

壳聚糖及其衍生物基因载体的研究进展

黄进 汪世龙^{*} 孙晓宇 李文哲 姚思德

(同济大学生命科学与技术学院, 上海 200092)

摘要:壳聚糖是一种天然生物可降解性、生物相容性好而且安全无毒的多糖, 因而它成为基因治疗载体研究的热点。本文就近年来壳聚糖及其衍生物作为基因载体转染的研究进展和现状作简要的综述, 并对转染率的影响因素如壳聚糖的分子量、粒径、脱乙酰度等进行着重介绍。

关键词:壳聚糖; 纳米粒; 非病毒载体; 转染率

自20世纪90年代初期首例基因治疗临床试验获得成功后, 人们对基因治疗的临床疗效充满信心。然而1999年美国宾夕法尼亚大学却发生了因应用重组腺病毒载体不当引发机体致命免疫反应而死亡的“杰辛格事件”^[1,2]; 在2000年法国也发生了用逆转录病毒载体基因治疗重症联合免疫缺陷病而诱发白血病的恶性事件, 因此使得基因治疗的载体问题引起关注。

目前, 基因治疗常用的载体系统主要包括两大类: 病毒载体系统和非病毒载体系统。病毒载体系统有逆转录病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体等。尽管病毒载体系统基因传递效率高达90%以上, 但仍存在许多难以克服的局限性^[3], 如逆转录病毒不能感染非分裂细胞; 腺病毒不能稳定整合于宿主细胞基因组内, 故难以长期稳定表达, 甚至可能引起机体强烈的免疫反应; 腺相关病毒载体容量小, 难以作为大片段基因所利用且制备困难。于是研究者把目光转移到安全无毒而且无免疫原性的非病毒载体。传统的非病毒载体如裸DNA、脂质体、阳离子多聚物等, 虽然安全但基因传递效率极低难以获得有意义的基因表达^[4]。因此, 发展基因治疗的关键在于开发安全、有效并具有优良特性的非病毒基因转运载体系统, 近年来发展起来的一种新型非病毒基因转运载体——壳聚糖, 除了具有可生物降解性和低细胞毒性等优越性之外, 还具有独特的跨细胞膜能力而倍受关注^[5]。本文就近年来壳聚糖及其衍生物在基因治疗中的应用进展作一简要综述。

1 壳聚糖性质

1811年, 法国人H. Braconnot用温热的稀碱溶液反复处理蘑菇提取到甲壳素至今, 人们对甲壳类物质的研究已经100多年了, 现在全世界每年由生物合成的甲壳素约为100亿吨, 可提取壳聚糖已达20亿吨以上^[6], 壳聚糖成为自然界中仅次于纤维素的取之不尽、用之不竭的第二大天然生物有机资源。壳聚糖(chitosan)也称为几丁聚糖, 是甲壳质(chitin)部分脱乙酰后的产物, 脱乙酰度和分子量是其两大理化指标。甲壳质广泛存在于蟹、虾、金龟子等甲壳类动物外壳和香菇等真菌类以及细菌类细胞膜中。它是由2-氨基-2-脱氧葡萄糖单体通过 β -(1,4)糖苷键连接起来的直链多糖, 学名为(1,4)-2-氨基-2-脱氧- β -D葡萄糖^[7], 具有无毒安全, 生物相容性好等优点。壳聚糖在发酵、造纸、烟草、纺织、医疗、农业、环保、日化等领域均都有较深入的应用。

2 壳聚糖基因载体

1995年, Mumper等^[8]首次报道壳聚糖溶液与DNA以自聚集的方式沉淀能得到一种粒径大小为150

基金项目:上海市科技攻关项目(03DZ19223)资助;

作者简介:黄进(1981—), 男, 同济大学硕士研究生, 主要研究方向为壳聚糖基因载体;

通讯联系人:汪世龙(1964—), 男, 同济大学生命科学与技术学院教授、博士生导师, 现主要从事纳米生物材料的研究, wsl@mail.tongji.edu.cn

~500nm 的复合物,壳聚糖/DNA 复合物的平均粒径与所用壳聚糖分子量有关(108~540kDa),而与缓冲液组成无关,于是初步认为壳聚糖有用于基因治疗载体的潜质。实验证明,该复合物转染效率仍低于阳离子脂质体和病毒载体,但壳聚糖作为天然高分子所具有的生物可降解性、良好的生物相容性、无毒安全等特性却引起研究者的兴趣。随后 Mao 等^[9]在制备壳聚糖/DNA 复合物之前对壳聚糖用醋酸进行预处理,用 NaOH 调节其 pH 至 5.5~5.7 左右,并在壳聚糖与 DNA 形成复合物的反应中加入 Na₂SO₄。结果得到大小在 200~500nm 结构紧凑的壳聚糖/DNA 复合物微球,该报道首次得到壳聚糖促进转染的正向数据。

