

# 纳米阳离子多聚物在基因载体系统的应用

郭 毅, 张爽男, 康春生, 常 津<sup>\*</sup>

(天津大学材料科学与工程学院纳米生物技术研究所, 天津 300072)

**摘要:**阳离子多聚物能与 DNA 通过静电吸附作用而自组装成纳米微粒, 防止 DNA 被核酸酶降解。阳离子多聚物由于具备合成简便、储存稳定、基因荷载率高、靶向性强、免疫原性低等优点而被用作基因载体。阳离子多聚物按特性可分为两类: 合成型和天然型。经典的人工合成型阳离子多聚物基因载体主要有: 多聚乙烯亚胺、多聚左旋赖氨酸和树状大分子等; 天然生物型阳离子多聚物基因载体主要有壳聚糖及其衍生物和明胶等。本文详细论述了各种阳离子聚合物用作基因载体的性能特点、自身缺陷、介导基因进入细胞的机理和靶向性策略, 并对非病毒基因载体的发展作出展望。

**关键词:**聚阳离子载体; 纳米微粒; 基因治疗; 多聚复合体

## 引言

目前, 应用于基因治疗的载体主要有病毒载体和非病毒载体两种。病毒载体转染效率高, 但存在免疫原性高、毒性大、目的基因容量小、靶向特异性差、制备较复杂及费用较高等缺点, 因此人们愈来愈重视非病毒载体的研究。非病毒载体安全性好, 但存在转染、整合效率低等缺点。常用的非病毒载体包括裸 DNA (naked DNA)、脂质体载体及阳离子多聚物载体等<sup>[1]</sup>。与脂质体及其它非病毒载体相比, 阳离子多聚物载体比较稳定, 结构灵活, 易调整其分子量、聚合物合成、多聚物形状(线形、星形、无规网状、嵌段、接枝等), 可以通过引入侧链和特异靶向性基团来修饰多聚物骨架, 进而调整和改善载体的性能, 因此阳离子多聚物载体具有较大的发展空间, 引起材料学家的广泛关注, 成为研究的热点。

根据多聚物的生物特性, 可将阳离子多聚物基因载体分成人工合成型和生物型。常见的人工合成型阳离子多聚物型载体有多聚左旋赖氨酸[poly(L-lysine), PLL], 多聚乙烯亚胺(polyethylenimine, PEI) 和星状树突体[Polyamidoamine (PAMAM) dendrimers]等; 天然生物型阳离子多聚物基因载体主要有壳聚糖及其衍生物和明胶等。

## 1 纳米阳离子多聚物基因载体系统

阳离子聚合物结构上的一个共同特点是分子内含有许多氨基, 在生理 pH 下会发生质子化, 这些质子化的氨基可以与 DNA 的磷酸基团的负电荷之间的静电吸附作用而发生电性中和, 使 DNA 自组装成稳定的多聚复合物(polyplexes), 使 DNA 分子由伸展结构压缩为体积相对较小, 不易被核酸酶降解的 DNA 粒子, 并可防止大的复合物在短时间内沉淀, 进而提高转染效率。此外, 复合物大小约 50~500nm, 带正电荷, 可与细胞表面带负电荷的受体结合, 因此能有效被细胞内吞摄入介导基因转移<sup>[2]</sup>。

然而阳离子多聚物/DNA 复合物纳米微粒进入体内后, 在达到靶细胞的过程中需要克服许多障碍, 如调理素(血清抗体、补体)、吞噬系统、胞外基质、降解酶等<sup>[3]</sup>。因此, 对阳离子多聚物/DNA 复合物纳米微粒表面要接上细胞表面特异表达的受体来解决靶向性问题, 使复合物能穿越重重障碍, 安全无损到达靶细胞<sup>[4]</sup>。运载系统到达靶细胞后, 首先遇到的是胞膜, 其亲疏性、通透情况直接影响载体进入胞内。如果通过胞吞作用进入内吞小泡后, 则会受到内吞小泡中酶的降解或进入溶酶体腔室中被降解, 为促使 DNA

