

肝细胞靶向 pH 敏脂质体介导的硫代反义寡核苷酸 对 HCV 5'NCR 基因表达的抑制作用

王小红 王升启* 文思远 管伟 毛秉智

(军事医学科学院放射医学研究所,北京 100850)

摘 要 反义寡核苷酸是一种阴离子大分子物质,细胞生物利用度较低且易被细胞溶酶体酶降解,为了增强反义药物在病变靶细胞内的有效浓度,根据受体介导的内吞作用原理,针对肝细胞专一性表达的去唾液酸糖蛋白受体,设计及制备了一种肝靶向性脂质体,这种脂质体同时具有 pH 敏性。采用竞争抑制实验及鸡红细胞溶血实验分析了其肝细胞靶向性及 pH 敏性;应用肝靶向 pH 敏脂质体作为药物运载工具,介导反义寡核苷酸 HCV363 作用于转基因细胞 HepG2.9706 细胞,通过荧光素酶活性检测,观察了硫代反义寡核苷酸对 HCV 5'NCR 调控功能的抑制活性。结果显示,不同浓度半乳糖溶液对 5% 18-gal 脂质体有一定的抑制作用,浓度超过 20mmol/L 时,达到饱和,最大抑制率为 38%;溶血实验显示脂质体与红细胞膜融合作用有显著的 pH 值依赖性,pH < 6 时,血红素释放量明显增加;肝靶向 pH 敏脂质体介导的 HCV363 对 HepG2.9706 细胞中 HCV 5'NCR 调控基因具有显著的剂量依赖性抑制作用,浓度为 1.0 μ mol/L 时,抑制率达 86%。综上,所制备的脂质体具有一定的肝细胞靶向性及显著的 pH 敏感性,这种脂质体能够增强 HCV 特异性硫代反义寡核苷酸的细胞内抑制活性,这为针对肝炎病毒的反义寡核苷酸的体内活性评价提供了有用的转运体系。

关键词 丙型肝炎病毒(HCV),反义寡核苷酸,pH 敏性,肝靶向性,脂质体,HepG2.9706

中图分类号 Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2001)06-0626-05

硫代反义寡核苷酸是抗病毒药物开发的一个新途径,许多研究^[1-3]报道了反义药物在动物模型、细胞培养及生物化学检测方面对病毒基因的反义抑制作用,一些抗病毒、抗炎症及抗肿瘤的反义寡核苷酸已进入临床试验,治疗艾滋病患者巨细胞病毒引起的视网膜炎的反义药物已进入市场。反义药物显示了广泛的应用前景。但是,硫代反义寡核苷酸是一类多聚阴离子大分子物质,作为药物应用主要有两个问题:①细胞生物利用度低;②易被核酸酶降解。

丙型肝炎病毒(Hepatitis C virus, HCV)是慢性肝病的主要病因,硫代反义寡核苷酸可能为丙型肝炎的治疗提供一个新策略。由于缺乏 HCV 感染细胞与小动物模型,我们建立了 HCV 5' NCR 调控荧光素酶基因的稳定表达细胞模型 HepG2.9706 株^[4],采用该细胞模型,对 HCV 特异性硫代反义寡核苷酸进行了评价,获得了对 HCV 5' NCR 调控荧光素酶基因表达具有剂量依赖性的特异性抑制活性的反义序列

HCV363^[5],为了提高 HCV363 在肝细胞内的有效浓度及防止细胞内核酸酶对其快速降解,我们制备了肝细胞靶向 pH 敏脂质体^[6],这是一种可用于体内的集成了肝靶向性与 pH 敏感性两种特性的阳离子型脂质体。本文采用肝细胞靶向 pH 敏脂质体作为药物运载系统,进一步评价了 HCV363 对 HCV 5' NCR 调控荧光素酶基因表达的抑制活性。

1 材料与方 法

1.1 肝靶向 pH 敏脂质体的制备及性质分析

1.1.1 肝靶向 pH 敏脂质体的制备:成膜材料为 N',N'-二甲基乙二胺氨酰基胆固醇(DC-Chol,由 N',N'-二甲基乙二胺与氯甲酰胆固醇合成)与二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE, Sigma 公司产品),它们具有 pH 敏感特性;导向分子为十八醇-半乳糖甙(18-Gal,由五乙酰基半乳糖与十八醇合成),它是肝细胞表面特异性受体去唾液酸糖蛋白的配体。肝靶向 pH 敏脂

