	Fluorescein sodium solution	-	7.00	1.10	1.53	2.18
1	DPPC: ch(10:10)	0.64 ± 0.26	7.00	1.17	2.67	1.83
2	DPPC: ch: DC- chol(10:1:10)	55 ± 3	5.48	5.45	6.17	19.14
3	DPPC: ch: DC- chol(10:1:15)	67 ± 6	-	-	-	-
4	DPPC: ch: DC- chol(10:1:20)	75 ± 3	-	-	-	-
5	DPPC: ch: DC- chol: PEG ₂₀₀₀ (10:1:10:1.34)	58 ± 6	5.84	8.56	13.94	34.33
6	DPPC: ch: DC- chol: PEG ₄₀₀₀ (10:1:10:1.34)	72 ± 5	7.26	27.08	24.44	39.62
7	DPPC: ch: DC- chol: PEG ₆₀₀₀ (10:1:10:1.34)	86 ± 5	8.66	18.11	23.14	48.46

DPPC: Dipalmitoyl phosphatidylcholine; ch: Cholesterol; DC- chol: 3 β [N-(N', N'-dimethylaminoethane) carbamoyl] cholesterol

3 阳离子脂质体与 FS 的相互作用

以 FS 的荧光光谱的变化考察 FS 与脂质体膜的相互作用。FS 为黄绿色荧光, 但在制备成阳离子脂质体后呈橙红色。从 FS 标准溶液和包封 FS 的脂质体的扫描图上可见, FS 的激发波长红移 9 ~ 10 nm, 发射波长红移 2 ~ 3 nm。说明 FS 与阳离子脂质体存在相互作用。

4 DC- chol 及 PEG 对脂质体细胞转染率的影响

FS 溶液及不同类型的包封 FS 的脂质体混悬液与 HepG₂ 2.2.15 细胞经 37 °C 培养不同时间, FS 的细胞转染率如表 1 所示。可见 FS 溶液不能通过细胞膜转入细胞内, 同样在实验条件下也观察不到普通脂质体(不含阳离子脂材 DC- chol) 对 FS 的细胞转染的促进作用。

阳离子脂质体对 FS 的细胞转染有较大的促进作用, 而且在脂质体处方中加入高分子 PEG 能显著增强促进转染作用。长时间培养(24 h), PEG 对阳离子脂质体细胞转染的促进作用存在分子量依赖性, 在分子量 2 000 ~ 6 000 内, PEG 分子量的增大有利于脂质体转染率的提高。

结果

1 FS 的标准曲线

FS 的荧光吸收值与 FS 浓度的线性回归方程为 $A = 974.31 C + 38.014$ ($r = 0.998$), 线性范围为 0.2 ~ 1.00 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。线性关系良好。

2 脂质体的包封率

以薄膜水化-超声法制备的脂质体包封率结果见表 1。可见在处方中加入阳离子类脂材料 DC- chol 后, 包封率有很大的提高, 而且 PEG 的分子量对 FS 脂质体的包封率有较大的影响, PEG 分子量的增加可显著提高 FS 的包封率。

5 DC- chol 及 PEG 对脂质体膜流动性的影响

DC- chol 含量及不同分子量的 PEG 对脂质体膜流动性的影响如表 2 所示。

Table 2 Fluorescent polarization (P) and anisotropy (Y) of liposomes with different constituents (n = 2)

Prescription	1	2	3	4	5	6	7
P_{DPH}	0.538	0.526	0.510	0.497	0.511	0.493	0.491
Y_{DPH}	0.437	0.425	0.410	0.397	0.411	0.393	0.391
P_{FS}	-	0.515	0.518	0.520	0.517	0.518	0.519
Y_{FS}	-	0.414	0.417	0.419	0.416	0.417	0.418

DPH: 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene; FS: Fluorescein sodium

从表 2 可以看出, 以 DPH 为荧光标记物时, 阳离子脂材 DC- chol 的加入降低了脂质体膜的偏振度, 使脂质体膜的各向异性降低, 而且随着 DC- chol 含量的增加, 脂质体膜的偏振度降低程度和脂质体膜的各向异性的降低程度都相应增加, 即膜的流动性增加。在处方中加入 PEG 可以降低脂质体膜各向异性, 而且随着 PEG 分子量的增大, 脂质体膜

的各向异性降低,膜的流动性增强。说明 PEG 对脂质体膜流动性的影响存在分子量依赖性,在分子量 2 000 ~ 6 000 内,PEG 分子量的增大有利于脂质体膜流动性的增加。

6 DC-cho1 含量和 PEG 对 FS 的氯仿 - 正辛醇/水分配系数的影响

DC-cho1 含量及不同分子量 PEG 对 FS 的氯仿 - 正辛醇/水分配系数的影响如表 3 所示。

Table 3 The partition coefficient of fluorescein sodium in solutions with different lipids (n = 2) (C₀ = 40 × 10⁻⁶ mol · L⁻¹)

