

用酸敏脂质体将荧光染料导入 NIH3T3 细胞及人胚肺成纤维细胞

刘启光* 尹长城† 沈子威† 赵南明† 吴 旻*

(*中国医学科学院肿瘤研究所,†清华大学生物科学与技术系)

提 要

我们制备了由 DOPE/CHOL/OA(4:4:3) 组成的酸敏脂质体, 将荧光染料 Calcein 装载在脂质体内, 并将这种包有荧光染料的脂质体导入 NIH3T3 细胞和人胚肺成纤维细胞。90% 以上的细胞有荧光物质进入, 并均匀分布于细胞质。我们还制备了由 DOPC/CHOL/OA(4:4:3) 组成的非酸敏脂质体, 其将荧光物质导入细胞的能力不如前者好。本文使用的冷冻干燥法制备脂质体, 方法比较温和、所得到的脂质体有利于携带 DNA 或其它生物活性物质。

脂质体是由磷脂分子形成的微球体。生物活性物质或药物分子可被包裹在微球体内部空间。脂质体可通过内吞或与细胞膜融合进入细胞, 因而脂质体作为将生物活性物质或药物分子导入细胞的载体而得到广泛应用。

脂质体作为基因载体, 已有一些报道。Fraley 等^[1]用脂质体将 SV40 DNA 成功地导入猴肾细胞。Weng 等^[2]用脂质体将细菌的 β -内酰胺酶 (β -lactamase) 基因片断导入 HeLa 细胞、宿主细胞内产生可测出量的 β -内酰胺酶。还有作者^[3]将含疱疹病毒胸苷激酶(TK)基因的重组 DNA 片断通过脂质体插入缺失 TK 的小鼠 L929 细胞, 并证明脂质体包裹的 DNA 的转化频率比常用的 DNA-磷酸钙法高 10—1000 倍。脂质体作为质粒 DNA 的载体也有报道, Fraley 等^[4]将 pBR322 DNA 通过脂质体导入 *E. coli*, 还有人报道用脂质体将整个染色体^[5]、甚至整个细胞核^[6]带入哺乳动物细胞。更加令人鼓舞的是, 已有报道^[3]将脂质体作为外源 DNA 体内导入的载体得到运用, 作者将编码前胰岛素原顺序的质粒 DNA 包于脂质体中, 大鼠接受静脉注射此种脂质体后, 胰岛素在肝中瞬时表达, 并伴随血糖水平的降低。总之, 脂质体作为基因载体越来越为人们所重视,

其前景是十分广阔的。

为了改进脂质体的运载效果, 人们选用各种不同磷脂成分制备脂质体。近来, 酸敏脂质体在一些实验室得到发展^[7]。本文制备了由 DOPE/CHOL/OA(4:4:3)组成的酸敏脂质体, 可有效地将装载在内部的水溶性荧光染料 Calcein 导入 NIH3T3 和人胚肺成纤维细胞, 荧光染料均匀分布在宿主细胞质, 我们并与非酸敏脂质体作了比较。

材 料 和 方 法

材料 二油酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE) 和二油酰磷脂酰胆碱 (DOPC) 购自美国 Avanti 公司, 油酸 (OA)、胆固醇 (CHOL) 及荧光素羧化衍生物 (Calcein) 购自美国 Sigma 公司。NIH3T3 细胞由美国 J. Cooper 教授赠送, 人胚肺成纤维细胞由本室冯骆同志赠送。DMEM 培养液购自美国 Life Technologies 公司, 血清购自天津市生化制品厂。

方法

脂质体的制备: DOPE、DOPC、CHOL 和 OA 分别溶于氯仿、浓度均为 10mg/ml、4℃ 存放待用。荧光染料溶于 1mol/L NaOH、浓度 333mmol/L, 4℃ 存放待用。

取 DOPE(DOPC): CHOL: OA (摩尔浓度)=4:4:3 混合, 脂的总量为 4.4 微摩尔, 用 N₂ 将氯仿吹干后悬浮在磷酸缓冲溶液中 (pH 8.0), 加 Calcein 后调整体积至 200 μ l, 使 Calcein 的终浓度为 50 mmol/L。水浴超声约 10 分钟, -60℃ 冷冻干燥过夜后, 加入 200 μ l 双蒸水重新水化。然后用生物胶 (Biogel 0.5M) 柱分离脂质体与游离荧光染料。得到的脂质体 4℃ 存放。

