

homology domain-mediated membrane association and activation of the beta-adrenergic receptor kinase requires coordinate interaction with G beta gamma subunits and lipid. *J Biol Chem*, 1995, **270** (20): 11707~ 11710

Structure and Function of PH Domain. WANG Jifun, YAO Libo (*Department of Biochemistry and Molecular Biology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China*).

Abstract The PH domain is a protein module of approximately 120 amino acid residues founded in many proteins involved in signal transduction. The PH domains are similar to each other in their three-dimensional structures, and the major structure difference among them lies in the three variable loops in the structures. The PH

domain is electrostatically-polarized and the variable loops are on the positively-charged surface, which may serve as a ligand-binding surface. So far, it has been found that PH domains can interact with the $\beta\gamma$ -subunits of G protein ($G\beta\gamma$), protein kinase C (PKC) and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate (PIP₂ or inositol 1, 4, 5-trisphosphate (IP₃)). All these implied that PH domain might play an important role in the interaction between the signaling molecules and help to form the signal transduction network.

Key Words PH domain, signal transduction, protein kinase C, G protein, phosphatidylinositol derivatives

受体介导的基因转移技术

李崇辉

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要 通过受体对 DNA-配体复合物的特异识别和吞入, 可以将外源基因导入特定的细胞内进行表达, 称为受体介导的基因转移技术. 对该项技术的基本方法、体内外应用研究进展以及发展方向等进行了介绍和综述.

关键词 受体, 配体, 基因转移

学科分类号 Q78

基因转移技术是生物工程和基因治疗中的关键技术之一. 随着分子生物学的发展和人类基因组计划的进展, 越来越多的基因序列得以测定. 利用基因转移技术将这些基因转移到各种细胞中进行表达, 才能进一步对这些基因的蛋白质产物进行研究或用于基因治疗. 目前, 磷酸钙共沉淀、DEAE 葡聚糖、脂质体和病毒载体等介导的基因转移技术已得到了广泛应用, 但是其共同的不足是缺乏细胞或组织特异性. 而受体介导的基因转移技术则利用特异的受体配体反应, 将外源基因导入特定的细胞中

进行表达, 以加强基因产物对这些细胞的作用而又不致于对其他细胞产生毒副作用. 而且由于是利用细胞生理性的吞入作用吸收外源基因, 可以提高基因转移效率, 减少细胞毒性. 自从 1987 年 Wu 等^[1]首次利用受体配体反应来介导基因转移成功后, 受体介导的基因转移技术得到了广泛重视和深入研究. 本文旨在对受体介导的基因转移技术进行介绍, 并对其近年来的研究进展进行综述.

收稿日期: 1997-04-14, 修回日期: 1997-07-21

1 受体介导的基因运载系统

受体介导的基因运载系统包括四个部分：
a. 具有内吞功能的受体；b. 受体的特异配体；
c. 含目的基因的真核细胞表达载体；d. 配体与DNA的连接部分，有些配体可直接与DNA结合，后三者结合在一起形成能够被受体识别并内吞的DNA-配体复合物。

1.1 介导基因转移的受体与配体

受体介导基因转移的机制是将DNA与配体结合在一起形成仍能被受体识别并内吞的DNA-配体复合物，然后与体外培养的细胞保温或直接注入动物体内，使其被相应的受体识别并内吞进入细胞内，一部分基因进一步转移到核内进行转录和表达。因此，理论上能够对特异配体进行识别、结合并内吞的细胞表面受体均可以介导基因转移。目前研究最多的两类高效内吞受体是去唾液酸糖蛋白受体 (asialoglycoprotein receptor, ASGPR) 和转铁蛋白受体 (transferrin receptor, TFR)。ASGPR 又称为半乳糖受体，只存在于肝实质细胞朝向肝窦一侧的细胞膜上，专一性识别含有末端半乳糖基的糖蛋白，循环血液中的许多糖蛋白就是通过该受体进入肝细胞进行代谢的。TFR 存在于许多细胞表面，负责向细胞内转运铁离子。

其他介导基因转移的受体配体还有：肝细胞胰岛素受体和胰岛素，T 细胞 CD3 受体和作为配体的 CD3 抗体^[2]，SLF (steel factor) 与造血干细胞 SLF 的受体 $c-kit$ ^[3]，巨噬细胞甘露糖受体和甘露糖修饰的多聚赖氨酸^[4,5]，肿瘤细胞叶酸受体和叶酸修饰的多聚赖氨酸等。

