

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.15.004  
文章编号: 1005-8982 (2019) 15-0016-05

## 载基因磁性脂质微泡的制备及对人 HepG2 细胞的生长抑制作用研究\*

李华梅, 景香香, 刘元税  
(海南省人民医院, 海南 海口 570311)

**摘要: 目的** 探讨自制载基因磁性脂质微泡的制备方法及其在联合磁感应热疗和基因治疗下对人 HepG2 细胞的生长抑制作用。**方法** 采用机械振荡法制备载基因磁性脂质微泡。对磁性脂质微泡进行表征分析及检测 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 磁性脂质微泡的升温情况。利用 pEGFP-C1 观察磁性脂质微泡介导外源基因转染的效率。MTT 法, 流式细胞仪评价载基因磁性脂质微泡对人 HepG2 细胞生长情况的影响。**结果** 载基因磁性脂质微泡粒径小, 性质稳定, 具有良好的磁响应性能, 可将外源 WtP53 基因转染至 HepG2 细胞系并高效表达, 在磁场作用下具有升温恒温能力, 在联合磁感应热疗和基因治疗下对人 HepG2 细胞有生长抑制作用。**结论** 载基因磁性脂质微泡为肿瘤的联合治疗开辟新的思路。

**关键词:** 磁性纳米粒子; 脂质微泡; 肝癌细胞; 生长抑制

**中图分类号:** R445

**文献标识码:** A

## Effect of magnetic lipid microbubble-based gene vectors on human HepG2 cell growth\*

Hua-mei Li, Xiang-xiang Jing, Yuan-shui Liu  
(Hainan General Hospital, Haikou, Hainan 570311, China)

**Abstract: Objective** To explore inhibitory effect of magnetic lipid microbubble based vectors on the growth of human HepG2 cells *in vitro*. **Methods** Magnetic lipid microbubbles based gene vectors were prepared by mechanical oscillation method. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles and heating up of magnetic lipid microbubble Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic lipid microbubble were identified. PEGFP-C1 was utilized to observe the efficiency of foreign gene transfection. mediated by magnetic lipid microbubbles. MTT method and flow cytometry were used to evaluate growth of HCC cells. **Results** The magnetic lipid microbubble contrast agent has a small particle size and stable properties, and has good magnetic response. The exogenous WtP53 gene can be transfected into HepG2 cell line and expressed constantly. Ability of self-heating up was achieved under the action of magnetic field. Gene therapy combination of magnetic induction hyperthermia and gene therapy in human HepG2 cells inhibited cellular growth. **Conclusions** Magnetic lipid microbubble based gene vectors may be a novel approach for cancer therapy.

**Keywords:** magnetic nano-particle; lipid micro-bubble; human HepG2 cells; growth inhibition

近年来, 随着医学分子影像学的发展, 靶向超声微泡在超声分子显像及治疗中的研究和应用愈来愈受

收稿日期: 2018-12-24

\* 基金项目: 国家自然科学基金 (No: 81760317, 30860270); 海南省自然科学基金 (No: 30854, 813208)

[通信作者] 景香香, E-mail: liuyuanhui@126.com

到学者们的广泛关注。本研究在脂质微泡中负载磁靶向纳米粒子并携带基因, 研制出一种新型的载基因磁性脂质微泡, 这样既可以在外加磁场的作用下实现基因的靶向高效定位释放, 又可以利用磁性粒子的磁感应升温特性对肿瘤细胞进行热疗, 为今后实现该磁性脂质微泡用于肿瘤的联合治疗提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、氨水、PEI、DSPC、DPPE (美国 Sigma 公司)、 $\text{SF}_6$  气体、吐温 80、甘油、丙二醇、pEGFP-C1 (4.7 kb)、 $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米粒子 (海南省人民医院中心实验室制备并储存)、PLXSN 质粒、Ecoli DH $\alpha$ Q 和人肝癌细胞系 HepG2 (海南省人民医院中心实验室储存)。

