

MT 肽修饰阳离子脂质体作为新型基因载体的体外细胞学评价

鹿月, 宋宝慧, 陈大为*

(沈阳药科大学药学院, 辽宁沈阳 110016)

摘要: 目的 通过体外细胞学实验对 MT 肽修饰的阳离子脂质体进行基因载体递送能力的评价。方法 通过点击反应制备 DSPE-PEG₂₀₀₀-MT 用于修饰阳离子脂质体, 并通过¹H-NMR 对 DSPE-PEG₂₀₀₀-MT 进行结构表征。以能够表达增强型绿色荧光蛋白的 pEGFP-C1 报告基因为模型基因, 首先通过琼脂糖凝胶电泳实验进行复合物包封率测定, 选出最佳质量比, 然后应用 A549 细胞对其进行细胞毒性评价、报告基因转染与表达研究, 以及细胞摄取实验。以 PEG₂₀₀₀ 修饰阳离子脂质体和空白阳离子脂质体为对照, 充分研究 MT 肽修饰阳离子脂质体作为基因递送系统的潜力。结果 MT 肽修饰阳离子脂质体(cationic liposomes modified by DSPE-PEG₂₀₀₀-MT, MCL)对比参照阳离子脂质体(cationic liposomes, CL; cationic liposomes by DSPE-PEG₂₀₀₀, PCL)具有更高的稳定性及包封率; 并通过细胞毒性实验验证 MT 肽修饰阳离子脂质体的细胞毒性较低; 通过共聚焦显微镜和流式细胞仪验证该复合物具有更好的细胞摄取能力, 能够促进绿色荧光蛋白的表达; 而且通过时间、温度依赖性实验表明了该摄取行为与时间和温度有一定的关系。结论 MT 肽修饰的阳离子脂质体拥有较好的稳定性, 较低的细胞毒性以及更好的细胞摄取能力, 是一个十分有潜力的基因递送载体。

关键词: MT 肽; 阳离子脂质体; 基因递送; 细胞学研究

中图分类号: R 94 **文献标志码:** A

随着精准医学^[1]时代的到来, 基因治疗^[1-4]在临床应用中占有越来越重要的地位。基因治疗主要是通过载体将外源性遗传物质导入某些特定细胞实现的, 由此可见基因递送载体的选择是基因治疗的关键^[5-6]。阳离子脂质体^[7-9]是除去裸 DNA 外应用最为普遍的非病毒基因传导系统, 可适用于多种细胞系, 对 DNA 的负载率可高达 100%^[10-11]。阳离子脂质体主要由阳离子头部基团、疏水尾部和它们之间的连接基团 3 种成分构成, 常用的阳离子脂质体脂质膜材主要有阳离子脂质如: (2,3-二油酰基-丙基)-三甲基铵-氯盐 [(2, 3-dioleoyloxy-propyl)-trimethylammonium-chloride, DOTAP]、N-(2-精胺甲酰基)-N', N'-双十八烷基甘氨酸酰胺 [N-(2-sperminoformyl)-N', N'-didecacylglyceramide, DOGS]、氯化三甲基-2,3-二油烯氧基丙基铵 (trimethyl-2,3-dioleenoxy propyl ammonium chloride, DOTMA), 中性脂质如: 胆固醇、二油酰磷脂酰乙醇胺

(dioleoylphosphatidylethanolamine, DOPE) 等。阳离子脂质体具有生物相容性、细胞亲和性, 可以通过实体瘤组织的高通透性和滞留效应 (enhanced permeability and retention effect, 简称 EPR 效应) 靶向至肿瘤细胞^[12-13]。然而阳离子脂质体协载基因之后的不稳定性, 低细胞摄取量以及在细胞内容易被网状内皮系统 (reticuloendothelial system, RES) 识别并吞噬等问题也进一步阻止了阳离子脂质体在基因递送系统中的应用^[14]。因此本文作者选用一种类似于细胞穿膜肽^[15]的 MT 肽, 该多肽具有正电性, 能够修饰阳离子脂质体后更有效地压缩 DNA, 其次该多肽拥有一段多聚精氨酸和多聚赖氨酸序列, 该序列能够促进复合物的细胞摄取^[16-18]。因此作者通过点击反应^[19]合成 DSPE-PEG₂₀₀₀-MT 用于修饰阳离子脂质体, 经过修饰的阳离子脂质体包裹 DNA 后的稳定性明显增强, 而且 PEG^[20-22]的修饰能够避免被 RES 系统识别并吞噬, 而 MT 肽具有的类似于多聚氨

收稿日期: 2019-03-23

作者简介: 鹿月 (1994-), 女 (汉族), 吉林通化人, 硕士研究生, E-mail 1046840842@qq.com; * 通信作者: 陈大为 (1958-), 男 (汉族), 辽宁沈阳人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事肿瘤免疫治疗、基因治疗等药剂学研究, Tel. 024-43520541, E-mail chendawei@syphu.edu.cn。

基酸序列能够有效地促进细胞摄取;作者采用报告基因 pEGFP-C1 表达的绿色荧光蛋白来验证该基因递送载体的递送效率。

1 仪器与材料

旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂), JY9222D 超声波细胞粉碎机(宁波新芝科器研究所), HE-120 多功能水平电泳槽、Tanon 2500R 全自动数码凝胶图像分析系统(上海天能科技有限公司), Varioskan Flash 多功能酶标仪(美国 Thermo 科技公司), 共聚焦激光扫描显微镜(Confocal laser scanning microscope, CLSM, 日本 Olympus 公司), 流式细胞仪(美国 BD 生物科技有限公司)。

