

融原型病毒脂质体载体与阻塞性血管疾病的基因治疗

董为人 秦清和 李福山 综述 李、进 审校

(第一军医大学细胞生物学研究室, 广州 510515)

摘要 为改善脂质体作为基因治疗的工具所介导的 DNA 转移效率, 基于病毒细胞融合原理, 研制了融原型病毒脂质体载体日本血凝病毒融合蛋白与包囊寡脱氧核苷酸或质粒 DNA 的脂质体组成的复合物。该脂质体与质膜的融合将 DNA 直接导入胞浆。将一种 DNA 结合核蛋白渗入该脂质体可增强质粒转基因的表达。可将长达 100 kb 的完整基因导入体内细胞。目前已成功地用于血管增殖性疾病细胞静止基因治疗模型中。类似的策略可望用于静脉移植体遗传工程以及免疫介导的小鼠肾小球疾病模型的治疗。

关键词 脂质体; 基因转移; 基因治疗; 阻塞性血管疾病

1 载体构建

1.1 融原型病毒脂质体的构建

虽然有限的人类基因治疗临床试验已经开始, 但其临床效果尚不明显, 可能与 DNA 输送系统的不完善有关^[1]。改善用于基因治疗的病毒和非病毒载体系统成为研究的热点。已有新型病毒载体(如假型逆转录病毒载体^[2]、低抗原性腺病毒载体^[3]及腺相关病毒载体)研制成功的报道, 慢病毒载体用于转导非分裂细胞已见效果^[4]。同样, 旨在提高转染效率的新型脂质结构亦

在研究中^[5]。其它在研究中的新型输送系统有基于脂聚氨的基因输送^[6]、靶向基因输送系统^[7]以及颗粒轰击装置^[8]。

Dzau 等^[9]则致力于融原型病毒脂质体 (fusigenic viral liposome vector, FVLV) 的研制。FVLV 为结合病毒和非病毒技术研制出的杂合子载体^[9~13]。日本血凝病毒 (Hemagglutinating virus of Japan, HVJ, or Sendai Virus) 为一粘附病毒, 其包膜含两种不同的糖蛋白(凝血神经氨酸和融合蛋白), 参与细胞融合。该病毒在中性 pH 条件下可与细胞膜融合。因此, 这种融合特性可用于使 DNA 易于直接导入胞浆, 避免溶酶体的降解。凝血神经氨酸为病毒颗粒结合于含唾液酸糖蛋白或唾液酸酯的受体所必需, 使融合蛋白与细胞膜的脂质双层相互作用, 从而诱导细胞融合。融合蛋白产生时为无活性型, 经蛋白酶水解后可诱导细胞融合。由于 DNA 可高效包裹入脂质体, Dzau 等^[9]将 HVJ 包膜蛋白掺入到这些脂质体内。他们首先经磷脂酰胆碱和胆固醇经涡旋 (vortexing) 或反相脱水等过程制备脂质体, 将 DNA 包裹入脂质体, DNA 掺入脂质体的俘获率为 10%~30%, 使得 50 万个以上的 20 mer 寡核苷酸拷贝被包进一个脂质体。之后, 他们将这些脂质体与紫外线灭活的 HVJ 融合形成直径为 400~500 nm、含 DNA 的

FVLV。HVJ-脂质体可与质膜融合,37℃下需 10~30 min 完成。这种短时间的 HVJ-脂质体孵育尤其适于体内基因治疗。相比之下,阳离子脂质体基因转移通常需要 5~20 h。实际上,他们已经证明将大鼠颈动脉暴露于 HVJ-脂质体(含异硫氰酸荧光素标记的寡脱氧核苷酸)仅 10 min,血管壁内便有 30%~50%的细胞摄取荧光物质。HVJ-脂质体的其它优点为直接将分子导入胞浆,避免内吞体和溶酶体的降解。事实上,用 HVJ-脂质体将异硫氰酸荧光素标记的寡脱氧核苷酸导入血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)中,5 min 内便在细胞核中检测到荧光,至少持续 24 h^[14]。相比之下,不用 HVJ-脂质体而直接将异硫氰酸荧光素标记的寡脱氧核苷酸转移入 VSMC,则仅在胞浆中可见荧光,24 h 后不再检出荧光。

