

综 述

基于碳水化合物的阳离子聚合物载体在基因释放中的应用

金 荣^{1,2}, 钟志远², Johan F. J. Engbersen², 印 杰^{1*}

(1. 上海交通大学 化学化工学院, 上海 200240;

2. Twente 大学 化学工程学院, 荷兰 Enschede P.O. Box 217, 7500 AE)

摘要: 在基因治疗中, 基因释放载体是不可缺少的重要组成部分。近几年来聚合物基因释放载体的研究主要旨在开发低毒或无毒的阳离子聚合物用于安全有效的基因释放。作为一类天然化合物, 基于碳水化合物的阳离子聚合物载体由于其良好的生物相容性和低毒性被广泛地研究并应用于基因释放。本文阐述了聚合物基因释放的机理, 并对近几年来一些典型的含碳水化合物的阳离子聚合物基因释放载体作一综述。

关键词: 非病毒载体; 基因释放; 碳水化合物

基因治疗(gene therapy)可定义为使用理疗基因修复或替换缺陷基因来治疗人类疾病^[1]。在过去二十年间, 基因理疗技术被用来治疗癌症等重大疾病, 显示出强大的应用前景, 受到人们的广泛重视。一般来说, 基因理疗需要理疗基因、基因释放系统和基因表达系统。其中, 基因释放系统负责将理疗基因释放到靶向细胞的细胞核。由于基因释放过程比较复杂, 是基因疗法中的关键过程, 成为目前人们研究的热点。

在基因释放过程中, 理疗基因需要通过某种途径进入细胞核。直接将基因释放到细胞内往往由于基因的酶降解导致低的细胞转染效率。基于载体的基因释放可获得高的细胞转染效率, 因此基因释放载体是基因释放的关键^[2]。基因释放载体主要包括两大类: 病毒载体和非病毒载体。病毒载体是经过生物工程技术改性的天然病毒, 如逆转录病毒(retroviruses)、腺病毒(adenoviruses)和痘病毒(poxvirus)^[3]。病毒载体具长效的基因表达, 转染效率高等优点, 因此被广泛地用于基因释放领域。据报道大多数临床基因理疗使用的是病毒载体^[3]。但是人们也为病毒载体的安全问题所困扰, 像细胞毒性(cytotoxicity)、致癌毒性(oncogenicity)及免疫反应。考虑到病毒载体的局限性, 近来非病毒载体的研究越来越受到人们的重视。非病毒载体通常是天然的或合成的阳离子材料。它们能够与带负电荷的DNA通过静电力自组装成复合体(complex)。最为常见的非病毒载体是脂质体(cationic lipid)和阳离子聚合物(cationic polymer)。但脂质体/DNA复合体稳定性不佳且具有较高毒性。比较而言, 阳离子聚合物较脂质体更具优势。它与DNA可形成更稳定的复合体, 而且通过多样性的聚合反应技术可以进行分子结构设计进而调控基因释放活动。最近报道表明一些生物可降解阳离子聚合物不但具有较高的基因转染效率而且无毒或者低毒; 而且靶向的受体基团也可以引入用于靶向基因释放^[4]。

近几年来聚合物基因释放载体主要旨在开发低毒或无毒的阳离子聚合物用于安全有效的基因释放。人们设计了各种各样的生物相容的可降解聚合物材料。其中, 基于碳水化合物的材料由于其天然的生物相容性和低毒性成为理想的基因释放载体。本文将对基因释放的机理以及一些典型的含碳水化合物的阳离子聚合物基因释放系统作一综述。

基金项目: Twente Scholarship Programme Foundation (TSP)资助 (No. 05001)

作者简介: 金荣 (1981—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为阳离子聚合物基因释放载体的研究;

* 通讯联系人: E-mail: jyin@sjtu.edu.cn

1 聚合物载体基因释放的机理

聚合物基因释放的机理如图 1 所示, 主要包含以下几个步骤: (1) 聚合物 /DNA 复合物的形成; (2) 细胞内吞过程; (3) 内涵体中复合物的逃逸; (4) 聚合物的解离, DNA 在细胞质中的扩散以及细胞靶向; (5) 基因表达。