DOTAP、胆固醇(上海艾伟特医药科技有限公司), 大豆磷脂(soybean phospholipid, 上海泰威药业有限公司), α -(1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺)-甲基-MT(乙二醇)-2000(DSPE-PEG₂₀₀₀-Mal)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000](DSPE-PEG₂₀₀₀)(上海芄硕生物科技有限公司), 多肽 MT-Cys(上海淘普生物科技有限公司), 氯仿(天津孵育精细化工有限公司), Hepes 缓冲液、3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑溴化物[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT](美国 Sigma 生物科技有限公司), Hoechst33258 和溴化乙锭(ethidium bromide, EB, 大连美伦生物科技有限公司), DMEM 培养基、胎牛血清、塑料细胞培养板、质量分数 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 和卡那霉素(美国 Gibco 公司)。

2 方法

2.1 DSPE-PEG₂₀₀₀-MT 的合成

按照物质的量比为 1.5:1 分别称取 DSPE-PEG₂₀₀₀-Mal 和末端修饰巯基的 MT 肽(MT-Cys)。首先将 DSPE-PEG₂₀₀₀-Mal 溶解在 5 mL 氯仿中, 32 °C 旋蒸除氯仿, 用 Hepes 缓冲液 3 mL 水化 5 min, 待瓶壁上的 DSPE-PEG₂₀₀₀-Mal 完全水化下来, 加入 MT-Cys 肽至反应瓶中, 维持温度为 25 °C, 搅拌, 氮气保护, 过夜。

2.2 多肽修饰阳离子脂质体的制备

采用薄膜分散法^[23]分别制备空白阳离子脂质体(CL), DSPE-PEG₂₀₀₀ 修饰阳离子脂质体(PCL)和 DSPE-PEG₂₀₀₀-MT 修饰阳离子脂质体(MCL)。(1)空白阳离子脂质体, 精密称取

DOTAP、胆固醇、磷脂(质量比 4:1:2)溶于 5 mL 氯仿和甲醇混合溶液(体积比 4:1)中, 32 °C 旋转蒸发除去氯仿。在 60 °C 水浴中加入 3 mL 预热至同温度的 Hepes 缓冲液水化 10 min, 即得脂质体混悬液。通过超声波细胞粉碎机对脂质体进行超声(200 W, 3 min), 过 0.22 μ m 聚碳酸酯膜, 得空白阳离子脂质体(CL)。(2)DSPE-PEG₂₀₀₀ 修饰阳离子脂质体, 精密称取 DOTAP、胆固醇、磷脂、DSPE-PEG₂₀₀₀(质量比 4:1:2:0.04)溶于 5 mL 氯仿和甲醇混合溶液(体积比 4:1)中, 32 °C 旋转蒸发除去氯仿。随后除将水浴温度改为 45 °C, 其余同上, 即得 DSPE-PEG₂₀₀₀ 修饰阳离子脂质体(PCL)。(3)DSPE-PEG₂₀₀₀-MT 修饰阳离子脂质体, 与 DSPE-PEG₂₀₀₀ 修饰脂质体制备方法一致, 需注意将 DSPE-PEG₂₀₀₀ 替换为 DSPE-PEG₂₀₀₀-MT, 即得 DSPE-PEG₂₀₀₀-MT 修饰的阳离子脂质体(MCL)。

2.3 MCL 形态学表征

采用 Malvern 激光粒度仪测定 MCL 的粒径。取 MCL 200 μ L, 用蒸馏水稀释至 2 mL, 加入样品池, 测定粒径; 采用 Malvern 电位分析仪测定其 Zeta 电位, 同样取 MCL 200 μ L, 用蒸馏水稀释至 2 mL, 加入样品池, 测定 Zeta 电位。

2.4 pDNA-阳离子脂质体复合物的制备

pDNA 和 CL、PCL、MCL 用 PBS 稀释至不同浓度, 分别将不同浓度的 CL、PCL、MCL 脂质体混悬液与 pDNA 等体积混合, 得到 DOTAP 与 pDNA 质量比分别为 0:1、1:1、5:1、10:1、15:1、30:1 的混合溶液。涡旋 1 min, 室温孵育 40 min, 即得到 pDNA 和不同阳离子脂质体不同质量比的复合物 CLP(cationic liposomes with pDNA)、PCLP(cationic liposomes modified by DSPE-PEG₂₀₀₀ with pDNA) 和 MCLP(cationic liposomes modified by DSPE-PEG₂₀₀₀-MT with pDNA)。

2.5 琼脂糖凝胶电泳试验

称取 EB 0.1 g, 溶解于 0.5 \times TBE(Tris 硼酸由 10.8 g \cdot L⁻¹ Tris, 5.5 g \cdot L⁻¹ 硼酸和 0.744 g \cdot L⁻¹ Na₂EDTA \cdot 2H₂O 构成)中, 定容至 10 mL, 即得 EB 溶液; 称取琼脂糖 0.35 g, 加入 50 mL 0.5 \times TBE, 置于加热套上加热至全溶, 精密吸取 EB 溶液 1 μ L 加入凝胶中混合均匀, 倒入模具中, 待冷却至室温即可。将上述所制得的不同 pDNA-阳离子脂质体复合物分别与 5 \times 10⁵ mg \cdot L⁻¹ 蔗糖溶液 2 μ L 混合均匀, 即可进行电泳(100 V, 100 A, 40 min), 然后于全自动数码凝胶图像分析系统中

