

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.11.1348

PCM修饰脂质体的制备及心肌靶向性初步评价

王欣, 黄华, 王谋, 陈华黎*

重庆医科大学重庆高校药物工程研究中心, 重庆 400016

[摘要] **目的** 制备心肌特异性靶向肽 PCM 修饰的载增强绿色荧光蛋白表达质粒(pEGFP)的脂质体(PCM-LIP), 并初步考察其心肌靶向性。**方法** 采用薄膜分散-超声法, 以 PCM 为配体, DOTAP 为阳离子脂质材料制备脂质体, PCM-LIP 与 pEGFP 室温孵育制备载质粒的脂质体。对 PCM 连接方法进行优化, 测定 PCM 的连接率, 并考察脂质体的载药能力、形态、粒径分布、电位及其在磷酸盐缓冲液(PBS)中的稳定性。通过倒置荧光显微镜和流式细胞术考察脂质体转染心肌细胞 H9c2 的效果, 表征其心肌靶向性, 筛选 PCM 的最佳用量。**结果** PCM 通过插入法连接, 用量为脂质的 3%, 与 pEGFP 孵育后的 PCM-LIP 呈圆球形, 粒径为 (261.9 ± 2.2) nm, zeta 电位在 (-5.0 ± 0.6) mV, 在 PBS 中具有良好的稳定性, 其对心肌细胞的转染效率高于未修饰的脂质体 ($P < 0.05$)。**结论** PCM 可提高脂质体对心肌细胞的转染效率, PCM-LIP 具有良好的心肌细胞靶向性。

[关键词] PCM; 脂质体; 质粒; 心肌细胞; 转染效率

[中图分类号] R 735.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2016)11-1348-05

Preparation of PCM modified liposome and evaluation of its myocardium targeting efficiency

WANG Xin, HUANG Hua, WANG Mou, CHEN Hua-li*

Chongqing Medical Engineering Research Center, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

[Abstract] **Objective** To prepare PCM modified liposome (PCM-LIP) containing enhanced green fluorescent protein expression plasmid (pEGFP) and to evaluate its myocardial targeting ability. **Methods** Liposome was prepared by film-ultrasonic, with PCM used as ligand and DOTAP as cationic lipid material. PCM-LIP containing pEGFP was prepared by incubating liposome with pEGFP at room temperature. The connecting method of PCM was optimized and the connection rate of PCM was determined. The characteristics of liposomes including encapsulation ability, morphology, particle size, zeta potential and stability in phosphate buffer solution (PBS) were observed. The transfection efficiency of liposomes into H9c2 cells was evaluated by inverted fluorescence microscopy and flow cytometry, so as to characterize their myocardial targeting ability and to determine the optimum dosage of PCM. **Results** PCM-LIP was prepared by insertion method and the amount of PCM accounted for 3% of the lipid. After incubation with pEGFP, PCM-LIP was spherical in shape, with the particle size being (261.9 ± 2.2) nm, zeta potential being (-5.0 ± 0.6) mV, and PCM-LIP was stable in PBS at -4°C for 30 d. The transfection efficiency of PCM-LIP was significantly higher than that of unmodified liposome ($P < 0.05$). **Conclusion** PCM can improve the transfection efficiency of liposome into cardiomyocytes and PCM-LIP shows a satisfactory myocardial targeting ability.

[Key words] PCM; liposomes; plasmids; cardiac myocytes; transfection efficiency

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(11): 1348-1352]

近年来,心血管疾病已经成为世界范围内发病率和病死率最高的疾病之一^[1]。随着我国社会经济的发展、生活方式和饮食结构的变化、工作及生活压力的增加,冠心病的发病率和病死率呈现持续上升的特点,其中心肌缺血后导致的心力衰竭是冠心病患者高病死率的主要病因。冠心病的传统治疗策略

大多只能改善症状,延缓心衰的发展,并不能针对病因逆转心脏组织的损伤^[2]。因此寻找新型治疗措施,修复损伤心肌,改善缺血心肌功能,仍然是今后治疗的重要方向。

目前,随着基因工程的飞速发展,基因治疗在人类疾病治疗和预防中的地位越来越重要。而配体修饰的

[收稿日期] 2016-03-08 **[接受日期]** 2016-08-31

[基金项目] 国家自然科学基金(81400212). Supported by National Natural Science Foundation of China (81400212).

