

[文章编号] 1007-385X(2002)02-0137-03

以质粒为载体的基因治疗现状

孙 丽 综述, 刘定千 审阅(中科院上海生物化学和细胞生物学研究所, 上海 200031)

[摘要] 近年来,质粒载体在基因治疗中的应用已引起人们的关注,并取得了很大进展。与病毒载体相比,质粒的优点为:制备简单,快捷,成本低廉,用于基因治疗较安全,并能与其它合成载体联合使用。本文就近年来质粒载体的发展,对质粒的设计,质粒导入机体的方法和途径、体内分布,和质粒抗癌药物的疗效进行了综述。

[关键词] 质粒载体; 阳离子脂质体; 肿瘤

[中图分类号] Q782 [文献标识码] A

* 实现肿瘤基因治疗的关键是要使用高效安全的基因导入系统。病毒载体,如逆转录病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体、疱疹病毒载体、痘苗病毒载体^[1]等,虽然能使基因高水平导入和表达,但所引发的宿主炎症免疫反应较强,可能通过重组产生致病的野生型病毒,并且生产成本甚高。这些缺点加速了人们对新的、无毒的、低成本的非病毒基因载体的研究。

质粒作为非病毒载体在基因治疗中的应用前景引人^[2]。当质粒内插入具有治疗作用的目的基因及所有顺式调控元件,如启动子、增强子及沉默子序列和转录处理信号时,就可以用于哺乳细胞的转染;当含有一个病毒复制子时,即可指导质粒在靶细胞核中扩增。同时质粒 DNA 与重组病毒相比,具有操作简单,可容纳的插入序列大,整合和扩散的危险性小,制备容易、生产成本很低等优点。另外质粒 DNA 的抗原性低,可多次投药而不引起如病毒载体那样的严重免疫反应。因此,近年来以质粒为载体的基因治疗研究很多,尤其是使用阳离子脂质体为导入介质的质粒系统。

1 基因治疗中使用重组质粒载体的设计

用于基因治疗的质粒载体要满足一定的要求。① 带有抗性标记基因:为了保证细菌体内质粒的存在,在发酵过程中需要加入选择压力。目前在分子生物学研究中使用最多的选择标记是 β -内酰胺类抗生素抗性标记。然而使用此种抗性生产质粒可能残留有 β -内酰胺类抗生素,而引起敏感个体产生过敏反应。美国生物发展研究中心(CBER)建议使用氨基糖苷类抗生素抗性,如卡那霉素抗性和新霉素抗性;② 减少质粒 DNA 序列和人基因组 DNA 序列的同源性,减少质粒 DNA 整合进入人类基因组的可能;③ 具有大肠杆菌的复制起点和真核启动子(如人巨细胞病毒早期启动子),既可在大肠杆菌中复制又能在真核细胞中表达;④ 所含外源基因片段能在真核中表达;⑤ 质粒具有较高的拷贝数;⑥ 质粒的大小:药物在装瓶前都需经无菌过滤,大质粒难以通过 0.2 μm 的无菌滤膜,易造成损失,所以在设计质粒时应尽量去除非必须序列,降低质粒的分子量,以免除这种损失。

2 质粒导入机体的方法

2.1 作为阳离子脂质体复合物导入

带正电荷的脂质体和带负电荷的质粒 DNA,经简单混合后,在静电引力作用下形成阳离子脂质体/质粒复合物。阳离子脂质体/质粒复合物在转染哺乳动物细胞时具有很大优势,其特征为:① 脂质体制备方法多样,结构设计简单;② 可转染多种类型的细胞(正常的或病变的内皮细胞、巨噬细胞、和肿瘤细胞);③ 与其他非病毒 DNA 转移系统比,易与细胞结合并被细胞内吞,具有较高的转染率;④ 免疫原性和生物毒性低,体内使用安全;⑤ 可运载大小不同的质粒 DNA,其容量大大超过其他基因载体;⑥ 能抵抗核酸酶,延缓基因降解。

