

磁感应纳米基因靶向治疗方法的研究与展望^{*}

王晓文 综述 唐劲天^{**} 审校

(清华大学工程物理系 医学物理与工程研究所, 北京 100840)

中图分类号: R-332

文献标识: A

文章编号: 1009-6604(2009)06-0509-04

磁感应纳米基因靶向治疗方法是一种联合磁感应热疗和热诱导基因治疗的综合肿瘤治疗方法。磁性纳米颗粒既是磁感应热疗的核心介质,也可以作为肿瘤基因治疗的非病毒载体。如果我们采用热诱导启动子来控制治疗基因表达,利用磁性纳米颗粒载体携带治疗基因进入靶细胞,那么在交变磁场的作用下,磁性纳米颗粒感应升温就能够激活热诱导启动子,实现磁感应热疗诱导和热诱导基因治疗联合应用。我们还可以通过在磁性纳米颗粒表面耦联不同的靶向分子,或利用纳米粒子的磁性实现靶向聚集,有可能解决磁感应介质和基因治疗中靶向定位问题。本文首次提出了磁感应纳米基因靶向治疗方法的概念,并从现有的相关研究基础出发,对实施磁感应纳米基因靶向治疗方法的可行性和可能存在的问题进行综述。

1 磁感应纳米基因靶向治疗的可行性

磁感应纳米基因靶向治疗方法是基于磁感应热疗、磁转染、热诱导基因治疗和靶向磁性纳米材料技术的研究提出来的,下面分别就这几方面的研究现状进行综述。

1.1 磁感应热疗——磁性纳米材料用作介质

磁感应热疗是肿瘤治疗的一种新型加温治疗方法,是把磁性介质如纳米磁颗粒定位在肿瘤组织中,在外加交变磁场的作用下,磁性材料产生磁滞、弛豫或涡流效应而被加热。纳米级别的磁性颗粒产热机制是磁矢量旋转和奈尔松弛即颗粒本身的物理旋转。磁性纳米颗粒在交变磁场下磁滞损耗产热与颗粒的微观结构、颗粒的尺度和形状等密切相关。由于生物体内本身没有磁性物质,所以体内肿瘤组织中植入磁性介质后,就能在交变磁场下把电磁能转换成热能,实现定位和适形的磁感应热疗。Duguet等^[1]的研究表明,为了让患者耐受并获得较好的舒适感,磁感应热疗的治疗时间应小于1小时,交变磁场参数要满足振幅 $<4.85 \times 10^8 \text{ A}/(\text{m} \cdot \text{s})$ 且磁场频

率 $>50 \text{ kHz}$, $<10 \text{ MHz}$ 。

Johannsen等^[2]用磁感应热疗联合放疗治疗前列腺肿瘤,联合治疗效果明显优于单纯20 Gy放疗,肿瘤体积减小幅度达87.5%~89.2%。20 Gy放疗联合热疗的治疗效果与单纯60 Gy放疗治疗效果相当。注射入肿瘤组织中的磁流体有87.5%留在前列腺组织中,2.5%磁流体在肝脏组织中发现。

自从Gilchrist提出磁介导热疗概念以来,各国的科学家为此进行了大量的研究,目前磁感应热疗发展出动脉栓塞热疗^[3]、直接注射热疗^[4]和细胞内热疗三种策略^[5]。细胞内热疗的概念强调纳米颗粒进入肿瘤细胞内,再通过外加交变磁场产热而杀伤细胞。细胞内热疗的概念提出后,科学家们把磁感应热疗的靶标从组织转向了细胞或分子。

1.2 磁转染——磁性纳米材料用作基因载体

磁性纳米颗粒在不同的生物医学领域中应用广泛并呈现逐渐增加的趋势,包括生物成像和药物/基因传递等。磁性纳米颗粒在磁共振成像MRI和药物传释系统中研究较多,最近磁转染用于靶向基因治疗的研究取得不错的结果^[6~9]。磁转染是DNA与磁纳米粒子静电结合,交联压缩成磁粒子/DNA纳米复合物。在高能量磁场的引导作用下,磁粒子/DNA纳米复合物直接进入宿主细胞。磁性纳米颗粒可由不同的化学组成成分,其中磁性 Fe_3O_4 或 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 是生物医学中最常用的铁氧颗粒。铁氧磁性纳米颗粒的化学稳定性和生物相容性好,毒性小且不易受到体内各种酶的消化。当磁性 Fe_3O_4 的晶体直径 $<30 \text{ nm}$ 时,具有超顺磁性,在外加静态磁场作用下具有磁靶向性^[6,10]。磁性铁氧粒子的表面涂覆一些高分子或无机物稳定剂能增加稳定性,提高生物相容性和生物利用度。

