

非病毒基因载体的研究进展

汤谷平, 陆 晓

(浙江大学化学生物和药物研究所, 浙江 杭州 310028)

[摘 要] 理想的转基因载体应具有安全性高、生物相容性好、靶向特异性强及体内外转染效率高的特性。非病毒基因载体具有低免疫原性和易制备等特点, 是一类较为理想的基因载体。

[关键词] 基因传递; 基因治疗; 非病毒载体

[中图分类号] R 730.54 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2009)01-0001-06

基因治疗的关键是选择合适的基因载体及基因导入方法, 使目的基因能够在靶细胞中获得安全、高效、可控且稳定的表达。目前, 用于基因治疗的载体主要有病毒载体(viral vector)和非病毒载体(non-viral vector)2种。常用的病毒载体, 如腺病毒(adenovirus, AV)、逆转录病毒(retrovirus, RV), 虽其经改造后去除了病原性, 保留了高的基因转染效率, 但因制备困难、目的基因容量小、靶向特异性差, 以及自身免疫原性和生物安全性问题, 限制了它们的应用^[1]。而非病毒载体具有低毒、低免疫反应, 外源基因随机整合率低且携带基因大小类型不受限制等优点, 已成为基因治疗中的热点和当前药剂学研究的前沿课题^[2-3]。对于非病毒载体, 其基因传递方法又可分为物理法(carrier-free gene delivery)和化学法(synthetic vector-based gene delivery)^[4-5]。因此, 无论是基因载体还是传递方法的发展都将对基因治疗产生深远的影响。

《Journal of Gene Medicine》对2008年在临床基因治疗中所用载体的类型和各期基因临床试验的情况进行了调查。该调查发现载体材料的使用中, 腺病毒载体占24.9%(367例), 为各种载体之首, 但进入Ⅲ期临床试验的基因治疗占3.2%(47例), 见图1。也就是说在基因治疗的临床应用上, 研究者变得更谨慎和小心, 就目前基因治疗的状况而言, 安全性, 即致畸、致癌和致突变, 靶向特异性及体内转染效率等

问题, 已成为基因治疗所遇到的瓶颈问题。因此, 如何研制出安全有效的、生物相容性好的基因药物载体, 如何提高非病毒性基因载体的靶向特异性和体内外转染效率, 已经是迫在眉睫的关键问题。

1 裸DNA(naked DNA)

裸DNA能够转染大多数细胞, 易大量制备。但裸DNA转染效率低, 基因表达时间短, 因此在临床应用上受到较大的限制^[6-7]。目前, 裸DNA主要利用如针注射、电穿孔、基因枪等物理方法^[8-9], 将目的基因载入细胞中并进行表达。

Bekeredjian等测试了在超声环境下, 微泡对基因转染的影响。载入DNA的微泡在超声的辅助下可大大增加基因转染效率, 并随着超声强度的增加细胞死亡率也相应增加。课题组还用靶向超声微泡的基因传递方法在肝肿瘤局部注入高浓度的治疗药物, 结果发现, 能瞬时增加

收稿日期: 2008-10-08 修回日期: 2008-12-15

基金项目: 国家重点基础研究(973)资助项目(2004CB518802); 国家高科技研究发展计划(863计划)项目(2007AA03Z355); 国家自然科学基金项目(30571068); 浙江省自然科学基金重点项目(Z207572)

作者简介: 汤谷平(1961—), 男, 博士, 化学生物学教授, 博士生导师, 主要从事生物材料、药物控制释放和非病毒性基因药物载体研究; E-mail: tangguping@yahoo.com.cn.

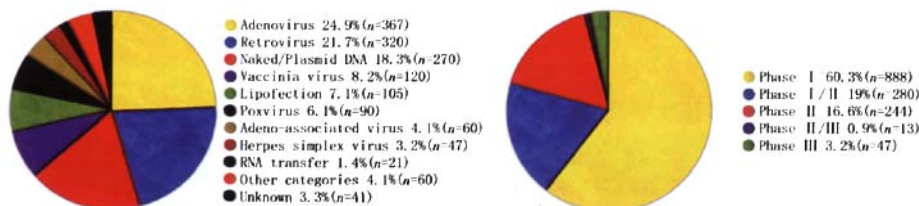


图1 2008年在临床基因治疗中所用载体和各期基因临床试验的情况

Fig. 1 Vectors used in gene therapy and phases of gene therapy clinical trials in 2008