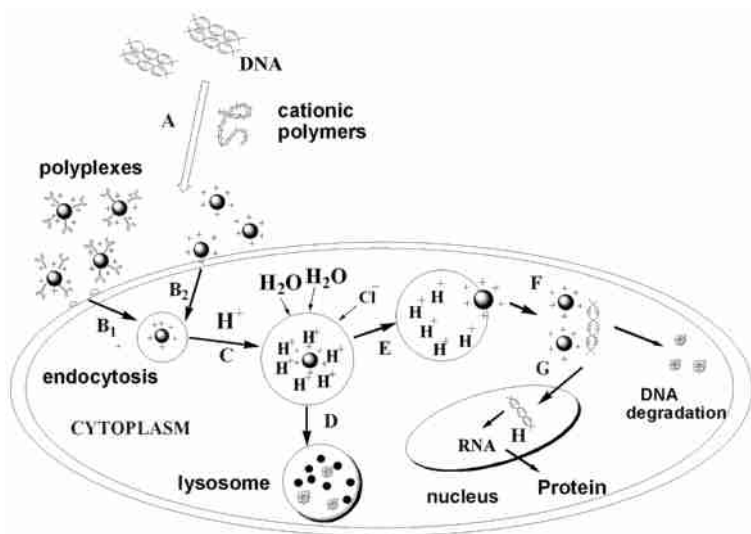


图 1 阳离子聚合物基因释放过程

Figure 1 Schematic presentation of gene delivery mediated by polymeric vectors

A: 聚合物和 DNA 形成纳米尺寸的聚合物 /DNA 复合物

B1: 聚合物 /DNA 复合物通过受体介导靶向作用被细胞内吞 (内吞途径之一)

B2: 聚合物 /DNA 复合物通过与细胞膜之间的相互作用被细胞内吞 (内吞途径之二)

C: 阳离子聚合物的质子化以及“质子海绵效应” (proton sponge effect)

D: 聚合物 /DNA 复合物在内涵体或者溶酶体中降解

E: 内涵体膨胀以致裂解

F: 聚合物 /DNA 复合物从内涵体中逃逸至细胞质

G: 聚合物 /DNA 复合物的解离, DNA 在细胞质中的扩散以及细胞核靶向

H: 蛋白质的表达

1.1 聚合物 /DNA 复合物的形成

阳离子聚合物能自发地通过静电作用自组装与 DNA 形成纳米尺寸的聚合物 /DNA 复合物^[5~7]。所形成复合物的形状有圆突状, 棒状或球状, 直径从几十到几百纳米不等^[8]。有关此类聚合物 (如: 聚乙烯亚胺 (PEI, polyethyleneimine)、聚赖氨酸 [PLL, poly (L-lysine)]、聚酰胺-胺型聚合物 [PAMAM, poly (amido amine)], 见图 2) 的研究表明聚合物和 DNA 的电荷比是一个至关重要的参数, 它能造成聚合物 /DNA 复合物粒子在尺寸大小上的不同从而导致在转染效率和细胞毒性上显著的差异^[5, 9]。一般来说, 当聚合物 /DNA 电荷比上升时粒子尺寸会下降。

1.2 细胞内吞过程

作为一个有效的基因释放系统的必要条件就是聚合物 /DNA 复合物能被有效地内吞, 因而复合物的粒径和表面电荷是两个非常重要的参数。以往的研究表明粒径小于 200nm 的粒子能被有效地内吞^[10, 11]; 并且, 表面带有正电荷的粒子能和带负电荷的细胞膜相互作用, 更有利于内吞过程^[10]。细胞内吞过程包括三个步骤: 带正电的复合物与细胞膜结合, 内在化 (internalization) 和内涵体 (endosome) 的形成 (见图 3)^[12]。

细胞膜是基因释放的主要障碍之一。复合物与细胞膜之间的静电作用是其内在化和内涵体形成的前提条件。但是, 过多的正电荷也会导致复合物与细胞非专一结合。因此人们提出将复合物表面连接上

