

# 阳离子脂质体介导的肺癌细胞基因转染效率的比较研究

李 芳<sup>1</sup>, 伍新尧<sup>2</sup>, 郭语彬<sup>1</sup>, 区敬华<sup>2</sup>, 童大跃<sup>1</sup>

(中山医科大学 1. 生化教研室; 2. 法医学教研室, 广东 广州 510089)

**摘要:**【目的】提高阳离子脂质体介导的肺癌细胞基因转染效率。【方法】采用表达 *E. coli*  $\beta$ -半乳糖苷酶的 pCMV $\beta$  报告基因质粒及组化染色评价阳离子脂质体的转染效率。优化脂质体介导肺癌细胞基因转染效率的条件包括: 脂质体:DNA 电荷比率, DNA 转染剂量, 阳离子脂质体的类型。【结果】当阳离子脂质体:DNA 电荷比率(+/-)为 3:1 时, pCMV $\beta$  的剂量为 4  $\mu$ g/孔(24 孔板)时, 阳离子脂质体 DOSPER 介导肺癌细胞株 SPC-A-1 转染效率最高, 达(11.9 $\pm$ 0.9)%。【结论】优化转染条件, 脂质体可有效地将外源基因体外导入肺癌细胞。本实验为阳离子脂质体介导肺癌细胞功能性基因的转移及进一步的肺癌基因治疗打下了基础。

**关键词:** 肺肿瘤/治疗; 基因疗法; 基因转移; 阳离子脂质体

**中图分类号:** R334.34      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000-257X(2000)06-0425-04

## Comparison Studies on the Transfection Efficiency of Cationic Liposome-mediated Gene Transfer to Cultured Lung Cancer Cells

LI Fang<sup>1</sup>, WU Xin-yao<sup>2</sup>, GUO Yu-bin<sup>1</sup>, OU Jing-hua<sup>2</sup>, Tong Da-yue<sup>1</sup>

(1. Department of Biochemistry; 2. Faculty of Forensic Medicine, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China)

**Abstract:** 【Objective】 This experiment aims at enhancing the efficiency of cationic liposome-mediated gene transfer to cultured lung cancer cells. 【Methods】 Reporter gene expressing *E. coli*  $\beta$ -galactosidase were used in order to evaluate transfection efficiency by histochemical staining. Optimization of conditions for cationic liposome-mediated transfection of cultured lung cancer cells include: charge ratios of cationic liposome: pCMV $\beta$  (+/-), doses of transferred pCMV $\beta$ , and the types of liposomes. 【Results】 When the cationic liposome: pCMV $\beta$  charge ratio is 3:1 and dose *D* (Per well of 24-well plate)/  $\mu$ g of pCMV $\beta$  is 4, the highest efficiency of DOSPER mediated gene transfer into SPC-A-1 cell reaches(11.9 $\pm$ 0.9)%. 【Conclusions】 Optimising the conditions of transfection, cationic liposomes can effectively transfer the gene into cultured lung cancer cells. The results lay the foundations of functional gene transfer to lung cancer cells and further to the gene therapy of lung cancer.

**Key words:** lung neoplasms/therapy; gene therapy; gene transfer; cationic liposome

肿瘤的基因治疗是继手术、化疗、放疗之后的又一肿瘤治疗方法。但是在体内, 外源基因能否准确有效地导入到特定组织细胞, 并在其中有效表达仍是基因治疗技术中的一个难点。目前采用的基因转移系统主要有病毒载体和非病毒载体两大类。病毒载体尽管基因转染效率较高, 但具有免疫原性

及病毒重组的可能性等局限性。阳离子脂质体是近年发展起来的最有前途的非病毒载体之一<sup>[1]</sup>。它没有病毒载体的安全性问题, 并具有下列优点: 毒性小, 对转移的基因大小没有限制, 潜在的靶向性, 易于进行较大量的生产。最重要的是阳离子脂质体没有免疫原性, 可在体内重复应用相同的脂质

收稿日期: 2000-04-17

基金项目: 在读博士研究生资助项目(331226)

