

高性能壳聚糖介导基因载体

郑连英 肖玉良

(浙江大学化学工程与生物工程学系 杭州 310027)

摘 要 以阳离子聚合物作载体的非病毒性基因载体的作用效率受到许多因素的影响,如粒子的大小、络合物的稳定性、毒性、免疫原性、保护 DNA 免受 DNase(脱氧核糖核酸酶)降解的能力以及细胞内 DNA 的传递。本文着重介绍了壳聚糖及其衍生物在非病毒基因载体方面的应用以及近年来壳聚糖基因转移载体转染的研究进展。

关键词 壳聚糖 非病毒性基因载体 转染

High Performance Chitosan Based Vector Mediated Gene Delivery

Zheng Lianying, Xiao Yuliang

(Department of Chemical and Biochemical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027)

Abstract Efficiency of non-viral gene delivery based on chitosan and chitosan derivatives as DNA-condensing carrier is dependent on a series of factors, such as complex size, complex stability, toxicity, immunogenicity, protection against DNase degradation and intracellular trafficking of the DNA. The advances in the application of chitosan and chitosan derivatives to non-viral gene delivery and the transfection studies on chitosan and chitosan derivatives as transfection agents, are reviewed.

Key words Chitosan, Non-viral gene delivery, Transfection

基因治疗是未来医药领域中极有潜力的发展方向^[1,2],自 1990 年美国成功地进行了腺苷脱氨酶[ADA]缺陷的基因治疗后,基因治疗引起广泛的重视。基因治疗最大的特点在于其针对疾病最根本的原因——基因变异进行治疗,而传统药物只针对疾病的症状。基因治疗中一个关键问题是如何选择合适的基因载体,寻找对病变组织有选择性、高效率且低毒的载体,以协助目的基因进入靶组织^[3]。随着 2000 年人类基因组框架图的解析成功,更多的基因药物从实验室研究阶段进入临床试验。壳聚糖是具有生物相容性和可生物降解的新型医用生物材料,具有无刺激、无致敏、无溶血、无致突变、无抗原性、无热原等作用已为实践所证明,壳聚糖及其衍生物能与 DNA 形成聚电解质聚合物,将是一种具有持久安全性和高效的阳离子聚合物基因转移运输载体^[4]。目前国内虽然对壳聚糖用作药物缓释载体的研究较多^[5~7],也取得了较好的研究成果,但对于壳聚糖用作基因载体的研究较少,未见公开报道。

1 基因载体的作用原理及载体的选择

郑连英 女,57岁,副教授,现从事生物工程方向的科研和教学工作。 E-mail: zhengly@cmsce.zju.edu.cn

国家自然科学基金重点基金(50233020)、浙江省自然科学基金(200075)资助项目

2003-04-22收稿,2004-02-13接受

基因治疗主要是通过有效的基因传递系统,将质粒 DNA 插入到目标细胞中,进行转录,最终将所携带的基因信息传递给所连接的细胞中,从而达到基因治疗的作用。其作用过程如图 1^[4]所示。为了完成图中所示的一系列过程,基因转移运载体系必须解决以下问题:(1)确定目标细胞的转移运载体系;(2)通过细胞膜的传输;(3)内溶酶体的吸收降解;(4)在细胞内质粒 DNA 到细胞核的输送。最关键的问题是如何选择合适的载体对病变组织有选择性且能高效率协助目的基因进入目的细胞的低毒基因载体。

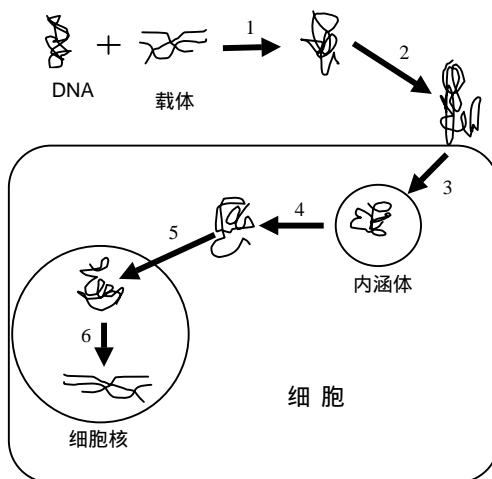


图 1 基因转染运载过程图

Fig.1 The process of gene delivery and transfection

- 1 用适宜的载体对质粒DNA进行浓缩吸附; 2 载体/DNA络合物在目标细胞上的吸附;
- 3 络合物在胞内内涵体中的装载; 4 络合物从内涵体成功的释放到细胞质中;
- 5 DNA在细胞内的传输最后定位在细胞核上; 6 DNA从络合物上释放出来