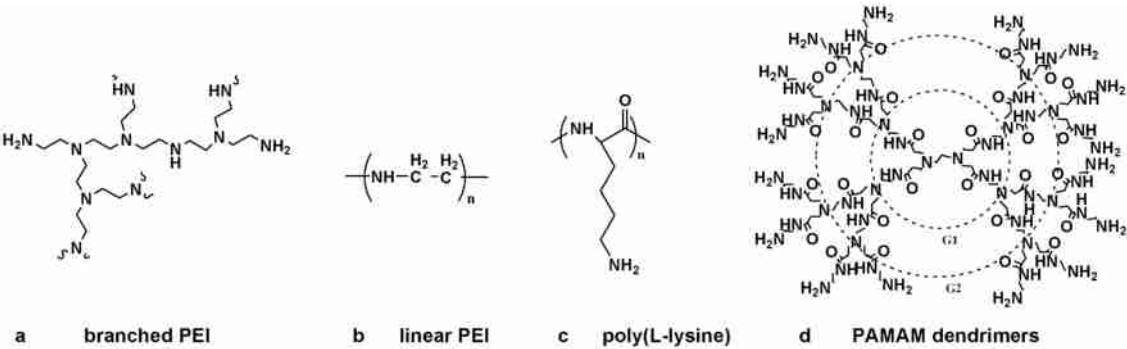


图2 一些阳离子聚合物载体的结构
Figure 2 The structures of cationic polymer vectors

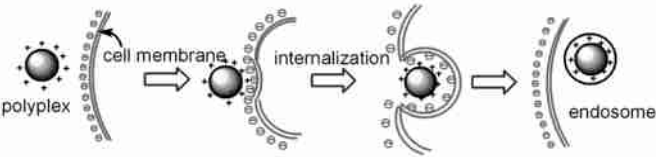


图3 内吞过程的描述
Figure 3 Simplified description of endocytosis pathway^[13]

配体[如: 铁传递蛋白(transferrin)或者抗 CD3 抗体(anti-CD3 antibody)], 使其通过受体介导的内吞途径来进入细胞^[14]。

1.3 内涵体中复合物的逃逸

经过内吞过程以后, 聚合物 /DNA 复合物在细胞体内形成内涵体。随着内涵体初步形成到成熟, 其内的 pH 值不断下降^[9]。随着 pH 值的降低, 复合物会进一步进入溶酶体, 降低的 pH 值和溶酶体中的酶导致基因被降解。因此为了防止基因的降解, 聚合物 /DNA 复合物必须尽快从内涵体中逃逸出来。据报道一些阳离子聚合物如聚乙烯亚胺能顺利逃逸, 这是由于所谓的“质子海绵效应”(或称“质子海绵假设”)^[19]。“质子海绵效应”的前提是聚合物结构中有可质子化(在 pH 为 5~7 范围)的功能基团。这些可质子化的功能基团(例如: 胺基)能结合内涵体中的质子并有效地缓冲内涵体中 pH 值。在阳离子聚合物质子化的过程中, 内涵体内外产生了离子浓度差(渗透压), 这导致氯离子不断地进入内涵体, 同时水也从细胞质渗入内涵体中, 最终内涵体膨胀继而破裂, 从而聚合物 /DNA 复合物从内涵体中逃逸。这个假设成功地解释了一些具有高缓冲能力的聚合物如聚乙烯亚胺显示出较高的转染效率的原因^[15, 9]。

1.4 复合物的解离, DNA 在细胞质中的扩散以及细胞核靶向

从内涵体中逃逸出来后, 复合物可能发生解离, DNA 在细胞质中扩散到达细胞核膜。虽然, DNA 在细胞质中扩散机理并不是很明确, 但是这个扩散过程却是基因释放中关键的步骤之一, 因为 DNA 或者其复合物往往会在扩散过程中降解从而导致转染效率的降低^[15]。因此对于聚合物 /DNA 复合物来说应该有足够的稳定性来防止 DNA 在扩散过程中被细胞质中的酶降解。加快复合物在细胞质中的扩散也能达到保护 DNA 的作用。细胞核膜是基因释放的另一障碍。对于复合物来说有两种途径可以穿过核膜进入细胞核^[5, 15]。其一是复合物通过被动扩散(passive diffusion)或核定位信号肽(nuclear location signal, NLS)穿过核膜孔; 另一种便是复合物在细胞分裂期穿过破裂的细胞核膜进入细胞核。但是目前为止还没有确凿的证据来证明这两种途径, 这些过程还有待于研究证实。

