

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2002 )02-0144-03

## Herceptin 治疗转移性乳腺癌的研究进展

宋海珠 综述, 罗荣城 审阅 ( 第一军医大学附属南方医院肿瘤科, 广州 510515 )

[ 摘 要 ] Herceptin 是一种针对 HER-2/neu 原癌基因产物的人源化单克隆抗体, 能特异的作用于 HER-2 受体过度表达的乳腺癌细胞。临床研究已评价了其药代动力学、临床治疗转移性乳腺癌的客观疗效和安全性问题。具有较大的临床应用及推广价值。

[ 关键词 ] Herceptin; 单克隆抗体; HER-2/neu 蛋白; 乳腺癌

[ 中图分类号 ] R392.11; R737.9 [ 文献标识码 ] A

乳腺癌是女性中最常见的恶性肿瘤, 术后复发和转移率较高。临床研究表明: 编码产物具有表皮生长因子受体( EGFR) 活性与功能的原癌基因 erb B-2, 又称为 neu 或 HER-2 是人类肿瘤中发生改变频率最高的癌基因之一。其基因表达水平和基因拷贝数目在乳腺癌细胞中升高显著, 是乳腺癌预后不良的一项独立危险因素。出现 HER-2 过度表达往往提示肿瘤恶性程度高, 进展迅速, 化疗缓解期短, 对三苯氧胺易产生耐药性, 无病生存和总生存率低<sup>[1]</sup>。HER-2 是一种具有膜外位点结构的跨膜癌基因蛋白, 因此可以作为抗乳腺癌治疗的靶抗原, 即以 HER-2 的特异性抗体对乳腺癌进行靶向治疗。Herceptin( 主要成分 Trastuzumab ) 即为一种针对 HER-2 受体的高纯度重组 DNA 衍生的人源化单克隆抗体, 由美国旧金山基因技术公司( Genentech Inc ) 和罗氏药厂( Roche ) 联合研究和生产, 1998 年被美国 FDA 批准上市。目前已通过 III 期临床试验, 主要用于治疗已发生转移的乳腺癌, 并取得了令人鼓舞的疗效<sup>[2]</sup>。

### 1 Herceptin 的作用机制

HER-2/neu 蛋白( 人类表皮生长因子受体 2 蛋白 ) 是由位于人第 17 号染色体 q11-22 位的原癌基因 HER-2/neu 编码的单链跨膜糖蛋白, 分子量为 185 kD, 因而又称 P185。HER-2/neu 蛋白由 1255 个氨基酸组成, 包括信号肽、胞外区、跨膜区和胞内区 4 个部分<sup>[3]</sup>。由于具内在酪氨酸激酶活性, 故与表皮生长因子受体( EGFR ), HER-3, HER-4 等同属 I 类受体酪氨酸激酶( RTK ) 超家族。它与 EGFR 结构高度相似, 约 50% 氨基酸残基同源, 在胞内氨基酸激酶区约 80% 以上的氨基酸残基同源, 被认为可能是一种未明确的生长因子受体<sup>[4]</sup>。原癌基因正常情况下不仅不会引起肿瘤, 相反还具有重要生理功能, 在细胞进行生命活动中必不可少。一旦活化即成为具有转化活性的细胞癌基因, 过度表达则可导致细胞过度增殖和表型向恶性转化。许多恶性肿瘤如乳腺癌、卵巢癌、肺癌、胃癌、结肠癌的细胞常可检测到 HER-2/neu 基因扩增或蛋白质过度表达, 提示 HER-2/neu 蛋白过度表达与肿瘤的发生有关。当 HER-2/neu 蛋白在细胞表面过度表达