现在大约 80%的基因载体是病毒性的载体,即将改造的病毒作为基因的载体,其具有良好的跨膜特性,因此可以定向地将目的基因导入细胞,且转染效率高^[8-10]。但是,由于人体自身具有抗病毒的免疫系统,因而病毒极易引起人的免疫反应。另外病毒具有自我复制的功能,故人们对使用病毒的安全性也深有顾虑。为了避免重组病毒载体的种种不利之处,人们开始致力于非病毒性载体的基因转移运载体系的研究^[11]。

基因药物的非病毒载体在最近几年取得了很大进展。研究表明,非病毒载体具有使用方便、可大规模生产和无免疫原性等优点,所以倍受人们瞩目。阳离子脂质体和阳离子聚合物是目前研究得最多的非病毒性基因转移运输载体,由于它们带有持久的正电性,两种类型的载体都易与带负电的 DNA 相互作用,形成络合物(脂质或聚合物络合物)^[12],但由于脂质体经静脉注射后首先与血清蛋白质结合,然后被主要存在于肝脾等网状内皮系统的单核巨噬细胞作为异物吞噬,因而较难进入靶细胞,影响基因转移效率,从而造成了其与病毒性载体相比低得多的转染效率,加之阳离子脂质体本身具有一定的毒性以及阳离子脂质体制备的低成功率等缺点,在一定程度上限制了脂质体的应用。

虽然与重组病毒基因载体相比,阳离子聚合物的基因转移效率还比较低,但阳离子聚合物与 DNA 组成的 DNA/聚合物络合物则相对稳定得多^[13]。现在人们正在研究可以提高转染效率的

阳离子聚合物, 通过它们与细胞 DNA 形成的聚合电解质聚合物, DNA 可以被很好地保护起来, 从而避免被核酸酶降解^[13,14], 同时这些阳离子聚合物的结构可以更具多样性和灵活性, 它可以通过特定的感应体与基因表达的目标部分形成共价键, 从而达到基因治疗的目的。与大量人工合成的非病毒性载体相比, 虽然可用的天然聚合物的数量很少, 但还是存在一定数量的天然聚合物具有有利于基因转移运输的特征: 生物相容性、低免疫性、低细胞毒性。壳聚糖就是这些天然聚合物, 中的一种, 其作为一种新型的医用生物材料, 具有生物相容性和可生物降解性、低毒、无刺激、无致敏、无抗原性且能与 DNA 形成聚电解质聚合物, 此外, 在壳聚糖上接枝如右旋糖苷、半乳糖苷等基团而得的衍生物, 可以增加络合物的组织选择性。这些特性使得此类聚合物有可能成为重组病毒基因载体和脂质体基因载体的良好替代品。

2 壳聚糖基因运载体系

2.1 壳聚糖基因载体的大小及相关条件

1995 年, 人们通过将相应的壳聚糖溶液与细胞质粒 DNA 混合, 首次制备了壳聚糖/DNA 络合物。络合物的大小为 150 ~ 500nm, 而且络合物的大小主要取决于所用壳聚糖的分子量, 而不是壳聚糖的存在方式或缓冲溶液的组成。此外, 其他的研究也发现与此类似的壳聚糖的分子量影响络合物大小的现象, 但同时也发现了壳聚糖/DNA 比例对络合物大小的影响。

壳聚糖主链上氨基的密度很高, 它在 $\text{pH} < 6$ 的情况下才能溶解, 在生理 pH 下, 不是所有的氨基都可以质子化。络合物中壳聚糖与 DNA 的比例一般用 N/P (聚合物中氮的量与 DNA 中磷酸酯的量之比) 表示, Erbacher 等^[15]发现 N/P 之比为 2 时络合物的大小在 15 μm 左右, 这与络合物的 θ 电位趋近于 0 是一致的, 这充分表明在络合物的电位为中性时, 质粒 DNA 的络合被阻滞, 聚合物的络合被加速。

