

文章编号: 1001-098X(2000)03-0104-03

受体介导的反义治疗研究

张 春

(华西医科大学附一院核医学科,成都 610041)

摘要: 受体介导的反义治疗是利用受体与配体高特异性、高亲和力结合的特点,通过受体介导的内吞作用,将配体与反义寡核苷酸(ASON)形成的转运复合物靶向运送到特定的细胞,使细胞内的 ASON达到足够高的浓度,从而有效发挥反义抑制作用。本文简要综述对受体介导的反义治疗日前常用的受体、转运复合物的形成、内吞过程中需要解决的问题及实验研究进展。

关键词: 受体; 反义治疗; 反义寡核苷酸

中图分类号: R817.5 **文献标识码:** A

反义治疗是指人工合成反义寡核苷酸(ASON)与靶基因的正义链或其 mRNA 互补、特异结合,从而阻断基因的表达。反义治疗的成功不仅要求确定一个合适的靶基因,而且要求建立一个有效的基因转运系统,使 ASON 高效准确地导入特定的靶细胞。目前,常用的基因转运载体包括逆转录病毒载体、腺病毒载体、脂质体载体和分子结合物载体。分子结合物载体中含有细胞或组织特异受体的配体,当载体与转运基因相连形成复合物后,即可通过受体介导的内吞作用将其靶向转运到特定的细胞。由于受体与配体结合具有高特异性、高亲和力的特点,大大提高了 ASON 的转运效率,从而为反义治疗应用于临床提供了光明的前景。

1 常用受体

目前,在利用受体途径进行反义治疗的研究中,常用的受体有去唾液酸酸性糖蛋白受体(ASGP-R)^[1~4]、转铁蛋白受体^[5~7]及叶酸受体^[8~10]。

ASGP-R 是肝细胞特异性受体,在其它组织和细胞不表达,该受体能与末端半乳糖的去唾液酸糖蛋白结合并内化,为 DNA 的肝靶向转运提供了有效的途径,使反义治疗肝脏疾病如肝癌、病毒性肝炎、肝脏代谢性疾病成为可能。转铁蛋白受体在增生的细胞如白血病细胞 HL-60 和 LoVo Dx 细胞高度表达,而许多人类肿瘤如肺癌、乳腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、肾癌、结肠癌和骨髓造血细胞癌均高度表达

叶酸受体,因此可通过转铁蛋白或叶酸受体介导,选择性地将 ASON 导入相应的肿瘤细胞,达到治疗肿瘤的目的。

另外,上皮肿瘤和神经胶质瘤过度表达上皮生长因子受体^[11],上皮生长因子相关受体 erbB2 在乳腺癌和卵巢癌细胞过度表达^[6],肺泡巨噬细胞高度表达甘露糖受体^[12,13],这些受体均被用于介导反义治疗。

2 转运复合物的形成

虽然不同受体所对应的配体不同,但 ASON 与分子结合物载体形成转运复合物的过程基本相同。首先配体与多聚阳离子如多聚赖氨酸共价结合形成载体,由于多聚赖氨酸带正电荷,寡核苷酸(ON)带负电荷,二者通过静电引力相结合,最终形成配体-多聚赖氨酸-ASON 复合物。如果将转运的 ASON 直接与配体共价结合,则可能引起 ASON 结构的改变,阻碍它与靶基因或其 mRNA 结合而影响治疗效果。

3 受体介导的转运复合物的内吞

转运复合物中的配体与受体特异性结合后,可经受体介导的内吞作用进入细胞,Wu 等^[11]将去唾液酸糖蛋白-多聚赖氨酸-质粒 pSV2-CAT 复合物分别与 HepG2 细胞 [ASGP-R(+)] 和 SK-Hep1 细胞 (ASGP-R(-)) 孵育,结果发现 HepG2 细胞具有乙酰基转移酶 (CAT) 活性,而 SK-Hep1 细胞无 CAT 活性,说明外源性 DNA 经受体途径进入细胞并表达。转铁蛋白-多聚赖氨酸-含荧光素酶的细菌质粒 DNA 复合物与鸡成红细胞 HD-3 作用 24h 后,细胞表达荧光素酶,表明转铁蛋白受体介导质粒 DNA

收稿日期: 2000-02-06

作者简介: 张 春 (1973-),女,山西长治人,华西医科大学附属第一医院核医学科住院医师,博士研究生,主要从事反义治疗研究

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39870200)

