

非病毒型基因载体研究进展

孙恩杰 杨冬*

(武汉理工大学 理学院生物科学与技术系 武汉 430070)

摘要 非病毒载体以其安全性、低毒性、低免疫反应、靶向性及易于组装等优点被寄予厚望, 对非病毒载体的研究人们投入了很大的精力, 以期在基因治疗方面有所突破。综述了近年来非病毒载体的研究现状, 分别总结阐述了阳离子脂质体载体、多聚阳离子载体、壳聚糖载体、树状高分子载体以及无机壳类 SiO_2 纳米粒子载体。提出非病毒载体今后的发展方向及发展的必要性。

关键词 基因治疗 非病毒载体 阳离子脂质体 阳离子多聚物 壳聚糖 树状高分子 SiO_2 纳米粒子

基因载体问题, 以及与载体相关的免疫反应、细胞毒性与安全性等问题是基因治疗领域亟待解决的关键问题之一。介导基因转移的载体一般分为病毒型载体和非病毒型载体。病毒型载体的缺点在于制备复杂, 有免疫原性, 不能体内反复应用, 存在安全性隐患以及非导向性, 必须进一步改建。非病毒载体是病毒载体的重要补充途径, 其体外实验应用较多。尽管非病毒载体转染效率目前较低, 但非病毒载体由于具有低毒, 低免疫反应, 靶向性和易于组装等优点, 非病毒载体的研究被寄予厚望。对于裸 DNA 和物理转染方法以及来源于细菌的阳离子肽载体, 由于篇幅所限不再在此介绍。

1 阳离子脂质体

阳离子脂质体 (CLs, 又称 cytofections) 中的正电荷分子由三个基本部分构成: 带正电荷的极性头部、疏水锚着区和连接极性与非极性区域的连接键。

极性头部起着脂质体与 DNA、脂质体/DNA 复合物与细胞膜或细胞内其它组分相互结合的作用。头部基团除一种脂质含胺基外, 其余阳离子极性头部都包含胺类基团。在头部区域附加极性基团, 如羟基基团, 可以显著提高体内的肺部转染率^[1]。Floch^[2] 认为将极性头部中的氮原子替代为砷原子可使培养细胞及鼠肺中转染率得到提高。

阳离子脂质体的疏水锚着区域不仅对转染有

显著影响, 且与阳离子脂质体的细胞毒性有关, 阳离子脂质体疏水锚着链长度对转染率的影响仍在探讨中, 其产生的影响很大程度上取决于另外两个区域的物化特征^[2]。

连接键决定了阳离子脂质体的化学稳定性及被生物降解的能力^[1]。连接键类型对转染活力和毒性可能产生影响。带有酰胺键的 DC-chol 对培养细胞的转染活力小; 带有酯键的阳离子脂质体, 如 DOTAP, 易被生物降解且具有细胞毒性小但化学稳定性较差的特点。Alberle 等^[3] 指出由 CLs 引起的细胞毒性可能出现于脂质复合物包入溶酶体前, 加大连接区域长度可减少细胞毒性。Bennett 等^[4] 认为极性头部与疏水锚着区间的连接部位差异会影响阳离子脂质体的转染率。带有较长连接部位的阳离子脂质体能增强与黏膜表面的相互作用。

可以看出, 阳离子脂质体间差异很大, 微小的变动就可引起转染活力及细胞毒性的显著差异。阳离子脂质体介导 DNA 转染的成功依赖众多因素, 这导致脂质体介导转染时, 尤其在体内基因转染中具有多样性。

脂质体介导基因转染时遇到的毒性问题通常与阳离子脂质体/核苷酸复合物的正电性及使用剂量成正相关。叔胺衍生物抑制 PKC 的能力比季铵衍生物低 4~20 倍, 对细胞产生的毒性较低, 其阳离子脂质体的转染活力比季铵衍生物的脂质体高出 10~30 倍^[5]。研究者已致力于用可生物降解的亲水脂分子化学物质构成 CLs。

