

纳米基因转运体

——原理、研制与应用*

朱诗国 李桂源**

(中南大学湘雅医学院肿瘤研究所, 长沙 410078)

摘要 基因转移是基因治疗的关键技术, 一直以来也是制约基因治疗成功开展的瓶颈问题. 随着纳米技术的发展, 纳米基因转运体的研制获得了积极发展, 其系统内和细胞内基因转移机理得到了深入阐明. 设计与研制在体内循环时间长、具有靶特异性的纳米转运体为突破基因转移瓶颈, 实现安全、高效和靶向性基因治疗带来了新的希望.

关键词 纳米颗粒, 纳米转运体, 基因传递, 基因治疗

学科分类号 R730.5

随着恶性肿瘤癌变分子机理研究的深入进行和人类基因组计划, 特别是癌肿解剖计划的顺利实施^[1], 人们对恶性肿瘤的遗传分子机制有了更全面和更深刻的认识, 对运用基因治疗策略从分子水平解决恶性肿瘤的治疗难题充满了信心. 自从1990年首例基因治疗临床试验实施以来, 已有3 278位患者接受了基因治疗临床试验, 其中69.2%为恶性肿瘤病人^[2]. 在这十多年的发展中, 许多新的基因治疗方法(肿瘤抑瘤基因治疗和癌基因灭活, 免疫基因治疗, 分子化/放疗等)被相继

运用. 然而, 在基因传递问题没有很好地解决以前, 要想实现全面的恶性肿瘤基因治疗并获得理想的治疗效果是不现实的^[3].

传统上基因转移系统被分为两大类: 病毒载体系统和非病毒载体系统. 病毒载体系统是至今为止最有效的基因转移方法, 其基因传递效率通常在90%以上, 而且在目前的基因治疗临床试验中有75%以上是利用病毒载体^[4]. 然而由于其局限性(表1), 尤其是安全问题的存在, 特别是在1999年基因治疗临床试验中, 出现首例运用腺病毒载体

Table 1 Advantages and disadvantages of non-viral and viral vectors

表1 病毒载体与非病毒载体的优势与局限

传递系统	优点	局限点
病毒载体		
逆转录病毒	可整合到靶细胞基因组	只能整合到分裂细胞基因组 插入突变
腺病毒	容易获得复制缺陷病毒 转化效率高 分裂和非分裂细胞均可转化 容易获得高滴度病毒	不能整合到靶细胞基因组 表达短暂(数天到数周) 病毒结构基因可被转录 局部炎症反应和免疫反应 插入基因最大只达28 kb
腺相关病毒	转化效率高 长期表达	产生体液免疫 插入基因大小有限 转化组织局限(肌肉和脑) 插入突变 制备困难
非病毒载体		
	转移基因大小不限 价廉、安全	转移效率低 表达短暂

* 国家自然科学基金资助项目(30171056), 教育部科学技术研究重点项目(01130), 教育部重大项目基金(2000-156), 湖南省自然科学基金项目(01JJY2020).

** 通讯联系人. Tel: 0731-4805446, E-mail: ligy@public.cs.hn.cn

收稿日期: 2002-05-13, 接受日期: 2002-06-20

致人死亡事件发生后^[5], 关于病毒载体系统临床运用控制得更加严格. 非病毒载体系统是一种包括从裸 DNA 注射到高精生物基因枪在内的基因转移体系, 包括基因枪、喷射注射、电脉冲、超声等^[6]. 尽管非病毒载体系统避免了重大的安全隐患, 但其转染效率一直不如病毒载体系统. 因此, 如何突破基因转移瓶颈已成为基因治疗研究领域的当务之急.

随着纳米技术的发展, 以纳米颗粒为基因转移载体的研究引起了广泛关注. 纳米颗粒 (nanoparticle, NP) 是一种粒径在 1~100 nm 之间的超微粒子, 具有表面效应、小尺寸效应和宏观量子隧道效应等^[7]. 以纳米颗粒为基因转移载体就是将 DNA、RNA、PNA (肽核苷酸)、dsRNA (双链 RNA) 等基因治疗分子包裹在纳米颗粒之中或吸附在其表面, 在细胞摄粒作用下, 纳米颗粒进入细胞内, 释放基因治疗分子, 发挥其基因治疗效能^[8,9].

1 纳米转运体的系统内与细胞内屏障

纳米颗粒基因转移载体, 即纳米基因转运体是一种新兴的极有希望的基因转移方法, 不过要实现这一基因转移过程尚有许多屏障需要克服^[10,11]:

巨噬细胞广泛分布和存在于机体众多组织器官中, 对于改变的和衰老的细胞、侵入体内的异物等能迅速识别和清除 (图 1). 纳米转运体/基因复合物进入机体后也将被作为异物被机体网状内皮细胞系统 (reticuloendothelial system, RES) 识别和迅速清除. 这一过程的长短与纳米转运体的大小、表面电位、表面生物相容性程度等密切相关. 而且由于纳米转运体/基因复合物巨大的表面效应, 颗粒

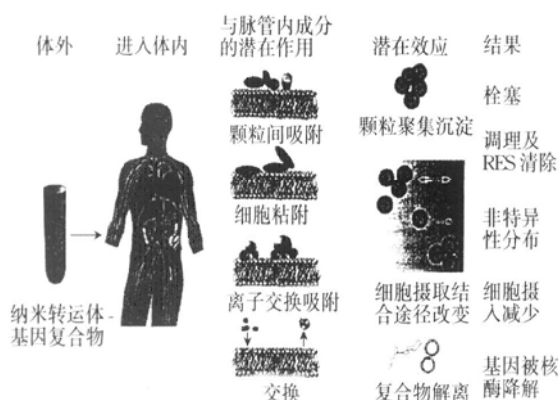


Fig. 1 Systemic interactions of nanoparticulate carrier-gene complexes

图 1 纳米转运体-基因复合物在系统内的作用

间可能会相互吸附而发生沉淀, 从而导致血管栓塞或被 RES 清除. 同时由于颗粒表面基团或电位 (阴性或阳性) 的影响, 可通过其与细胞非特异性粘附或与细胞发生离子交换, 引起细胞非特异吞噬或纳米转运体/基因复合物解离, 从而导致颗粒被清除、非特异性分布、细胞摄取减少或进入胞内后不能被有效保护而被核酶降解^[2].

纳米转运体/基因复合物通过循环系统到达组织细胞后, 细胞将以吞噬或吞饮的方式将其摄入胞内, 并通过克服一系列障碍而发挥作用 (图 2). 首先纳米转运体/基因复合物、胞膜等形成核内体, 核内体被溶酶体迅速吞噬, 在溶酶体内基因如果不能被保护, 并及时有效地被释放, 则会被溶酶体酶降解. 大多数研究者认为基因能否有效地从溶酶体内迅速逃离是影响基因转移效率的关键步骤.

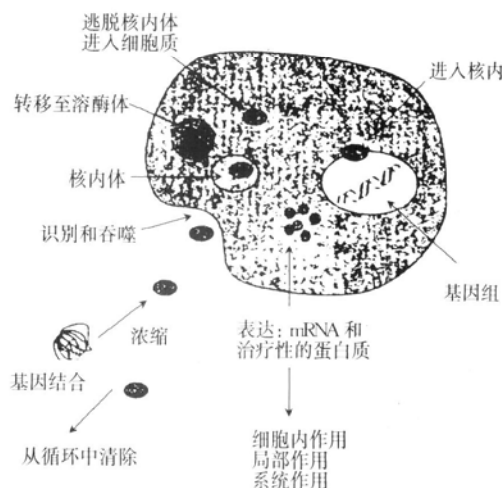


Fig. 2 Schematic diagram of nanoparticulate carrier for gene delivery

图 2 纳米转运体基因转移模式图

基因逃离溶酶体后能否在胞质内不被降解, 并顺利进入到核内也同样影响着基因的表达和功能. 甚至有研究者认为胞质内质粒 DNA 不被降解可能比基因从溶酶体逃脱更能决定基因的转移效率. 基因进入核内可能主要通过两种途径, 一是细胞分裂时核膜的破裂, 另一个便是经核孔进入. 不过具体的机制目前仍不太清楚.