[作者简介] 王欣, 硕士. E-mail: 1364904702@qq.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 023-68485161, E-mail: mole127@126.com

脂质体作为一种新型的基因药物传递系统,已经在靶向性、抵御调理作用等方面取得了很大的成功。PCM (WLSEAGPVVTVRALRGTGSW)是一种由 20 个氨基酸组成的心肌细胞特异性靶向肽,通过噬菌体展示技术筛选出来。独立的 PCM 噬菌体与原代心肌细胞的结合能力是对照噬菌体的 180 倍,且与其他细胞包括其他肌细胞比较,PCM 可特异性地与心肌细胞结合^[3-5]。以 PCM 作为配体修饰脂质体,使脂质体具有心肌靶向性,可将基因药物有效地传递至缺血心肌,达到更有效、更安全的治疗效果。本研究以增强绿色荧光蛋白表达质粒(pEGFP)作为报告基因,配体 PCM 修饰的脂质体(PCM-LIP)为基因载体,研究脂质体的制备工艺和稳定性,考察 PCM-LIP 对心肌细胞的转染效率,初步评价 PCM-LIP 的心肌靶向性。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂 RE-52AA 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),DKZ-450B 型电热恒温振荡水槽(上海森信实验仪器有限公司),VC505 探头超声仪(Sonics 公司,美国),RF-5301pc 荧光扫描仪(Shimadzu 公司,日本),Zetasizer Nano ZS90 型纳米粒度及 zeta 电位分析仪(Malvern 公司,英国),Hitachi-7500 透射电镜(Hitachi 公司,日本),倒置荧光显微镜(Nikon 公司,日本),低温高速离心机(Thermo Scientific 公司,美国),流式细胞仪(Becton Dickinson 公司,美国),净化工作台(苏州净化设备有限公司),细胞培养箱(Thermo Scientific 公司,美国)。

大豆磷脂(Cargill 公司,德国),胆固醇(NFC 公司,日本),DSPE-mPEG2000(NFC 公司,日本),DSPE-PEG2000-Mal(Nanosoft 公司,美国),DOTAP(Corden 公司,瑞士),PCM(上海吉尔生化有限公司),Sephadex-G50(Pharmacia 公司,美国),荧光胺(阿拉丁试剂),pEGFP(自制),DMEM 培养基(Gibco 公司,美国),胎牛血清(Gibco 公司,美国)。

1.2 未修饰脂质体的制备 精密称取一定量的大豆磷脂、胆固醇、DSPE-mPEG2000、DOTAP,使其摩尔比为 40:30:10:20,三氯甲烷溶解后,旋转蒸发呈均匀薄膜,真空干燥 2 h 后,加入 2 mL 磷酸盐缓冲液(PBS),37℃水浴振荡 1 h,水浴超声使脂质膜完全溶解,探头超声(150 W,5 s,5 s)30 次,形成均匀脂质体,用 Sephadex-G50 柱纯化脂质体。

1.3 PCM 修饰脂质体的制备 考察 PCM 的溶解性,PCM 不溶于低沸点可抽膜的有机溶剂,可溶于

水,所以考虑采用插入法和水相反应法制备 DSPE-mPEG2000-PCM。插入法:按 1.2 项下的方法制备脂质体,另取一定量的 DSPE-mPEG2000-Mal 溶于三氯甲烷中,采用薄膜分散-超声法制成胶束后,加入 PCM 室温反应过夜。将制得的胶束加入脂质体中,室温孵育 3 h。水相反应法:将一定量的 DSPE-mPEG2000-Mal 与脂质材料抽膜,按 1.2 项下的方法制备脂质体后,加入 PCM 室温搅拌反应 3 h。制备不同 PCM 用量(1%、3%、5%、7%)的 PCM-LIP,即 1% PCM-LIP、3% PCM-LIP、5% PCM-LIP 和 7% PCM-LIP,用 Sephadex-G50 柱纯化脂质体。

1.4 PCM 连接率的测定 采用改进的荧光胺法测定 PCM 的连接率^[6-7],以 PCM 连接率为指标,筛选 PCM 的连接方法。在离心管中加入 PCM-LIP 和荧光胺乙腈溶液,涡旋振摇,室温避光反应,加甲醇至 3 mL,用荧光分光光度计测定其光密度值($E_x=395$ nm, $E_m=475$ nm,slit $E_x/E_m=5$ nm/5 nm)。样品通过一系列已知 PCM 浓度的标准溶液所制备的标准曲线定量。