许多科学家在体外原代细胞、干细胞和体内实验都已经证实,磁转染方法不但比传统转染方法效率大幅提高,而且目的蛋白的表达时间也大大缩短^[9,11,12]。

* 基金项目:国家自然科学基金(10775085);国家自然科学基金(30571779);北京市科委(Z07000200540704);清华大学裕元基金

** 通讯作者

韩国学者 Chang 等^[12] 比较磁转染和传统转染试剂 FuGENE6 对小鼠胚胎干细胞 D3 的转染能力, 转染的外源基因是绿色荧光蛋白。实验结果表明, 磁转染方法的细胞转染率高达 45%, 而 FuGENE6 转染率仅为 15%; 进一步研究表明, 磁转染的小鼠胚胎干细胞传 50 代后, 外源基因绿色荧光蛋白还能表达, 而胚胎干细胞的分子标志也保持不变。

德国 Hutteringer 等^[13] 用磁转染方法把粒细胞 - 巨噬细胞集落刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) 基因转染到猫纤维肉瘤中, 再实施外科手术治疗。结果表明, 磁转染组猫纤维肉瘤的复发率明显低于对照组, 也没有明显的毒性反应发生。目前磁转染 GM-CSF 治疗猫纤维肉瘤方案已经通过一期临床试验。

1.3 热应激诱导启动子控制外源基因表达

当哺乳动物的细胞温度比生理温度升高 3 ~ 7 ℃ 时, 热休克反应或应激反应就被激活。在热休克反应阶段, 细胞大部分正常的蛋白合成工作停止, 转而合成一系列应激蛋白, 如热休克蛋白 (heat shock protein, HSP)。这些应激蛋白都是在转录水平通过自身启动子的激活而增加合成的。常见的热诱导/激活启动子包括: 热休克蛋白 70B (HSP70B) 启动子, 生长抑制和 DNA 损伤蛋白 153 (growth arrest and DNA damage 153, GADD153) 启动子和巨细胞病毒 (cytomegalovirus, CMV) 启动子。研究人员把热调控启动子广泛应用在基因治疗的表达调控中。

HSP70B 启动子是最具有代表性的热诱导启动子, Huang 等^[14] 的体外细胞实验表明, 当温度升高到 42 ℃ 时, HSP70B 启动子活性升高达 33 ~ 835 倍。Marianne 等^[15] 在头颈鳞癌细胞株 HLaC79 和 FaDu 中分别转染了 HSP70B 启动子调控的绿色荧光蛋白基因, 在温度升高到 43 ℃ 作用 30 min 后, FaDu 细胞中绿色荧光蛋白表达增加 5.83 倍, 而 HLaC79 细胞中增加不明显, 说明热诱导启动子的表达情况与

宿主细胞的类型相关。Dammeyer 等^[16] 把 HSP70B 启动子置于人免疫缺陷病毒 2 长末端重复 (human immunodeficiency virus 2 long terminal repeat, HIV2LTR) 序列上游, 构建成了一种放大调控 GM-CSF 基因表达载体。42 ℃ 加温 30 min 后, GM-CSF 表达量能达到 1.36 μg/ml, 比基础表达量 (37 ℃ 表达量是 0.2 μg/ml) 增加 6.8 倍。

GADD153 启动子是一种应激刺激激活启动子, 热刺激、放射线辐射等许多刺激因素都能激活 GADD153 启动子。Ito 等^[17] 用 GADD153 启动子来调控肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor-α, TNF-α) 基因表达, 在人神经胶质瘤细胞株 U251-SP 中, 温度升到 42 ℃ 后, 细胞培养上清中 TNF-α 蛋白表达明显增加。有意义的是, TNF-α 蛋白分子也能激活 GADD153 启动子, 起到正反馈作用。Ito 等^[18] 用 ⁶⁰Co 照射转染 GADD153/TNF-α 基因的细胞, GADD153 启动子也被激活, TNF-α 表达量增加高达 30 ~ 100 倍。这些研究结果提示: 放射治疗、热疗和基因治疗可以实现联合应用。

