

脂质体作为基因工程载体的研究

刘启光 吴旻

(中国医学科学院肿瘤研究所)

提 要

脂质体是由天然脂类和(或)类固醇组成的微球体,核酸分子可被包裹在微球体内部空间,通过细胞内吞作用(endocytosis)及膜融合(membrane fusion)进入细胞。由于脂质体没有毒性,制备容易,因此,脂质体作为基因载体越来越受到重视。

一、脂质体的制备

制备脂质体最简单的方法是通过机械振动脂类的水悬液,这样形成的脂质体是多层囊泡(MLV),MLV经超声波处理,则形成小的单层囊泡(SUV),曾有人用SUV包裹DNA片断,但一般来说,用SUV包裹核酸不理想,因为SUV体积小,直径200—250 Å,包裹效率低(0.1—0.5 μl/μmol),并且在制备SUV包裹核酸时,超声波处理易使核酸分子断裂。MLV虽然包裹核酸的效率是SUV的10—20倍(5—10 μl/μmol),而且避免了超声波处理,但MLV大小很不均一(直径0.1—10 μm),降低了包裹效率,MLV还不能保护被包裹的核酸免受核酸酶的作用。目前用作核酸载体的脂质体多为大的单层囊泡(LUV,直径为0.1—10 μm),包裹核酸的效率是SUV的 10^3 — 10^4 倍,并且能保护被包裹的核酸不受核酸酶的作用。常用的制备LUV脂质体的方法有:

Ca²⁺-EDTA 螯合法: 首先将脂的水溶液用超声波处理,制成SUV,然后加入Ca²⁺,使SUV相互融合,再加入核酸分子,最后加EDTA来螯合Ca²⁺,以除去之,便得到LUV脂质体。此法操作较温和,核酸包裹率为10%。

逆相蒸馏法: 在溶于有机溶剂的脂溶液中加入核酸水溶液时,脂分子由于亲水基朝向水

层而并排在两相界面,经超声波处理,即在有机相中形成包有水溶液的小泡,减压蒸馏有机溶剂,并加入水溶液,搅拌后即形成LUV脂质体,通常称为REV型脂质体。此法得到的脂质体较大,可用于包裹大分子核酸,核酸包裹率较高,可达50%。此法由Papahadjopoulos^[1]建立,已得到广泛应用,是目前最常使用的方法。此法缺点是残留的有机溶剂可能影响被包裹物质及脂质体结构和性质。

去污剂透析法: 用超声波处理脂溶液形成SUV,再加入核酸及一定比例的去污剂,然后缓慢去除去污剂,在去污剂去除过程中,脂分子重新排列而形成LUV脂质体。此法操作温和,正在被日益广泛采用。

冷冻干燥法: 用超声波处理脂水溶液,形成SUV,然后加入核酸分子,进行真空冷冻干燥脱水,再重新水化即形成LUV脂质体。此法温和,所得到脂质体也较大,可用于包裹大分子核酸,核酸包裹率约为60%。

脂质体进入宿主细胞后,如何释放被包裹物质,是一个重要问题。有人曾将组织温度局部升高,脂质体即破裂而释放其包裹的物质,但高温对组织有损伤。Yatvin^[2]制备了“酸敏脂质体”,这种脂质体在pH 5.0—6.5的环境中破裂而释放被包裹的物质。在制备脂质体时,加入对酸敏感的脂,便可得到酸敏脂质体,由于酸敏

脂质体便于释放其内包物,人们便根据不同的需要制备出各种酸敏脂质体。

在脂质体制备中,另一吸引人的进展,是将脂质体与抗体相连接,构成“免疫脂质体”,使脂质体载体具有定向运载的特点。早在1975年已有人将脂质体与免疫球蛋白相连接,制备出具有特异性的脂质体,但免疫球蛋白与脂质体的连接不稳定。后来,一些学者将抗体与脂质体以共价键结合,大大提高了脂质体与抗体间结合的稳定性。Huang等^[3]用抗体首先与脂肪酸相连,分离、纯化、将连有抗体的脂肪酸与脂混合,制备免疫脂质体。避免了在抗体与脂质体相连时所加入的试剂对脂质体组成的影响和对脂质体的损伤。