通常认为阳离子脂质体的转导是正电荷复合

收稿日期: 2003-11-14 修回日期: 2004-02-27

* 通讯作者, 电子信箱: yieh@eyou.com

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

物与质膜融合的结果,膜融合可使脂质体直接进入细胞质。然而,许多人认为细胞内吞作用也参与了这一重要过程。氯喹可以在一定条件下提高阳离子脂质体介导基因转染,是因为它可以提高内吞体的pH从而有效抑制了内吞体与溶酶体的融合作用,促进复合物从内吞体中释放。同时,PKC活性与转染率的反向关系也暗示了内吞作用参与了转导机制的可能性。DNA从内吞体中的释放是DNA转导中的主要障碍,在转移配对结合的DNA/聚赖氨酸体系中加入腺病毒可以促进从内吞体中的释放以提高转染率,与阳离子脂质介导DNA转导类似,将细胞用腺病毒处理后(200PEU/cell)可提高转染率2~7倍^[6]。

大多数阳离子脂质体中都应用了中性脂质DOPE。DOPE是形成稳定单脂双层阳离子脂质体所必需的,同时具有促膜融合作用,可以增加脂质膜的不稳定性,促进复合物被释放入胞浆。Zhou等^[7]在电子显微镜下观察到用DG chol/DOPE转染细胞,结果表明DOPE可使内吞体膜产生不稳定,而DOPC却不行。进一步研究,中性脂质DOPE加入阳离子脂质体可提高转染效率。可通过改变阳离子脂质体中阳离子与中性脂质的比例得到不同的转染率。含有多价阳离子脂质的阳离子脂质体转染活力要比单价阳离子脂质体的高。

目前,DNA脂质体复合物的实际应用有:肺和鼻黏膜上皮细胞的气雾胶法^[8]。动脉内皮的导管术,脑和肿瘤的直接注射和局部组织给药等。

2 阳离子多聚物

2.1 聚乙烯亚胺 PEI

聚乙烯亚胺PEI是阳离子多聚物的典型代表,主要有线状和分枝状两种结构。PEI每三个原子中有一个为胺基原子,可在生理条件下发生质子化,使PEI具有高正电荷密度,并且PEI在较宽pH范围内都具有很强的缓冲能力。阳离子多聚物通过静电作用结合DNA分子,N/P比例对DNA封装程度有很大影响。DNA封装可以保护DNA免受核酶降解,紧密结合的粒子有利于被细胞通过自吞过程如内吞、吞噬、胞饮过程摄入。

粒子尺寸是影响体内转染的一个关键性参数。对于分枝状PEI800/DNA及PEI25复合物,小尺寸的复合物的转染率低于大尺寸的^[9]。有些线状PEI则不同,如线状小尺寸的PEI22在5%葡萄糖中形

成的复合物具有较高转染率。关于转染率的另一重要参数是PEI/DNA复合物的表面电荷,在通常采用的N/P比下($N/P > 4$),PEI/DNA复合物具有+30~35mV的 ζ 电位,选用不同PEI时 ζ 电位无明显差异^[9]。

为进一步提高转染率和靶向特异性,通常在转染复合物载体上连接配体,将非特异性静电复合物改变为特异性受体介导胞内摄取。配体-受体复合物通过内化作用将外源基因转入靶细胞,目前已报道的介导DNA转移的靶向配体有:抗体、LDL、转铁蛋白、生长因子及激素类等。如转铁蛋白在扩散性细胞如肿瘤细胞中呈过度表达,可与其受体结合并被内吞入细胞内,已作为一种靶向配体与阳离子多聚物偶联用于靶向转基因;偶联半乳精配体的PEI可用于靶向特异性识别肝细胞去唾液酸糖蛋白受体达到靶向DNA转移;偶联因子如灭活腺病毒或膜去稳定肽可使DNA有效释放入胞浆,从而提高基因转染效率。