审校者: 华西医科大学附属第一医院核医学科 谭天秩

进入细胞并表达^[5]。

虽然DNA可通过受体介导途径由内吞体进入细胞,但当内吞体与溶酶体融合后,内化的DNA大部分会被降解,这将大大降低DNA的转导效率。研究发现,腺病毒的衣壳可促进内吞体溶解,使DNA免于降解,因此,在复制缺陷型腺病毒存在的情况下,分子结合物载体转运DNA进入细胞的效率增加,但该法所需腺病毒滴度高达 10^4 /细胞,如此高的滴度会对细胞产生毒性作用,而将腺病毒与载体直接相连,可显著减少腺病毒的用量,同时又保证了较高的转运效率^[14]。但是,腺病毒受体在细胞膜上普遍存在,腺病毒与其受体的结合会削弱载体的靶向特异性,因此可先用抗纤维抗体处理腺病毒,阻断腺病毒与受体的结合,这样既能保留DNA载体复合物与特定细胞结合的特异性,又能阻止溶酶体降解内化的DNA,从而达到提高DNA转运效率的目的。

4 受体介导的反义治疗实验研究

目前,受体介导的反义研究还处于体外实验及动物实验阶段,研究的范围主要涉及病毒性肝炎、肝脏代谢性疾病及肿瘤,实验的结果已预示了广阔的临床应用前景,在此以三种常用受体为例,简要介绍其研究结果

4.1 ASGP-R介导的反义研究

Madon等^[2]通过ASGP-R介导的内吞作用,将靶向乙肝病毒(HBV)基因组衣壳形成位点的ASON导入HBV感染的鸡肝细胞瘤细胞LMN,发现ASON可明显抑制HBV核心蛋白合成,从而抑制HBV复制,而作为对照的游离ASON进入细胞的量则很少,因此受体介导途径为病毒性肝炎的反义治疗提供了有效的方法。

Sugano等^[3,4]将靶向兔胆固醇酯转移蛋白(CETP)mRNA的反义和正义ON分别与去唾液酸蛋白连接后经兔耳静脉注射,发现注射ASON后24-48-96h,血浆的总胆固醇浓度和CETP活性均下降,血浆高密度脂蛋白胆固醇浓度在注射后48h升高;肝细胞的CETP mRNA水平在6-24-48h均减少,而注射正义ON后上述指标均无明显变化;为了进一步探讨CETP在动脉粥样硬化发生中的作用,给予兔子胆固醇饮食8周后静脉注射ASON,结果显示基本同前,同时发现主动脉的胆固醇含量和粥样硬化受累区域显著低于注射正义ON组及对照

组,说明通过ASGP-R途径将ASON靶向导入肝细胞可抑制血浆CETP活性,减少血浆中低密度脂蛋白和极低密度脂蛋白中胆固醇的含量,从而最终抑制动脉粥样硬化的形成,因此可望以此为基础开发一种反义药物来对抗动脉粥样硬化的发生。

4.2 转铁蛋白受体介导的反义研究

HL-60和LoVo Dx细胞高表达转铁蛋白受体和C-myc癌基因,将两种细胞分别暴露于转铁蛋白-多聚赖氨酸-C-myc ASON复合物,可引起迅速而持久的细胞增生抑制和死亡,其作用明显强于游离的C-myc ASON,而正义链无论与载体结合与否对细胞的增生均不产生影响,而且用反义复合物处理过的细胞在48h后几乎检测不到C-myc mRNA,而用正义链处理的细胞C-myc mRNA大量表达^[6,7],说明C-myc ASON能通过受体介导的内吞作用大量进入细胞,与靶mRNA形成稳定的双体而产生持久的生物学作用,这一结果有利于临床上对白病反义治疗的深入研究。

4.3 叶酸受体介导的反义研究

叶酸受体在许多肿瘤细胞高度表达,为肿瘤的反义治疗药物的运送提供了便利途径。人黑色素瘤细胞(M-14)表达叶酸受体,C-myc癌基因对该肿瘤的生长起关键作用,将C-myc ASON复合物通过叶酸受体导入M-14,发现细胞对复合ASON的摄取较游离ASON增强,并且细胞内C-myc蛋白显著减少,引起M-14生长抑制和集落形成能力降低^[9]。Wang等^[10]利用叶酸受体将上皮生长因子受体的ASON导入培养的KB细胞也得到类似的结果,细胞摄取复合ASON较游离ASON增强16倍,在复合ASON作用48h后,90%的KB细胞生长抑制,同时细胞膜上的上皮生长因子受体数目明显减少。上述实验表明,反义治疗药物通过叶酸受体途径可显著抑制肿瘤细胞的生长,从而达到治疗肿瘤的目的。

