

# 新型“脂质-HAP-DNA 复合物”的制备和用于真核细胞基因转染研究 Preparation of New Lipid-Hydroxyapatite-DNA Complex and Gene Transfection Research in Eukaryotic Cell

何保凌<sup>1</sup>, 孙恩杰<sup>1\*</sup>, 杨冬<sup>2</sup>

HE Bao-Ling<sup>1</sup>, SUN En-Jie<sup>1\*</sup> and YANG Dong<sup>2</sup>

1 武汉理工大学理学院生物科学与技术系 武汉 430070

2 陕西科技大学化学与化工学院 咸阳 712081

1 Department of Biological Science and Technology, School of Science, Wuhan University of Technology, Wuhan 430070, China

2 College of Chemistry and Chemical Engineering, Shannxi University of Science and Technology, Xi'an 712081, China

**摘要** 为寻找一种简单、经济、有效的 DNA 递送系统用于基因转染和基因治疗,制备了表面电荷为正电的纳米 HAP,与表面电荷为负电的 DNA 结合形成 DNA-HAP 复合物,采用逆向蒸发法,用卵磷脂、DOPE 和胆固醇制备成脂质体封装 DNA-HAP 复合物形成脂质-HAP-DNA 复合物,脂质体和 HAP 对照,对所形成的脂质-HAP-DNA 复合物(LHD)的特性、封装率、转染 HeLa 细胞的效果进行初步检测研究。所获得的脂质-HAP-DNA 复合物呈球形、平均粒径为 643nm;平均封装率达 11.67%,为中性脂质体,能有效转染真核细胞。该方法可作为提高基因转染效果的简单、经济、有效的手段之一,也为进一步提高非病毒载体的转染效率提供了一个思路。

**关键词** HAP, 脂质体, 脂质-HAP-DNA 复合物, 基因转染, 非病毒基因载体

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)05-0795-05

**Abstract** This work was directed at obtaining a better gene carrier to improve the effects of gene delivery. Neutral liposomes made from cholesterol, lecithin and DOPE by reverse evaporation technique were used for encapsulating DNA-HAP complex which was made from DNA and optimized HAP. The sizes of complexes and the efficiency of encapsulation were detected. The efficiency of transfection into HeLa cells was shown by observation of X-gal staining and measurement of transfection efficiency. The average size of complexes was 643nm, the average encapsulating efficiency of DNA in microspheres reached 11.67%. These Lipid-Hydroxyapatite-DNA complex(LHD) could be transfected into mammalian cells. The Lipid-Hydroxyapatite-DNA complex prepared by reverse evaporation technique could be applied available in DNA delivery system, and it gave another thinking to increase the gene transfection of non-viral genetic vector.

**Key words** HAP, liposome, lipid-hydroxyapatite-DNA complex, gene transfection, non-viral gene vectors

非病毒载体具有低毒、低免疫反应、靶向性和易于组装等优点而成为目前的研究热点,但转染效率一直不高。用传统的基因载体进行基因转染时,或是由于吸附在细胞表面的 DNA 分子的浓度比较低,

致使进入细胞内 DNA 分子较少,基因转染的效率得不到很高的提高,或是虽然 DNA 在细胞膜上有较高的富集浓度, DNA 分子从细胞膜外进入细胞膜内有一定的效率,但进入细胞内的 DNA 易于被溶酶体内

的核酸酶降解,同样不能使外源基因得到高效表达。在非病毒基因载体中,脂质体及无机纳米基因载体分别以其在基因转染中展示出来独特的作用方式,启发了我们构建新型非病毒基因载体的思考。脂质体作为 DNA 载体,除能保护 DNA 免受核酸酶的攻击,增加其生物稳定性与生物利用度外,还具有在生物体内可降解、无毒、免疫学惰性、容易制备以及组分可调整的优点<sup>[1]</sup>,脂质体的类细胞膜结构使其在基因转染中具有良好的膜亲和性,可以增加 DNA 入膜机率,从而提高基因转染效率。无机纳米颗粒基因载体具有低分散性,可重复合成性,良好的生物亲和性,较低细胞毒性,代谢产物少,无免疫排斥反应,稳定性好等许多优点。无机纳米颗粒易与细胞膜融合被受体细胞高效率吞噬,无机纳米颗粒对 DNA 的结合能力很强并对 DNA 有保护作用,可保护 DNA 免受 DNase I 降解。本研究采用低毒性的中性脂质卵磷脂为主要脂质成分,生物亲和性较高的纳米 HAP 粒子浓缩 DNA 形成 HAP-DNA 复合物,用逆向蒸发法制备的脂质体包裹 HAP-DNA 复合物进行基因转染,并初步探讨了不同条件下 HAP 结合 DNA 的性质及形成的中性脂质复合体体外转染效果,为同时使用多种非病毒基因载体提高基因转染效率开拓思路,并为其用于体内试验打下基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料、菌种及细胞株