**基金项目:**国家自然科学基金(50373033); 天津市应用基础研究重点基金(05YFJZJC01001);

**作者简介:**郭毅, 25 岁, 男, 硕士研究生, 从事载药及基因纳米微粒的研究;

<sup>\*</sup> 联系人 Tel: 022-27401821 E-mail: jinchang@tju.edu.cn

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

从内吞小泡和溶酶体中释放,可加入溶酶体抑制剂如氯喹或利用非病毒本身的特点如采用有侧链的阳离子多聚物如 PEI 和星状树突体等来破坏内吞小泡膜以释放其中的 DNA;也可以利用病毒或病毒蛋白、细菌蛋白、短肽等。DNA 转运对于许多非病毒介导的转染来说都是一个限速步骤,可以通过共价偶联上靶向基因及富含赖氨酸和精氨酸的核定位信号(NLS)序列,便于复合物进入核中进行转录,从而提高转染效率<sup>[5,6]</sup>。Foster 等<sup>[7]</sup>将人表皮生长因子(HER2)抗体与多聚赖氨酸共价耦联,然后用于萤火虫酶基因表达质粒(pRSVLuc)非共价结合,发现其转染效率提高了 186 倍。Zenke 等<sup>[8]</sup>利用转移蛋白-多聚赖氨酸结合外源质粒,通过转铁蛋白受体,成功将外源基因导入造血细胞。

而对于聚阳离子载体的毒性机制目前主要有两种代表性的观点,其一认为毒性的产生主要是阳离子聚合物的正离子与细胞膜的相互作用而对细胞产生损伤或引起细胞的凝聚,另外一种则认为阳离子聚合物进入细胞后激活细胞内信号转导系统导致的。Fischer 等<sup>[9]</sup>对聚合物进行了体外细胞毒性试验,发现阳离子聚合物载体的毒性具有结构依赖性,与阳离子聚合物的分子量、电荷密度、空间构型以及阳离子聚合物-DNA 复合物的表面电位等因素有关。对于结构相似的阳离子聚合物,分子量和载体表面电荷的密度是影响载体毒性的关键因素,分子量越高,载体表面的电荷密度越大,载体的毒性越大;对于结构不同的聚合物,影响载体毒性的因素较复杂。Fischer 在测试了常见的几种阳离子聚合物载体的毒性后,发现聚乙烯亚胺和聚赖氨酸的毒性最大,而聚酰胺-胺型树状物载体的毒性较小。Gebhart<sup>[2]</sup>亦通过转染一组细胞比较了常见的阳离子聚合物,和脂质体的毒性,在研究中发现大部分阳离子聚合物载体的毒性比阳离子脂质体的毒性小。且阳离子聚合物的结构特点使其易于通过修饰降低毒性。

2 合成型纳米阳离子多聚物基因载体系统

合成型阳离子多聚物基因载体主要分为多肽类和多聚季铵盐类,常用的载体有:多聚左旋赖氨酸(PLL),多聚乙烯亚胺(PEI)和星状树突体(PAMAM)等。它们用作基因载体具有合成方便,安全无毒等优点。但阳离子多聚物基因载体存在转染、整合效率低等缺点。

2.1 PEI 介导的纳米基因载体系统

PEI 是近年来研究最为广泛的阳离子多聚物非病毒基因载体。PEI 有两种形式:线性和支链。支链型的 PEI 是一种高度分枝的聚合物,具有强大的缓冲能力,能抑制晚期内吞小泡的酸化并因而导致肿胀引起内吞小泡膜的破裂释放其中的载体 DNA<sup>[10]</sup>。