肝肿瘤组织的毛细血管通透性。

电穿孔是利用瞬间电脉冲能可逆地增加细胞膜通透性这一原理,将裸DNA注入治疗部位的同时,在局部加以合适强度和合适持续时间的电脉冲,以利于DNA分子进入细胞内。最近研究显示用纳米电穿孔方法,即用毫秒或纳秒级的电脉冲直接将裸DNA传递到细胞核内且方法可行。

粒子轰击法,又称“基因枪”,是在目的基因内包以金属微粒(通常为1~3 μm直径惰性金属颗粒),通过电场或气压加速直接将其喷射到细胞或组织表面,使DNA穿透细胞膜,进入细胞质或细胞核中。目前,认为该法对于皮肤、黏膜及外科手术暴露组织的基因传递效果较为理想。

2 脂质体和脂质体复合物(liposomes or lipoplexes)

脂质体是由磷脂双层构成的具有水相内核的脂质微囊,其作为抗癌药物的载体对癌细胞具有靶向性、无免疫原性、缓释时间长、毒副作用低及载药率高等优点。由于脂质体既能包封脂溶性药物,又能包封水溶性药物,在肿瘤治疗中显示出明显的优越性。

近年来,国内外研究者在脂质体的制备工艺、表面修饰、靶向性等方面进行了广泛研究,前体脂质体、长循环脂质体、阳离子脂质体等新型脂质体不断涌现,为脂质体的临床应用开辟了广阔前景。前体脂质体是在普通脂质体制剂中加入一定量的固相载体,通过不同的干燥工艺使其形成流动性较好,易在水中分散或溶解的粉末^[10]。North等^[11]用脂质体包裹肿瘤相关

抗原BLP25制成肿瘤疫苗,用于治疗非小细胞肺癌和前列腺癌患者,延长了患者的存活时间。Richards等人^[12]将脂质体包被的多柔比星(ADR)对胃癌患者进行瘤周黏膜下注射,与单独注射游离ADR比较,其在淋巴结内药物浓度明显提高,而且持续时间长、毒副作用小、抗瘤疗效高。

3 阳离子高聚物(cationic polymer)

阳离子高聚物载体是利用带正电的高聚物静电结合浓缩DNA,再通过静电作用结合细胞膜或通过携带的靶向配体与细胞膜上的受体结合,通过内吞、逃离内体和胞质转运的方式,使DNA进入细胞核,从而表达目的基因。阳离子多聚物具有易合成和改性,无免疫原性,能与DNA紧密结合,保护DNA免受核酸酶的降解,便于进行靶向性及生物适用性改性等诸多优点。常见的阳离子高聚物有聚赖氨酸、聚乙烯亚胺、聚氨基酯、聚脒、壳聚糖树枝状聚合物等。

3.1 聚乙烯亚胺(polyethylenimine, PEI) 研究表明,PEI在体内外均有较高的转染效率,但是PEI不易被细胞内的酶代谢,易在核内聚集,引起细胞毒性。因此,需对PEI进行改性,使聚乙烯亚胺表面聚乙二醇化,即“PEGylation”,以减小其毒性。其中将聚乙二醇与聚乙烯亚胺共聚、聚乙二醇与聚乙烯亚胺偶合和聚乙二醇对聚乙烯亚胺进行物理包裹等都是可选择的策略。因为聚乙二醇的介入,使聚乙烯亚胺与DNA所形成的微粒在血液循环中稳定性增加,防止微粒在生理条件下聚集和沉淀。Thomas等用不同分子量的聚乙二醇偶合于PEI 25 kDa上,发现PEG在PEI所形成的微粒有不同的结

构形式,如核壳结构(core-shell structure)和均相结构(homogenous),其中均相结构微粒易被细胞吞噬。他们还将三元共聚化合物 hy-PEI-g-PCL-b-PEG应用于基因药物的释放,该共聚物的特点是可生物降解^[13]。Kim 将半乳糖和聚乙烯胺通过活性聚乙二醇的“桥”连接起来,同时利用活性 VS-PEG-NHS 将 RGD 短肽键合于载体材料,偶合配体的聚乙烯胺在基因转染实验中均显示靶向细胞选择性^[14]。

