

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.02.011

· 基础研究 ·

EGFR 小分子多肽配体修饰提高阳离子脂质体对肿瘤细胞的转染效率

张海红¹, 彭金良², 徐宇虹³(1. 江西护理职业技术学院 药学系, 江西 南昌 330029; 2. 上海交通大学 Med-X 研究院, 上海 200030; 3. 上海交通大学 药学院, 上海 200240)

[摘要] **目的:**用针对表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)的小分子多肽配体 D4 修饰 PEG 化的阳离子脂质体, 观察其提高质粒 DNA 和 siRNA 对肿瘤细胞转染效率的作用。**方法:**将 D4 连接在 DSPE-PEG2000 的末端以修饰 PEG 化的阳离子脂质体, 检测该载体系统对高表达 EGFR 的人非小细胞肺癌细胞株 H1299 中质粒 DNA 转染效率的影响, Sirius 照度仪检测质粒 DNA 转染后 H1299 细胞荧光素酶的表达, 荧光显微镜观察转染 FAM-siRNA 后 H1299 细胞的荧光强度。**结果:**制备的脂质体/质粒 DNA 复合物随着电荷比的提高, 复合物粒径逐渐减小, 复合物 Zeta 电位逐渐升高。在质粒 DNA 的转染中, 与无修饰的非靶向脂质体相比, D4 修饰的脂质体可以显著提高 H1299 细胞中荧光素酶的表达($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); D4 修饰的脂质体在各个电荷比处对 H1299 细胞的转染效率显著高于无修饰的非靶向脂质体($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。在 FAM-siRNA 的转染中, 荧光显微镜下可以观察到 D4 修饰的脂质体组有更高水平的 FAM 荧光强度。**结论:**D4 修饰的阳离子脂质体提高高表达 EGFR 肿瘤细胞中质粒 DNA 和 siRNA 的转染效率。

[关键词] 基因输送; 肿瘤靶向; 阳离子脂质体; 多肽配体; 转染效率

[中图分类号] R730.51; Q782

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2012)02-0163-05

Modification by EGFR small peptide ligand enhances transfection efficiency of cationic liposome on tumor cells

ZHANG Hai-hong¹, PENG Jin-liang², XU Yu-hong³(1. Department of Pharmacy, Jianxi Vocational Technology College of Nursing, Nanchang 330029, Jiangxi, China; 2. Med-X Research Institute, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030, China; 3. School of Pharmacy, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

[Abstract] **Objective:**To modify PEGylated cationic liposome was modified by small peptide ligand D4 of epidermal growth factor receptor (EGFR), and study its effect on enhancing the transfection efficiency of plasmid DNA and siRNA in tumor cells. **Methods:** D4 was conjugated to the end of DSPE-PEG2000 to modify the PEGylated cationic liposome, and the effects of this vector system on transfection efficiency of plasmid DNA in EGFR highly-expressed human non-small lung cancer H1299 cells was examined. Luciferase expression in plasmid DNA transfected-H1299 cells was observed by Sirius illumination apparatus, and the fluorescence intensity of FAM-siRNA transfected-H1299 cells was detected by fluorescence microscopy. **Results:** In prepared liposome/plasmid DNA, with increasing of electric charge ratios, the particle diameter of complex was gradually decreasing and Zeta electric potential was increasing. Compared with non-targeted liposome, liposome modified by D4 significantly increased the expression of luciferase in H1299 cells after plasmid DNA transfection ($P < 0.05$, or $P < 0.01$); the transfection efficiency of D4-modified liposome with different electric charge ratios on H1299 cells was significantly increased compared with un-modified liposome ($P < 0.05$, or $P < 0.01$). In addition, in the transfection of FAM-siRNA, an enhanced fluorescence intensity of FAM was observed in the D4-modified liposome group under a fluorescence microscope. **Conclusion:** D4-modified cationic liposome can improve the transfection efficiency of plasmid DNA and siRNA in EGFR highly-expressed tumor cells.

[Key words] gene delivery; tumor targeting; cationic liposome; peptide ligand; transfection efficiency

[Chin J Cancer Biother, 2012, 19(2): 163-167]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30801446)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30801446)

[作者简介] 张海红(1987-),女,江西省抚州市人,硕士,主要从事肿瘤基因治疗的研究。E-mail: zhanghaihongdyx@126.com

[通信作者] 徐宇虹(XU Yu-hong, corresponding author), E-mail: yhxu@sjtu.edu.cn

在肿瘤的基因治疗中,配体导向的靶向输送方式是肿瘤基因输送中的一个新的着眼点^[1-2]。目前常用的靶向分子有单克隆抗体和抗体片段,但是它们的分子较大、稳定性较差,容易被肝和网状内皮系统摄取。鉴于此,具有分子较小、化学性质更加稳定、免疫原性更低、并且相对容易操作等优点的多肽,有望成为更有潜力的肿瘤靶向配体。表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)在肺癌、乳腺癌、头颈癌、膀胱癌等许多人类肿瘤中有过度表达,是肿瘤治疗研究中的重要靶点。研究^[3-5]表明,对高表达 EGFR 的肿瘤细胞,EGFR 特异性配体介导的药物输送方式能有效地提高药物的细胞毒性和基因转染效率,对提高肿瘤的靶向疗效有显著的意义。阳离子脂质体是应用最为广泛的非病毒基因载体之一,聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)化是最常见的阳离子脂质体的修饰方法,它可以提高脂质体的稳定性,延长在血液里的循环时间,并且有助于在肿瘤部位的聚集。然而, Mishraa 等^[6]发现,PEG 化会降低细胞对载体的摄取能力,抑制转染效率。课题组前期工作中,根据 EGFR 三维晶体结构,在反义肽理论^[7-10]基础上建立了小分子六肽库,并从中筛选到 EGFR 的配体多肽 D4。D4 与 EGFR 有较强的结合能力,恰好进入 EGFR 表面某处凹陷“口袋”,几乎所有残基都与该结合位点的残基相互作用。为了提高 PEG 化阳离子脂质体的转染效率,本研究利用 D4 修饰阳离子脂质体构建配体介导的输送系统,以未经 D4 修饰的 PEG 化阳离子脂质体作为非靶向脂质体对照组,探讨 D4 在肿瘤细胞体外转染中的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞株与试剂

高表达 EGFR 的人非小细胞肺癌细胞株 H1299 购自中科院细胞生化所,胎牛血清、RPMI 1640 培养基为 Gibco 公司产品,脂质材料 DOTAP、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000(DSPE-PEG2000)、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000-马来酰亚胺(DSPE-PEG2000-Mal)、胆固醇为美国 Avanti 公司产品,小分子多肽 D4 为吉尔生化有限公司合成,荧光素酶检测底物为 Promega 公司产品,质粒大量抽提试剂盒为 Qiagen 公司产品,羧基荧光素标记的 siRNA(carboxyfluorescein-siRNA, FAM-siRNA)为上海吉玛制药技术有限公司产品,常用分析用化学试剂为中国医药集团上海化学试剂公司产品。

1.2 小分子多肽 D4 与脂质的连接

取适量 DSPE-PEG-MAL 氯仿溶液,加入茄形瓶中,氮气吹干氯仿,按多肽与脂质摩尔比 2:1 的比例加入小分子多肽 D4,在氮气保护下加入适量除气 HEPES 水溶液,在 10 °C、200 r/min 条件下恒温振荡,反应 24 h 后得到最终产物 DSPE-PEG-D4,收集反应产物在透析袋(MW 3500)中透析除去盐和过量 D4,冻干保存备用。

1.3 脂质体的制备

1.3.1 D4 修饰脂质体的制备 按摩尔比 1:1:0.01:0.02 取 DOTAP、胆固醇、DSPE-PEG-2000、DSPE-PEG-D4,将以上脂质的氯仿储备液加入茄形瓶中,置于旋转蒸发器上,抽真空使压力控制在 0.1 MPa,30 °C 下旋转蒸发 60 ~ 120 min,使脂质在瓶壁形成均匀透明的薄膜,充 N₂ 除尽氯仿。向茄形瓶中加入适量生理盐水水合,使脂质质量浓度为 1 mg/ml。超声 5 min,过 200 nm 孔径聚碳酸酯膜 13 次得到脂质体,4 °C 保存。