如果采用肿瘤坏死因子等免疫分子作为治疗基因, 一般研究者都通过使用不同的启动子来增加表达。CMV 启动子是目前使用非常广泛的强启动子, 它不但本底活性高, 当温度升高时 CMV 启动子活性也明显增加^[16, 19]。

1.4 靶向磁性纳米粒子的研究

靶向分子是对正常细胞和靶细胞的亲嗜力差别非常明显的分子, 它能特异性识别、结合并聚集在靶细胞上, 而不与正常组织细胞结合。靶向分子的应用是药物减少毒副作用, 避免损伤正常组织的有效方法。磁性纳米颗粒具有强大的表面修饰潜能, 在纳米颗粒表面耦联不同类型的靶向分子就能使其特异性识别靶细胞, 进而被细胞吞噬。目前应用在纳米颗粒上的靶向分子主要有转铁蛋白、单克隆抗体、病毒胞膜蛋白和特异靶向小肽等几类 (表 1)。

表 1 常见靶向分子

靶向分子		用途	参考文献
转铁蛋白	与肿瘤细胞上的转铁蛋白受体结合		[20]
抗 CD-20 单抗	特异结合非何杰金淋巴瘤		[21]
RGD 序列	与整合素家族结合		[22]
乙肝病毒 L 抗原蛋白	特异识别人肝脏细胞		[23]
核定位信号	结合核孔复合体, 帮助入核		[24]
叶酸	与肿瘤细胞膜受体结合, 容易入胞		[25]
特异靶向肽	噬菌体展示技术为寻找与靶细胞/组织快速结合的短肽提供快速有效的途径		[26, 27]
表皮生长因子	特异结合肿瘤细胞		[28]

2 问题与展望

肿瘤基因治疗和磁感应热疗都为肿瘤治疗带来了新的思路, 但是这两种治疗方法各有优缺点。基因治疗面临的最大难题是基因传递载体问题, 最理

想的载体要满足既能安全准确地传递基因, 又能定时、定位激活基因的条件。磁感应热疗的优点在于磁介质的适形性加热。磁感应纳米基因治疗方法的提出恰当地融合了两种方法的长处。那么磁感应纳米基因治疗在应用中是否可以优势互补呢? 下面就

磁感应纳米基因治疗可能存在的问题进行探讨。

2.1 细胞靶向与核靶向

磁性纳米颗粒表面带正电荷,表面负电荷的 DNA 能通过非特异静电作用与纳米颗粒结合。非病毒载体传递 DNA 要经历形成载体/DNA 纳米颗粒复合物到目的基因表达 7 个步骤^[29]:①载体生物材料结合 DNA,依靠静电作用紧缩成载体/DNA 纳米颗粒,保护 DNA 免受核酸酶降解;②细胞内吞载体/DNA 纳米颗粒;③纳米颗粒进入内噬体-溶酶体系统;④载体/DNA 纳米颗粒从内噬体-溶酶体系统中逃逸,释放到细胞质中;⑤载体/DNA 纳米颗粒解离,载体生物降解;⑥DNA 进入细胞核;⑦目的基因表达^[6]。

如果以基因到达的部位作为聚焦点,可以把上述基因传递过程分为细胞靶向和核靶向两个阶段。

2.1.1 细胞靶向 磁性纳米颗粒载体携带 DNA 在体内传递,最终找到靶细胞过程中涉及的问题可以归结成细胞靶向问题。许多因素能影响基因的传递表达效率,比如:①和血清蛋白相互作用抑制转染。带正电荷的复合物可与血浆中组分结合,如白蛋白、免疫球蛋白和纤维蛋白原等;②与巨噬细胞和中性粒细胞相互作用,非特异性结合到其他非靶组织或细胞上。这些作用造成载体/基因的血浆半衰期缩短、清除率增加。