### 1.2 仪器

能谱仪 (Thermo NORAN, vantage, 美国), 机械振荡仪 (重庆影像研究所), SPG-06A 高频磁感应加热设备 (深圳双平高频加热器厂), 扫描电镜 (日本 JEOL JsM-6360LV), 流式细胞仪 (FACS vantage SE 型, 美国 Becton-Dickson 制造), 激光粒度分析仪 (英国 MALVERN 公司)。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 载基因磁性脂质微泡的制备** 将 3 种有机磷脂按一定比例充分溶解于有机溶剂中, 加热 30 min 使有机溶剂蒸发完全, 将葡萄糖和丙二醇按比例配置的水合液加入西林瓶中, 超声分散后使其形成脂质悬液。在此悬液里先加入一定量的 PEG4000 和吐温 800.01 ml 后, 将一定量 DNA/PEI/ $\text{Fe}_3\text{O}_4$  和明胶按比例加入到脂质悬液中, 用注射器充入定量的  $\text{SF}_6$  气体置换西林瓶上方的空气。将西林瓶放入机械振荡器中振荡 60 s, 即得载基因磁性脂质微泡。

**1.3.2 磁性脂质微泡体外升温实验** 以 PBS 溶液配制出  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  浓度分别为 1.0、1.5、2.0、2.5 g/L 等 4 种磁性脂质微泡溶液, 各取 5 ml 入平底试管 (20 mm) 中, 以 20℃ 为起始温度, 置于输出电流 30 A、频率 230 kHz 的 SPG-06A 高频磁感应加热设备加热 1 h。每 5 min 测 1 次温度, 以时间为横坐标、温度为纵坐标绘制磁性脂质微泡的升温曲线<sup>[1]</sup>。

**1.3.3 转染效率的观察** 转染之前, 预先将质粒 DNA 和 PEI- $\text{Fe}_3\text{O}_4$  分别用无血清培养基稀释, 然后按每孔中加入 4  $\mu\text{g}$  质粒 DNA 的量, 按照磁性纳米粒子与质

粒 DNA 的比率 (固定质粒 DNA 的质量) 分别加入不同量的 PEI- $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (15 g/L), 最后总体积为 400  $\mu\text{l}$ 。接着, 将复合物置于室温下孵育 30 min, 将此混合物加入脂质原溶液中摇振, 制备出载基因磁性脂质微泡。将 HepG2 细胞接种于 6 孔板中,  $5 \times 10^5$  个/孔细胞, 孵育 18 h 后, 用 2 ml 无血清 1640 培养基替换原来的细胞培养基, 其中含有按照不同比率配制的 500  $\mu\text{l}$  PEI- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ /pEGFP 载基因磁性脂质微泡 (A 组), 置于强磁铁上 30 min, 然后, 用新鲜的含有血清的培养基替换无血清的培养基, 继续孵育 24 h。以裸 DNA (B 组) 和明场图 (C 组) 作为转染的对照。荧光显微镜下观察细胞荧光蛋白的表达情况。

**1.3.4 载基因磁性脂质微泡基因治疗联合磁流体热疗对 HepG2 细胞生长的影响** MTT 方法测定细胞增殖率, 取对数生长期 HepG2 细胞并吹打成细胞悬液, 细胞浓度调整为  $4 \times 10^4$  个/ml, 按每孔 100  $\mu\text{l}$  接种于 96 孔板, 每组 5 个接种复孔, 接种细胞 24 h 后, 随机分为 4 组, 1 组加入 1640 培养液, 2 组加入磁性脂质微泡, 3、4 组加入载基因磁性脂质微泡, 其中 2、4 组联合 MFH 板置于 SP-04C 高频加热器平板线圈上 1 h, 给定输出电流 30 A, 交变磁场为 4 kW, 两板置于饱和湿度培养箱中继续培养 48 h, 每孔加入 MTT 20  $\mu\text{l}$ , 以相同条件继续培养 4 h 后弃去孔内液体, 加入溶液 150  $\mu\text{l}$  DMSO/孔, 摇匀 10 min。读取酶标仪上 493 nm 处光密度 (OD) 值, 取得细胞增殖率<sup>[2]</sup>。各组细胞存活率计算公式: 实验组 OD 均值 / 对照组 OD 均值  $\times$  100%。

