

细菌磁小体作为新型非病毒载体用于肿瘤基因治疗的研究进展

王 熙, 耿圆圆, 侯 蕾, 李智丽, 王吉贵, 姜 伟, 刘维全

(中国农业大学生物学院, 北京 100193)

摘 要: 磁小体是由趋磁细菌自身生物矿化形成的纳米级单畴晶体, 其主要成分为 Fe_3O_4 , 以脂膜包裹。磁小体晶型完美、粒径均一、有良好的分散性、分布范围窄等特点, 可作为一种纳米载体应用于多种活性物质的固定负载。且由于磁小体具有良好的生物相容性及表面可修饰等显著优势, 故在肿瘤靶向治疗方面有着广阔的应用前景。本文主要介绍了基因治疗的研究现状、细菌磁小体的特性以及将磁小体作为非病毒载体用于肿瘤基因治疗的优势和应用, 并探讨了磁小体作为一种新型非病毒载体的发展前景。

关键词: 细菌磁小体; 肿瘤; 基因治疗; 载体

中图分类号: R73 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2016)04-0322-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2016.04.B014

Research Progress in Magnetosomes Used as a New Non-viral Vector for Tumor Gene Therapy

WANG Xi, GENG Yuan-yuan, HOU Qiang, et al.

(College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: Bacterial magnetosomes (BMs) are nanoparticles with single domain biosynthesized in magnetotactic bacteria. They are composed of Fe_3O_4 crystals enveloped by an organic membrane. They are highly crystalline, monodisperse, with nano-scale and narrow size distribution. Magnetosomes have been commonly used as a novel natural magnetic nanocarrier for various bioactive substances due to its significant advantages such as the characteristics above. Furthermore, as their biocompatibility and surface modification, a broad application prospect in tumor gene therapy was emerged. In this review, the features and advantages of magnetosomes, especially their application study on tumor gene therapy as a non-viral vector are introduced in detail.

Subject words: bacterial magnetosomes; tumor; gene therapy; vector

癌症是一种人们谈之色变的疾病, 每年都会导致数以万计的人死亡。肿瘤的发生主要是由于异常的细胞浸润性生长, 且这些异常的细胞极易扩散到机体其他部位。传统的肿瘤治疗手段包括手术、放疗和化疗等, 这些方法可以在一定程度上治疗或抑制肿瘤细胞的生长, 但存在很大的局限性, 且治疗后有复发的危险^[1]。此外, 许多辅助抗肿瘤的药品如 DNA 烷基化剂、激素激动剂/拮抗剂和抗代谢药品等也被广泛应用, 但是癌细胞极易产生耐药性, 故这些药品不能长期使用。而且, 抗肿瘤药品靶向性较差, 在杀灭癌细胞的同时对机体的正常细胞也会产生不良反映。

基因治疗是随着基因重组、基因克隆等技术发

展起来的, 近年来被广泛应用于恶性肿瘤、自身免疫性疾病等重大疾病的治疗。2004 年, 全球上市的一个基因治疗的药品就是针对肿瘤治疗的, 表明肿瘤的基因治疗是该领域最重要的部分。目前已有的肿瘤基因治疗方案大多存在缺乏靶向性和安全性等问题, 甚至会产生很大的毒性作用^[2]。细菌磁小体的出现在一定程度上解决了肿瘤基因治疗中靶向性和安全性的问题。磁小体表面覆盖有一层生物膜, 具有良好的生物相容性, 其上存在的某些游离基团可直接偶联基因、药品、蛋白等多种生物活性物质, 制备直径很小的磁小体复合物。且磁小体的主要成分为 Fe_3O_4 , 通过外加磁场的作用, 能够使磁小体靶向聚集在肿瘤部位。最重要的是磁小体具有较高的生物安全性。这些优势都显示磁小体有望在肿瘤基因治疗中被广泛应用。本文从肿瘤基因治疗的现状及磁

通讯作者: 刘维全, 教授, 博士; 中国农业大学生物学院生化与分子生物学系, 北京市海淀区圆明园西路 2 号 (100193); E-mail: weiquan8@cau.edu.cn