阳离子脂质体导入介质系统由阳性脂质和中性的辅脂质组成。辅脂质能促进 DNA 从阳离子脂质体中释放。对于体内基因转染,辅脂质的选择应依据给药途径^[3]。气管和组织给药时,选用含 DOPE(双油酰磷脂酰乙醇胺)的阳性脂质体可提高 DNA 的转染率,DOPE 能和复合物形成六面体,利于复合物与转染细胞膜的融合,促进 DNA 的释放^[4];而由静脉给药时,用 CHOL(胆固醇)代替 DOPE 能使基因转染效率明显提高,尤其在肺内的转染效率^[5-6]。

阳离子脂质体/DNA 复合物的物理化学性质,如脂质体/质粒的电荷比、脂质和辅脂质的摩尔比等都影响基因的转染效率、组织器官分布和表达。研究表明,基因的转染效率和表达水平会随着脂质体/质粒电荷比的增加而增加,Ram 等报道 DOTMA(氯化-N-[1-(2,3-双油酰氨基)-丙基]-N,N,N,-三甲胺):DOPE/pDNA 的电荷比在 0.5:1 时基因表达水平比 3:1 时低 20~200 倍^[7],高的电荷比可使伸展态的 DNA 得到压缩,免被核酸酶降解。有报道说可使用 48:1 的电荷比(DOTMA:DOPE/DNA),但过高的电荷比反而不利于质粒的释放且可产生生物毒性^[3]。脂质和辅脂质的摩尔比对质粒在肝肺中的分布影响不明显,但可显著影响质粒基因的表达水平,如 DOLCE(1-肉碱-油酰油酸脂):DOPE(4:1)时基因在肺和肝中的表达水平比(1:1)时分别提高了 32 倍和 7 倍^[8]。

阳离子脂质体在制备时,要满足方法的简便性和可重复性,主要的制备方法^[9]有:① 机械法(薄膜法):将脂质和辅脂质混合溶于有机溶剂中,通入氮气或减压除去有机溶剂,

在容器底壁上就形成了脂质薄膜,将无菌水加在脂质薄膜上,室温下放置 30 min 水化,在高于相变温度下震荡分散,脂质碎片吸水膨胀,弯曲封闭形成脂质体。② 反相蒸发法:脂质和辅脂质混合溶于有机溶剂,通过减压去除有机溶剂,再加入有机溶剂溶解脂质,脂质溶解后加入无菌水,以超声波处理直至混合物形成均匀单相系,减压蒸发有机溶剂,即得反相蒸发脂质体。③ 去污剂分散法:脂质和辅脂质混合溶于有机溶剂,混匀,减压去除有机溶剂形成脂质薄膜,用适当的去污剂分散脂质,形成脂质/去污剂微团,除去去污剂,就自发形成单层脂质体。④ 冻融法:将薄层法制备的脂质分散物经过反复快速冷冻和融化而置备脂质体的方法。

2.2 作为裸 DNA 导入

裸 DNA 导入即将治疗基因连接在表达的质粒载体中进行 DNA 注射而不依赖其他物质(脂类或蛋白质)介导,是最简单的载体系统。基因枪和电穿孔技术的出现显著提高了裸 DNA 基因转移的效率, DNA 不但可以穿透靶细胞的细胞膜,还可直接到达细胞核,避免了溶酶体酶的降解。裸 DNA 适合于局部给药。

2.3 导入途径

① 瘤内注射^[10]:瘤内基因注射是一种导向治疗方法,可将基因直接注入肿瘤组织,提高基因的作用浓度,缩短基因到达肿瘤细胞的时间,减少治疗费用,同时也可避免基因表达产物对其他组织器官可能产生的损害。② 静脉注射:阳离子脂质体/质粒复合物静脉给药的研究很活跃。质粒 DNA/脂质体复合物经小鼠尾静脉注射后可分布于全身各个组织器官,而且方法简单。但静脉注射质粒/脂质体复合物在临床上所面临的主要问题是:基因表达的一过性;脂质体复合物与血液元件作用降低转染率。③ 经呼吸道给药:质粒脂质体复合物也可以雾化或滴注方式经呼吸道给药,复合物优先分布于肺内,对肺部疾病的治疗效果显著。

