

Institute of Biochemistry, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China; National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China).

Abstract A protein with long polypeptide chain always folds into more than one distinct, compact globular regions that have been designated as domains. Being one of the structural hierarchy, domain is a structural level situating in between secondary and tertiary structure. It is a basic unit to compose three-dimensional structure

of protein, to execute the biological function as well as to fold a functional protein. As structural modules, domains may have advantage to compose complex proteins during the process of protein evolution by insertion, deletion and excising. Studies on the structure and interaction of domains can throw light on the study of the relationship between protein structure and function and the design of novel proteins.

Key word domains, protein, structure, function, module

用于转基因的阳离子脂质体

王 颀 林其谁

(中国科学院上海生物化学研究所, 分子生物学国家重点实验室, 上海 200031)

摘要 通过直接导入外源基因来治疗人类疾病的方法需要一种有效、安全并且可重复进行的载体, 阳离子脂质体是基本满足这些条件的有限几种载体中的一员。目前已经有十几种阳离子脂质体。这些脂质体通过外周的电荷与 DNA 相结合, 静电吸引形成复合物在与细胞膜相互作用后, 通过细胞的内吞或融合作用使复合物进入细胞内, 从而将外源基因导入细胞, 这种 DNA 传递技术的有效性和安全性已经确立。二例利用阳离子脂质体的人体基因治疗临床试验也已开始实施, 将来会有更多的临床试验得到开展, 阳离子脂质体在基因治疗领域有较好的前景。

关键词 阳离子脂质体, DNA, 传递, 表达, 基因治疗, 转染

基因治疗是通过对一个需要长期表达基因的设计, 将其植回宿主细胞并成功地得到表达。发展安全合适、高表达的 DNA 介导传递技术是基因治疗研究极其重要的方面, 而阳离子脂质体转染技术的运用是一次飞跃。

1 阳离子脂质体/脂质形式

阳离子脂质分子含有四种结构域形式: 带正电荷的极性头; 能改变长度的隔离区; 连接键和疏水的锚着区。除一种脂质含脒基外, 其余阳离子脂质的极性头都包含胺类基团, 从简单的氨基到被甲基或羟乙基团取代的季铵盐。

阳离子脂质的极性头起着脂质体与 DNA、脂质体-DNA 复合物与细胞膜或细胞内其他组分的相互结合的作用。在阳离子胆固醇衍生物中, 带有叔胺基团的阳离子胆固醇化合物比季铵盐化合物有更佳的转染活力, 并且毒性小得多^[1]。带有多价极性头基团的阳离子脂质形成脂质体时比那些单价阳离子脂质排列得更紧密, 这可能与转染能力较高有关。间隔垫充区的链长和键长也影响转染活力, 带有长间隔垫充区的阳离子脂质体能显著增强与粘膜表面的相互作用。

收稿日期: 1996-09-20, 修回日期: 1997-01-20

连接键决定了阳离子脂质的化学结构稳定性和被生物降解的能力。阳离子脂质如N-[1-(2, 3-二油酰氧) 丙基]-N, N, N-氯化三甲铵 (DOTMA) 和双十八烷基溴化铵 (DDAB) 含有醚键或 C—N 键, 化学稳定性好, 但不能被生物降解, 不适用于体内实验。含有酯键的阳离子脂质较易被生物降解, 细胞毒性小, 但它们的化学稳定性通常较差。因此, 常采用含有稳定的、生物可降解的连接键的阳离子脂质, 如: 酰胺键和氨甲酰键^[1, 2]。

阳离子脂质的疏水锚着链主要有二类, 一类是脂肪酰链; 另一类是胆固醇环。脂肪酰链

通常是 C18: 1, C14: 0 或 C12: 0, 以达到在生理温度下为脂双层提供足够的流动性。胆固醇有维持脂质排列有序化、保持脂双层膜刚度的性能。

目前已有的阳离子脂质及由它们制备的脂质体形式达十几种 (表 1)。阳离子脂质体通常由一种阳离子亲水脂分子和二油酰磷酸乙醇胺 (DOPE) 组成。DOPE 作为“脂质伴侣”是形成稳定的单脂双层阳离子脂质体所必需的。含多价阳离子脂质的阳离子脂质体转染活力要比那些含单价阳离子脂质的高。