目前的基因转移方法受限于转基因的低水平表达,若将核蛋白 HMG-1(high mobility group-1)与质粒 DNA 一并导入可增强转基因的表达^[15,16]。HMG-1 蛋白为一非组蛋白性 DNA 结合蛋白,分子量为 28 kD,为 DNA 构象和功能所必需^[17]。抗血管紧张素转化酶基因的反义寡脱氧核苷酸(oligodeoxynucleotide, 反义 ODN)-RNase H 共导入损伤的大鼠颈动脉后,反义 ODN 的效应在加入 RNase H 后提高 3 倍。可见,HVJ-脂质体可在多种组织中用于体内 DNA 转移。

1.2 融原型病毒脂质体的优点

1.2.1 高效转染 ODN、质粒 DNA 和蛋白质

日本血凝病毒脂质体包裹的 DNA 可长达 100 kb。已成功地含胸腺嘧啶激酶基因的 45 kb 粘粒 DNA 转入培养的小鼠细胞^[18]。最近,用 HVJ-1 脂质体将人杜氏肌营养不良基因 cDNA 全长导入体内后,在 mdx 小鼠骨骼肌和膈肌上检测到基因表达^[19]。用 HVJ-1 脂质体将碱性纤维母细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)的反义 ODN 转染入 VSMC 并与阳离子脂转染或直接 ODN 转移比较的结果表明,降低 VSMC DNA 合成率的 75%所需上述 ODN 的浓度分别为 0.1 μmol/L, 10 μmol/L 和 20 μmol/L^[9]。可见 HVJ-1 脂质体为 ODN 和质粒 DNA 转移的有效方法。用 HVJ-1 脂质体亦可将核酶(ribozyme)有效地导入细胞,该载体亦可用于导入重组蛋白 IgG 和 IgM^[19]。

1.2.2 载体向在体组织的穿透能力

将未损伤的兔颈动脉腔内充满含转基因的 HVJ-脂质体 10 min,中膜细胞中便有转移基因的表达^[9]。与腺病毒相比,该载体可稳定地穿过内膜层到达中膜。与含 Evans 兰染料的脂质体(而非 HVJ)孵育观察到中膜间隙染色,提示这种穿透能力主要由脂质体提供。之后的细胞融合和

细胞内 DNA 输送则由 HVJ 融合蛋白介导。Dzau 等^[9]构建的脂质体除磷脂酰胆碱和胆固醇外,尚含阴离子磷脂酰丝氨酸。阴离子的存在可能在增强血管壁穿透性方面起重要作用。他们目前正在改变脂质体的构成并试验其对组织穿透能力的影响。阴离子脂质体一般在体内培养细胞中的转移效率不高,但是,这种逆反现象可能为体内基因转移的真相。最近,他们研制了阴离子 HVJ-脂质体,并与阳离子 HVJ-脂质体和阴离子脂转染胺(GIBCO/BRL 公司)的体内外基因转移效率进行了比较。在体外实验中,阳离子 HVJ-脂质体和脂转染胺较阴离子 HVJ-脂质体的效率高得多,而阴离子 HVJ-脂质体在体内肝和骨骼肌中的转染效率最高^[9]。

1.2.3 无明显毒性和低的抗原性

体外应用 HVJ-脂质体没有观察到显著的细胞损伤,体内应用亦未检测到靶器官的功能异常。给 8 周龄小鼠门静脉注射 $10^{10} \sim 10^{11}$ HVJ-脂质体颗粒未见任何可检测的毒性^[20],但是在临床应用 HVJ-脂质体之前必须更慎重地分析 HVJ 蛋白、病毒颗粒和脂质体在体内的代谢命运。另外,必须仔细证实紫外光对 HVJ 灭活的彻底性。

他们还检测了 HVJ-脂质体的在体抗原性大鼠门静脉注射 HVJ-脂质体 1 周后检出低滴度的 HVJ 抗体,注射空 HVJ-脂质体后 7 天再注射含标记基因的 HVJ-脂质体,与一次性 HVJ-脂质体基因转染相比,标记基因的表达不衰竭。显然,关于 HVJ-脂质体复合物的免疫原性及在体重复注射的效应的研究尚需更多的工作。