2.1 壳聚糖粒径

基因转染是一种检验基因载体递送性能最有说服力的手段。无论是评价所设计载体的性能,还是应用载体进行基因治疗,都要用基因转染来作为评价方法。从载体递送基因的释放角度看^[10],壳聚糖/DNA 复合物的粒径大小尤为重要,尺寸的变化将严重影响复合物在体内的循环时间、靶向细胞的进入以及在体内的效用。虽然有许多有关壳聚糖转染的相关报道,但是关于壳聚糖/DNA 复合物的尺寸与转染率的关系,不同研究者所得的结论似乎是矛盾的。一般情况下,纳米粒子粒径在 100nm 以下能够很好的保证细胞对粒子的内吞^[11]。Illum 等^[12]合成出粒径为 20~500nm 壳聚糖/DNA 复合物,实验表明粒径越小的复合物越容易被细胞内吞或者胞饮,因而转染效率就越高。Erbacher 等^[13]发现壳聚糖/DNA 复合物的粒径为 50~100nm 时,进行体外实验的转染率甚至比 PEI 的还高。但是 Nakanishi 等^[14]的研究表明中等粒径大小为 0.4 μ m~1.4 μ m 的壳聚糖/DNA 颗粒具有最高的转染率,而小于 400nm 的复合物的转染率反而降低。

对于壳聚糖/DNA 复合物粒径大小的影响因素也有报道,包括有壳聚糖的分子量、DNA 浓度、盐浓度、pH 值、电荷比率和温度等,Mao 等^[15]总结研究了影响壳聚糖/DNA 复合物粒径尺寸的因素,发现复合物的粒径尺寸主要由 N/P 比决定,而 Na₂SO₄ 的浓度为 2.5~25mmol/L 时对复合物的粒径无明显影响,而且 DNA 的大小为 5.1~11.9kb 时对复合物的尺寸也无影响。

2.2 壳聚糖分子量

关于壳聚糖纳米粒的分子量对转染效率的影响以及如何选择合适的分子量也是壳聚糖作为基因载体研究中的重点。Ishii 等^[16,17]研究壳聚糖分子量、体系 pH 值、血清浓度等对不同的细胞的转染效率影响,结果显示壳聚糖的最佳分子量取决于细胞系,10~50kDa 的壳聚糖是最好的基因载体,而分子量的大小可能影响到壳聚糖/DNA 复合物的稳定性、细胞转运的效率以及细胞内吞后 DNA 从复合物上酶解等。

Richardson 等^[18]采用三组分子量分别为小于 5000Da,5000~10000Da,大于 10000Da 的高纯度壳聚糖片断用碘标记后包裹 DNA 对雄鼠进行体内实验,结果表明这些低分子量的壳聚糖既无溶血性又无生物毒性,而且能够与 DNA 形成复合物保护其不被酶解,同时他们还发现分子量越低的壳聚糖在肝中的累积量越低,因此推测分子量更低的壳聚糖也可能作为基因载体。Lee 等^[19]采用分子量为 22kDa 的低分子量的壳聚糖进行基因转染实验,发现与高分子量的壳聚糖不同的是,低分子量的壳聚糖在水中极易溶解,且在生理缓冲液中便可以与 DNA 形成复合物,结果表明低分子量的壳聚糖的转染率比裸 DNA 和 PLL 都高,用 MIT 法证明其的生物毒性比 PLL 还低。Mao 等^[20]在研究高聚壳聚糖解聚也提出正是由于低分子量壳聚糖的可溶性因而其对基因载体递送系统的设计更有价值。

2.3 壳聚糖脱乙酰度

对壳聚糖除了研究其分子量对转染率的影响外似乎很少有人把目光放在壳聚糖其它性质,而 Kiang 等^[21]便把壳聚糖的脱乙酰度与基因的转染率关联起来,研究结果表明随着脱乙酰度的降低,DNA 的包封率和复合物的电荷比率也随着增加,使得壳聚糖/DNA 复合物在血清浓度中不稳定,因此转染效率也随之降低。在建构合适的壳聚糖/DNA 复合物时,壳聚糖的脱乙酰度也是一个需要考查的重要因素。