收稿日期:2001-03-12,修回日期:2001-06-12。

基金项目:国家 863 高技术发展与计划项目(102-08-04-01)和军队九·五重点课题(962007)基金资助。

* 通讯作者。Tel:86-10-66932211;Fax:86-10-68214653;E-mail:sqwang@nic.bmi.ac.cn

质体的制备简述如下:分别将 DC-Chol、DOPE 及 18-Gal 溶于乙醇:二氯甲烷(1:3)混合溶剂中,配制成浓度为 10mg/mL 的脂质溶液与 5mg/mL 的导向分子溶液,脂质溶液各取 0.5mL 混合于 10mL 烧瓶中,加入导向分子溶液 0.2mL,在旋转蒸发仪上均匀旋转,并在减压、油浴温度为 40℃ 条件下蒸除有机溶剂,使脂质在容器内形成均匀脂膜,真空干燥过夜,加入无菌磷酸缓冲液 10mL,4℃ 搅拌,水化 12h,在浴式超声仪中超声振荡 20min,得到均匀的胶体溶液,用聚碳酸酯膜反复过滤 3 次,即得肝靶向 pH 敏脂质体^[6]。

1.1.2 脂质体导向性分析:将 HepG2 细胞(高分化的肝癌细胞,其细胞膜上含有去唾液酸糖蛋白受体)接种于 96 孔板,细胞数为 2×10^4 /孔,细胞 80% 融合时,进行肝靶向 pH 敏脂质体介导质粒转染,质粒为 pHCV-neo4,能进行荧光素酶基因表达。同时,用半乳糖溶液进行竞争抑制实验,设葡萄糖溶液为对照。具体操作如下:质粒取 0.1 μ g,质粒与肝靶向 pH 敏脂质体比例为 1:5,分别用 12.5 μ L 无血清的 DMEM 稀释,室温放置 30min,将脂质体与质粒溶液混合,再于室温放置 30min 以形成质粒-脂质体复合物,然后加入无血清的 DMEM 培养基 75 μ L。培养细胞用无血清 DMEM 培养基洗 2 次,每孔细胞加入不同浓度半乳糖溶液或葡萄糖溶液作用 5min 后,再加入总体积为 100 μ L 的质粒-脂质体复合物溶液,作用 5h 后换含 10% 小牛血清的 DMEM 继续培养 24h 后,检测荧光素酶活性。

1.1.3 鸡红细胞溶血实验:为检测 pH 敏性,将脂质体与鸡红细胞在不同 pH 值条件下混合,考察细胞膜溶解(血红素释放)情况。按 1.0pH 值梯度配制 pH4.0 ~ 8.0 的 0.1mol/L PBS 缓冲液。各取 100 μ L PBS 缓冲液,加入 1% (V/V) 新鲜制备的鸡红细胞悬液 100 μ L 和脂质体 20 μ L (10 μ g/ μ L),37℃ 振荡,在 2.5h 时取悬液,1000g 离心,取上清加到 96 孔板内,在酶标仪(Multiscan MS)上测定 A_{540} 值。同时设置平行对照:100 μ L PBS 缓冲液 + 100 μ L 1% (V/V) RBC + 20 μ L 生理盐水;阴性对照:120 μ L 生理盐水 + 100 μ L 1% (V/V) RBC;阳性对照:100 μ L 生理盐水 + 100 μ L 1% (V/V) RBC + 20 μ L 10% Triton X-100。

1.2 硫代反义寡核苷酸的合成

硫代反义寡核苷酸 HCV363 序列为 GAG GTT TAG GAT TCG TGC TCA TG,采用 PE 公司产 391A 型自动 DNA 合成仪合成并在合成时进行硫代修饰。合成完毕浓氨水 55℃ 切割并脱保护 15h 后,经 Micro Pure II 反相纯化柱(Solid Phase Sciences)纯化,紫外

(Beckman DU640)定量后真空(Oligo Prep OP120,SA-VANT)干燥,-20℃ 保存备用。

1.3 转基因细胞模型 HepG2.9706 株

HepG2.9706 细胞株由含 HCV 5'NCR 及部分多聚蛋白起始区序列与荧光素酶基因的融合基因片段的真核表达载体 pHCV-neo4 转染 HepG2 细胞,建立的稳定表达荧光素酶基因的转基因细胞模型,其荧光素酶基因的表达受 HCV 5'NCR 调控^[4]。采用含 10% 胎牛血清(Hyclone 公司产品)及 400 μ g/mL G418(GIBCO)的 DMEM 培养基,在 37℃,5% CO₂ 条件下进行培养及传代。