3.2 生物相容性载体材料 为解决基因载体材料生物相容性的问题,天然高分子生物材料如胶原、透明质酸、壳聚糖和海藻酸盐等被用于基因药物载体的研究。其中壳聚糖及其衍生物在基因载体系统的研究最为广泛。Leong 等^[15]将壳聚糖先与DNA形成复合物微粒,把聚乙二醇(NHS-PEG-MAL)偶合于复合物微粒上,将肿瘤细胞上具有靶向受体表达的转铁蛋白(transferrin)偶合在复合物微粒上,形成一种组装式、靶向性的转基因药物载体,该组装式载体在HEK293细胞株上具有很高的转染效率。Chong 等^[16]将聚乙烯胺(25 kDa)偶合于壳聚糖上制成母体材料,然后把靶向于肝细胞的半乳糖基键合于母体材料上,制成具有靶向肝细胞的基因药物载体。他们还将壳聚糖进行甘露糖化作为靶向于巨噬细胞的甘露糖受体,以作为鼻腔内免疫体的辅助释放系统。

除壳聚糖外,植物多糖也是一类良好的载体材料。大量的药理试验证明,多糖类药物主要作用于免疫系统、血液系统和消化系统等。作为基因药物载体,多数植物多糖的结构本身不能与质粒DNA结合,因此需要用化学方法对植物多糖的结构进行修饰改性。由于植物多糖的糖苷环结构中带有丰富的羟基、羰基等,为载体材料本身的活化提供了可能性。Takeda^[17]等报道了用天然裂褶多糖(schizophyllan, SPG)、聚乙烯胺和质粒DNA三元复合物在抗原递呈细胞上被细胞吞噬摄取的研究,用原子显微镜观察了细胞的吞噬过程,结果发现该复合物易被细胞吞噬,说明糖羟基的存在易使复合物在细胞膜表面黏附及摄取。

环糊精(cyclodextrin, CyD)是直链淀粉在由芽孢杆菌产生的环糊精葡萄糖基转移酶作用

下生成的一系列环状低聚糖,其中具有重要意义的是含有6、7、8个葡萄糖单元分子的 α 、 β 、 γ -环糊精。在基因药物载体中,由于其所具有的活泼羟基基团,可以与聚阳离子材料(聚赖氨酸、聚乙烯胺及树枝状高分子载体材料)结合,制成具有生物相容性、可生物降解的基因药物载体系统。

Davis 等^[18]报道用分子量为25 kDa的直链型和树枝状聚乙烯胺,分别偶合于经过活化的 β -环糊精上,制得 β -CyD-LPEI和 β -CyD-bPEI,对所合成的载体材料进行体外细胞学实验和体内动物实验。我们课题组用 β -环糊精上的活泼羟基,用N,N'-二羰基咪唑对环糊精进行修饰,将低分子量的聚乙烯胺偶合于 β -环糊精上,得到了满意的体内外转染效率^[19-21]。Li用 β -环糊精为核,将聚乙二醇穿过 β -环糊精的空穴,再将小分子的聚乙烯胺偶合于 β -环糊精的表面羟基上,形成一个多功能的组合式基因药物载体,所合成的载体材料极易溶于水体系中,且有很强的DNA缩合能力,在HEK293细胞上表现出良好的转染效率^[22]。同时,用低分子量的聚乙烯胺经N,N'-二羰基咪唑活化后,偶合于 β -环糊精的7个羟基上,形成一个以 β -环糊精为核、聚乙烯胺为侧基的树枝状聚合物,为 β -环糊精-聚阳离子材料在基因药物的研究领域开创了新的方法。

4 配体介导的靶向载体

要使非病毒载体能在肿瘤细胞或特异组织中定向迁移并携带DNA进行细胞转染,就需要在载体表面进行靶向基团修饰,使其具有靶向特异性。叶酸、转铁蛋白、半乳糖、TAT肽及胆甾醇等靶向配体偶合于载体上可以提高载体的靶向性。

4.1 叶酸受体 研究表明叶酸受体在大部分恶性肿瘤细胞表面均有过度表达。叶酸受体主要有 α -FR、 β -FR和 γ -FR三种亚型,其中 α -FR在卵巢癌、子宫癌、睾丸癌、肺癌等一些上皮组织的恶性肿瘤细胞中高表达; β -FR在头颈部鳞状细胞癌及一些非上皮来源的癌组织中高表达; γ -FR分布很少,主要在血液组织出现恶变时有过度表达。叶酸受体的表达水平与肿瘤的

