

• 基础研究 •

超声微泡-阳离子纳米脂质体复合体制备的实验研究

王红红 冉海涛 王志刚 李攀

摘 要

目的 利用生物素亲和素系统连接超声微泡与阳离子纳米脂质体, 制备一种新型的基因载体。
方法 机械振荡法制备生物素化超声微泡 (Bio-MB)。薄膜分散-膜挤压法制备生物素化阳离子纳米脂质体 (Bio-CNLP)。采用生物素亲和素系统偶联 Bio-MB 与 Bio-CNLP。以非生物素化超声微泡 (MB) 加非生物素化阳离子纳米脂质体 (CNLP) 组作为对照, 行激光共聚焦显微镜观察复合物形态与连接效果。
结果 Bio-CNLP 的平均粒径约 291.7 nm, 平均表面电荷约 (21.6±2.1) mV。激光共聚焦显微镜下 Bio-MB + Bio-CNLP 组可见绿色 Bio-MB 壁因连接 Bio-CNLP 而不光滑, 周围可见红色小圆形点状 Bio-CNLP 呈花环状聚集, 而 MB+CNLP 组 MB 壁光滑, 周围未见 CNLP 聚集。
结论 生物素亲和素系统可成功将 Bio-CNLP 与 Bio-MB 牢固连接, 有望为肿瘤基因治疗提供一种新的手段, 为探索基因载体和转染方法提供一种新的思路。
关键词 超声微泡 阳离子纳米脂质体 生物素亲和素系统

Preparation of Ultrasound Microbubbles-Cationic Nanoliposomes Complex

Wang Honghong, Ran Haitao, Wang Zhigang, et al

Institute of Ultrasound Imaging, Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010 China

Abstract: Objective To combine ultrasound microbubbles with cationic nanoliposomes by biotin-avidin system and prepare a new type of gene vector. **Methods** Biotinylated ultrasound microbubbles (Bio-MB) were prepared by mechanical shaking. Biotinylated cationic nanoliposomes (Bio-CNLP) were prepared by film dispersion method-film extrusion method. They were combined by Biotin-avidin system. With nonbiotinylated ultrasound microbubbles (MB) and nonbiotinylated cationic nanoliposomes (CNLP) served as the control group, the morphology and connect effect of complex were observed by laser scanning confocal microscope. **Results** The mean size of Bio-CNLP was 291.7 nm, and the mean surface potential was (21.6±2.1) mV. In Bio-MB+Bio-CNLP group, it showed that the green Bio-MB wall was not smooth and a number of red small round Bio-CNLP gathered around Bio-MB under confocal imaging. In MB+CNLP group, the MB wall was smooth and no conjugation of CNLP was observed. **Conclusions** Bio-MB and Bio-CNLP can be combined firmly and successfully by avidin-biotin system. It is potential to provide a new means of gene therapy and a new train of thought on probing gene vectors and transfection methods.

Key words: Ultrasound microbubbles, Cationic nanoliposomes, Biotin-avidin system.

基因治疗已成为当前肿瘤治疗研究的热点。超声靶向微泡爆破 (ultrasound-targeted microbubble destruction, UTMD) 介导基因定位释放是当前一种新型、无创的靶向性基因治疗技术, 可显著提高基因转染效率^[1-2], 但微泡携带基因量难以满足治疗需要。目前阳离子脂质体是一种成熟的非病毒基因投递载

体, 其携基因能力强, 但靶向性与转染效率不够。基于两者的优势与不足, 本实验拟通过生物素亲和素系统将超声微泡与纳米阳离子脂质体连接, 制备一种新型的高效的基因载体, 并通过激光共聚焦显微镜观察其连接效果。

资料与方法

1. 材料与仪器

二棕榈酰磷脂酰胆碱 (DPPC, Lipoid, 德国); 生物素化聚乙二醇二硬脂酰磷脂酰乙醇胺 (Bio-PEG-DSPE, Avanti, 美国); 二硬脂酰磷脂酰乙醇胺 (DSPE, Lipoid, 德国); 氢化大豆卵磷脂 (HSPC, Lipoid, 德国); 3β-[N-(N', N'-二甲基