1.3.2 非靶向脂质体的制备 按照摩尔比 1:1:0.03,取 DOTAP、胆固醇、DSPE-PEG-2000,制备方法同上 D4 修饰脂质体的制备。

1.4 pGL3 质粒转染 H1299 细胞

本实验用的编码荧光素酶的质粒 pGL3 是从 *E. Coli* DH5 α 中提取的,用质粒大抽试剂盒依据说明书操作步骤进行提取,制备脂质体/DNA 复合物。将脂质体和 DNA 稀释到相同的体积,将脂质体滴加到 DNA 溶液中,边滴加边涡旋振荡,室温孵育 20 min 即得。测定脂质体和脂质体/DNA 复合物的粒径和 Zeta 电位。转染前 1 d,将 H1299 细胞株以 7×10^3 个/孔接种在 96 孔板中。将培养板置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 18 ~ 24 h,转染时细胞融合度为 60% ~ 80%。对于无血清条件下的转染,在加样前,将孔板中的培养液吸走,换成无血清 RPMI 1640 培养液;对于含 10% 血清条件下的转染,在加样前,将孔板中的培养基吸走,换成新鲜的含 10% FBS 的培养液。转染时,将制备好的 D4 修饰的脂质体/DNA 复合物和非靶向脂质体/DNA 复合物加入孔中,每组样品做 3 个复孔,摇动培养板,使混匀。在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 4 h,之后将孔中液体吸走,用 PBS 洗 3 遍,更换为新鲜完全培养液,继续培养 24 h 后测定荧光素酶的活性。吸去 96 孔板中的培养液,细胞用 PBS 洗 3 遍后,每孔加入 50 μ l 细胞裂解液,裂解 30 min。收集裂解液,2 580 \times g 离心 5 min,取上清 10 μ l,加入荧光素酶反应底物 10 μ l,混匀,用 Sirius 照度仪检测相对光强度(RLU/s, Relative light unit/s)。

1.5 FAM-siRNA 转染 H1299 细胞

将脂质体和 FAM-siRNA 稀释到相同的体积,将稀释好的脂质体加入到 FAM-siRNA 中,并轻轻吹吸 3~5 次混匀,室温静置 30 min,制备脂质体/FAM-siRNA 复合物,待用。转染前 1 d,将 H1299 细胞以 1.2×10^5 个/孔的密度接种在 6 孔板中,将培养板置于 37°C 、5% CO_2 培养箱培养 18~24 h,转染时细胞融合度为 60%~80%。转染时,将制备好的 D4 修饰的脂质体/FAM-siRNA 复合物和非靶向脂质体/FAM-siRNA 复合物加入孔中,转染 4 h,吸去培养液,用 PBS 洗细胞 5 遍,除去表面非特异性结合的脂质体,立即用荧光显微镜观察($\lambda = 480 \text{ nm}$)观察细胞荧光。

1.6 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS16.0 统计软件,两样本均数间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脂质体/DNA 复合物的粒径和 Zeta 电位

在不同的脂质体/DNA 电荷比处测定脂质体/质粒 DNA 复合物的粒径和 Zeta 电位。脂质体/质粒 DNA 复合物的粒径和 Zeta 电位跟复合比例有关,随着电荷比的提高,复合物粒径逐渐减小,复合物 Zeta 电位逐渐升高(图 1)。Zeta 电位是影响转染效率的重要因素,较高的 Zeta 电位有利于促进脂质体与细胞的结合。结果表明,D4 修饰的脂质体/DNA 复合物 Zeta 电位较未经修饰的非靶向脂质体/DNA 复合物高。

2.2 D4-脂质体提高质粒 DNA 对 H1299 细胞的转染效率

实验结果(图 2)显示,当转染条件为无血清培养液时,在 H1299 细胞中,D4 修饰的脂质体/DNA 复合物在各个 DOTAP/DNA 电荷比处的转染效率显著高于非靶向脂质体/DNA 复合物($P < 0.01$)。由此可见,D4 的修饰可以提高 PEG 化阳离子脂质体对高表达 EGFR 的 H1299 细胞转染效率。

2.3 D4-脂质体介导质粒 DNA 对 H1299 细胞的转染不受血清影响

实验用正常细胞培养基的血清浓度,即 10% FBS 的培养基中对 D4 修饰的阳离子脂质体和非靶向脂质体在 H1299 细胞中的转染效率进行了评价,结果(图 3)显示,D4 修饰的脂质体在各个电荷比处的细胞转染效率显著高于非靶向脂质体(4:1, $P < 0.05$;其余电荷比, $P < 0.01$)。由此可见,在模拟体