2.1.2 核靶向 当载体携带目的基因找到靶细胞后,也存在许多问题有待回答:如何提高细胞吞噬纳米颗粒的效率?如何提高载体/基因复合物吞噬泡逃逸效率?基因如何突破核膜障碍,高效转移入核?进入细胞核后,外源基因是单独还是与磁性纳米颗粒一起形成复合体?外源基因的遗传稳定性怎么实现?研究人员也通过如高分子子包封、靶向分子修饰等不同的办法克服核障碍^[22,28]。本实验室采用 SV40 核定位信号序列修饰磁性纳米颗粒来增加磁转染效率^[24],取得了一定的效果。

2.2 细胞内热疗和基因表达的平衡关系

要实现细胞内热疗必须保证磁性纳米颗粒进入细胞。通过对纳米粒子的包封、修饰能增加纳米颗粒的入胞效率、生物相容性和特异靶向性。基因治疗需要保证基因进入细胞核,才能转录合成蛋白质。这样,在热诱导温度和基因表达之间就出现一种需要平衡的关系。日本 Ito 等^[17]观察到,42℃热诱导外源基因表达最高,而温度升高到 46℃时,外源基因表达降低。他们认为 46℃时,细胞发生凋亡或坏死,不能有效合成外源基因。

另外,除了温度因素外,细胞内存在的纳米颗粒对目的基因蛋白合成会不会有影响?是什么样的影响?针对不同的目的基因、不同的宿主细胞和不同的疾病类型,都需要找到不同的细胞内热疗和基因表达的平衡关系。

2.3 基因转染量和热介质比例问题

磁感应纳米靶向治疗想要解决的是,利用磁性纳米介质作为基因携带的载体,同时也作为磁感应热疗的发热介质。日本的 Ito 等^[17]在研究热疗联合基因治疗时,采用脂质体转染方法先把治疗基因传递到达目的细胞/组织,再注射磁性纳米颗粒做发热介质。德国学者用磁转染法把 GM-CSF 基因导入猫纤维肉瘤进行治疗^[13]。但是基因治疗磁转染的有效剂量能不能达到磁感应介质热疗的剂量要求呢?基因转染量和热介质比例的问题也是磁感应纳米靶向治疗方案中的又一关键问题。

3 小结

磁感应纳米基因治疗方法是一种结合了生物材料学、肿瘤学、细胞生物学、分子生物学和免疫学等多学科交叉的治疗方法。如果充分发挥了纳米材料表面可设计的功能,有可能解决细胞/分子靶向问题,突破目前磁感应热疗和基因治疗的局限。目前磁感应纳米基因治疗方法还处于探索阶段,许多问题尚待解决,但随着磁感应热疗、磁转染、基因治疗和磁纳米技术的不断发展,相信磁感应纳米基因治疗有望成为一种非常有前途的肿瘤治疗方法。

参考文献

- Duguet E, Vassur S, Mornet S, et al. Magnetic nanoparticles and their applications in medicine. *Nanomedicine*, 2006, 1: 157 - 168.
- Johannsen M, Thiesen B, Gneveckow U, et al. Thermotherapy using magnetic nanoparticles combined with external radiation in an orthotopic rat model of prostate cancer. *Prostate*, 2006, 66: 97 - 104.
- Minamimura T, Sato H, Kasaoka S, et al. Tumor regression by inductive hyperthermia combined with hepatic embolization using dextran magnetite incorporated microspheres in rats. *Int J Oncol*, 2000, 16: 1153 - 1158.
- Masashige S, Mitugu Y, Masataka S, et al. Intracellular hyperthermia for cancer using magnetic cationic liposomes. *J Magn Magn Mater*, 1999, 194: 176 - 184.
- Moroz P, Johns SK, Gray BN, et al. Magnetic mediated hyperthermia: current status and future direction. *Int J Hyperthermia*, 2002, 18: 267 - 284.
- Jason RM, Kimberly AK, Eric YS, et al. Target delivery of multifunctional magnetic nanoparticles. *Nanomedicine*, 2007, 2: 153 - 167.
- Shinkai M, Ito A. Functional magnetic particles for medical application. *Adv Biochem Engin/Biotechnol*, 2004, 91: 191 - 220.
- Ajay KG, Rohan RN, Vikas DV, et al. Recent advances on surface engineering of magnetic iron oxide nanoparticles and their biomedical applications. *Nanomedicine*, 2007, 2: 23 - 39.
- Scherer F, Anton M, Schillinger U, et al. Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. *Gene Ther*, 2002, 9: 102 - 109.
- Kim JS, Yoon TJ, Yu KN, et al. Cellular uptake of magnetic nanoparticle is mediated through energy-dependent endocytosis in A549 cells. *J Vet Sci*, 2006, 7: 321 - 326.
- Plank C, Schillinger U, Scherer F, et al. The magnetofection method: using magnetic force to enhance gene delivery. *J Biol Chem*, 2003, 278: 737 - 747.