PEI 与 DNA 通过静电作用形成复合物,并且新形成的复合物表面电荷与 PEI 的相比显著降低,有利于与细胞膜的融合,并降低载体的毒性。其 PEI 缩合 DNA 的能力取决于二者量的比例(N:P),缩合后形成的复合物粒径一般在 20~40nm,个别大粒子达到 240nm<sup>[11]</sup>。纳米级的粒径有助于实现载体的靶向性和穿入细胞的有效性。

目前发现影响复合物转染效率的主要因素<sup>[11]</sup>有 PEI 的氨基与 DNA 的磷酸基的比例(N:P)、PEI 的分子相对质量、PEI 的支化度、复合物的粒径及表面电荷密度等。Boussif 等<sup>[10]</sup>的研究表明支化 PEI 的转染效率在 N:P 为 9~13.5 时达到最大。这可能是由于复合物中大量的氨基增强了复合物的缓冲能力,使之更有效地从内吞小泡中释放而到达核内进行转录表达。Godbey 等<sup>[12]</sup>研究发现随着 PEI 分子相对质量的增加,DNA 的转染效率增加,但细胞毒性也增大。Ogris 等<sup>[13]</sup>报道粒径较小(40nm)的转运铁蛋白-PEI/DNA 复合物与粒径较大(>100nm)的复合物相比,转染效率低,这可能是较小的粒径有利于复合物的降解。另外,使 PEI 与靶向性配体连结有利于提高 DNA 的转染效率,乳糖化多聚聚乙烯亚胺(L-PEI)能将 DNA 选择性的投放干细胞,具有靶向性,对受体阳性的 Huh-7 细胞具有较高的转染效率。

2.2 PLL 介导的基因纳米控制系统

PLL 是一种简单的合成型多聚物。由于带有氨基基团,可以使分子链带正电荷,而与表面带负电荷的 DNA 通过静电吸附作用形成纳米微粒。研究表明影响复合物稳定性和尺寸的因素主要有溶液的 pH、N/P、PLL 的尺寸、PLL 的改性程度等<sup>[14]</sup>。在 N/P 小于 0.8 时,PLL 与 DNA 的键合作用依赖于 pH,但 N/P 较大时,二者的作用与 pH 无关。PLL 的分子相对质量是影响 PLL 与 DNA 相互作用的重要因素,在较小的

N/P 下,分子相对质量越高的 PLL 与 DNA 结合越完全,当 N/P=12 时,复合物的尺寸和尺寸分布随着 PLL 相对分子质量的增大而增大。

由于外源基因进入核内所需要的核定信号序列中含有较多的碱性氨基酸,因此多聚赖氨酸可能参与核定位过程,而使 PLL-DNA 复合物的转染效率比其它阳离子多聚物基因复合物的。然而由于 PLL 较低的转染效率和较高的细胞毒性,需要对 PLL 进行改性,使其成为亲水性、生物相容性并具有靶向性的高分子材料来提高它的转染效率,降低毒性,如将 PLL 与亲水性的聚合物嵌段 PEG、右旋糖苷 PEG、右旋糖苷 pHMA 接枝<sup>[15]</sup>。因此可以通过改变聚合物的物理化学及生物性能来调节其作为基因载体的转运性能。

靶向化 PLL 可以将其乳糖化,如在研究中发现脂质体或乳糖化多聚赖氨酸包埋的重组表达质粒经腹腔途径导入人体内后,均以肝脏为主要分布器官,而糖化多聚赖氨酸的肝脏靶向导入作用优于脂质体。也可以将完整的 EGF 或合成的 EGFC 环肽段与对 DNA 有结合力的多聚赖氨酸极性化学偶联来作为 DNA 转移载体,起到靶向性作用。

### 2.3 PAMAM 树状大分子介导的基因纳米控释系统

PAMAM 树状大分子是一类新型纳米级的合成高分子,它们高度枝化的结构和独特的单分散特性为这类化合物带来一系列不同寻常的性质和行为。其纳米超微小体积,可以携带药物、基因等通过任何毛细血管,到达靶部位并进入组织间隙,被细胞吸收,因此是一种理想的导向载体。