表 1 目前已有的商品化和非商品化的阳离子脂质体

阳离子脂质体	组成成分	厂 商	生物降解能力	转染活力	
				体外(<i>in vitro</i>)	体内(<i>in vivo</i>)
A. 商品化的					
Lipofectin	DOTMA/DOPE= 1: 1(质量比)	GIBCO BRL	无	☆☆☆	☆☆
DOTAP	DOTAP	Boehringer Mannheim	有	☆☆☆	☆☆
TransfectACE	DDAB/DOPE= 1: 3(摩尔比)	GIBCO BRL	无	☆☆☆	无
LipofectAMINE	DOSPA/DOPE= 3: 1(质量比)	GIBCO BRL	部分	☆☆☆☆	无
Transfectam	DOGS	Promega	部分	☆☆☆☆	☆☆☆
Tfx™-50	Tfx™-50/DOPE	Promega	部分	☆☆☆☆	☆☆
DC-choI	DC-choI/DOPE= 1: 1(摩尔比)	Sigma	有	☆☆☆	☆☆☆
B. 未商品化的					
CTAB	CTAB/DOPE= 1: 4(摩尔比)		无	☆☆	无
C ₁₂ GluPhCnN ⁺	C ₁₂ GluPhCnN ⁺		有	☆☆☆	无
C ₁₂ GluCnN ⁺	C ₁₂ GluCnN ⁺		有	☆☆☆	无
Lipopolylysine	Lipopolylysine/DOPE= 1: 8(摩尔比)		有	☆☆☆	无
Cationic cholesterol	Cationic choI/DOPE= 1: 1(摩尔比)		有	☆☆☆	☆☆☆
GS 2888	GS 2888/DOPE= 2: 1(摩尔比)		部分	☆☆☆	☆☆☆
SA liposome	SA(Stearylamine)/DOPE= 1: 1(质量比)		有	☆☆☆	☆☆☆
DMRIE	DMRIE/DOPE= 1: 1(摩尔比)		无	☆☆☆	☆☆☆
DOTMA/choI	DOTMA/cholesterol= 1: 1(摩尔比)		无	☆☆☆	无
Lysyl-PE	Lysyl-PE/β-alanyl cholesterol= 1: 1(摩尔比)		有	☆☆☆	无

注: ☆的多少代表转染效率的高低。由于所有数据不能直接用来相互比较, 评价是相对的。

对于人工合成的阳离子脂质, 细胞会产生较强的排异作用。由硬脂胺 (stearvlamine, SA) /DOPE (质量比 1: 1) 制备的脂质体是目前已知的完全由天然脂质所构成的阳离子脂质体^[3]。它对机体的免疫原性小, 可能会有利于今后应用于基因治疗。

2 阳离子脂质体介导基因传递的机制

阳离子脂质体起三种作用: a. 通过电荷的相互作用, 与 DNA 分子结合; b. 与细胞膜相互作用导致 DNA 复合物的被吸收, 进入胞浆; c. 导致 DNA 或者是整个复合物进入细

胞核。

Gershon 等^[4]研究了 DNA 同 DOTMA 和 DOTMA/DOPE 阳离子脂质体之间的相互作用。用碱基螯合的染料荧光淬灭进行分析, 结果表明在 DNA 与阳离子脂质体结合时, DNA 的形态会发生显著的改变, 而脂质体之间发生融合。Sternberg 等^[5]用冰冻断裂电子显微镜技术研究表明 DNA 在结合过程中折叠成各种紧凑的结构, 最终被融合成管状的脂质体包裹成为一种明显的“杆状”结构, 提出了单超螺旋 DNA 棒状链被一层单脂双层膜所覆盖的模型。