真核细胞表达质粒 pSV $\alpha$ (购自 Promega 公司),编码  $\beta$ -半乳糖苷酶( $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -gal)报告基因,由 SV40 早期启动子和增强子驱动;大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 菌株(获赠于华中科技大学);Hela 细胞(购自武汉大学);X-gal:武汉生命科学技术有限公司;LB 培养粉:DECENT BIOTECH;琼脂粉:武汉生命技术有限公司;日本进口分装;卵磷脂:上海伯奥生物有限公司(进口分装);二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE):Sigma 公司;胆固醇:上海惠世生化试剂有限公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 质粒 pSV- $\beta$ -gal 的克隆及大量提取:**参照文献[2]将制备的感受态大肠杆菌大量培养,用质粒大量提取试剂盒提取质粒 DNA,聚乙二醇沉淀法纯化质粒 DNA,经 8g/L 琼脂糖电泳分离,并用紫外分光光度计测定其在 260nm 和 280nm 处的吸光度,根据  $A_{260}/A_{280}$  比值估算其纯度,根据公式(DNA 浓度 =  $A_{260} \times 50\mu\text{g}/\text{mL} \times$  稀释倍数)计算其质量浓度。

**1.2.2 纳米 HAP 的制备及改性方法<sup>[3-5]</sup>:**反应方程式:  $10\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 + 6(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 + 8\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O} - \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 + 20\text{NH}_4\text{NO}_3 + 6\text{H}_2\text{O}$

配制 0.2mol/L 的相同浓度的  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  溶液(加入稳定剂 A 至反应后的最终浓度为 0.5mg/mL)和  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  溶液,体积比为 1.67,控制反应温度在 25 $^\circ\text{C}$ ,不断搅拌的条件下,将  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  溶液以 3 滴/s 的速度滴入  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  溶液,反应过程中,用精密 pH 计在线检测并用  $\text{HNO}_3$  或氨水调节溶液 pH 值,直至反应完全,超声处理数次,然后放置沉化 12h。经激光粒度分布仪(MASTERSIZER 2000, UK)和扫描电镜(Amary, USA)测定粒径大小,检验 Ca/P 值和表面电荷。

**1.2.3 HAP-DNA 复合物的制备:**取改性后的纳米 HAP 加入 Hepes 缓冲液中,超声分散 2min(功率 80W),制备成 30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  纳米 HAP 悬液。分别取适量 DNA 溶液加入到 1mL 纳米 HAP 悬液中,使 DNA 最终浓度为 30、15、10、7.5 和 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,室温混合 15min,然后 4000r/min,离心 5min;取离心后的上清液,用紫外分光光度计测残留 DNA 的吸光度,判断 HAP 与 DNA 结合的情况。按结果最优一组的 HAP/DNA 比例制备 HAP-DNA 复合物,4000r/min 离心,沉淀悬于 Hepes 缓冲液中制备成按 HAP 计算 30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  的 HAP-DNA 复合物悬液,备用。

**1.2.4 逆相蒸发法( REV )<sup>[6]</sup>制备脂质-羟基磷灰石-DNA 复合体:**空白脂质体制备:称取 0.6g 卵磷脂、0.2g DOPE 和 0.2g 的胆固醇,置于圆底烧瓶中,用 10mL 的氯仿/甲醇(2:1, V/V)溶解,经真空旋转蒸发得到脂质薄膜,继续干燥 1h,用 10mmol/L Hepes 缓冲液(pH 7.4)2mL 水合脂质薄膜,加入适量 Tween-80(5%),充入氮气后超声处理 3min,得到空白脂质体。