时, HER-2/neu 受体的异质二聚体形成数量增加, 细胞信号传递系统过度活化, 从而导致细胞增殖失控, 发生癌变<sup>[5]</sup>。

HER-2/neu 蛋白位于细胞表面, 易被抗体接近, 因而可以制备针对 HER-2/neu 的单克隆抗体以阻断细胞增殖性信号的传导。Herceptin 即为针对 HER-2/neu 蛋白设计的人源化人鼠嵌合型鼠抗体, 通过基因工程方法将非特异性的人 IgG 的稳定区与鼠的抗 HER-2/neu 蛋白 IgG 的抗原决定簇嵌合在一起, 不仅对 HER-2 受体有高度亲和力, 还同时解决了鼠源性抗体应用于人体的免疫原性问题, 能减少人体内抗体( HAMA ) 的产生, 以避免被网状内皮系统清除, 因而能成功应用于临床。研究结果表明: Herceptin 可抑制 HER-2/neu 蛋白与 RTK 超家族的其它成员发生交联形成异质二聚体; 减弱细胞生长信号的传递; 还可通过诱导 P27<sup>kip1</sup> 和 RB 相关蛋白 P130, 大量减少 S 期细胞数目; 下调细胞表面的 HER-2/neu 蛋白; 减少血管内皮生长因子的产生; 介导对过度表达 HER-2/neu 肿瘤细胞的抗体依赖性细胞毒作用( ADCC ) 等机制来抑制肿瘤生长<sup>[5]</sup>。此外, Herceptin 可能介导 HER-2/neu 受体的内存降解从而减少其细胞表面密度, 抑制肿瘤的进一步生长<sup>[6]</sup>。体外和动物试验中: Herceptin 能显著抑制 HER-2 过度表达的乳腺癌细胞和卵巢癌细胞的增殖, 但对无 HER-2 过度表达的乳腺癌细胞和肺癌细胞无此作用。Herceptin 与多种化疗药物有相加或协同作用。Herceptin 与 DDP 联合, 对肿瘤细胞的杀伤作用提高 2 个数量级, 其机制为 Herceptin 使 HER-2 过度表达细胞对 DDP 诱导的 DNA 损伤的修复减少 35% ~ 40%, 从而增强 DDP 的细胞毒作用, 被称为受体增强的化疗敏感性<sup>[7]</sup>。小鼠移植瘤实验中, Herceptin 与紫杉醇联合运用, 抑癌率从单药的 35% 提高至 93%, 阿霉素与 Herceptin 联合也明显提高抑癌率<sup>[6]</sup>。此外, Herceptin 明显增强紫杉特尔、噻替派、足叶乙甙、氮甲喋呤和长春花碱的抗肿瘤作用<sup>[8]</sup>。

### 2 Herceptin 的临床研究及应用

Herceptin 的临床研究主要在美国进行, 业已完成 I ~ III 期和一些相关的临床研究, 评价了 Herceptin 单药或与化疗

药物联合治疗转移性乳腺癌的疗效和安全性。临床实验中所有的对象均为 HER-2 过度表达的转移性乳腺癌患者。

I, II, III 期临床试验均进行了药代动力学的研究。I 期临床中, Herceptin 按不同剂量水平 10 mg, 50 mg, 250 mg, 500 mg 递增, 单剂或每周 1 次多剂给药。Herceptin 的药代动力学呈剂量依赖型, 非线性特点。大多数病人的药代动力学符合一室模型, 随剂量增加, 药物半衰期延长, 血浆清除率下降, 血谷和峰浓度增加。单药为首次负荷量 4 mg/kg, 每周 2 mg/kg 维持的给药方法。Herceptin 的平均半衰期为  $(5.83 \pm 4.30)$  d, 平均血清清除率为每天  $(5.15 \pm 2.45)$  ml/kg, 血清谷浓度于治疗第 12 周达到稳态, 此时平均谷浓度 70  $\mu\text{g/ml}$ 。Herceptin 与化疗联合每周 1 次给药时, 血谷浓度与治疗后第 20 ~ 32 周达稳态。Herceptin 的药代动力学参数不受病人年龄、肾功能和 DDP 联合用药的影响。II 期临床所有研究对象都是转移后经 1 到 1 个以上方案化疗后, 抗拒常规化疗的乳腺癌晚期患者。研究表明: Herceptin 单药治疗转移性乳腺癌有效, 但与 DDP 联用的疗效优于 Herceptin 或 DDP 单药。Herceptin 剂量  $\geq 1.7$  mg/kg 时疗效优于低剂量。故采用首次负荷剂量 4 mg/kg, 维持剂量每周 2 mg/kg 的给药方式。III 期临床试验为随机、开放、多民族、多中心参与, 主要目的是进一步评价 Herceptin 与化疗联合治疗转移性乳腺癌的疗效和安全性。结果表明: 与单纯化疗比较, Herceptin 与阿霉素、环磷酰胺或紫杉醇联合治疗转移性乳腺癌明显提高疗效。并且在化疗第 32 周时生活质量评分可保持更高的趋势<sup>[10]</sup>。

大量 II 期和 III 期临床试验已经分别验证 Herceptin 作为二线或三线单药使用及作为一线药物与化疗药联用的疗效及安全性。美国最近将 114 名患者随机分为 2 组进行 Herceptin 一线单药治疗的试验。一组给予标准剂量, 即首剂 4 mg/kg, 每周 2 mg/kg (i. v.) 维持的给药方式; 另一组给予大剂量, 即首剂 8 mg/kg, 每周 4 mg/kg (i. v.) 维持的给药方式。入选者均为经免疫组化 (IHC) 检验 HER-2 2<sup>+</sup> 或 3<sup>+</sup> 的转移性乳腺癌患者。2 组耐受性均较好, 除大剂量组出现发热、寒颤、皮疹、呼吸困难等输液相关反应率略高外, 总反应无明显差别 (标准剂量组 24%, 大剂量组 28%, 平均反应率 26%)。病程在 6 个月以上、HER-2 3<sup>+</sup> 的患者临床有效率为 47%, 中位生存期为 24.4 个月, 与 III 期临床试验的 25 个月无差异<sup>[11]</sup>。因此, 对于 HER-2 过度表达的乳腺癌转移患者, Herceptin 作为一线药物单药治疗是个很重要的新方案, 既可减少化疗药物的不良反应, 减少耐药性, 又可减轻患者经济负担, 而疗效无明显降低。