1.2 DNA-配体复合物的形成

用于基因转移的DNA-配体复合物的结构和组成各式各样。当配体为非DNA结合蛋白时，一般是先将蛋白配体与多聚-L-赖氨酸 (poly-L-lysine, PLL) 共价连接，带正电的PLL再通过静电作用与带负电的DNA结合。PLL的另一个重要功能就是将分子质量巨大的DNA进行折叠浓缩，形成小的颗粒结构，

易于被细胞内吞，并且能够抵抗核酸酶的降解。DNA浓缩与细胞吸收有密切关系，全浓缩质粒DNA形成80~100 nm直径的杆样结构，最容易被细胞吸收^[6]。其他能够结合DNA的物质也可用来连接DNA与配体：如组蛋白、鱼精蛋白、DNA嵌入试剂、DNA结合多肽、生物素化的DNA与亲和素标记的配体直接结合等等。DNA结合多肽是一种人工合成的精胺类似物，能够结合并浓缩DNA^[7]。另外甘露糖或叶酸修饰的PLL可直接与DNA结合形成DNA-配体复合物。

将配体共价连接到脂质体表面，脂质体再包装DNA后形成的复合物也能被相应的受体识别并内吞^[8]。病毒载体经修饰后，也可以进行靶向基因运送：将复制缺陷的鼠白血病病毒的外壳蛋白连接半乳糖基后，对敏感细胞的感染力下降，而特异地被表达ASGPR的人肝细胞株HepG2识别并内吞。当用于介导细菌 β 半乳糖苷酶 (β -gal) 基因转移时，36%的细胞可被转染，而转染无ASGPR的人肝细胞株SKHep1时则无阳性细胞^[9]。

1.3 DNA-配体复合物的体内运输

体内的基因转移过程要比体外复杂的多。DNA-配体复合物经静脉注入体内后，经过血液循环到达靶部位，再穿越毛细血管网和内皮层到达实质细胞。因此要求复合物能在血液中保持稳定且不受血液成分的影响，而且颗粒大小要合适，不阻塞毛细血管或被网状内皮系统吞噬。DNA-配体复合物被受体识别并内吞进入细胞形成内吞体，内吞体内移最终与溶酶体融合。DNA需从内吞体中释放出来并转移到核内进行转录和表达。任何一个环节发生障碍或者效率不高，都会影响到整个受体介导的基因转移和表达过程。

2 受体介导的体内外基因转移

1987年，Wu等^[1]首次利用ASGPR介导体外基因转移成功。他们将ASGPR的天然配体ASORO (asialoorosomucoid) 与PLL共价连接，然后与含细菌氨基霉素乙酰基转移酶基因

的质粒 pSV2CAT 混合, 将形成的复合物分别与 HepG2 和 SK-Hep1 细胞温育. 结果表明, HepG2 细胞中表达的 CAT 酶活性是磷酸钙方法的二倍, 而 SK-Hep1 细胞中检测不到 CAT 酶活性. Wagner 等^[10]利用转铁蛋白 TF-PLL/DNA 或 TF-鱼精蛋白/DNA 转染多种具有 TFR 的细胞, 基因表达水平也比较低, 转染鸡成红细胞系 HD3 时, 比 DEAE 葡聚糖法低 100 倍.

从 1988 年, Wu 等^[11-13]又将 ASORO-PLL/DNA 复合物经尾静脉注入大鼠体内进行了一系列体内受体介导的靶向基因表达研究. DNA-配体复合物可经血液循环被肝细胞迅速吸收, 静注 10 min 后有 80% 的质粒分布于肝细胞中, 而单独注射 DNA 时, 肝脏中只有 17%. 肝细胞中的质粒 DNA 大部分被降解, 24 h 时只剩下千分之一, 48 h 时检测不到. 但是肝细胞中可检测到暂时的基因表达, 4 h 即可检测到目的基因的 mRNA, 24 h 时表达产物水平最高, 72 h 时下降到检测不出的水平.