3 壳聚糖/DNA 复合物的形成机制

DNA 究竟是以何种形式或作用与壳聚糖形成纳米粒复合物,有报道^[22]采用络合、吸附、包裹、嵌入等,目前普遍接受的壳聚糖与 DNA 以静电络合的方式形成复合物的。因为壳聚糖上的游离氨基质子化

使得壳聚糖分子带正电荷,可以与带负电荷的 DNA 以静电作用结合在一起而形成壳聚糖/DNA 复合物。用溴化乙锭(EtBr)进行荧光扫描再进行凝胶电泳可以证明复合物之间以静电作用。Leong 等^[23]把壳聚糖加入经溴化乙锭(EtBr)染色的 DNA 溶液中,随着阳离子壳聚糖竞争键的作用,用荧光光度计检测发现荧光强度明显减小,利用激光粒度仪检测出复合表面电势的变化也证明壳聚糖与 DNA 之间静电作用的存在。

4 壳聚糖/DNA 复合物的稳定性

壳聚糖/DNA 复合物的稳定性决定了转染效率。研究发现^[24]冻干的壳聚糖/DNA 复合物在 4 周后仍保持着转染细胞的能力。

由于非病毒载体运载 DNA 极易受 DNase 酶降解,壳聚糖/DNA 复合物的防 DNase 酶降解是考查其复合物稳定性的重要参数。Richardson 等^[18]以 DNase II 作为标准酶,在不同酶浓度下通过凝胶电泳来检验载体的保护能力,发现由不同分子量且经高度纯化的壳聚糖与 DNA 组成的络合物以电荷比为 1/1 时几乎可以完全抑制 DNase II 对质粒 DNA 的降解。壳聚糖之所以能有效地抑制 DNase 降解,估计是因为壳聚糖与 DNA 结合而成的络合物形成的三维空间结构所产生的位阻效应。

Mao 等^[15]也研究了壳聚糖/DNA 复合物在盐溶液和血清中稳定性,发现当复合物暴露在血清或高离子强度的盐溶液时,可能由于对蛋白质的吸收或相互之间发生凝聚作用导致复合物的尺寸变大。MacLaghlin 等^[25]更加系统地研究不同分子量,不同电荷比的壳聚糖/DNA 复合物在 10%血清浓度中的稳定性。研究发现随着分子量的增大,壳聚糖与 DNA 之间的相互作用更趋于稳定。

5 壳聚糖衍生物基因载体

在前期壳聚糖作为基因载体的论证成功后,目前许多研究者都把研究的重点放在壳聚糖的改性和修饰上,期望能提高壳聚糖的递送性能,研究重点是对壳聚糖进行改性,然后考查其转染效率,主要是提高壳聚糖基因递送系统的细胞靶向性,从而提高转染效率。

5.1 脱氧胆酸化壳聚糖载体

Lee 等^[26~28]对壳聚糖分子进行疏水性修饰,以碳酰亚胺作为交联剂,在分子链上用化学方法连接脱氧胆酸,使得壳聚糖成两亲性分子,而这种两亲性的壳聚糖在水性介质中能够自组装成疏水基向里亲水基向外的平均粒径为 162nm 左右的纳米粒。自组装形成的纳米粒具有一定的空间结构,在纳米粒的外表面富有大量亲水性的氨基可以质子化而使纳米粒的表面带有大量的正电荷,DNA 可以通过静电作用加载在表面,或者插到纳米粒空穴中。而且采用自组装的方法制得纳米粒是这个研究小组对壳聚糖改性的一大特色,之后这个研究小组的 Park^[29]和 Kwon^[30]还在壳聚糖上接上乙二醇后用胆甾烷酸对其改性制成纳米粒,通过细胞粘附力和细胞迁移等实验证明其具有良好的生物活性和转染效率。

5.2 半乳糖化壳聚糖载体

壳聚糖/DNA 复合物纳米粒在没有任何配体-受体作用下可被细胞摄入,若要进入特定的靶向细胞,需用不同的生物特异配体修饰壳聚糖,Park 等^[31]制备出半乳糖化的壳聚糖/DNA 复合物,研究发现这种经过半乳糖化的复合物能高速地转染肝细胞系。随后 Kim 等^[32]用乳糖酸的半乳糖基修饰在水中有较强的稳定性也无生物毒性的水溶性的壳聚糖后进行体外实验,载体能够有效地防止 DNase I 的酶解,对肝细胞具有靶向性,并且对 HepG2 细胞具有高转染率。而 Gao 等^[33]经过细胞毒性试验和基因转染试验也证明分子量为 21kDa 左右的低分子量壳聚糖经半乳糖化能够有效的作为基因载体,并且还发现半乳糖苷化度和 N/P 比是影响其转染率的主要因素。