在制备酸敏脂质体与免疫脂质体的基础上,Connor等^[4]制备了酸敏免疫脂质体,将荧光染料 Calcein 引入小鼠 L₉₂₉ 细胞。

二、脂质体运载核酸至动物细胞

Wilson等^[5]将脊髓灰质病毒 (polio virus) 通过脂质体带进 HeLa 细胞,脂质体-polio 病毒感染 HeLa 细胞的能力不受抗血清的影响,而裸露的 polio 病毒的感染力受抗血清的影响,说明 polio 病毒是被包裹在脂质体内受到保护,因而不受抗血清中酶的作用。脂质体-polio 可以感染缺乏这种病毒受体的细胞,例如非洲灵长目细胞,这种细胞通常是抗 polio 病毒感染的,这一事实表明脂质体携带的 polio 病毒不是通过病毒受体引起感染的,而是由脂质体将病毒直接引入细胞内。可能是通过脂质体与细胞膜融合或细胞内吞作用将病毒带入细胞。这一研究结果首次表明脂质体能够用作携带核酸物质进入细胞的载体。

脂质体运载 RNA 至动物细胞 在 Wilson 的工作之后,Ostro 及 Dimitriadis 分别报道用脂质体包裹被提纯的 RNA,通过去污剂的胞溶作用或溶剂提取,可将包裹 RNA 的脂质体清除,而保留 RNA 的生物活性。之后,他们又分别将兔珠蛋白 mRNA 包在脂质体内,通过脂质体把 mRNA 引入人的 Hep-2 细胞

(human epithelial carcinoma cell)^[6] 和小鼠淋巴细胞^[7],并获得表达。Dahl 等 (1981)^[8] 用脂质体将裂隙连接蛋白 mRNA 引入缺失胞间通讯的小鼠细胞,结果使这种小鼠细胞建立起正常的胞间通讯。成功地应用了脂质体载体。

Wilson 等 (1980)^[9] 在过去工作的基础上,又进一步将提纯的 polio 病毒 RNA 通过脂质体载体引入 HeLa 细胞、小鼠 L 细胞及 CHO (chinese hamster ovary) 细胞,并与通常使用的 DEAE Dextran/DMSO 法比较,用脂质体载体, polio RNA 的感染效率为 10^4 — 10^5 pfu/ng, 较 DEAE Dextran/DMSO 法高 10—100 倍,细胞感染率前者可达 85—95%,而后者只有 40—60%。

脂质体运载 DNA 至动物细胞 Mukherjee 等 (1978)^[10] 把从 HGPRT⁺ (hypoxanthine guanine phosphoribosyl-transferase) 小鼠与人的杂交细胞中提取的染色体包在脂质体中,然后转入 HGPRT⁻ 小鼠细胞 A-9,使 HGPRT⁻ 细胞转变为 HGPRT⁺ 细胞,转化效率为 10^{-5} ,较用裸露的染色体直接转化,效率至少高 10 倍。Kondorosi 等 (1980)^[11] 将鸡的红血细胞核通过脂质体引入 CHO/pro⁻ (proline⁻) 细胞, pro⁺ 细胞出现的频率为 3.7 — 6.2×10^{-5} ,比 pro⁻ → pro⁺ 自发转化的效率高 100 倍。在此期间,几个实验室分别用脂质体成功地包裹被提纯的 DNA 分子,如 λ DNA,噬菌体 T₇ DNA 和 pBR322 DNA。包在脂质体内的 DNA 不被 DNase 降解, DNA 分子的物理性质除了在分子表面见到一些缺口外,没有受到明显的影响。

Wong 等^[12]将来自细菌的 pBR322 的含有 β -内酰胺酶 (β -lactamase) 的基因片断 (875bp) 通过脂质体载体引入 HeLa 细胞和鸡胚成纤维细胞,结果在细胞提取物中可检测到 β -内酰胺酶的活性,而用空的脂质体或空脂质体加 β -内酰胺酶基因 (未包进脂质体) 的对照组,则无 β -内酰胺酶的活性。几乎同时, Fraley 等 (1980)^[13] 将 SV40 DNA 通过脂质体载体转