1.4 硫代反义寡核苷酸的活性评价

以肝细胞靶向性 pH 敏脂质体介导 HCV363 作用于 HepG2.9706 细胞株,通过荧光素酶活性检测,了解硫代反义寡核苷酸对 HCV 5'NCR 调控荧光素酶基因表达的抑制作用。具体操作同上述质粒的转染。每次实验,每一药物浓度均设 3 孔,结果取其平均值。

1.5 荧光素酶活性检测

荧光素酶活性检测采用荧光素酶测定试剂盒并参考其推荐的操作步骤进行。待测细胞用 PBS (pH7.3)洗 2 次,每孔细胞加 1 \times 细胞裂解液 20 μ L,室温下裂解 10min,加荧光素酶作用底物 100 μ L,混匀,立即在多标记检测仪(VICTOR™ Wallac1420 MULTILABEL COUNTER)上测 1 秒钟发光强度。

2 结果

2.1 肝靶向性 pH 敏脂质体的靶向性

为检测制备的脂质体(18-gal 脂质体)介导的细胞吞噬作用含有受体介导的作用,用半乳糖竞争抑制受体,考察其对转染效率有无影响。结果显示半乳糖溶液在 20mmol/L 时对 5% 18-gal 脂质体的转染效率有最强的抑制作用,抑制率达 39.1%。浓度大于 20mmol/L 时,其抑制作用达到饱和(图 1)。用 20mmol/L 的半乳糖溶液和葡萄糖溶液对不同组成配比的靶向脂质体(靶向分子占 DC-chol/DOPE 的比例分别为 5%、10%、20%)及 DC-Chol/DOPE 进行质粒 DNA 转染抑制实验,结果如下:半乳糖溶液对靶向脂质体介导的质粒转染有一定的抑制作用,抑制率分别为 35%、40%、46%,在靶向分子所占比例为 20%时,抑制率可达 46%。而 DC-Chol/DOPE 在有半乳糖溶液存在的情况下转染效率无显著差异(图 2)。相同浓度的葡萄糖溶液对脂质体的转染活性则无抑制作用。另外,以肺细胞系作为对照组,所

制备各种脂质体对其转染效率低且无显著性差异(结果未给出)。以上结果说明,制备的肝靶向性 pH 敏脂质体的转染活性至少有部分作用由受体介导的内吞作用所致。

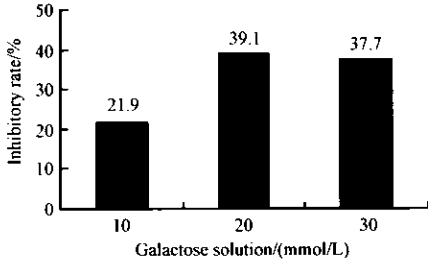


图1 半乳糖溶液对肝靶向 pH 敏脂质体转染效率的竞争抑制作用

Fig.1 Effect of competitive inhibition of galactose solution on transfection efficacy of hepatocyte targeting pH-sensitive liposome

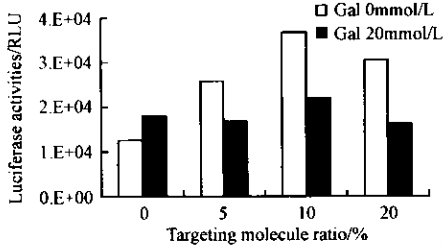


图2 半乳糖溶液对含不同量靶向分子脂质体转染活性的影响

Fig.2 Effect of galactose solution on transfection activities of liposomes with different ratio of targeting molecule

2.2 肝靶向性 pH 敏脂质体的 pH 敏性

将制备的脂质体在不同 pH 值条件下与鸡红细胞混合,在 2.5h 测定红细胞膜融合(血红素释放)情况。结果(图3)显示:红细胞在不同 pH 值的 PBS 缓冲溶液中释放血红素量并无显著差别,都与阴性对照相近(阴性对照平均值为 0.103);而细胞与脂质体发生膜融合作用则有显著的 pH 值依赖性,在