大约 25,000 患者接受了这种抗 HER-2 人源化单克隆抗体的治疗<sup>[12]</sup>。74 名 (即 0.3%) 患者出现严重的输注相关反应, 且大多数出现在首次输注时或输注后, 主要表现为呼吸道症状, 如发热、寒颤等, 对症治疗后可缓解。33 名患者继续 Herceptin 治疗, 未再出现输注反应。研究表明: 对于 HER-2 过度表达的乳腺癌转移患者单药耐药性和用药依从性良好, 很少出现化疗药物的典型毒性反应, 如脱发、黏膜炎、骨髓抑

制或肝肾功能损害。心脏毒性和输注相关反应是 Herceptin 的两大主要副作用。回顾性研究表明 Herceptin 联用蒽环类抗癌药的心脏毒性较单用蒽环类抗癌药大。年龄、蒽环类药物史、心脏疾病史为心脏毒性反应的三大危险因素。大多数患者经相应治疗后心功能不全的症状和体征好转。鉴于正常心肌组织不表达 HER-2 受体, 目前尚不清楚 Herceptin 对心脏的毒性机制<sup>[12]</sup>。因此, Herceptin 治疗过程中需定期监测心功能, 一旦出现典型症状即需停药, 除非权衡患者情况利大于弊时。

### 3 结 语

目前手术仍为乳腺癌的主要治疗手段, 辅以化疗及其他治疗手段的目的在于预防复发, 清除手术残留的微小病灶, 提高中晚期患者的 5 年生存率。Herceptin 作为 HER-2 受体的人源化单克隆抗体, 克服了鼠源性抗体因免疫原性强、半衰期短、反复应用易产生 HAMA 的缺点, 无论单药还是与化疗药物合用治疗 HER-2 过度表达的乳腺癌均取得了明显疗效。但其在乳腺癌综合治疗中的作用和地位尚应做进一步的全面评价, 包括与化疗药物联用的具体方案, 如何与内分泌治疗、放疗等治疗手段联用等等。目前有大量试验正在进行中。对其他 HER-2 过度表达的上皮源性恶性肿瘤, 如胃癌、卵巢癌、肺癌、结直肠癌等的临床疗效, 也是目前研究的热点问题。另外, Herceptin 的安全性问题及对生活质量的影响需进一步评价, 尤其是对心脏毒性机制、预防和降低措施尚需深入探讨。

### 【参 考 文 献】

- [1] 周爱萍. 乳腺癌靶向治疗: Herceptin 的研究进展 [J]. 国外医学肿瘤学分册, 2000, 8(4): 167-170.
- [2] Fornier M, Esteva FJ, Seidman AD. Trastuzumab in combination with chemotherapy for the treatment of metastatic breast cancer [J]. *Semin Oncol*, 2000, 27(6 Suppl 11): 38-45.
- [3] 夏梦. Herceptin 治疗妇科恶性肿瘤的机制及应用前景 [J]. 国外医学妇产科学分册, 2000, 27(4): 206-209.
- [4] Kurebayashi J. Biological and clinical significance of HER2 overexpression in breast cancer [J]. *Breast Cancer*, 2001; 8(1): 45-51.
- [5] Hung MC, Lau YK. Basic science of HER-2/neu: A review [J]. *Semin Oncol*, 1999, 26(4 Suppl 12): 51-59.
- [6] Baselga J, Norton L, Albanell J, et al. Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts [J]. *Cancer Res*, 1998, 58(13): 2825-2831.
- [7] Pietras RJ, Fendly BM, Chazin VR, et al. Antibody to HER-2/neu receptor blocks DNA repair after cisplatin in human breast and ovarian cancer cells [J]. *Oncogene*, 1994, 9(7): 1829-1838.
- [8] Progam M, Hsu S, Lewis G, et al. Inhibitory effects of combinations of HER-2/neu antibody and chemotherapeutic agents used for treatment of human breast cancers [J]. *Oncogene*, 1999, 18(13): 2241-2251.
- [9] Baselga J, Tripathy D, Mendelsohn J, et al. Phase II study of weekly intravenous trastuzumab (Herceptin) in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer [J]. *J Clin Oncol*, 1996, 14(3): 737-744.