1.5 基因表达

迄今人们还不能确定聚合物 /DNA 复合物的解离是在进入细胞核之后还是在扩散过程中发生的。过早的释放 DNA 会导致 DNA 在细胞质中被酶降解, 但倘若由于聚合物和 DNA 结合过于紧密则会阻止 DNA 的释放^[2]。一旦 DNA 进入细胞核, DNA 可通过基因表达指导蛋白质的合成。

2 理想聚合物载体的要求

2.1 高的转染效率

一个理想的聚合物载体要有高的转染能力。目前, 聚合物载体远不如病毒载体有效。低的转染效率可能是由于低效的内吞过程, DNA 不充分释放或被降解, 或者不能有效地进入细胞核等因素造成。提高转染效率的方案包括: (1) 增强聚合物载体与 DNA 的结合能力得到小粒径的复合物; (2) 根据“质子海绵假说”设计具有高缓冲能力的聚合物载体; (3) 其它的还有在聚合物链中引入可降解基团辅助 DNA 释放^[16, 17]。

2.2 安全性

低的细胞毒性则是另一个要求。在聚合物链中引入生物相容性的组分(如碳水化合物、聚乙二醇等^[18])可以降低细胞毒性, 改善载体的生物相容性, 延长在血液循环中的时间^[19, 20]。

3 基于碳水化合物的阳离子聚合物载体

3.1 壳聚糖及其衍生物

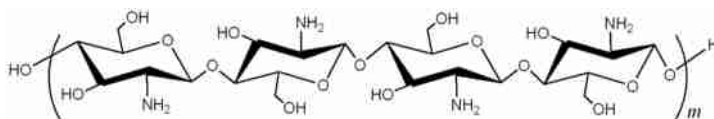


图 4 壳聚糖的结构

Figure 4 The structure of chitosan

壳聚糖是一种可生物降解的、天然的阳离子多糖, 由葡糖胺单体通过(β -1, 4)糖苷键连接而成。壳聚糖的 pK_a 值在 6.5 左右, 能够与 DNA 形成复合物用于基因释放。Mumper 首次报道了用壳聚糖作为基因载体来释放 DNA, 结果显示壳聚糖的分子量会影响壳聚糖/DNA 复合物的粒子尺寸(范围从 100nm 到 600nm 不等), 最优化的分子量则依赖于所选用的细胞系^[1, 21]。一般来说分子量在 10 ~ 50kDa 的壳聚糖是比较理想的基因释放载体, pH 环境和血清也在很大程度上影响其转染效率。据报道壳聚糖在 pH = 6.9 的环境下转染效率会高于其在 pH = 7.6 的环境; 而壳聚糖在存在血清的情况下较无血清的时候转染效率增加 2 ~ 3 倍, 这可能是因为存在血清的条件下细胞功能有所增强^[22]。并且, 一些研究表明壳聚糖的链长, 脱乙酰化程度(F_A)以及 N/P 电荷比(聚合物载体中 N 残基与 DNA 分子带负电的磷酸基团的摩尔比)都是决定壳聚糖载体转染效率的重要因素^[22~26]。