5 展望

综上所述,受体介导的反义治疗利用受体配体高特异性、高亲和力结合的特点,大大提高了靶细胞摄取ASON的效率,使靶细胞内的ASON达到足够高的浓度,从而有效发挥反义抑制作用。但是,受体介导的反义治疗要广泛应用于临床尚需解决许多理论和实践方面的问题,如在理论上需要明确疾病发生发展过程中基因的异常改变,确定合适的靶基

因,准确选择靶细胞上的特异性受体;实践上要求 ASON 复合物的制备简单、易行,体内外稳定性好,体内的靶向性高,非靶向性摄取低,对人体的毒副作用小等等,这一系列问题的解决尚需进行大量的基础研究和临床研究。

随着肿瘤的反义研究的深入进行,设想可在癌基因的 ASON 链上标记发射 α 、 β 或俄歇电子的放射性核素,通过受体介导靶向到达靶细胞,一方面, ASON 可阻断癌基因的表达,另一方面,放射性核素产生辐射生物效应,杀伤癌细胞,利用二者的联合作用来治疗肿瘤可望达到更满意的疗效。如果这一设想付诸实践,必将为人类肿瘤的治疗谱写新的篇章。

参考文献:

- [1] Wu GY, Wu CH. Receptor-mediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system [J]. *J Biol Chem*, 1987, 262: 4429~ 4432.
- [2] Madon J, Blum HE. Receptor-mediated delivery of hepatitis B virus DNA and antisense oligodeoxynucleotides to avian liver cells [J]. *Hepatology*, 1996, 24: 474~ 481.
- [3] Sugano M, Makino N. Changes in plasma lipoprotein cholesterol level by antisense oligodeoxynucleotides against cholesteryl ester transfer protein in cholesterol-fed rabbits [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271: 19080~ 19083.
- [4] Sugano M, Makino N, Sawada S, et al. Effect of antisense oligodeoxynucleotides against cholesteryl ester transfer protein on the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273: 5033~ 5036.
- [5] Wagner E, Zenke M, Cotton M, et al. Transferrin-

- polycation conjugates as carriers for DNA uptake into cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 3410~ 3414.
- [6] Citro G, Perrotti D, Cucco C, et al. Inhibition of leukemia cell proliferation by receptor-mediated uptake of c-myc antisense oligodeoxynucleotides [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 7031~ 7036.
- [7] Citro G, Ginobbi P, Candiloro A, et al. Chemical modification of ligands for cell receptors to introduce foreign compounds into the cells [J]. *Dis Colon Rectum*, 1994, 37(suppl): s127~ s132.
- [8] Reddy JA, Low PS. Folate-mediated targeting of therapeutic and imaging agents to cancers [J]. *Crit Rev Ther Carrier Syst*, 1998, 15: 587~ 627.
- [9] Ginobbi P, Geiser TA, Ombres D, et al. Folic acid-polylysine carrier improves efficacy of c-myc antisense [J]. *Anticancer Res*, 1997, 17(1A): 29~ 35.
- [10] Wang S, Lee RJ, Cauchon G, et al. Delivery of antisense oligodeoxynucleotides against the human epidermal growth factor receptor into cultured KB cell with liposomes conjugated to folate via polyethylene glycol [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 3318~ 3322.
- [11] Cristiano RJ, Roth JA. Epidermal growth factor mediated DNA delivery into lung cells via the epidermal growth factor receptor [J]. *Cancer Gene Ther*, 1996, 3(1): 4~ 10.
- [12] Liang WW, Shi X, Deshpande D, et al. Oligonucleotide targeting to alveolar macrophages by mannose receptor-mediated endocytosis [J]. *Biophys Acta*, 1996, 1279(2): 227~ 234.
- [13] Rojanasakul Y, Weissman DN, Shi X, et al. Antisense inhibition of silica-induced tumor necrosis factor in alveolar macrophages [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(2): 3910~ 3914.
- [14] Miller N, Vile R. Targeted vectors for gene therapy [J]. *Faseb J*, 1995, 9: 190~ 199.

Receptor-mediated antisense therapy studies

Zhang Chun

(Department of Nuclear Medicine the Affiliated Hospital the West China University of Medical Sciences Sichuan Chengdu 610041, China)

Abstract Receptor can specifically bind its ligand with high affinity. Based on this antisense oligonucleotides (ONs) linked to specific receptor ligand can be targeted to cells which possess specific receptor and enter into these cells by receptor-mediated endocytosis. Adequate intracellular concentrations of antisense ONs can be obtained enough to inhibit target gene expression. Receptors used frequently, formation of ONs delivery complexes, questions required to settle in the process of endocytosis and experiment studies of receptor-mediated antisense therapy are concisely introduced in this article.

Key words receptor; antisense therapy; oligonucleotides