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (No. 30900370), 重庆市科技攻关项目 (CSTC, No. 2009AB5216), 国家自然科学基金面上项目 (No. 30770565), 国家自然科学基金青年科学基金项目 (No. 30900371)
作者单位: 400010 重庆市, 重庆医科大学附属第二医院超声科 超声影像学研究所
通讯作者: 冉海涛 E-mail: rht66@163.com

胺乙基) 胺基甲酰基] 胆固醇 (DC-Chol, Avanti, 美国); 亲和素 (Sigma, 美国); HJ-1 型磁力搅拌器 (江苏荣华仪器公司); RE-52A 旋转蒸发仪 (上海亚荣仪器厂); CKX41 倒置荧光显微镜 (Olympus, 日本); TCS-SP2 激光共聚焦显微镜 (Leica, 德国)。

2. 生物素化超声微泡 (Bio-MB) 的制备

将一定摩尔比的脂膜材料 DPPC、Bio-PEG-DSPE 置于甘油及 PBS 混悬液中, 同时加入微量 FITC, 42 °C 水浴 30 min, 充入全氟丙烷气体, 机械振荡 55 s, 用 4 ml PBS 缓冲液 (pH=7.4) 稀释混悬液, 即得到 Bio-MB。同时, 制备非生物素化超声微泡 (MB) 用于对照组中做连接, 其制备过程中用 DSPE 取代 Bio-PEG-DSPE, 其余方法同 Bio-MB。

3. 生物素化阳离子纳米脂质体 (Bio-CNLP) 的制备

取一定摩尔比的 HSPC、DC-Chol、Bio-PEG-DSPE 溶于 4 ml 氯仿, 同时加入微量罗丹明 6G, 用封口膜封住烧杯口磁力搅拌 30 min。再置旋转蒸发仪 50 °C 减压蒸发 30 min 形成均匀的薄膜。然后加入 PBS 缓冲液 (pH=7.4) 移出薄膜使磷脂浓度为 10 mg/ml, 超声分散 2 min, 将此混悬液分别通过孔径为 450、220 nm 的微孔滤膜各 3 次, 即得到 Bio-CNLP。应用光镜、透射电镜观察其形态, 测其粒径及表面电位分布。同时, 制备非生物素化阳离子纳米脂质体 (CNLP) 用于对照组中做连接, 其制备过程中未加入 Bio-PEG-DSPE, 其余步骤同 Bio-CNLP。

4. Bio-MB 与 Bio-CNLP 的连接实验

实验组连接的制备: 将 2 中制备的 Bio-MB 静置 15 min, PBS 缓冲液 (pH=7.4) 多次漂洗直至下层液体无色。取 100 μ l 漂洗后的 Bio-MB, 加入过量亲和素, 4 °C 轻摇混匀孵育 30 min, 待反应完成后漂洗过量的亲和素。在亲和素化的微泡中加入过量的 Bio-CNLP, 4 °C 轻摇混匀孵育 30 min, 待反应完成后多次用 PBS 缓冲液 (pH=7.4) 漂洗未连接上的 Bio-CNLP, 上层即为超声微泡与阳离子脂质体连接的复合物。对照组连接的制备: 连接过程中用 MB 取代 Bio-MB, 用 CNLP 取代 Bio-CNLP, 其余操作步骤同实验组。

5. 激光共聚焦显微镜观察复合体与对照组的形态及连接效果

制备过程中用 FITC 标记超声微泡, 用罗丹明 6G 标记阳离子脂质体, 实验组与对照组采取相同操作。将制备好的实验组与对照组的样品送检激光共聚焦显微镜观察连接情况。

结 果

1. Bio-MB 一般特性检测

Bio-MB 外观呈均匀的凝乳状混悬液; 光镜下可见微泡呈圆形, 表面光滑, 大小较均一, 分布较均匀; 使用 DFY 超声定量仪测得其粒径约 1.52 μ m。