DNA在吞噬泡内富集并进而被降解,很大程度上制约了转导感染率,加入氯喹或甘油可以提高培养细胞的转染率,增加多聚物转基因系统的转染活性。灭活腺病毒粒子加入转染基质或直接偶联至DNA复合物上可大幅提高转染率,只有极少数阳离子多聚物无需附加溶酶体因子便有较高转染率,如聚酰胺-胺型(PAMAM)^[10]。

PEI具有强缓冲能力,起到了“质子海绵”作用,从而引起溶酶体肿胀破裂,使PEI/DNA复合物得以放入胞浆。除此之外,PEI的其它特性,如结构屈曲性、PEI分子量对DNA转移都有重要作用。研究表明高效转染出现于小分子量(约10kDa)以上的PEI复合物。

DNA从胞浆至细胞核的转移也是限制非病毒载体的主要因素,且涉及到胞内运动及透核膜两过程。运用DNA复合物的显微注射入细胞浆研究表明PEI本身可能具有核靶向活性^[11],另外聚阳离子保护了DNA免受核酸酶的降解。聚合物的转染率高低也较为依赖于细胞周期,Brunner等^[12]研究表明,在细胞有丝分裂S期或G2期加入复合物可提高转染率,而在复合物上偶联腺病毒的转染是非细胞周期依赖的,这就成为体内非病毒基因转染的另一制约因素。有报道在聚阳离子上偶联核定位信号序列或在DNA序列中添加转录因子结合位点有

助于解决这一问题^[12]。

PEI/DNA 复合物已成功引入各种体内应用中,研究表明,PEI 可像 DOGS/DOPE 一样用于新生小鼠脑细胞转染以及鼠肾,鼠肺,及皮下生长肿瘤^[13],不同分子量的线状或分枝状的偶联了或未偶联配体的 PEI 得到了各种特异靶向区域依赖的转染率。

2.2 壳聚糖和壳聚糖衍生物

壳聚糖属天然高分子多糖,对细胞毒性极小或没有。壳聚糖带有正电荷,因此可以与负电荷聚合物、大分子在液相中接触发生相互作用。生物制药中壳聚糖有可黏附于黏膜表面的独特特征,这使它成为黏膜药物输送的可用载体。壳聚糖能够打开牢固上皮细胞键连,因此便于大分子物质的通过完好组织的上皮组织的转运,壳聚糖生物制药特征以其很好的生物相容性和低细胞毒性已被广泛认同。

Sato 等^[14]对壳聚糖特征及其吸收率研究表明壳聚糖复合物能显著提高 DNA 在 HeLa 细胞中的摄取(约 40%,裸 DNA 吸收率为 3%),但它们不会增加入血液中巨噬细胞(10vs. 9%)对 DNA 的摄取。后继研究表明,除了较低的摄取效率,壳聚糖/DNA 转导 A549 细胞时远远优于聚半乳糖胺/DNA 复合物。

MacLaughlin 等^[15]研究表明具有适度分子量(102kDa)聚合物可以在各种条件下有效转染和保持悬浮稳定。改变正电荷的壳聚糖胺基团对负电荷 DNA 磷酸根基团(N/P)的比例,对表面电荷、粒子尺寸、转染率及稳定性等参数有显著影响。作为正负电荷确切衡量比例的 N/P 对环境条件敏感(如 pH、温度等)但不能够精确量化。壳聚糖复合物对 COS-1 细胞的转染效率高于裸 DNA。Mao HQ 等^[16]把 DNA 与壳聚糖共聚成壳聚糖 DNA 纳米粒子,实现了 DNA 在多种细胞中的转染。Roy 等^[17]研究表明尽管与脂质体相比处于较低转染水平,但壳聚糖 DNA 纳米粒子可以转染 HEK293、IB3 及 THE 细胞株。杜芝燕等^[18]研究表明壳聚糖纳米粒能将报告基因绿色荧光蛋白载体 pEGFP-N1 递送至靶细胞,且与脂质体介导转染相同浓度的质粒基因时,表现出较阳离子脂质体低的细胞毒性。氯喹能显著增加其它中性、阳性生物聚合物(如明胶)的转导率,但壳聚糖却不受影响。在同类研究中,在表面直接偶联转铁蛋白配体时,可提高其他聚阳离子