成像分析。

2.6 细胞培养

实验室冻存人非小细胞肺癌细胞 A549, 培养于包含体积分数 10% 血清和 $1 \times 10^4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 双抗的 DMEM 培养液中, 并保持培养温度为 37°C , 维持一定的湿度及体积分数 5% 的 CO_2 浓度。

2.7 细胞毒性试验

A549 细胞接种于 96 孔板(每孔 5×10^3 个细胞), 并培养过夜。弃去上清液, 加入不同的 pDNA-脂质体复合物分别于体积分数 5% CO_2 、饱和湿度、 37°C 培养 24 h 和 48 h。然后加入 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MTT 溶液 $20 \mu\text{L}$ 继续培养 4 h, 弃去上清液, 每孔加入 $150 \mu\text{L}$ DMSO 震荡 5 min, 用实验中心多功能酶标仪在 490 nm 波长处测定吸光度值(OD), 然后用公式: 细胞存活率 = $(\text{OD}_{\text{实验组}} - \text{OD}_{\text{空白组}}) / (\text{OD}_{\text{对照组}} - \text{OD}_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 计算细胞存活率。

2.8 报告基因转染与表达研究

A549 细胞接种于铺有盖玻片的 6 孔板中(每孔 3×10^5 个细胞), 培养过夜。弃去上清液, PBS 清洗两遍之后加入不同浓度的 pDNA-MCL 无血清培养液, 并保证每孔 pDNA 的量为 $5 \mu\text{g}$, 继续于 37°C 、体积分数 5% CO_2 环境下培养 24 h。弃去上清液, PBS 清洗 3 遍后, 用多聚甲醛固定 30 min。继续用 PBS 清洗 3 遍, 随后用 Hoechst 33258 ($10^{-2} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 染核 10 min, 小心吸取染料, 加入 PBS 清洗 3 遍, 每次 10 min。取出盖玻片, 反压在载玻片上, 用甘油-PBS 混合液(体积比 1:1)封片, 于共聚焦显微镜下观察并拍照。

2.9 复合物细胞摄取研究

2.9.1 共聚焦显微镜用于细胞摄取定性分析

A549 细胞接种于含有盖玻片的 6 孔板中(每孔 3×10^5 个细胞)孵育过夜。弃去上清液, 加入含有不同 pDNA-脂质体复合物的无血清培养液(每孔 pDNA $5 \mu\text{g}$), 继续在 37°C 、体积分数 5% CO_2 环境下培养 24 h。余下操作见“2.6”条方法。

2.9.2 流式细胞仪用于细胞摄取定量分析

A549 细胞接种于 6 孔板中(每孔 5×10^5 个细胞), 于 DMEM 完全培养基中培养至细胞覆盖面积为 80% 左右, 弃去上清液, 加入含有不同 pDNA-脂质体混合物的无血清培养液(每孔 pDNA $5 \mu\text{g}$)继续培养 24 h。冷 PBS 清洗 3 遍, 加入胰酶消化, 于 $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 将细胞吸出, 分散于 $500 \mu\text{L}$ PBS 溶液中, 过筛网至流式管内, 通过流式细胞仪进行摄取情况分析。

2.9.3 复合物摄取行为的时间、温度依赖性分析

A549 细胞接种于 6 孔板中(每孔 5×10^5 个细胞), 于 DMEM 完全培养基中培养至细胞覆盖面积为 80% 左右, 弃去上清液, 加入含有不同 pDNA-脂质体复合物的无血清培养液(每孔 pDNA $5 \mu\text{g}$)分别继续培养 1、4、8、12 和 24 h。冷 PBS 清洗 3 遍, 加入胰酶消化, 于 $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 将细胞吸出, 分散于 $500 \mu\text{L}$ PBS 溶液中, 过筛网至流式管内, 通过流式细胞仪进行摄取分析; A549 细胞接种于 6 孔板中(每孔 5×10^5 个细胞), 于 DMEM 完全培养基中培养至细胞覆盖面积为 80% 左右, 弃去上清液, 加入含有不同 pDNA-脂质体复合物的无血清培养液(每孔 pDNA $5 \mu\text{g}$)分别于 4°C 、 25°C 和 37°C 条件下继续培养 4 h, 冷 PBS 清洗 3 遍, 加入胰酶消化, 于 $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 将细胞吸出, 分散于 $500 \mu\text{L}$ PBS 溶液中, 过筛网至流式管内, 通过流式细胞仪进行摄取分析。

3 结果与讨论

3.1 DSPE-PEG₂₀₀₀-MT 结构表征

通过 DSPE-PEG₂₀₀₀-Mal 和 MT-Cys 肽之间进行硫醇-迈克尔加成反应得到 DSPE-PEG₂₀₀₀-MT。结果见图 1, DSPE-PEG₂₀₀₀-Mal 中马来酰亚胺的信