3 重组质粒导入机体后的分布、代谢动力学和药效

3.1 机体内的分布及代谢在无瘤小鼠尾静脉注射 DOTMA

DOPE/pCMV-CAT 复合物,注射后的第 15 分钟观察到质粒 DNA 大部分集中在肺[(83 ± 3.4)%],其次是肝[(11.4 ± 3.3)%],肾[(2.2 ± 0.8)%],脾[(1.9 ± 0.7)%],心脏[(0.95 ± 0.2)%]^[7]。多数研究证明,质粒优先分布于肺,这可能与肺的首过作用及肺内皮细胞具有很大的吸收面积有关。Meyer 等研究了质粒/脂质体复合物气管给药途径,得到的 DNA 分布结果与静脉给药相似^[11]。

质粒的消除速率很快,松弛型质粒的血浆半衰期为 10 ~ 20 min,超螺旋 DNA 在静脉注射后的 60 min 内可检测到,之后开始迅速减少。对组织进行 Southern 杂交检测发现完整质粒在肺、脾、肝、心、肾、骨和肌肉的存留时间不超过 24 h。7 d 之后,用 Southern 杂交就检测不到完整质粒的存在,然而用 PCR 分析质粒可在所有组织中存在 7 ~ 28 d。在一次给药 6 个月后,质粒仅存于肌肉中^[3]。

荷瘤小鼠在静脉注射 10 d 后,肺内质粒 DNA 的存留量为其峰值的 10%,肿瘤内质粒 DNA 的存留量为其峰值的

25%。初次注射后,隔 3 d 进行第 2 次注射,肿瘤内基因表达量恢复到初始峰值,肺内则未见基因表达的恢复^[12]。

3.2 质粒抗癌基因疗效观察

以质粒为载体的抗癌基因在体内和体外实验中都有明显的抑制肿瘤的作用。给荷瘤小鼠全身或局部注射血管抑素的表达质粒/脂质体复合物,黑色素瘤的生长速率降低了 50% ~ 90%^[12];利用电穿孔的方法定期给荷瘤裸鼠注射金属蛋白酶抑制子-4(TIMP-4)表达质粒,经过 14 d 的培养期,肿瘤的大小为对照组的 53%^[13];使用编码 IL-18 基因的质粒/脂质体复合物的荷瘤小鼠,其肿瘤浸润淋巴细胞中 NK 细胞的数量和活性大大增加^[14]。

以质粒为载体的肿瘤基因治疗在临床上也取得了一定疗效。1993 年 Nabel 报道了用外源性主要组织相容性复合蛋白基因-HLA-B7 的质粒/脂质体复合物治疗 5 位 HLA-B7 阴性的黑色素瘤患者。经过治疗,对一位患者的细胞免疫反应进行鉴定,发现 HLA-B7 激活的细胞毒 T 淋巴细胞(CTL)前体增加 5 倍;专一性 CTLs 可在肿瘤浸润淋巴细胞和外周血淋巴细胞中观测到。同时,临床观察到一位患皮肤黑色素瘤病人的肿瘤完全消退^[15]。

4 以质粒为载体的抗癌基因治疗的缺点

与病毒载体高转染率相比,质粒载体转染效率较低。病毒载体能整合入宿主的基因组,使其携带基因长期表达,而质粒 DNA 的表达具有一过性;后者对于希望治疗基因在患者体内长期表达的疾病是不利的(如血友病),但对那些不需要治疗基因长期表达的疾病来说则是优点。

5 质粒载体的工业化生产和成本

质粒存在于大肠杆菌中,所以可利用微生物发酵的方法进行大肠杆菌发酵,大量生产质粒,且生产周期短,工业成本低,已有报道称可从多达 3 500 L 的细菌培养液中提取 100 g 适合人体注射的纯质粒^[16]。

[参考文献]

- [1] Mulligan RC. The basic science of gene therapy[J]. Science, 1993, 260: 926-932.
- [2] Lew D, Parker SE, Latimer T, et al. Cancer gene therapy using plasmid DNA: Pharmacokinetic study of DNA following injection in mice (see abstract)[J]. Hum Gene Ther, 1995, 6: 553-564.
- [3] Sakurai F, Nishioka T, Saito H, et al. Interaction between DNA-cationic liposome complexes and erythrocytes is an important factor in systemic gene transfer via the intravenous route in mice: The role of the neutral helper lipid[J]. Gene Ther, 2001, 8: 677-686.
- [4] Horton HM, Dorigo O, Hernandez P, et al. IL-2 plasmid therapy of murine ovarian carcinoma inhibits the growth of tumor ascites and alters its cytokine profile[J]. J Immunol, 1999, 281: 78-81.
- [5] Li S, Rizzo MA, Bhattacharya S, Huang L. Characterization of cationic lipid-protamine-DNA(LPD) complexes for intravenous gene delivery[J]. Gene Ther, 1998, 5: 930-937.
- [6] Li S, Tseng WC, Stolz DB, et al. Dynamic changes in the characteristics of cationic lipidic vectors after exposure to mouse serum: Implication for intravenous lipofection[J]. Gene Ther, 1999, 6: 585-594.