载体的转导率,却只能使壳聚糖纳米粒子转导效率略微提高^[17],研究者推测壳聚糖纳米粒子通过独特的内吞途径进入细胞。已经确定: pH、血清浓度及壳聚糖分子量会对转导效率有影响。

壳聚糖与细胞膜具有亲和性,有些基因载体引入壳聚糖,也称为壳聚糖衍生物。近来, Park 等^[19]制备了半乳糖改性的壳聚糖-接枝-葡聚糖 DNA 复合物,实验证明这一体系能有效地转染表达唾液酸糖蛋白受体(ASGR)的 Chang 肝细胞, ASGR 能特异地识别壳聚糖上的半乳糖配体。

2.3 树状高分子载体

材状高分子是一类新型高分子聚合物,表面正电荷密度高,导致荷载 DNA 的浓缩,其静电效应可能受直径及其分子量大小的影响。

树状高分子介导外源基因入胞机制与一些非病毒基因载体,如脂质体、脂精胺、聚氮丙啶的机制相似。复合物表面阳离子电荷与转导效率成正相关关系,将复合物中 DNA 或树状高分子进行放射性标记后分析证实细胞摄取该复合物的主要机制为胞吞机制。将细胞与胞吞抑制剂(如松孢菌素 B 及去氧葡萄糖)共孵育后,其复合物摄取率及相应基因的表达率显著降低。此外,使用溶酶体酸化抑制剂氯喹可提高树状高分子介导的基因转染率。树状高分子因其表面氨基而具有极强的缓冲力,可作为弱碱基对抗溶酶体酸化作用,加速 DNA 或复合物的释放,故而提高基因转移效率。

树状高分子复合物的入核能力随不同细胞类型而有所不同。最近,有研究发现树状高分子介导基因入核时,部分树状高分子与 DNA 复合物并未发生分离,因此推测其所介导的入核过程也可以是树状高分子/DNA 复合物的形式进行的^[13]。

树状高分子在能有效介导 DNA 转染的浓度水平下未显示出细胞毒性作用^[20],对树状高分子在体内和体外细胞毒性研究表明,树状高分子表现出浓度及大小依赖的毒性,其分子和浓度越大,细胞毒性越强^[20]。

树状高分子在有血清存在时仍保持较高的转染活性^[21],且在干燥后仍保有转染能力。这对皮肤细胞的转染提供了体内体外的技术支持。此外,树状高分子在体内的作用特性也有初步研究报道。不同途径导入也会影响复合物靶向细胞的特异性及转染效率。

3 SiO_2

目前已有一系列关于无机硅壳类纳米颗粒的研究报道。李杜等^[22]研究表明以无机二氧化硅为外壳制备的纳米颗粒具有良好的生物相容性,对细胞的生长和代谢没有明显的影响;何晓晓等^[23]将氨基化后 SiO_2 颗粒用于转染,将质粒 DNA (PIRGFP) 导入 COS-7 细胞系,并实现了其在细胞内的高水平表达。研究者认为:一是这种纳米颗粒复合物易与细胞膜融合被受体细胞高效率吞噬;二是这种复合物对 DNA 的结合能力很强;三是这种复合物的形成对 DNA 有保护作用,可免受 Dnase I 降解。Kneucer 等^[24]发现在硅胶表面进行阳离子共价修饰后,将表达半乳糖苷酶的质粒固定于硅纳米微粒后,有效地转染了 COS-1 细胞。Luo D 等^[25]用致密的硅纳米粒子把 DNA/载体复合物以单分子层浓缩于细胞表面提高转染率 8.5 倍。