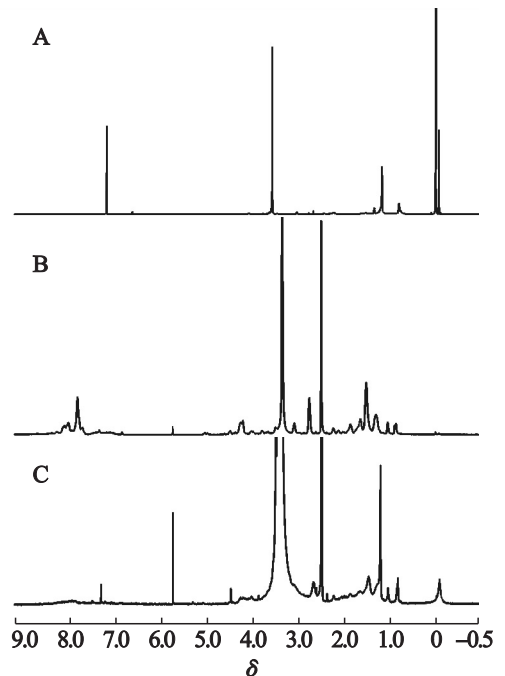


Fig. 1 $^1\text{H-NMR}$ spectra of DSPE-PEG₂₀₀₀-Mal (A), MT-cys (B) and DSPE-PEG₂₀₀₀-MT (C)

图 1 DSPE-PEG₂₀₀₀-Mal (A), MT-cys (B) 和 DSPE-PEG₂₀₀₀-MT (C) 的核磁共振氢谱 ($^1\text{H-NMR}$)

号峰 δ 6.7 消失,且 δ 7.0~8.0 处出现 MT 肽信号峰 (-NHCO-),而 δ 3.5 为 PEG 中 -OCH₂CH₂O- 信号峰, δ 2.0~3.0 为 DSPE 中的 -CH₂CH₂CO- 信号峰,以上成功证实了 DSPE-PEG₂₀₀₀-MT 的合成。

3.2 MCL 制剂学表征

基因递送载体的大小、电位以及形态都会对

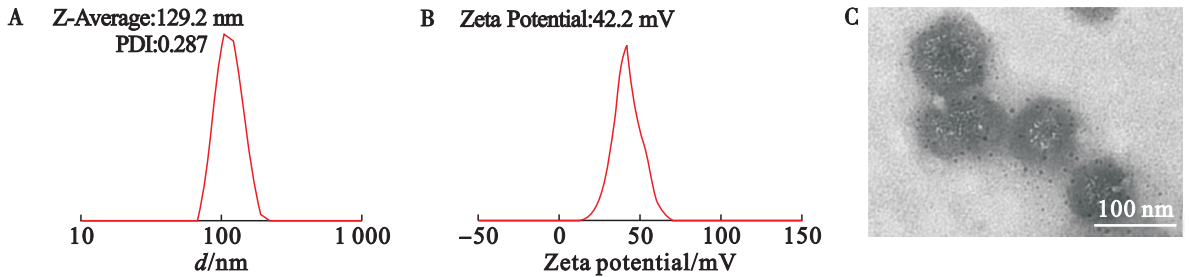


Fig. 2 The Z-Average (A), the Zeta potential (B) and the TEM picture (C) of cationic liposomes modified by MT peptide (MCL)

图2 MT 肽修饰阳离子脂质体(MCL)粒径(A)、电位(B)、透射电镜图(C)

3.3 pDNA-阳离子脂质体复合物稳定性表征

在质粒DNA的结构中存在很多磷酸基团,因此DNA分子呈负电性,当加入外加电场时,根据同性相斥的原则,DNA分子可以从负极向正极移动。而溴化乙锭溶液能够特异性与DNA分子结合,形成DNA-EB复合物,增强EB的荧光强度,经过凝胶电泳之后,在紫外灯下可以呈现十分强烈的荧光条带,从而在凝胶成像系统中进行分析。如图3所示,随着质量比的增加,不同载体包封DNA的能力逐渐增加。而对比三组复合物,复合物PCLP稳定性最差,可以看到当质量比为30:1时仍然有DNA条带跑出,说明该载体并不能很好地包封住质粒DNA,这是因为当阳离子脂质体修饰PEG₂₀₀₀时正电性略有下降,不能很好地包裹带负电的质粒DNA;而空白阳离子脂质体能够在质量比为30:1时阻滞大部分DNA条带;相比之下,复合物MCLP在质量比为10:1时即看不到DNA条带跑出,说明MCLP对DNA具有很好的压缩能力。

3.4 载体体外细胞毒性研究

细胞内低毒性是基因递送载体不可或缺的条件。通过MTT实验,测定载体在A549细胞内于24和48h培养下的细胞存活率。测定结果见图4,当孵育24h时(图4A),随着不同载体的浓度的增加,细胞存活率逐渐下降,在载体质量浓度为10~500 mg·L⁻¹时,MCL的细胞存活率基本上略低于CL和PCL,这与其制剂学表征结果一致,在电位测定结果中,可以知道MCL的正电位最强,

其细胞毒性和细胞摄取行为产生影响,因此对该载体进行制剂学评价是研究过程中不可或缺的一步。如图2所示,MCL粒径为129.2 nm、电位为42.2 mV,且电泳图显示该阳离子脂质体分布均匀,且呈近似球形。

CL次之,修饰有PEG的阳离子脂质体的正电位最低,所以细胞毒性也就最弱,MCL具有最高的正电位,也即是细胞毒性最强,但是我们可以看到即使在质量浓度为500 mg·L⁻¹时,不同载体的细胞存活率仍能达到80%以上,也就是说载体的细胞毒性并不影响细胞的正常行为。相比之下,当孵育48h(图4B)时,不同载体的细胞存活率明显下降,而且当质量浓度达到500 mg·L⁻¹时,细

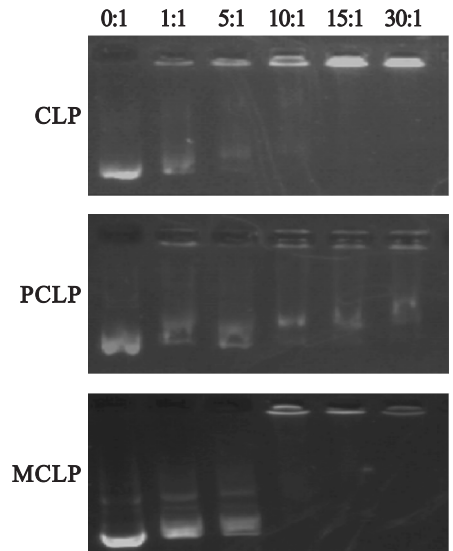


Fig. 3 Electrophoresis imaging of different lipoplexes (CLP,PCLP,MCLP) with mass ratios 0:1,1:1,5:1,10:1,15:1,30:1 at the parameter of 100 V,100 A,40 min

图3 CLP、PCLP、MCLP不同复合物分别在质量比为0:1、1:1、5:1、10:1、15:1和30:1时进行琼脂糖凝胶电泳图(100 V,100 A,40 min)

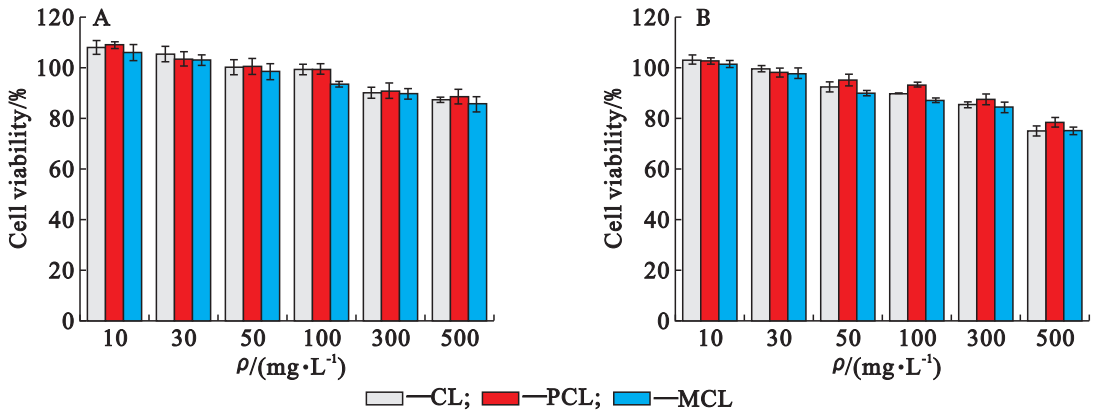


Fig. 4 The cell viability of CL, PCL, MCL at the concentration of 10, 30, 50, 100, 300 and 500 µg in A549 cells of 24 h (A) and 48 h (B)

图4 CL, PCL, MCL 分别在其浓度为 10、30、50、100、300 和 500 µg 时,在 A549 细胞中的 24 h (A) 和 48 h (B) 的细胞存活率。细胞存活率已经下降到 75%,但是当不同载体质量浓度为 10 ~ 300 mg·L⁻¹ 时,虽然 MCL 的细胞存活率仍基本上略低于 CL 和 PCL,但是其细胞存活率仍能达到 85% 以上,说明 MCL 作为基因递送载体并不会对细胞存活率造成明显影响,不会干扰接下来的细胞转染、表达、摄取研究。

3.5 体外转染与表达研究

体外细胞毒性考察之后,继续考察了 MCL 作为基因递送载体的促进基因转染与表达的能力。如图 5 所示,当没有载体存在时,基本上没有见到绿色荧光蛋白的表达,说明裸露的质粒不能实现基因的转染与表达;而随着质量比逐渐增大,绿色荧光蛋白的表达逐渐增加,当质量比为 10:1 时实现了最大表达量,而当质量比大于 10:1 时表达量略有下降。这可能是因为当质量比大于 10:1 时,阳离子脂质体应用增多,导致其细胞毒性有所增加,从而减少了细胞摄取,也就减少了绿色荧光蛋白的表达。

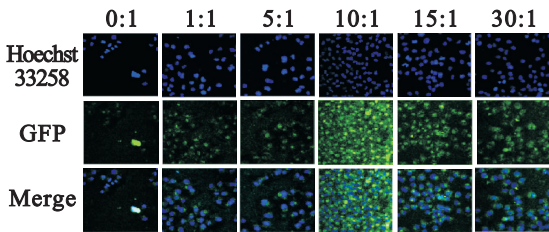


Fig. 5 LCSM (laser scanning confocal microscope) images of MCLP with different weight ratios. Green fluorescence presented green fluorescence protein, and blue fluorescence presented cell nucleus