作者简介: 李 芳(1965-), 女, 重庆人, 博士生。

复合物<sup>[2,3]</sup>。本实验采用表达  $\beta$ -半乳糖苷酶( $\beta$ -gal)的报告基因系统,探讨了阳离子脂质体介导肺癌细胞基因转移的优化条件。

## 1 材料与方 法

### 1.1 细胞培养

人肺腺癌细胞株 SPC-A-1, GLC-82, A549, 肺鳞癌细胞株 L78, 由本实验室传代培养。

### 1.2 阳离子脂质体与质粒 DNA

阳离子脂质体 ESCORT 转染剂是 1, 2-二油酰氧基-3-三甲氨基丙烷(DOTAP)和二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)的  $w = 100\%$  的混合物(SIGMA), DOSPER 是 1, 3-二油酰氧基-2-(6-羰基精胺)丙胺(宝灵曼), DC-Chol(3  $\beta$  [N-(N', N'-二甲氨基乙烯基)-氨甲酰基胆固醇]和胆固醇(Cholesterol, Chol)单体购自 SIGMA 公司, 多层脂质体 DC-Chol:Chol(1 mol:1 mol)的制备按 Felgner 等<sup>[4]</sup>报道的方法制备。简要过程:将 DC-Chol:Chol 溶于  $\varphi$  (氯仿:甲醇)=200%中, 然后在旋转蒸发器中干燥 2 h, 干燥的脂质薄膜重新悬于消毒三蒸水中, 使脂质体的质量浓度为 1 g/L。在旋涡混合仪上混匀 2 min, 即为多层脂质体。

报告基因质粒 pCMV $\beta$  (CLONTECH)是一个 7.2 kb 的真核表达质粒, 包含 Lac Z 基因和 CMV 启动子。采用氯化钙处理法将质粒 DNA 转导入 *E. coli* 菌株 DH5  $\alpha$  中, 质粒 DNA 通过碱裂解法分离, 然后用离子交换层析法纯化(QIAGEN, CLONTECH)。沉淀后溶解于去离子蒸馏水中备用。

### 1.3 脂质体: pCMV $\beta$ 复合物的制备

阳离子脂质体和 pCMV $\beta$  按不同的电荷比率等体积混合。当脂质体:DNA 的电荷比率(+/-) < 1 时, 将脂质体加入 DNA 中; 当电荷比率 > 1 时, 将 DNA 加入脂质体中, 以防止聚集现象的发生<sup>[5]</sup>。核苷酸和脂质体的电荷比率计算按一个单核苷酸带 1 个负电荷, 并且其平均相对分子质量为 330。此外, 1 mol 的 DOSPER 带 4 mol 的正电荷, 1 mol 的 DC-Chol 和 DOTAP 带 1 mol 的正电荷。

### 1.4 DNase I 敏感性试验

按 Ferrari 等报道的方法操作<sup>[9]</sup>。脂质体:pCMV $\beta$  按不同的电荷比率混合, DNA 的终质量浓度为 0.3 mg/L。在 43  $\mu$ L 混合物中加入 5  $\mu$ L 10  $\times$  DNase I 缓冲液, 混匀后加入 2  $\mu$ L DNase I (50

$\times 10^3$  U/L)(华美公司)。样品孵育在 37  $^{\circ}$ C, 在不同的孵育时间取出样品, 加入 5  $\mu$ L 0.5 mol/L EDTA pH 8 以终止反应。然后, 加入 2  $\mu$ L 含 100 g/L zwittergent (宝灵曼)的 20 mmol/L NaOAc pH 6 缓冲液。样本混匀, 并在 55~65  $^{\circ}$ C 加热 15 min, 然后加入 2 倍体积的  $\varphi$  (氯仿:甲醇)=200% 混匀, 并在 37  $^{\circ}$ C 孵育 15 min, 离心(湘仪高速冷冻离心机 GL20A, 半径:9.6 cm)12 000  $\times$  g 15 min, 取上清做 10 g/L 琼脂糖电泳。