脂质体与质膜之间的融合可能是阳离子脂质体介导 DNA 进入细胞的主要机制, 实际上 DNA-阳离子脂质体同带负电荷的细胞膜之间的融合要比游离的阳离子脂质体和阴离子脂质体之间的融合要少。促细胞内吞作用也是阳离子脂质体的一种重要机制, Huang 等发现大多数用脂多聚赖氨酸 (lipopolylysine) /DOPE 制备的脂质体与 DNA 形成的复合物是通过膜凹陷和内吞机制被细胞吸收的。被内吞后的复合物在胞浆的释放效率也取决于脂质体中的 DOPE, 至于那些不含 DOPE 的阳离子脂质体, 如 DOTAP 和 N, N'-二 (十八烷基) -N'-(6-羧基精胺酰) 甘氨酸酰胺 (DOGS), 可能通过阳离子脂质的脂交换和类似去垢剂作用的影响而导致局部膜的不稳定。用细胞松弛素 B 处理细胞可抑制细胞的内吞作用, 实验发现 SA 脂质体介导 DNA 进入细胞主要是通过内吞作用, 而 Lipofectin 试剂介导 DNA 进入细胞却主要通过融合作用^[3]。内吞和融合能力的不同可能导致细胞对转染方法的选择性。

一些阳离子脂分子是蛋白激酶 C (PKC) 的抑制剂^[6], 这可能与它们的毒性作用有关。叔胺衍生物抑制 PKC 的能力比季铵衍生物低 4~20 倍, 对细胞产生的毒性较低, 其阳离子脂质体的转染活力比季铵衍生物的脂质体高出 10~30 倍。

DNA 和脂质体的比例决定了复合物表面电荷的分布以及复合物颗粒的大小, 在最适的

DNA 和脂质体的比率下, 复合物的表面呈网状布满正电荷。而有血清存在时, DNA-脂质体复合物的活力会下降, 这可能是由于复合物同带负电荷的一些血清蛋白结合, 电荷被中和的缘故^[1]。

3 在动物模型和临床试验中的应用

目前, DNA-脂质体复合物的实际应用课题有: 肺和鼻粘膜上皮细胞的气雾胶法^[7]、动脉内皮细胞的导管术、脑和肿瘤的直接注射或局部组织的系统给药等等。3 β -(N-(N', N'-二甲基氨基乙基)) 氨基甲酸酯胆固醇 (DC-cho) /DOPE 脂质体和溴化 1, 2-二肉豆蔻基丙氧基-3-二甲基-羟乙基铵 (DMRIE) /DOPE 脂质体已在英国和美国用于基因治疗的临床试验。

3.1 肿瘤内部 DNA-脂质体复合物的注射

Nabel 等^[8]首先使用阳离子脂质体介导基因传递的临床试验。他们将异源的编码 I 型 (class I) 组织相容性复合物 (MHC) 抗原的一个外源基因导入肿瘤细胞, 原位 (*in situ*) 刺激宿主细胞毒素的 T 淋巴细胞 (CTL) 应答来攻击遗传变异的肿瘤细胞。这说明向肿瘤内部注射编码人 I 型抗原的异源 cDNA 可能有临床应用前景。

Stewart 等^[9]在小鼠中对 DNA-脂质体复合物的作用进行研究的结果表明, 质粒 DNA 在被注射的肿瘤内始终能够检测到, 甚至在肿瘤外周的组织中也能被发现。而与此同时并未发现有明显的炎症或肝功能的改变, 说明这个过程是安全的。

使用与 HLA B7 基因复合的 DC-cho/DOPE 阳离子脂质体对 5 例缺少 HLA B7 基因的已扩散的黑色素瘤病人进行了治疗。给予三次不同剂量的 DNA-脂质体复合物注射。实验的可行性和安全性表明体内通过阳离子脂质体-DNA 复合物直接传递基因这个途径在治疗学的潜在应用前景^[8]。这是被认可用于人体内基因治疗的第一次尝试, 也是非病毒的基因传递载体的首次应用。Nabel 还报道了 DMRIE/

DOPE 脂质体的治疗效果要好于 DNA-DC-cho/DOPE 脂质体^[10].

3.2 气溶胶法和系统基因传递的应用

肺有一个很大的上皮表面, 基因通过气溶胶法进入相对比较容易, 以肺与呼吸道为目标的基因治疗逐步得到重视. 用阳离子脂质体采取气溶胶法进行基因传递的可行性得到了证实, 包括被应用在小鼠、大鼠和家兔的动物模型中^[11]. Deb 等运用气溶胶技术通过 DOTMA/DOPE 脂质体-DNA 复合物传递, 成功地延长了基因在动物体内的表达时间, 在支气管和肺泡上皮细胞中都发现了基因表达产物^[7]. 其他阳离子脂质体如 DC-cho 和 DOTAP 同样有成功的报道.

