脂质体介导基因转移的研究进展

陈吉祥　薛飞群　李广林　赵荣材
(中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所　兰州　730050)

关键词　脂质体，基因，转移
分类号　Q78　**文献识别码**　C　**文章编号**　0253-2654(1999)-03-0223-225

基因转移是基因工程技术的重要环节之一，无论何种基因操作均离不开基因的转移，其最常用的方法有钙盐沉淀法、反转录病毒法、DEAE-右旋糖苷法、电融合法、显微注射法等，这些方法尽管都有其适用性，但各有缺点，如钙盐沉淀法虽然较早使用，但对细胞膜有较大的破坏性，且不易于活体动物，反转录病毒转染效率较高，却存在病毒潜在感染的危险。脂质体是由可生物降解的磷脂组成的双分子层结构，与生物膜有较大的相似性和组织相容性。自 Banghan[1]发明并做为生物膜模型研究以来，至今已应用于医学生物学的各个领域。70 年代后期，Robert 等将细菌质粒 DNA 包入脂质体，由此开始了脂质体在分子生物学领域的新应用[2]，而 80 年代中期出现的阳离子脂质体，将基因转染的效率提高了 10 多倍，与其它方法相比，脂质体有高效、毒性小、无潜在感染及把目标基因转移到特定组织的潜在优势，本文就这方面的研究进展进行了综述。

1　载基因脂质体的组成

脂质体是由磷脂分子构成的双分子层囊泡，最初用作基因载体是由天然磷脂(如卵磷脂、脑磷脂)及胆固醇所构成的中性或带阴离子电荷的阴离子脂质体，质粒 DNA 被包入脂质体内部，但包封率低，而且易于被溶酶体溶解破坏。1987 年 Felgner 等合成了阳离子脂质 N-[1-(2.3-二油酰基)丙基-]-N, N, N-三乙胺氯(DOTMA)，其分子结构有一带季胺阳离子的头部和二个长链的不饱和脂肪酸，由 DOTMA 构成的脂质体可与 DNA 自发形成复合物，其结合率可达 100%，Felgner 用 DOTMA / DOPE (1:1,)脂质体转染质粒 pSV2CAT 到各种细胞中，结果表明，这种阳离子脂质体介导的基因转染效率是 DEAE-Dextran 和磷酸钙盐沉淀法的 5～10 倍，转染的细胞株包括 COS-7细胞、T-淋巴细胞样干细胞、杂交瘤细胞等[3]；Leventis 等合成了一系列阳离子脂，其结构为二油酰基甘油或胆固醇通过一个可降解的酯键与阳离子头部相连，这些脂包括 1.2-二油酰基-3-(三甲胺)丙烷(DOTAP) 1.2-二油酰-(4-三甲胺)丁基-Sn-甘油(DOTAB)；1.2-二油酰 3-琥珀酰 Sn 甘油胆碱脂(DOSC)和胆固醇基(4'-三甲胺)丁基盐(CHOTB)，其介导 pSV2 CAT 质粒转染 CV-1 和 3T3 细胞的效率均高于 DEAE Dextran[4]。

Gao Xiang 等合成了胆固醇的阳离子衍生物 3β[N-N', N'-二甲胺基乙基胆固醇酯(DC-chol)，用其制成阳离子脂质体，能有效地介导 DNA 转染入内皮癌细胞和人肺癌细胞、鼠 L929 成纤维细胞，其转染效率比 Lipofectin 试剂高，其细胞毒性降低了 4 倍，而且由于 DC Chol含有一个氨甲酰键，与同类双亲性分子相比更稳定，含 DC-Chol和 DOPE 的脂质体在 4℃保存 6 周，其转染效率不降低[5]。目前已合成的阳离子脂不下 20 种，其基本结构都由两部分组成：疏水性的脂肪酸链或胆固醇基构成的尾部和亲水性的带正电荷的头部，后者是阳离子脂的功能部位，它们与 DNA 磷酸基结合或与细胞膜脂的负电荷部分结合。

阳离子脂质体的另一组份为不带电荷的中性脂分子，也叫辅助脂(helper lipid)，它们对提高转染效率有重要作用，DOPE 是一种最重要的辅助脂。Farhood 研究了 DOPE 在阳离子脂质体 DNA 转染过程中的作用，他们在 DNA 脂质体复合物转染细胞的同时，加入由 DOPE / DC-Chol组成的空白阳离子脂质体，结果发现当加入一定量的空白脂质体后，其转染效率最大可增加 8 倍，而且这种作用与空白脂质体中 DOPE 的含量有关，当 DOPE 含量为 80mol% 时，效果最明显，再增加 DOPE 的量，这种作用会降低，DOPE 的类似物 DOPC