- [7] Mahato RI, Anwer Khursheed, Tagliaferri Frank, *et al.* Biodistribution and gene expression of lipid/plasmid complexes after systemic administration [J]. *Hum Gene Ther*, 1998, 9: 2083-2099.
- [8] F Liu, H Qi, L Huang, *et al.* Factors controlling the efficiency of cationic lipid-mediated transfection *in vivo* via intravenous administration [J]. *Gene Ther*, 1997, 4: 517-523.
- [9] Rongen HA, Bult A, Van Bennekorn WP, *et al.* Liposome and immune [J]. *J Immunol Methods*, 1997, 204: 105-133.
- [10] Hersh EM, Stopeck AT, Clark PR. Intratumoral gene delivery for cancer treatment [J]. *Curr Res Mol Ther*, 1998, 1: 335-338.
- [11] Meyer KB, Thompson MM, Levy MY, *et al.* Intratracheal gene delivery to the mouse airway: Characterization of plasmid dna expression and pharmacokinetics [J]. (abstract) *Gene Ther*, 1995, 2: 450-460.
- [12] Rodolfo M, Cato EM, Soldati S, *et al.* Growth of human melanoma xenografts is suppressed by systemic angiostatin gene therapy [J]. *Cancer Gene Ther*, 2001, 8(7): 491-496.
- [13] Celiker MY, Wang M, Atsidaftos E, *et al.* Inhibition of Wilms' tumor growth by intramuscular administration of tissue inhibitor of metalloproteinases-4 plasmid DNA [J]. *Oncogene*, 2001, 20(32): 4337-4343.
- [14] Yoshimura K, Hozama S, Lizuka N, *et al.* Successful immunogene therapy using colon cancer cells(colon 26) transfected with plasmid vector containing mature interleukin-18 cDNA and the Iggkappa leader sequence [J]. *Cancer Gene Ther*, 2001, 8(1): 9-16.
- [15] Nabel GJ, Nabel EG, Yang ZY, *et al.* Direct gene transfer with DNA-liposome complexes in melanoma: Expression, biologic-activity, and lack of toxicity in humans [J]. *proc natl acad sci USA*, 1993, 90: 11307-11311.
- [16] Breul A, Müller M. 治療薬としてのプラスミドDNAの開発:大量生産の視点からの考察 [J]. *細胞*, 2001, 33(6): 28-31

[收稿日期] 2001 - 10 - 08

[修回日期] 2001 - 11 - 20

· 研究简报 ·

[文章编号] 1007-385X(2002)02-0139-01

阳离子脂质体介导小鼠白细胞介素 2 基因治疗头颈鳞癌的抗肿瘤作用研究

杨 焯¹, 刘世喜¹, 梁传余¹, 彭文珍²(1. 四川大学华西医院耳鼻喉科, 成都 610041; 2. 四川大学华西医疗中心分子生物与免疫实验室, 成都 610041)

白细胞介素 2(IL-2)是肿瘤免疫治疗中最有效的细胞因子之一。运用转基因技术将 IL-2 基因转入肿瘤细胞并表达,可克服全身应用 IL-2 蛋白质制剂所带来的副作用。国内外一些研究认为合适的脂质体和核酸物质的质量比是形成复合物理化特性的决定性因素,并影响其转染效率。转染肿瘤因肿瘤细胞的类型、脂质体结构和电荷不同等因素影响而效果各异。我们利用多价阳离子脂质体 LipofectAMINE 携带小鼠 IL-2 基因的真核表达质粒转染头颈鳞癌 SCC VII 细胞株及其移植瘤,旨在探讨脂质体转染特性,寻求最佳脂质复合物(Lipoplexes)转染比例,为进一步基因治疗提供最佳转导途径。