流式细胞仪的测定, 取对数生长期的 HepG2 细胞吹打成细胞悬液, 将其浓度调整为  $3 \times 10^5$  个/ml 后接种于培养瓶。4 个实验组共接种 4 个培养瓶, 24 h 后按分组情况分别加入 1640 培养液 (1 组)、磁性脂质微泡 (2 组)、载基因磁性脂质微泡 (3 组)、载基因磁性脂质微泡 (4 组), 其中 2、4 组置于 SP-04C 高频加热器平板线圈上 1 h, 给定交变磁场 4 kW, 输出电流 30 h, 4 瓶细胞置于饱和湿度的培养箱中培养 48 h。检测前将 PBS 洗涤 2 次的细胞重悬于 0.5 ml PI 染色液 (20 mg/ml, 0.25 mg/ml RNase A) 中于室温下避光染色 30 min, 用目丝网过滤后上机分析。

### 1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 22.0 统计软件。计数资料以率 (%) 表示, 比较采用  $\chi^2$  检验和  $\chi^2$  分割法,  $\chi^2$  分割法检验水准为  $\alpha = 0.0083$ ,  $P < 0.05$  为差异有统计

学意义。

## 2 结果

### 2.1 磁性脂质微泡造影剂的表征

所制磁性脂质微泡扫描电镜下似圆球形, 平均粒径为 1 127 nm, 分散度好 (见图 1)。表面能谱分析示磁性脂质微泡中 P 为脂质成分, Fe、O 为磁性材料的成分 (见图 2)<sup>[1]</sup>。

### 2.2 磁性脂质微泡体外升温实验结果

磁场强度恒定条件下, 磁性脂质微泡升温能力与 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 磁性纳米粒子浓度呈正相关, 但有共同规律: 前 30 min 升温快速, 30 ~ 50 min 升温平缓, 50 min 后恒定于 42 ~ 62℃ (见图 3)。

### 2.3 转染效率

pEGFP-C1/PEI/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 载基因磁性脂质微泡转染 HepG2 细胞后, 在荧光显微镜下可见绿色荧光蛋白的表达 (见图 4)。

### 2.4 载基因磁性脂质微泡基因治疗联合磁流体热疗对 HepG2 细胞生长的影响

2.4.1 MTT 实验结果 各组 HepG2 细胞相对增殖率比较, 差异有统计学意义 ( $\chi^2=16.481, P=0.001$ )。2、3、4 组对肝癌细胞 HepG2 增殖均有抑制作用, 且 4 组对 HepG<sub>2</sub> 细胞增殖的抑制作用高于 2、3 组。见图 5。



图 1 磁性脂质微泡扫描电镜图

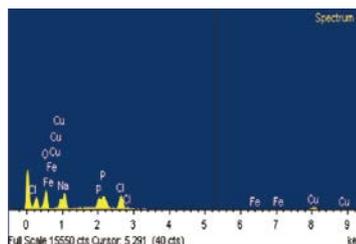


图 2 磁性脂质微泡的能谱分析

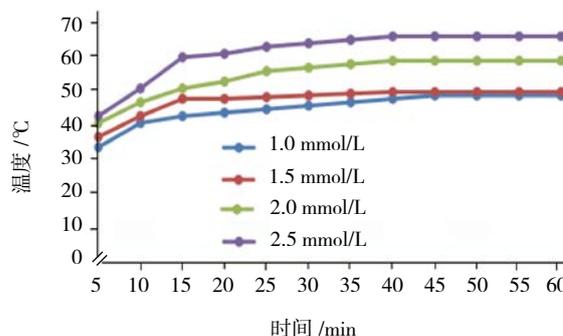
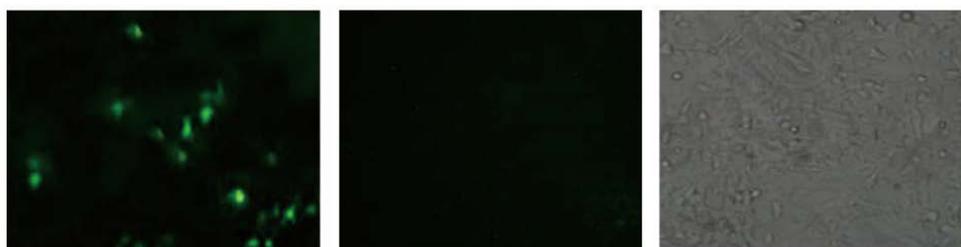