无机纳米颗粒基因载体具有低分散性,可重复合成性,良好的生物亲和性,较低细胞毒性,代谢产物少,无免疫排斥反应,稳定性好等许多优点。

目前,无机材料制备纳米颗粒非病毒基因载体存在一定局限性:一方面必须对纳米颗粒再进行阳离子聚合物或氨基硅烷化等功能化修饰,程序化较复杂;另一方面对纳米颗粒的大小有一定的要求^[23]从而使其在基因载体的研究与应用中受到限制。

4 总 结

在过去的数年间,非病毒介导基因治疗系统的研究已取得了较大的进展。目前存在的主要问题是转染效率低、表达时间短暂、载体/DNA 长期保存不稳定。随着各项研究的不断深入,相信非病毒基因治疗所遇到各种问题将会得到解决,使基因治疗成为临床常规治疗。

参考文献

- [1] Balasubramaniam RP, Bennett MJ, Aberle AM, et al. Structural and functional analysis of cationic transfection lipids: the hydrophobic domain. *Gene Ther*, 1996, 3: 163~ 172
- [2] Flock V, Losisel S, Gvenin E, et al. Cationic substitution in cationic phosphonolipids: a new concept to improve transfection activity and decrease cellular toxicity. *Med Chem*, 2000a, 43: 4617~ 4628
- [3] Aberle AM, Tablin F, Walker NJ, et al. A novel tetraester construct that reduces cationic lipid associated cytotoxicity. Implications for the onset of cytotoxicity. *Biochemistry*, 1997, 37: 6533~ 6540

- [4] Bennett MJ, Aberle AM, Balasubramaniam RP, et al. Cationic lipid mediated gene delivery to murine lung: correlation of lipid hydration with *in vivo* transfection activity. *J Med Chem*, 1997, 40: 4069~ 4078
- [5] Farhood H, Bottega R, Epand RM, et al. Effect of cationic cholesterol derivatives on gene transfer and protein kinase C activity. *Biochem Biophys Acta*, 1992, 1111(2): 239~ 246
- [6] Yoshimura K, Rosenfeld MA, Nakamura H, et al. Expression of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in the mouse lung after *in vivo* intratracheal plasmid mediated gene transfer. *Nucleic Acids Res*, 1992, 20(12): 3233~ 3240
- [7] Zhou X, Huang L. DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine characterization and mechanism of action. *Biochim Biophys Acta*, 1994, 1189(2): 195~ 203
- [8] Striblioni R. Aerosol gene delivery *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(23): 11277~ 11281
- [9] Ogri M, Brunner S, Schuller S, et al. PEGylated DNA/transferin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. *Gene Ther*, 1999, 6: 595~ 605
- [10] Tang MX, Redemann CT, Szoka FC, et al. *In vitro* gene delivery by degraded polyanidoamine dendrimers. *Bioconj Chem*, 1996, 7: 703~ 714
- [11] Godbey WT, Wu KK, Midos AG, et al. Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine) DNA complexes for gene delivery. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 5177~ 5181
- [12] Brunner S, Sauser S, Carotta S, et al. Cell cycle dependence of gene transfer by lipoplex, polyplex and recombinant adenovirus. *Gene Ther*, 2000, 7(5): 401~ 407
- [13] Godbey WT, Wu KK, Ludtke JJ, et al. Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine) DNA complexes for gene delivery. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(9): 5177~ 5181
- [14] Sato T, Shirakawa N, Nishi H, et al. Formation of a DNA/ polygalcoccaine complex cocaine complex and its interaction with cells. *Chem Lett*, 9(1996): 725~ 726
- [15] MacLaughlin FC, Mumper RJ, Wang J, et al. Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for *in vivo* plasmid delivery. *Control Rel*, 1998, 56: 259~ 272
- [16] Mao HQ, Roy K, Truong Le VL. Chitosan DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. *Control Release*, 2001, 23: 70(3): 399~ 421
- [17] Roy K, Mao H-Q, K W Leng, et al. DNA-chitosan nanospheres: transfection efficiency and cellular uptake. *Proc Int Symp Control Rel Bioact Mater*, 1997, 24: 673~ 674
- [18] 杜芝燕, 黄伟, 李峰生, 等. 新型纳米转染试剂转染 PNP 自杀基因体外杀伤实验, 研究报告, 1009~ 002(2003) 01~ 0004~ 04
- [19] Park Yk, Park YH, Shin BA, et al. Galactosylated chitosan dextran as hepatocyte targeting DNA carriers. *J Controlled Release*, 2000, 91~ 97
- [20] Roberts JC, Bhalgat MK, Zara RJ, et al. Preliminary biological