壳聚糖只有在酸性 pH = 1 ~ 6 的条件下可溶, 在生理环境中容易聚集, 故而人们致力于研究壳聚糖衍生物以求改进其溶解性。一般来说有两种方法, 一种是在壳聚糖结构中引入可溶性的组分, 如聚乙二醇^[1]; 另一种便是将壳聚糖的氨基季铵化^[27]。壳聚糖还可以通过引入十二烷基链来增加其稳定性^[28]。结构表明长的烷基链能够保护 DNA 防止其被 DNA 酶降解。这些改性后的壳聚糖显示出增强的转染效率, 并且毒性也有所降低。改性的壳聚糖的转染效率随着细胞系的不同也有所不同。例如: 对于 COS-1 细胞系, 季铵化的三甲基壳聚糖(季铵盐化分别为 40% 和 50%)的转染效率和壳聚糖寡聚物相比显示出 5 ~ 10 倍的提高, 但对于 Caco-2 细胞系, 两者的转染效率并无较大差异^[27]。这些改性以后的壳聚糖载体的转染效率仍然无法和聚乙烯亚胺相比。近来, Wong 报道了一种 PEI 接枝的壳聚糖(PEI-g-Chitosan)基因释放载体, 结果显示在 N/P 电荷比为 2.5/1 时, 聚合物能有效地结合 DNA 形成复合物, 并且无论是体内或是体外实验, PEI-g-Chitosan 的转染效率较聚乙烯亚胺(25 KDa)有所提高, 细胞毒性也较聚乙烯亚胺低^[29]。

3.2 基于 β -环糊精的聚合物载体

环糊精(cyclodextrin, CD)是一种由多个 D-吡喃葡萄糖单元通过 α -1, 4-糖苷键连接而成的多糖。其中 β -CD(含 7 个吡喃葡萄糖单元)被认为是一种毒性低、生物相容性好的材料, 而被开发作为聚合物载体

应用于基因释放。Davis 曾报道通过双功能基化的环糊精二胺和功能基化的咪唑盐(dimethylsuberimidate[°] 2HCl, DMS)共聚来制备阳离子聚合物^[29]。所得到的 β-CD 聚合物能紧密结合 DNA, 在 N/P 电荷比为 5 时, 粒子大约为 100 ~ 150nm, 其转染效率与 PEI (25KDa)相当, 且相应的细胞毒性较低, 细胞存活率为 90%。并且, 该组制备四种不同结构的 β-CD 聚合物加以比较(见图 5)^[30], 结果表明, 电荷中心和 β-CD 之间的距离对复合物粒子尺寸和表面电荷影响极小, 但对于其细胞毒性和转染效率却有着不可忽视的影响。对于聚合物 AP1-AP3, 电荷中心和 β-CD 之间的距离越远, 复合物细胞毒性越大, 继而转染效率较低。另一方面, 对于季铵类聚合物(AP4), 电荷量对复合物的转染效率也会有影响。结果显示季铵化脒类聚合物较未季铵化的脒类聚合物转染效率低, 而细胞毒性相当。此外, 当有氯喹啉存在的情况下, 季铵化脒类聚合物转染效率有所提高, 而对于脒类聚合物却没有提高。这表明季铵化脒类聚合物逃逸内涵体的能力较差^[31]。