2. Bio-CNLP 一般特性检测

Bio-CNLP 在光镜下呈圆形, 大小均一, 分布均匀 (图 1); 透射电镜下, 脂质体呈球形或类球形 (图 2)。平均粒径约 291.7 nm, 平均表面电位约 (21.6 $\pm$ 2.1) mV。

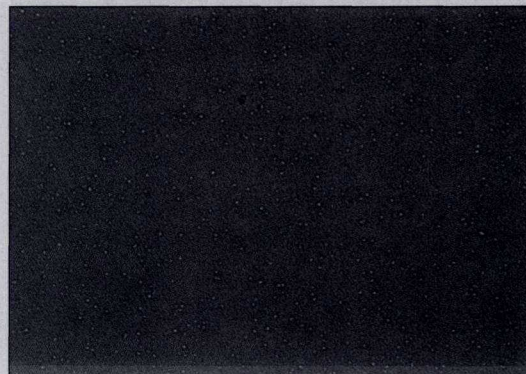


图 1 Bio-CNLP 光镜图 ($\times 400$)

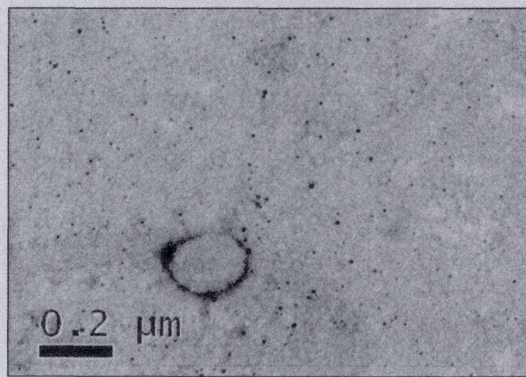


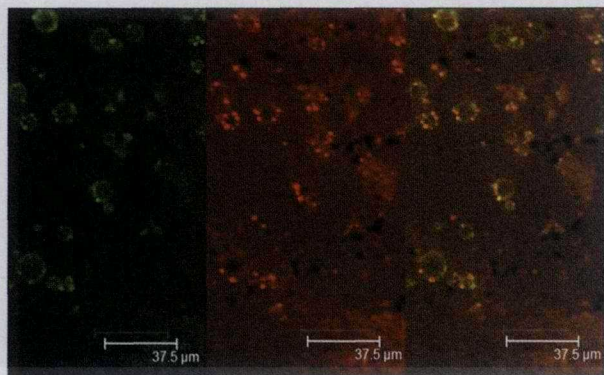
图 2 Bio-CNLP 透射电镜负染图 ($\times 39\ 000$)

3. 激光共聚焦显微镜观察复合体与对照组的连接效果

在激光共聚焦显微镜视野下, FITC 标记的超声微泡呈明亮的绿色, 罗丹明 6G 标记的阳离子脂质体呈明亮的红色。Bio-MB+Bio-CNLP 实验组绿色的 Bio-MB 壁因连接 Bio-CNLP 而不光滑, 周围可见数量不等的红色小圆形点状 Bio-CNLP 呈花环状或硬戒状聚集 (图 3); 而 MB+CNLP 对照组 MB 壁光滑, 周围未见 CNLP 聚集 (图 4)。

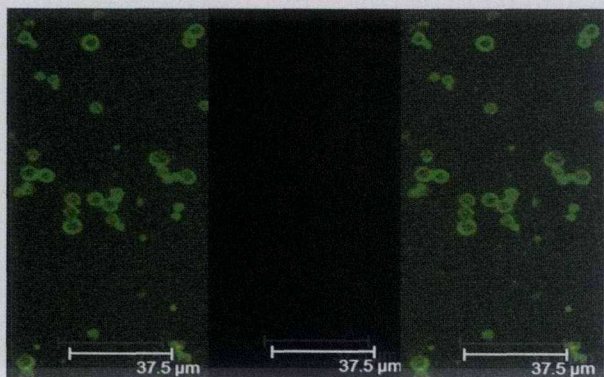
讨 论

近年来, 国内外研究表明 UTMD 介导靶向治疗技术已成为一种极具潜力的基因靶向递送新技术。有研究发现, 超声波破坏微泡造影剂可以增强空化效



图左：绿色通道可见 Bio-MB 壁不光滑，图中：红色通道 Bio-MB 周围可见数量不等的 Bio-NCLP 聚集，图右：合成通道 Bio-MB 周围可见绿色与红色合成的明亮黄色的 Bio-NCLP