细胞培养: NIH3T3 和人肺细胞均为 3 天传代一次。培养液为含 10% 血清的 DMEM。使用的细胞为复苏后在体外传代不超过 3 个月的细胞。

脂质体被导入细胞: 将 NIH3T3 和人肺细胞在放有盖玻片的培养皿中传代, 37℃ 保温过夜。次日, 将细胞换液, 2 小时后用磷酸缓冲溶液洗细胞两次, 加含有脂质体浓度 (按脂成分计算) 为 75 μ g/ml 的 DMEM 培养液, 相当于 1 μ g 脂质体/10⁴ 细胞, 37℃ 保温 2 小时, 取出盖玻片, 用磷酸缓冲溶液洗细胞 10 次。实验分为三大组。

DOPE 组: 所加脂质体为 DOPE/CHOL/OA。

a. 只加 DOPE 脂质体。

b. 加 DOPE 脂质体的同时, 加 CaCl₂ 和 MgCl₂ 溶液, 按 Ca²⁺ 和 Mg²⁺ 的不同浓度分为 3 组。其中一组 Ca²⁺ 和 Mg²⁺ 的终浓度为 1 mmol/L, 另一组 Ca²⁺ 和 Mg²⁺ 的终浓度为 2 mmol/L, 最后一组 Ca²⁺ 和 Mg²⁺ 的终浓度为 5 mmol/L。

c. 加 DOPE 脂质体的同时, 加聚乙二醇, 其终浓度分别为 5% 及 11%。

DOPC 组: 所加脂质体为 DOPC/CHOL/OA。

a. 只加 DOPC 脂质体。

b. 加 DOPC 脂质体的同时, 加 CaCl₂ 和 MgCl₂ 溶液, 按 Ca²⁺ 和 Mg²⁺ 的不同浓度分为 2 组, 其中一组 Ca²⁺ 和 Mg²⁺ 的终浓度为 1 mmol/L, 另一组 Ca²⁺ 和 Mg²⁺ 的终浓度为 5 mmol/L。

c. 加 DOPC 脂质体的同时, 加聚乙二醇, 其终浓度分别为 5% 和 11%。

对照组: 加游离荧光染料 (未包进脂质体), 终浓度为 0.3 mmol/L。

细胞的观察及照像: 将洗好的培养细胞的盖玻片立即用 400× (Nikon, 日本) 显微镜观察。先在普通光源下观察并照像, 曝光时间 12 秒, 然后在同一视野下, 将光源换成荧光光源, 在荧光显微镜下观察荧光物质进入细胞的情况并照像, 曝光时间 80 秒。

计算吸收脂质体的细胞占总细胞的百分数: 用 400× 显微镜, 计算全视野中细胞总数后, 同视野下将普通光源换成荧光光源, 在荧光显微镜下计算带有荧光物质的细胞。如此任意选取 4 个视野, 计算平均值。

结果与讨论

用生物胶柱分离脂质体时, 淡红色的包有荧光染料的脂质体首先被洗脱, 与绿色的游离荧光染料没有任何交叉。荧光染料的被包裹率大约为 10%^[12]。我们使用的冷冻干燥法制备脂质体, 与通常使用的超声波法相比较, 得到的脂质体较大, 一般为 1000 Å, 适于包裹大分子物质。目前, 常用逆相蒸发法制备装载 DNA、酶及各种蛋白质等生物活性物质的脂质体, 用这种方法, 虽然能得到直径较大的脂质体, 但需使用大量有机溶剂, 往往会影响生物活性物质的活性, 而我们使用的冷冻干燥法, 不需要有机溶剂, 对被包裹物无损伤, 有利于制备运载大分子生物活性物质的脂质体。

显微镜观察, 加游离荧光染料的对照组, 细胞内未见荧光物质, 而实验组可见到 90% 以上细胞有荧光物质进入。在 DOPE 组, 清楚地见到细胞内的荧光物质 (图 1, 2 见图版 II), 而 DOPC 组, 虽然也可见到 90% 细胞有荧光物质进入, 但荧光强度明显弱于 DOPE 组 (由于荧光太弱, 故未拍照)。表明, 由 DOPC/CHOL/OA 组成的脂质体, 其内包物进入细胞的能力较由 DOPE/CHOL/OA 组成的脂质体差。我们过去也曾制备过各种不同成分的脂质体 (资料未发

表): DOPE/OA = 7:3; DOPE/OA = 8:2; DOPC/OA = 8:2; DOPE/CHOL/OA = 4:4:2; DOPE/CHOL/OA = 4:4:3; DOPC/CHOL/OA = 4:4:3, 并比较这些脂质体携带荧光物质进入细胞的能力。结果表明, 由 DOPE/CHOL/OA = 4:4:3 组成的脂质体携带荧光物质进入细胞的能力最好。

显微镜下可见到, 在 DOPE 组, 荧光物质均匀分布于细胞质(图 2 见图版 II), 说明脂质体进入细胞后, 荧光物质被释放进入细胞质。在 DOPC 组, 荧光物质多分布在细胞膜内面, 可能是由于脂质体进入细胞后, 分布在细胞膜内面, 荧光物质仍在脂质体内, 随脂质体聚集在细胞膜附近。制备脂质体的一个重要问题是脂质体如何将内包物释放进入细胞。有人为解决这一问题, 曾报道制备热敏脂质体^[7], 即对温度敏感的脂质体。这种脂质体, 当温度升高至 42℃ 左右, 便破裂而释放内包物。虽然肿瘤组织及炎症组织温度常较正常组织高, 因而热敏脂质体作为药物载体也曾得到一些应用^[8,9], 但由于高温易引起组织损伤, 故热敏脂质体的使用有很大局限性, 未被广泛采用。我们制备的由 DOPE/CHOL/OA 组成的脂质体是酸敏脂质体^[9], 这种脂质体在 pH < 6.5—6 时, 自动破裂而将内包物释放。所以, 在本文中, 由 DOPE/CHOL/OA 组成的脂质体进入细胞后, 在细胞内微酸的环境中, 脂质体破裂, 荧光物质被释放, 均匀分布在细胞质。但由 DOPC/CHOL/OA 组成的脂质体是非酸敏脂质体^[10], 在酸性条件下也不破裂, 因而观察到的荧光物质主要集中在贴近细胞膜处。由于酸敏脂质体的这种优越性, 在脂质体的制备中很受重视。一些研究脂质体的实验室根据需要研究制备不同的酸敏脂质体^[7,11]。本文根据 Wang 等^[10]的方法, 加以改进, 同时比较脂质体成分, 发现 DOPE/CHOL/OA = 4:4:3 较原方法 4:4:2 稍好。我们制备的酸敏脂质体可以将内包物有效地导入宿主细胞, 并均匀分布于细胞质中。

我们还看到, 在 DOPE 组, 当加 Ca²⁺ 和 Mg²⁺ 时, 无论其浓度是 1mmol/L, 2mmol/L,

5mmol/L, 荧光物质进入细胞的效率及在细胞内的分布, 均不比单纯的 DOPE 组有所提高(图 3 见图版 II)。DOPE+ 聚乙二醇, 无论聚乙二醇浓度是 5% 还是 11%, 荧光物质导入细胞的效果也不比单纯的 DOPE 组有所提高(图 4 见图版 II)。说明在 DOPE 组中, Ca²⁺、Mg²⁺、聚乙二醇这类膜融合剂没有增加脂质体进入细胞的效率。在 DOPC 组, 无论 Ca²⁺、Mg²⁺ 的浓度是 1mmol/L 或 5mmol/L, 也没有增加荧光物质进入细胞的效率。当加聚乙二醇时, 浓度为 5%, 没有明显改变荧光物质进入细胞的效率, 但当浓度为 11% 时, 荧光物质进入细胞的量较单纯的 DOPC 组大大提高。关于脂质体进入细胞的机制, 目前尚不十分清楚, 一般认为细胞通过内吞作用吞噬脂质体或脂质体膜与细胞膜融合而进入细胞。在 DOPE 组, 膜融合剂没有增加脂质体进入细胞的效率, 我们可以推测 DOPE 脂质体可能主要以内吞的途径进入细胞。在 DOPC 组, 浓度为 11% 的聚乙二醇明显提高脂质体进入细胞的量, 说明对于 DOPC 脂质体, 膜融合可能是脂质体进入细胞的重要途径之一。

参 考 文 献

- [1] Fraley, R. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1980, 225, 10431.
- [2] Wong, T-K et al.: *Gene*, 1980, 10, 87.
- [3] Ray Wu 等著, 张大达等译: 《生物工程新进展》, 科学技术文献出版社重庆分社, 重庆, 1985 年, 161—164。
- [4] Fraley, R. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1979, 76, 3348.
- [5] Mukherjee, A. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1978, 75, 1361.
- [6] Kondorosi, E. et al.: *FEBS Lett.*, 1980, 120, 37.
- [7] Connor, J. et al.: *J. Cell Biology*, 1985, 101, 582.
- [8] Yatvin, M. et al.: *Science*, 1978, 202, 1290.
- [9] Yatvin, M. et al.: *Science*, 1980, 210, 1253.
- [10] Wang, C-Y. et al.: *Plant Physiol.*, 1986, 82, 1.
- [11] Connor, J. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1984, 81, 1715.
- [12] Gregoriadis, G.: *Liposome Technology*, CRC Press Inc., Boca Roton Florida, 1985, 19—27.