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2002 )02-0146-004

## 受体介导的基因转移与基因治疗

任常春 综述, 田培坤, 顾健人 审阅 ( 上海市肿瘤研究所癌基因及相关基因国家重点实验室, 上海 200032 )

**[ 摘要 ]** 基因治疗成功的关键在于将治疗基因靶向性转移到细胞或组织, 受体介导的基因转移能满足此要求, 很有发展潜力的基因转移方法。然而, 要将这种转移方法用于基因治疗, 与转移系统有关的万分的化学特性与物理反应, 靶细胞的受体表达水平, DNA 配体复合物怎样逃逸溶酶体的降解以及包含在复合物中的外源基因的表达等都是至关重要的。本文综述了受体介导的基因转移的基本原理。DNA 配体复合物形成的最佳条件与性质, 影响基因转移与表达的各种因素以及近年来国内外受体介导的基因转移用于基因治疗取得的进展。

**[ 关键词 ]** 受体介导的内吞作用; 基因转移; 细胞转染; 基因治疗

**[ 中图分类号 ]** R73.36 **[ 文献标识码 ]** A

受体介导的基因转移( receptor mediated gene transfer )是利用细胞表面受体特异性识别相应配体并将其内吞的机理, 将与配体结合的外源基因转移至特定类型的细胞。理论上受体介导的基因导入系统, 只要有相应的配体或抗体便可以向外源基因导入任何具有特异性受体的细胞。基因治疗是将外源基因导入特定的哺乳动物细胞, 通过对致瘤基因的抑制或缺陷基因的修复以治疗疾病的方法。无论是遗传性疾病还是恶性肿瘤的基因治疗, 靶向性是非常重要的, 特别是应用到体内时, 既要考虑对靶细胞的治疗, 又要注意对正常细胞的保护。受体介导的基因转移系统与目前应用于基因治疗的基因转移系统相比具有诸多优势: 相对靶向性; DNA 不整合到宿主细胞染色体, 不需要导入细胞处于分裂期; 对转移的外源基因大小无限制, 可同时携带多种基因或靶向多种受体; 导入系统本身无潜在的感染性; 兼具安全性, 低免疫原性。而其劣势亦很明显: 瞬时表达, 如体内应用, 需重复注射; 表达水平低, 因为被细胞内吞的复合体可能在内吞小泡与溶酶体融合后被降解而影响外源基因的表达。但某些病毒的外膜蛋白质具有使内吞小泡破裂释放其内容物的能力。复制缺陷型腺病毒, 流感病毒血凝素的膜融合区均可辅助外源基因逃逸溶酶体的降解, 从而提高外源基因的表达效率。总之受体介导的基因转移系统在基因治疗中较有优势和前景。

### 1 受体介导的内吞作用

受体介导的内吞作用是一个正常的生理过程, 真核细胞

通过此过程, 从其外环境中获取各种不同的分子, 包括由转铁蛋白和 LDL 携带的信号( 生长因子, 细胞因子, 激素等), 以及一些将在细胞内降解的分子等。配体首先与其细胞膜上特异性的受体结合, 结合位置的细胞膜即内陷增厚, 形成衣被小凹, 配体 - 受体复合物内吞进入细胞质, 形成内吞小体。当内吞小体与溶酶体融合后, 酸性增加, 溶酶体水解酶被修饰, 活性增加, 将配体降解。

### 2 受体介导的内吞作用与基因转移

基因治疗首先需要有一个基因转移系统, 将完整的外源治疗基因导入到细胞核内, 基因才能表达并发挥治疗作用。要将受体介导的内吞作用用于基因转移, 必须解决 2 个问题: DNA 不是天然的配体, 要将其与特定的配体偶联, 才能被有效地内吞; 内吞的分子可再循环到细胞膜, 或转运到胞浆, 或运到溶酶体降解, 而 DNA 分子极有可能被运到溶酶体。因此, 必需设计逃逸内吞小体 - 溶酶体降解的成份, DNA 才能有效地转移到核。Cheng 等<sup>[1]</sup>首先提出受体介导的基因转移并将  $\alpha_2$  巨球蛋白与 DNA 共价连接, 随后又制备了配体 - DNA 衍生物。George 与 Cathine Wu<sup>[2]</sup>首次利用去唾液酸糖蛋白受体靶向性介导外源基因进入肝母细胞瘤( HepG<sub>2</sub> )。Wu 与 Wu 应用此方法将外源基因导入动物模型的肝脏, 用以治疗遗传性疾病。

**[ 基金项目 ]** 国家自然科学基金( No 30171040 )资助

[ 10 ] Simon D, Leyland Jones B, Shsk S, *et al.* Phase III trial of wercetin for the treatment of breast cancer[ C ], Thirty-seventh Annual Meeting, 2001, San Francisco CA. 2001, 16-483a.