1.2.4 现行载体系统的改善

目前的 HVJ-脂质体系统的一个主要缺陷是基因表达的暂时性。最近,Dzau 等^[9]用 EB 病毒的自我复制装置成功地获得了在体基因的长期表达。源于 EB 病毒的 Ori P 序列和 EBNA-1 编码区的质粒已构建出来,由鸡 β-肌动蛋白启动子控制的荧光素酶基因被克隆入该载体。荧光素酶基因在培养的人细胞(Hela 和 KEK293)中的表达在 HVJ-脂质体与该载体转染后随细胞分裂而增加。Southern blot 分析这些细胞中的附加 DNA 证明,转基因在核内自我复制。但是该质粒不能在啮齿动物细胞中自动复制,但却滞留在核内。当该 EB 病毒复制载体被用 HVJ-脂质体导入大鼠肝脏时,荧光素酶基因在 4 周以上可检测到,虽然其水平渐减。为增强组织特异性表达,包裹入 HVJ-脂质体转基因由细胞类型特异性启动子启动。Dzau 等^[9]已成功地将小鼠清蛋白启动子或大鼠丙酮酸激酶启动子在肝脏获得了基因表达,且内皮素启动子亦允许内皮细胞特异性转基因的在体表达。

2 融原型病毒脂质体基因治疗在阻塞性血管疾病中的应用

2.1 血管增殖性疾病(再狭窄)

2.1.1 反义策略 球囊血管成形术为冠状动脉狭窄的主要疗法之一。但是,血管成形术后约30%~40%的病人发生再狭窄。再狭窄的一个主要成分便是新内膜过度增生,其特征主要为VSMC的异常增殖和迁移。多种生长因子参与了VSMC增殖。细胞周期运行至细胞分裂最终由细胞周期调节基因调控。因而拟定了通过抑制细胞周期调节蛋白的表达而抑制在体VSMC的异常增殖的策略。Morishita等^[21]报道,联合应用增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)和cdc2(细胞分裂周期2)激酶的反义ODN可抑制血清刺激的在体VSMC的增殖。同样,联合cdc2激酶和Cyclin B1以及cdc2激酶和CDK2(Cyclin依赖性激酶2)的反义ODN可完全抑制血清刺激的DNA合成。由于新内膜的形成始于中膜VSMC急性期的复制,Dzau等^[9]通过HVJ-脂质体将PCNA和cdc2激酶的反义ODN转染入球囊损伤的在体大鼠颈动脉。结果表明,反义ODN转移后2周新内膜形成被完全抑制;一次转染后的抑制效率持续达8周。但是,转染含对照、正义ODN后无抑制效应。在该血管增殖疾病的实验模型中,联合应用cdc2激酶和Cyclin B1以及cdc2激酶和CDK2的反义ODN亦引起新内膜过度增生的抑制。

2.1.2 转录因子“诱饵”策略 PCNA、cdc2激酶和*c-myc*、*c-myb*原癌基因的转录均被公共的转录因子E2F激活。在静止的VSMC,E2F与pRb(视网膜母细胞瘤蛋白)构成复合物。在生长因子刺激下,pRb磷酸化,E2F从复合物中释放,之后与上述细胞周期基因的启动子区域结合,激活其转录。已弄清E2F结合位点的共有序列为TTTCGCGC。因而抑制细胞增殖的策略便是细胞内输送含TTTCGCGC序列的双链ODN作为一个“诱饵”,以俘获被释放的E2F^[22]。Dzau等^[9]已合成了含该共有序列的14-mer和30-mer的双链ODN,用竞争性凝胶移位分析证明,两者均能有效地俘获E2F。用HVJ-脂质体作载体将E2F“诱饵”ODN导入培养的VSMC可完全抑制血清刺激的VSMC的增殖,并伴有PCNA和cdc2激酶水平的降低。而错配“诱饵”无抑制效应。

基于这些体外研究,他们又测试了E2F“诱饵”防治新内膜过度增生的在体效应。应用HVJ-脂质体将E2F“诱饵”转导入球囊损伤的大鼠颈动脉,结果表明,球囊损伤后2周新内膜形成显著抑制,而错配、乱配或

孕酮反应元件的“诱饵”对新内膜形成无效。有趣的是,单次应用E2F“诱饵”产生的新内膜形成抑制效应持续长达8周。

2.1.3 基因转移研究 应用HVJ-脂质体通过质粒DNA基因转移可抑制新内膜形成^[23]。一些研究证实一氧化氮(nitric oxide, NO)可抑制新内膜形成^[24]。如NO抑制离体VSMC的增殖和迁移。全身应用NO合成酶(NO synthetase, NOS)抑制剂可加快动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)病变形成,损伤血管反应性。推测,内皮细胞NOS的过度表达可能为一有效的基因治疗策略。他们用含内皮细胞NOS基因的表达载体转染球囊损伤的大鼠颈动脉。HVJ-脂质体介导的内皮细胞NOS基因转移后4天,检测到内皮细胞NOS蛋白的高水平表达,相应地,损伤动脉的NO产生亦增加。内皮细胞NOS基因转移2周后,组织学分析显示,与未转染的损伤动脉相比,实验侧动脉内膜面积减少70%,而空载体转染组受损动脉的内膜面积与未转染组类似。由于NO对血管壁具有多种效应(包括血管舒张、抑制血小板聚集、阻止白细胞粘附以及抑制VSMC的增殖和迁移),因此,旨在增加NO产生的基因治疗策略可能为再狭窄治疗的有效的、切实可行的途径。

再狭窄治疗的另一个重要方面是受损动脉的再内皮化。虽然已知一些因子可刺激内皮细胞生长,但最近发现肝细胞生长因子(hepatic growth factor, HGF)较其它如血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial cell growth factor, VEGGF)或bFGF有更强的内皮化促进作用。另外,与bFGF不同,HGF并不刺激VSMC增殖。因此,Dzau等^[9]提出通过反义、诱饵或NOS基因转移以抑制VSMC增殖及联合HGF基因转移以刺激内皮细胞增殖的防治再狭窄基因治疗新策略。

2.2 遗传工程化静脉移植物抗动脉粥样硬化形成

大隐静脉移植物为临床治疗阻塞性血管疾病最常用的搭桥材料。但是,10年内约50%以上的静脉移植物失败,主要归咎于加速移植物动脉粥样硬化。当移植入动脉后,由于腔内压增高,移植静脉出现适应性管壁增厚和新内膜过度增生,后者继而形成As疾病,最终导致移植失败。Mann等^[25]设计了一细胞静止策略以阻止对急性移植损伤的过度增生反应,移植物血管不进行新内膜过度增生而向中膜肥厚发展。游离大鼠颈静脉,用PCNA和cdc2激酶的反义ODN经HVJ-脂质体转染后将其植入颈动脉。经反义ODN处理的静脉移植物的新内膜形成受到抑制的时间长达10周,同时中膜肥厚。当高胆固醇饲喂时,未处理组和正义ODN处理组静脉出现As变化,如斑块形成和巨噬细胞浸润;

而反义 ODN 处理的静脉移植体既无斑块形成,又无明显的巨噬细胞浸润。这为遗传工程生物假体的研制提供了可能性,以抵抗或较好适宜于阻塞性血管疾病的长期治疗^[26]。

2.3 肾小球硬化治疗

Dzau 等^[9]尚用 E2F“诱饵”寡核苷酸以减轻肾小球系膜增生性肾炎动物模型中的病理改变。注射抗 Thy-1 抗体以损伤肾小球系膜细胞,引起增生性肾小球病变,之后于肾动脉内灌注 HVJ-脂质体复合物(含 14-mer E2F 双链“诱饵”ODN)。BrdUrd 掺入和总肾小球细胞计数的结果表明,该法抑制抗 Thy-1 诱导的系膜细胞增生。另外,该“诱饵”疗法尚可阻止肾小球内的组织学变化(类似 IgA 肾病和某些类型的局部肾小球硬化)。

3 未来的研究方向

融原型病毒脂质体似乎为基因转移和基因治疗的有效工具。目前应用的为 HVJ-脂质体复合物,其它病毒融合蛋白亦可能成功地用于构建新型载体。另外,在构建融原型脂质体复合物的过程中,应用纯化的或重组的融合多肽而非病毒的全包膜成为新型载体构建的新方向。由于该系统为病毒和非病毒载体的杂合体,必须考虑其安全性。有必要检测紫外线灭活的 HVJ 自身的安全性、脂质体的安全性和 HVJ-脂质体复合物的免疫原性。HVJ-脂质体可能为短期和局部基因治疗的有用工具。该系统的改进将有希望为临床基因治疗提供安全稳定的基因表达输送方法。

致谢 本校微机室张杰民、吴婉波和李玉民教授为本文查新检索,肖锐进行文字处理。

参考文献

- 1 Marshall E. Gene therapy's growing pain. *Science*, 1995, **269**: 1 050~055.
- 2 Hopkins N. High titers of retrovirus pseudotypes, at last. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**: 8 759~760.
- 3 Yang Y, Nunes FA, Berencsi K, et al. Cellular immunity to viral antigen limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**: 4 407~411.
- 4 Naldini L, Blomer U, Gallay P, et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by lentiviral vector. *Science*, 1996, **272**: 263~267.
- 5 Yonemitsu Y, Kaneda Y, Muraishi A, et al. HVJ-cationic liposomes; a novel and potentially effective liposome-mediated technique for gene transfer to the airway epithelium. *Gene Ther*, 1997, **4**(7): 631~638.
- 6 Remy JS, Kickler A, Mordvinov V, et al. Targeted gene transfer into hepatoma cells with lipopolyamine-condensed DNA particles presenting galactase ligands; a stage towards artificial viruses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**: 1 744~748.
- 7 Wagner E, Plank C, Zatloukal K, et al. Coupling of adenovirus to transferrin-polylysine/DNA complexes greatly enhances receptor-mediated gene delivery and expression of transfected genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**: 6 099~102.
- 8 Cheng L, Ziegelhoffer PR, Yang NS. In vivo promoter activity and transgene expression in mammalian somatic tissues evaluated by using particle bombardment. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**: 4 455~459.
- 9 Dzau VJ, Mann MJ, Morishita R, et al. Fusigenic viral liposome for gene therapy in cardiovascular diseases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**: 1 421~425.
- 10 Mann MJ, Morishita R, Gibbons GH, et al. DNA transfer into vascular smooth muscle using fusigenic Sendai virus(HVJ)-liposomes. *Mol Cell Biol*, 1997, **17**: 3~12.
- 11 Suzuki J, Isobe M, Morishita R, et al. Prevention of graft coronary arteriosclerosis by antisense cdc2 kinase oligonucleotide. *Nat Med*, 1997, **3**: 900~903.
- 12 Tomita N, Morishita R, Higaki J, et al. In vivo gene transfer of insulin gene into neonatal rats by the HVJ-liposome method resulted in sustained transgene expression. *Gene Ther*, 1996, **3** (6): 477~482.
- 13 Morishita R, Higaki J, Aoki M, et al. Novel strategy of gene therapy in cardiovascular disease with HVJ-liposome method. *Contrib Nephrol*, 1996, **118**: 254~264.
- 14 Kaneda Y, Morishita R, Tomita N. Increased expression of DNA cointroduced with nuclear protein in adult rat liver. *J Mol Med*, 1995, **73**: 289~297.
- 15 Kaneda Y, Iwai K, Uchida T. Increased expression of DNA cointroduced with nuclear protein in adult rat liver. *Science*, 1989, **243**: 375~378.
- 16 Kaneda Y, Iwai K, Uchida T. Introduction and expression of the human insulin gene in adult rat liver. *J Biol Chem*, 1989, **264**: 12 126~129.
- 17 Lilley DM. DNA-protein interactions. HMG has DNA wrapped up. *Nature*, 1992, **357**: 282~283.
- 18 Kaneda Y, Uchida T, Kim J, et al. The improved efficient method for introducing macromolecules into cells using HVJ-liposomes with gangliosides. *Exp Cell Res*, 1987, **173**: 56~69.

- 19 Yanagihara I, Inui K, Dickson G, et al. Expression of fulllength human dystrophin cDNA in mdx mouse muscle by HVJ-liposome injection. *Gene Ther*, 1996, **3**: 3 549~553.
- 20 Yonemitsu Y, Kaneda Y, Morishita R, et al. Characterization of in vivo gene transfer into the arterial wall mediated by the Sendai virus liposomes; an effective tool for the in vivo study of arterial diseases. *Lab Invest*, 1996, **75**(3): 313~323.
- 21 Morishita R, Gibbons GH, Ellison KE, et al. Single intraluminal delivery of antisense cdc2 kinase and PCNA oligonucleotides results in chronic inhibition of neointimal hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**: 8 474~478.
- 22 Morishita R, Gibbons GH, Ellison KE, et al. Evidence for direct local effect of angiotensin in vascular hypertrophy. In vivo gene transfer of ACE. *J Clin Invest*, 1994, **90**: 1 458~464.
- 23 Morishita R, Gibbons GH, Horiuchi M, et al. A gene therapy strategy using a transcription factor decoy of the E2F binding site inhibits smooth muscle proliferation in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**: 5 855~859.
- 24 Von der Leyen H, Gibbons GH, Morishita R, et al. Gene therapy inhibiting neointimal vascular lesion; in vivo transfer of endothelial cell nitric oxide synthetase gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**: 1 137~141.
- 25 Mann M, Gibbons GH, Kernoff RS, et al. Genetic engineering of vein grafts resistant to atherosclerosis. *Proc Natel Acad Sci USA*, 1995, **92**: 4 502~506.
- 26 董为人,李进. 反义寡核苷酸防治静脉移植阻塞. 第一军医大学学报, 1996, **16**: 351~353.
(1997-06-05 收到, 1998-01-25 修回)