1998-02-23收稿，1998-09-15修回

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

却无这种作用[6]。

2 DNA 与脂质体作用的模式及其形式复合物的性质

中性脂质体和阴离子脂质体与 DNA 作用较为简单，主要是质粒 DAN 被脂质体包裹，而阳离子脂质体与 DNA 作用较为复杂，是当前一个研究热点，已用多种方法研究了复合物的性质，如冷冻蚀刻电镜技术、荧光光谱、核磁共振、X 射线衍射等，目前认为阳离子脂质体与 DNA 有如下几种作用形式：(1) DNA 靠静电吸引力结合在阳离子脂质体的外表面，Felgner 认为一个直径为 250nm 的脂质体约含 2500 个脂分子，其中有一半为阳离子脂分子，而一个长度为 2.5kb 的质粒 DNA 分子含有 5000 个净负电荷，这样一个质粒可结合 4 个脂质体；(2) 带负电的 DNA 完全进入脂质体内部，并靠电荷吸附在阳离子脂质体内层表面，或悬浮在脂质体内部液体中，这种结合模式已由冰冻蚀刻电镜技术得到了证实[7]；(3) 线性 DNA 的周围包围着脂双层结构，DNA 与脂质分子之间靠静电吸引，但此时的脂质体已不具备完整性，脂分子呈线性排列在 DNA 的周围，这种结构也许对 DNA 转染更为有利；(4) 线性 DNA 部分插入脂质体内部：脂质体的某一部位双层断开并允许线性 DNA 分子进入，DNA 与脂质体结合，在此过程中 DNA 可以分布在脂质体内外两层，最大限度地中和脂质体正电荷[8]。脂质体与 DNA 形成复合物后脂质体发生聚集，膜融合，脂质体粒径变大，而且有时会出现可见沉淀。

脂质体与 DNA 的作用受其组成、大小、所带电荷、环境 pH、脂质体与 DNA 的比例等因素的影响。脂质体与 DNA 的比例对于转染效率是至关重要的，而且由于受体细胞的种类不同，比例随之改变，如 DOTMA / DOPE(1:1，脂质体与质粒 pSV2CAT 之比为 10:1 时，其转染 COS-7细胞的效率最高，而 DC-Chol / DOPE (3:2) 与 pUCSV2CAT 的比为 6:1 时，其转染细胞的效率最高。

3 DNA 脂质体转入细胞及其在细胞内的释放

脂质体介导 DNA 进入细胞的机制目前尚未十分清楚。Felgner 认为脂质体通过膜融合将 DNA 转入细胞，他们认为阳离子脂质体不仅与 DNA 结合成复合物，而且能结合到细胞膜表面与膜发生融合，把用 Rb 标记的 PE 结合到 DOTMA 阳离子脂质体中，再转染组织细胞，荧光显微镜显示 DNA 脂质体与细胞膜发生了融合，并通过膜进入细胞内，转染 4h 后其荧光强度最大。但 Pinnadunege 认为大部分的 DNA 结合在阳离子脂质体的外表面，因此靠脂质体和细胞膜融合而导入细胞的可能性很小，最可能的机制是通过细胞的吞噬作用，脂质体 DNA 复合物可以被吞噬进入胞内体和溶酶体，在该处阳离子脂质体破裂而将 DNA 释放进入胞浆[9]。Farhood 等认为 DNA 脂质体复合物首先通过电荷作用吸附在细胞表面，这种复合物然后通过细胞吞噬进入胞内体和溶酶体，目前多数人支持这种观点；另外，脂质体与细胞膜的脂质也可发生交换，在此过程中，单个的磷脂分子进入细胞质膜，并增加膜的通透性，与其相连的 DNA 分子有可能随着进入细胞浆。

Xu 等研究了 DNA 从 DNA 脂质体复合物中释放的机制：当 DNA 脂质体复合物进入胞内体后，使胞内体不稳定，而且使主要位于细胞膜表面的阴离子脂发生 flip-f10p翻转，该阴离子脂渗透入复合物，与脂质体中的阳离子脂结合，使质粒 DNA 释放入胞浆[10]，质粒 DNA 进一步进入胞核，在载体启动子的操纵下，目的基因被转录成 mRNA，该 mRNA 又由胞浆粗面内质网上的核糖体翻译成蛋白质，但绝大部分的 DNA 被细胞内核酸酶降解或者被甲基化而失活。