**LHD 的制备:**取悬于 Hepes 缓冲液的 DNA-HAP 复合物(pH7.4)1.8mL 加入到 1mL 空白脂质体中,轻微振荡以混匀,室温孵育 30min,4000r/min 离心 10min 分离未被包裹的复合物,得脂质-HAP-DNA 复合体(LHD)。

**对照组脂质-DNA 制备:**取上空白脂质体水合脂质薄膜 1mL,加入质粒 DNA,使 DNA 的最终浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,并补充蒸馏水使最终体积为 2.8mL,轻微振荡以混匀,室温孵育 30min,得到封装 DNA 的脂质体(脂质-DNA)。

**1.2.5 脂质-羟基磷灰石-DNA 复合体的特性测定:**

脂质-羟基磷灰石-DNA 复合体的粒径大小经激光粒度分布仪( MASTERSIZER 2000 ,UK )测定 ,荷电性用琼脂糖电泳法测定 :将脂质-羟基磷灰石-DNA 复合体混悬液放入电泳装置样品池内 ,外加电压 ,观察脂质体的泳动情况。

**1.2.6 包封率测定 :**将 LHD 溶液于 4℃ ,4000r/min 离心 30min ,精密量取上清液 1mL ,加入 1mL 蒸馏水 ,在紫外分光光度计上测定  $A_{260}$  ,得到上清液  $A_{260}$  ,在离心管中加入终浓度为 1% 的 Triton X-100 溶液并调节 pH 值 ,以破坏脂质层并释放出 HAP-DNA 中的 DNA ,同样在紫外分光光度计上测定  $A_{260}$  ,得到沉淀  $A_{260}$  。按公式计算包封率 :

包封率( % ) = 沉淀  $A_{260}$  / ( 上清液  $A_{260}$  + 沉淀  $A_{260}$  ) × 100%

**1.2.7 体外细胞转染与检测 :**HeLa( 人宫颈癌细胞 ) 用含有 10% 小牛血清的 DMEM 培养液进行常规培养。转染前 24h ,在 6 孔培养板上接种细胞数为  $2 \times 10^5$  /孔 ,转染时细胞约达到 70% 融合。用 HEPES 缓冲液冲洗细胞 2 次 ,每孔中加入无血清、无抗生素的培养基 2 mL ,其中 2 孔分别加入上述方法制备的 LHD 800 $\mu$ L ,另外 2 孔分别加入脂质-DNA 800 $\mu$ L ,最后 2 孔分别加入按 HAP 计算 30 $\mu$ g/ $\mu$ L 的 HAP-DNA 复合物悬液 520 $\mu$ L 。于 37℃ ,5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 5h ,吸去培养液 ,每孔用 HEPES 缓冲液冲洗细胞 2 次 ,加入含有 10% 小牛血清的培养基培养 48h ,使胞内的基因得以表达。

细胞  $\beta$ -gal 表达产物  $\beta$ -半乳糖苷酶(  $\beta$ -galactosidase ,  $\beta$ -gal ) 的检测采用原位固定 X-gal 染色法<sup>[2]</sup> 细胞转染培养 48h 后 ,每孔用 HEPES 缓冲液洗 1 次 ,每孔中加入 2mL 固定剂室温作用 5min 。每孔用 4mL HEPES 洗 2 次 ,分别加 1mL X-gal 底物/染色液 室温过夜( 14h ) 。用 4mL HEPES 洗 1 次 ,然后用倒置显微镜观察 ,评估蓝色(  $\beta$ -gal 阳性 ) 细胞比例并

照相。蓝染的细胞为转染了  $\beta$ -半乳糖苷酶质粒 ,然后在显微镜下每孔选取 5 个视野计数 ,记录蓝色细胞占总细胞的百分率。

## 2 结果

### 2.1 质粒 DNA 的纯度与浓度

将制备的原始质粒 DNA 溶液稀释 50 倍 ,用紫外分光光度计分别于测其在 260nm 和 280nm 处的紫外吸收 ,结果如表 1 所示。

表 1 质粒 DNA 的纯度与浓度

Table 1 Purity and concentration of pSV $\beta$ plasmid				
Test times	$A_{260}$	$A_{280}$	$A_{260}/A_{280}$	$c_{DNA}$ ( $\mu$ g/ $\mu$ L )
1	0.4007	0.2311	1.734	1.00175
2	0.3992	0.2298	1.737	0.998
3	0.3995	0.2304	1.734	0.99875

由以上结果可以看出 ,制备的质粒 DNA 具有较高的纯度 ,原始 DNA 的浓度 0.9995 $\mu$ g/ $\mu$ L。

### 2.2 改性 HAP 的特性

在扫描电子显微镜下( 见图 1 ) 观察改性 HAP 呈现针状 ,平均粒径在纳米级范围 ,经激光粒度分布仪测试改性 HAP 平均粒径为 250nm ,典型粒度分布范围从 181nm 至 324nm ,分布较为均匀 ,表面电荷为正电荷 ,测试符合预期的要求。

经紫外分光光度计检测不同 HAP/DNA 质量比( mg/ $\mu$ g ) 制备 HAP-DNA 复合物的上清吸光度 ,结果如表 2 所示。

由表 2 HAP/DNA 质量比( mg/ $\mu$ g ) 对上清吸光度的关系可以看出 ,HAP 对 DNA 的吸收量是随着 DNA 浓度的增加而上升的 ,HAP/DNA 质量比( mg/ $\mu$ g ) 接近 3 时 ,HAP 与 DNA 的结合是较为理想的 ,实验确定质粒 HAP 与 DNA 复合的合适质量比( mg/ $\mu$ g ) 比例为 3。

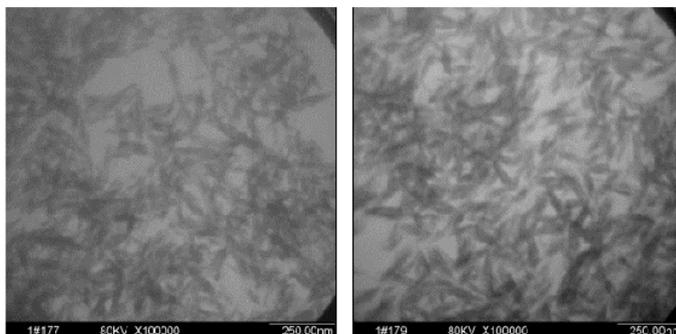


图 1 稳定剂浓度为 0.5mg/mL 制备所得 HAP 的 TEM 照片

表 2 不同 HAP/DNA 质量比 (mg/ $\mu$ g) 制备 HAP-DNA 复合物的上清吸光度结果

Table 2 Abs of supernatant of HAP-DNA mixture at different HAP/DNA quality ratio

HAP/DNA quality ratio (mg/ $\mu$ g)	$A_{260}$ of the same concentration pure DNA	$A_{260}$ of supernatant
1	0.6088	0.1278
2	0.2989	0.0569
3	0.2013	0.0192
4	0.1492	0.0131
5	0.1197	0.0157

### 2.3 脂质-羟基磷灰石-DNA 复合体的特性

粒度分布仪测试脂质-羟基磷灰石-DNA 复合体平均粒径为 643nm, 典型粒度分布范围从 498nm 至 1024nm, 分布较为均匀。

用电泳测定脂质-羟基磷灰石-DNA 复合体悬液的荷电性, 结果脂质-羟基磷灰石-DNA 复合体几乎没有泳动迁移, 说明脂质-羟基磷灰石-DNA 复合体悬液是中性的, 为中性脂质体。

计算所得脂质-羟基磷灰石-DNA 复合体的平均包封率达 11.67%。

### 2.4 脂质-羟基磷灰石-DNA 复合体的体外转染结果

转染后倒置显微镜下观察到 HeLa 细胞在底物 X-gal 作用下成为蓝色的细胞。图 2、图 3、图 4 分别为对照脂质-DNA、LHD 复合体、HAP-DNA 复合物在 HeLa 细胞中转染的照片。