evaluation of polyamidoamine (PAMAM) starburst dendrimers, J Biomed Mater Res, 1996, 30: 53~ 65

[21] Kukowsak Latallo JF, Raczk E, Raczk E, et al. Intravascular andendobonchial DNA delivery to muring lung tissue using a novel, nonviral vector. Hum Gene Ther, 2000, 11: 1385~ 1395

[22] 李杜, 何晓晓, 王柯敏, 等. 无机硅壳类纳米颗粒对细胞毒性检测, 湖南大学学报(自然科学版), 2002, 29(6); 1~ 6

[23] 何晓晓, 王柯敏, 谭蔚泓, 等. 基于氨基化 SiO₂ 纳米颗粒的新型基因载体, 科学通报, 2002, 47(18): 1365~ 1370

[24] Kneucer C, Sameti M, Bakowsky U, et al. A nonviral DNA delivery system based on surface modified silica nanoparticles can efficiently transfect cells *in vitro*. Bioconj Chem, 2000, 11(6); 926~ 932

[25] Luo D, Saltzman WM. Enhancement of transfection by physical concentration of DNA at the cell surface. Nat Biotechnol, 2000, 18(8): 893~ 895

The Advance of Nonviral Gene Delivery Vectors

SUN En jie YANG Dong

(Wuhan University of Technology Department of Biological Science and Technology, Wuhan 430070, China)

Abstract Having advantages in safety, lower toxicity, lower immune response and facilitate to assemble, nonviral gene delivery vectors is expected for much. Much researches have been devoted into nonviral gene vectors to bring breakthrough in gene therapy. This paper reviews the current development in study of nonviral gene vectors, especially in work in the vectors of cationic lipid, polycation, chitosan, Starburst PAMAM Dendrimers and silica nanoparticles respectively. At last, it is points out that the prospects and the necessity of developing the nonviral gene delivery systems.

Key words Gene therapy Nonviral gene vectors Cationic lipid Polycation Chitosan Starburst PAMAM dendrimers Silica nanoparticle

(上接第 20 页)

[27] Marc D M, Michelle W, Hiten DM. Conserved histone variant H2A. Z protects euchromatin from the ectopic spread of silent heterochromatin. Cell, 2003. 112: 725~ 736

[28] Peterson CL, Workman JL. Promoter targeting and chromatin remodeling by the SWI/SNF complex. Curr Opin Genet Dev, 2000, 10(2): 187~ 192

[29] Walters MC, Magis W, Fiering S, et al. Transcriptional enhancers act in cis to suppress position effect variegation. Genes Dev, 1996, 10: 185~ 195

Research Advance on Mechanism of Barrier

LIU Feng tao REN Zhao rui*

(Institute of Medical Genetics, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200040, China)

Abstract In the eukaryotic cells, despite how close the regulation elements of active and inactive genes are frequently, they do not affect each other expression level. The reason is that there are some boundary elements separating chromatin into different domains. Barrier is a kind of boundary elements, which blocks the spread of heterochromatin and insulates the neighboring active genes from repression effects. This review will focus on recent data that illustrated the mechanism and mode of action of barrier elements.

Key words Barrier Heterochromatin Euchromatin Histone acetyltransferase Histone deacetylase