将表达 IL-2 基因的质粒型真核表达载体(PIL0555)和空载体 EP 扩增、纯化、定量和鉴定,紫外分光光度计测定 A260/A280 = 1.8 ~ 2.0。细胞培养和体内转染动物模型的建立:SCC VII 细胞株用含有 10% 小牛血清的 DMEM 完全培养基,在 37℃, 5% CO₂ 条件下待生长旺盛用 0.25% 胰酶消化, PBS 洗成 2 × 10⁴ L⁻¹ 细胞悬液,每只小鼠颈下接种 0.1 ml。当肿瘤长至 4 mm × 4 mm × 3 mm 时(接种第 6 天),将动物随机分组,氯胺酮麻醉下 U 型切开小鼠颈下皮肤暴露肿瘤,按分组直接向肿瘤内分别注射不同比例的脂质复合物 [脂质体:DNA(简称 L:D)分别为 1:1; 3:1; 5:1]、裸 DNA、空载体 EP、PBS 各 100 μl。切口用细丝线 1/0 缝合。治疗 48 h 后用摘眼球法收集小鼠血液,处死动物取肿瘤组织待测。相同 L:D = 3:1 比例的脂质体与质粒 DNA 剂量呈梯度递增,治疗方法同上。体外转染:待置入 6 孔板中的 3 × 10⁵/孔 SCC VII 细胞生长至 70% 密度时,用无血清培养基清洗细胞,裸 DNA、脂质体与质粒 DNA 按不同比例(L:D = 1:1; 3:1; 5:1; 8:1)分别稀释在 100 μl 的无血清、无双抗的 DMEM 培养基中,室温混合 15 min,再加入此培养基至 1 ml 均匀滴入每孔,注意观察毒性反应。37℃ 孵化 10 h 时加 1 ml 双倍血清培养基,转染 24 h 后更换完全培养基,48 h 取上清待测。肿瘤细胞培养上清和小鼠血清中的 IL-2

分泌水平检测:将肿瘤组织制成 1 × 10⁶ 细胞/孔悬液,6 孔板培养 24 h,取其上清待测。小鼠血液静止后离心 1 000 r/min, 10 min 取上清。ELISA 检测方法详见说明书,用 HTS7000 多孔板荧光/紫外高效分析仪绘制标准曲线和检测样本 OD 值。采用方差分析进行 F 检验和 q 检验。

体外不同比例的脂质复合物和裸 DNA 的转染比较结果显示不同 L:D 混合物与裸 DNA 相比,转染效果具有显著差异(P < 0.01),比例在 L:D = 5:1 以上 IL-2 呈高水平表达。体内不同比例的脂质复合物和裸 DNA 的转染比较(n = 4)示 L:D = 3:1 时 IL-2 分泌高于其它治疗组,与裸 DNA 转染相比 P < 0.05。L:D 相同比例的剂量梯度的研究(n = 3)表明随着 DNA 及脂质体的浓度增加,IL-2 分泌水平增高(组间无差异 P > 0.05),但高浓度时分泌下降。体内转染血清中 IL-2 的表达(n = 4)见荷瘤小鼠对照组 IL-2 分泌水平明显低于正常小鼠(P < 0.05),脂质复合物、裸 DNA 治疗后与治疗前血清 IL-2 水平相比有一定升高,但与正常小鼠相比无显著性差异(P > 0.05)。

我们的研究表明脂质复合物对头颈部癌进行瘤内直接基因转染的良好效能取决于其合适的构成比例和剂量,体外细胞转染的最佳脂质混和物比例不能作为体内转染的参考;与裸 DNA 转染相比,多价阳离子脂质体适于作为头颈肿瘤进行直接瘤内基因治疗的非病毒载体。我们对新型脂质混合物的优化组合的研究为基因治疗头颈癌和临床应用奠定了基础。

[关键词] 阳离子脂质体; IL-2; 基因治疗; 头颈肿瘤

[中图分类号] R739.6 [文献标识码] D

[收稿日期] 2001 - 11 - 15

[修回日期] 2002 - 01 - 15

[基金项目] 四川省 2000 跨世纪青年学科带头人基金(464),教育部回国人员启动基金(345)资助