收稿日期: 2015-09-06; **修回日期:** 2015-11-03

小体在基因治疗中的优势等方面综述磁小体用于肿瘤基因治疗的研究进展。

1 基因治疗

1.1 基因治疗概况

基因治疗从 1990 年应用至今,研究人员已在遗传、代谢类疾病及肿瘤治疗等领域取得一定的成果。基因治疗是一种从 DNA 水平对疾病进行诊断和治疗的技术,是将外源治病基因导入目的细胞,以纠正或修复遗传错误或基因异常所引起的疾病,从而达到治疗的目的^[3]。

目前,基因治疗主要有两种方法:一种是在体外对目的细胞的遗传功能进行调控,之后将修饰好的细胞导入宿主受体。这种方法的关键取决于,目的细胞可以被轻易获得并且能够在体外对其遗传功能进行调整,使其被导入宿主后可以有效的发挥作用。另一种方法是将外源基因直接插入宿主受体中。这种方法要求首先对外源基因有充分的了解,其次能够克隆获得外源基因,最后也是最重要的是,转运载体能够携带外源基因进入机体,使其在体内表达从而达到治疗效果。

1.2 基因转运载体

肿瘤基因治疗的难点在于外源基因的体内递送及其安全性。目前,临床试验中使用的基因转运载体主要有两类。

一类为病毒载体,即通过改造病毒的基因组,使其携带外源基因并包装成完整的病毒颗粒。这类载体以病毒感染的方式将基因传递到细胞内部,转染效率和表达效率都较高。但是,病毒载体在构建和纯化方面比较困难,而且存在诸如包装容量有限、插入突变、基因重组及免疫反应等一系列安全隐患。目前,仅有少数几种病毒如腺病毒、疱疹病毒、逆转录病毒及慢病毒等被用作基因载体,并有一定范围的应用研究报道。

另一类为非病毒载体,主要包括裸 DNA、脂质体、阳离子多聚物等。这类载体易于构建,且有较高的安全性和基因包裹能力,是目前研究的热点。但由于外源基因被导入机体后,首先需要克服机体内的许多生理屏障才能进入靶细胞,然后越过细胞质进入细胞核,将编码信息传递给 mRNA,最后进行翻译产生活性蛋白,从而发挥治疗作用。由此可见,非病

毒载体在基因治疗过程中,靶细胞的转染效率和目的基因的表达水平都相对较低。

将外源基因克隆到质粒中直接注射入机体,诱导机体产生免疫应答,是经典的基因传递方式。该方法已经用于预防 B 细胞淋巴瘤以及诱发对淋巴瘤和骨髓瘤的免疫反应^[4,5]。但是这种方法基因的表达效率较低,且存在剂量依赖效应^[6]。基因枪技术和电穿孔技术的出现,虽然可以提高裸 DNA 的转染效率,但体内操作时基因定位转移不易控制,电穿孔的溶液、电脉冲宽度、数量和波形等因素都会影响转染效率。

脂质体特别是阳离子脂质体是将外源基因导入机体的常规载体。阳离子脂质体带正电荷,可以与 DNA 通过静电吸附形成复合物,保护 DNA 不被酶降解。脂质体在低剂量使用时无不良反应,但仍存在转染效率低及靶向性差等问题。近年来,研究者发现,很多合成的或天然的阳离子聚合物同样可与 DNA 通过静电吸附形成稳定复合物,且它们能有效地压缩 DNA 链以提高转染效率。PEI 是目前应用最广的阳离子聚合物,但 PEI 带有大量正电荷,会产生较大的细胞毒性。

在疾病的基因治疗中,基因转移的靶向性对治疗效果有重要影响,尤其在体内实验时,除了测定对靶细胞的治疗效果,还得观察对正常细胞的影响。受体介导的内吞可转导外源基因进入靶细胞,是目前所知的最有效的靶向性基因转移系统^[7]。该方法是细胞表面特异性蛋白为靶标,将与其对应的配体或抗体与 DNA 在多价阳离子辅助物的介导下形成蛋白质-核酸复合体,再经胞吞作用进入细胞,从而达到靶向性基因转移的目的。但以该方式进入细胞,DNA 极易被溶酶体酶系所降解,同样会影响基因的转移效率。

非病毒载体在基因治疗中,从性能和发展前景上看,比病毒载体更具优越性。然而,目前已有的非病毒载体在靶向性、转染效率、颗粒的稳定性及均一性等方面均不够理想,未能在临床治疗中广泛应用。近年来,生物磁学及纳米技术逐渐出现在生物医学领域,为非病毒基因载体提供了一个新的选择。