发展阶段有关,早期肿瘤的叶酸受体表达较低,晚期及高度恶变的肿瘤受体表达增强。

用壳聚糖为核心偶合聚乙二醇形成亲水性的载体材料,再将叶酸偶联于载体材料上,是一种有效改善壳聚糖性质的方法。Yang 等报道壳聚糖经过聚乙二醇偶合后溶解性大为改善,再偶合叶酸配体后,该载体材料就成为一种具有一定靶向性的复合式基因载体^[23]。

4.2 转铁蛋白受体 Wanger 等将聚乙烯亚胺与转铁蛋白偶合制成 Tf-PEI 共聚物,对 50 种细胞进行了体外转染实验,发现 Tf-PEI 共聚物对 10 种肿瘤细胞的转染具有较高的选择性;同时,对动物进行了体内的研究,实验结果表明其在肿瘤组织中的表达明显高于其它组织器官。他们还用冷光共聚焦显微镜活体观察了 Tf-PEI/DNA 和 Tf-PEG-PEI/DNA 复合物在荷瘤小鼠中的分布及在肿瘤部位的迁移、富集,为非病毒基因载体材料在动物体内的研究奠定了基础^[24]。

4.3 短肽蛋白 1988 年 Green 和 Franke 研究小组^[25]分别发现 HIV-1 的 TAT 短肽蛋白具有穿越细胞膜进入细胞的特性,随后一批能跨膜的短肽蛋白相继被发现,如 Antp、VP22 及 Transportan 等。这类具有穿膜功能的短肽被科学家统称为细胞膜穿透肽(cell-membrane penetrating peptide, CPPs)。CPPs 不但自身具有穿透细胞膜的能力,而且能够介导与其相连的各种载体材料跨膜进入细胞,这对于不能靠自身能力进入细胞的载体材料是个非常有意义的发现。因此,有许多课题组开展了短肽蛋白介导的穿膜体系研究,噬菌体展示技术已经筛选出许多具有靶向功能的短肽蛋白。Yang 课题组将短肽 TAT 偶合于聚乙二醇-胆固醇载体材料上,形成双功能靶向载体 TAT-PEG-b-Chol,其中 TAT 序列为 NH₂-YGRKKRR QRRR,结合 FITC 技术和量子点技术发现,该组装式载体在肿瘤细胞具有极高的转染效率^[26]。汤谷平课题组将 TAT、MC10 和 CY11 等功能性靶向短肽偶合于 PEI-CD 载体材料上,在体外细胞转染实验中显示出较强的肿瘤细胞选择性^[27-29]。

4.4 激素受体 雌激素受体、孕激素受体不仅

存在于性激素靶器官肿瘤,而且还存在于一些非性激素靶器官肿瘤,如肺癌、甲状腺腺瘤、脑膜瘤、黑色素瘤、食管癌、胰腺癌、肝癌等。这就为以激素介导的基因药物治疗肿瘤及其他疾病提供了可能。

Yang 课题组用癸二酰氯(sebacoyl chloride)和 N-甲基二乙醇胺(N-methyldiethanolamine)合成聚(N-甲基二乙醇胺癸酯)[poly(N-methyldiethanolamine sebacate)]。配体胆甾醇则用溴乙胺(bromoethylamine)与酰氯化的胆甾醇(cholesteryl chloroformate)在三乙胺作用下,活化 3 位碳上带活性基团的胆甾醇,然后与上述两个化合物结合,形成以聚(N-甲基二乙醇胺癸酯)为骨架结构,胆甾醇为侧链配体的基因药物载体。在 HEK293、HepG2、4T1、HeLa、MDA-MB-231 细胞株及骨髓干细胞上均表现为低细胞毒性和高转染效率^[30]。

5 展 望

对非病毒性基因药物载体的研究是基因治疗的重要方法和手段,除了研制安全有效的基因药物、靶向特异性的载体外,对载体在亚细胞的阻碍问题、载体的核定位信号问题、载体传送给过程的障碍穿透问题、小分子药物和基因药物协同治疗问题、基因的免疫治疗和载体携带 RNA 药物的研究都是目前基因治疗领域亟待解决的问题及研究发展方向。