Concentration of lipids in oil phase	C ₀ /mol · L ⁻¹ (1 × 10 ⁻⁶)	P	log P
No lipids	15.560	2.213	0.345
DC-cho1 1 μmol	14.800	2.378	0.376
DC-cho1 2 μmol	12.596	2.970	0.473
DC-cho1 3 μmol	11.408	3.383	0.529
DC-cho1 4 μmol	10.325	3.843	0.585
DC-cho1 2 μmol: PEG ₂₀₀₀ 0.12 μmol	10.215	3.895	0.591
DC-cho1 2 μmol: PEG ₄₀₀₀ 0.12 μmol	9.859	4.072	0.610
DC-cho1 2 μmol: PEG ₆₀₀₀ 0.12 μmol	9.571	4.224	0.626

从表 3 可见,在氯仿 - 正辛醇中加入阳离子类脂材料 DC-cho1 可以增加 FS 在油相中的分布,DC-cho1 含量的增加使 FS 在油相中的分配系数增大;在体系中加入 PEG 可以促进 FS 向油相的分布,这与包封率的实验结果相一致。

讨论

在实验中作者采用 FS 为模型药物考察不同分子量 PEG 对脂质体包封率及细胞转染率等因素的影响。因为 FS 为钠盐结构,有较好的水溶性,在水溶液中通过电离使自身带负电荷,DC-cho1 3' 端的叔胺阳性功能团利用正负电荷的电性作用吸附 FS,使阳离子脂质体对 FS 的包封率大大提高,脂质体的处方中加入 PEG,FS 的包封率也提高。从 DC-cho1 和 PEG 对 FS 的氯仿 - 正辛醇/水的分配系数的结果也证实,加入阳离子脂质材料和 PEG 后,使较大比例的 FS 从水相转移到有机相,油水分分配系数提高。

在膜流动性实验中,PEG 的加入能增强脂质体膜的流动性(表 2),说明 PEG 能分布在脂质体膜中

并影响脂质体膜的结构。而膜流动性的增加可显著的提高阳离子脂质体的细胞转染率(表 1),提示阳离子脂质体对细胞转染率的促进作用除了通过电性吸附增强转染之外,还可能通过增强脂质体膜与细胞膜的融合作用来提高细胞转染率。高分子量的 PEG 能增强脂质体膜的流动性,从而促进了阳离子脂质体的细胞转染率。

一般脂质体通过包合作用运载药物,磷脂双分子层的亲水层不与药物发生作用。阳离子脂质体通过正负电荷作用吸附带负电荷的物质并使其在脂质体膜表面聚集。脂质体膜亲水层流动性的改变可能对脂质体膜的流动性产生较大影响。作者以 FS 为标记物考察了不同处方脂质体膜的流动性。实验结果表明,阳离子脂材 DC-cho1 含量的增加及游离 PEG 分子量的增大,脂质体膜各向异性增大,即膜的流动性降低。这与以 DPH 为标记物的实验结果相反。FS 也是一种扁平的刚性分子,通过与 DC-cho1 阳性功能团的电性作用嵌入脂质体膜的亲水层,它的偏振规律反映了脂质体亲水层的活动情况;而 DPH 嵌入脂质体膜的烃链层,它的偏振规律反映了脂质体烃链层的活动情况。当阳离子脂材 DC-cho1 含量的增加及游离 PEG 分子量的增大时,脂质体的包封率显著提高,FS 分子嵌入脂质体亲水层的量也显著增加,限制了磷脂分子在平面内的侧向扩散等运动,从而使脂质体膜的流动性降低。水溶性 FS 用于脂质体膜流动性的观察,未见相关报道。它测量的数值是否能定量反映脂质体膜的流动性还有待于进一步的考察,但在阳离子脂质体研究中,其荧光偏振变化规律能反映不同处方对脂质体膜流动性的影响。

References :

[1] Kikuchi H, Suzuki N, Ebihara K, *et al.* Gene delivery using liposome technology [J]. *J Controlled Release*, 1999, **62**(1) :269 - 277 .
 [2] Escriou V, Ciolina C, Lacroix F, *et al.* Cationic lipid-mediated gene transfer: effect of serum on cellular uptake and intracellular fate of lipopolyamine/ DNA complexes [J]. *Biochim Biophys Acta*, [J]. 1998, **1368**(2) :276 - 288 .
 [3] Yang Q, Guo Y, Li L, *et al* Effects of lipid head group and packing stress on poly(ethylene glycol)-induced phospholipid vesicle aggregation and fusion [J]. *Biophys J*, 1997, **73**(2) : 277 - 282 .