上述结果表明, DNA-配体复合物可以有效的通过受体介导的内吞途径进入靶细胞, 但是由于多数内吞受体介导的是内吞降解途径, 即受体-配体复合物最终进入溶酶体, 有些受体与配体解离, 受体重新循环到细胞表面进行下一轮内吞, 配体则在溶酶体中被降解. 因此如何将 DNA 从内吞体或溶酶体中释放出来, 并转移到细胞核内进行表达, 成为受体介导的基因转移技术成功的关键. 进一步的研究探索发现, 中断或破坏内吞降解途径的任何环节都可以提高受体介导的基因表达水平, 延长基因表达时间.

2.1 抑制内吞体与溶酶体融合

由于内吞体在向溶酶体移动的过程中需要微管, 因此破坏微管可阻止内吞体与溶酶体融合, 避免 DNA 降解. 给大鼠尾静脉注射 ASORO-PLL/pSV2CAT 复合物前 30 min, 腹腔注射微管破坏试剂秋水仙碱, 可使肝内 CAT 酶表达持续 9~14 周, 而未给秋水仙碱的动物基因表达只持续 48 h. 同法转移 pSVK3-

hBUGT1 (bilirubin uridinediphosphoglucuronate glucuronosyltransferase 1) 基因时, 肝中基因表达可持续 10 周, 血中胆红素水平下降 25%~35%, 并保持 8 周. 而未给秋水仙碱的动物肝中基因表达只有 48 h, 血中胆红素水平未见下降^[14].

2.2 破坏内吞体

多数病毒感染细胞时进入细胞的过程与受体介导的基因转移过程类似, 但是病毒却能够有效逃避细胞水解酶的降解. 无包膜病毒如腺病毒与细胞表面蛋白结合后引发胞吞作用进入内吞体, 晚期内吞体中的酸性环境引起病毒外壳蛋白构型改变可活化内吞体裂解蛋白, 使其疏水区与内吞体膜相互作用并导致内吞体膜破坏释放病毒 DNA. 将灭活的腺病毒与 TF-PLL/DNA 共转染培养的细胞时, 可使基因表达水平提高 10~100 倍^[2,15], 可能是由于腺病毒与 DNA 进入同一内吞体, DNA 借助腺病毒从内吞体中释放出来而避免被降解. 腺病毒经化学试剂或紫外线灭活失去感染能力, 使用安全.

被膜病毒表面蛋白也具有破坏内吞体的作用. 将根据流感病毒凝血素亚单位 HA-2 的 N 端序列合成的多肽加入到转染复合物 TF-PLL/pCMV β -gal 中, 转染 HeLa 细胞时, 细胞阳性率从 < 0.5% 提高到 3%~10%^[2]. 呼吸道合胞病毒的融合蛋白也具有类似的功能.

2.3 破坏溶酶体

氯喹可抑制溶酶体酶, 使内吞体空泡化, 释放其内容物, 从而减少对 DNA 的降解. 以 DNA-配体复合物转染细胞时加入 100 μ mol/L 氯喹, 可使转染效率提高 10~100 倍^[10,15]. 体内肝靶向基因转移 HCV cDNA 时同时给一定量的氯喹, 可使肝内基因表达水平提高 22 倍^[16].

2.4 部分肝切除

将 ASORO-PLL/pSV2CAT 尾静脉注入大鼠后 30 min, 对大鼠进行 60% 肝切除. 未切除组肝匀浆中 CAT 酶活性为 10 U/g 肝组织, 只维持 3 d, 肝切除组的 CAT 酶活性为

11.3 U/g肝组织, 可持续 11 周^[17]. 以含人白蛋白基因的质粒转染白蛋白缺陷的大鼠时, 对大鼠进行 2/3 肝切除, 大鼠血液中人白蛋白浓度在 2 周时达到 34 mg/L, 并可持续 4 周^[18]. 研究表明肝切除后, 质粒 DNA 以低水平、非降解形式长时间存在于细胞质中. 将 ASORO-PLL/DNA 注入大鼠体内并实施 60% 肝切除, Southern 杂交表明, 80% 的 DNA 可进入肝细胞. 但是未经肝切除的大鼠肝脏中的 DNA 在 4 h 和 24 h 时, 分别下降到最初水平的 8%~12% 和 2%~4%, 7 天时检测不到. 而肝切除组则分别为 20%, 9% 和 7%^[13]. 这可能是部分肝切除延长基因表达的主要原因, 但其详细机制还不清楚.