该复合物除可在体内或体外获得高水平的 DNA 转染效率,还有一系列优良特性。首先,PAMAM/DNA 复合物具有很高的稳定性和溶解性。Delong 等<sup>[16]</sup>研究发现 PAMAM 并不改变 DNA 的结构,保证复合物结构的稳定性和 DNA 的活性。另外复合物在水溶液中可稳定存在长达几周时间,并且在较大的 pH 值范围内和不同的缓冲液条件(水,500mmol/L NaCl, PBS 等)下稳定存在,并不解离。只有采用离子清洁剂 SDS(十二烷基硫酸钠)时才能解离 DNA-树状大分子复合物<sup>[17]</sup>。DNA-树状大分子复合物对限制性内切酶也很稳定,这就使得 DNA 在体内存活时间延长。与裸露的 DNA 或现有的阳离子脂质体系统介导的转染技术相比,核酸分子(反义寡核苷酸、反义 cDNA 质粒与表达质粒等)与 PAMAM 分子的复合物可在体外转染大量不同类型的真核细胞,并具有普遍的高效性。其次,PAMAM 树状大分子能缓冲内吞小泡中的 pH 值,而且热处理使之活化后由于除去一些分枝而灵活多变,其转染效率提高 50 倍左右。由于他们的分支中含有大量氨基,因此可共价偶联一些配体并可迅速内吞。最后,对真核细胞转染效率的大小与复合物分子的大小、形状、表面电荷密度、pKa(树状大分子的酸性解离常数)及 PAMAM 与 DNA 分子的电荷比等因素有关。因此,在合成 PAMAM 时我们可以通过控制内核分子、代数和活化时间来调整和控制其转移基因的特性,增强 DNA 的转染效率。

除了上述三类经典的合成多聚阳离子载体外,近年来也报道了很多用于基因载体的新载体材料,同样取得了很好的转染效果。如 lim 等<sup>[18]</sup>报道人工合成的聚[2-(4-氨基丁基-L-乙醇酸)](PAGA)与 DNA 以电荷比为 1:1 的组成,能形成自组装生物可降解的复合物,PAGA 体内降解最终产物为 L-氧化赖氨酸,它的转染效率约为 PLL/DNA 复合物的 2 倍多。Wen<sup>[19]</sup>等报道用生物可降解两亲聚磷酸酯 PoLy (PhosPhoester)为主链,胆固醇为支链阳离子聚合物 PCEP 与挂有红色荧光蛋白(red fluorescent protein, RFP)形成大小为 100—120nm, Zeta 电位为 20~30mV 的纳米粒 PCEP/pRFP 作为基因给药系统。在体外, Caco-2 细胞实验中,呈现很高的细胞转染率。用口服管饲法(oral gavage)观察到大鼠小肠中有很高的 RFP 表达。Fonseca 等<sup>[20]</sup>报道用聚[2-(二甲基氨基)-乙基丙烯酸甲酯](PDMAEMA)阳离子为载体进行  $\beta$ -葡糖醛酸酶基因治疗,发现该载体有压缩(condense)pDNA 作用,在 OVCAR-3 细胞上呈现有效转染作用,比商品阳离子脂质(HPofectamine)转染率高 30%。

## 3 纳米天然生物高聚物基因载体系统

生物高聚物如明胶和壳聚糖也属于阳离子复合物,是生物可降解材料,广泛用作缓释材料,能与 DNA 形成大小为 200~700nm 的微球体。

3.1 壳聚糖介导的基因纳米控释系统

壳聚糖是一种无毒、无副作用的物质,具有生物粘附性、生物相容性和可降解性。目前,可以利用硫酸钠盐诱导的共沉淀法制备壳聚糖与 DNA 复合物的纳米微粒,并可有效地导入细胞。其最大优点是安全性好,但转染效率有待提高。壳聚糖与 DNA 复合物纳米微粒的制备与盐浓度、pH、温度及壳聚糖和 DNA 的浓度有关。实验发现复合物的粒径与正负电荷的比例 N/P(Negative/Positive)有直接的关系,当 N/P 在 3~8 范围内,复合物粒径相应地在 150~250nm 之间。但硫酸盐的浓度(2.5~25mol/L)和质粒 DNA 的尺寸(5.1~11.9kb)对复合物的粒径并不影响。然而经过交联的壳聚糖与 DNA 复合物的稳定性比未交联的好。