染猴肾细胞,转化效率为 $1.8 \times 10^3 \text{ pfu}/\mu\text{g DNA}$,在有聚乙二醇存在的条件下,转化效率提高,可达 $3 \times 10^5 \text{ pfu}/\mu\text{g DNA}$,与 DNA-磷酸钙法基本相当。Schaefer-Ridder 等 (1982)^[44] 用脂质体载体将含疱疹病毒胸苷激酶 (TK) 基因的重组 DNA 片断插入缺失 TK 的小鼠 L₉₂₉ 细胞,得到的转化效率比 DNA-磷酸钙法高 10—1000 倍。Itani 等 (1987)^[45] 报道用脂质体载体将 TK 基因高效地引入悬浮生长的缺失 TK 的小鼠 FM3A 细胞,转化效率达 2×10^{-2} ,较 DNA-磷酸钙法约高 10^4 倍,与微注射法转化 DNA 的效率基本相当,并证明转化 DNA 在细胞中活性可保持 8 个月以上。他们还将质粒 pLTR-myc-neo DNA 用脂质体载体引入 HL60 细胞及人淋巴瘤贴壁 U937 细胞,转化效率也明显高于 DNA-磷酸钙法。他们还确定了脂质体的量与加入 DNA 量的关系:在 $1 \mu\text{mol}$ 磷脂酰丝氨酸 (PS) 中加 $10 \mu\text{g DNA}$ (7.6 kb) 时, DNA 的被包裹率最高为 10%。Nakatsuji 等^[46] 用脂质体载体将 HLA-DQ₂、DQ₃ 基因与 neo 基因一起共同转染小鼠 L 细胞,转化效率也达到 $1-2 \times 10^{-2}$,得到的转化细胞可与几种 HLA 单克隆抗体相连接。以上这些实验结果表明,经过大约 10 年的研究,脂质体确实可作为一种操作简便,转化效率高的基因工程运载系统。

有人报道将脂质体用于体内 DNA 转移,将编码前胰岛素原顺序的质粒 DNA 包于脂质体中,大鼠被静脉注射此种脂质体后,胰岛素在肝中获得瞬时表达,并伴随血糖水平的降低。这一实验结果十分令人鼓舞,预示着脂质体用于临床基因治疗的前景。

三、脂质体运载核酸至植物细胞

脂质体作为核酸载体用于植物细胞,有其特殊的优越性。因为植物细胞培养基中常常存在原生质体分泌的核酸酶,使外源核酸常在进入原生质体前就被分解。脂质体包裹核酸分子后,可以保护其免于核酸酶的作用。另外,植物细胞除去细胞壁后,其原生质体膜较动物细胞

膜更易与脂质体融合 (因为动物细胞膜常有多糖覆盖在上面)。

Cassells^[47] 将包有荧光素二乙酸酯 (FDA) 的脂质体与西红柿原生质体混合,结果 FDA 进入西红柿原生质体。自此,开始了脂质体作为植物细胞核酸载体的研究。一些研究者先后报道了用脂质体载体将质粒 pBR322 DNA 及来自细菌的核酸分子引入植物细胞原生质体。有人用脂质体包裹同位素标记的 pBR322 DNA,然后与烟草和豇豆的原生质体一起温育,结果在原生质体中检测到放射性,说明 pBR322 DNA 进入原生质体。如果温育时加上聚乙二醇,进入细胞的 DNA 量增加,其中 3% DNA 进入细胞核。Ohgawara 等 (1983)^[48] 也报道,用脂质体将 pBR322 DNA 引入胡萝卜原生质体,一星期后,在培养的原生质体中,仍有此质粒存在。Ostro 等把用同位素标记的 *E. coli* RNA 通过脂质体引入胡萝卜原生质体。Wang 等^[49] 用酸敏脂质体运载荧光物质 Calcein 进入胡萝卜原生质体,由于酸敏脂质体易释放其内包物,他们在原生质体内观察到均匀分布的荧光。在有聚乙二醇存在时,89% 原生质体有荧光物质进入。酸敏脂质体与非酸敏脂质体比较,无论是荧光物质进入细胞的效率还是在细胞内的分布都大为提高。

一些研究者把兴趣放在用脂质体将植物病毒 RNA 引入植物细胞原生质体。有作者报道,用脂质体载体将 TMV (Tobacco Mosaic Virus) RNA 及 CPMV (Cowpea Mosaic Virus) RNA 引入烟草和豇豆原生质体时,聚乙二醇能大大增加 TMV RNA 进入豇豆原生质体的效率,而对于 TMV RNA 进入烟草原生质体时,聚乙烯醇的处理较聚乙二醇更为有效。同时还证明,在制备脂质体时,如果加入胆固醇,用来运载 TMV RNA 及 CPMV RNA 进入植物细胞原生质体后能复制、合成外壳蛋白而形成病毒颗粒。还有作者报道,用脂质体将 TMV RNA 引入烟草原生质体,6 小时后原生质体内部形成 TMV 粒子,20—24 小时后,每个原生质中可观察到 5×10^5 个病毒颗

粒。Fukunaga 等(1983)^[20]通过脂质体把 TMV RNA 引入烟草原生质体,其中 80% 原生质体被感染,他们还对脂质体进入细胞的机制进行研究,认为脂质体是通过细胞内吞作用进入原生质体的。