3 研究受体介导的基因转移的策略

受体介导的基因转移技术除具有靶向基因运送的主要优势外, 还具有许多优点: a. 一种受体可通过一种运载体介导多种基因转移; b. 对基因载体的大小无限制; c. DNA 通过生理性内吞途径进入细胞, 对细胞损伤作用小, 效率高; d. 无致癌变作用. 但是, 目前该技术还处于基础研究阶段, 若应用于临床基因治疗, 则还有许多问题有待于解决:

3.1 受体介导的基因转移过程中, 外源 DNA 没有整合入细胞染色体的机制, 主要表现为瞬时表达. 因此, 若用于基因治疗, 还须研制能高效定点整合入染色体的基因载体, 这也是其他基因转移方法需要解决的难题.

3.2 目前受体介导的基因转移方法在辅助使用秋水仙碱、病毒融合肽和部分肝切除等手段时才能获得较高的基因表达水平, 但前二者有一定的毒性或免疫源性, 肝切除不适用于人, 故须寻找更安全有效的替代措施. 靶向模拟病毒载体似乎将多种基因运载体的长处集于一体, 有较好的发展前途. Remy 等^[19] 首先用脂多胺 (lipopolyamine) 结合并浓缩 DNA, 然后将磷脂 DOPE (dioeoyl phosphatidylethanolamine) 通过疏水作用结合上去, 形成模拟病毒颗粒, 在掺入人工合成的含有末端三线半乳糖基的糖脂后,

仍能被 HepG2 细胞的 ASGPR 识别, 此靶向模拟病毒载体可使转染效率提高 1 000 倍. 此电中性的靶向基因运载体用于体内基因转移时或许会更有效.

3.3 细胞通过受体介导的内吞途径吸收配体的效率是非常高的, 如体重 300 g 的大鼠肝细胞对 ASORO 的内吞率为 60 $\mu\text{g}/\text{min}$, 相当于内吞 5.5 kb 的质粒 6 mg/min. 实际上细胞对配体的吸收率远远超过了目前技术上所能给予的 DNA-配体复合物的量. 目前文献中制备的 PLL/DNA 复合物多数颗粒大小不均一, 浓度稍高即产生沉淀, 所用的 PLL/DNA 比例也相差很多. Ferkol 等^[4] 认为将甘露糖-PLL 与 DNA 于 0.7 mol/L 的 NaCl 中滴加混合, 形成浊液后再滴加 5 mol/L NaCl 至变成清亮溶液, 可以得到凝缩 (condensed) 的单个质粒 DNA, 形成直径为 10~20 nm 的面包圈样结构. 该复合物介导基因转移的效率明显高于低离子强度下形成的聚集 (aggregated) 颗粒和高离子强度下形成的松散颗粒. 因此进一步改进 DNA-配体复合物的结构、组成及制备方法, 提高其靶向运送的效率也有利于提高受体介导的基因表达水平.

致谢 本文经导师孙曼霁教授仔细审阅, 在此深表感谢!

参 考 文 献

- 1 Wu G Y, Wu C H. Receptor-mediated *in vitro* gene transformation by a soluble DNA carrier system. *J Biol Chem*, 1987, **262**: 4429~4432
- 2 Buschle M, Cotten M, Kirlappos H *et al.* Receptor-mediated gene transfer into human T lymphocytes via binding of DNA/CD3 antibody particles to the CD3 T cell receptor complex. *Hum Gene Ther*, 1995, **6**: 753~761
- 3 Schwarzenberger P, Spence S E, Gooya J W *et al.* Targeted gene transfer to human hematopoietic progenitor cell lines through the c-kit receptor. *Blood*, 1996, **87**: 472~478
- 4 Ferkol T, Perales J C, Mularo F *et al.* Receptor-mediated gene transfer into macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**: 101~105
- 5 Erbacher P, Bousser M, Raimond J *et al.* Gene transfer by DNA/glycosylated polylysine complexes into human blood monocyte-derived macrophages. *Hum Gene Ther*, 1996, **7**:

- 721~ 29
- 6 Wagner E, Cotten M, Foisner R *et al.* Transferrin polycation complexes: the effect of polycations on the structure of the complex and DNA delivery to cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**: 4255~ 4259
 - 7 Gottschalk S, Sparrow J T, Hauer J *et al.* A novel DNA-peptide complex for efficient gene transfer and expression in mammalian cells. *Gene Ther*, 1996, **3**: 448~ 457
 - 8 Schreier H, Moran P, Caras I W. Targeting of liposomes to cells expressing CD4 using glycosylphosphatidylinositol-anchored gp120. *J Biol Chem*, 1994, **269**: 9090~ 9094
 - 9 Hara T, Aramaki Y, Takada S *et al.* Receptor mediated transfer of pSV2CAT DNA to a human hepatoblastoma cell line HepG2 using asialofetuin-labeled cationic liposomes. *Gene*, 1995, **159**: 167~ 174
 - 10 Zenke M, Steinlein P, Wagner E *et al.* Receptor-mediated endocytosis of transferrin-polycation conjugates: an efficient way to introduce DNA into hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**: 3655~ 3659
 - 11 Wu G Y, Wu C H. Receptor-mediated gene delivery and expression *in vivo*. *J Biol Chem*, 1988, **263**: 14621~ 14624
 - 12 Wilson J M, Grossman M, Wu C H. Hepatocyte directed gene transfer *in vivo* leads to transient improvement of hypercholesterolemia in LDL receptor deficient rabbit. *J Biol Chem*, 1992, **267**: 962~ 967
 - 13 Chowdhury N R, Wu C H, Wu G Y *et al.* Fate of DNA targeted to the liver by ASGPR-mediated endocytosis *in vivo*. *J Biol Chem*, 1993, **268**: 11265~ 11271
 - 14 Chowdhury N R, Hays R M, Bommineni V R *et al.* Microtubular disruption prolongs the expression of human BUG-Tase I gene transferred into Gunn rat livers. *J Biol Chem*, 1996, **271**: 2341~ 2346
 - 15 Harris C E, Agarwal S, Hu P C *et al.* Receptor-mediated gene transfer to airway epithelial cells in primary culture. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1993, **9**: 441~ 447
 - 16 Yamamoto M, Hayashi N, Miyamoto Y *et al.* *In vivo* transfection of hepatitis C virus complementary DNA into rodent liver by asialoglycoprotein receptor mediated gene delivery. *Hepatology*, 1995, **22**: 847~ 855
 - 17 Wu C H, Wilson J M, Wu G Y. Targeting genes: delivery and persistent expression of a foreign gene driven by mammalian regulatory elements *in vivo*. *J Biol Chem*, 1989, **264**: 16985~ 16987
 - 18 Wu G Y, Wilson J M, Shalaby F. Receptor-mediated gene delivery *in vivo*. *J Bio Chem*, 1991, **266**: 14338~ 14342
 - 19 Remy J S, Kichler A, Mordovinov V *et al.* Targeted gene transfer into hepatoma cells with lipopolyamine condensed DNA particles presenting galactose ligands: a stage towards artificial viruses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**: 1744~ 1748

Receptor Mediated Gene Transfer. LI Chong-hui (*Beijing Institute of Pharmacology and Toxicology, Beijing 100850, China*).

Abstract Exogenous genes can be introduced into specific cells for expression via receptor-mediated recognition and endocytosis of DNA-ligand complexes. The receptor-mediated gene transfer technique, its application and the perspective were described.

Key words receptor, ligand, gene transfer

(上接第 196 页, Continued from page 196)

- 2 Kern J A, Warnock L J, McCafferty J D. The 3' untranslated region σ 1 beta regulates protein production. *J Immunol*, 1997, **158** (3): 1187~ 1193
- 3 Kwon Y K, Hecht N B. Cytoplasmic protein binding to highly conserved sequences in the 3' untranslated region of mouse protamine 2 mRNA, a translationally regulated transcript of male germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88** (9): 3584~ 3588
- 4 Kollmush, Flohe L, McCarthy J E G. Analysis of eukaryotic mRNA structures directing cotranslational incorporation of selenocysteine. *Nucleic Acids Res*, 1996, **24** (7): 1195~ 1201
- 5 Carolyn J D, Roy P. Mechanism of mRNA degradation in Eukaryotes. *TIBS*, 1994, **19** (8): 336~ 340

3'-Untranslated Region of Eukaryotic mRNA in Gene Regulation. SHI Tong-dong, WU Yuzhang, ZHU Xihua (*Department of Molecular Immunology, 3rd Military Medical College, Chongqing 400038, China*).

Abstract The 3' untranslated region (3'-UTR) of eukaryotic mRNA plays an important role in the eukaryotic gene regulation. It controls not only the stability and degradation of eukaryotic mRNA, but the translation as well.

Key words 3'-UTR, eukaryotic mRNA, gene regulation