壳聚糖/DNA 微粒是通过一种复杂的方法制成的。此方法用硫化钠作反溶剂试剂, 可以制得分子大小为 200 ~ 500nm 的产品。Mao 等^[16]最近研究了几种参数对壳聚糖/DNA 络合物大小的影响后发现, 与 N/P 比率的显著影响相比, 在 2.5 ~ 25mmol/L 范围内, 硫酸钠的浓度对所形成络合物的大小基本没有影响; 在温度为 55 $^{\circ}\text{C}$ 、 pH 为 5.5、 N/P 比率在 3 ~ 8 的情况下, 可以制得大小为 150 ~ 250nm 的颗粒; 在 5.1 ~ 11.9Kb 范围内不同大小的细胞质粒之间的不相容性对所形成的粒子大小没有什么影响。

2.2 DNA 的加载

人们发现利用 EtBr(溴乙非啶)通过竞争键间的研究可以检验壳聚糖与 DNA 间的静电场。当壳聚糖加入经 EtBr 染色的 DNA 溶液中后, 随着阳离子壳聚糖竞争键的作用, 溶液的荧光性下降了, 这样通过利用 EtBr 染色和共聚焦激光扫描显微镜就可以测定 DNA 在壳聚糖中的分布^[17]。例如, 从图 2 可以看出, 裸露的质粒 DNA(暗带 5)与原始的质粒 DNA(暗带 2)相比有明显的降解, 而壳聚糖/DNA 络合物在相同的环境中几乎没什么变化(暗带 7)。另一种确定 DNA 加载的方法是基壳聚糖酶或溶菌酶消化后用 PicoGreen 分析, 其效果如图 3 所示, 发出绿色荧光的物质即为所要检测的质粒 DNA。一般来说, 所报道的加载效率都在 95% 以上, 而 DNA 加载到壳聚糖上的一个后果就是 DNA 的组成形式从超螺旋状态转换到一种自由的状态^[17]。

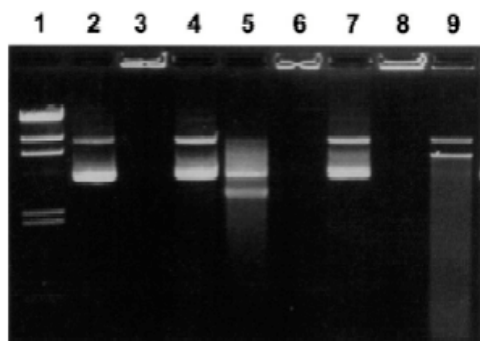


图2 壳聚糖/DNA 络合物 DNase 降解后的电泳图^[16]
Fig.2 Electrophoretic mobility analysis of Chitosan /DNA complex following DNase digestion^[16]

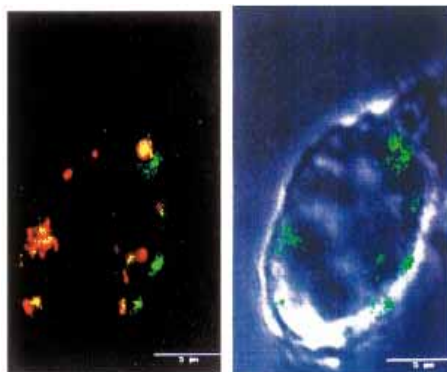


图3 用共聚焦激光扫描显微镜的壳聚糖/DNA 络合物扫描图^[17]
Fig.3 Chitosan/DNA complex as viewed under confocal fluorescence microscope^[17]

Ozabas-Turan 等^[18]在 1999 年研究了质粒 DNA 从壳聚糖载体中的释放。实验在 37 的 PBS(磷酸钠缓冲溶液、pH7.4)中进行,释放的 DNA 用分光光度计在 260nm 下检测出来,而且发现,长达 50d 后仍然可以检测到质粒 DNA 的释放。但这些实验条件根本无法与实际的生理条件(如降解酶和血清的存在、低的内涵体细胞溶解酶 pH)相比,也许仅仅表明在此条件下壳聚糖/DNA 可以长期储存。这些载体在实际的体内环境中的作用情况还有待于进一步研究。

2.3 壳聚糖/DNA 载体的稳定性

研究发现,在水中储存交联的壳聚糖/DNA 纳米微粒可以保持稳定 3 个月以上,而在同样条件下储存在 PBS 中的未交联纳米微粒仅能保持稳定几小时^[14]。冻干的壳聚糖/DNA 载体微粒可以维持其效力达 4 周以上^[19]。