5.3 季铵盐化的壳聚糖载体

为了提高载体的转染效率,Murata 等^[34,35]在 1995 年就提出将壳聚糖季铵盐化后用于基因载体实验,他们先用三甲基铵盐来修饰壳聚糖,再用半乳糖残基来连接壳聚糖,这种复合物能够有效的转染 HepG2 细胞,证明了其作为基因载体的可能性。而 Thanou 等^[36]用季铵化度 40%、50%的三甲基低聚壳聚糖作为

载体,研究其对 COS-1 和 Caco-1 的转染效果,发现其转染 COS-1 的能力比低聚壳聚糖好得多,而且无细胞毒性,但是却不能提高 Caco-1 的转染率。

5.4 其它壳聚糖衍生物载体

Kim 等^[37]用带咪唑环的尿刊酸来修饰壳聚糖,在生理条件下复合物的粒径为 109~342nm,用尿刊酸来修饰的壳聚糖在转染 293T 细胞时,显示出良好的载 DNA 的能力,可以防止 DNA 被核酸酶酶解,且细胞毒性低。国内研究壳聚糖基因载体比较领先的姚康德等^[38,39]将壳聚糖十二烷基化,通过对比不同温度下的 DNA 和壳聚糖/DNA 复合物中 DNA 的紫外吸收发现,由于十二烷基化壳聚糖的保护作用,DNA 分子热稳定性提高,DNA 酶解实验表明,原始 DNA 已被酶解成碎片,而被十二烷基化壳聚糖保护的 DNA 未受影响。周旭等^[40]在纳米粒表面连接 PEG 对纳米粒进行修饰,壳聚糖纳米粒能将报告基因递送到细胞内而且能在细胞内表达。

6 展望

正是由于壳聚糖的安全性、良好的生物相容性以及易于生产存储,使得研究者对壳聚糖的研究不断的深入。但是目前对壳聚糖基因载体的转染机制仍然不能完全阐明,Ishii 等^[16]认为转染机制可以大体分成细胞摄取、逃逸内吞小体和向核转运三个阶段。并且现在虽然有很多体外实验的报道,而有关体内实验的报道却鲜少^[41]。总而言之,壳聚糖及其衍生物是一种具有良好应用价值和广阔应用前景的基因载体,随着对其研究的深入,人们一定能够将壳聚糖及其衍生物推向临床应用。

参考文献:

- [1] 张阳德,孙颖. 中国现代医学杂志,2003,13(21):148.
- [2] 朱诗国,李桂源. 生物化学与生物物理进展,2002,29(6):868.
- [3] 郭荣,邹萍,陆华中. 国外医学生物医学工程分册,2002,25(2):77.
- [4] 胡云霞,原续波,张晓金,等. 北京生物医学工程,2003,22(4):299.
- [5] Borchard G. Adv Drug Deliver Rev,2001,52(2):145.
- [6] 张凯,郝晓东,黄渝鸿,等. 应用化工,2004,33(3):6.
- [7] 齐凤生. 水利渔业,2002,22(4):4.
- [8] Mumper R J, Wang J, Claspell J M, et al. Pro Int Symp Control Rel Bioact Mater,1995,22:178.
- [9] Mao H Q, Roy K, Walsh S M, et al. Pro Int Symp Control Rel Bioact Mater,1996,23:401.
- [10] Liu W G, Yao K D. J Controlled Release,2002,83(1):1.
- [11] Vinogradov S V, Bronich T K, Kabanov A V. Adv Drug Deliver Rev,2002,54(1):135.
- [12] Illum L, Jabbal-Gill I, Hinchcliffe M, et al. Adv Drug Deliver Rev,2001,51(1-3):81.
- [13] Erbacher P, Zou S, Bettinger T, et al. Pharm Res,1998,15(9):1332.
- [14] Nakanishi M, Noguchi A. Adv Drug Deliver Rev,2001,52(3):197.
- [15] Mao H Q, Roy K, Troung-Le V L, et al. J Controlled Release,2001,70(3):399.
- [16] Ishii T, Okahata Y, Sato T. Biochim Biophys Acta,2001,1514:51.
- [17] Sato T, Ishii T, Okahata Y. Biomaterials,2001,22(15):2075.
- [18] Richardson S C W, Kolbe H V J, Ruth D. Int J Pharm,1999,178(2):231.
- [19] Lee M H, Nah J W, Kwon Y M, et al. Pharm Res,2001,18(4):427.
- [20] Mao S R, Shuai X T, Unger F, et al. Int J Pharm,2004,281(1-2):45.
- [21] Kiang T, Wen J, Lim H W, et al. Biomaterials,2004,25(22):5293.
- [22] 黄伟. 壳聚糖纳米粒基因递送系统的研究. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院. 2002.
- [23] Leong K W, Mao H Q, Truong-Le V L, et al. J Controlled Release,1998,53(1-3):183.
- [24] Mao H Q, Truong-Le V L, August J T, et al. Pro Int Symp Control Rel Bioact Mater,1997,24:671.
- [25] MacLaughlin F C, Mumper R J, Wang J J, et al. J Controlled Release,1998,56(1-3):259.
- [26] Lee K Y, Kwon I C, Kim Y H, et al. J Controlled Release,1998,51(1-3):213.
- [27] Lee K Y, Jo W H, Kwon I C, et al. Macromolecules,1998,31(2):378.
- [28] Kim Y H, Gihm S H, Park C R. Bioconjugate Chem,2001,12(6):932.
- [29] Park J H, Kwon S L, Nam J O, et al. J Controlled Release,2004,95(3):579.