内环境即有血清的培养液中,D4 修饰脂质体相较于未经 D4 修饰的非靶向脂质体仍可以显著提高细胞 DNA 转染效率,为进一步体内研究提供参考依据。

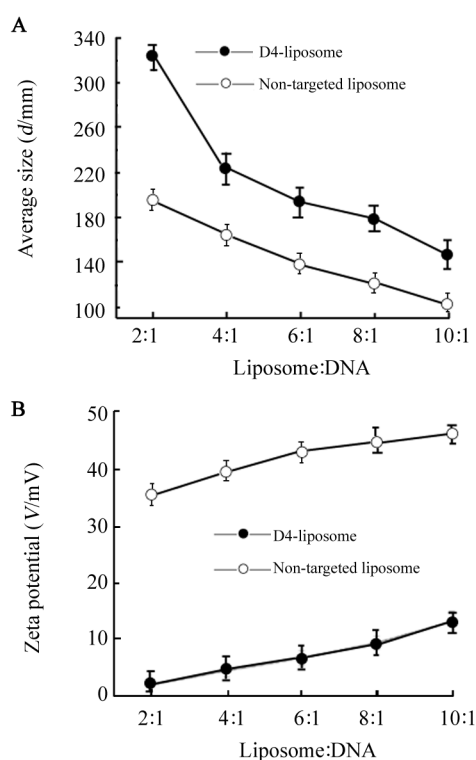


图 1 脂质体/DNA 复合物的粒径 (A) 和 Zeta 电位 (B)
Fig. 1 Particle size (A) and Zeta potential (B) of liposome/DNA complex

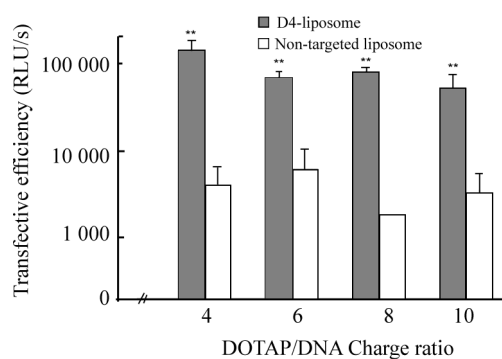


图 2 无血清培养液中不同 DOTAP/DNA 电荷比的脂质复合物对 H1299 细胞的转染效率
Fig. 2 Transfection efficiency of lipoplex with different DOTAP/DNA charge ratios on H1299 cells in serum free medium

** $P < 0.01$ vs non-targeted liposome

2.4 D4-脂质体促进 FAM-siRNA 对细胞的转染 荧光显微镜观察 H1299 细胞转染荧光标记的

FAM-siRNA 的情况, 由于 siRNA 容易被降解, 因此实验用的培养基为无血清培养基。结果(图 4)显示, 在荧光显微镜视野下, D4-脂质体转染细胞能观察到的绿色荧光明显比非靶向脂质体强。由此可见, D4 修饰的脂质体可促进细胞转染 FAM-siRNA。

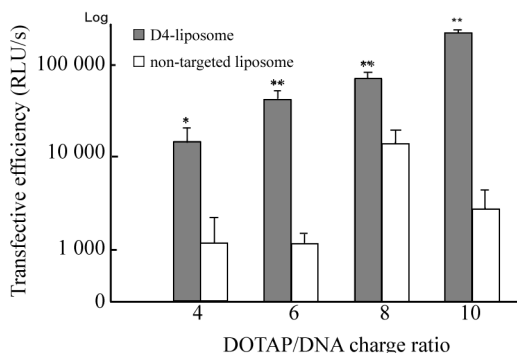


图 3 10% FBS 培养基中不同 DOTAP/DNA 电荷比的脂质复合物对 H1299 细胞的转染效率

Fig. 3 Transfection efficiency of lipoplex with different DOTAP/DNA charge ratios on H1299 cells in 10% FBS-containing medium

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs non-targeted liposome

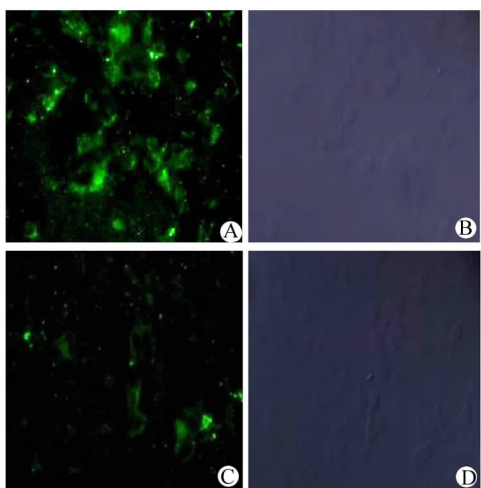


图 4 荧光显微镜观察 H1299 细胞中脂质体/FAM-siRNA 复合物的转染效率(×4 000)