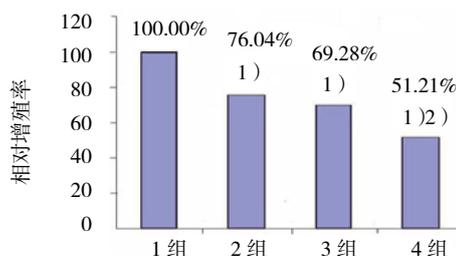
图 3 不同浓度 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 磁性脂质微泡磁感应升温曲线



A 载基因磁性脂质微泡转染组 B 裸露 DNA 直接转染组 C 明场图

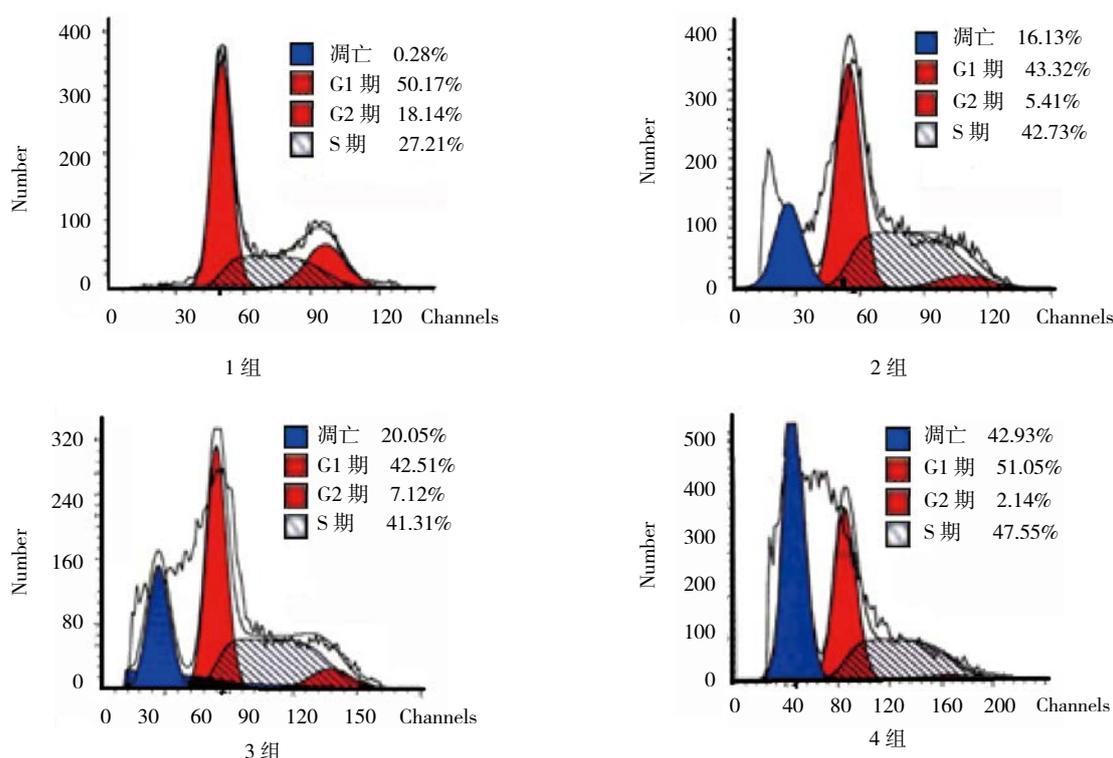
图 4 荧光显微镜下 HepG2 转染效率的观察 (×200)

2.4.2 流式细胞仪检测结果 各组 HepG2 细胞经处理 48 h 后, 流式细胞术分析显示: 2、3、4 组在细胞周期 G<sub>0</sub> 期前细胞周期均被不同程度地阻滞在 S 或 G<sub>1</sub>/M 期, 且出现亚二倍体凋亡峰。1 组凋亡率为 0.28%, 2 组凋亡率为 16.13%, 3 组凋亡率为 20.05%, 4 组凋亡率为 42.93%, 各组凋亡率比较差异有统计学意义 ( $\chi^2=46.835, P=0.000$ ), 2 组与 3 组凋亡率比较差异无统计学意义 ( $P>0.0083$ ), 2 组与 4 组、3 组与 4 组凋亡率比较差异有统计学意义 ( $P<0.0083$ )。见图 6。