3.2 壳聚糖衍生物介导的基因纳控释系统

由于壳聚糖分子相对质量较大,不能水溶,给纳米微粒的制备带来了很多不便。然而通过对壳聚糖改性,制备它的衍生物,保留了壳聚糖优良的生物可降解材料的性能,同时使其分子相对质量降低,细胞毒性降低,增加其水溶性和靶向性。本实验室已成为制备出水溶性的壳聚糖衍生物 O-羧甲基壳聚糖( O-carboxymethyl chitosan, O-CMC ),利用超声法制备纳米微球,并将其携带寡核苷酸转染 TJ905 人脑胶质瘤细胞,通过 RT-POR 方法对细胞的转染情况作了一系列的体外检测。细胞实验表明,携带寡核苷酸的聚乳酸-O-羧甲基壳聚糖纳米微球能有效地转染 TJ905 人脑胶质瘤细胞,同时也能有效地抑制胶质瘤细胞中端微粒酶 RNA、端粒酶催化亚基 RNA 的表达和端粒酶的活性,从而抑制人脑胶质瘤细胞生长,达到基因治疗的目的<sup>[21]</sup>。

3.3 明胶介导的基因纳米控释系统

明胶是胶原的变形形式,它是一种在 35~40℃以下胶化的多聚两性电解质。在 pH 小于 5 时,明胶带正电荷,能与带负电荷的 DNA 发生静电吸附,通过共沉淀法制备复合物的纳米微粒。交联后的复合物在高离子强度的溶液中保持稳定,然而未交联的复合物在 PBS 溶液或血清液中易解离。明胶/DNA 纳米微粒中的 DNA 的释放主要受明胶蛋白的降解影响。Kazunori 等<sup>[22]</sup>仅由明胶发现质粒 DNA 的释放仅由明胶的降解控制,而明胶水凝胶的降解是由明胶水凝胶的交联度决定的。这意味着无论载体的形状大小如何,可控释放可以通过控制明胶水凝胶的交联度而获得。因此,肌肉内移植 DNA-水凝胶复合物可以显著延长质粒 DNA 在移植部位的表达,延长的时间随着水凝胶中水含量的增加而减少。另外,在复合物纳米微粒表面接上转铁蛋白和氯喹可以提高 DNA 的转染效率。最近实验证明超声波辐射有利于提高质粒 DNA 的表达。

4 展望

在基因工程迅速发展的今天,阳离子多聚物作为纳米基因载体将是今后很长时间的研究重点。这种非病毒载体避免了使用再组合病毒的危险,并且可以进行充分有效的基因转染。但未来的无病毒基因治疗需要对输送 DNA 的屏障有详细的了解,这包括限制输送装置的物理机械屏障、影响胶体粒子自组合的物理化学屏障和阻碍 DNA 输送的生物屏障。通过对病毒穿过生物膜的特性进行研究,并对其加以应用,必定会使现有的基因载体转染效率得到很大的提高。可以相信,使用合理数量的 DNA 复合物,就会达到和真正的病毒粒子相似的转染效率。可以大胆地预测,随着人类对类病毒粒子研究的深入,从而提高阳离子多聚物纳米控释系统作为基因载体的可行性、实用性、必然会使人类对基因载体的研究取得突破性进展。

参考文献:

[ 1 ] Maureen D B, Andress G S, Ijeoma F U. Inter J Pharm, 2001, 229,1~21.  
[ 2 ] Gebhart C L, Kabanov A V. J Control Release, 2001, 73,401~416.  
[ 3 ] Pouton C W, Seymour L W. Adv Drug Deliv Rev. 1998, 34(1),3~19.  
[ 4 ] 顾健人,曹血涛.基因治疗,第一版,北京,科学出版社,2001,83~96.  
[ 5 ] Pitard B, Aguerre O, Airiau M, et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94,14412~14417.