Fig. 4 Transfection efficacy of liposome/FAM-siRNA complex in H1299 cells observed by fluorescence microscopy(×4 000)

A, B: D4-liposome; C, D: Non-targeted liposome;
A, C: Dark field; B, D: Bright field

3 讨论

PEG 化是最常见的阳离子脂质体修饰方法, 它

可以提高脂质体的稳定性。但是研究^[11-12]发现, PEG 修饰后的非病毒基因载体纳米粒, 细胞转染效率受到抑制, 原因是 PEG 修饰会降低脂质体表面电荷, 从而影响复合物进入细胞。本研究将筛选得到的 EGFR 配体分子 D4^[13] 联接在 PEG 末端并修饰脂质体, 通过促进受体介导的细胞内吞作用帮助复合物进入细胞, 从而提高基因的转染效率。

脂质体/DNA 复合物的表面电荷和粒径是基因转染中的重要影响因素^[14-15]。本研究对靶向脂质体、非靶向脂质体与 DNA 形成的复合物的粒径和 Zeta 电位进行了分析。结果显示, D4-脂质体/DNA 复合物粒径比非靶向脂质体/DNA 复合物大, 其中在 2:1 时, 粒径相差最大为 130 nm, 其余电荷比处, 粒径差异较小。这可能是因为在较低的电荷比处, 脂质复合物复合得比较松散。D4-脂质体/DNA 复合物的 Zeta 电位比非靶向脂质体/DNA 复合物电位低, 可能是因为多肽 D4 在中性环境中带负电造成的。

由于血清中含有各种带电荷的分子, 尤其是有很多带负电荷的蛋白分子, 会与表面带正电荷的阳离子脂质体结合, 从而改变阳离子脂质体表面结构和物化特征, 影响转染效率。因此, 本研究在无血清培养基和含有 10% FBS 的培养基中分别进行转染实验, 对比了血清对转染的影响。结果发现血清对达到转染效率最佳时的电荷比是有影响的, 在有血清的条件下, 非靶向脂质体和 D4-脂质体的最佳转染效率的电荷比都比在无血清的情况下要高, 非靶向脂质体的最佳转染效率的电荷比是 8:1, 而 D4-脂质体的最佳转染的电荷比是 10:1, 但是, 无论是在有血清还是无血清的培养基中, 在相同的电荷比处, D4-脂质体介导的质粒转染效率都比非靶向脂质体显著增高。

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术近年来迅速发展为确认药物靶标和研究基因功能的有力工具, 并逐渐应用到治疗相关疾病, 并有望在肿瘤治疗中发挥独特的作用^[16-18]。siRNA 能在 mRNA 水平上诱发序列特异性的转录后基因表达沉默, 是 RNA 干扰作用得以发生的重要效应分子, 因其特异性、高效性以及作为基因治疗药物的巨大潜力而倍受青睐^[19-21]。在质粒 DNA 的转染中, D4 修饰的脂质体显示提高细胞转染效率的效应, 因此, 本研究也对其在 siRNA 的输送中进行了考察, 从荧光显微镜观察的结果来看, D4 也能促进脂质体/FAM-siRNA 在肿瘤细胞中的摄取。

总之, 多肽配体 D4 可以有效的提高 PEG 化的

阳离子脂质体/DNA 复合物、阳离子脂质体/FAM-siRNA 对高表达 EGFR 肿瘤细胞的转染效率,下一步将研究 D4 修饰的阳离子脂质体在动物体内基因输送的效果,包括探索 D4 修饰的阳离子脂质体在动物体内的分布、稳定性和肿瘤靶向输送效果。

[参考文献]