1.5 载 pEGFP 脂质体的制备及脂质体载药能力考察 取不同体积数的脂质体样品和 0.5 μ g pEGFP 加入不同离心管中,分别用适量 PBS 稀释,静置 2 min 后,室温孵育 20 min,制备得到不同脂质/DNA 比的脂质体/DNA 复合物,通过琼脂糖凝胶电泳考察脂质体对 pEGFP 的载药能力。

1.6 不同 PCM 用量脂质体的细胞转染效率 根据琼脂糖凝胶电泳实验的结果,制备载 pEGFP 的脂质体。分别取一定体积的未修饰的脂质体、1% PCM-LIP、3% PCM-LIP、5% PCM-LIP 和 0.5 μ g pEGFP 加入不同的离心管中,分别用适量的 PBS 稀释,静置 2 min,室温孵育 20 min,制备得到不同 PCM 连接比例的脂质体/DNA 复合物,用 opti-MEM 稀释后用于细胞转染实验。

将 H9c2 细胞(四川大学生物治疗国家重点实验室蒋维教授惠赠)接种于 24 孔板内,待细胞融合度达 60%~70%且形态饱满后,分别加入上述载 pEGFP 的 PCM-LIP。在 37℃、5% CO₂ 孵育箱中转染 5 h 后,弃去脂质体悬液,换有血清培养液,继续培养。24 h 后,用倒置荧光显微镜定性观察转染效果。另将 H9c2 细胞接种于 6 孔板内,待细胞融合度达 70%~80%且形态饱满后,按上述方法转染载 pEGFP 的 PCM-LIP,收集细胞,用流式细胞仪检测脂质体的转染效率。

1.7 脂质体的形态、粒径、zeta 电位的测定 取适量载 pEGFP 的 3% PCM-LIP 稀释至一定倍数,滴

加在覆有支持膜的铜筛网上,用2%磷钨酸负染,自然干燥后,透射电镜观察形态。另取适量样品稀释一定倍数后,用纳米粒度及 zeta 电位分析仪测定脂质体的粒径及电位。

1.8 脂质体的稳定性考察 制备未修饰的脂质体和3% PCM-LIP,考察脂质体在 PBS 中的稳定性。将脂质体样品置于4℃冰箱保存,于0 d、30 d时分别测定脂质体的粒径和电位。

1.9 统计学处理 应用 GraphPad Prism 4.0 软件进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示,采用单因素方差分析(ANOVA)。检验水准(α)为0.05。

2 结果

2.1 PCM 连接率的测定结果 实验发现,7% PCM-LIP 无法经凝胶柱有效纯化,因此只能测出1% PCM-LIP、3% PCM-LIP、5% PCM-LIP 的 PCM 连接率。结果如表 1,不同 PCM 用量的脂质体通过插入法制备得到的 PCM 连接率均高于通过水相反应法制备得到的 PCM 连接率,且在这两种方法中,当 PCM 用量为3%时得到的连接率最高,故选择插入法作为 PCM 的连接方法,PCM 用量为3%。

表 1 PCM 不同连接方法的连接率

Tab 1 The PCM connection ratio of PCM-LIPs of different connection modes

Connection mode	%, n=3, $\bar{x} \pm s$		
	1% PCM-LIP	3% PCM-LIP	5% PCM-LIP
Insertion method	71.4±0.5	96.8±0.2	59.0±0.1
Aqueous phase	46.2±0.1	69.2±0.3	42.9±0.1

LIP: Liposome

2.2 脂质体载药能力考察结果 首先分别考察了1、2、5、10 μL 的未修饰的脂质体对 pEGFP 的载药能力,结果如图 1A 所示,5 μL 的脂质体可将 pEGFP 载带完全。进一步考察了 5 μL 不同 PCM 用量的脂质体对 pEGFP 的载药能力,结果如图 1B, 5 μL 不同 PCM 用量的脂质体都可将 pEGFP 载带完全。

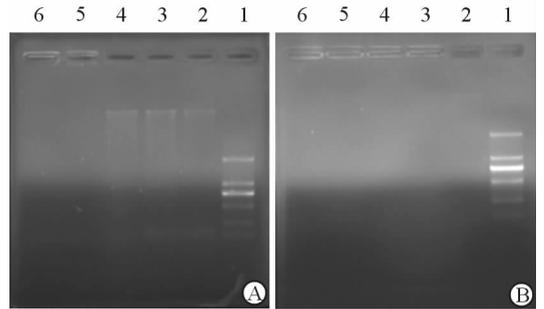


图 1 脂质体对 pEGFP 载药能力的测定

Fig 1 Determination of pEGFP encapsulation ability of liposomes (LIPs)