[ 11 ] Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, *et al.* First-line herceptin monotherapy in metastatic breast cancer[ J ]. *Oncology*, 2001, 10

( 61 Suppl S2 ): 37-42.

[ 12 ] Cook-Brunns N. Retrospective analysis of the safety of herceptin immunotherapy in metastatic breast cancer[ J ]. *Oncology*, 2001, 10 ( 61 Suppl S2 ): 58-66.

[ 收稿日期 ] 2001 - 12 - 12

[ 修回日期 ] 2002 - 03 - 11

## 2.1 DNA 结合的骨架

受体介导的基因转移的配体一般与多聚阳离子多肽连接,多聚阳离子同时作为 DNA 结合的骨架,常用的多聚阳离子多肽为 Poly-L-lysine,它包含的  $\epsilon$ -氨基酸与所需的配体通过双功能交联剂 SPDP [N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) Propionate] 共价连接。转铁蛋白 Tf 与 Poly-L-lysine 连接形成的 Tf-PL 也能与其受体结合,并转运铁离子,只是效率稍有降低,说明 Tf-PL 的内吞途径与 Tf 一致。鱼精蛋白 (Protamine) 与多聚赖氨酸性质相似,也常用作 DNA 结合的骨架,近年来发现聚乙酰胺 (polyethylenimine, PEI) 是一种有效的凝集 DNA 并与质粒 DNA 结合的多聚阳离子骨架<sup>[3,4]</sup>。

## 2.2 DNA - 配体复合物的形成

DNA 与配体 - PL 按最佳配比在无磷酸盐缓冲液中形成中性复合物,形成的复合物颗粒可用 X-射线衍射 (CD) 和电子显微镜检测。适宜的复合物(构型,大小适合用作基因转移的载体)的制备,是实现基因转移成功的必要条件。影响复合物形成的因素包括(1)离子强度:共价连接物在很低的离子强度条件下形成多分子团块 (Multimolecular aggregation)。若离子强度过大,则形成杆状 (Rod-like) 复合物甚至沉淀。只有在低离子强度条件下方可形成圆状单分子复合物 (Toroid)。而且此时对 DNA 的压缩亦极为适宜,形成的复合物半径接近天然配体的半径。(2) DNA 浓度及碱基组成:低 DNA 浓度能避免形成复合物时产生沉淀,一般不足 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,本实验室可提高到 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。富含 GC 的 DNA 与多聚赖氨酸作用时更易形成不溶性复合体。(3) 复合体的稳定性:适宜的复合物形成后相当稳定,在 4 $^{\circ}\text{C}$  可保存数月不解离。通过 1% 凝胶电泳阻抑实验观察到形成好的复合物, DNA 被阻滞在孔中,表明此时 DNA 被完全包裹在多肽 - 多聚赖氨酸中。稍带正电的复合物容易与膜上受体结合并内吞,因细胞膜是带负电的。可溶的、稳定的,大小和形状合适的复合物,才能达到高效的基因导入。体内实验对复合物颗粒大小要求较高,大颗粒虽易胞吞,但在通过血管内皮细胞等天然屏障时受到限制,而太小的颗粒由于布朗运动很难沉积在细胞表面并与受体结合。实验证明,较大(不小于 100 nm)颗粒的转染效率比 40 nm 的小颗粒要高 100 倍。本实验室制备的复合物能保持一定的构型和大小,电镜观察直径为 100 ~ 150 nm 的非病毒颗粒<sup>[5]</sup>。

## 2.3 影响受体介导的基因转移的因素

受体介导的基因转移包括以下过程:小颗粒的 DNA/配体复合物与细胞膜上受体结合、内吞;耐受核酸酶的降解,内吞小体与溶酶体融合;DNA/配体复合物转运到细胞核;小分子穿过核孔 (40 nm) 入核;基因保留在核中并表达。基因转移的效率与外源基因表达水平的高低受诸多因素影响:(1) DNA - 配体复合物的稳定性;(2) 靶细胞表面特异性受体的数量;(3) 受体与配体的亲和力;(4) 逃逸溶酶体的降解;(5) DNA 向细胞核转运的效率;(6) 包含在复合物中的外源基因的表达。对于怎样逃逸溶酶体的降解研究得较多,并获得了有效的解决方法。