各组在倒置显微镜下观察, 选取 5 个视野计数, 计算转染效率, 结果如表 3 所示。

结果表明, 质粒基因能被脂质体、LHD、HAP 递送到细胞内并开始表达产生半乳糖苷酶, 三种方法都能在人宫颈癌 HeLa 细胞中成功的转染报告基因 pSV- $\beta$ -gal 质粒, 而单独使用 HAP 转染的效率最小, 约为脂质体方法的 80%。采取 LHD 复合体方法转染的效率是传统中性脂质体方法的 2 倍左右, 表明 LHD 复合体方法能够有效地提高基因转染的效率。

表 3 对照脂质体、LHD、HAP-DNA 复合物用于 HeLa 细胞基因转染的效率

Table 3 Transfection efficiency in HeLa cells with control liposome, LHD, HAP-DNA complex

Visual field	Control liposome/%		LHD/%		HAP-DNA complex/%	
	hole 1	hole 2	hole 3	hole 4	hole 5	hole 6
1	2.17	1.87	4.14	4.21	1.61	1.45
2	1.80	2.28	4.24	4.03	1.74	1.77
3	1.73	1.82	4.01	3.92	1.70	1.36
4	2.47	1.95	3.89	3.79	1.55	1.60
5	1.88	1.78	4.13	3.82	1.42	1.66
Average	2.01 $\pm$ 0.46	1.94 $\pm$ 0.34	4.08 $\pm$ 0.19	3.95 $\pm$ 0.26	1.60 $\pm$ 0.18	1.57 $\pm$ 0.12

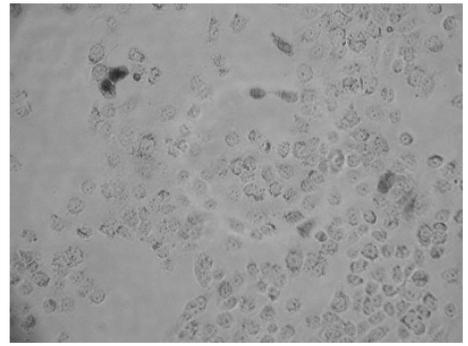


图 2 对照脂质体基因转染(200 $\times$ )

Fig.2 Gene transfection with control liposome (200 $\times$ )

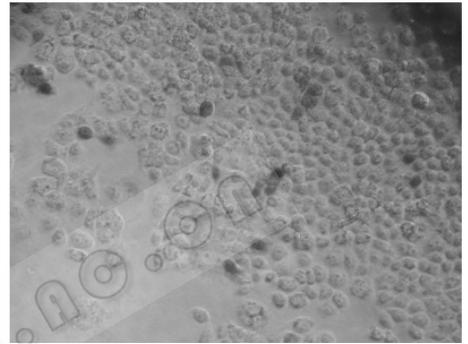


图 3 LHD 用于基因转染(200 $\times$ )

Fig.3 Gene transfection with LHD (200 $\times$ )

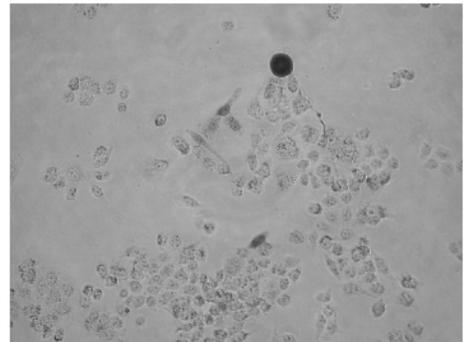


图 4 HAP-DNA 复合物用于基因转染(200 $\times$ )

Fig.4 Gene transfection with HAP-DNA complex (200 $\times$ )

### 3 讨论

基因治疗在防治感染性疾病及遗传性疾病方面有其独特的优势,因而倍受人们的关注,但基因治疗的效果受多种因素的影响。其中,携带目的基因的表达载体是否能有效地被递送至靶细胞并有效表达是其关键<sup>[7]</sup>。病毒型载体转染效率高效果好,但其安全性让人担心,非病毒型载体中常规的注射方法<sup>[8]</sup>(如裸 DNA 注射、溶于生理盐水的质粒 DNA 载体进行肌注等)都存在一个问题,即注入体内的基因稳定性差,生物利用率低,仅有部分转染进入细胞,导致基因的定向摄取及表达均处于一个较低的水平,从而影响使用效果。脂质体由于其类细胞结构和生物膜的特性,可以用来将多种物质(药物、DNA 等)转入到动、植物和微生物的多种类型的细胞中。脂质体可以运载大小不同的基因片段、质粒 DNA 等,其生物学活性不被破坏,而且还可提高转化效率<sup>[9]</sup>。脂质体作为 DNA 载体已被用于多种疾病的基因治疗及基因免疫的研究中,而脂质体介导、DNA 转染细胞已成为实验室常规方法。