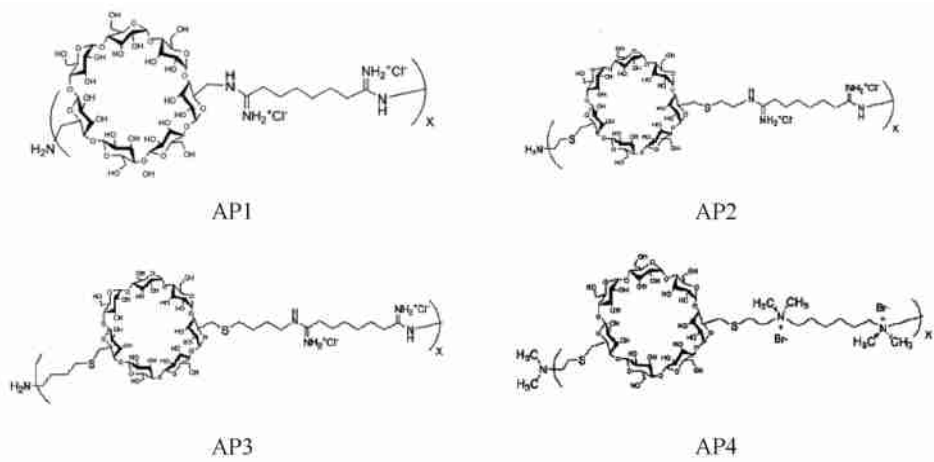


图 5 不同结构的 β-环糊精聚合物

Figure 5 The structures of different types of β-CD-containing polymers

3.3 基于裂蓟菌素 (Schizophyllan) 的阳离子聚合物载体

裂蓟菌素是一种已经用于临床的多糖类聚合物材料, 具有安全低毒的特点。通过氧化反应、偶联及还原三步反应, 裂蓟菌素可以被改性为阳离子聚合物作为基因释放载体^[32] (见图 6)。实验表明被改性的裂蓟菌素能有效地转染 COS-1 细胞。比较四种使用的胺类化合物, 乙醇胺 (ethanolamine)、亚精胺 (spermidine)、精胺 (spermine) 和 N,N'-二 (3-氨基丙基)-1, 3-丙基二胺 (N,N'-bis (3-amiopropyl)-1, 3-propanediamine, APPD), 使用 APPD 改性的裂蓟菌素转染效率最好, 能获得相当于聚乙烯亚胺 5 倍的转染效率。然而相应的细胞毒性也比较高 (细胞存活率为 70% ~ 80%)。PEG 改性可以降低聚合物产生的细胞毒性, 然而转染效率也相应的降低。改性的裂蓟菌素最突出的优势是可用于长效的基因表达, 表达半衰期为 7 天。

3.4 Poly (glycoamidoamine) 阳离子聚合物载体

Reineke 等报道了类聚乙烯亚胺的阳离子聚合物 poly (glycoamidoamine) 用于非病毒基因释放^[33]。通过不同结构长度的胺与 D-glucaric acid, dimethyl-meso-galactarate 以及 D-mannaro-1, 4, 6, 3-dilactone 逐步聚合反应得到一系列聚合物 (见图 7)。研究发现可质子化氮原子的数量对聚合物 /DNA 复合物的形成影响很大, 因而也影响了最终的转染效率。其中含有 4 个氮原子的 poly (glycoamidoamine) 显示出高的转染效率, 与聚乙烯亚胺有相近的转染能力。特别是聚合物上的手性羟基基团对最终的转染效率也有明显的影响, 其中以基于 dimethyl-meso-galactarate 的 poly (glycoamidoamine) 复合物介导的转染效率最好。结果表明此类基于碳水化合物的聚合物既有良好的生物相容性同时又兼有较高的转染效率。

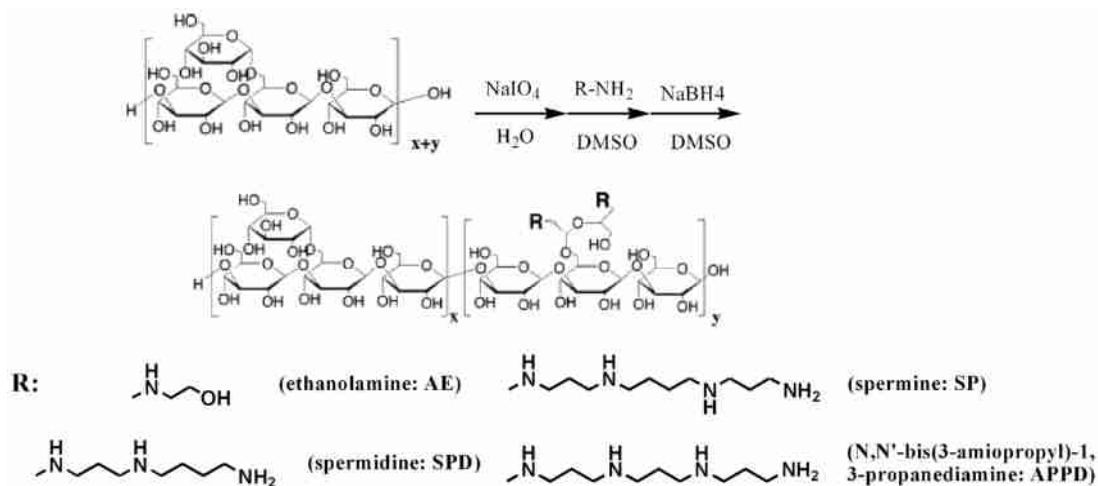


图 6 基于 SPG 聚合物载体的合成

Figure 6 Synthesis of different types of SPG-based polymeric vectors

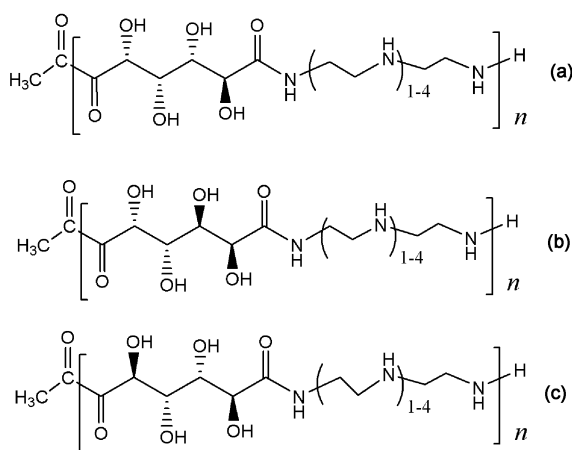


图 7 不同结构的 poly(glycoamidoamine) 聚合物

Figure 7 The structures of different types of poly(glycoamidoamine) polymers

4 结语

基于碳水化合物的阳离子聚合物载体由于其良好的生物相容性、低的细胞毒性具有很大的可能性用于安全有效的非病毒基因释放。和国外相比,目前国内在这方面的研究主要集中在壳聚糖及其衍生物的基因释放载体^[1, 28, 34~36],其它碳水化合物类型的载体也有一些报道^[37, 38]。

由于基因释放的机理不同,非病毒载体的转染效率仍低于病毒载体,而且体内和体外实验结果往往缺乏合理的相关性^[39]。因此,今后的工作将会注重于细胞内基因释放机理的研究和体内释放实验的研究。通过改变聚合物的结构、组分等尽可能模拟病毒载体的基因释放,将其安全性和病毒载体的有效性相结合,以实现最终的体内靶向基因释放和临床基因治疗。

参考文献:

[1] Liu W G, Yao K D. J Control Rel, 2002, 83 (1): 1~11.

[2] El-Aneel A. J Control Rel, 2004, 94 (1): 1~14

[3] Merdan T, Kopecek J, Kissel T. Adv Drug Delivery Rev, 2002, 54 (5): 715~758.

[4] Nishikawa M. Biol Pharm Bull, 2005, 28 (2): 195~200

[5] Wu G Y, Wu C H, J Biol Chem, 1988, 263 (29): 14621~14624.

- [6] Han S, Mahato R I, Sung Y K, et al. *Mol Ther*, 2000, 2 (4): 302 ~ 317.
- [7] Bloomfield V A. *Biopolymers*, 1997, 44 (3): 269 ~ 282.
- [8] Dunlap D D, Maggi A, Soria M R, et al. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25 (15): 3095 ~ 3101.
- [9] Abdallah B, Hassan A, Benoist C, et al. *Hum Gene Ther*, 1996, 7 (16): 1947 ~ 1954.
- [10] Pouton C W, Seymour L W. *Adv Drug Delivery Rev*, 2001, 46 (2-3): 187 ~ 203.
- [11] Vijayanathan V, Thomas T, Thomas T J. *Biochemistry*, 2002, 41 (48): 14085 ~ 14094.
- [12] Luo D, Saltzman W M. *Nat Biotechnol*, 2000, 18 (8): 33 ~ 37.
- [13] Godbey W T, Wu K K, Mikos A G, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96 (9): 5177 ~ 5181.
- [14] Kirchheis R, Kichler A, Wallner G, et al. *Gene Ther*, 1997, 4 (5): 409 ~ 418.
- [15] Wiethoff C M, Middaugh C R. *J Pharm Sci*, 2003, 92 (2): 203 ~ 217.
- [16] Zhong Z Y, Song Y, Engbersen J F J. *J Control Rel*, 2004, 109 (1-3): 317 ~ 329.
- [17] Christensen L V, Chang C W, Kim W J, et al. *Bioconjugate Chem*, 2006, 7 (15): 1233 ~ 1240.
- [18] 王幽香, 沈家骢. *科学通报*, 2004, 49 (9): 819 ~ 824.
- [19] Petersen H, Fechner P M, Martin A L, et al. *J Control Rel*, 2002, 13 (4): 845 ~ 854.
- [20] Wong K, Sun G B, Zhang X Q, et al. *Bioconjugate Chem*, 2006, 17 (1): 152 ~ 158.
- [21] Mumper R J, Wang J, Claspell J M, et al. *Proc Int Symp Control Rel Bioact Mater*, 1995, 22: 178 ~ 179.
- [22] Sato T, Ishii T, Okahata Y. *Biomaterials*, 2001, 22 (15): 2075 ~ 2080.
- [23] Koping-Hoggard M, Tubulekas I, Guan H, et al. *Gene Ther*, 2001, 8 (14): 1108 ~ 1121.
- [24] Koping-Hoggard M, Melnikova Y S, Vanum K M, et al. *J Gene Med*, 2003, 5 (2): 130 ~ 141.
- [25] Romøren K, Pedersen S, Smistad G, et al. *Int J Pharm*, 2003, 261 (1-2): 115 ~ 127.
- [26] Danielsen S, Strand S, Davies C d L, et al. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1721 (1-3): 44 ~ 54.
- [27] Thanou M, Florea B I, Geldof M, et al. *Biomaterials*, 2002, 23 (1): 153 ~ 159.
- [28] Li F, Liu W G, Yao K D. *Biomaterials*, 2002, 23 (2): 343 ~ 347.
- [29] Gonzalez H, Hwang S J, Davis M E. *Bioconjugate Chem*, 1999, 10 (6): 1068 ~ 1074.
- [30] Reineke T M, Davis M E. *Bioconjugate Chem*, 2003, 14 (1): 247 ~ 254.
- [31] Reineke T M, Davis M E. *Bioconjugate Chem*, 2003, 14 (1): 255 ~ 261.
- [32] Nagasaki T, Hojo M, Uno A. *Bioconjugate chem*, 2004, 15 (2): 249 ~ 259.
- [33] Liu Y M, Reineke T M. *J Am Chem Soc*, 2005, 127 (9): 3004 ~ 3015.
- [34] 陈郎东, 杨冠东, 董加喜, 等. *生物医学工程研究*, 2005, 24 (3): 162 ~ 165.
- [35] 张灿, 丁娅, 平其能. *中国现代应用药学杂志*, 2005, 22 (5): 386 ~ 388.
- [36] 万一元, 张星, 何友兼, 等. *癌症*, 2005, 24 (11): 1408 ~ 1411.
- [37] Huang H L, Tang G P, Wang Q Q, et al. *Chem Commun*, 2006, 22: 2382 ~ 2384.
- [38] 刘涛, 陈龙, 侯森, 等. *科学通报*, 2006, 51 (4): 399 ~ 403.
- [39] 黄世文, 卓仁禧. *科学通报*, 2003, 448 (5): 405 ~ 409.

Carbohydrate-based Cationic Polymeric Vectors for Gene Delivery

JIN Rong^{1,2}, ZHONG Zhi-yuan², Johan F. J. Engbersen², YIN Jie^{1*}

(1 School of Chemistry and Chemical Technology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China;

2 Faculty of Chemical Technology, University of Twente, P. O. Box 217, 7500 AE Enschede, The Netherlands)

Abstract: Gene delivery system is indispensable for gene therapy. Recently, research on polymeric gene delivery vectors aims at developing non / low cytotoxic cationic polymers for safe and efficient gene transfer. As a family of natural compounds, carbohydrate-based cationic polymer vectors are widely studied and applied to gene delivery due to their good biocompatibility and low cytotoxicity. This review describes the mechanism of polymeric gene delivery processes. Also, the latest typical carbohydrate-based polymers as non-viral vectors are reviewed.

Key words: Non-viral vectors; Gene delivery; Carbohydrate