A: pEGFP encapsulation ability of LIP (1: DNA marker 2 000; 2: pEGFP + loading buffer; 3: pEGFP+1 μL LIP; 4: pEGFP + 2 μL LIP; 5: pEGFP+5 μL LIP; 6: pEGFP+10 μL LIP); B: pEGFP encapsulation ability of PCM-LIP (1: DNA marker 2 000; 2: pEGFP+loading buffer; 3: pEGFP+5 μL LIP; 4: pEGFP+5 μL LIP+1% PCM-LIP; 5: pEGFP+5 μL LIP+3% PCM-LIP; 6: pEGFP+5 μL LIP+5%PCM-LIP). pEGFP: Enhanced green fluorescent protein plasmid

2.3 不同 PCM 用量脂质体的细胞转染效率 图2显示了不同 PCM 用量脂质体转染 H9c2 细胞的转染效率,可见 PCM-LIP 的转染效率均高于未修饰的脂质体,且当 PCM 的用量为3%时,细胞的绿色荧光最高,脂质体的转染效率最高。

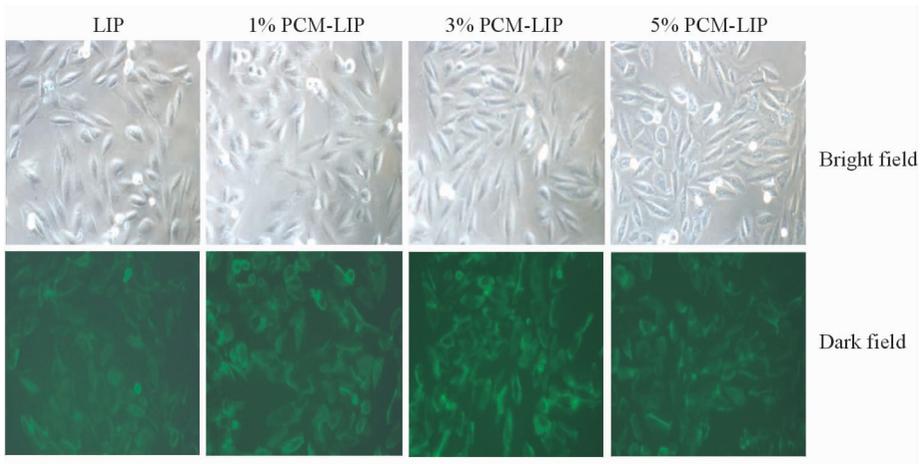


图 2 载 pEGFP 的脂质体在 H9c2 细胞中的表达

Fig 2 Expression of pEGFP carried by liposomes (LIPs) in H9c2 cells

pEGFP: Enhanced green fluorescent protein plasmid. Original magnification: $\times 200$

2.4 不同 PCM 用量的脂质体的细胞转染效率的定量测定 图 3 显示了不同 PCM 用量脂质体转染 H9c2 细胞的流式细胞仪检测结果, 可见 3%

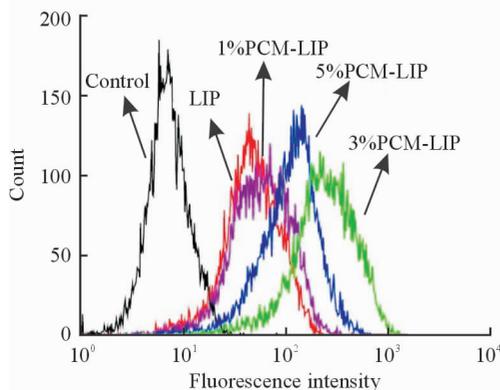
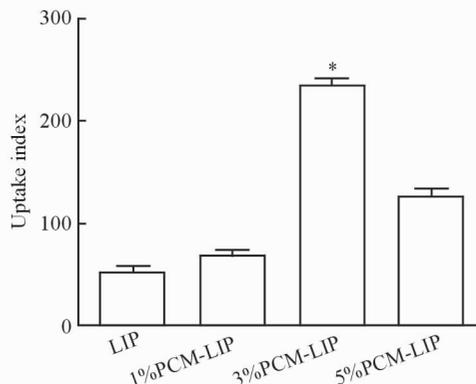