肺泡囊纤维症 (CF) 是一种由 CFTR 单基因突变引起的遗传性疾病, CFTR 是 cAMP-调节的氯离子通道. 在转基因的 CF 小鼠中运用阳离子脂质体传递 CFTR 基因成功地恢复了氯离子通道的活力^[12]. 通过气溶胶直接滴灌法运用 DNA-脂质体复合物将人的 CFTR cDNA 和 lac Z 的报告基因传递到鼠和兔子体内. 超过 50% 的细支气管区域与大约 70% 的表皮细胞都发现了 lac Z 基因有效表达, 上述结果表明, 利用 DNA-脂质体复合物转染一个相关的野生型基因能被用来治疗人肺泡囊纤维症^[13].

向携带由人乳腺癌细胞株衍生肿瘤的裸鼠的静脉内注射与 DOTMA/DOPE 脂质体复合的野生型人 p53 cDNA 后, 肿瘤生长变缓最后逐渐退化^[14], 肿瘤复发和转移的趋势显著降低. DOGS 阳离子脂质体能传递报告基因进入母鼠体内的胎鼠中^[15], 虽然胎鼠组织显示出的基因表达是暂时的但分布广泛, 而且对母鼠及其子代都是安全的.

4 转基因技术的前景和展望

基因转移系统分病毒载体和非病毒转基因两大类. 病毒载体对导入基因的大小有限制, 其转基因的效率较高但有免疫原性, 运用于人体临床治疗有很大的风险性. 非病毒转基因手

段没有类似病毒载体的安全性问题, DNA 本身无毒性、免疫原性弱、容量大, 比较适用于体内基因治疗的途径. 非病毒转基因方法包括: 传统的 DEAE-葡聚糖法和磷酸钙共沉淀法, 转染率较低且重复性不理想; 受体介导的方法定点专一性好, 但需要寻找特异性表达的配体^[16], 且体内转基因效率不高. 一些物理学方法如显微注射法、电穿孔法、基因枪技术以及新近发展的喷气注射、脉冲电场、超声波介导等方法能成功地介导核酸进入真核细胞. 这些方法有较高的转染效率, 但并不是对所有的细胞都有效, 导入 DNA 的量有限, 而且对细胞造成损伤, 产生较高的毒性, 操作复杂且需要有专门的精密仪器.

目前, 基因治疗领域最为迫切的是优先发展有更强适用性和灵活性的能准确调控转基因表达的基因传递系统. 阳离子脂质体的发现向这方面迈出了可喜的一步. 事实上脂质体早已用于普通药物、小分子蛋白的体内运送, 这方面的成果可直接移植应用于体内转基因. 与传统的包埋脂质体不同是, 阳离子脂质体通过电荷吸附作用与 DNA 形成复合物, 能有效地避免细胞内溶酶体降解, 将 DNA 高效导入细胞, 而且对 DNA 的大小没有限制, 体外培养细胞的转染效率比其他非病毒载体有显著提高且操作简易. 一旦体内基因表达量和专一导向等技术问题能顺利解决, 它作为基因治疗的载体将很快被应用于临床.

与腺病毒载体结果相比较, 阳离子脂质体介导基因传递的转染水平还有待提高, 体液中的血清蛋白、粘液和表面活性剂均会明显降低转染效率, 因此如何提高体内转染效率是一个重要的课题. 基因治疗还亟待解决的问题是目的基因的定向表达. 为了提高阳离子脂质体对靶组织的专一性, 提出了“三重复合”概念 (图 1), 它包含了质粒、脂质体和能同 DNA 结合的变异目标配体. 在三元复合物中, 抗体或某些配体提供了目标专一性, 而且可能触发复合物的内吞作用. 专一结合的三元复合物在体外 (*in vitro*) 可转染小鼠的肺内皮细胞,

在体内 (*in vivo*) 能将 DNA 定向导入小鼠的肺细胞. 而以脱唾液酸糖蛋白配对结合的多聚赖氨酸被作为配体的 DOGS 阳离子脂质体, 能有效专一地转染 HepG2 肝癌细胞^[17].