## 2.4 逃逸溶酶体降解的方法

氯喹能提高溶酶体内的 pH 值,抑制其水解酶的活性,减少降解,从而提高外源基因的表达,但由于细胞毒性,以及抑制受体从内吞小泡再循环到细胞膜的过程,干扰有效的基因转移而限制了其应用,并且不能用于体内。某些病毒例如腺病毒和流感病毒,能通过受体介导的内吞作用进入细胞,并能从内吞小泡逃逸,从而避免溶酶体的降解。最初,人们在转染液中直接加入灭活的腺病毒,当复合物与灭活的腺病毒被内吞形成同一内吞小泡,则病毒使内吞小泡破裂,复合物进入胞浆。将灭活的腺病毒与多聚赖氨酸通过链霉素亲和素-生物素 (Streptavidin-biotin) 或者抗体桥共价连接,腺病毒-多聚赖氨酸 (Ad-PL) 取代配体-多聚赖氨酸 (Ligand-PL) 形成一种三元复合物。用此三元复合物转染一般方法较难转染的 HeLa 细胞,得到高水平的基因表达。用 Ad-PL-Tf-PL-DNA 复合物转染鼠肝癌细胞系, BNL CL. 2, 基因表达的百分比从使用氯喹的 0.2% 提高到 100%。Siwoo 利用去唾液酸糖蛋白-多聚赖氨酸 (ASOR-PL) 与 Ad-PL 形成三元复合物转染原代培养的肝细胞,基因表达的水平从使用 ASOR-PL 的 0.1% 提高到 100%,但四元复合物颗粒大约在 200 nm,限制了其体内应用。

流感病毒血凝毒素 (hemagglutinin, HA) 是流感病毒的外膜蛋白,组成 HN2 N 末端的 2 条多肽链之一具有膜融合功能,引起内吞小体的膜破裂,从而逃逸到细胞质里。Midoux<sup>[6]</sup> 在用乳糖化多聚赖氨酸向肝癌细胞 HepG<sub>2</sub> 转基因时,加入了流感病毒 HA2 N 末端肽,外源基因的表达提高 500 倍。HA 肽也可以与多聚赖氨酸连接,并与配体 - 多聚赖氨酸形成复合物, Tf-PL-HA20-DNA 复合物应用于多种细胞的基因转移,例如 K562, Hela 和 BNL CL. 2。Plank 等<sup>[7]</sup> 构建了一个“合成配体”,是由 4 个半乳糖残基组成的分枝肽,称为“四天线半乳糖配体”。这种配体不但体积小,易溶解,并且也容易与多聚赖氨酸连接,包含此配体的复合物可联合腺病毒或 HA-PL,用于转移基因到 BNL CL. 2 细胞。近年来又发现甘油,细菌溶菌素,白喉毒素的转膜区域,鼻病毒相关区域的合成肽均有抑制溶酶体酶,提高转染效率的作用。

## 3 受体介导的体内外基因转移

受体介导的基因转移目前已发展了多种受体 - 配体系统,包括去唾液酸糖蛋白、半乳糖化蛋白、转铁蛋白、胰岛素、乳糖、甘露糖、合成配体等,归纳于表 1。除此之外,还发展了靶向于成纤维细胞生长因子 (FGF) 受体、表皮生长因子 (EGF) 受体及抗 ErB-2、CD3<sup>[8]</sup>、CD5, CD117<sup>[9]</sup> 的抗体等。虽然受体介导体外(细胞)基因转移非常高效,然而应用于体内的结果并不十分理想。Wu 等<sup>[10]</sup> 应用 ASOR PL 包裹人血清白蛋白基因从尾静脉注射患白蛋白缺乏症的 Nagase rats, 随后进行部分肝脏切除,期望纠正大鼠的白蛋白缺乏症。然而基因表达的水平不足以产生治疗效果。Gao 等<sup>[11]</sup> 将 Tf-pL-Ad-PL-DNA 三元复合物直接用于手术切开的气管,基因的表达水平 24 h 达高峰,7 d 后消失,为瞬时表达。因此,需要重

复使用。选择合适的抗原-抗体,也可用作受体介导的基因转移。抗血栓素单克隆抗体与血栓素结合被人的脐静脉内皮细胞内吞,将多聚赖氨酸与抗体形成复合体靶向性将外源基因体内外转移到鼠肺表皮细胞。

本实验室自1996年以来,致力于受体介导的非病毒载体的研究,根据肿瘤细胞表面某种受体的过度表达,已成功构建了分别针对胰岛素样生长因子受体 IGF I R 及 IGF II R,细胞表面表皮生长因子受体 EGF R<sup>[12]</sup>,和血管内皮生长因子受体 VEGFR<sup>[13-14]</sup>的基因导入系统,体外实验证实3种系统均能有效转移外源基因到富于受体表达的肿瘤细胞<sup>[12-16]</sup>。体内靶向性转移基因到肿瘤组织,将细胞周期素依