### 1.5 基因质粒 pCMV $\beta$ 转染及转染效率评价

人肺癌细胞株 SPC-A-1, GLC-82, A549, L78 计数按  $1 \times 10^4$  个/孔接种于 24 孔板。24 h 后, 加入不同剂量的阳离子脂质体:pCMV $\beta$  复合物。在 37  $^{\circ}$ C,  $\varphi = 5\%$  的 CO<sub>2</sub> 孵育箱中孵育 5~6 h 后, 吸去脂质体复合物, 加入完全培养基培养 40 h 后, 检测  $\beta$ -gal 的表达。

pCMV $\beta$  中 Lac Z 基因表达  $\beta$ -gal 的检测采用  $\beta$ -gal 染色试剂盒(宝灵曼公司), 根据说明书的要求进行操作。于转染后 40 h, 固定细胞, 加 X-gal, 显微镜下每孔随机选取 5 个视野, 计数蓝色细胞占总细胞数的百分率。每组设 3 个复孔。所有的转染效率用蓝色细胞的百分率均值  $\pm$  标准差表示。

### 1.6 统计学分析

采用 SPSS 9.0 统计软件包进行。

## 2 结 果

### 2.1 阳离子脂质体:pCMV $\beta$ 复合物对 DNase I 的敏感性

裸 DNA 及脂质体:DNA 复合物随 DNase I 消化时间的不同, DNA 被降解的程度也不同。裸 DNA 迅速被 DNase I 降解, 消化 2 h 后, 全部降解为小片段。而脂质体对 DNA 有明显的保护作用, 当脂质体(DC-Chol:Chol):DNA 的电荷比率(+/-)为 3:1 时, DNase I 消化 2 h, 只有极少量 DNA 被降解; 当电荷比率为 4 时, DNA 可完全抵抗 DNase I 的降解作用。

### 2.2 阳离子脂质体:DNA 的电荷比率(+/-)对基因转染效率的影响

在不同的阳离子脂质体(DOSPER):DNA 电荷比率(+/-)下, 肺癌细胞 SPC-A-1 转染 pCMV $\beta$  的效率见图 1。当电荷比率(+/-)为 3:1 时, 转染效率最高, 经 LSD 统计检验,  $P < 0.05$ ,  $n$

=3。当脂质体:DNA 的电荷比率继续增加到 5:1 时,转染效率则不再增加,  $P > 0.05$ ,  $n = 3$ 。而且高浓度的脂质体会对细胞产生一定的毒性。

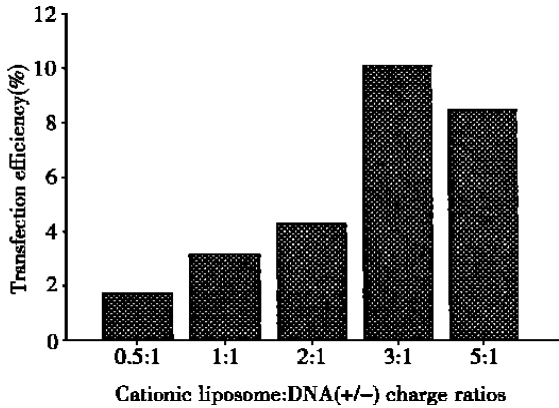


图1 阳离子脂质体:DNA 的电荷比率(+/-)对基因转染效率的影响

Fig. 1 Influence of cationic liposome:DNA (+/-) charge ratios on transfection efficiency

### 2.3 DNA 的转染剂量对基因转染效率的影响

对于不同的肺癌细胞株,达到最高基因转染效率时的 DNA 剂量基本相同,结果见图 2。在 24 孔培养板, pCMV $\beta$  的最适转染剂量为 4  $\mu\text{g}/\text{孔}$ 。其中,介导 SPC-A-1 细胞的转染效率达 12.7% (125/820)。