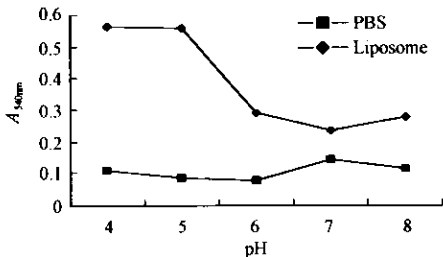


图3 肝靶向性 pH 敏脂质体的 pH 敏性分析
Fig.3 pH sensitivity analysis of hepatocyte targeting pH-sensitive liposome

pH = 6 前后两段区间内血红素释放量有显著性差异,在 pH 小于 6 的酸性环境中,血红素大量释放,最大值接近阳性对照(阳性对照均值为 0.709)。结果表明制备的脂质体具有显著的 pH 敏感性。

2.3 硫代反义寡核苷酸的抑制活性

应用肝靶向 pH 敏脂质体包裹不同浓度(0.25, 0.5, 1.0 μ mol/L)的 HCV363 作用于 HepG2.9706 细胞,连续 3 d,观测 HCV 5'NCR 调控荧光素酶基因的表达抑制情况。结果如图 4 所示,在 0.25 ~ 1.0 μ mol/L 范围内,HCV363 对融合基因的表达呈现明显的剂量依赖性抑制活性,抑制率分别为 45%、69%和 86%;而平行对照组阳离子脂质体 Lipofectin 介导 HCV363 对融合基因表达抑制率分别为 44%、79%和 85%,两组之间无明显的差异。此外,从图 5 可见,靶向 pH 脂质体介导的反义药物作用 1 次,在 1.0 μ mol/L 药物浓度时,抑制率可达 54%,随着药物作用次数的增加,HCV363 的抑制活性明显增强。

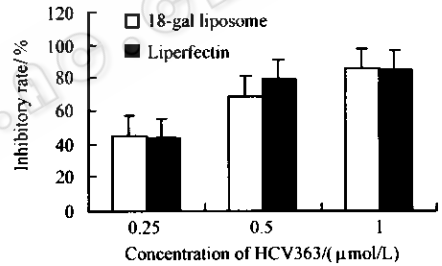


图4 HCV363 对 HepG2.9706 细胞 HCV 5'NCR 调控荧光素酶基因的表达抑制活性
Fig.4 Inhibitory effects of HCV363 on luciferase expression controlled by HCV 5'NCR in HepG2.9706 cells

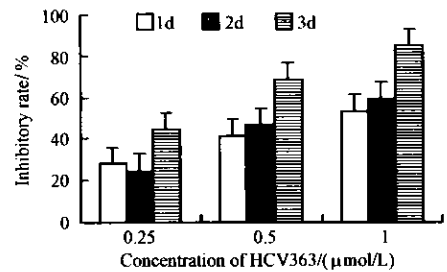


图5 药物作用次数对 HCV363 抑制活性的影响
Fig.5 Effects of 3 times of consecutive drug administration on inhibitory activities of HCV 363

3 讨论

反义核酸药物在抗病毒抗肿瘤等疾病的治疗中表现出良好的发展前景^[1,7]。但由于核酸类多聚阴离子大分子物质不易被细胞摄取及稳定性差等原因,使其在体内不能充分发挥生物效应。脂质体作

为重要的药物转运系统(Drug delivery system),是目前普遍采用的对此问题的解决方法。近年来,随着各种 pH 敏性脂质体、阳离子脂质体和主动靶向技术的出现,脂质体以其转运的高效性、对包封药物的保护性和便于化学修饰等优点,而被应用于反义核酸药物的转运中^{8,9}。

阳离子脂质体对核酸类多聚阴离子大分子物质有良好的包封率和转运效率,但具有一定的细胞毒性,一般用于体外实验。有文献报道^[10]某些低毒性阳离子脂质体可用于临床,其介导的反义核酸药物在临床试验中证明有效,但不足之处在于缺乏对特定细胞的靶向性。脂质体技术与靶向技术相结合得到的靶向脂质体具有更优越的性能。