References:

- [1] COLLINS S A, GUINN B A, HARRISON P T. et al. Viral vectors in cancer immunotherapy: which vector for which strategy [J]. *Curr Gene Ther*, 2008, 8(2): 66-78.
- [2] KAWAKAMI S, HIGUCHI Y, HASHIDA M. Nonviral approaches for targeted delivery of plasmid DNA and oligonucleotide [J]. *J Pharm Sci*, 2008, 97: 726-745.
- [3] LI S D, HUANG L. Non-viral is superior to viral gene delivery [J]. *J Control Release*, 2007, 123(3): 181-183.
- [4] LIU D, REN T, GAO X. Cationic transfection lipids [J]. *Curr Med Chem*, 2003, 10: 1307-1315.

- [5] NEU M, FISCHER D, KISSEL T. Recent advances in rational gene transfer vector design based on poly (ethylene imine) and its derivatives [J]. *J Gene Med*, 2005, 7(8): 992-1009.
- [6] VAN DER WOUDE E A, SANDOVICI M, HENNING R H, et al. Approaches and methods in gene therapy for kidney disease [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2004, 50(1): 13-24.
- [7] NISHIKAWA M, TAKAKURA Y, HASHIDA M. Theoretical considerations involving the pharmacokinetics of plasmid DNA [J]. *Adv Drug Deliver Rev*, 2005, 57(5): 675-688.
- [8] BEKEREDJIAN R, BOHRIS C, HANSEN A, et al. Impact of microbubbles on shock wave-mediated DNA uptake in cells in vitro [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2007, 33(5): 743-750.
- [9] BEKEREDJIAN R, KROLL R D, FEIN E, et al. Ultrasound targeted microbubble destruction increases capillary permeability in hepatomas [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2007, 33(10): 1592-1598.
- [10] AL-DOSARI M S, KNAPP J E, LIU D. Hydrodynamic delivery [J]. *Adv Genet*, 2005, 54: 65-82.
- [11] NORTH S, BUTTS C. Vaccination with BLP25 liposome vaccine to treat non-small cell lung and prostate cancers [J]. *Expert Rev Vaccines*, 2005, 4(3): 249-257.
- [12] RICHARDS R L, RAO M, VANCOTT T C, et al. Liposome-stabilized oil-in-water emulsions as adjuvants; increased emulsion stability promotes induction of cytotoxic T lymphocytes against an HIV envelope antigen [J]. *Immunol Cell Biol*, 2004, 82(5): 531-538.
- [13] HOLGER PETERSEN, PETRA M FECHNER et al. Synthesis, characterization, and biocompatibility of Polyethylenimine-graft-Poly (ethylene glycol) block copolymers [J]. *Macromolecules*, 2002, 35: 6867-6874.
- [14] KAZUYOSHI S, KIM S W. A new synthesis galactose-poly (ethylene glycol)-polyethylenimine for gene delivery to hepatocytes [J]. *J Controlled Release*, 2002, 79: 271-281.
- [15] LEONG K W, MAO H-Q, TRUONG-LE V L, et al. DNA-Polycation nanospheres as nonviral gene delivery vehicles. [J]. *J Controlled Release*, 1998, 53(1-3): 183-193.
- [16] PARK I K, KIM T H, KIM S I, et al. Visualization of transfection of hepatocytes by galactosylated chitosan-graft-poly (ethylene glycol)/DNA complexes by confocal laser scanning microscopy. [J]. *Int J Pharmaceut*, 2003, 257: 103-110.
- [17] AZZAM T, ELIVAHU H, SHAPIRA L, LINIAL M, et al. Polysaccharide-oligoamine based conjugates for gene delivery [J]. *J Med Chem*, 2002, 45: 1817-1824.
- [18] SWAROOP M, JOREMY D H, PAUL W, et al. Imidazole group on a linear, cyclodextrin-containing polycation produce enhanced gene delivery via multiple processes [J]. *J Control Release*, 2006, 116: 179-191.
- [19] TANG G P, GUO H Y, ALEXIS F, et al. Low molecular weight polyethylenimines linked by β -cyclodextrin for gene transfer into nervous system [J]. *J Gene med*, 2006, 8: 736-744.
- [20] ZHAO Dan-jun, LU Xiao, JIANG Qi-ying, et al. (赵丹军, 陆晓, 姜启英, 等). Preparation of floxuridine loaded polycation and its antitumor activity [J]. *Journal of Zhejiang University: Medical Sciences* (浙江大学学报: 医学版), 2009, 38(1): 53-58. (in Chinese)
- [21] WANG Zhong-ren, CHEN Dan, ZHOU Jun, et al. (王中仁, 陈丹, 周峻, 等). Aspirin-PEI- β -CyD as a novel non-viral vector for gene transfer [J]. *Journal of Zhejiang University: Medical Sciences* (浙江大学学报: 医学版), 2009, 38(1): 46-52. (in Chinese)
- [22] LI J, YANG C, LI H Z, et al. Cationic supramolecules composed of multiple oligoethylenimine-grafted- β -cyclodextrins thread on a polymer chain for efficient gene delivery [J]. *Advanced Material*, 2006, 18: 2969-2974.
- [23] PEGGY C, MOTOICHI K, JOO E C, et al. Synthesis and characterization of chitosan-g-Poly (ethyleneglycol)-folate as a non-viral carrier for tumor-targeted gene delivery [J]. *Biomaterials*, 2007, 28: 540-549.
- [24] RALFKIRCHEIS, LIONEL W, WAGNER E. Design and gene delivery activity of modified polyethylenimines [J]. *Adv Drug Deliver Rev*,