2 纳米转运体的设计、研制与应用

根据纳米转运体基因转移的体内和细胞内屏障设计, 并研制理性的纳米颗粒是纳米基因转运体研究和发展的必然趋势. 作为体内基因转移载体的理

想纳米颗粒, 首先必须能够尽量逃避机体网状内皮系统的识别和清除, 在体内有足够长的循环时间, 以保证纳米基因转运体更多地从肿瘤脉管系统逃离和在肿瘤内累积, 即通过增加渗透和滞留效应 (enhanced penetration and retention effect, EPR 效应) 在肿瘤内发挥基因转移功能^[12]. 研究表明, 纳米转运体逃避网状内皮系统一方面必需足够小, 一般应小于 200 nm. 因为转运体的大小与蛋白质或调理素的吸附直接相关, 也在补体激活中扮演重要角色, 这些都是启动巨噬细胞识别和清除的重要因素. 而且超过 200 nm 的纳米颗粒大多不易通过脾脏的内皮间隙而被滤除. 另一方面纳米颗粒表面电位也与其清除时间长短有直接联系. 研究表明, 中性的纳米转运体有更长的循环时间, 这可能与中性颗粒的补体激活能力低有关. 而且中性的纳米转运体/基因复合物可以减少因表面电位影响而发生的非特异性反应, 对延长循环时间和增强基因的保护效应具有重要作用. 此外, 要维持长时间的体内循环, 纳米转运体必需有伪装的相容性外表^[13, 14], 如修饰有红细胞表面的必需成分唾液酸、整合素相关蛋白 CD47、具有补体抑制功能的肝素、免疫原性和抗原性极低的聚乙二醇等. 这些伪装成分的修饰能使纳米转运体有效地逃避巨噬细胞的吞噬, 延长其体内循环时间, 增加纳米转运体的基因转移效率.

为进一步提高基因转移效率, 减少非特异性分布, 保证纳米转运体足够的靶特异性也是重要和必需的. 靶向性一般分为被动靶向和主动靶向, 被动靶向是纳米颗粒通过 EPR 效应在实体瘤内的累积过程. 主动靶向主要是通过偶联特异性配体或抗体成份, 如 E-选择素、叶酸、寡肽、转铁蛋白、表皮生长因子、成纤维生长因子等, 与细胞表面特异受体结合, 增加纳米转运体在靶组织的累积^[15, 16]. 当然, 如果能同时结合运用组织特异性启动子^[5], 在组织特异性启动子作用下实现基因在靶组织内的特异表达, 对于提高靶组织内目的基因表达水平具有重要意义.

纳米转运体进入细胞后, 影响其基因转移效率的另一个重要限速环节便是基因分子从溶酶体内有效逃逸. 为解决这一问题, 溶酶体释放剂 (lysosomotropic) 的应用是一种有效的方法, 如氯喹、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖等^[17]. 当然, 温度敏感、pH 敏感、蛋白酶敏感等纳米材料的研制将可能是更为行之有效的方法. 基因从溶酶体内释放后

能否即时顺利地进入核内, 也是实现其有效转移的必然环节, 尽管具体的核转移机制目前仍不太清楚, 但应用核定位信号是行之有效的方法^[18].

纳米基因转运体的研制是目前国际纳米生物和肿瘤基因治疗研究领域重要的前沿性课题, 在国际上已相继研制出纳米树 (dendrimer)、聚氰基丙烯酸烷基酯、聚丙烯交酯等纳米基因转移载体. 在国内我们也较早地涉足这一研究领域, 并成功研制出多聚赖氨酸硅纳米颗粒^[19, 20]、磁性氧化铁纳米颗粒^[21]等多种纳米基因转运体. 但目前的纳米转运体都存在一定的不足, 还远未达到真正理想纳米转运体的标准, 不过可以相信, 随着纳米生物技术的迅猛发展, 理想的长循环-靶特异性纳米转运体的成功研制已为期不远, 安全、高效和靶向性基因治疗临床常规应用将是指日可待. 综合性的纳米生物治疗将可能彻底解决恶性肿瘤等重大疾病的难治性问题, 为人类步入和谐、美好的纳米医学时代积蓄力量^[22].

参 考 文 献

- 1 余 鹰, 李桂源. CGAP 及鼻咽癌相关研究进展. 国外医学肿瘤学分册, 2000, 27 (4): 233~235
Yu Ying, Li G Y. Foreign Medical Science (Oncology), 2000, 27 (4): 233~235
- 2 Schatzlein A G. Non-viral vectors in cancer gene therapy: principles and progress. Anti-Cancer Drugs, 2001, 12 (5): 275~304
- 3 Anderson W F. Human gene therapy. Nature, 1998, 392 (1): 25~30
- 4 Luo D, Saltzman W M. Synthetic DNA delivery systems. Nat Biotech, 2000, 18 (1): 33
- 5 Fox J L. Gene therapy safety issues come to fore. Nat Biotech, 1999, 17 (9): 1153
- 6 Kouraklis G. Progress in cancer gene therapy. Acta Oncol, 1999, 38 (6): 675~683
- 7 杜仕国, 施冬梅, 韩其文. 纳米颗粒的液相合成技术. 粉末冶金技术, 2000, 18 (1): 46~50
Du S G, Shi D M, Han Q W. Powder Metallurgy Technique, 2000, 18 (1): 46~50
- 8 Davis S S. Biomedical application of nanotechnology-implications for drug targeting and gene therapy. Trends in Biotech, 1997, 15 (2): 217~224
- 9 Lambert G, Fattal E, Couvreur P. Nanoparticulate systems for the delivery of antisense oligonucleotides. Adv Drugs Deliv Rev, 2001, 47 (1): 99~112
- 10 Fenske D B, MacLachlan I, Cullis P R, et al. Long-circulating vector for the systemic delivery of genes. Curr Opin Mol Ther, 2000, 3 (2): 153~158
- 11 Moghimi S M, Hunter A C, Murray J C. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practices. Pharmacol Rev, 2001, 53 (3): 283~318
- 12 H. Maeda J, Wu T, Sawa Y, et al. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutic: a review. J Control Release, 2000, 65 (2): 271~284