图 3 激光共聚焦显微镜下观察实验组连接情况图 (×800)



图左：绿色通道可见 MB 壁光滑，图中：红色通道上未见 CNLP 形态，图右：未见 NCLP 聚集在 MB 周围

图 4 激光共聚焦显微镜下观察对照组连接情况图 (×800)

应，使裸露 DNA 的转染效率提高 3 000 倍^[3]。但微泡作为基因载体仍存在一些技术难题，首先其载基因量十分有限；其次微泡体内稳定性较差，易受血流剪切力和温度的影响而破坏，导致基因丢失或被血清 DNA 酶降解，实际到达靶器官或组织的基因量少。然而，阳离子脂质体介导基因治疗能够更有效地携带基因和保护核苷酸，使其免遭核酸酶的降解，在体内半衰期长，且具有较大的安全性。但阳离子脂质体主要存在靶向性不够、转染效率较低的问题。

鉴于超声微泡与阳离子脂质体的优势与不足，本

实验用细胞毒性小的阳离子脂膜材料 DC-Chol 成功制备了 Bio-CNLP，利用生物素亲和素系统将 Bio-MB 与 Bio-CNLP 连接^[4-5]，克服了微泡载基因能力低和脂质体靶向性不够、转染效率不高的弱点。激光共聚焦显微镜下实验组微泡周围可见数量不等的纳米脂质体聚集，使得微泡壁不光滑。但是由于实验中所用的材料均为脂溶性膜材，微泡易被脂质体上的罗丹明 6G 淡染呈红色，脂质体也同样易被微泡上的 FITC 淡染呈绿色，因此绿色通道下微泡壁因可见连接上的脂质体的轮廓而不光滑，红色通道下也隐约可见微泡的轮廓，合成通道上连接上的脂质体就成明亮的黄色。而对照组非生物素化超声微泡周围未见纳米脂质体聚集，绿色通道上与合成通道上微泡壁光滑，红色通道上未见脂质体形态。综合上述表明生物素亲和素系统可实现超声微泡与纳米脂质体的连接，为进一步研究体内体外复合物基因治疗的效果奠定基础。

结 论

利用生物素亲和素系统成功连接了超声微泡与纳米阳离子脂质体，综合了 UTMD 技术与阳离子纳米脂质体的优势与不足，为肿瘤基因治疗提供了一种新的载体与转染方法。

参考文献

- [1] Suzuki R, Maruyama K. Effective in vitro and in vivo gene delivery by the combination of liposomal bubbles (bubble liposomes) and ultrasound exposure. *Methods Mol Biol*, 2010, 605: 473-486.
- [2] Suzuki R, Takizawa T, Negishi Y, et al. Tumor specific ultrasound enhanced gene transfer in vivo with novel liposomal bubbles. *J Control Release*, 2008, 125(2): 137-144.
- [3] Lawrie A, Briskin AF, Francis SE, et al. Microbubble-enhanced ultrasound for vascular gene delivery. *Gene Ther*, 2000, 7(23): 2023-2027.
- [4] Kheirrolomoom A, Dayton PA, Lum AF, et al. Acoustically-active microbubbles conjugated to liposomes: characterization of a proposed drug delivery vehicle. *J Control Release*, 2007, 118(3): 275-284.
- [5] 朱叶锋, 冉海涛, 张群霞, 等. 靶向纳米脂质超声造影剂制备及其体外寻靶能力实验研究. *中国超声医学杂志*, 2009, 25(3): 220-222.

(2010-06-17 收稿, 2010-08-16 修回)

文稿中样本数符号的使用规范

文稿中用于表示样本数(病例数、病灶数、实验动物数等)的符号应该是英语字母 n 的斜体小写(n), 而不是楷体小写(n), 更不是楷体大写(N)。