

## 基因治疗药物输递系统的研究现状及发展趋势\*

李燕<sup>1, 2)</sup> 阳俊<sup>1)</sup> 刘桂英<sup>3)\*\*</sup> 张欣<sup>1)\*\*</sup>

<sup>1)</sup> 中国科学院过程工程研究所, 生化工程国家重点实验室, 北京 100190; <sup>2)</sup> 中国科学院大学, 北京 100049;

<sup>3)</sup> 首都医科大学附属北京安贞医院儿科, 北京 100029)

**摘要** 基因治疗是一种有效的治疗方法, 可用于治疗多种严重威胁人类健康的疾病。然而, 裸露的基因治疗药物存在易被核酶降解、细胞内吞效果差和细胞靶向能力差等缺点。因此, 需要寻求合适的载体, 将基因治疗药物有效地输递到靶细胞, 实现高效的基因治疗。本文主要综述了近年来基因治疗药物输递系统的研究进展, 分别总结和阐述了病毒载体、脂质体、聚合物和树状大分子等非病毒载体, 以及具有示踪功能的输递系统的特点及研究和发展现状。

**关键词** 基因治疗, 病毒载体, 脂质体, 聚合物, 树状大分子  
**学科分类号** R452, Q7

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2013.00312

基因治疗(gene therapy)是将目的基因导入患者的特定组织和细胞进行适当的表达, 以纠正或补偿因基因缺陷或异常而引起的疾病, 从而达到治疗疾病的目的<sup>[1]</sup>。基因治疗与传统治疗方法相比, 具有无可争议的优越性。它从根源上修正了引起疾病的异常基因, 可以选择性地治疗多种严重威胁人类健康的疾病, 其中包括: 遗传病(如血友病、囊性纤维病、遗传性高胆固醇血症)、恶性肿瘤和心血管疾病等, 并且取得了一定的治疗效果。目前, 基因治疗已经成为医学领域里一个新的研究热点。

基因治疗的目的是将基因治疗药物运送到特定的靶细胞, 而裸露的基因治疗药物存在以下缺点: a. 基因治疗药物在组织或细胞中易被核酶降解; b. 基因治疗药物的细胞靶向能力差; c. 基因治疗药物自身带有负电荷, 与带有负电荷的细胞膜之间存在排斥作用, 导致其细胞内吞和内涵体逃逸能力差。以上缺点造成基因治疗效果不佳<sup>[2]</sup>。因此, 需要寻求合适的载体负载基因治疗药物, 以跨越基因治疗药物输递过程中遇到的瓶颈, 将其输递到靶细

胞, 有效逃离内涵体, 释放基因治疗药物进入细胞质, 以实现该药物的高效表达(图 1)。理想的载体应当具备以下条件: a. 载体应有效地保护基因治疗药物免受组织或细胞中核酶的降解; b. 无毒性, 对患者及环境安全无害; c. 稳定性好, 包载率高, 容易制备, 可以实现大规模生产; d. 能够帮助基因治疗药物实现高效和长期的表达。目前, 基因治疗的研究和临床应用中, 常用的载体大致分为病毒载体(viral vector)和非病毒载体(non-viral vector)两大类<sup>[3]</sup>。

\* 国家自然科学基金(51103159, 51203162)和国家高技术研究发展计划(863)(2012AA022703, 2012AA020804)资助项目。