赖的蛋白激酶抑制物基因 p21 体外导入人肝癌细胞,显著抑制肝癌细胞生长,并诱导肝癌细胞凋亡<sup>[16]</sup>,体内显著抑制荷瘤裸小鼠皮下肿瘤的生长<sup>[17-19]</sup>。靶向于 IGF R 与 EGF R 的非病毒基因导入系统 E5 基因导入系统与 GE7 基因导入系统,分别与外源质粒 DNA 形成稳定的四元复合体: E5-PCP/DNA/HA20-PCP, GE7-PCP/DNA/PCP-HA20, 复合体大小为 100~150 nm。对于该导入系统的入膜机理研究已完成<sup>[5]</sup>。应用 GE7 基因导入系统同时转移 p21 与细胞因子基因 GM-CSF(瘤周注射)到荷鼠肝癌 C57BL/6 小鼠模型,动物肿瘤的生长受到明显抑制,生存期显著延长,小鼠脾 NK 和 CTL 细胞活性明显增加<sup>[19]</sup>。

表1 受体介导的体内外基因转移

受体	靶向配体	体内外基因转移	注释
去唾液酸糖蛋白 (Asialoglycoprotein)	去唾液酸 α <sub>1</sub> , 酸性糖蛋白 (Asialoorosomucoid)	HepG <sub>2</sub> HuH-7 原代培养肝细胞	联合腺病毒 或腺病毒-多聚赖氨酸(Ad-PL)
	糖异生蛋白 (neoglycoprotein)	大鼠肝细胞 肝	尾静脉注射
	半乳糖基 (galactosylated)	肝	联合流感病毒 HA 肽
	(Gal) <sub>4</sub> 合成配体分子	HepG <sub>2</sub> BNL. CL-2	
转铁蛋白受体	转铁蛋白(Transferrin)	K562 HeLa BNL. CL-2 HBE 棉鼠气管表皮	联合 Ad-PL 直接用于气管表皮
胰岛素受体	胰岛素(Insulin)	HepG <sub>2</sub> PLC/PRF/5 人肝癌细胞系	
单克隆抗体 (anti-thrombomodulin)	α-血栓素 (α-thrombomodulin)	鼠肺表皮细胞	
乳糖受体	乳糖(Lactose)	HepG <sub>2</sub>	乳糖特异性凝集素联合流感病毒 HA 肽
聚合的免疫球蛋白 (polymeric immunoglobulin)	抗分泌成份 Fab	呼吸道表皮、肝	Ferkol, T., Perales, J. C., Kaetzel, C. S., 未发表结果
甘露糖受体	甘露糖(Mannose)	巨噬细胞	Ferkol, T., Perales, J. C., Malario, F., 未发表结果

4 存在的问题与应用前景

为了更好地将受体介导的基因转移应用于临床基因治

疗,有很多需要解决的问题。在体内应用时,基因表达的水平低,持续时间短,不足以产生治疗作用。一个称为位点控制区( locus control regions, LCRs )转录激活序列,可以加入到

转移复合物中,LCRs 使其连接的基因得到组织特异性高水平的表达。例如:人  $\beta$ -球蛋白,人 CD2,鸡溶酶体酶和鼠 MHC-II。提高治疗基因整合到宿主细胞染色体的频率,甚至整合到特定的位点,亦可提高基因表达持续的时间。虽然 Tf-pL-Ad-pL-DNA 在体内直接用于肺的气管表皮的实验研究中取得一些进展,但静脉注射进入血液循环系统的复合物很快被补体系统破坏。另外复合物颗粒过大难于通过小的毛细血管到达靶器官。因此复合物必须进一步改造,一是颗粒大小的控制;二是降低使用剂量;三是不被免疫系统识别。近年来,人们致力于制备更小的转移复合物,用小分子的合成肽 [K16] 取代多聚赖氨酸,同时缩短配体的氨基酸序列(11个氨基酸的 RGD),[K16] RGD 与 DNA 形成靶向于 Integrin 的基因转移系统,即是一个成功的例子<sup>[20]</sup>。Plank 等<sup>[21]</sup>合成了5段不同长度的分枝肽作为多聚赖氨酸的替代物,发现仅需6~8个氨基酸即能包裹DNA,形成有活性的受体介导的基因转移系统。

受体介导的基因转移应用潜力很大,几乎100%的细胞都能用加入灭活腺病毒的三元复合物转染;毒性低,对被转染细胞膜几乎无破坏,对细胞的损伤更是微乎其微;由于加入灭活腺病毒或病毒外膜多肽,相对安全;从配体到病毒外膜蛋白多肽,均可人工合成,便于大量制备;复合物形成利用静电作用,因此既可结合DNA又可结合RNA,能携带转移的DNA长度可达48kb;可根据需要选择配体,构建具有不同细胞特异性的靶向性基因转移系统;应用于体内时,可反复注射而不产生免疫反应。对受体介导的基因转移的分子机理的研究,并与病毒性载体基因转移系统转移DNA的分子机理相比较,进一步模拟病毒,构建更经济、高效、适用的受体介导的基因转移系统,将为基因治疗带来新的希望。

## [参考文献]

[1] Cheng S, Merlino GT, Pastan LH. A versatile method for the coupling of protein to DNA: Synthesis of  $\alpha$  2-macroglobulin-DNA conjugate[J]. *Nucleic Acids Res*, 1983, 11: 659-669.