由于由非病毒性载体运载的 DNA 很易受 DNase 降解的影响,因此检验 DNA 运载体系的一个标准参数就是载体物质防止 DNase 降解、保护结合在载体上的 DNA 的能力,由于酶的生理浓度无法准确检测,只能人为估计,Richardson 等^[20]以 DNase 和 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(<5000D, 5000 ~ 10000D, >10000D)且经高度纯化的壳聚糖与 DNA 组成的络合物在加载率为 1/1 时几乎可以完全抑制 DNase 对质粒 DNA 的降解。

简而言之,壳聚糖完全有能力有效地保护 DNA,防止酶对其的降解,究其原因可能是壳聚糖与 DNA 结合而成的络合物所形成的三维空间结构所产生的位阻影响。

2.4 壳聚糖/DNA 载体的免疫性

壳聚糖/DNA 不仅具有良好的低免疫性,壳聚糖还可以有效地加强抗原的免疫原性,诱发抗原特定 IgG、分泌 IgA、毒素中和抗体以及 T 细胞的反应^[21]。壳聚糖的诸多性质使得其成为未来很有发展前途的粘膜免疫的 DNA 疫苗的载体 Roy 等^[22]发现,壳聚糖/DNA 纳米粒子可以有效地将所需基因转移到小鼠的肠内,用口服 pCMVArh2 转移质粒(其上编码了诱导过敏性抗原)检验对花生过敏的小鼠时,壳聚糖/DNA 纳米粒子表现出了相对较高的 IgG2a 免疫性,对壳聚糖/pCMVArah2 免疫的小鼠与没有免疫的小鼠相比,没有发现严重的过敏原反应,很好地保护了小鼠通过过敏检测。

3 壳聚糖及其衍生物转染效率

最近几年,人们已经报道了不少关于壳聚糖及其衍生物转染的研究。Maclanughlin 等^[23]已经研究了壳聚糖及低聚糖浓缩、传输 COS-1 细胞的质粒 DNA 的能力,分子量在 100 000 以下的壳聚糖可以形成大小在 100 ~ 200nm 范围内的微络合物,且在 10%的血清中检测到这些络合物,这些络合物显示了不同的稳定性。经研究表明,在体外环境中,壳聚糖的分子量对质粒的表达影响甚少;在兔子小肠的体内试验中,壳聚糖/DNA 络合物中质粒的表达水平比没有保护的裸露质粒的表达水平高得多(表 1)^[23]。Ishii 等^[24]发现,当壳聚糖的分子量在 40kD 或 84kD、N/P 比为 5、pH 为 7、转染培养基含有 10%的血清时,壳聚糖/DNA 络合物的转染效率最好。

表 1 兔子小肠中质粒催化表达效果比较
Tab.1 Plasmid expression in the upper small intestine of rabbits

| 测量部位 | | 兔子编号 | | | | 催化表达平均值/(pg/mg) |
|---------------|------|------|------|------|-------|-----------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| 质粒/壳聚糖 络合物 | PP3 | 6.12 | 5.01 | 0 | 5.83 | 4.24 ± 2.87 |
| | ENT1 | 1.45 | 0 | 8.10 | 6.62 | 4.04 ± 3.92 |
| | MLN | 0 | 0 | 3.98 | 10.16 | 3.66 ± 5.17 |
| 裸露的质粒 | PP3 | 0 | 0 | — | — | 0 ± 0 |
| | ENT1 | 0 | 0 | — | — | 0 ± 0 |
| | MLN | 0 | 0 | — | — | 0 ± 0 |

Thanon 等^[25]用季铵化度 40%、50%的三甲基壳聚糖低聚物作载体,研究了在 COS-1 和 Caco-2 细胞 DNA 链中运载 DNA 的能力(Caco-2 细胞链是人结肠癌细胞,可以作为肠上皮细胞的模型),发现其转染 COS-1 细胞的能力要比壳聚糖、低聚糖载体好得多,而在对不同 Caco-2 细胞链的研究中发现,所应用的壳聚糖/DNA 和脂质体/DNA 载体都没有提高细胞的转染效率。Murata 等^[26]用季铵化度 80%的三甲基壳聚糖低聚物作载体,研究了其在 Hep-G2 细胞中作为半乳糖受体表达 β -半乳糖酶活力的能力,此种三甲基壳聚糖/DNA 络合物可以有效转染 Hep-G2 细胞,但在抑制剂存在的情况下其转染效率下降很大,这表明络合物与受体之间的结合主要通过 Hep-G2 细胞表面的半乳糖受体。