2 细菌磁小体

1975 年,美国科学家 Blakemore 在研究盐泽泥

浆沉积物中的螺旋体时偶然发现并首次报道了趋磁细菌^[8]。这类细菌可以吸收环境中的铁离子,在适宜的条件下,利用细胞内自发的生物矿化作用形成一种有双层脂膜包裹的纳米磁性颗粒—磁小体(magnetosome)。

2.1 细菌磁小体的性质和特点

磁小体具有种属特异性^[9],即不同菌种所合成磁小体的成分、形态、结构及大小各不相同,而同一菌种合成的磁小体成分单一、大小相似、形状相同、数目稳定。磁小体的形状多样,常见的有子弹状、液滴状、薄片状、球状等,晶形有平截六面体棱柱形和平截八面体棱柱形等。X射线衍射分析结果表明,磁小体的成分主要是 Fe_3O_4 ,极少数为 Fe_3S_4 。它们的直径在40~120nm之间,属单畴范围^[10]。单个晶体外膜组分与细胞质膜类似,为磷脂双层膜^[11],主要成分为磷酸酰丝氨酸和磷脂酰乙醇胺。磁小体的生物膜上还存在一些其他生物膜中不存在的特异性蛋白^[12],为磁小体膜上表达特定蛋白以及膜的修饰奠定了基础。此外,磁小体膜上还存在某些游离基团,可直接偶联基因、药物、蛋白等多种生物活性物质(Figure 1)。制备直径很小的磁小体复合物,在外部磁场的诱导下,可变成一支“运载火箭”,直接攻击机体的病灶部位。

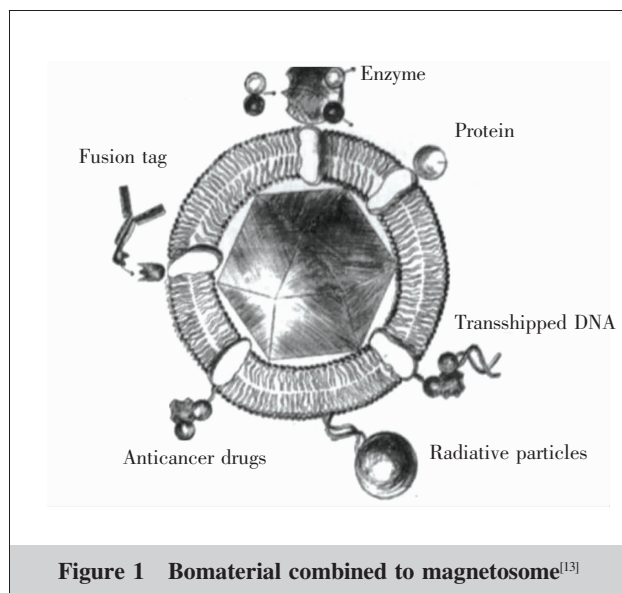


Figure 1 Bomaterial combined to magnetosome^[13]

2.2 细菌磁小体的应用

目前,已有关于磁小体在固定化酶载体^[14]、制备磁性细胞^[15]、靶向药物载体^[16,22]、蛋白展示^[17,18]、DNA/RNA的分离和标记^[19]、免疫检测^[20]等方面的

研究(Figure 2)。但将磁小体作为一种非病毒载体用于疾病基因治疗则鲜有报道。

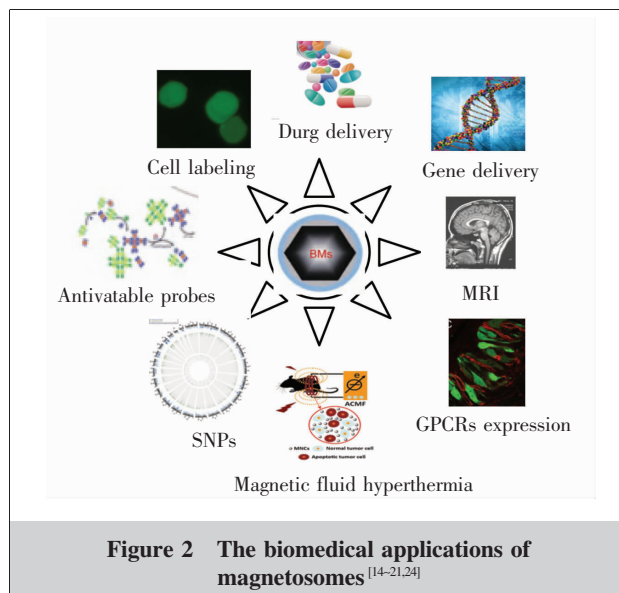


Figure 2 The biomedical applications of magnetosomes^[14-21,24]