[2] Wu GY, Wu CH. Receptor-mediated gene delivery and expression *in vivo*[J]. *J Biol Chem*, 1988, 263: 14621-14624.

[3] Kircheis R, Kichler A, Wallner G, et al. Coupling of cell-binding ligands to polyethylenimine for targeted gene delivery[J]. *Gene Ther*, 1997, 4: 409-418.

[4] Baker A, Saltid M, Lehrmann H, et al. Polyethylenimine (PEI) is a simple, inexpensive and effective reagent for condensing and linking plasmid DNA to adenovirus for gene delivery[J]. *Gene Ther*, 1997, 4: 773-782.

[5] Ren CC, Li JJ, Tian PK, et al. Molecular mechanism of non-viral cancer gene delivery systems targeting EGF and IGF receptors[J]. 2002, (in press).

[6] Midoux P, Mendes C, Legrand, et al. Specific gene transfer mediated by lactosylated poly-L-lysine into hepatoma cells[J]. *Nucleic Acids Res*, 1993, 21(4): 871-878.

[7] Plank C, Zatloukal K, Cotton M, et al. Gene transfer into hepatocytes using asialoglycoprotein receptor mediated endocytosis of DNA complexed with an artificial tetra-antennary galactose ligand[J]. *Bioconjugate Chem*, 1992, 3(6): 533-539.

[8] Buschle M, Cotton M, Kirlapposh, et al. Receptor-mediated gene transfer into T lymphocytes via binding of DNA/CD3 antibody particles to the CD3 T cell receptor complex[J]. *Hum Gene Ther*, 1995, 6: 753-761.

[9] Guy J, Drabek D, Antoniou M. Delivery of DNA into mammalian cells by receptor-mediated endocytosis and gene therapy[J]. *Mol Biotechnol*, 1995, 3(3): 237.

[10] Wu GY, Wilson JM, Shalaby F, et al. Receptor-media gene delivery *in vivo*[J]. *J Biol Chem*, 1991, 266: 14338-14342.

[11] Gao L, Wagner E, Cotton M, et al. Direct *in vivo* gene transfer to airway epithelium employing adenoviral-polylysine DNA complexes[J]. *Hum Gene Ther*, 1993, 4: 17-24.

[12] 田培坤, 任圣俊, 任常春, 等. 一种新的以细胞表面受体为靶向的基因导入系统[J]. *中国科学(C辑)*, 1998, 28(6): 554-556.

[13] Li JM, Han JS, Huang Y, et al. A novel gene delivery system targeting cells expression VEGF receptors[J]. *Cell Res*, 1999, 9: 11-25.

[14] 韩峻松, 田培坤, 李钧敏, 等. 血管内皮生长因子受体介导的靶向性非病毒载体的改进与体内导入实验[J]. *中华医学杂志*, 2000, 80(57): 378-382.

[15] 任常春, 李锦军, 赵瑞皎, 等. 胰岛素样生长因子受体靶向性基因导入系统的体外、体内导入瘤谱[J]. *中华医学杂志*, 2001, 81(18): 1113-1117.

[16] 任常春, 田培坤, 曲淑敏, 等. 细胞周期素依赖的蛋白激酶抑制剂诱导肝癌细胞凋亡[J]. *科学通报*, 1997, 42(22): 2428-2432.

[17] 任常春, 田培坤, 曲淑敏, 等. 靶向于胰岛素样生长因子受体的基因导入系统[J]. *肿瘤杂志*, 2001, 22(6): 431-434.

[18] 韩峻松, 田培坤, 柳湘, 等. 靶向性非病毒载体介导 p21WAF-1 基因对肝癌细胞的抑制作用[J]. *中国科学(C辑)*, 2000, 30(30): 523-527.

[19] Liu X, Tian P, Yu Y, et al. Enhanced antitumor effect of EGFR-targeted p21 WAF-1 and GM-CSF gene transfer in the established murine hepatoma by peritumoral injection[J]. *Cancer Gene Ther*, 2002, 9(1): 100-108.

[20] Harbottle RP, Cooper RG, Hart SL, et al. An RGD-Oligolysine peptide: A prototype construct for integrin-mediated gene delivery [J]. *Hum Gene Ther*, 1998, 9: 1037-1047.

[21] Plank C, Tang MX, Wolfe AR, et al. Branched cationic peptides for gene delivery: Role of type and number of cationic residues in formation and *in vitro* activity of DNA polyplexes[J]. *Hum Gene Ther*, 1999, 10(2): 319-332.