(下转第 523 页)

12 Chang HL, Eun YK, Kilsoo J, et al. Simple, efficient, and reproducible gene transfection of mouse embryonic cells by magnetofectin. *Stem Cells Dev*, 2008, 17: 133 – 141.

13 Hutterer C, Hirschberger J, Jahnke A, et al. Neoadjuvant gene delivery of feline granulocyte-macrophage colony-stimulating factor using magnetofection for the treatment of feline fibrosarcomas; a phase I trial. *J Gene Med*, 2008, 10: 655 – 667.

14 Huang Q, Hu JK, Lohr F, et al. Heat-induced gene expression as a novel targeted cancer gene therapy strategy. *Cancer Res*, 2000, 60: 3435 – 3439.

15 Marianne S, Tonja H, Petra G, et al. Inducible promoters for gene therapy of head and neck cancer: an in vitro study. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2004, 261: 208 – 215.

16 Dammeyer P, Jaramillo MC, Pipes BL, et al. Heat-inducible amplifier vector for high-level expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Int J Hyperthermia*, 2006, 22: 407 – 419.

17 Ito A, Masashige S, Hiroyuki H, et al. Heat-inducible TNF- α gene therapy combined with hyperthermia using magnetic nanoparticles as a novel tumor-targeted therapy. *Cancer Gene Therapy*, 2001, 8: 649 – 654.

18 Ito A, Masashige S, Kazumi H, et al. Radiation-inducible TNF- α gene expression under stress Inducible promoter gadd153 for cancer therapy. *J Biosci Bioeng*, 2001, 92: 598 – 601.

19 Borrelli MJ, Schoenherr DM, Wong A, et al. Heat-activated transgene expression from adenovirus vectors infected into human prostate cancer cells. *Cancer Res*, 2001, 61: 1113 – 1121.

20 Li Y, Ogris M, Wagner E, et al. Nanoparticles bearing polyethyleneglycol-coupled transferrin as gene carriers preparation

and in vitro evaluation. *Int Pharm*, 2003, 259: 93 – 107.

21 Ghobrial I, Witzig T. Radioimmunotherapy: a new treatment modality for B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Oncology*, 2004, 18: 623 – 630.

22 Ruoslahti E. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1996, 12: 697 – 715.

23 Yamada T, Iwasaki Y, Tada H, et al. Nanoparticles for the delivery of genes and drugs to human hepatocytes. *Nat Biotechnol*, 2003, 21: 885 – 890.

24 Xu C, Xie J, Kohler N, et al. Monodisperse magnetite nanoparticles coupled with nuclear localization signal peptide for cell-nucleus targeting. *Chem Asian J*, 2008, 3: 548 – 552.

25 Zhang Y, Kohler N, Zhang M, et al. Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake. *Biomaterials*, 2002, 23: 1553 – 1561.

26 Brown KC. New approaches for cell-selected peptides from combinatorial libraries. *Curr Opin Chem Biol*, 2000, 4: 16 – 21.

27 Trepel M, Arap W, Pasqualini R. In vivo phage display and vascular heterogeneity: implications for targeted medicine. *Curr Opin Chem Biol*, 2002, 6: 399 – 404.

28 Blessing T, Kursu M, Holzhauser R, et al. Different strategies for formulation of PEGylated EGF-conjugated PEI/DNA complexes for targeted gene delivery. *Bioconjug Chem*, 2001, 12: 529 – 537.

29 Green JJ, Langer R, Anderson DG, et al. A combinatorial polymer library approach yield insight into nonviral gene delivery. *Acc Chem Res*, 2008, 41: 749 – 759.

(收稿日期: 2008 – 09 – 16)

(修回日期: 2008 – 11 – 11)

(责任编辑: 王惠群)