细胞表面的受体对作用底物有高度选择性,只有特异的配体分子才能被识别并与之结合,继而介导高效的细胞吞噬作用。用化学方法修饰脂质体,使其表面携带特异的配体分子,即可得到对特定细胞有专一识别力的靶向脂质体。为了得到对肝细胞有特异识别的靶向脂质体,本研究选用了肝细胞专一性表达的受体-去唾液酸糖蛋白的配体-半乳糖作为靶向分子,制备了 18-醇半乳糖脂质体,半乳糖竞争抑制实验证明这种修饰的脂质体介导的细胞内吞作用至少含有部分受体介导的内吞作用,说明制备的脂质体具有一定的肝细胞靶向性。

核酸药物的作用位点是在特定细胞的胞质或胞核中。常规脂质体及靶向脂质体介导的药物被靶细胞摄取后形成内吞小体,然后转运至溶酶体,大部分药物在发挥作用之前即被溶酶体酶降解,为了促进药物在进入溶酶体之前迅速释放,本研究制备了既有肝靶向性又具 pH 敏性的脂质体,pH 敏性是基于内吞小体在向溶酶体转运过程中,其内环境 pH 值逐渐降低,pH 敏性的脂质体在酸性环境下将与内吞小体胞膜融合,至其胞膜破碎,进而促使所包封的核酸类药物释放,进入细胞质或细胞核中发挥治疗作用,避免了溶酶体酶的降解^[11,12]。红细胞溶血实验表明所制备的脂质体具有显著的 pH 敏性,导向分子十八醇-半乳糖甙的加入对脂质体的 pH 敏感性无影响。

采用制备的肝靶向 pH 敏脂质体,介导 HCV363 作用 HepG2.9706 细胞株,获得的结果表明 HCV363 对 HCV 5'NCR 调控荧光素酶基因表达具有剂量依赖性的抑制作用,抑制活性与市售 Lipofectin 介导的

作用相似。但药物作用 1 次的抑制活性明显高于以往 Lipofectin 介导的作用^[5]。从理论上讲,肝靶向 pH 敏脂质体介导的反义药物应具有更好的抑制活性,而实验中未能明显地提示,这可能与所采用的药物评价模型有关如转基因细胞表面专一性受体的表达及作用靶基因在细胞内的复制状态不同等。但本实验结果至少表明制备的肝靶向 pH 敏脂质体具有较强的药物转运能力;反义药物 HCV363 具有明显的抑制 HCV 调控基因表达的反义活性。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Galderisi U, Cascino A, Giordano A. Antisense oligonucleotides as therapeutic agents. *J Cell Physiol*, 1999, 181(2): 251 ~ 257
- [2] Lang KA, Peppercorn MA. Promising new agents for the treatment of inflammatory bowel disorders. *Drugs R D*, 1999, 1(3): 237 ~ 244
- [3] Zoulim F, Trepo C. New antiviral agents for the therapy of chronic hepatitis B virus infection. *Intervirol*, 1999, 42(2 ~ 3): 125 ~ 144
- [4] WANG X H(王小红), WANG S Q(王升启), LI M D(李梦东) et al. Establishment of transgenic cell model HCV 5' NCR. *Chinese Journal of Virology*(病毒学报), 1998, 14(4): 296 ~ 301
- [5] WANG X H(王小红), WANG S Q(王升启), LI M D(李梦东) et al. Researches on the inhibitory effects of antisense oligonucleotides on the expression of regulating gene of HCV in vitro. *Chinese Journal of Virology*(病毒学报), 1999, 15(3): 225 ~ 230
- [6] WEN S Y(文思远), WANG X H(王小红), WANG S Q(王升启) et al. Preparation and evaluation of a hepatocyte-targeting pH-sensitive liposome. *Progress in Biochemistry & Biophysics*(生物化学与生物物理进展), 2001, 28(1): 113 ~ 117
- [7] WANG X H(王小红), WANG S Q(王升启). Progress in pre-clinic and clinic studies on antisense drugs. *Foreign Med Sci*(国外医学药学分册), 2000, 27(1): 1 ~ 5
- [8] Fresta M, Chillemi R, Spampinato S et al. Liposomal delivery of a 30-mer antisense oligonucleotide to inhibit proopiomelanocortin expression. *J Pharm Sciences*, 1998, 87: 616 ~ 625
- [9] Duzgunes N, Pretzer E, Simoes S et al. Liposome-mediated delivery of antiviral agents to human immunodeficiency virus-infected cells. *Mol Membr Biol*, 1999, 16: 111 ~ 118
- [10] Hui K M, Ang P T, Huang L et al. Phase I study of immunotherapy of cutaneous metastases of human carcinoma using allogeneic and xenogeneic MHC DNA-liposome complexes. *Gene Ther*, 1997, 4: 783 ~ 790
- [11] Ropert C, Malvy C, Couvreur P et al. Inhibition of Friend retrovirus by antisense oligonucleotides encapsulated in liposomes: mechanism of actions. *Pharm Res*, 1993, 10(10): 1427 ~ 1433
- [12] CHEN Z B(陈忠斌), WANG S Q(王升启), WANG H(王弘) et al. Effects of pH-sensitive liposomes on anti-influenza virus activity of antisense oligonucleotides. *Chin J Biochem Mol Biol*(中国生物化学与分子生物学报), 1999, 15(4): 553 ~ 557