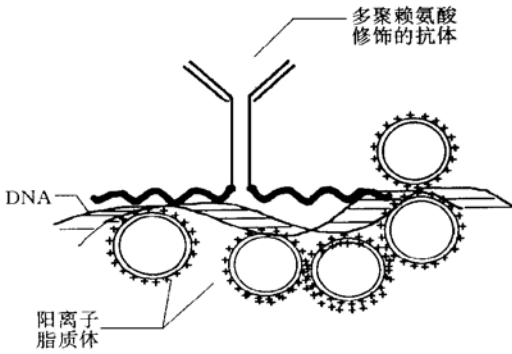


图1 DNA/ 阳离子脂质体/ 抗体-多聚赖氨酸
“三重复合”产物

解决基因治疗中基因表达的持续时间的途径, 包括协同引进 DNA 和提纯的整合酶以及利用含有 AAV 末端复制序列的质粒表达载体^[18]. 不同阳离子脂质体介导 DNA 转染的效率是不同的, 因此在采用阳离子脂质体时也要针对细胞株系与被转导的分子来进行选择^[19].

参 考 文 献

- 1 Farhood H, Bottega R, Epand R M *et al.* Effect of cationic cholesterol derivatives on gene transfer and protein kinase C activity. *Biochim Biophys Acta*, 1992, **1111** (2): 239~246
- 2 Gao X, Huang L. A novel cationic liposome reagent for efficient transfection in mammalian cell. *Biochim Biophys Res Commun*, 1991, **179** (1): 280~285
- 3 Lin Q S, Yang J P, Wang D. SA liposomes: a highly efficient reagent mediating nucleic acid transfection. In: Jisnuron S eds. *Biopolymer and bioproducts (structure, function and applications)*. Japan: Sama kkhisian, 1995. 46~53
- 4 Gershon H, Ghirlando R, Guttman S B *et al.* Mode of formation and structural features of DNA-cationic liposome complexes used for transfection. *Biochemistry*, 1993, **32** (28): 7143~7151
- 5 Sternberg B, Sorgi F L, Huang L. New structures in complex formation between DNA and cationic liposomes visualized by freeze-fracture electron microscopy. *FEBS Lett*, 1994, **356** (2): 361~366
- 6 Bottega R, Epand R M. Inhibition of protein kinase C by cationic amphiphiles. *Biochemistry*, 1992, **31** (37): 9025

~ 9030

- 7 Stribling R. Aerosol gene delivery *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89** (23): 11277~11281
- 8 Nabel G J. Direct gene transfer with DNA liposome complexes in melanoma: expression, biological activity, lack of toxicity in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90** (23): 11307~11311
- 9 Stewart M J. Gene transfer *in vivo* with DNA-liposome complexes safety and acute toxicity in mice. *Hum Gene Ther*, 1992, **3** (3): 267~275
- 10 San H. Safety and toxicity of a novel cationic lipid formulation for human gene therapy. *Hum Gene Ther*, 1993, **4** (6): 781~788
- 11 Carnonico A. Expression of a CMV promoter driven human $\alpha 1$ antitrypsin gene in cultured lung endothelial cells and the lungs of rabbits. *Clin Res*, 1991, **39** (suppl. 1): 219A
- 12 Alton E W F W. Noninvasive liposome-mediated gene delivery can correct the ion transport defective chloride channel regulation in cystic fibrosis mutant mice. *Nature Genetics*, 1993, **5** (2): 135~142
- 13 Logan J J. Cationic lipids for reporter gene and CFTR transfer to rat pulmonary epithelium. *Gene Therapy*. 1995. **2** (1): 38~49
- 14 Lesoor Wood L A. Systemic gene therapy with p53 reduces growth and metastases of a malignant human breast cancer in nude mice. *Hum Gene Ther*, 1995, **6** (4): 395~405
- 15 Tsukamoto M. Gene transfer and expression in progeny after intravenous DNA injection into pregnant mice. *Nature Genetics*, 1995, **9** (3): 243~248
- 16 Lee R J, Huang L. Folate-targeted, Anionic liposome-entrapped polylysine condensed DNA for tumor cell-specific gene transfer. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, 1996, **271** (14): 8481~8487
- 17 Mack K D, Rosemary W, Zeldis J B. Cationic lipid enhances *in vitro* receptor-mediated transfection. *Am J Med Sci*, 1994, **307** (2): 138~143
- 18 Shoji Tanaka A, Mizuochi T, Komuro K. Gene transfer using purified retroviral integrase. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, **203** (3): 1756~1764
- 19 Wang D, Jing N H, Lin Q S. Stearylamine Liposome as a new efficient reagent for DNA transfection of eukaryotic cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, **226** (2): 450~455