- [1] Veiseh O, Kievit FM, Gunn JW, et al. A ligand-mediated nanovector for targeted gene delivery and transfection in cancer cells [J]. *Biomaterials*, 2009, 30(4): 649-657.
- [2] Kang JH, Toita R, Katayama Y. Bio and nanotechnological strategies for tumor-targeted gene therapy [J]. *Biotechnol Adv*, 2010, 28(6): 757-763.
- [3] Mamot C, Drummond DC, Noble CO, et al. Epidermal growth factor receptor-targeted immunoliposomes significantly enhance the efficacy of multiple anticancer drugs *in vivo* [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(24): 11631-11638.
- [4] Mamot C, Ritschard R, Küng W, et al. EGFR-targeted immunoliposomes derived from the monoclonal antibody EMD72000 mediate specific and efficient drug delivery to a variety of colorectal cancer cells [J]. *J Drug Target*, 2006, 14(4): 215-223.
- [5] Song S, Liu D, Peng J, et al. Peptide ligand-mediated liposome distribution and targeting to EGFR expressing tumor *in vivo* [J]. *Int J Pharm*, 2008, 363(1/2): 155-161.
- [6] Mishra S, Webster P, Davis ME. PEGylation significantly affects cellular uptake and intracellular trafficking of non-viral gene delivery particles [J]. *Eur J Cell Biol*, 2004, 83(3): 97-111.
- [7] Mekler LB. Specific selective interaction between amino acid groups of polypeptide chains [J]. *Biofizika*, 1969, 14(4): 581-584.
- [8] Root-Bernstein RS, Holsworth DD. Antisense peptides: A critical mini-review [J]. *J Theor Biol*, 1998, 190(2): 107-119.
- [9] Heal JR, Roberts GW, Raynes JG, et al. Specific interactions between sense and complementary peptides: The basis for the proteomic code [J]. *ChemBiochem*, 2002, 3(2/3): 136-151.
- [10] Bhakoo A, Raynes JG, Heal JR, et al. De-novo design of complementary (antisense) peptide mini-receptor inhibitor of interleukin 18 (IL-18) [J]. *Mol Immunol*, 2004, 41(12): 1217-1224.
- [11] Song LY, Ahkong QF, Rong Q, et al. Characterization of the inhibitory effect of PEG-lipid conjugates on the intracellular delivery of plasmid and antisense DNA mediated by cationic lipid liposomes [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1558(1): 1-13.
- [12] Ogris M, Steinlein P, Carotta S, et al. DNA/polyethylenimine transfection particles: Influence of ligands, polymer size, and PEGylation on internalization and gene expression [J]. *AAPS Pharm Sci*, 2001, 3(3): E21.
- [13] Song S, Liu D, Peng J, et al. Peptide ligand targeted delivery to EGFR expressing cancer cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *ICBPE*, 2006, 12: 490-493.
- [14] Ramezani M, Khoshhamdam M, Dehshahri A, et al. The influence of size, lipid composition and bilayer fluidity of cationic liposomes on the transfection efficiency of nanolipoplexes [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2009, 72(1): 1-5.
- [15] Chen C, Han D, Cai C, et al. An overview of liposome lyophilization and its future potential [J]. *J Control Release*, 2010, 142(3): 299-311.
- [16] Rothdiener M, Müller D, Castro PG, et al. Targeted delivery of siRNA to CD33-positive tumor cells with liposomal carrier systems [J]. *J Control Release*, 2010, 144(2): 251-258.
- [17] Alshamsan A, Hamdy S, Samuel J, et al. The induction of tumor apoptosis in B16 melanoma following STAT3 siRNA delivery with a lipid-substituted polyethylenimine [J]. *Biomaterials*, 2010, 31(6): 1420-1428.
- [18] Oh YK, Park TG. siRNA delivery systems for cancer treatment [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61(10): 850-862.
- [19] Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, et al. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs [J]. *Nature*, 2004, 432(7014): 173-178.
- [20] Patil Y, Panyam J. Polymeric nanoparticles for siRNA delivery and gene silencing [J]. *Int J Pharm*, 2009, 367(1/2): 195-203.
- [21] Kim SW, Kim NY, Choi YB, et al. RNA interference *in vitro* and *in vivo* using an arginine peptide/siRNA complex system [J]. *J Control Release*, 2010, 143(3): 335-343.

[收稿日期] 2011 - 11 - 10

[修回日期] 2012 - 01 - 25

[本文编辑] 王莹

· 读者 · 作者 · 编者 ·

文稿中统计学符号规范化书写的要求

本刊严格遵守国家标准 GB 3358 - 93《统计学术语》的有关规定。为此,请作者书写统计学符号时注意以下要求:(1)样本的算术平均数用英文小写 \bar{x} ,不用大写 X ,也不用 Mean 或 M ;(2)标准差用英文小写 s ,不用 SD;(3)标准误用英文小写 s_x ,不用 SE;(4) t 检验用英文小写 t ;(5) F 检验用英文大写 F ;(6)卡方检验用希腊文小写 χ^2 ;(7)相关系数用英文小写 r ;(8)自由度用希腊文小写 ν ;(9)样本数用英文小写 n ;(10)概率用英文大写 P ;(11)以上符号 \bar{x} 、 s 、 s_x 、 t 、 F 、 χ^2 、 r 、 ν 、 n 、 P 均为斜体。请作者注意遵照执行。

(本刊编辑部)