- 13 Passirani C, Barratt G, Devissaguet J P, *et al.* Long-circulating nanoparticles bearing heparin or dextran covalently bound to poly (methyl methacrylate). *Pharm Res (New York)*, 1998, **15** (9): 1046~ 1050
- 14 De Jaeghere F, Aliemman E, Feijen J, *et al.* Cellular uptake of PEO surface-modified nanoparticles: evaluation of nanoparticles made of PLA: PEO diblock and triblock copolymers. *J Drug Target*, 2000, **8** (1): 143~ 153
- 15 Cristiano R J. Targeted, non-viral gene delivery for cancer gene therapy. *Front Biosci*, 1998, **3** (10): D1161~ 1170
- 16 Ward C M. Folate targeted non-viral DNA vectors for cancer gene therapy. *Curr Opin Mol Ther*, 2000, **2** (2): 182~ 187
- 17 Ciftci K, Levy R. Enhanced plasmid DNA transfection with lysosomotropic agents in cultured fibroblasts. *Inter J Pharm*, 2001, **218** (1): 81~ 92
- 18 Zanta M A, Belguise-Valladier P, Behr J P. Gene delivery: a single nuclear location signal peptides is sufficient to carry DNA to the cell nucleus. *Proc Nat Aso Sci USA*, 1999, **96** (1): 91~ 96
- 19 朱诗国, 吕红斌, 向娟娟, 等. 一种新型的非病毒 DNA 传递载体——多聚赖氨酸-硅纳米颗粒. *科学通报*, 2002, **47** (3): 193~ 197
- 20 Zhu S G, Lu H B, Xiang J J, *et al.* Science Bulletin, 2002, **47** (3): 193~ 197
- 21 Zhu S G, Lu H B, Xiang J J, *et al.* A novel nonviral nanoparticle gene vector: poly-L-lysine silica nanoparticles. *Chin Sci Bull*, 2002, **47** (8): 654~ 658
- 22 向娟娟, 朱诗国, 吕红斌, 等. 用氧化铁磁性纳米颗粒作为基因载体的研究. *癌症*, 2001, **20** (10): 1~ 6
- Xiang J J, Zhu S G, Lu H B, *et al.* *Cancer*, 2001, **20** (10): 1~ 6
- 朱诗国, 贺达仁, 李桂源. 纳米医学的圣殿. *医学与哲学*, 2001, **22** (7): 41~ 43
- Zhu S G, He D R, Li G Y. *Medicine and Philosophy*, 2001, **22** (7): 41~ 43

Nanoparticulate Carriers for Gene Delivery: Principles, Research and Applications*

ZHU Shi-Guo, LI Gui-Yuan**

(Cancer Research Institute, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract Although genomic research has opened up more new avenues for therapeutic interventions based on genetic therapy, it will not be possible to realize the full potential of these therapies until the issue of gene delivery has been resolved. With the development of nanotechnology, the systemic and cellular mechanisms of nanoparticulate carriers for gene delivery have been gradually elucidated. Research and applications of long-circulating and target-specific nanoparticulate carriers maybe help to alleviate the gene delivery bottleneck, and realize the efficient, targeted and safe gene delivery.

Key words nanoparticles, nanoparticulate carriers, gene delivery, gene therapy

* This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (30171056), The Science and Technology Key Programs of the Ministry of Education (01130), The Key program Funds of the Ministry of Education (2000-156) and The Hunan Provincial Natural Science Foundation of China (01JJY2020).

** Corresponding author. Tel: 86-731-4805446, E-mail: ligy@public.cs.hn.cn

Received: May 13, 2002 Accepted: June 20, 2002