【本文于 1988 年 4 月 14 日收到】

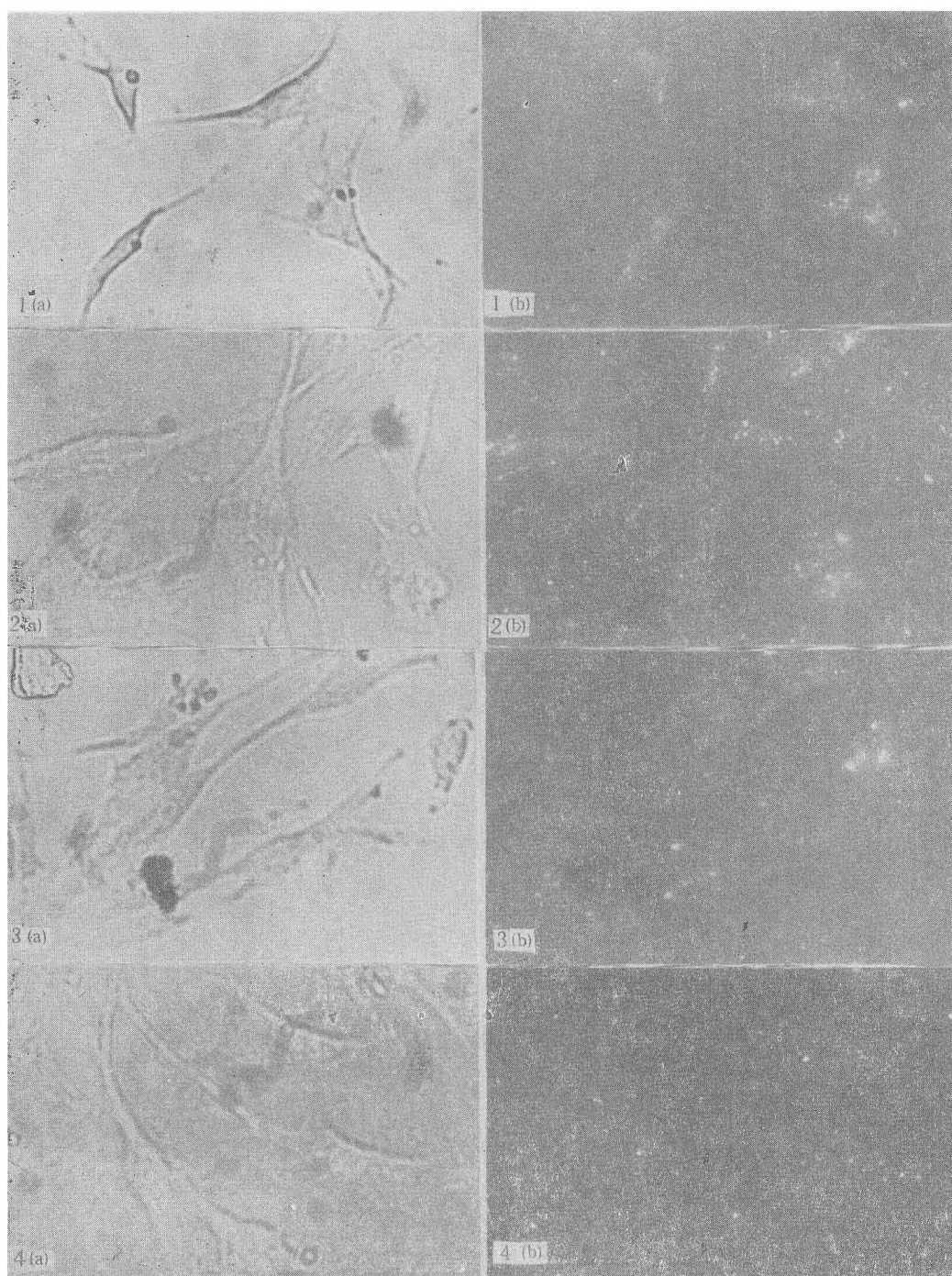


图 1 DOPE/CHOL/OA (4:4:3) 脂质体与 NIH3T3 细胞温育后
(a) 普通显微镜照像 (b) 荧光显微镜照像

图 2 DOPE/CHOL/OA (4:4:3) 脂质体与人胚肺成纤维细胞温育后
(a) 普通显微镜照像 (b) 荧光显微镜照像(400×)

图 3 DOPE/CHOL/OA (4:4:3) 脂质体+1mmol/L CaCl_2 + 1mmol/L MgCl_2 与人胚肺成纤维细胞温育后
(a) 普通显微镜照像 (b) 荧光显微镜照像(400×)

图 4 DOPE/CHOL/OA (4:4:3) 脂质体+5%聚乙二醇与 NIH3T3 细胞温育后
(a) 普通显微镜照像 (b) 荧光显微镜照像(400×)