- [ 6 ] Zanta M A, Belguise V P, Bechr J. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96;3729~3733.
- [ 7 ] Foster B J, Kem J A. Hum Gene Ther, 1997, 8(6);719~723.
- [ 8 ] Wu G Y, Wu C H. J Biol Chem, 1987, 262;4429~4432.
- [ 9 ] Fischer D, Li Y, Ahlemeyer B, et al. Biomaterials, 2003, 24; 1121~1124.
- [10] Boussif O, Lezoualch F, Zanta M A, et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92;7297~7301.
- [11] Dunlap D, Maggi A, Soria M R, Monaco L. Nucleic Acids Res, 1997, 25;3095~3101.
- [12] Godbey W T, Wu K K, Mikos A G. J Biomed Mater Res, 1999, 45;268~275.
- [13] Ogris M, Steinlein P, Kursa M, et al. Gene Ther, 1998, 45;1425~1433.
- [14] 钟森, 温守明, 张定凤, 等. 中华实验和临床病毒学杂志, 2001, 15 (2);150~153.
- [15] Toncheva V, Wolfert M A, Uibrich K, et al. Biochim Biophys Acta, 1998, 1380; 354~368.
- [16] Delong R, Dtephenson K, Lofus T, et al. J Pharm Sci, 1997, 886(6);762~764.
- [17] Bielinska A, Kukowska L J F, Johnson J, et al. Nucleic Acids Res, 1996, 24(11);2176~2182.
- [18] Lim Y B, Han S U, Kong H U, et al. Pharm Res, 2000, 17(7); 811~815.
- [19] Wen J, Kiang T, Mao H Q, et al. Bioconjug Chem, 2000, 11(5);668~672.
- [20] Fonseca M J, Storm G, Hennink W E, et al. J Gene Med, 1999, 1(6);407~411.
- [21] 常津, 刘海峰, 许晓秋, 等. 中国生物医学工程学报, 2002, 21 (6);515~529.
- [22] Yasunori F, Kazunori I, Kazuhiro M, et al. J Control Release, 2002, 80;333~343.

## Application of Poly-cation Nanoparticles on Gene Delivery System

GUO Yi, ZHANG Shuang-nan, KANG Chun-sheng, CHANG Jin<sup>\*</sup>

(*Institute of Nanobiotechnology, School of material science and engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China*)

**Abstract:** Polycations can condense with DNA by self-assembly, form polyplexes nanoparticles spontaneously as a result of electrostatic interactions and protect DNA from degradation by DNase. They have great advantages used for gene delivery such as ease of synthesis, cell/tissue targeting, low immune response, Stableness in storage, and unrestricted plasmid size. Polycations as non-viral gene vectors can be divided into two types: synthetic polycations such as PEI, PLL, and PAMAM; and natural polycations such as chitosan, its derivative and gelatin. So development on polyplexes nanoparticles used as controlled gene delivery systems are discussed with emphasis on mechanism of polycation-mediated cell entry and targeting strategies of polycations, also several polyplexes are evaluated with respect to their characters and transfection efficiency, at last it can conclude that nontoxic natural gene vectors should be the focus of studies in the future.

**Key words:** Poly-cation; Nanoparticles; Polyplex; Gene therapy

(上接第 15 页)

polyamide (PA<sup>6</sup>), PBT, and high performance fiber such as UHMW PE fiber, PBO fiber have been successfully done. Finally, this paper prospected the developing direction and trends of polymer technologies within the Eleventh Five-year Plan period.

**Key words:** Macromolecular materials industry; Technology; Development