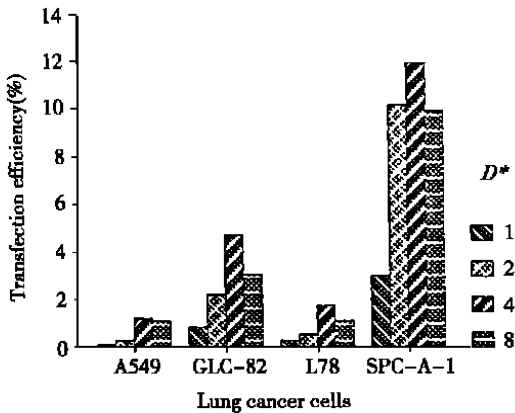


图2 pCMV $\beta$  的转染剂量对肺癌细胞基因转染效率的影响

Fig. 2 Influence of the dosages of transfected pCMV $\beta$  on transfection efficiency

\* D (Per well of 24-well plate)/ $\mu\text{g}$

### 2.4 脂质体类型对肺癌细胞基因转染效率的影响

不同的阳离子脂质体对不同类型的肺癌细胞株的基因转染效率不同。按脂质体:DNA 的电荷比率(+/-)为 3:1, pCMV $\beta$  的剂量为 4  $\mu\text{g}/\text{孔}$  (24 孔板)进行转染。不同的阳离子脂质体的转染效率

高低顺序为: DOSPER > ESCORT > DC-Chol:Chol, 组间差异经 Duncan 检验,  $P < 0.05$ ,  $n = 3$ 。而肺癌细胞株对 pCMV $\beta$  的转染敏感性为 SPC-A-1 > GLC-82 > L78 > A549, 组间差异同样采用 Duncan 检验,  $P < 0.05$ ,  $n = 3$ 。

## 3 讨论

阳离子脂质体载体是迄今为止转染效率最高且毒性最小的非病毒载体之一。阳离子脂质体作为基因载体的应用前景主要取决于脂质体在体内的稳定性,与靶细胞的选择性作用,基因释放入靶细胞内的效率及基因的有效表达。目前商业化的阳离子脂质体产品已有 30 多种,已有效地将功能性基因在体内导入气管细胞,心脏,大脑,肿瘤,肺和其它组织,并正应用于临床基因治疗<sup>[7]</sup>。阳离子脂质体似乎特别适宜于一些组织,如肺和肿瘤组织的基因转移。当静脉给予阳离子脂质体:DNA 复合物进行体内基因转移时,目的基因表达水平最高的器官是肺<sup>[8]</sup>。肺有一个很大的上皮表面,脂质复合物通过气雾剂或气管内/鼻内滴注法进入相对比较容易,经肺与呼吸道为目标的基因治疗逐步得到重视<sup>[9]</sup>。因此,本实验通过优化转染条件,提高阳离子脂质体介导的肺癌细胞基因转染效率,为其进一步用于肺癌的基因治疗打下基础。

阳离子脂质体介导的基因转移机制目前还没有完全阐明。现在普遍接受的是内吞途径假说<sup>[10]</sup>。但阳离子脂质体:DNA 复合物与细胞膜的最初作用是静电作用。因此,脂质复合物的净电荷起重要作用。本实验结果表明,尽管当脂质体:DNA 的电荷比率(+/-)为 0.5 时,大部分的 DNA 已被保护,但只有当电荷比率为 3:1 时,肺癌细胞基因转染才能达到最佳效果。

影响阳离子脂质体介导的基因转染效率的另一个因素是 DNA 的转染剂量。不同的细胞对转基因的敏感性不同。对于肺癌细胞株 SPC-A-1, GLC-82, A549, L78,最佳的转基因剂量均为 4  $\mu\text{g}/\text{孔}$  (24 孔板)。事实上,过多的 DNA 会抑制基因的转染。

本实验显示,脂质体的类型及细胞类型对基因转染效率起重要作用。本实验采用 3 种不同结构的阳离子脂质体 DC-Chol, ESCORT, DOSPER, 其中胆固醇衍生物 DC-Chol 转染效率最低,而带多价极性精胺头部的 DOSPER 转染效率最高,阳离子

去垢剂 ESCORT 介于二者之间。而对于不同类型的肺癌细胞,在相同的基因转染条件下,DOSPER 介导SPC-A-1 细胞的基因转染效率可达(11.9 ± 0.9)%。而对 A549 细胞株的转染效率只有(1.2 ± 0.2)%。对产生这些差异机制的研究,将有助于了解阳离子脂质体的转基因机制及进一步改善其转基因效率。