4 提高脂质体介导 DNA 转染效率的方法

4.1 靶向敏感性脂质体 这种脂质体有两个特点：一是对酸性环境或温度敏感，二是带有特异性抗体，具有靶向性。在基因治疗中，pH 或温度敏感性靶向脂质体能有效地介导目的基因到特异靶组织和靶细胞。目前已经有了关于体内外成功转染的报道，Wynshaw 等将质粒 pPCTK6A 包裹在由 DOPE/CHOL/OA(4:4:2)组成的 pH 敏感性免疫脂质体中，该脂质体含有 H-2K^{k}的抗体，质粒转染的细胞是鼠 LtK$^-$细胞，这种细胞能表达 H-2K^{k}抗原，但缺乏 TK 活性，通过测定转染细胞 TK 活性发现，pH 敏感性免疫脂质体转染 DNA 效率是 pH 不敏感脂质体的 8 倍多，当不含特异性抗体时其转染效率降低了 6 倍，pH 敏感性免疫脂质体的长期转染效率是磷酸钙盐法的 16 倍[11]。某些肿瘤部位的温度高于正常体温，由此可制备温度敏感性靶向脂质体，用靶向脂质体可把目的基因运到各种组织细胞。

4.2 使用特殊性能脂质体避免被网状内皮系统破坏 多数脂质体进入体内后，容易被网状内皮系统(RES)摄取，因此可设计一些具有特殊性能避开网状内皮细胞的脂质体，称为"隐秘脂质体"(Stealth liposomes)。聚

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

乙二醇被连接在脂质体的表面，模仿血红细胞，脂质体得到保护而不再被巨噬细胞吞噬，这样脂质体可在体内保留更长时间(半衰期可达 2d)，此外，还可用单神经节苷脂(GM1)或胆固醇。

4.3 DNA 与保护性蛋白结合以减少核酸酶降解

DNA 被转入细胞后，很容易被细胞内的核酸酶降解，如果在转染之前，把 DNA 与某些蛋白结合，既能增加脂质体与细胞的结合能力，又能使 DNA 免受核酸酶的降解，DNA 与流感病毒 HA-2 N末端融合性多肽组成复合物，经脂质体转染了几个细胞株，其优点是多肽能与细胞接触，DNA 多肽复合物类似人造病毒而抵抗核酸酶降解[12]。Jay 在制备脂质体时，DNA 中加入了溶菌酶使 DNA 对核酸酶的抵抗力增加了 100 倍；高迁移性组蛋白(HMG)能够与具转录活性的染色体结合，当它引入到脑磷脂脂质体时，其转染大肠杆菌半乳糖苷酶基因的能力增加了 3 倍[13]。

总之，脂质体介导的基因转移，不仅在体外转染培养细胞有效率高、无毒性、无污染的优点，更重要的是脂质体可做为基因载体将目的基因导入体内某一特定组织，已经在一些先天性疾病及肿瘤的基因治疗方面显示出优越性，新的研究技术及应用也不断出现[14]，90 年代出现的核酸疫苗有较大的应用潜力，而有效的免疫途径和长效的基因表达至关重要，已经有人尝试将阳离子脂质体作为核酸疫苗载体并取得了进展[15]。通过改变脂质体的组成和结构可以制成各种特殊性能的脂质体，将来也可能将目的基因引入某一指定染色体的特殊部位，并进行新基因的诱导整合和转录。

参 考 文 献

[1] Banghan A D, Standish M M, Wathins J C *et al.* J Mol Biol, 1965, **13**:238～252.

[2] Robert JT, Chester S F, Samuel K *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1979, **76**(7):3348～3352.

[3] Felgner P L, Gadek T R, Holm M *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1987, **84**(11):7413～7417.

[4] LeventisR, SilviusJR. Biochem Biophy Acta, 1990, **1023**:124～132.

[5] Gao X, Huang L. Biochem Biophy Res Commun, 1991, **178**(1):280～285.

[6] Farhood H, Sonbing N, Huang L *et al.* Biochem Biophy Acta, 1995, **1235**(2):289～295.

[7] Baeza I, Ibamez M, Santiago J. J Mol Evd, 1990, **31**:453～461.

[8] Keren-Zur, Beigel M, Loyter A *et al.* Biochem Biophy Acta, 1989, **938**:253～258.

[9] Pinnadunege P, Schmitt L, Huang L. Biochem Biophy Acta, 1989, **985**:33～37.

[10] Xu Y, Francis C, SzokaJ. Biochemistry, 1996, **35**(18):5616～5623.

[11] Wynshaw B, Lugo T G, Short J M *et al.* J Biol Chem, 1984, **259**:12161～12169.

[12] Bugelsk P, Gennaro D F, Poster G *et al.* J Histochem Cytochem, 1989, **37**:843～851.

[13] Kato K, Nakanishi M, Kanada Y *et al.* J Biol Chem, 1991, **266**:3361～3364.

[14] Templeton N S, Lasic D, Frederik P *et al.* Natural Biotech, 1997, **15**(7):647～652.

[15] Linda S K, Gao I, Christina B *et al.* Vaccine, 1997, **15**(8):818～820.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn