

- [2] Trump BJ, et al., 1995, *FASEB J*, **9**:219.
- [3] McConkey DJ, et al., 1989, *J Immunol*, **143**:4801.
- [4] Jiang S, et al., 1994, *Exp Cell Res*, **212**:84.
- [5] Piacentini M, et al., 1991, *Cell Tissue Res*, **263**:227.
- [6] Cohen JJ, 1993, *Immunol Today*, **14**:126.
- [7] Whyte MKB, et al., 1993, *J Clin Invest*, **92**:446.
- [8] Fesus L, et al., 1991, *Eur J Cell Biol*, **56**:170.
- [9] Nagy P, et al., 1995, *Immunol Lett*, **44**:91.
- [10] Kluck RM, et al., 1994, *Biochim Biophys Acta*, **1223**:247.
- [11] Kroemer G, et al., 1994, *Immunol Today*, **15**:235.
- [12] Gomez J, et al., 1994, *Exp Cell Res*, **213**:178.
- [13] Jacobson MD, et al., 1994, *Biochem Soc Trans*, **22**:600.
- [14] Ni R, et al., 1994, *Exp Cell Res*, **215**:332.
- [15] Leszczynsky D, et al., 1994, *Am J Pathol*, **145**:1265.
- [16] Pongracz J, et al., 1994, *Biochem Soc Trans*, **22**:593.
- [17] Walker PR, et al., 1993, *Exp Cell Res*, **207**:142.
- [18] Martin SJ, et al., 1990, *Cell Tissue Kinet*, **23**:545.
- [19] Kerr JFR, et al., 1994, *Cancer*, **73**:2013.
- [20] Squier MKT, et al., 1995, *J Leuko Biol*, **57**:2.
- [21] Cotter TG, et al., 1992, *Cancer Res*, **52**:997.
- [22] Kolesnick R, et al., 1994, *Cell*, **77**:325.
- [23] Obeid LM, et al., 1993, *Science*, **259**:1769.
- [24] Jarvis WD, et al., 1994, *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**:73.
- [25] Otani H, et al., 1993, *J Biol Chem*, **25**:2273.
- [26] Song Q, et al., 1993, *Biochem Biophys Res Commun*, **190**:47.
- [27] Schranfstatte I, et al., 1988, *J Clin Invest*, **82**:1040.
- [28] Buttke TM, et al., 1994, *Immunol Today*, **15**:7.
- [29] Sandstrom PA, et al., 1994, *J Biol Chem*, **269**:798.
- [30] Sarih M, et al., 1993, *Biochem Biophys Res Commun*, **191**:503.
- [31] Genaro AM, et al., 1995, *J Clin Invest*, **95**:1884.
- [32] Jacobson MD, et al., 1995, *Nature*, **374**:814.
- [33] Meikrantz W, et al., 1994, *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**:3754.
- [34] Monti D, et al., 1992, *Am J Clin Nutr*, **55**:1208S.
- [35] Deckers CLP, et al., 1993, *Exp Cell Res*, **208**:362.

血清因素对阳离子脂质体转染的影响及其对策

王 旻 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)

尽管许多由合成脂构成的阳离子脂质体传递系统已被成功地应用于体外转染和体内基因治疗,但在介导寡核苷酸(ODNs)以及质粒转染真核细胞时尚有它们的局限:由于它们的转染效率是受血清的影响,因此只有在无血清的条件下才可获得最佳的转染效果,这显然不利于体内(in vivo)应用,运用于临床治疗的前景不大。

大多数阳离子脂质体介导转染细胞,至少在最初几个小时的阶段需要在无血清的情况下进行,然而无血清却对转染的细胞是不利的。在

有血清条件下,转染操作对细胞生长、功能、活力的影响可减至最小,并且:1). 转染的操作变得简便;2). 介质需求的减少将降低实验的成本;3). 避免可能产生的细胞功能及其原有生存习性的改变。研究发现,在一定条件下,阳离子脂质体也可在有血清存在的环境中得到较高水平的表达。

一、血清因素影响转染的机制

阳离子脂质体在血清环境下转染活性降低

的原因,有四种解释:1. 血清中的高密度载脂蛋白(HDL)与脂质体相互作用会导致脂肪酸链运动的自由度降低、双分子层堆积特性改变、脂质成分被转移到载脂蛋白上,使脂质体膜的通透性增加,脂质体结构不稳定、分解最终破裂失活。血清白蛋白、 α -和 β -珠蛋白、抗磷脂抗体和可溶性脂交换蛋白同样也可引起脂质体膜的不稳定^[1]。2. 脂质体与一些能促进巨噬细胞吞噬的被称为“调理素”的血浆蛋白结合而被清除,或者通过直接与细胞表面融合,最终被肝或脾的网状内皮细胞所吞噬^[2]。实验表明补体成分、免疫球蛋白和纤维粘连蛋白可以作为调理素来增强脂质体的被吞噬,而 β 2-糖蛋白 I 是体内廓清(clearance)脂质体的一种重要蛋白^[3]。3. 阳离子脂质体-DNA 复合物介导基因传递对于血清蛋白的敏感性还可能是由于复合物中的 DNA 被血清中的核酸酶所降解,DNA 与某些阳离子脂质体只是形成复合物,不能完全阻断 DNA 被核酸酶的降解^[4]。4. 脂质体被网状内皮细胞系统从血液中清除的速率是由其表面特性所决定的,这些特征能被网状内皮细胞系统的吞噬细胞上的受体所识别。脂质体表面特性同时可决定脂质体与巨噬细胞上受体的亲和力,对这类受体有高亲和力的脂质体易于被从血液中排除^[5]。

近年来一些实验室曾尝试用各种方式来得到半衰期长并能靶向到非网状内皮细胞组织的阳离子脂质体,实验表明,通过改进脂质成分、脂质颗粒大小、表面电荷分布等途径是能够获得体内高效、稳定的转染表达活力的。在含血清条件下,转染步骤、细胞密度以及脂质体和 DNA 浓度的不同都可导致转染表达活力的差异。

通过视觉检测和细胞染色鉴定都证实在无血清的条件下,一定浓度的转染试剂会对细胞产生毒性,而在 10%—50% 的血清存在的条件下,各种转染试剂对细胞的毒性明显减缓了。无血清条件下,LipofectAmine 在高浓度时(20 μ g/ml),会对 90% 的细胞产生毒性,Lipo-

fectin 和 GS 2888 只对 20%—30% 的细胞有毒性^[6],而在同等浓度下,目前唯一由天然阳离子脂质合成的硬脂胺(SA)脂质体的毒性仅是 Lipofectin 的四分之一^[7]。一般说来,脂质体-DNA 复合物的形成应在无血清条件下进行,形成过程中若有血清存在将会降低转染的表达活力,这可能是由于复合物同带负电荷和血清蛋白结合,电荷被中和的缘故。脂质体-DNA 复合物一旦形成,影响就不那么显著。

二、消除血清影响的对策

1. 改进 DNA 和脂质体的比率

在血清存在的条件下,这时 DNA-脂质体复合物的活力会减少很多,可能是由于复合物同带负电荷的血清蛋白结合,电荷被中和的缘故^[8]。例如:Watanabe 用 Lipfectin 在含血清条件下介导 pCH110 质粒转染原代培养的小鼠肝细胞表达的效率比在无血清条件下转染的低。在无血清条件下转染 6 小时表达效率达到峰值,并可维持 48 小时,而有血清情况则不同,表达效率在转染 8 小时后逐渐减少到对照水平^[9]。Farhood 用四种阳离子的胆固醇衍生物分别与 DOPE 合成的阳离子脂质体介导质粒 pUCSV2CAT 转染 L929 细胞,结果 5% 的小牛血清即可抑制表达活力达 85%,而当血清浓度达到 20% 时,在细胞抽提液中就基本测不到 CAT 的表达活力^[8]。对于成功的转染来说,为了能同细胞有效结合并被细胞吸收,复合物的表面应呈网状布满正电荷,因此正确地选择 DNA 和脂质体的比率是很重要的,DNA 和脂质体的比率决定了复合物表面电荷的分布以及复合物颗粒的大小,所有的这些参数可能影响转染实验的结果。一些商品化的阳离子脂质体试剂如 Lipfectin、LipofectACE、LipofectAmine、DC-Chol、DOSPA 等分别介导 pCMV-CAT 和 pCMV β gal 质粒转染 BHK-21 和 CHO-kl 细胞株,对它们 CAT 和 β -gal 基因表达效率的研究表明各种阳离子脂质体的最高转

染效率都是在无血清培养条件下转染获得的,并且血清的存在无一例外地降低转染效率,但通过选择合适的脂质体/DNA的比率,在一定血清浓度下成功地转染了 CV-1、MEL、BHK-21 和 CHO-kl 等细胞株^[10]。

2. 改进阳离子脂质体脂质成分

选用适合的脂质成分也是获得成功转染的关键,Lewis 等由人工合成的阳离子脂质 GS 2888 与 DOPE(2:1m/m)配制成的 GS 2888 阳离子脂质体^[6],它能克服 Lipofectin 试剂介导寡核苷酸(ODNs)以及质粒转染的缺陷,在有血清或无血清的介质中转染许多细胞株都获得了比 Lipofectin 高的表达效率,并可降低试剂用量。在 10%小牛血清(FBS)存在的条件下,现有的大多数阳离子脂质成分或脂质混合物都不能有效地介导 ODNs 传递到细胞内,而 GS 2888 试剂能在 50%的血清浓度下,有效介导 ODNs 进入 CV-1 细胞。在对 COS-7 细胞的转染中,10% FBS 的条件下用 GS 2888 介导质粒 DNA 转染的效率明显高于已商品化的 Lipofectin、LipofectAmine、LipofectAce 和 Transfectam 试剂。GIBCO 公司新近推出的 TfxTM-50 试剂转染 Hep G2 和 COS-7 细胞也可在有血清条件下获得好的表达效率。

3. “稳定型”的阳离子脂质/DNA 复合物形式

传统的阳离子脂质体/DNA 复合物寿命有限,放置 24 小时后再表达就会渐渐失活,再加上血清蛋白对复合物的破坏作用以及人工合成类脂质体对细胞尚有一定毒性等因素均限制了阳离子脂质体的应用。Hofland 用阳离子脂质 DOSPA 与“脂质伴侣”DOPE(二油酰乙醇胺)形成脂质体后增溶于 1% 的辛基葡萄糖苷(octylglucoside)中,再与质粒 DNA 形成复合物,透析方法除去去垢剂后得到“稳定型”阳离子脂质体/DNA 复合物^[4]。它在有血清存在的条件下转染 NIH3T3 细胞,可保持 30% 的表达活力,血清浓度达到 15% 时仍可维持一定的转染效率,而传统的复合物在 2% 血清存在

时基因表达就被抑制了。他们还将有活性的脂质体/DNA 复合物同未复合的游离脂质体分离,从而明显降低了对细胞的毒副作用。由于体内基因表达实验往往需要几周才能获得结果,因此转染试剂自身的稳定性也决定了其在体内基因治疗中的应用价值。

4. “融合基因”的脂质体

Mizuguchi 发明了一种称为“融合基因”的脂质体^[11],是将仙台病毒(副流感病毒,Sendai virus)融合在多片层的脂质体上,形成被囊脂质体,通过与细胞膜的融合将携带基因有效导入细胞内,在 40% 小牛血清条件下尚能维持 70% 的转染活力。阳离子脂质体不存在被囊结构,而融合基因脂质体的被囊膜可有效保护 DNA 不被核酸酶所降解。由于血清中的高浓度唾液酸一般认为是仙台病毒的受体,因此,“融合基因”脂质体达到高饱和浓度才能进行有效基因传递,此时血清中的唾液酸与细胞表面结合融合基因脂质体的受体的竞争才不突出。

5. 天然成分的阳离子脂质体

由于大多数阳离子脂质成分是由人工合成的,有可能被免疫系统识别为“外来物质”;而过分追求延长在体内的半衰期和提高血液中的稳定性,又会使其自然生物降解能力减弱对细胞的潜在毒性增大。SA 脂质体是由天然脂质构成的,它稳定性好、抗降解性强,免疫原性弱^[12]。我们发现 SA 脂质体在血清存在下能维持无血清转染获得的高水平表达。在一系列血清浓度的条件下分别用 SA 脂质体和 Lipofectin 试剂介导 pCH110 质粒转染 10 种不同类型的真核细胞,结果显示 SA 脂质体在血清存在条件下转染的表达效率均优于 Lipofectin 试剂,并且可达到最高转染效率,有广泛的体内应用前景。

6. 其他改进措施

有实验证明增大脂质体直径或含有长的饱和碳氢链或用胆固醇的脂质所形成的脂质体能延长半衰期并能减少脂质体的渗漏,可有效抑制同载脂蛋白的脂交换,降低与血清蛋白的结

合的敏感性^[2]。

三、阳离子脂质体与网状内皮细胞系统的关系

血清能影响鼠肝对脂质体的吸收。以原代培养的 Kupffer 肝细胞作为模型,发现脂质体在血清存在下被网状内皮细胞所清除的速率与脂质体的脂质成分有关^[5]。脂质体含有磷脂酰丝氨酸(PS)、联十六烷基脂质成分或单由磷脂酰胆碱(PC)和胆固醇组成的脂质体会提高被清除率;而含有单唾液酸神经节苷脂(GM₁)或多聚亲水脂分子(乙二醇)脂质成分的脂质体能减缓被清除速率^[13]。

用小鼠肝脏作为模型,证明肝脏对中性和阴离子脂质体的吸收不涉及血清的作用,然而网状内皮细胞系统吞噬阳离子脂质体的速率直接受到脂质体表面特性的影响,并且血清会增强肝脏对阳离子脂质体的吸收。血清蛋白导致脂质体聚集是影响肝吸收的原因之一。许多文献的研究证明,使用长效脂质体(能经受长期血液循环)可以增加基因治疗的功效,但是这类脂质体是如何逃避网状内皮细胞系统吞噬的机制尚不了解。不论是网状内皮细胞系统的巨噬细胞还是原代培养的肝 Kupffer 细胞究竟是如何区分不同脂质体之间仅仅是表面电荷、大小和脂质组分等细微结构上的差别的,目前有两种看法:一种认为依靠调理素的脂质体廓清(clearance)。它认为脂质体暴露在血液中时将被血浆蛋白所覆盖,这个过程将决定脂质体最终被网状内皮细胞系统所识别。具有不同表面特征的脂质体吸附血浆蛋白的数量不等,与这些蛋白作用的脂质体从质和量上都会发生改变,但变化幅度依其表面结构而有差异,这些差异可能是造成脂质体在血液中的清除率和组织中降解效率不同的原因。用原代培养的取自腹膜的巨噬细胞作为模型,表明补体成分、免疫球蛋白和纤维粘连蛋白可以作为调理素来增强脂质体的被吞噬,然而这些物质在高浓度的其它血清蛋白存在的条件下是否还具有相同的活力

就不十分清楚了。另一个看法则强调了脂质体-细胞相互作用的重要性,认为脂质体被网状内皮细胞系统从血液中清除的速率是由脂质体表面特性所决定的,这些特征能被网状内皮细胞系统的巨噬细胞上的受体所识别,并决定了与脂质体的亲和力。对这类受体有高亲和力的脂质体从血液中被排除得更快。

目前,许多体外实验结果主要是在含有小牛血清或无血清的条件下获得的。尽管一些体内(in vivo)的实验结果在体外(in vitro)的模型系统中能被重复,但问题在于,从这些模型系统得到的结果是在特定的、不可能真正模拟体内环境的条件下获得的,例如这些系统不可能提供关于脂质体被网状内皮细胞系统吞噬的数据。脂质体在体内血液中与网状内皮细胞系统的巨噬细胞的作用比在体外相对静止状态下要难得多,再者网状内皮细胞系统的巨噬细胞在细胞培养的状态下失去了某些原有特性。用胶原酶从肝脏分离的 Kupffer 细胞也面临类似问题^[13]。

摘 要

由于大多数阳离子脂质体在血液中的稳定性差,致使它们进一步运用于基因治疗的潜能没能完全发挥出来。本文阐述了血清因素影响阳离子脂质体转染的机制,阳离子脂质体与网状内皮细胞系统的关系以及目前消除血清影响的一些对策和亟待改进之处。

参 考 文 献

- [1] Gao, X. and Huang, L., 1995, *Gene therapy*, 2: 710-722.
- [2] Mercadal, M. et al., 1995, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1235:281-288.
- [3] Chonn, A. et al., 1995, *J. Biol. Chem.*, 43 (270):25845-25849.
- [4] Hofland, H. et al., 1996, *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:7305-7309.
- [5] Liu, D. et al., 1995, *Biochim. Biophys. Acta.*,

- 1240:277-284.
- [6] Lewis, J G. et al., 1996, *Pro. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**:3176-3181.
- [7] Lin, Q S. Yang, J P. and Wang, D., 1995, *Biopolymer and Bioproducts (Structure, Function and Applications)* Published for the Organising Committee, 11th FAOBMB Symposium by Samakkhisan (dokya)Public Comany Limited, 46-53.
- [8] Farhood, H., 1992, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1111**:239-246.
- [9] Watanabe, Y. et al., 1994, *J. Biochem.*, **116**:1220-1226.
- [10] Ciccarone, V. et al., 1994, *Forcs*, **15**(3):80-83.
- [11] Mizuguchi, H. et al., 1996, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **218**:402-407.
- [12] Wang, D. Jing, N H. and Lin, Q S., 1996, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **226**:450-455.
- [13] Liu, F. et al., 1996, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1278**:5-11.

碱性成纤维细胞生长因子(Basic FGF)的结构、功能、释放机理及其与肿瘤发生的关系

王楠 徐永华

(中国科学院上海细胞生物学研究所 上海 200031)

目前,对 FGF 家族中的 bFGF(碱性成纤维细胞生长因子)的研究已日益引起人们的关注。bFGF 在体内功能多样,在细胞的增殖、分化、胚胎的发育以及肿瘤的发生与转移中均起重要的作用。但由于 bFGF 缺乏一段可供分泌于胞外的信号肽序列,使得人们难于理解 bFGF 在体内是如何行使功能的。本文着重介绍 bFGF 的结构、功能、释放机理、及其在肿瘤发生中的作用。

bFGF 的蛋白质结构及其特征

bFGF 最早是从牛垂体中提纯到的一个 146 个氨基酸、分子量为 16.5 KDa、PI 值为 9.6 的蛋白质^[1]。以后人们发现 bFGF 在体内分布广泛,存在于神经组织、骨骼、生殖器官、腺体、白细胞等以及多种肿瘤细胞中。

当人和牛的 bFGFcDNA 被克隆以后,人们发现了一个处于合适位置的起始密码子 AUG,由此可转录出一个 155 个氨基酸的蛋白质^[2]。此外,从三个上游的起始密码子 CUG 也

可以依次转录出三种高分子量的 bFGF 蛋白^[3]。现在已知人的 bFGF 有四种表达形式:18KDa(从 AUG 起始转录)、22KDa、22.5 KDa、24KDa(从 CUG 起始转录)^[4]。其中后三种高分子量蛋白的氨基酸序列除了 N 端有一段长短不一的延伸之外,其余部分与 18KDa 的蛋白相同。这四种形式的 bFGF 分子有脑及许多不同的细胞系中均有表达,可能与不同的亚细胞分布有关。18KDa 的分子主要分布于细胞质中,而高分子量的分子则多分布于细胞核内及核糖体中^[5],这表明 N 端的延伸序列中可能包含一段核定位序列。如果将高分子量 bFGF 的 N 末端接到正常的胞内蛋白上,可使这种融合蛋白定位于核内^[6]。利用定点突变选择性地抑制胞质或核内 bFGF 亚型分子表达的实验表明,这些 bFGF 亚型分子在细胞内的功能是不一样的。胞内的 bFGF 可以增强细胞的迁移、介导 FGF 受体的下行调节以及细胞在软琼脂中的生长。这些效应在 FGF 受体显性失活突变存在的情况下可被抑制。而细胞核内的 bFGF 亚型分子只能介导细胞在软琼脂中以及