2.2.1 细菌磁小体作为新型非病毒载体的优势

以趋磁螺菌磁小体为例,其具有以下一些优势:①晶体稳定,分散性能好,粒径分布在40~50nm之间;②主要成分为 Fe_3O_4 ,具有铁磁性,通过外加磁场可让其靶向作用于病灶部位,且不会因为膜修饰后影响其磁靶向的能力;③磁小体膜上有很多活性物质,可以与多种物质偶联,如药物、蛋白、DNA/RNA等;④其膜与细胞质膜类似,具有良好的生物相容性,可以进行生物降解;⑤具有很高的基因转移效率;⑥可以保护所携带的外源基因不被机体内各种物质及酶破坏;⑦没有细胞毒性,生物安全性高。

将磁小体与病毒载体和已有的非病毒载体作比较(Table 1),发现磁小体具有明显优势。

基于以上特点,磁小体可作为一种新型的非理想的非病毒载体用于肿瘤的基因治疗。

2.2.2 细菌磁小体作为非病毒载体在肿瘤基因治疗方面的应用

目前,磁小体的研究主要集中于其生物合成的机制方面,将其作为基因载体进行基因转染等方面研究仍然缓慢。已有研究者通过体内、体外等多种实验验证磁小体的生物相容性。Sun等^[22]通过舌下静脉注射SD大鼠,初步证明磁小体对大鼠的半数致死量为62.7mg/kg,存活的大鼠血常规、心肌酶与肝肾功能检测均未见明显异常。将大鼠主要脏器做病理切片以及电镜切片,仅能在肝脏细胞内发现磁小

Table 1 Advantages of magnetosomes as a non-viral vector

	Viral vector(ADV)	Non-viral vector	Magnetosomes
Source	Modification of viral genome	Nude DNA、Lipidosome、Polymers ...	Magnetotactic bacteria
Targeting	-	+	+
Potency of integration	-	-	-
Transfection efficiency	High	Low	High
Manner of Gene expression	Transient expression	Transient expression	Transient expression
Immunogenicity	High	Low	Low
Cytotoxicity	High	Low	Low
Capability of DNA fragment	≤37kb	Unlimited	Unlimited

Note: +: positive; -: negative.

体,且不会导致组织病变。另外,溶血实验、MTT 测试以及微核测试也证明,磁小体在剂量为 4mg/ml 时没有细胞毒性、基因毒性以及溶血现象发生,表明在该剂量时磁小体有很好的生物相容性。Liu 等^[23]用乳腺癌细胞 MCF-7 与磁小体共同孵育时发现,磁小体对机体产生的毒性小到可以忽略不计。

磁小体生物膜的主要成分是磷脂酰乙醇胺,使得磁小体具有吸附 DNA 的能力。1995 年,日本研究者 Takeyama 等^[24]让磁小体吸附不同的真核穿梭质粒,利用基因枪技术成功的将质粒转移到蓝藻细胞内并表达。并且,磁小体连接 DNA 后,大小、形态并未有任何变化,分散性良好,外膜完好^[23],这些均符合作为基因载体的条件。

但磁小体在溶液中呈负电性,故而其直接吸附 DNA 的能力较低。利用阳离子多聚物 PEI 对 DNA 进行包裹后,会形成带正电荷的 PEI-DNA 复合物,之后通过静电吸附即可与磁小体紧密结合成磁小体基因复合物,大大增加了磁小体的 DNA 吸附量,同时也降低了 PEI 的细胞毒性。2007 年,Xiang 等^[25]曾报道在体内、外条件下,BMPs-PEI 体系可以有效将 DNA 转运至细胞内,在磁场作用下,复合物的转染效率很高,且对细胞几乎没有毒性。体内试验表明,复合物通过磁场作用,可以提高基因在体内的表达水平。2010 年,Tang 等^[26]将肿瘤基因疫苗 pSLC-E7-Fc 与磁小体连接形成 BMP-V 复合基因疫苗,优化了连接条件及在体内外转染细胞的最佳条件。通过小鼠肿瘤的治疗模型,探索 BMP-V 在体内免疫的最佳途径、方式及治疗剂量,以及 BMP-V 发挥抗肿瘤免疫效应的机制,证明磁小体基因复合物在磁场的作用下,在剂量为微克级时即能产生抗肿瘤免疫效应,且复合物对于小鼠的主要脏器无毒副作用。此外,Han 等^[27]将 HIV-1 中的跨膜多肽 Tat 和树状大