图5 复合物 MCLP 在不同质量比条件下的体外转染与表达的共聚焦显微镜成像。绿色代表绿色荧光蛋白在细胞内的表达情况,蓝色代表由细胞核

3.6 CLP, PCLP, MCLP 不同复合物的体外转染与表达

确定复合物质量比为 10:1,测定不同复合物的体内转染与表达情况,分别应用共聚焦显微镜和流式细胞仪进行定性和定量测定,测定结果见图 6。如图 6A 所示,裸露的质粒在细胞内基本上没有表达,也就是说,裸露的质粒 DNA 在细胞内极不稳定,无法实现绿色荧光蛋白的成功表达;相比之下,CLP 能够实现部分绿色荧光蛋白的表达,说明阳离子脂质体具有一定的质粒 DNA 的压缩和保护能力,而且 CLP 组的绿色荧光蛋白表达量明显高于 PCLP,可能原因是 PCLP 由于有 PEG 修饰阳离子脂质体,PEG 上面部分负电荷导致阳离子脂质体表面正电性略有下降,而细胞膜带负电,即正负电相吸引的能力减弱,即可能会减少复合物的细胞摄取量,也就导致了绿色荧光蛋白的表达量减少。而 MCLP 组,由于在 PEG 的表面又修饰有富含正电荷的 MT 肽,即增强了其正电性,在保证其低细胞毒性的前提下增加其与细胞膜的正负电相吸引特性,即增加了复合物的细胞摄取量,从而绿色荧光蛋白表达量得到加强。另一方面,如图 6B 和图 6C 所示,绿色荧光蛋白的定量表达结果显示,与共聚焦测定结果一致, MCLP 表达量最高,CLP 表达量次之,而正电性最低的 PCLP 的绿色荧光蛋白表达量最低。从定性和定量的角度共同分析不同复合物之间,修饰有 MT 肽的阳离子脂质体修饰质粒 DNA 具有最大的细胞摄取量以及绿色荧光蛋白的表达量。

3.7 复合物 MCLP 的摄取与时间、温度依赖性研究

通过上述的研究可知 MCLP 具有很好的稳

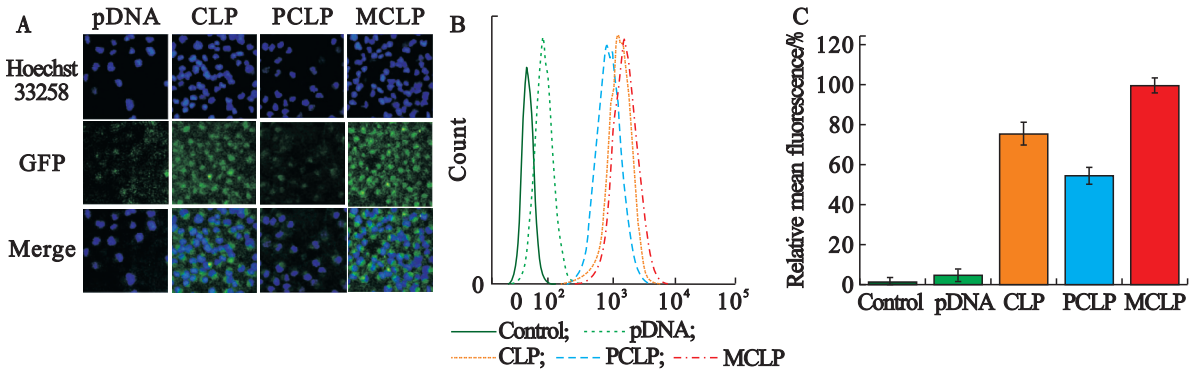


Fig. 6 CLSM images of CLP, PCLP, MCLP in 37 °C, certain humidity and CO₂ after incubation in A549 of 24 h (A). Green fluorescence presented green fluorescence protein, and blue fluorescence presented cell nucleus. The mean fluorescence intensity of flow cytometry of CLP, PCLP, MCLP in 37 °C, certain humidity and CO₂ after incubation in A549 of 24 h (B, C)

图6 复合物 CLP、PCLP、MCLP 分别于 37 °C、一定湿度和 CO₂ 条件下培养 24 h 时体外转染与表达的共聚焦显微镜成像(A), 绿色代表 pEGFP-C1 报告基因表达的绿色荧光蛋白, 蓝色代表细胞核; 复合物 CLP、PCLP、MCLP 分别于 37 °C、一定湿度和 CO₂ 条件下培养 24 h 后流式细胞仪测定的相对平均荧光强度值 (B, C)

定性、低细胞毒性、较高的细胞摄取量和绿色荧光蛋白表达量。接下来需要考察其细胞内摄取条件, 首先考察其在不同时间内的细胞摄取规律, 由图 7A 和图 7B 所示, 复合物在 1、4、8 和 12 h 的平均荧光强度依次递增, 而 24 h 时增加显著, 可以看到该复合物的细胞摄取具有明显的时间依赖

性; 又考察了该复合物的细胞摄取是否与温度有关, 细胞经过一夜的培养之后, 分别在 4 和 37 °C 条件下继续培养 4 h, 后续处理方法同“2.9.3”条方法, 得到图 7C 和图 7D, 当复合物在 4 °C 条件下培养 4 h 后, 其相对荧光强度明显较 37 °C 培养的复合物有所降低, 说明在 4 °C 时, 该复合物的细胞

