

## 知识介绍

## 阳离子聚合物基因转染载体的研究进展

吴传保, 郝建原<sup>\*</sup>, 邓先模, 夏 雨  
(中国科学院成都有机化学研究所, 成都 610041)

**摘要:**安全有效的基因载体是实现基因治疗的必要条件, 由于阳离子聚合物易于合成和改性, 无免疫原性, 可以方便地与 DNA 形成紧密的超分子复合物, 保护 DNA 免受核酸酶的降解, 并促进其进入细胞, 从而成为非病毒基因载体中的一个重要类型; 但阳离子聚合物基因载体, 对细胞具有电荷相关的毒性, 转染效率低于病毒载体, 这成为限制其进入临床使用的瓶颈。本文从提高阳离子聚合物作为基因载体时的转染效率及降低其毒性方面综述了阳离子聚合物基因载体的研究进展, 归纳了改善阳离子聚合物基因载体转染特性的八种方法, 预测了阳离子聚合物基因载体的发展前景。

**关键词:**阳离子聚合物; 基因载体; 转染效率; 细胞毒性

## 1 基因转染载体

### 1.1 基因转染载体的作用及类型

基因治疗方法为先天性遗传疾病和严重后天获得性疾病的治疗提供了一条富有前景的新途径<sup>[1,2]</sup>。基因治疗的实施方式多种多样, 但都离不开将外源基因高效地导入细胞。DNA 分子通常以带负电的疏松状态存在, 体积较大, 满负电荷与细胞表面之间存在排斥作用, 难于进入细胞; 另外, 血液及细胞内存在大量的水解酶尤其是核酸酶, 能将裸 DNA 分子破坏, 因此单独使用 DNA 转染时, 效率较低<sup>[3]</sup>。为了使 DNA 有效转染, 需要借助物理方法或使用基因载体辅助 DNA 转染。物理方法需要使用专门的设备, 不能进行全身性使用, 并且会对组织和细胞产生严重损害<sup>[4,5]</sup>, 采用基因载体法有望克服物理方法的缺陷。基因载体包括病毒载体及非病毒载体, 病毒载体尽管转染效率高, 但是存在免疫原性、致癌性、宿主 DNA 插入整合等弊端<sup>[6,7]</sup>, 从而限制了它们的应用。非病毒载体无免疫原性, 便于大规模生产, 但转染效率低于病毒载体。非病毒载体中的阳离子聚合物载体具有优异的 DNA 结合及保护能力, 便于进行靶向性及生物适用性改性, 成为基因载体研究中的一个重要研究对象。文献中报道了很多合成阳离子聚合物基因载体如聚赖氨酸<sup>[8,9]</sup>、聚乙烯亚胺<sup>[10]</sup>、聚酰胺基胺<sup>[11,12]</sup>、聚氨基酯<sup>[13,14]</sup>、聚脒<sup>[15]</sup>、壳聚糖<sup>[16~18]</sup>、带有阳离子侧基的聚烯烃<sup>[19~21]</sup>等类型。

### 1.2 基因转染载体的效率和毒性

高效率且低毒性的基因载体是基因治疗进入临床使用的必要条件<sup>[22]</sup>, 因此高效率而低毒性也就成了开发新的基因载体的目标。基因载体的效率可用细胞转染率及编码外源蛋白的表达量来表示, 它与载体能否有效地保护外源基因免于水解酶的破坏并促进其突破各种生物屏障进入细胞核等适于基因表达的细胞器内有关<sup>[23]</sup>。基因载体的毒性根据聚合物的侵害对象可分为细胞毒性、血液毒性和组织毒性, 其中细胞毒性是体外基因转染时评价基因载体的一个重要指标, 当将基因载体复合物用于体内时, 如果是

**基金项目:**中国科学院院长特别支持基金;

**作者简介:**吴传保(1975—), 男, 博士, 现从事生物医用高分子材料的研究;

**\* 通讯联系人:** E-mail: j. hao@cioc.ac.cn.

通过血液途径的系统性基因治疗,可能出现诸如溶血等毒性,当基因载体复合物在体内进行局部支撑治疗及血液途径的系统性基因治疗时,复合物分布到器官或组织后可能产生相应的组织毒性;另外,根据毒性随时间的变化可分为瞬时毒性和累积毒性。

提高转染效率与降低毒性是两个密切相关的概念,一种基因转染载体真正应用于基因治疗临床必须同时具有这两个特性。高效高毒的基因转染载体由于其毒性破坏了细胞的生存能力从而使其效率无法发挥,低效低毒的基因转染载体由于其效率低,而体现不出基因治疗相对于传统治疗的优越性。对毒性与效率都低的基因载体进行改性提高其效率,对毒性与效率都高的基因载体进行改性以降低其毒性,或通过改性同时提高基因载体的效率又降低其毒性,都将推动基因载体的研究进展。

### 1.3 阳离子聚合物的阳离子特性对其转染特性的影响

阳离子聚合物作为基因载体时,其阳离子特性对基因转染效率有如下影响:一,提供与 DNA 自组装的动力,有利于保护 DNA 免受降解;二,压缩 DNA 成为比自由 DNA 体积小复合物颗粒,有利于进入细胞<sup>[28~30]</sup>;三,复合物颗粒之间产生静电排斥作用,稳定复合物;四,与细胞膜产生静电吸引作用,促进复合物内吞;五,与体液负电组分结合,不利于体内转运;六,阻止 DNA 释放,不利于编码基因表达。前四种影响有利于提高转染效率,后两种影响不利于提高转染效率,由此可见阳离子聚合物的阳离子特性对基因转染效率具有双重性影响。提高阳离子聚合物作为基因载体时的转染效率就要促进阳离子特性的有利影响抑制其不利影响。阳离子聚合物的阳离子特性也是其具有细胞毒性的决定因素之一,其所携带的正电荷会破坏细胞的膜结构,对于血细胞而言会产生溶血现象。阳离子聚合物的分子量越高,电荷量越大,毒性也越大<sup>[24~27]</sup>。

近年来,阳离子聚合物基因载体的研究取得了很大的进展,尤其是发现了一些转染效率与 PEI25K 相当甚至效率比 PEI25K 更高的载体。本文对近年来阳离子聚合物基因载体的研究进行了综述,重点总结了改善阳离子聚合物基因载体转染特性的方法。

## 2 改善阳离子聚合物基因载体转染特性的方法

### 2.1 在阳离子聚合物中引入亲水基团

一般作为基因载体的阳离子聚合物本身具有较好的水溶性,但当其与 DNA 形成超分子复合物后,水溶性降低。通过血液途径进行系统性的基因治疗时,带正电的基因与阳离子聚合物的复合物容易和血液中的负电组分结合并被网状内皮系统清除,在体外进行血清存在条件下的转染实验时,则形成难于被细胞内吞的大颗粒沉淀,从而降低转染效率<sup>[31,32]</sup>。为了克服这一问题,可以在阳离子聚合物上引入非离子的亲水性基团,当聚合物与 DNA 复合时,形成内部为水溶性较低的核,而外部为水溶性较高的具有核壳结构的复合物颗粒,从而提高了复合物的稳定性。PEG 是被广泛运用的亲水改性成分<sup>[33~39]</sup>。Tang 等<sup>[38]</sup>用分子量为 2K 的 PEG 对分子量为 25K 的 PEI 进行接枝改性,得到了一系列平均每条 PEI 分子链上接枝 PEG 数从 1~14.5 的改性聚合物,对改性聚合物的接枝率与有或无血清条件下的转染及体内转染之间的关系进行了较为详细的研究。他们发现接枝数为 1 时,PEG-g-PEI 在 0~2mM 的实验浓度范围内,对定向的人神经前体细胞 NT2 的毒性没有明显变化,而接枝数为 5 时,在实验浓度范围内,毒性明显降低,尤其是在聚合物浓度为 2mM 时,未改性 PEI 的细胞存活率几乎为 0,而 PEG-g-PEI 的细胞存活率保持在 100%以上。接枝度越高,聚合物的毒性对浓度的依赖性越小,即增加聚合物浓度时细胞的存活率降低越小。在无血清存在条件下的体外转染实验中,接枝数为 1 的改性聚合物的转染效率是起始 PEI 的 10 倍。血清存在的条件下,PEI 的转染效率是无血清时的 6%,而接枝数为 1 的改性聚合物的转染效率在血清存在条件下的转染效率是 PEI 的 5 倍,接枝数为 5 的聚合物的转染效率在血清存在条件下的转染效率是 PEI 的 6.3 倍。可见 PEG 接枝改性可以提高 PEI 在血清存在条件下的转染效率。通过将复合物经由胸部注射到成年雄性 wistar 鼠腰椎蛛网膜下隙的方法进行了体内转染实验,对冷冻切片进行免疫组织化学染色后,发现脊髓和脑膜部位有明显报告基因表达。荧光素酶活性分析表明,在 N/P 为 20 时,接枝数为 1 的聚合物的体内转染效率是起始 PEI 的转染效率的 3 倍,接枝数为 2.5 的聚合物的转染效率是起始 PEI

的 2 倍,接枝数为 14.5 时,体内转染效率没有增加。用起始 PEI 进行转染时,在远离注射位点的脑部没有明显转染,而用 PEG-*g*-PEI 转染时,脑干、小脑等脑部部位出现可明显检测的转染。可见对阳离子聚合物进行亲水改性时,聚合物的毒性随着接枝率的增加而减小,接枝率对转染效率的影响不是单调增加的,转染效率的增加在适当的接枝率时出现最大值,增大或减小接枝率时,转染效率都会降低,当然这只是具体实验细节问题,与亲水改性作为一种提高转染效率并降低毒性的方法并不矛盾。

Petersen 等<sup>[40,41]</sup>不仅研究了 PEG 接枝率对 PEI 转染特性的影响,还研究了 PEG 分子量对转染特性的影响。他们在分子量为 25K 的 PEI 上适度接枝分子量为 5K 的 PEG 后,发现复合物粒径从  $142 \pm 59 \text{ nm}$  变为  $61 \pm 28 \text{ nm}$ 。在最佳接枝率以上,随着接枝率的进一步增加,复合物的形成受到了阻碍,且复合物不再是球形。PEI 上接枝 1 个分子量为 20K 的 PEG 后可以与 DNA 形成球形  $51 \pm 23 \text{ nm}$  的紧密微粒。而接枝 35 个分子量为 550 的 PEG 时,与 DNA 形成  $130 \pm 60 \text{ nm}$  的离散微粒,且不能有效屏蔽 PEI 的电荷,会导致明显的红血球聚集及溶血现象。PEG 分子量对毒性的研究表明,随着 PEG 分子量的增加,毒性降低;PEG 接枝数对毒性的研究表明,接枝数在 6 个以上时,即可得到无毒的载体。

亲水改性的阳离子聚合物与起始阳离子聚合物在基因转染方面存在一些相同点,如它们的细胞毒性都随着 N/P 的增加而增加,复合物颗粒的粒径随 N/P 的增加而减小,转染效率随 N/P 的增加先增加后减小。但亲水改性的阳离子聚合物与起始阳离子聚合物在转染特性方面又存在着不同点,如在相同的 N/P 条件下,效率、毒性、zeta 电势、粒径、抗盐性及抗血清性都不同,无血清及血清存在条件下,出现最佳转染效率时的 N/P 也不相同。从根本上说,亲水基团对阳离子聚合物具有两种作用:一是增强了水溶性或水稳定性,二是屏蔽阳离子聚合物的电荷。增强水稳定性有利于减小团聚,促进内在化;有利于增强抗血清及抗盐性,避免或减小被网状内皮系统清除(如果是进行体外有血清时的转染或体内血液途径的系统性治疗时);有利于增强复合物在血液及体液中的扩散,促进到达病灶部位。屏蔽阳离子聚合物的电荷有利于减小细胞毒性,进而增强转染效率;有利于减弱与体内负电组分的结合,保持复合物的体内稳定;同时,不利于聚合物与 DNA 形成紧密的复合物,降低保护作用;不利于复合物与细胞表面的静电结合,减弱内在化能力。可见亲水改性对聚合物的毒性有确定的减小作用,但对转染效率却有双重影响,需要合理优化。亲水基团的双重影响造成了上述改性或未改性阳离子聚合物在作为基因载体时存在的相同点和不同点,改性用 PEG 的分子量及 PEG 的百分用量的增加都将增强亲水基团对阳离子聚合物的这两种根本作用。适当亲水改性后,复合物颗粒能稳定存在,减小团聚,在体外转染时有利于内吞,在体内转染时除了有利于内吞外,还有利于延长复合物在体内的存在时间,从而增加转染效率降低细胞毒性。亲水改性基团隔离了阳离子聚合物与生物体膜的接触,降低了聚合物的细胞毒性,细胞的生存能力增强,可能使得转基因的表达能力相应增强。

用 PEG 对阳离子聚合物进行改性时,既可以用 PEG 接枝阳离子聚合物,也可以用 PEG 与阳离子聚合物形成嵌段共聚物<sup>[42]</sup>。Choi<sup>[43]</sup>等用氨基 PEG 和赖氨酸合成了哑铃形的树枝状聚赖氨酸与 PEG 的三嵌段共聚物(见图 1),由于分布在复合物表面的 PEG 段的屏蔽作用,几乎不存在细胞毒性。除了 PEG 外,聚 *N*-羟丙基甲基丙烯酸酰胺(pHPMA)<sup>[44,45]</sup>和聚 *N*-乙烯吡咯烷酮<sup>[46,47]</sup>也被用于阳离子聚合物亲水改性。

## 2.2 在阳离子聚合物中引入可降解基团

基因治疗的过程中包括两个重要步骤,一个是基因传输,另一个是基因表达。为了使前一个步骤实现,对于聚合物基因载体来说,就需要提高聚合物与 DNA 的结合能力,使其更容易组装成紧密微小的超分子复合物<sup>[48]</sup>。为了使后一个步骤实现,就要在适当的时候,使载体与 DNA 容易地分离,也就是需要在适当的时候减小 DNA 与载体之间的相互作用。根据前面 1.3 中的分析,聚合物与 DNA 的结合特性及聚合物的毒性都具有分子量依赖性,如果能使得阳离子聚合物在与 DNA 复合时,具有较高的分子量,而形成的复合物进入细胞后又能变为分子量较小电荷量较低的副产物,则可以同时实现上述的两个步骤,进而同时实现降低聚合物的毒性和提高转染效率两个方面的作用,为此可采用可降解阳离子聚合物,尤其是响应细胞内环境的可降解聚合物<sup>[49]</sup>作为基因载体。

Zhong 等<sup>[50]</sup>合成了一系列可降解超支化聚( $\beta$ -氨基酯)(见图 2,其中折线部分代表含有酯键的连接部

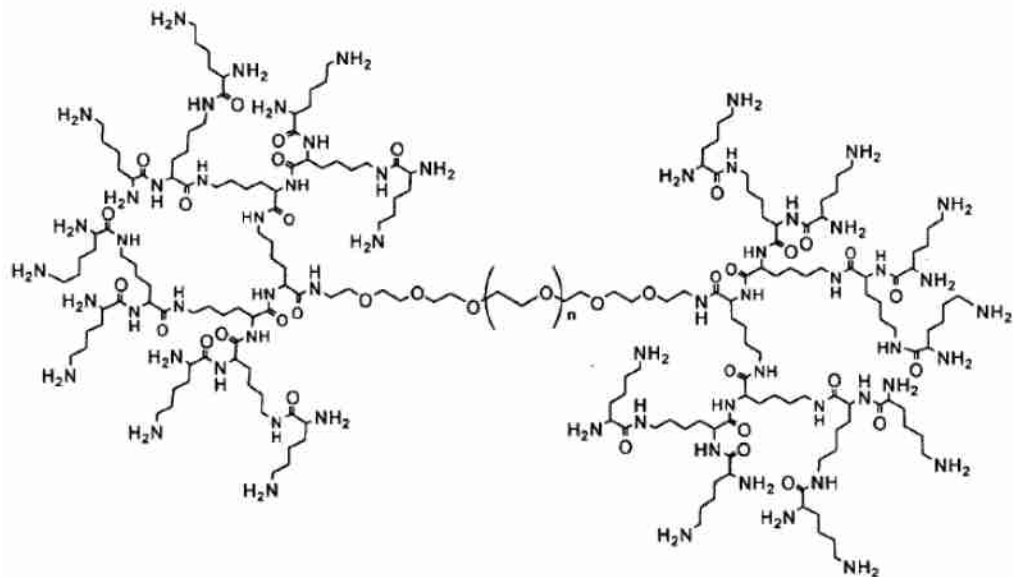


图 1 由 PEG 与赖氨酸共聚得到的哑铃形共聚物  
Figure 1 Copolymer of dendritic polylysine and PEG

分),它们在 37℃,pH 为 7.4 的生理条件下可降解,在 4h 内,会有 10%的酯键被水解,这些聚氨基酯在 pH 为 5.1~7.4 的范围内具有高的缓冲能力,部分聚合物在 N/P 为 40 时,可以与质粒形成 94~135nm 的小微粒,具有与 PEI 相当或比 PEI 高的转染效率,在血清存在的条件下仍可保持其转染效率,并且毒性低于 PEI、PLL 及 pDMAEMA。

Lim 等<sup>[51]</sup>合成了侧基与聚赖氨酸相同,而主链与之不同的聚胺丁基乙醇酸(PAGA),在 pH 为 7.3 的 37℃ 的水溶液中进行降解实验,发现其分子量半衰期为 30min, 5h 后分子量变为起始的 1/3, 1d 后降解变慢,完全降解需要 6 个月。N/P 为 3 时,DNA 得到部分保护,N/P 为 5 时,在 4h 内 DNA 都可以得到完全保护。单独的 PAGA 的浓度即使在 300μg/mL 时,也检测不出毒性,PAGA 与 DNA 在 N/P 为 60 时形成的复合物,没有细胞毒性,与空白细胞对照,存活率反而增加了 30%,在此条件下,用 PLL 作载体时,细胞的存活率仅为 25%。

在用氯喹辅助内涵体破坏的条件下,当 N/P 为 6 时,PLL 的转染效率最高,而 PAGA 在 N/P 为 60 时转染效率最高,后者的转染效率是前者的 3 倍。与此类似,Luten 等<sup>[52]</sup>合成了与聚甲基丙烯酸二甲胺基乙酯(pDMAEMA)具有类似侧基结构而主链可降解的聚二甲胺基乙基聚膦腈(pDMAEPZ1 和 pDMAEPZ2)(见图 3),在转染效率方面,当 pDMAEPZ 与 DNA 的质量比为 24 时,pDMAEPZ1 具有最佳转染效率,且与 pDMAEMA 相当。当质量比为 6 时,pDMAEPZ2 具有最佳转染效率,且其转染效率是 pDMAEMA 的 2 倍。在细胞毒性方面,pDMAEMA 的 IC<sub>50</sub> 为 4μg/mL, pDMAEPZ1 的 IC<sub>50</sub> 为 20μg/mL, pDMAEPZ2 的 IC<sub>50</sub> 为 6μg/mL。表面上看 pDMAEPZ2 的毒性没有比 pDMAEMA 小的少,但实际上每个结构单元中 pDMAEPZ2 的 N 原子数比 pDMAEMA 的多一倍,考虑到这一点,可以认为 pDMAEPZ2 比 pDMAEMA 具有显著的生物相容性。

从上述实例中可以看出,可降解聚合物由于在水溶液中分子量会降低,因此每个分子上的电荷量也会逐渐减少,为了充分发挥对 DNA 的保护作用,在形成复合物时,通常要比不可降解聚合物高的 N/P,相应最佳转染效率的发挥,也需要较高的 N/P。尽管在最佳转染条件下的操作中,可降解聚合物作载体

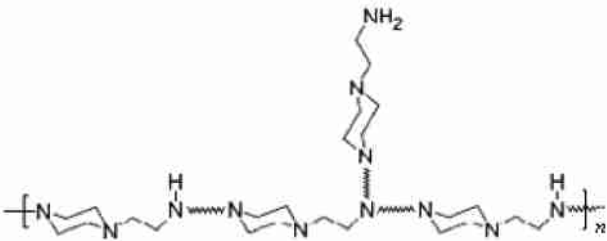


图 2 可降解超支化聚(β-氨基酯)  
Figure 2 Biodegradable hyperbranched poly(ester amine)

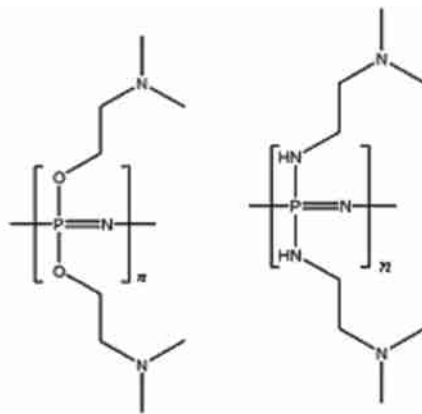


图 3 聚双(二甲基胺乙氧基)膦腈及聚双(二甲基胺乙胺基)膦腈

Figure 3 Poly( *N*, *N*-dimethylaminoethyl) phosphazenes

时的 N/P 高于不可降解聚合物,但前者的毒性不但不会高于后者,反而低于后者,甚至可能不具有任何毒性,可见可降解阳离子聚合物的降解性削弱了分子量增加对载体毒性和效率影响之间的矛盾。利用可降

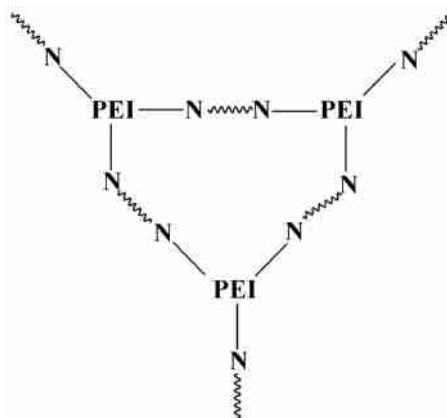


图 4 可降解交联 PEI

Figure 4 Biodegradable crosslinked PEI

解阳离子聚合物在基因转染方面提高效率降低毒性的优势,有人将不可降解的低分子量 PEI 通过可降解部分交联起来得到了一系列可降解的高分子量 PEI,这些交联 PEI 即保持了 PEI 的转染效率,同时大大降低了 PEI 的毒性<sup>[53~55]</sup>(见图 4,其中折线部分表示含有可降解键的交联部分)。Forrest 等<sup>[55]</sup>将分子量为 0.8K 的 PEI 用含有酯键的小分子交联剂交联后得到了分子量为 14~30K 的可降解 PEI。交联 PEI 可以与 DNA 形成 30~80nm 左右的复合物颗粒,降解半衰期为 4h,且在中性及内涵体酸性环境下的降解速率相差不大,尽管交联 PEI 可降解,但与 DNA 形成的复合物在实验的 24h 内都能阻止溴乙啶的内插。动态光散射显示紧密复合物颗粒至少可以保持 6h。起始 0.8KPEI 与 DNA 的复合物对 MB-231 和 C2C12 实验细胞系没有可检测的转染,交联 PEI 因结构和细胞系的不同,可产生 2~16 倍于 PEI25K 的转染效率。交联 PEI 在基因治疗通常使用的载体浓度范围内,没有毒性,聚合物降解越快,毒性越小。

### 2.3 在阳离子聚合物中引入内涵体破坏性基团或成分

要使阳离子聚合物载体/基因复合物产生高的转染效率,必须使它能克服基因传输时面临的各种生理屏障,其中复合物能否从进入细胞后形成的内涵体中逸出是对阳离子聚合物基因载体的转染效率有重要影响的转移过程。如聚赖氨酸和聚乙烯亚胺是两种较早应用于基因转染的阳离子聚合物基因载体,但是单纯的聚赖氨酸的转染效率比聚乙烯亚胺低得多<sup>[56~58]</sup>,这是因为聚赖氨酸与 DNA 的复合物通过内吞作用<sup>[59,60]</sup>进入细胞后,往往被限制在内涵体的酸性环境中<sup>[61]</sup>,在内涵体的生命周期后期,聚赖氨酸及其所携带的 DNA 可被其中的水解酶降解破坏。聚乙烯亚胺由于具有独特的“质子海绵”作用,在中性 pH 条

件下只发生部分质子化而与 DNA 结合,还剩余一部分胺基(主要是叔胺)未质子化,当它进入内涵体后,剩余的胺基在内涵体中继续发生质子化,并与内涵体膜产生相互作用,导致内涵体膜破坏;另外内涵体中 pH 升高,会促进其吸收细胞液膨胀瓦解内涵体<sup>[62]</sup>。这就使得聚乙烯亚胺/DNA 复合物在内吞入细胞后能较快地从内涵体中逃逸,因此聚乙烯亚胺至今仍是不需另外添加内涵体破坏剂而保持较高转染效率的聚合物载体之一<sup>[63]</sup>。可见,增强复合物的内涵体破坏能力将增强其转染效率。为了改善复合物从内涵体的逃逸能力,可以在形成复合物时添加氯喹<sup>[64]</sup>,膜破坏性肽<sup>[65,66]</sup>及聚丙烯丙烯酸<sup>[67,68]</sup>等。其中氯喹虽然可以明显提高转染效率,但是具有较大的细胞毒性。膜破坏性肽及聚丙烯丙烯酸具有响应 pH 的变化而发生构象转变的能力,在较低 pH 值条件下可以插入细胞内膜,导致膜上成孔,使膜内包含物逸出。

根据 PEI 破坏内涵体的原理,在保证阳离子聚合物的基因复合能力的前提下,设计合成能在内涵体 pH 条件下继续质子化的阳离子聚合物可以增强复合物的内涵体逸出能力,从而提高转染效率。在阳离子聚合物上引入三级胺或咪唑环等具有质子海绵效应的基团时,可以实现这种效果<sup>[69~71]</sup>。Benms 等<sup>[70]</sup>为了提高聚赖氨酸的转染效率,合成了聚组氨酸接枝的聚赖氨酸 PLH-*g*-PLL,PLH-*g*-PLL 与 DNA 可以形成 117~336nm 的复合物颗粒,在聚合物与 DNA 的质量比相同的条件下,PLH-*g*-PLL 在 293T 细胞中的转染效率高于 PLL。毒性研究表明,在聚合物与 DNA 的质量比为 20/1 时,使用 PLL 作载体时细胞的存活率为 40%,而使用 PLH-*g*-PLL 时的存活率为 90%。Kim 等<sup>[71]</sup>为了改善壳聚糖/基因复合物的转染效率,通过在侧基上引入尿刊酸的方法合成了改性壳聚糖 UAC(见图 5)。在实验的 N/P 范围内,各种接枝度的 UAC 均可以与 DNA 形成 100nm 以下的复合物颗粒,在实验的配比范围内,不管是改性壳聚糖还是未改性壳聚糖,对细胞的存活率均没有明显影响,细胞存活率均保持在 90%以上,但引入尿刊酸可以进一步提高细胞的存活率。UAC 的转染效率均高于相同条件下的壳聚糖的转染效率,尤其是在 N/P 为 20 时,UAC70 的效率大约是壳聚糖的 400 倍左右。

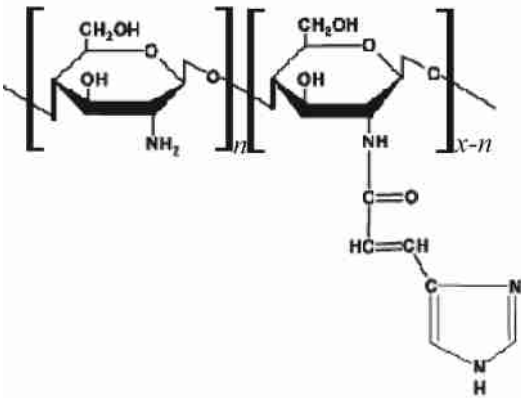


图 5 尿刊酸改性壳聚糖  
Figure 5 Urocanic acid-modified chitosan

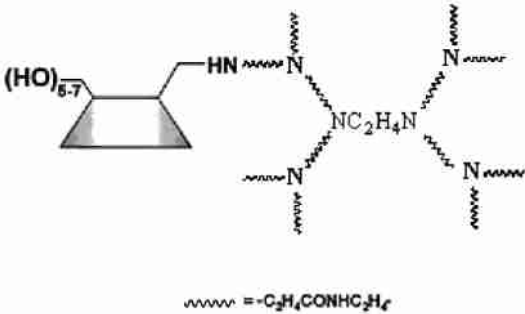


图 6 环糊精衍生化树枝状聚酰胺胺基

(C)1994-2021 China Academic Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

另外,根据环糊精具有溶血性,能增强水溶性药物对生物体膜的渗透作用原理,Kihara 等<sup>[72,73]</sup>合成了

环糊精衍生化的不同代数的聚酰胺基胺树枝状聚合物(见图 6), 环糊精衍生化的 2 代树枝状聚合物在 NIH3T3 细胞系中的转染效率在 N/P 为 200 时提高大约 60 倍, 改性 3 代聚合物的转染效率在实验的 2~200 的 N/P 范围内, 转染效率都得到了提高, N/P 为 20 时, 转染效率约提高了 15 倍, 四代改性聚合物的转染效率在实验的 N/P 范围内也得到了提高, 只是提高的范围不如三代聚合物。环糊精改性的树枝状聚酰胺基胺的细胞毒性没有明显改变, 在 NIH3T3 细胞系中, 当 N/P 在 100/1 以下时, 改性聚合物几乎没有毒性。

## 2.4 在阳离子聚合物中引入靶向基团

有效的系统性的基因治疗离不开基因的靶向传输。除了癌组织独特的渗透容留效应可以使 DNA 药物被动靶向之外<sup>[74]</sup>, 不具有靶向特性的基因载体不但难以使足量的外源治疗基因到达病灶部位, 反而可能使正常细胞受到影响。靶向传输与细胞表面存在的特定受体有关, 载体上的靶向基团对特定细胞的表面受体具有特异性识别作用, 可以使载体转染特定类型的细胞, 增强了复合物受体介导的内吞, 从而提高转染效率。通过血液途径的体内系统性治疗中, 有利于减小正常组织受影响的范围, 增强病变组织的治疗效果。文献中研究较多的靶向传输是肝细胞及癌细胞的靶向传输<sup>[75, 76]</sup>。Gao 等<sup>[77]</sup>为了增强壳聚糖/基因复合物向肝细胞的传输, 合成了侧基部分半乳糖化的壳聚糖。在 N/P 为 3 时, 半乳糖化低分子量壳聚糖的转染效率比低分子量壳聚糖高 1 倍。在浓度高达 1400  $\mu\text{g/mL}$  时, 高分子量壳聚糖几乎把细胞全部杀死, 而低分子量壳聚糖的细胞存活率为 38% 左右, 半乳糖化的低分子量壳聚糖的细胞存活率则提高到 84% 左右。Sagara 等<sup>[78]</sup>通过双官能团 PEG 将半乳糖耦合到 PEI 上, 耦合率为 1% 时, 外源基因在肝源细胞系 HepG2 中的表达效率即高于相同条件下的 PEI, 耦合率为 1%, N/P 为 20 时的转染效率是 PEI 的 2.1 倍。而在非肝源细胞 NIH3T3 中, 耦合靶向基团的载体所得到的转染效率只有相应 PEI 的 1/40, 可见靶向基团改性后的阳离子聚合物的转染选择性增强。Ogris 等<sup>[79]</sup>通过 PEG 间隔合成了转铁蛋白(Tf)和上皮生长因子(EGF)靶向配体的 PEI。通过静脉将靶向改性的 PEI 与质粒的复合物注射到荷瘤实验鼠体内, 报告基因在肿瘤组织中的表达效率比其它组织高 10~100 倍。反复注射编码肿瘤坏死因子的 DNA 与改性 PEI 的复合物到荷瘤细胞鼠中, 没有发现明显的细胞和组织毒性, 并且肿瘤生长得到了抑制。Benms 等<sup>[80]</sup>用 PEG 间隔合成了叶酸改性的 PEI(FPF-g-PEI), 接枝度数为 5.2 的改性 PEI 的细胞毒性低于 PEI, 在实验的 0.1/1~7/1 的聚合物与 DNA 的重量比范围内, 改性聚合物在克隆腺癌细胞 CT-26 中的转染效率都高于未改性的 PEI, 而在口腔上皮细胞 KB 和平滑肌细胞中改性聚合物作载体时的转染效率与 PEI 相当或低于 PEI。

除了癌细胞及肝细胞的靶向传输之外, Kang 等<sup>[81]</sup>为了向胰岛素分泌细胞靶向传输治疗 DNA, 合成了磺酰脲改性的聚赖氨酸 PLL-SU, 该聚合物与质粒形成 100nm 的复合物微粒, 接枝率为 5mol% 的 PLL-SU 在胰岛素分泌细胞 RINm5F 中的转染效率比 PLL 高出至少 5 倍, 而在非胰岛素分泌细胞系 NIH3T3 和 HepG2 中的效率低于 PLL。乳糖除了可以靶向肝细胞外, 有研究表明它也可以促进呼吸道上皮细胞对复合物的吸收, 如 40% 乳糖化聚赖氨酸增强了复合物在呼吸道上皮细胞的内在化<sup>[82]</sup>。抗体也被用作靶向配体连接到了聚合物载体上, Suh 等<sup>[83]</sup>合成了抗白血病特异性 JL1 抗原的单克隆抗体 anti-JL1 改性的聚赖氨酸(见图 7), 聚合物与质粒在质量比为 5/1 时, 可以形成直径为 200~300nm 的微粒, 复合物微粒与白血病细胞 Molt4 在 37℃ 的条件下培养 4h, 可以被有效内在化, 转染效率是使用聚赖氨酸作载体时的 10 倍以上。

靶向基团除了其靶向作用可以提高转染效率外, 作为一般的基团, 也会对复合物的电荷屏蔽及亲水、憎水特性产生影响。所以靶向基团改性基因载体时存在一个最佳连接率。半乳糖化 PEI 的复合物粒径随着半乳糖连接量的增加而增大, 不连接配体时为 156nm, 连接 3.5% 配体时为 486nm, 连接 31% 配体时为

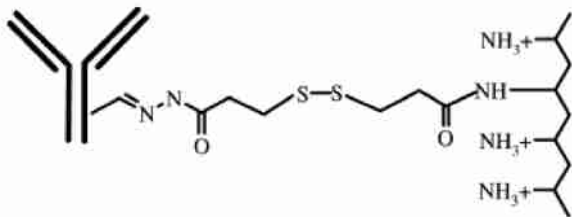


图 7 抗体-JL1 靶向改性的聚赖氨酸

Figure 7 Anti-JL1 antibody-conjugated poly(L-lysine)

652nm, 电势随半乳糖量增加而降低, 不连接配体时为 30mV, 连接 3.5%配体时为 22mV, 连接 31%配体时为-26mV<sup>[84]</sup>。

2.5 在阳离子聚合物中引入赋予阳离子聚合物以脂质特性的基团或成分

尽管阳离子聚合物基因载体与 DNA 形成复合物后水溶性降低, 但适当的引入赋予聚合物以脂质特性的憎水基团可以增强与细胞膜的结合能力, 增加复合物被细胞吸收的几率或促进复合物从内涵体逃逸, 从而可以提高转染效率<sup>[85]</sup>。Wang 等<sup>[86]</sup>将胆固醇接枝到分子量为 1800 和 10K 的 PEI 的仲胺后, 得到了水溶的脂质阳离子聚合物 PEI-Chol。两种脂质聚合物的临界胶束浓度分别是 496.6μg/mL 和 1330.5μg/mL, 低分子量脂质聚合物与 DNA 形成 384±300nm 的微粒, 而高分子量脂质聚合物与 DNA 形成 110~205nm 的微粒, 当 N/P 为 15/1 时, 低分子量脂质 PEI 的转染效率是低分子量 PEI 的 5 倍左右, 细胞的存活率由 70%提高到 90%以上。

四代树枝状聚酰胺基胺外周以憎水苯丙氨酸改性(见图 8), 随着苯丙氨酸数目由 16 增加到 46, 转染活性也逐渐增加, 接枝数为 64 的聚酰胺基胺在 CV1 细胞系中的转染效率分别是 Lipofectamine 和 SuperFect (两种商业化的基因载体)2 倍和 10 倍。两种商业化的基因载体与基因复合物的细胞存活率分别为 90%和 80%, 而改性聚酰胺基胺的细胞存活率为 100%<sup>[87]</sup>。赖氨酸与憎水性色氨酸以 4/1 的比例无规共聚后所得的聚合物的抗盐性高于聚赖氨酸, 预期具有高的血液稳定性及转染效率<sup>[88]</sup>。Yoo 等<sup>[89]</sup>为了研究树枝状聚酰胺基胺与基因复合物的细胞内转移机理, 在 PAMAM 上引入憎水荧光染料 Oregon green 488 以跟踪复合物时, 意外发现憎水改性的 PAMAM 比未改性 PAMAM 具有更高的转染效率。Jeong 等<sup>[90]</sup>在聚赖氨酸上接枝 PLGA(乙醇酸乳酸共聚物)后得到了脂质聚赖氨酸 PLL-g-PLGA, 该聚合物在水溶液中具有成胶束特性, 胶束大小为 149nm, 且分布较窄, 临界胶束浓度为 9.6mg/L。脂质聚赖氨酸可以与 DNA 形成 200~300nm 的复合粒子, 有效地保护 DNA 免受 Dnase 的降解。在 N/P 为 13.4 时改性聚合物的转染效率最高, 未改性 PLL 的最佳转染效率出现在 N/P 为 5 时, 前者的效率是后者的 10 倍, 细胞毒性研究显示, 改性 PLL 的 LD<sub>50</sub>是 500μg/mL, 而未改性 PLL 的 LD<sub>50</sub>是 100μg/mL。可见通过脂质接枝改性, 尽管阳离子聚合物的电荷量降低, 但转染效率却增加, 有效地解决了电荷量对转染效率和存活率的矛盾性影响。PEI 链上引入十四酰基得到了憎水改性聚合物 PEI-PA, 纯聚合物的 IC<sub>50</sub>(μg/mL)在 A431 细胞中由 1.9 上升为 3.98, 复合物的 IC<sub>50</sub>(μg/mL)在 A549 细胞系中由 13.3 增加为 27.8, 在 A431 细胞中由 3.6 上升为 5.6<sup>[91]</sup>。

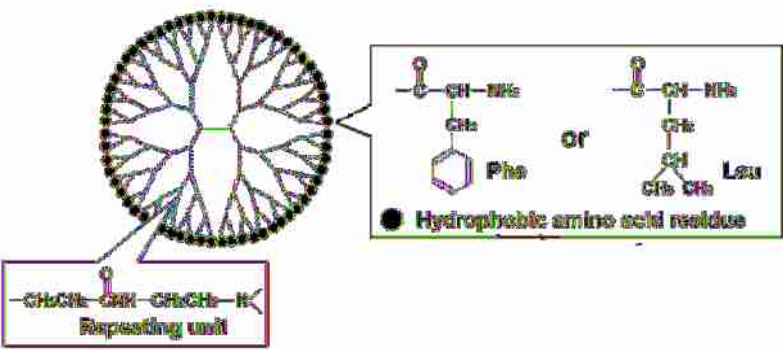


图 8 表面憎水氨基酸改性的树枝状聚酰胺基胺

Figure 8 Polyamidoamine dendrimers having<sup>2</sup> hydrophobic amino acid residues in the periphery

除了对聚合物进行化学改性得到的脂质聚合物可以增强聚合物的基因转染效率外, 直接添加助脂质体到阳离子聚合物与 DNA 的混合物中也可以通过增强复合物的膜融合特性增强转染效率。5%mol 十六烷基化 PEI 与脂质体 DOPE 合用在体外转染时得到了高于经典脂质体 DPPC/胆固醇(2/1)的转染效率, 脂质聚合物复合物经尾静脉注射入小鼠体内后在肺内得到了高于 PEI 的转染效率<sup>[92]</sup>。多肽/DNA/脂质体三元复合物的辅助转染效率比多肽/DNA 复合物的转染效率提高了 10<sup>4</sup>~10<sup>5</sup> 倍<sup>[93]</sup>。PEI2K 复合物几乎不能被细胞吸收, 但是 DOPE/PEI2K/DNA 复合物却可以被大量吸收<sup>[94]</sup>。从这些实例中可以看出脂质特性对于提高聚合物基因复合物的转染效率的潜力。有意思的是叶酸不光可以作为靶向配体共价连接到载体上

提高转染效率,也可以采用物理混合的方式形成叶酸/PEI/DNA 三元复合物,使得原本在血清存在条件下难以转染的 PEI 产生较高的转染效率,而且转染效率具有叶酸浓度依赖性,而不管细胞表面有无叶酸受体,这种效果可能由叶酸的憎水性引起<sup>[94]</sup>。

## 2.6 在阳离子聚合物中引入潜在酸性基团或直接引入阴离子成分

基因从复合物释放出来是其在细胞内表达的前提条件<sup>[95]</sup>,由 2.2 的阐述可知,采用可生物降解阳离子聚合物作基因载体有利于实现这种效果。除此之外,在阳离子聚合物中引入潜在酸性基团时,潜在酸性基团逐渐释放出自由的酸性基团,将有效中和载体的正电荷,减弱载体与基因的相互作用,促进释放 DNA,同时载体的电荷部分中和后,会相应降低载体电荷相关的毒性。在载体与 DNA 形成正电复合物后,再适当引入阴离子组分,也有利于实现这一过程。虽然 PEI 仍是目前最有效的非病毒基因载体之一,如果利用其较高的电荷密度,高效结合 DNA,快速突破内涵体,同时使其在细胞内能有效地与 DNA 分离,则有利于提高转染效率。通过锌离子将阴离子聚合物磺酸葡聚糖(DS)引入 PEI/DNA 复合物,在 pH 为 8, PEI 与 DS 质量比大于 2,硫酸锌浓度为 0.025mM 时得到了粒径约为 200nm、分散指数为 0.2 的复合物微粒, DNA 在复合物中保持 B 构象,随着 DS 用量增加,毒性降低<sup>[96]</sup>。为了促进释放复合物中的 DNA 以使其所携带的目的基因表达目标产物, Liu 等<sup>[97]</sup>合成了侧基含有甲酯基的线形 PEI,在水溶液中,聚乙烯亚胺上的酯键会逐渐水解生成羧酸,并与聚乙烯亚胺上的胺基成盐,减小了聚合物/DNA 复合物之间的离子相互作用,促进了 DNA 的释放,实验表明,酯基化在 20% 以上时可以实现这种促进释放的效果。

## 2.7 控制聚合物的 N 类型

N 的类型不同,在基因转染中的作用也不同,如 2.3 中提到的三级胺和咪唑环上的 N 虽然对与 DNA 的复合贡献很小,但对内涵体的破坏作用贡献很大。主体阳离子聚合物的 N 类型除了影响 DNA 从内涵体释放外,控制聚合物的 N 类型还可以影响其对 DNA 的结合能力,通过对阳离子聚合物的 N 类型进行转换,不是通过改变聚合度或 N 的摩尔量实现的,所以也是一个独立的改善转染效率,降低毒性的方法。

将低级胺转化为具有永久电荷的四级胺有利于增强阳离子聚合物的阳离子特性及水溶性。用碘甲烷对 PEI 进行部分季铵化后,纯聚合物的  $IC_{50}$  ( $\mu g/mL$ ) 在 A549 细胞系中由 5.2 增加为 7.7,在 A431 细胞中由 1.9 上升为 8.6,复合物的  $IC_{50}$  ( $\mu g/mL$ ) 在 A549 细胞系中由 13.3 增加为 32.3,在 A431 细胞中由 3.6 上升为 24.2<sup>[91]</sup>。对外部为羟基的聚酰胺基胺树枝状聚合物内部的叔胺季铵化后,毒性小于聚酰胺基胺树枝状聚合物,同时由于季铵化增加了聚合物的电荷量,使其比起始聚合物具有更强的复合 DNA 的能力,随着季铵化程度的增强,压缩能力增强,在最佳电荷比条件下,复合物粒径达 53.3nm<sup>[98,99]</sup>。用组氨酸取代赖氨酸六代树枝状聚合物的第六代后,在中性条件下的转染效率接近于 0,这是因为在中性条件下组氨酸的咪唑基团不能质子化, DNA 的结合能力较弱,电泳试验显示,中性条件下阳离子/阴离子为 1.0 时,聚赖氨酸可以完全阻滞 DNA,而组氨酸改性聚赖氨酸只能部分地阻滞 DNA;相反在 pH 为 5.0 时组氨酸改性聚赖氨酸可以具有与聚赖氨酸相当的转染效率<sup>[100]</sup>。

控制聚合物的 N 类型或实现聚合物上不同 N 类型的转变时,应当根据待改性阳离子聚合物的实际情况,因为不同的 N 类型在基因转染中扮演着不同的作用,随便地将一种胺转化为另一种胺未必使转染特性改善,反而可能降低转染特性。

## 2.8 在阳离子聚合物上引入核定位信号因子

复合物能否在细胞液中接近细胞核并将 DNA 转运至细胞核也是影响基因表达效率的一个重要因素。连接核定位信号因子(NLS)有助于实现这一过程。第一个被发现的 NLS 是猿肾病毒大 T 抗原序列 SV40,几个小组的研究表明无论 SV40 与 DNA 结合还是与载体结合都会促进 DNA 进入细胞核,增强编码蛋白的表达。在 NLS 的作用下,较大的 DNA 颗粒也可以通过 importin 介导的方式由细胞核导入系统转运至细胞核内。Talsma 等<sup>[101]</sup>合成了 3 型呼肠孤病毒  $\sigma 1$  结合蛋白和 NLS 双重改性的 PEI 阳离子聚合物基因载体  $\sigma 1$ -NLS-PEI,在纤维原细胞系 L929 中的转染效率是 PEI 的 16 倍,是  $\sigma 1$ -PEI 的 3 倍。

# 3 综合运用多种方法改善阳离子聚合物基因载体的转染特性

上述改善阳离子聚合物转染特性的方法,不光可以用于阳离子聚合物改性,也可以用于阳离子聚合

物的合成,而且既可以单独应用,也可以综合应用,综合利用提高转染效率的多个措施比运用单个措施更能提高转染效率。如连接半乳糖的聚赖氨酸 Gal-PLL 与质粒在质量比为 1/0.4 形成 256nm 的荷正电微粒,在表达半乳糖特异性膜凝集素的 HepG2 细胞系中高效转染,而在 NIH3T3 细胞系中只有微弱转染,再添加膜破坏肽 KALA 时,转染效率可以进一步提高 10 倍<sup>[102]</sup>。同时运用提高效率 and 降低毒性两种措施则有望得到低毒的效率保持或增加的阳离子聚合物基因转染载体。靶向基团及内涵体破坏基团通过 PEG 间隔共同改性阳离子聚合物是较常采用的综合运用方法。融合蛋白 KALA 具有促进复合物摆脱内涵体局限的功能,但当将 KALA、PEI 和 DNA 直接复合时,所得到的复合物微粒会团聚,而当将 KALA 耦合到 PEG 上,然后再与 PEI/DNA 的负电复合物进一步组装后便可以得到直径为 200~400nm 的稳定微粒(见图 9)。在 N/P 为 2.5 时,PEG-KALA/DNA/PEI 的转染效率是 KALA/DNA/PEI 的 60 多倍,而在 N/P 为 15 时,前者是后者的转染效率的 100 多倍。在细胞毒性方面,293T 细胞在 PEI 的浓度为 20μg/mL 时,培养 2h 后存活率为 31.1%,培养 12h 后,细胞的存活率为 11.2%,而细胞与 PEG-KALA/DNA/PEI 的基因复合物培养 12h 后,细胞的存活率为 89.2%<sup>[103]</sup>。

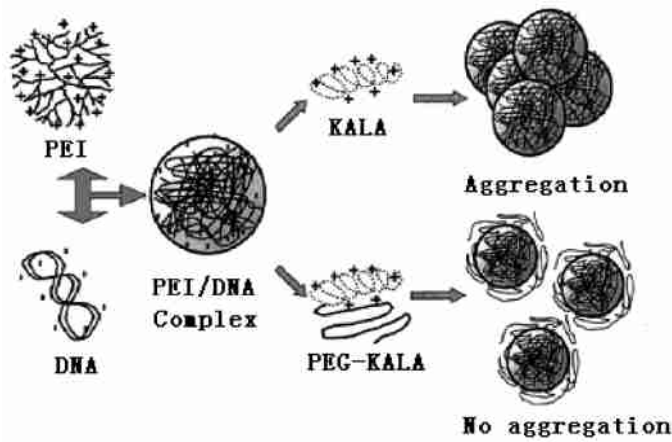
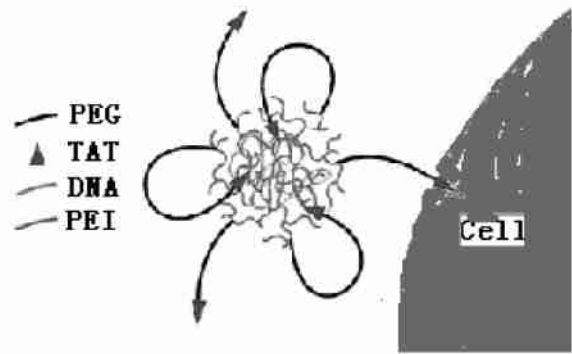


图 9 KALA/PEI/DNA 与 PEG-KALA/PEI/DNA 的稳定性比较  
Figure 9 The comparison of stability between KALA/PEI/DNA and PEG-KALA/PEI/DNA

HIV-1 蛋白 TAT 的衍生多肽通过杂双官能团 PEG 连接到 PEI 得到的 TAT-PEG-PEI 与 DNA 在 N/P 为 10 时形成了 90nm 左右的小微粒,复合物对器官壁液、表面活性剂 Alveofact 及 Dnase 稳定,通过气管吸入实验鼠体内后,编码蛋白在肺中的表达效率是单纯使用 PEI 的 6 倍,而单纯使用 TAT 衍生肽或 TAT 衍生肽与 PEI /DNA 复合物直接混合时,都没有明显转染,体内转染效率的改善与 PEG 的稳定作用及 TAT 衍生肽的细胞膜结合作用都有关(见图 10)。实验细胞系中 PEI 的 IC<sub>50</sub> 为 0.071mg/mL,而 TAT-PEG-PEI 的 IC<sub>50</sub> 为 0.2mg/mL,当 PEI 在 0.1 mg/mL 时,细胞存活率为 23%,而相应 TAT-PEG-PEI 的细胞存活率为 70%<sup>[104]</sup>。



(C)1994-2021 China 图 10 TAT-PEG-PEI/DNA 复合物及与细胞之间的作用 All rights reserved. <http://www.cn>  
Figure 10 The complex of TAT-PEG-PEI/DNA and its interaction with cell

Bikram 等<sup>[105]</sup> 合成了含有内涵体破坏侧基 (*N,N*-二甲基组氨酸基, 简称 His)、主链含有可降解酯键、分子量为 1450 的聚乙二醇嵌段亲水改性的可降解聚乙二醇与分子量为 2.62K 的聚赖氨酸的共聚物 PEG-PLL-*g*-His (见图 11)。经过筛选后得出组氨酸侧基含量为 16mol% 时的分子量为 31K 的共聚物, 在 37℃, pH 为 7.4 的磷酸缓冲溶液中降解的半衰期为 5h, 但与 DNA 形成的复合物在 PBS 缓冲溶液中可以保持 6 天的稳定期。复合物对 A7r5 细胞的生长能力没有明显影响, 而原始聚赖氨酸使细胞的生长能力下降为 70%。PEG-PLL-*g*-16%His 在 A7r5 细胞中的转染效率是聚赖氨酸的 3~4 倍。

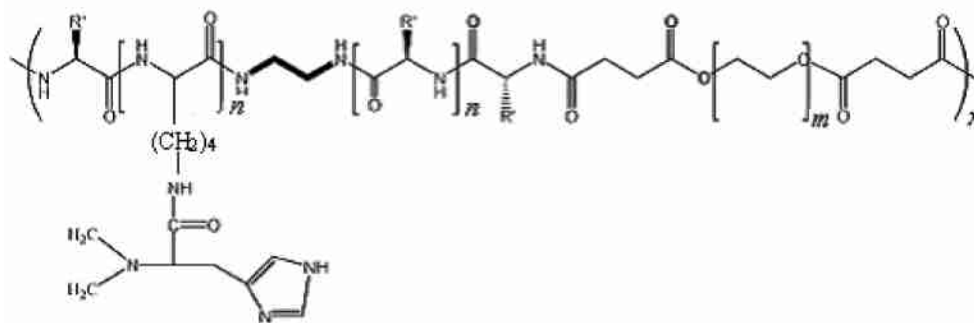


图 11 组氨酸化可降解 PEG-*b*-PLL

Figure 11 Biodegradable poly(ethylene glycol)-co-poly(lysine)-*g*-histidine multiblock copolymer

## 4 展望

尽管阳离子聚合物基因载体得到了广泛的研究, 但要在临床上使用, 还有待于进一步优化和改进, 因为其转染效率仍低于治疗期望, 并且可能存在除细胞毒性以外的其它生理毒性。未来的阳离子聚合物基因载体可能在以下方面取得进展或突破: 首先, 更加综合地利用已经发现的有助于改善转染特性的方法改性传统阳离子聚合物或合成新的阳离子聚合物; 其次, 进一步探讨复合物在细胞内的转运, 尤其是复合物进入细胞核及表达的机制, 探讨使 NLS 发挥最佳效果的方法, 因为尽管一些核定位信号因子被实验过, 但是效果时常不佳<sup>[106~108]</sup>, 这说明人们对于成功应用 NLS 提高转染效率的方法仍不完全清楚; 再次, 阳离子聚合物基因载体与其它基因转染载体及转染方式可以进行综合运用, 以进一步提高转染效率。

## 参考文献:

- [1] Schmidt-Wolf G D, Schmidt-Wolf I G H. Trends Mol Med, 2003, 9 (2): 67~72.
- [2] Merdan T, Kopecek J, Kissel T. Adv Drug Deliver Rev, 2002 (54): 715~758.
- [3] Guo W J, Lee R J. J Control Release, 2001, 77(1~2): 131~138.
- [4] Durieux A C, Bonnefoy R, Busso T, et al. J Gen Med, 2004, 6(7): 809~816.
- [5] Shin J Y, Suh D C, Kim J M, et al. BBA-Gen Subjects, 2005, 1725(3): 377~384.
- [6] O'Neal, W K, Zhou H S, Morral N, et al. Mol Med, 2000, 6(3): 179~195.
- [7] Lampela P, Soininen P, Puttonen K A, et al. Int J Pharm, 2004, 284(1~2): 43~52.
- [8] Moriguchi R, Kogure K, Akita H, et al. Int J Pharm, 2005, 301(1~2): 277~285.
- [9] Ohsaki M, Okuda T, Wada A, et al. Bioconjugate Chem, 2002, 13(3): 510~517.
- [10] Zhang C, Yadava P, Hughes J. Methods, 2004, 33(2): 144 150.
- [11] Shah D S, Sakthivel T, Toth I, et al. Int J Pharm, 2000, 208 (1~2): 41~48.
- [12] Choa J S, Nam K., Park J, et al. J Control Release, 2004, 99 (3): 445~456.
- [13] Pfeifer B A, Burdick J A, Little S R, et al. Int J Pharm, 2005, 304(1~2): 210~219.
- [14] Anderson D G, Akinc A, Hossain N, et al. Mol Ther, 2005, 11(3): 426~434.
- [15] Hwang S, Bellocq N, Davis M. Bioconjugate Chem, 2001, 12 (2): 280~290.
- [16] Kean T, Roth S, Thanou M. J Control Release, 2005, 103: 643~653.
- [17] Thanou M, Flore B I, Geldof M, et al. Biomaterials, 2002, 23(1): 153~159.
- [18] Bozkir A, Saka O M. Drug Delivery Reviews, 2004, 54(12): 1077~1112.
- [19] van de Wetering P, Schuurmans-Nieuwenbroek NME, van Steenberg MJ, et al. J Control Release, 2000, 64 (1~3): 193~203.
- [20] Ihm J E, Han K O, Han I K, et al. Bioconjugate Chem, 2003, 14 (4): 703~708.

- [21] Agarwal A, Unfer R, Mallapragada S K. *J Control Release*, 2005, 103 (1): 245~258.
- [22] Kim I S, Lee S K, Park Y M, et al. *Int J Pharm*, 2005, 298(1): 255~262.
- [23] Ruponen M, Honkakoski P, Ronkko S, et al. *J Control Release*, 2003, 93(2): 213~217.
- [24] Sugiyama M, Matsuura M, Takeuchi Y, et al. *BBA-Biomembranes*, 2004, 1660(1~2): 24~30.
- [25] Aoyama Y, Kanamori T, Nakai T, et al. *J Am Chem Soc*, 2003, 125(12): 3455~3457.
- [26] Harashima H, Shinohara Y, Kiwada H. *Eur J Pharm Sci*, 2001, 13 (1): 85~89.
- [27] Nimesh S, Goyal A, Pawar V, et al. *J Control Release*, 2006, 110(2): 457~468.
- [28] Clamme J P, Krishnamoorthy G, Mely Y. *BBA-Biomembranes*, 2003, 1617(1~2): 52~61.
- [29] Kunath K, von Harpe A, Fischer D, et al. *J Control Release*, 2003, 89(1): 113~125.
- [30] Symonds P, Murraya J C, Hunter A C, et al. *FEBS Lett*, 2005, 579 (27): 6191~6198.
- [31] de Wolf H K, Luten J, Sne C J, et al. *J Control Release*, 2005, 109(1~3): 275~287.
- [32] Kawano T, Okuda T, Aoyagi H O, et al. *J Control Release*, 2004, 99(2): 329~337.
- [33] Kichler A, Chillon M, Leborgne C, et al. *J Control Release*, 2002, 81(3): 379~388.
- [34] Luo D, Haverstick K, Belcheva N, et al. *Macromolecules*, 2002, 35(9): 3456~3462.
- [35] Ahn C H, Chae S Y, Bae Y H, et al. *J Control Release*, 2002, 80 (1~3): 273~282.
- [36] Itaka K, Yamauchi K, Harada A, et al. *Biomaterials*, 2003, 24: 4495~4506.
- [37] Rungsardthong U, Deshpande M, Bailey L, et al. *J Control Release*, 2001, 73(2~3): 359~380.
- [38] Tang G P, Zeng J M, Gao S J, et al. *Biomaterials*, 2003, 24(13): 2351~2362.
- [39] Hong J W, Park J H, Huh K M, et al. *J Control Release*, 2004, 99(1): 167~176.
- [40] Petersen H, Fechner P M, Martin A L, et al. *Bioconjugate Chem*, 2002, 13(4): 845~854.
- [41] Petersen H, Fechner P M, Fischer D, et al. *Macromolecules*, 2002, 35(18): 6867~6874.
- [42] Ahn C H, Chae S Y, Bae Y H, et al. *J Control Release*, 2004, 97(3): 567~574.
- [43] Choi J S, Joo D K, Kim C H, et al. *J Am Chem Soc*, 2000, 122(3): 474~480.
- [44] Oupicky D, Konaka C, Ulbrich K, et al. *J Control Release*, 2000, 65(1~2): 149~171.
- [45] Oupicky D, Howard K, Konak C, et al. *Bioconjugate Chem*, 2000, 11(4): 492~501.
- [46] Cook S E, Park I K, Kim E M, et al. *J Control Release*, 2005, 105(1~2): 151~163.
- [47] Park I K, Jiang H L, Cook S E, et al. *Arch Pharm Res*, 2004, 27 (12): 1284~1289.
- [48] Okuda T, Sugiyama A, Niidome T, et al. *Biomaterials*, 2004, 25 (3): 537~544.
- [49] Gosselin M A, Guo W J, Lee R J. *Bioconjugate Chem*, 2001, 12 (6): 989~994.
- [50] Zhong Z Y, Song Y, Johan F J, et al. *J Control Release*, 2005, 109(1~3): 317~329.
- [51] Lim Y B, Kim C H, Kim K. *J Am Chem Soc*, 2000, 122 (27): 6524~6525.
- [52] Luten J, van Steenis J H, van Someren R, et al. *J Control Release*, 2003, 89 (3): 483~497.
- [53] Park M R, Han K O, Han I K, et al. *J Control Release*, 2005, 105(3): 367~380.
- [54] Kim Y H, Park J H, Lee M, et al. *J Control Release*, 2005, 103(1): 209~219.
- [55] Forrest M L, Koerber J T, Pack D W. *Bioconjugate Chem*, 2003, 14 (5): 934~940.
- [56] Jones N A, Hill I R C, Stolnik S, et al. *BBA-Gene Struct Expr*, 2000, 1517(1): 1~18.
- [57] Lee H, Jeong J H, Park T G. *J Control Release*, 2002, 79(1~3): 283~291.
- [58] Midoux P, Kichler A, Boutin V, et al. *Bioconjugate Chem*, 1998, 9(2): 260~267.
- [59] Rejman J, Bragonzi A, Conesl M. *Mol Ther*, 2005, 12(3): 468~474.
- [60] Sheff D. *Adv Drug Deliver Rev*, 2004, 56(7): 927~930.
- [61] Mannisto M, Vanderkerken S, Toncheva V, et al. *J Control Release*, 2002, 83(1): 169~182.
- [62] Lampela P, Eloma M, Ruponen M, et al. *J Control Release*, 2003, 88(1): 173~183.
- [63] Honore I, Grosse S, Frison N, et al. *J Control Release*, 2005, 107(3): 537~546.
- [64] Abes S, Williams D, Prevot P, et al. *J Control Release*, 2006, 110 (3): 595~604.
- [65] Li W J, Nicol F, Szoka F C. *Adv Drug Deliver Rev*, 2004, 56 (7): 967~985.
- [66] Stayton P S, Hoffman A S, Murthy N, et al. *J Control Release*, 2000, 65 (1~2): 203~220.
- [67] Cheung C Y, Murthy N, Stayton P S, et al. *Bioconjugate Chem*, 2001, 12 (6): 906~910.
- [68] Yessine M A, Leroux J C. *Adv Drug Deliver Rev*, 2004, 56 (7): 999~1021.
- [69] Chen Q R, Zhan L, Luhter P W, et al. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30 (6): 1338~1345.
- [70] Bennis J M, Choi J S, Mahato R I, et al. *Bioconjugate Chem*, 2000, 11(5): 637~645.
- [71] Kim T H, Ihm J E, Choi Y J, et al. *J Control Release*, 2003, 93 (3): 389~402.
- [72] Kihara F, Arima H, Tsutsumi T, et al. *Bioconjugate Chem*, 2002, 13(6): 1211~1219.
- [73] Arima H, Kihara F, Hirayama T, et al. *Bioconjugate Chem*, 2003, 14(1): 176~184.
- [74] Maeda H, Wu J, Sawa T, et al. *J Control Release*, 2000, 65 (1~2): 271~278.
- [75] Nishikawa M, Takemura S, Takahara Y, et al. *J Pharmacol Exp Ther*, 1998, 287(1): 408~415.

- [76] David A, Kopeckova P, Rubinstein A, et al. *Bioconjugate Chem*, 2001, 12(6): 890~899.
- [77] Gao S Y, Chen J N, Dong L, et al. *Eur J Pharm and Biopharm*, 2005, 60 (3): 327~334.
- [78] Sagara K, Kim S W. *J Control Release*, 2002, 79(1~3): 271~281 .
- [79] Ogris M, Walker G, Blessing T, et al. *J Control Release*, 2003, 91 (2): 173~181.
- [80] Bennis J M, Mahato R I, Kim S W. *J Control Release*, 2002, 79(1~3): 255~269.
- [81] Kang H C, Kim S, Lee M, et al. *J Control Release*, 2005, 105(1~2): 164~176 .
- [82] Klink D, Yu Q C, Glick M C, et al. *Mol Ther*, 2003, 7(1): 73~80.
- [83] Suh W, Chung J K, Park S H, et al. *J Control Release*, 2001, 72(1~3): 171~178.
- [84] Kunath K, von Harpe A, Fischer D, et al. *J Control Release*, 2003, 88(1): 159~172.
- [85] Takahashi T, Kono K, Itoh T, et al. *Bioconjugate Chem*, 2003, 14(3): 764~773.
- [86] Wang D, Narang A S, Kotb M, et al. *Biomacromolecules*, 2002, 3(6): 1197~1207.
- [87] Kono K, Akiyama H, Toshinari T, et al. *Bioconjugate Chem*, 2005, 16(1): 208~214 .
- [88] Gomez-Valades A G, Molas M, Vidal~Alabro A, et al. *J Control Release*, 2005, 102(1): 277~291.
- [89] Yoo H, Juliano R L. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(21): 4225~4231.
- [90] Jeong J H, Park T G. *J Control Release*, 2002, 82(1): 159~166 .
- [91] Brownlie A, Uchegbu I F, Sch tzlein A G. *Int J Pharm*, 2004, 274(1~2): 41~52.
- [92] Matsuura M, Yamazaki Y, Sugiyama M, et al. *BBA~Biomembranes*, 2003, 1612(2): 136~143.
- [93] Tokunaga M, Hazemoto N, Yotsuyanagi T. *Int J Pharm*, 2004, 269 (1): 71~80.
- [94] Guo W J, Lee R J. *J Control Release*, 2001, 77(1~2): 131~138.
- [95] Okuda T, Niidome T, Aoyagi H. *J Control Release*, 2004, 98(2): 325~332 .
- [96] Tiyafoonchai W, Woiszwillo J, Middaugh C R. *J Pharm Sci*, 2003, 19(4): 191~202 .
- [97] Liu X H, Yang J W, Miller A D, et al. *Macromolecules*, 2005(38): 7907~7914.
- [98] Crommelin D J A, Storma G, Jiskoota W, et al. *J Control Release*, 2003, 87 (1~3): 81~88.
- [99] Lee J H, Lim Y B, Choi J S, et al. *Bioconjugate Chem*, 2003, 14 (6): 1214~1221.
- [100] Okuda T, Sugiyama A, Niidome T, et al. *Biomaterials*, 2004, 25 (3): 537~544.
- [101] Talsma S S, Babensee J E, Murthy N, et al. *J Control Release*. 2006, 112 (2): 271~279.
- [102] Han J, Yeom Y. *Int J Pharm*, 2000, 202(1~2): 151~160 .
- [103] Lee H, Jeong J H, Park T G. *J Control Release*, 2001, 76(1~2): 183~192.
- [104] Kleemann E, Neu M, Jekel N, et al. *J Control Release*, 2005, 109(1~3 ): 299~316 .
- [105] Bikram M, Ahn C H, Chae S Y, et al. *Macromolecules*, 2004, 37 (5): 1903~1916.
- [106] Boulanger C, Di Giorgio C, Vierling P. *Eur J Med Chem*. 2005, 40 (12): 1295~1306 .
- [107] Haberland A, Bottger M. *Biotechnol Appl Bioc*, 2005, 42: 97~106.
- [108] van der Aa M A E A, Koning G A, d'Oliveira C, et al. *J Gene Med*. 2005, 7 (2): 208~217.

## Cationic Polymeric Gene Carrier

WU Chuan-bao   HAO Jian-yuan   DENG Xian-mo   XIA Yu

(*Chinese Academy of Science Chengdu Institute of Organic Chemistry, Chengdu 610041, China*)

**Abstract:** Secure and efficient gene carrier is a prerequisite of gene therapy coming into reality. Cationic polymer is an important kind of non-viral gene carriers because it is easily produced and modified at a large scale, has no immunogenicity, can complex DNA into compact microparticle to prevent degradation of DNA from Dnase and carry DNA into cell. But cationic polymer has acute cytotoxicity related to charge and lower transfection efficiency than viral carrier, which limits its use in clinical gene therapy. Here, research progress on cationic polymeric gene carrier was summarized in enhancing transfection efficiency and decreasing cytotoxicity. Eight measures of improving cationic polymeric gene carrier in transfection were summarized and the development of cationic polymeric gene carrier was forecast.

**Key words:** Cationic polymer; Gene carrier; Transfection efficiency; Cytotoxicity

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>