1) 与 1 组比较,  $P<0.05$ ; 2) 与 2、3 组比较,  $P<0.05$

图 5 载 Wtp53 基因磁性脂质微泡对 HepG2 的生长抑制作用

图 6 载 *Wtp53* 基因磁性脂质微泡处理细胞后的流式细胞图

### 3 讨论

超声微泡经历了从普通微泡到靶向微泡的发展阶段, 现阶段, 在磁性脂质微泡的表面进行修饰<sup>[3]</sup>或在内部进行负载, 使其成为药物和基因的靶向载体, 制备出兼具靶向诊断和治疗的磁性脂质微泡成为研究热点。

超声微泡用于包裹气体的壳膜材料主要是体内可生物降解的高分子多聚物<sup>[4-5]</sup>、脂质<sup>[6]</sup>或白蛋白<sup>[7]</sup>, 为了便于微泡携带更多抗体和多肽等配体<sup>[8-9]</sup>, 可通过调节壳膜材料的脂质配比或是适当配比辅料来对微泡表面进行修饰。超声微泡的气体核心多采用氟碳气体(如  $C_6F_6$ )或氟硫气体(如  $SF_6$ ), 其优点为弥散度低、血液溶解度低。本室成膜材料选择有机合成磷脂, 膜内填充  $SF_6$  气体, 采用机械振荡法制备磁性脂质微泡, 经反复验证, 确定振荡频率为 4 500 r/min, 即可使微泡粒径  $< 2 \mu m$ , 能经血液循环顺利到达病变部位, 不易导致肺栓塞。

超声微泡不仅用于制备影像增强剂来提高图像对比度, 同时也可作为靶向基因载体来携带基因。为了赋予普通微泡磁靶向性和磁感应升温特性且又可作为基因载体, 笔者采用一定技术将进行表面修饰的磁性纳米粒与 PLSN-53 质粒结合后混入脂质原溶液中

一起摇振, 即制备出载基因磁性脂质微泡。

研究者将磁性脂质微泡作为一种安全、便捷的载体<sup>[10-11]</sup>, 其表面或内部携带的基因或药物能够靶向释放, 从而达到治疗疾病的目的。基因的有效转染是基因治疗成功的关键。HALLOW 等<sup>[12]</sup>的研究表明, 微泡作为一种空化核, 在超声辐照下可产生瞬时空化, 升高局部组织和毛细血管细胞膜的通透性, 促成声孔形成。另外有学者研究亦表明<sup>[13]</sup>, 超声作用微泡产生的空化效应使其携带的药物和基因得到高效利用, 达到良好的靶向治疗效果。SAKAKIMA 等<sup>[14]</sup>研究发现, 超声辐射联合磁性脂质微泡转染细胞可使转染效率提高近 6 倍。LENTACKER 等<sup>[15]</sup>制作的携带质粒 DNA 微泡可提高人肝癌细胞转染效率, 明显抑制肝癌细胞的生长。QIU 等<sup>[16]</sup>利用超声辐照下, 微泡声空化效应介导 EGFP 基因转染兔肌腱, 结果证实 EGFP 基因在兔肌腱中得到持续高表达。

本研究创新性地具有高热稳定性、良好的水溶性和较大的生物相容性的磁性纳米粒子引入超声微泡, 旨在赋予普通微泡磁靶向性的同时, 使微泡对肿瘤组织兼具基因治疗和磁感应热疗<sup>[17]</sup>的特性。本实验交变磁场中包有磁性纳米粒的脂质微泡悬浮液温度上

升后稳定在 42 ~ 62 ℃, 该区间温度对肿瘤热疗具有良好效果。因此, 可以利用不同浓度磁性脂质微泡在一定磁场下的升温恒温来实现对肿瘤的热疗<sup>[1]</sup>。