令人感兴趣的是有人将植物基因工程的常用载体——Ti 质粒用脂质体引入植物细胞。长田敏行(1982)^[21]通过脂质体载体把 Ti 质粒引入烟草原生质体,通过生长素自主型来选择、鉴定细胞株,表明有 Ti DNA 合成的蛋白质存在。

Deshayes 等(1985)^[22]用脂质体包裹带有卡那霉素抗性基因的大肠杆菌质粒,引入烟草原生质体,结果从转化细胞获得再生植株,其叶内原生质体仍能在高浓度的卡那霉素培养基上生长。而野生型的在低浓度时,就被杀死。在转化植物中检测到转移基因的酶活性及 DNA 序列。转移植物所结种子也不同于野生型,前者能在卡那霉素培养基上正常萌发生长,后者不能正常生长。

Giles 等(1980)^[23]以脂质体为载体,成功地将菠菜叶绿体引入了美洲曼陀罗的原生质体,他们用显微镜和氧电极进行检测。发现所引入的叶绿体都排列在原生质体膜的内表面附近,并在较长时间内表现出较高放氧活性。这一实验结果表明,脂质体可以将细胞器引入植物细胞。

四、脂质体载体的特点

1. 目前常用的基因载体,如质粒 DNA,病毒载体系统,噬菌体 DNA 等,虽然也经过人工修饰和加工,但它们毕竟是“天然的”。而脂质体完全是人工合成的,并且制备方法简便、易行,因而可根据需要制备出各种不同的脂质体。

2. 一般基因载体所运载的基因片断有一定大小及特定的粘性末端,而脂质体可以运载不同大小的基因片断,还可以运载质粒 DNA 而

作为载体的载体。脂质体可以运载整个染色体或整个细胞核以及植物细胞的细胞器,其容量大大超过其它各种基因载体。

3. 一般的基因载体都有一定的宿主范围,而脂质体则不受宿主限制,可将基因引入动物细胞、植物细胞和细菌。

4. 脂质体可与抗体结合,而成为具有高度特异性的基因运载体。

5. 脂质体可以抵抗核酸酶的作用,因而能够保护其携带的基因不受核酸酶的降解作用。

6. 脂质体载体运载 DNA,其转化效率较 DNA-磷酸钙法高许多,可与微注射法及电脉冲法相比拟,但后者往往对宿主细胞有损伤,有时还会引起细胞内物质丢失。脂质体对宿主细胞没有毒性,是一种高效、安全的载体系统。

参 考 文 献

- [1] Szoka, F. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1978, 75, 4194.
- [2] Yatvin, M. B. et al.: *Science*, 1980, 210, 1253.
- [3] Huang, A. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1982, 716, 140.
- [4] Connor, J. et al.: *J. Cell Biol.*, 1985, 101, 592.
- [5] Wilson, T. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1977, 74, 3471.
- [6] Ostro, M. et al.: *Nature*, 1978, 274, 921.
- [7] Dimistriadis, G.: *Nature*, 1978, 274, 923.
- [8] Dahl, G. et al.: *Nature*, 1981, 289, 683.
- [9] Papahadjopoulos, D. et al.: *In Vitro*, 1980, 16, 49.
- [10] Mukherjee, A. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978, 75, 1361.
- [11] Kondoroski, E. et al.: *FEBS Lett*, 1980, 120, 37.
- [12] Wong, P. K. et al.: *Gene*, 1980, 10, 87.
- [13] Fraley, R. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1980, 255, 10431.
- [14] Schaefer-Riader, M. et al.: *Science*, 1982, 215, 166.
- [15] Itani, T. et al.: *Gene*, 1987, 56, 267.
- [16] Naktsuji, T. et al.: *Immunogenetics*, 1987, 25, 1.
- [17] Cassells, A.: *Nature*, 1978, 275, 760.
- [18] Ohgawara, T. et al.: *Protoplasma*, 1983, 116, 145.
- [19] Wang, C-Y et al.: *Plant Physiol.*, 1986, 82, 1.
- [20] Fukunaga, Y. et al.: *Exp. Cell Res.*, 1983, 144, 181.
- [21] 长田敏行:《化学と生物》,1982,20,177.
- [22] Deshayes, A. et al.: *The EMBO J.* 1985, 4, 2731.
- [23] Giles, K. et al.: *In Vitro*, 1980, 16, 581.

【本文于1988年8月22日收到】