[30] Kwon S L, Park J H, Chung H, et al. *Langmuir*, 2003, 19(24) ;10188.

[31] Park Y K, Park Y H, Shin B A, et al. *J Controlled Release*, 2000, 69(1) ;97.

[32] Kim T H, Park I K, Nah J W, et al. *Biomaterials*, 2004, 25(17) ;3783.

[33] Gao S Y, Chen J N, Xu X R, et al. *Int J Pharm*, 2003, 255(1—2) ;57.

[34] Murata J I, Ohya Y C, Ouchi T. *Carbohydr Polym*, 1996, 29(1) ;69.

[35] Murata J I, Ohya Y C, Ouchi T. *Carbohydr Polym*, 1997, 32(2) ;105.

[36] Thanou M, Florea B I, Geldof M, et al. *Biomaterials*, 2002, 23(1) ;153.

[37] Kim T H, Ihm J E, Choi Y J, et al. *J Controlled Release*, 2003, 93(3) ;389.

[38] Liu W G, Yao K D, Liu Q G. *J Appl Polym Sci*, 2001, 82(14) ;3391.

[39] Li F, Liu W G, Yao K D. *Biomaterials*, 2002, 23(2) ;343.

[40] 周旭, 黄伟, 贺俊峰. *解放军药学报*, 2003, 19(4) ;241.

[41] Mansouri S, Lavigne P, Corsi K, et al. *Eur J Pharm Biopharm*, 2004, 57(1) ;1.

Advance in the Study of Chitosan and its Derivatives as Non-Viral Vectors

HUANG Jin, WANG Shi-long^{*}, SUN Xiao-yu, LI Wen-zhe, YAO Si-de
(*School of Life Science and Technology of Tong Ji University, Shanghai 200092, China*)

Abstract: Recently chitosan is focused in the research of gene delivery system for it is already known as a biocompatible, biodegradable and non-toxic polysaccharide. This article is to summarize the recent development of chitosan and its derivatives as non-viral vectors for gene transfection. And the influential factors of the transfection efficiency are also discussed such as molecular mass of chitosan, size of chitosan nanoparticle and depolymerization of chitosan.

Key words: Chitosan; Nanoparticle; Non-viral vector; Transfection efficiency

(上接第 9 页)

Self-assembly Synthesis and the Application of Low Dimension Polymer Nano-materials

ZHAO Zhen-rong¹, WANG Li^{1*}, WANG Jian-feng^{1,2}
(*1. State Key Lab of Polymer Reaction Engeering, College of Materials Science and Engerring, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China; 2. Ningbo University of Technology, Ningbo 315016, China*)

Abstract: Polymers can self-assemble into nano-materials through molecular recognition and/or molecular interactions. Resultant nano-materials will be potentially used in microelectronic, new material and biotechnology areas. This article reviews the ways of self-assemble synthesis of low dimension nano-structural polymers and their applications.

Key words: Polymer; Nano-structure; Self-assembly