

[文章编号] 1007-385X(2002)02-

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将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发展前景。

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^[1]首先提出受体介导的基因转移并将 α_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^[2]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(HepG₂)。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。

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 ϵ -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^[3,4]。

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。适宜的复合体(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。影响复合体形成的因素包括(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)复合体甚至沉淀。只有在低离子强度条件下方可形成圆状单分子复合体(Toroid)。而且此时对DNA的压缩亦极为适宜,形成的复合体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:适宜的复合体形成后相当稳定,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体,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。稍带正电的复合体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体,才能达到高效的基因导入。体内实验对复合体颗粒大小要求较高,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^[5]。

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^[6]在用乳糖化多聚赖氨酸向肝癌细胞HepG₂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^[7]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^[8]、CD5, CD117^[9]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^[10]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^[11]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^[12],和血管内皮生长因子受体VEGFR^[13-14]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^[12-16]。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^[16],体内显著抑制荷

瘤裸小鼠皮下肿瘤的生长^[17-19]。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^[5]。

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^[19]。

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_1 , 酸性糖蛋白 (Asialoorosomuroid)	HepG ₂ 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) ₄ 合成配体分子	HepG ₂ 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 ₂ PLC/PRF/5 人肝癌细胞系	
单克隆抗体 (anti-thromobomo dulin)	α -血栓素 (α -thrombomodulin)	鼠肺表皮细胞	
乳糖受体	乳糖(Lactose)	HepG ₂	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 β -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 In-

tergrin 的基因转移系统,即是一个成功的例子^[20]。Plank 等^[21]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 48 kb;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 α 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 Therapy*, 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 Therapy*, 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 Biotechnology*, 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 adenovirus-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, 赵瑞姣, 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 Therapy*, 2002, 9(1): 100-108.
- [20] Harbottle RP, Cooper RG, Hart SL, *et al.* An RGK-Oligolysine peptide: A prototype construct for integrin-mediated gene delivery [J]. *Human Gene Therapy*, 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]. *Human Gene Therapy*, 1999, 10(2): 319-332.

[收稿日期] 2001 - 12026

[修回日期] 2002 - 03 - 28