阳离子脂质体一般包封率较高,转染效果也比较好,尽管低毒,但是现在的研究表明用于在体转染时其毒性仍然为人们关注,而中性脂质体和阴性脂质体又由于电性问题导致包封率和转染效率一直较低而限制其使用。本研究利用普通的材料和常规的制备技术,选用中性脂质体包封 DNA 后用于基因转染。考虑到传统上常用钙磷沉淀体系——磷酸钙转染法进行基因转染并得到一定的转染效率,我们想到把多种非病毒基因载体结合运用可能会提高基因转染的效率,因此选择生物相容性很好的与磷酸钙成分接近的 HAP 先与 DNA 形成复合物再进行包封,由于常规情况下 DNA 在 pH 中性条件下带负电荷,并且 HAP 也是在 pH 中性条件下带负电荷,因此首先对制备的 HAP 表面改性。其结果显示 HAP 与 DNA 复合的质量比(mg/ $\mu$ g)接近 3 时结合情况较理想,形成的 LHD 复合体用于体外转染时转染的效率是传统中性脂质体方法的 2 倍左右,表明 LHD 复合

体方法能够有效地提高中性脂质体基因转染的效率,其原因可能是脂质体的存在促进了细胞融合,而 HAP 的存在则保护 DNA 进入细胞后免遭溶酶体的降解。

尽管本研究中制备的 LHD 复合体用于体外转染时转染的效率与阳离子脂质体相比仍然较低,但实验证明多种非病毒载体方法结合运用确实能够有效地提高基因转染的效率,为后续研究打下了一定的基础,也为进一步提高非病毒载体的效率提供了一个思路。

### REFERENCES(参考文献)

- [ 1 ] Deng YX(邓英杰). Technology of Liposome Prepare. Edited by Lu Bin(陆彬). New Drugs and New Technology Center, 1st Version. Beijing: Peoples Health Press, 1988. pp. 107 - 110
- [ 2 ] Joseph Sambrook, David W Russell. Molecular Cloning, 3th ed. Beijing: Scientific Press, 2002. pp. 10 - 12
- [ 3 ] Wang XJ(王学江), Wang JX(汪建新), Li YB(李玉宝) et al. Preparation of nanograde hydroxyapatite needle-like crystals under normal atmospheric pressure. *High-tech Communications(高技术通讯)*, 2000, 11: 92 - 94
- [ 4 ] Song YK(宋云京), Li MS(李木森), Wen SL(温树林) et al. Effect of temperature and pH value on the preparation of hydroxyapatite powder. *Bulletin of the Chinese Ceramic Society(硅酸盐通报)*, 2003, 2: 7 - 10
- [ 5 ] Guo LF(郭边峰), Zhang WC(张文光), Wang CT(王成焱). Synthesis of nano particle hydroxyapatite and crystallization control. *Chinese Journal of Inorganic Chemistry(无机化学学报)*, 2004, 3: 290 - 297
- [ 6 ] Sozoka FJR, Papahadjopoulos D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and High capture by reverse phase evaporation. *Proc Natl Acad Sci*, 1978, 75(9): 94 - 98
- [ 7 ] Yang JP, Huang L. Direct gene transfer to mouse melanoma by intratumor injection of free DNA. *Gene Therapy*, 1996, 3(4): 542 - 545
- [ 8 ] Donnelly JJ, Ulmer JB, Liu MA. DNA vaccines. *Life Sciences*, 1997, 60(3): 163 - 166
- [ 9 ] Liu QQ(刘启光), Wu M(吴旻), Shen ZW(沈子威) et al. Preparation of liposomes entrapping plasmid DNA and linear DNA. *Acta Academiae Medicinae Sinica(中国医学科学院学报)*, 1992, 14(3): 220 - 224