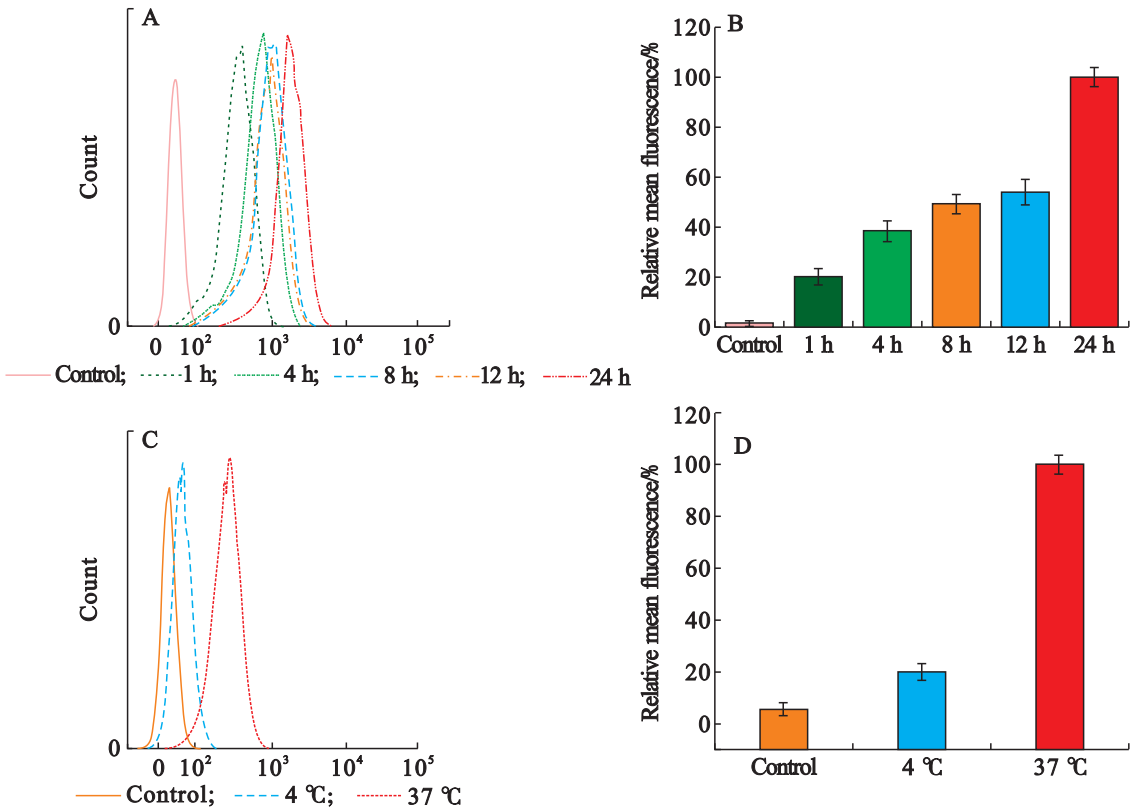


Fig. 7 The relative mean fluorescence of MCLP in 1, 4, 8, 12 and 24 h by flow cytometry (A, B). The relative mean fluorescence of MCLP in 4 °C and 37 °C by flow cytometry (C, D)

图7 MCLP 分别在 1、4、8、12 和 24 h 表达的绿色荧光蛋白的相对平均荧光强度 (A, B); MCLP 分别在 4 °C 和 37 °C 时表达的绿色荧光蛋白的相对平均荧光强度 (C, D)

摄取量有所下降,也就导致了其绿色荧光蛋白的表达量下降。也就是说 MCLP 作为基因递送载体,其细胞摄取行为是受到时间和温度影响的,时间越长摄取量越多,温度在 37 ℃ 时摄取量最大,而当温度在 4 ℃ 时,细胞摄取量受到明显的抑制。

4 结论

本研究以 DSPE-PEG₂₀₀₀-MT 修饰阳离子脂质体,旨在改善阳离子脂质体的基因递送能力,通过制剂学实验表明,MCLP 的形态圆整,分布均匀;通过琼脂糖凝胶电泳实验表明在细胞内具有良好的稳定性;并且通过流式细胞仪以及共聚焦显微镜分析可以知道该复合物能够很好的被细胞摄取,实现绿色荧光蛋白的表达,并且该摄取行为具有一定的时间及温度依赖性。也就是说 MCLP 作为基因递送载体具有良好的制剂学性质,良好的物理稳定性,并且能够实现有效的细胞摄取,表达绿色荧光蛋白,且该摄取行为与时间及温度都有一定的关系,是一种十分有潜力的基因递送载体。

参考文献:

- [1] WANG L S, WU Z Z. Cell therapy in the era of precision medicine [J]. *Journal of Precision Medicine (精准医学杂志)*, 2018, 33(2): 95-97, 101.
- [2] ZHANG H H, LIU Y F. Research progress of targeted gene delivery vector for tumor [J]. *Journal of Modern Oncology (现代肿瘤医学)*, 2019, 27(3): 165-169.
- [3] LI M, YANG Y J, KEBAI R, et al. Research progress of efficient gene targeting delivery system [J]. *Journal of International Pharmaceutical Research (国际药学研究杂志)*, 2017, 44(11): 29-37.
- [4] WANG Y, QI L Y, ZHANG C L, et al. Research progress of gene therapy drug delivery system [J]. *Progress in Pharmaceutical Science (药学进展)*, 2018, 42(12): 884-896.
- [5] YANG J, SUN F. Research progress of nucleic acid delivery vector for gene therapy [J]. *Journal of Shanxi Medical University (山西医科大学学报)*, 2018, 49(305): 98-103.
- [6] HANG X, DING G Y, DONG Q, et al. Research progress of liposome-based nanocarriers [J]. *Applied Chemistry (应用化学)*, 2018, 35(7): 735-744.
- [7] JIAO J, JIANG G P, DENG Y H. An overview of 50 years development of liposome drug delivery system [J]. *Journal of Shenyang Pharmaceutical University (沈阳药科大学学报)*, 2014, 31(9): 738-754.
- [8] DU Z Q, LI X W, ZHAO X F, et al. Preparation and evaluation of cationic liposomes containing adriamycin and siRNA *in vitro* [J]. *Journal of Shenyang Pharmaceutical University (沈阳药科大学学报)*, 2016, 33(11): 839-843, 920.
- [9] ZANG X L, LI J, LI X W, et al. Preparation of siRNA loaded cationic liposomes [J]. *Journal of Shenyang Pharmaceutical University (沈阳药科大学学报)*, 2015, 32(7): 510-514, 518.
- [10] ZHANG Y, ZHAN J Y, MENG K, et al. Cationic liposome and gene therapy [J]. *Neural Injury and Functional Reconstruction (神经损伤与功能重建)*, 2019, 14(1): 37-39.
- [11] LIANG J K, WU Z L, ZHANG H J. Advances in cationic nanocrystals as non-viral carriers for gene delivery of drugs [J]. *Chinese Journal of New Drugs (中国新药杂志)*, 2016, 25(22): 2562-2568.
- [12] FENG Y Y, HU H M. Research progress of cationic liposomes modified by different substances [J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical and Toxicology (中国药理学与毒理学杂志)*, 2018(6): 490-496.
- [13] GAO H, JU J, MA Q Q, et al. Cationic lipid material and its application in gene transfection [J]. *Northwest Pharmaceutical Journal (西北药学杂志)*, 2017, 32(6): 813-817.
- [14] ZANG X, DING H, ZHAO X, et al. Anti-EphA10 antibody-conjugated pH-sensitive liposomes for specific intracellular delivery of siRNA [J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2016, 11: 3951-3967.
- [15] YANG Y, YANG Y, XIE X, et al. Dual-modified liposomes with a two-photon-sensitive cell penetrating peptide and NGR ligand for siRNA targeting delivery [J]. *Biomaterials*, 2015(48): 84-96.
- [16] ROTH D M, MOSELEY G W, POUTON C W, et al. Mechanism of microtubule-facilitated "Fast Track" nuclear import [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(16): 14335-14351.
- [17] ROTH D M, MOSELEY G W, GLOVER D, et al. A microtubule-facilitated nuclear import pathway for cancer regulatory proteins [J]. *Traffic*, 2007, 8(6): 673-686.
- [18] JIA J Z, XI Z, KUI L, et al. Direct cytoplasmic delivery and nuclear targeting delivery of HPMA-MT con-

jugates in a microtubules dependent fashion [J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2016, 13(9): 3069 – 3079.

- [19] YU L. Application of sulfhydryl group click chemical reaction in polymer synthesis [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2018, 10(25): 21590 – 21600.
- [20] PENG Y, TANG Y N, ZHOU L L, et al. Advances in anti-tumor targeting of liposomes [J]. *Chinese Journal of New Drugs (中国新药杂志)*, 2018, 27(13): 1510 – 1514.
- [21] LI N. Study on multidrug resistance of docetaxel liposome modified by TPGS (TPGS 修饰的多西他赛脂质体抗肿瘤多药耐药的研究) [D]. Yinchuan:

Ningxia Medical University(宁夏医科大学), 2018.

- [22] JIU L Z, ZHOU Q D, SHUANG P, et al. Overcoming multidrug resistance by codelivery of MDR1-targeting siRNA and doxorubicin using EphA10-mediated pH-sensitive lipoplexes; *In vitro* and *in vivo* evaluation [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2018, 10(25): 21590 – 21600.
- [23] WANG L Y, LIN H Q, CHEN J W, et al. Research on novel cationic liposomes mediating gene transfer [J]. *China Pharmacy(中国药房)*, 2018, 29(15): 2152 – 2156.

The *in vitro* cytological evaluation of cationic liposome modified by MT peptide as a novel gene vector

LU Yue, SONG Baohui, CHEN Dawei*

(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: Objective To evaluate the gene delivery ability of cationic liposomes modified by MT peptide in vitro cytology experiments. **Methods** DSPE-PEG₂₀₀₀-MT was prepared by click reaction to modify cationic liposomes, and the structure of DSPE-PEG₂₀₀₀-MT was characterized by ¹H-NMR. The pEGFP-C1 reporter gene was capable of expressing enhanced green fluorescent protein and was used as a model gene. First, the agarose gel electrophoresis experiment was carried out to determine the encapsulation efficiency of the composite, and the best mass ratio was selected. Then A549 cells were used for cytotoxicity evaluation, reporter gene transfection and expression studies, and cell uptake experiments. PEG₂₀₀₀ modified cationic liposomes were compared with blank cationic liposomes to fully study the potential of MT peptide modified cationic liposomes as a gene delivery system. **Results** MCL (cationic liposomes modified by DSPE-PEG₂₀₀₀-MT) had higher stability and encapsulation efficiency than the reference complexes, and the cytological experiments confirmed that the MCLP could express green fluorescent protein more effectively, which was determined by confocal microscopy and flow cytometry. **Conclusion** MT peptide modified cationic liposomes has good stability, low cytotoxicity and higher cell uptake capacity, making them as a very potential gene delivery vehicle.

Key words: MT peptide; cationic liposomes; gene delivery; cytological study