目前壳聚糖/DNA 络合物一般以微粒的形式存在,Leong 等^[11]发现,壳聚糖微粒 DNA 载体具有以下特征:(1)配位体可以结合到微粒上以刺激受体媒介的细胞内吞作用;(2)溶酶体溶解剂可以结合到微粒上以减少在溶解酶区域内 DNA 的降解;(3)可以屏蔽其它具有生物活性的试剂或多重质粒;(4)可以保护 DNA 免受血清核酸酶的降解,从而提高 DNA 的生物活性;(5)这些微粒可以在冻干的情况下储藏,活力不变。Leong 等^[17]还通过自诱导凝聚的方法生产出了 200 ~ 750nm 的粒子,这些微粒在荧光酶素 293 细胞体系中应用时是一种很有效的载体,但在其它细胞链中检验时发现,在不同的细胞链中其转染效果不同,并且在纳米粒子表面添加铁传递蛋白或氯奎等添加剂也不能提高载体的转染效率。

4 结束语

据一系列体内、外研究报道可以发现,壳聚糖及其衍生物生物相容性好、可生物降解、可以有效地浓缩质粒 DNA、保护其免受 DNase 的降解,此外壳聚糖作为基因转移载体还能够与

具有特殊细胞作用的诸如铁传递蛋白、右旋糖苷、半乳糖苷配位,从而提高基因治疗的效果。由此可以认为壳聚糖及其衍生物是一种有效的非病毒性基因疫苗载体,将可能成为病毒性基因载体和阳离子脂质体载体有效的替代载体,具有良好的研究价值和广阔的应用前景。

参考文献

- [1] T Friedmann. *Nature Med.*, 1996, 2: 144~151.
- [2] R G Crystal. *Nature Med.*, 1995, 1: 15~23.
- [3] R G Crystal. *Science*, 1995, 270: 404~413.
- [4] Gerrit Borchard. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001, 52: 145~150.
- [5] Y Pan, Y J Li, H Y Zhao et al. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*, 2000, 11(3): 97~111.
- [6] 尹承慧, 侯春林, 蒋丽霞 等. *第二军医大学学报*, 2002, 23(5): 536~539.
- [7] 王奎旗, 管华诗. *青岛海洋大学学报*, 2000, 30(4): 614~618.
- [8] Z Q Xiang, Y Yang, J M Wilson et al. *Virology*, 1996, 219: 220~229.
- [9] M R Knowles, N Engl. *J. Med.*, 1995, 333: 823~829.
- [10] E W Alton, D M Geddes, *Gene Ther.*, 1995, 2: 88~95.
- [11] K W Leong, H Q Mao, V L Truong-Le et al. *Journal of Controlled Release*, 1998, 53: 183~193.
- [12] D Deshpande, P Blezinger, R Pillai et al. *Pharm. Res.*, 1998, 15: 1340~1347.
- [13] S C De Smedt, J Demeester, W E Hennink, *Pharm. Res.*, 2000, 17: 113~126.
- [14] M C Garnett *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier syst.*, 1999, 16: 147~207.
- [15] P Erbacher, S Zou, T Bettinger et al. *Pharm. Res.*, 1998, 15: 1332~1339.
- [16] H Q Mao, K Roy, V L Truong-Le et al. *J. Control. Rel.*, 2001, 70: 399~421.
- [17] K W Leong, H Q Mao, V L Truong-Le et al. *J. Control. Rel.*, 1998, 53: 183~193.
- [18] S Ozbas-Turan, C Aral, L Kabasakal et al. *Proc. Intl. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 1999, 26: 645~646.
- [19] H Q Mao, V Truong-L E, J T Augest et al. *Proc. Intl. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 1997, 24: 671~672.
- [20] S C W Richardson, H V J. Kolbe, R Duncan. *Int. J. Pharm.*, 1999, 178: 231~243.
- [21] Mc Neela, A Edel, D O'Connor et al. *Delivery Vaccine*, 2000, 19: 1188~1198.
- [22] K Roy, H Q Mao, S K Huang et al. *Nat. Med.* 1999, 5(4): 387~391.
- [23] F C MacLaughlin, R J Mumper, J Wangf et al. *J. Control. Rel.*, 1998, 56: 259~272.
- [24] Tsuyoshi Ishii, Yoshio Okahata, Toshinori Satob et al. *Biophysica Acta*, 2001, 15(14): 51~64.
- [25] B Thanou, M Florea, H E Geldof et al. *Biomaterials*, 2001, 23: 153~159.
- [26] J Murata, Y Ohya, T Ouchi. *Carbohydr. Polym.*, 1997, 32: 105~109.