本研究制备的磁性脂质微泡不仅具有磁场的靶向性, 同时可作为一种新型的磁流体和基因的载体, 对肿瘤进行磁感应热疗和基因治疗, 有望成为靶向肿瘤治疗的新途径。

#### 参 考 文 献:

- [1] 李华梅, 张佳, 张东生. 磁性脂质超声微泡造影剂的制备及影像增强的实验研究[J]. 东南大学学报(医学版), 2009, 28(6): 474-478.
- [2] 倪海燕, 张东生, 杜益群. As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 磁性纳米微球的制备及其联合磁流体热疗对宫颈癌治疗的体外实验研究[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2006, 26(4): 271-274.
- [3] MYRSET A H, FJERDINGSTAD H B, LEE R J, et al. Design and characterization of targeted ultrasound microbubbles for diagnostic use[J]. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 2011, 37(1): 136-150.
- [4] PISANI E, YSAPIS N, PARIS J, et al. Polymeric nano/microcapsules of liquid perfluorocarbons for ultrasonic imaging: physical characterization[J]. *Langmuir*, 2006, 19(22): 4397-4402.
- [5] KIM J H, PARK K, NAM H Y, et al. Polymers for bioimaging[J]. *Progress in Polymer Science*, 2007, 32(15): 1031-1053.
- [6] AMAUD B, PATRICK S, FRANCOIS H, et al. Design of targeted lipid nanocapsules by conjugation of whole antibodies and antibody Fab' fragments[J]. *Biomaterials*, 2007, 23(28): 4978-4990.
- [7] MAAYAN D E, DAN A, MARCELE M, et al. The effects of albumin coated microbubbles in DNA delivery mediated by therapeutic ultrasound[J]. *Journal of Control Release*, 2006, 14(12): 156-166.
- [8] RYCHAK J J, LINDNER J R, LEY K, et al. Deformable gas-filled microbubbles targeted to P-selectin[J]. *Journal of Control Release*, 2006, 114(3): 288-299.
- [9] LYSHCHIK A, FLEISCHER A C, HUAMANI J, et al. Molecular imaging of vascular endothelial growth factor receptor 2 expression using targeted contrast-enhanced high-frequency ultrasonography[J]. *Journal of Ultrasound in Medicine*, 2007, 26(11): 1575-1586.
- [10] KONG W T, WANG W P, ZHANG W W. Contribution of contrast-enhanced sonography in the detection of intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. *J Ultrasound Med*, 2014, 33(2): 215-220.
- [11] JIANG Z Z, XIA G Y, ZHANG Y. Attenuation of hepatic fibrosis through ultrasound-microbubble-mediated HGF gene transfer in rats[J]. *Clin Imaging*, 2013, 37(1): 104-110.
- [12] HALLOW D M, MAHAJAN A D, MCCUTCHEN T E, et al. Measurement and correlation of acoustic cavitation with cellular bioeffects[J]. *UL-trasound Med Biol*, 2006, 32(7): 1111-1122.
- [13] BAZAN-PEREGRINO M, ARVANITIS C D, RIFAI B, et al. Ultrasound-induced cavitation enhances the delivery and therapeutic efficacy of oncolytic virus in an invitro model[J]. *J Control Release*, 2012, 157(2): 235-242.
- [14] SAKAKIMA Y, HAYASHI S, YAGI Y, et al. Gene therapy for hepatocellular carcinoma using sonoporation enhanced by contrast agents[J]. *Cancer Gene Therapy*, 2005, 12(11): 884-889.
- [15] LENTACKER I, VANDENBROUCKE R E, LUCAS B, et al. New strategies for nucleic acid delivery to conquer cellular and nuclear membranes[J]. *J Control Release*, 2008, 132(3): 279-288.
- [16] QIU L, ZHANG L, WANG L. Ultrasound-targeted microbubble destruction enhances naked plasmid DNA transfection in rabbit achilles tendons[J]. *Gene Ther*, 2012, 19(7): 703-710.
- [17] 唐毓林, 唐卫中. 直肠癌放疗, 化疗, 热疗及基因治疗新进展[J]. *结直肠肛门外科*, 2015, 21(6): 483-488.

(张蕾 编辑)