分子 PAMAM 通过化学偶联到 BMP 上,形成新型载体 Tat-BMPs-PAMAM 后,用该载体挂载 siRNA 形成 Tat-BMPs-PAMAM/siRNA,直接瘤内注射该复合物治疗小鼠的皮下肿瘤。证明了所制备的 Tat-BMPs-PAMAM 基因投递系统具有与 Lipofectamine 2000 相似的体内肿瘤抑止效果,同时具有 Lipofectamine 2000 不具备的磁靶向和跨膜复合功能。由此可见,在 DNA 传递中,磁小体是一种很有应用前景的非病毒载体。

3 展 望

近年来,对于磁小体的研究已经在分子生物学、生物化学等方面取得了重大进展。研究发现,磁小体在抗肿瘤方面除了可作非病毒载体用于肿瘤基因治疗,还可以用于核磁共振成像和磁热疗等^[28]。磁小体能够通过改变组织在核磁共振下的弛豫时间,影响组织的信号强度,从而提高组织在核磁共振成像中的对比度,让有病变的组织更早地被发现。而且,磁小体在交变磁场作用下会产生大量热量,肿瘤细胞并不具备对高温的耐受性,所以利用这一现象同样可以达到杀伤肿瘤细胞的效用,若与肿瘤基因治疗联合应用,相信有更大的应用前景。

磁小体虽然从 1975 年就受到人们的关注,但之前的研究主要集中在其生物合成机制方面^[29],对于磁小体作为一种新型非病毒载体用于肿瘤基因治疗方面的研究仍处于初级阶段。我们相信,继续对磁小体生物学特性如生物相容性、外源基因的转染效率、基因在体内的表达水平、磁流体动力学、注射途径以及体内代谢清除等方面进行深入研究,不论是在理论上还是实际应用中都有极大的价值和意义,也可以使磁小体在不久的将来在生物学及医学领域得到

更加广泛的应用。

参考文献:

- [1] Patyar S, Joshi R, Byrav DSB, et al. Bacteria in cancer therapy: a novel experimental strategy [J]. J Biomed Sci, 2010, 17(1): 21.
- [2] Deng HX, Wei YQ. Tumor gene therapy: current status and future perspectives[J]. Chinese Journal of Cancer Biotherapy, 2015, 22(2): 170-176. [邓洪新, 魏于全. 肿瘤基因治疗的研究现状和展望[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2015, 22(2): 170-176.]
- [3] Weber W, Fussenegger M. Pharmacologic transgene control systems for gene therapy [J]. J Gene Med, 2006, 8(5): 533-534.
- [4] Hen WC, Huang L. Non-viral vector as vaccine carrier[J]. Adv Gene, 2005, 54: 315-337.
- [5] Cui Z, Mumper RJ. Plasmid DNA-entrapped nanoparticles engineered from microemulsion precursors; in vitro and in vivo evaluation[J]. Bioconjug Chem, 2002, 13(6): 1319-1327.
- [6] Bansal A, Jackson B, West K, et al. Multifunctional T-cell characteristics induced by a polyvalent DNA prime/protein boost human immunodeficiency virus type 1 vaccine regimen given to healthy adults are dependent on the route and dose of administration[J]. J Virol, 2008, 82(13): 6458-6469.
- [7] Liu X. Non-viral vector system application in gene therapy [J]. Foreign Medical Sciences (Cancer Section), 2001, 28(3): 189-191. [柳湘. 非病毒载体系统在基因治疗中的应用[J]. 国外医学(肿瘤学分册), 2001, 28(3): 189-191.]
- [8] Blakemore R. Magnetotactic Bacteria [J]. Science, 1975, 190(4212): 377-379.
- [9] Schüller D. Formation of magnetosomes in magnetotactic bacteria[J]. J Mol Microbiol Biotechnol, 1999, 1(1): 79-86.
- [10] Moskowitz BM. Biomineralization of magnetic minerals[J]. Reviews of Geophysics, 1995, 33: 123-128.
- [11] Gorby YA, Beveridge TJ, Blakemore RP. Characterization of the bacterial magnetosome membrane [J]. J Bacteriol, 1988, 170(2): 834-841.
- [12] Atsuahi A, John W, Tadashi M. A novel protein tightly bound to bacterial magnetic particles in Magnetospirillum magneticum strain AMB-1[J]. J Biol Chem, 2003, 278(10): 8745-8750.
- [13] Chen L, Wang GB, Tao KX. The separation of nanoparticles(magnetosomes) from magnetotactic bacteria and their applications in medicine[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2008, 8(7): 1327-1334. [陈龙, 王国斌, 陶凯雄. 趋磁细菌纳米磁小体的培养与分离及其在医学上的应用进展和前景[J]. 现代生物医学进展, 2008, 8(7): 1327-1334.]
- [14] Tadashi Matsunaga, Shinji Kamiya. Use of magnetic particles isolated from magnetotactic bacteria for enzyme immobilization [J]. Applied microbiology and biotechnology, 1987, 26(4): 328-332.
- [15] Matsunaga T, Hashimoto K, Noriyuki Nakamura, et al. Phagocytosis of bacterial magnetite by leucocytes [J]. Applied microbiology and biotechnology, 1989, 31(4): 401-405.
- [16] Matsunaga T, Higashi Y, Tsujimura N. Drug delivery by magnetoliposomes containing bacterial magnetic particles [J]. Cell Eng, 1997, 2: 7-11.
- [17] Yoshino T, Matsunaga T. Development of efficient expression system for protein display on bacterial magnetic particles[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 338(4): 1678-1681.
- [18] Yoshino T, Kato F, Takeyama H, et al. Development of a novel method for screening of estrogenic compounds using nano-sized bacterial magnetic particles displaying estrogen receptor[J]. Analytica Chimica Acta, 2005, 532: 105-111.
- [19] Ota H, Takeyama H, Nakayama H, et al. SNP detection in transforming growth factor-1 gene using bacterial magnetic particles[J]. Biosens Bioelectron, 2003, 18(5-6): 683-687.
- [20] Wacker R, Ceyhan B, Alhorn P, et al. Magneto immune-PCR: A novel immunoassay based on biogenic magnetosome nanoparticles [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 357(2): 391-396.
- [21] Sun JB, Duan JH, Dai SL, et al. Preparation and anti-tumor efficiency evaluation of doxorubicin-loaded bacterial magnetosomes; magnetic nanoparticles as drug carriers isolated from Magnetospirillum gryphiswaldense[J]. Biotechnol Bioeng, 2008, 101(6): 1313-1320.
- [22] Sun J, Tang T, Duan J, et al. Biocompatibility of bacterial magnetosomes; acute toxicity, immunotoxicity and cytotoxicity[J]. Nanotoxicology, 2010, 4(3): 271-283.
- [23] Liu R, Liu J, Tong JQ, et al. Heating effect and biocompatibility of bacterial magnetosomes as potential materials used in magnetic fluid hyperthermia[J]. Progress in Natural Science: Materials International, 2012, 22(1): 31-39.
- [24] Takeyama H, Yamazawa A, Nakamura C, et al. Application of bacterial magnetic particles as novel DNA carriers for ballistic transformation of a marine cyanobacterium[J]. Biotechnology Techniques, 1995, 9(5): 355-360.
- [25] Xiang L, Bin W, Huali J, et al. Bacterial magnetic particles (BMPs)-PEI as a novel and efficient non-viral gene delivery system[J]. J Gene Med, 2007, 9(8): 679-690.
- [26] Tang YS, Wang D, Zhou C, et al. Bacterial magnetic particles as a novel and efficient gene vaccine delivery system [J]. Gene Therapy, 2012, 19(12): 1187-1195.
- [27] Han L, Zhang A, Wang H, et al. Tat-BMPs-PAMAM conjugates enhance therapeutic effect of small interference RNA on U251 glioma cells in vitro and in vivo[J]. Human Gene Therapy, 2010, 21(4): 417-426.
- [28] Lisy MR, Hartung A, Lang C, et al. Fluorescent bacterial-magnetic nanoparticles as bimodal contrast agents [J]. Invest Radiol, 2007, 42(4): 235-241.
- [29] Guo L, Huang J, Zheng LM. Efficient conjugation doxorubicin to bacterial magnetic nanoparticles via a triplex hands coupling reagent[J]. J Nanosci Nanotechnol, 2010, 10(10): 6514-6519.