#### 参考文献:

- [1] Lee R J, Huang L. Lipidic vector system for gene transfer [J]. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 1997, 14(2): 173.
- [2] Griesenbach U, Chonn A, Cassady R, *et al*. Comparison between intratracheal and intravenous administration of liposome-DNA complexes for fibrosis lung gene therapy [J]. *Gene Ther*, 1998, 5(2): 181.
- [3] Zou Y Y, Zong G, Li Y H, *et al*. Effective treatment of early endobronchial cancer with regional administration of liposome-p53 complexes [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1998, 90(15): 1130.
- [4] Felgner J H, Kumar R, Sridhar C N, *et al*. Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(4): 2556.
- [5] Zelphat O, Nguyen C, Ferrati M, *et al*. Stable and monodisperse lipoplex formulations for gene delivery [J]. *Gene Ther*, 1998, 5(9): 1271.
- [6] Ferrari M E, Nguyen C M, Zelphat O, *et al*. Analytical methods for the characterization of cationic lipid-nucleic acid complexes [J]. *Hum Gene Ther*, 1998, 9(3): 341.
- [7] Heo D S, Yoon S J, Kim W S, *et al*. Locoregional response and increased natural killer activity after intratumoral injection of HLA-B7/B-2 Microglobulin gene in patients with cancer [J]. *Gene Ther*, 1999, 9(14): 2031.
- [8] Mahato R I, Anwer K, Tagliaferri F, *et al*. Biodistribution and gene expression of lipid/plasmid complexes after systemic administration [J]. *Hum Gene Ther*, 1998, 9(4): 2083.
- [9] Scheule R K. Gene therapy for lung cancer: an application for cationic lipid-mediated gene delivery? [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1998, 90(15): 1118.
- [10] Friend D S, Papahadjopoulos D, Debs R J, *et al*. Endocytosis and intracellular processing accompanying transfection mediated by cationic liposomes [J]. *Biochem Biophys Acta*, 1996, 1278(1): 41.

(编辑 张敏瑞)

#### ·简讯·

### 傅茂博士的研究表明 CART 和 PPAR- $\gamma$ 基因与肥胖和 2 型糖尿病的关系

中山医科大学孙逸仙纪念医院博士后傅茂在傅祖植教授指导下,首次在国内探讨 CART(可卡因-安非他明调节转录肽)基因、PPAR- $\gamma$ (过氧化物酶增殖体激活受体)基因与肥胖和 2 型糖尿病的关系,研究未发现这两种基因的多态性与肥胖和 2 型糖尿病关联。肥胖和 2 型糖尿病之间存在密切关系,其病因和发病机理尚未完全阐明,成为目前国内外研究热点之一。流行病学调查显示两者是遗传因素和环境因素共同作用的结果。傅茂博士的研究以 401 例无亲缘关系的华南地区汉族人为研究对象,包括 76 例正常体重正常糖耐量者、104 例单纯性肥胖正常糖耐量者、221 例 2 型糖尿病患者,分别用 PCR-SSCP 和 PCR-RFLP 法对 CART 和 PPAR- $\gamma$  基因的多态性进行研究,发现这两种基因的多态性与肥胖和 2 型糖尿病无明显关联,但发现中国人 PPAR- $\gamma$  2 的 Pro12Ala 多态性的基因型和等位基因频率与日本人相似,而与欧美人群不同,存在着种族差异,PPAR- $\gamma$  2 基因 Pro12Ala 的多态性以 PP 基因型分布为主;与腰围和腰臀比呈正相关,提示 PPAR- $\gamma$  2 基因 Pro12Ala 的变异与糖尿病患者的腹型肥胖相关联。本研究在国内首先探讨了 CART 和 PPAR- $\gamma$  基因与肥胖和 2 型糖尿病的关系,为研究肥胖和 2 型糖尿病病因和发病机理提供了实验数据。

(冯世容)