The Inhibitory Effects of Hepatocyte Targeting pH-Sensitive Liposome Mediated Phosphorothioate Antisense Oligonucleotide on Gene Expression Controlled by HCV 5'NCR

WANG Xiao-Hong WANG Sheng-Qi* WEN Si-Yuan GUAN Wei MAO Bing-Zhi

(Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract Antisense oligodeoxynucleotide is a negative charged macromolecule and hence is difficult to penetrate cell membrane and liable to degradation. To increase the effective concentration of antisense drugs in the target cells, a hepatocyte-targeting liposome directed to asialoglycoprotein receptors exclusively expressing on the hepatocyte membrane was designed and prepared based on the receptor-mediated gene transfer. In order to accelerate endosomal exit of nucleic acid drugs, the liposomal formulation with pH-sensitive property was adopted. The hepatocyte-targeting and pH-sensitivity of liposome were analyzed by galactose-receptor competitive inhibition and hemolysis of chicken red blood cell. Antisense oligodeoxynucleotide, HCV363 against HCV 5'NCR, was delivered via prepared liposome to transgenic cell HepG2.9706 and evaluated for its inhibitory effect on luciferase expression controlled by HCV 5'NCR in HepG2.9706 using Luciferase Assay System. The results showed that different concentrations (10, 20, 30 mmol/L) of galactose solutions reduce the delivery effects of liposome to some extent that were up to saturation when the concentrations of galactose solution exceed 20 mmol/L. Prepared liposomes mixed with chicken RBC are put into PBS buffers with different pH values (4.0 ~ 8.0), it was observed that the amount of heme is greatly released in acidic PBS (pH < 6) due to the fusion of liposome and RBC membranes. Liposome-mediated HCV363 has dose-dependent inhibitory activities on luciferase expression controlled by HCV 5'NCR in HepG2.9706 and the inhibitory rate is 86% at a concentration of 1.0 μmol/L. In conclusion, the liposome is proven to be a hepatocyte-targeting pH-sensitive delivery system that can increase the pharmacal effects of antisense drugs.

Key words hepatitis C virus, antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotide, hepatocyte targeting, pH-sensitive, liposome, HepG2.9706

Received: March 12, 2001

This work was supported by Grant from the 863 Plan of China (102-08-84-01) and the Military "9·5" Key Project (96Z007)

* Corresponding author. Tel: 86-10-66932211; Fax: 86-10-68214653; E-mail: sqwang@nic.bmi.ac.cn

诚 征 广 告

《生物工程学报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的综合性的学术刊物。主要报道我国生物技术领域科学和技术的新进展和新成果,刊登的内容包括:基因工程、细胞工程、酶工程、生化工程、生物反应器等各个方面,涉及工业、农业和医学等诸多领域。刊载的文章有60%以上是获“863”高技术、国家自然科学基金资助或属“八五”、“九五”攻关及省部级重大项目的研究论文,为国内从事生物技术的科研人员必读的刊物。

过去的几年,本刊以严谨的态度、诚实的信誉,赢得了厂商和读者的信赖,与许多公司建立了良好的长期合作关系。

《生物工程学报》设有广告专版,真诚欢迎国内外厂商来此发布产品、技术和服务信息,刊登仪器、设备、试剂等方面的广告。我刊除彩色四封外,还有精美彩色、黑白插页供选择。

需要刊登广告的客户,可电话告知您的 Fax,我们会立即将报价单传真给您,洽商确定版位后,即由科学出版社广告部(我刊广告代理)与您签定正式的刊登合同。

《生物工程学报》广告联系人: 武 文 电话: 010-62554303

传真: 010-62560912 E-mail: cjb@sun.im.ac.cn