- 2001,53:341-358.
- [25] IJ GIDEBRABDT, M IYER, WAGNER E, et al. Optical imaging of transferring targeted PEI/DNA complexes in living subjects [J]. *Gene Therapy*, 2003, 10: 758-764.
- [26] LI L H, KUN G, JIA L, et al. Biologically active core/shell nanoparticles self-assembled from cholesterol-terminated PEG-TAT for drug delivery across the blood-brain barrier [J]. *Biomaterials*, 2008, 29: 1509-1517.
- [27] LAI Li-hua, JIANG Qi-ying, CHEN Dan, et al (来利华, 姜启英, 陈丹, 等). Peptide TAT modified polyethylenimine- β -cyclodextrin for gene delivery [J]. *Journal of Zhejiang University: Medical Sciences* (浙江大学学报: 医学版), 2009, 38(1): 15-23. (in Chinese)
- [28] LIU Jun, HU Yi-ping, JIANG Qi-ying, et al (刘君, 虎义平, 姜启英, 等). Peptide MC10 mediated PEI- β -CyD as a gene delivery vector targeting to Her-2 receptor [J]. *Journal of Zhejiang University: Medical Sciences* (浙江大学学报: 医学版), 2009, 38(1): 7-14. (in Chinese)
- [29] HU Yi-ping, JIANG Qi-ying, CHEN Dan, et al (虎义平, 姜启英, 陈丹, 等). Peptide CY11 conjugated polyethylenimine- β -cyclodextrin for gene delivery [J]. *Journal of Zhejiang University: Medical Sciences* (浙江大学学报: 医学版), 2009, 38(1): 24-30. (in Chinese)
- [30] WANG Y, GAO S J, YE W H, et al. Co-delivery of drug and DNA from cationic core-shell nanoparticles self-assembled from a biodegradable copolymer [J]. *Nature Materials*, 2006, 15: 791-796.

[责任编辑 黄晓花]

中国博士后科学基金首批特别资助及第44批面上资助结果揭晓

近日,中国博士后基金会公布了首批特别资助及第44批面上资助名单。浙江大学共有28人获博士后基金特别资助,67人获第44批博士后基金面上资助(其中16人获一等资助,51人获二等资助)。获得特别资助人数和面上一等资助人数均列全国高校第二位。

中国博士后科学基金设立于1986年,旨在资助具有创新能力和发展潜力的优秀博士后研究人员,每年分两批申报。2008年1月,中国博士后科学基金会重新制定了《中国博士后科学基金资助规定》,在继续进行面上资助的同时,推出了特别资助办法,对在站期间取得重要科研成果和研究能力突出的博士后研究人员给予资助。面上资助强度分为一等资助5万元和二等资助3万元两档;特别资助给予一次性10万元资助金。据悉,我校申报中国博士后基金首批特别资助的获准率为54.9%,高出全国平均数26个百分点。