图 3 载 pEGFP 的脂质体转染 H9c2 细胞的流式细胞术测定结果

Fig 3 The flow cytometry assay of H9c2 cells transfected with liposomes (LIPs) containing pEGFP

pEGFP: Enhanced green fluorescent protein plasmid. * $P < 0.05$ vs other groups. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

PCM-LIP 的转染效率最高。结合连接率测定结果和细胞转染效率的定性观察结果, 筛选得到的 PCM 最佳用量为 3%。



2.5 脂质体的形态、粒径、zeta 电位 透射电镜图 (图 4) 显示载 pEGFP 的 3%PCM-LIP 呈圆球形。载 pEGFP 的未修饰的脂质体粒径为 (212.4 ± 3.0) nm, 载 pEGFP 的 3% PCM-LIP 粒径为 (261.9 ± 2.2) nm, 连接 PCM 后脂质体的粒径增大; 两种脂质体多分散系数(PDI)均在 0.2 左右 [(0.20 ± 0.01) vs (0.19 ± 0.01)], zeta 电位分别为 (-4.3 ± 0.6) mV 和 (-5.0 ± 0.6) mV, 说明 PCM 的连接对脂质体电位无明显影响。

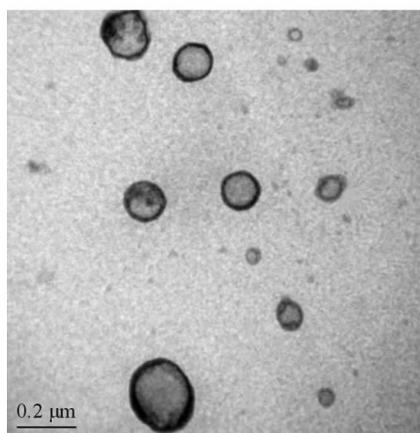


图 4 载 pEGFP 的 3% PCM-LIP 透射电镜图

Fig 4 TEM of 3% PCM-LIP containing pEGFP

TEM: Transmission electron microscope; LIP: Liposome; pEGFP: Enhanced green fluorescent protein plasmid

2.6 脂质体的稳定性考察结果 新制备的 PCM-LIP (3% PCM-LIP) 的粒径为 (261.9 ± 2.2) nm, zeta 电位为 (-5.0 ± 0.6) mV, PDI 为 $(0.19 \pm$

$0.01)$ 。-4℃放置 30 d 后, 粒径为 (267.4 ± 1.9) nm, zeta 电位为 (-5.3 ± 0.1) mV, PDI 为 (0.20 ± 0.01) 。结果表明 PCM-LIP 在 -4℃下放置 30 d, 脂质体的粒径、zeta 电位和 PDI 无明显变化, 说明脂质体在 PBS 中有较好的稳定性。

3 讨论

缺血性心脏病严重威胁着人类生命健康和生活质量, 目前国内外公认的治疗有药物治疗、介入治疗和外科手术治疗 3 种。这些治疗方法在一定程度上可以减轻症状, 但并不能针对病因逆转心脏组织的损伤。基因治疗是将目的基因用一定的手段导入患者特定的组织和细胞并进行适当的表达, 以补偿或纠正因基因缺陷或异常而引起的疾病, 从而达到治疗疾病的目的^[8]。基因治疗与传统治疗方法相比有巨大的优越性, 它从根源上纠正了引起疾病的异常基因, 可以选择性地治疗多种严重威胁人类健康的疾病^[9]。目前用于传递基因药物的系统有病毒载体和非病毒载体两大类, 其中脂质体由于具有低毒、低免疫反应、靶向性和易于组装等优点, 已经成为基因治疗领域中一个新的研究热点^[10]。

本研究采用薄膜分散-超声法, 以 pEGFP 为报告基因制备 PCM-LIP, 筛选出 PCM 的最佳连接方法为插入法, 最佳用量为 3%, 测定 PCM 的连接率最高可达 95% 以上。PCM 的连接率不是随着 PCM 用量的提高而提高, 这与相关文献得到的结论相同:

随着预插入量的增多,插入效率的下降和插入量增加有逐渐变缓趋势^[11]。通过凝胶阻滞实验测定了脂质体的载药能力,5 μL 的脂质体可将0.5 μg 的 pEGFP 质粒载带完全。制备得到的载质粒的 PCM-LIP 形态圆整,粒径为 (261.9 ± 2.2) nm, zeta 电位为 (-5.0 ± 0.6) mV, 粒径和电位是考察脂质体稳定性的重要指标^[12-13], 由于本研究制备的 PCM-LIP 存放于 PBS 中, 因此考察了 PCM-LIP 在 PBS 中的稳定性, 实验表明该脂质体在 PBS 中具有较好的稳定性。通过倒置荧光显微镜和流式细胞仪定性和定量地考察了 PCM-LIP 对心肌细胞的转染效率, 结果表明 PCM-LIP 相比于未修饰的普通脂质体具有明显的心肌细胞靶向性, 且筛选得到的 PCM 最佳用量为 3%。脂质体转染效率不是随着 PCM 的用量提高而提高, 有两方面原因, 一方面当 PCM 用量为 5% 时, PCM 的连接量与 PCM 用量为 3% 时相差不多, 另一方面是脂质体表面修饰的构象和密度等因素, 对脂质体本身的特性及其靶向效果都有很大的影响^[14-15], 其中具体的相互关系国内外文献都尚无定论。本研究制备的 PCM-LIP 有望成为一种新的靶向心肌的基因传递系统, 但尚待进一步考察其体内靶向性、载目的基因后的抗心肌缺血活性和安全性, 以全面检验脂质体的基因传递能力。

【参考文献】

[1] LIU M, LI M, SUN S, LI B, DU D, SUN J, et al. The use of antibody modified liposomes loaded with AMO-1 to deliver oligonucleotides to ischemic myocardium for arrhythmia therapy[J]. *Biomaterials*, 2014, 35: 3697-3707.

[2] WHELAN R S, KAPLINSKIY V, KITSIS R N. Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance[J]. *Annu Rev Physiol*, 2010, 72: 19-44.

[3] MCGUIRE M J, SAMLI K N, JOHNSTON S A, BROWN K C. *In vitro* selection of a peptide with high selectivity for cardiomyocytes *in vivo* [J]. *J Mol Biol*, 2004, 342: 171-182.

[4] NAM H Y, KIM J, KIM S W, BULL D A. Cell targeting peptide conjugation to siRNA polyplexes for

effective gene silencing in cardiomyocytes [J]. *Mol Pharm*, 2012, 9: 1302-1309.

- [5] WON Y W, BULL D A, KIM S W. Functional polymers of gene delivery for treatment of myocardial infarct [J]. *J Control Release*, 2014, 195: 110-119.
- [6] YAYLAYAN V A, HUYGHUES-DESPOINTES A, POLYDORIDES A. A fluorescamine-based assay for the degree of glycation in bovine serum albumin [J]. *Food Res Int*, 1992, 25: 269-275.
- [7] BELAL F, ABDINE H, AL-MAJED A, KHALIL N Y. Spectrofluorimetric determination of vigabatrin and gabapentin in urine and dosage forms through derivatization with fluorescamine [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2002, 27: 253-260.
- [8] TROS DE ILARDUYA C, SUN Y, DÜZGÜNES N. Gene delivery by lipoplexes and polyplexes [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2010, 40: 159-170.
- [9] 李燕, 阳俊, 刘桂英, 张欣. 基因治疗药物递送系统的研究现状及发展趋势 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2013, 40: 998-1007.
- [10] 江献芳, 周诺. 脂质体在基因治疗中的应用研究及进展 [J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16: 1463-1466.
- [11] 周正源, 唐海玲, 徐宇虹. 多肽靶向脂质体的表面配体修饰密度及其体内肿瘤靶向效果的研究 [J]. *生物物理学报*, 2010, 26: 216-224.
- [12] SHARMA G, MODGIL A, LAYEK B, ARORA K, SUN C, LAW B, et al. Cell penetrating peptide tethered bi-ligand liposomes for delivery to brain *in vivo*: biodistribution and transfection [J]. *J Control Release*, 2013, 167: 1-10.
- [13] 袁松, 孙会敏, 丁丽霞. 脂质体物理化学稳定性研究进展 [J]. *中国药事*, 2011, 25: 384-388.
- [14] ALLEN T M, SAPRA P, MOASE E. Use of the post-insertion method for the formation of ligand-coupled liposomes [J]. *Cell Mole Biol Lett*, 2002, 7: 217-219.
- [15] MOREIRA J N, ISHIDA T, GASPARI R, ALLEN T M. Use of the post-insertion technique to insert peptide ligands into pre-formed stealth liposomes with retention of binding activity and cytotoxicity [J]. *Pharm Res*, 2002, 19: 265-269.