Cationic Liposome mediated Gene Transfer.

WANG Die, LIN Qishui (Shanghai Institute of Biochemistry, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China).

Abstract Direct gene transfer for the treatment of human diseases requires a vector which can be administered efficiently, safely and repeatedly.

Cationic liposomes represent one of the few examples that can meet these requirements. Currently, there are more than a dozen cationic liposome formulations. These liposomes bind and condense DNA spontaneously to form complexes with high affinity to cell membranes. Endocytosis of the complexes followed by disruption of the endosomal membrane appears to be the major mechanism of gene delivery. The effectiveness

and safety of this DNA delivery method has been established in many studies. Two human gene therapy clinical trials using cationic liposomes have been conducted and more trials will be started in the near future. In the field of gene therapy, cationic liposome is struggling to meet expectations.

Key words cationic liposome, DNA, delivery, express, gene therapy, transfection

哺乳类 C 型凝集素超级家族

陈政良

(第一军医大学免疫学教研室, 广州 510515)

摘要 C 型凝集素超级家族根据其糖识别域 (CRD) 的一级结构分为蛋白聚糖、II 型跨膜受体、胶原凝素、选凝素、自然杀伤细胞受体及多 CRD I 型跨膜受体等 6 个家族。每一家族的成员具有同源的氨基酸序列、相同的总体分子结构及类似的生物学功能。从 CRD 的一级结构至三级结构水平确定了 C 型凝集素选择性糖识别的分子基础。

关键词 C 型凝集素, 糖识别域, 结构, 功能

凝集素是一类能专一识别糖并与之非共价可逆结合的非酶非抗体蛋白质, 动物中一些活性依赖 Ca^{2+} 的凝集素称为 C 型凝集素。自 1906 年报道第一个动物 C 型凝集素牛胶固素 (conglutinin) 以来, 在哺乳动物体内发现了多种多样的 C 型凝集素, 它们构成了一个庞大的超级家族。C 型凝集素分布广泛, 功能复杂, 涉及体内许多重要的生理、病理过程, 因而成为当今令人瞩目的研究热点之一。

C 型凝集素以跨膜蛋白和水溶性蛋白两种形式存在, 都是多结构域分子, 其共同的结构特征是具有一个或多个糖识别域 (carbohydrate recognition domain, CRD)。C 型 CRD 长约 115~130 个残基, 其中有 14 个恒定残基 (包括 4 个 C 残基) 和 18 个保守残基。某些 CRD 含额外 2 个 C 残基, 称作长型 CRD, 而只有 4 个 C 残基者称为短型 CRD。由 C 残基形

成的二硫键对于维系 CRD 的构象及整个分子的活性均十分重要。CRD 的一级结构不同, 决定了 C 型凝集素有不同的糖识别特异性。基于 CRD 一级结构比较确定其在进化树中的位置, Drickamer^[1]于 1993 年将 C 型凝集素超级家族分为蛋白聚糖、II 型跨膜受体、胶原凝素 (collectins)、选凝素 (selectins)、II 型淋巴细胞抗原及巨噬细胞甘露糖受体 (macrophage mannose receptor, MMR) 等 6 组。近年研究已基本确认 II 型淋巴细胞抗原就是自然杀伤 (natural killer, NK) 细胞的识别受体, 并发现树突状细胞表面 205 ku 蛋白 (DEC-205) 和磷脂酶 A₂ 受体 (phospholipase A₂ receptor, PLA₂R) 与 MMR 同属一个多 CRD I 型跨膜受体家族。因此, 本文将第 5、6 组 C 型凝集