\*\* 通讯联系人。

张欣. Tel/Fax: 010-82544853, E-mail: xzhang@home.ipe.ac.cn

刘桂英. Tel: 010-84005105, E-mail: liuguiying@126.com

收稿日期: 2013-07-04, 接受日期: 2013-07-10

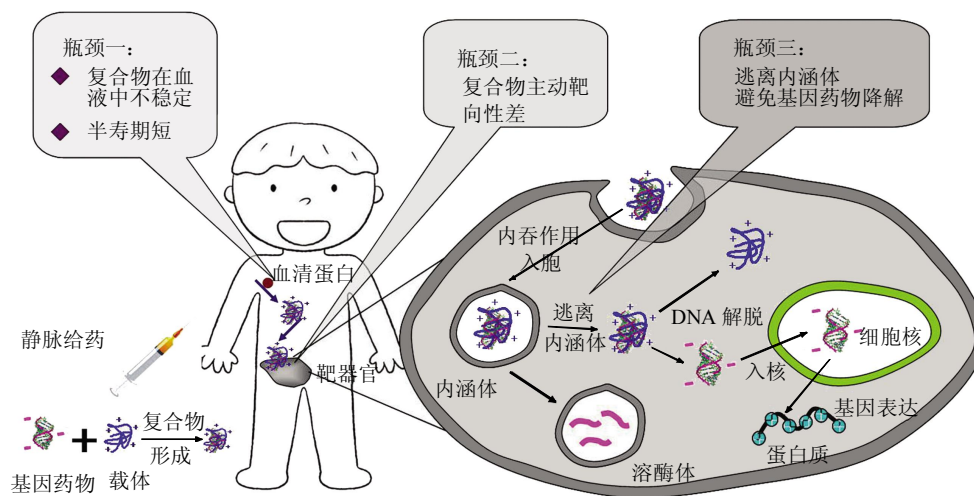


Fig. 1 Schematic diagram of barriers associated with gene delivery

图 1 基因治疗药物输送的瓶颈示意图

## 1 病毒载体输送系统

病毒载体是一种常用于分子生物学的工具, 可以将遗传物质转入细胞. 病毒载体是通过转换方式完成基因转移, 即以病毒为载体, 将基因治疗药物通过基因重组技术, 组装于病毒上, 通过这种重组病毒去感染宿主细胞, 从而使基因治疗药物在宿主细胞内表达, 达到治疗疾病的目的. 目前, 较常使用的病毒载体主要包括: 逆转录病毒载体 (retrovirus)、慢病毒载体 (lentivirus)、腺病毒载体 (adenovirus) 和腺病毒相关病毒载体 (adeno-associated virus) 等. 其中, 逆转录病毒载体和腺病毒载体应用较为广泛<sup>[4-5]</sup>. 世界首个获准上市的由深圳赛百诺基因技术有限公司研制的基因治疗药物“今又生”, 是由正常人肿瘤抑制基因 p53 和改构的 5 型腺病毒基因重组而成的, 其利用腺病毒载体将基因治疗药物 p53 传递进入靶细胞发挥治疗作用, 目前, 该载体已治疗数千名国内外癌症患者. Follenzi 等<sup>[6]</sup>采用慢病毒载体负载 DNA, 结果发现慢病毒载体在体内可以有效地将 DNA 分子运送到肝细胞并且进行高效表达. Chaudhary 等<sup>[7]</sup>采用修饰后的腺病毒相关病毒载体负载小干扰 RNA 用于转染哺乳动物细胞, 修饰后的腺病毒相关病毒载体可以有效地将小干扰 RNA 递送到 HeLa S3 细胞中, 有效地降低了 HeLa S3 细胞中 p53 和半胱天冬酶 8 (caspase 8) 的表达. 病毒载体输送系统对大多数靶细胞具有很高的转染效率, 一般可以达到 90% 以

上, 在基因治疗中占有一定优势. 然而, 在应用中发现, 病毒载体存在很多弊病: a. 负载量低, 特异性和靶向性不强; b. 安全性差, 可能因随机插入宿主细胞基因而引起基因失活、重组以及癌基因激活; c. 很难实现大规模的生产<sup>[8-9]</sup>. 以上缺点给病毒载体的实际应用带来很大障碍.

## 2 非病毒载体输送系统

非病毒载体输送系统由于具有低毒、低免疫反应、靶向性和易于组装等优点, 已经成为当今基因治疗领域里一个新的研究热点<sup>[10]</sup>. 非病毒载体主要包括脂质体 (liposomes)、聚合物 (polymers) 以及树状大分子 (dendrimers) 等.

### 2.1 脂质体

脂质体是磷脂依靠疏水缔合作用在水中自发形成的一种分子有序组合体, 为多层囊泡结构, 每层均为类脂双分子膜, 构成双分子层的类脂其亲水性的头部形成膜的内外表面, 而亲脂性的尾部处于膜的中间. 脂质体分为中性脂质体、阴离子脂质体和阳离子脂质体. 在基因治疗应用中, 中性脂质体和阴离子脂质体与基因治疗药物作用较为简单, 主要是通过亲水包覆作用. 然而, 中性脂质体间缺乏排斥作用, 极易聚集. 阴离子脂质体由于表面带有负电荷, 导致其基因治疗药物包埋率低, 脂膜融合效率差, 以上缺点使得二者应用受到很大限制<sup>[11]</sup>. 目前, 在基因治疗领域里应用较为广泛的是阳离子脂质体.

### 2.1.1 阳离子脂质体.

阳离子脂质体是一种自身带有正电荷的脂质囊泡, 主要由阳离子脂质和中性辅助脂组成. 阳离子脂质为整个脂质体提供正电荷, 如图 2 所示, 主要包括单电荷的阳离子脂质, 如(2, 3- 二油氧基丙基)三甲基氯化铵(DOTAP)、N-[1-(2, 3- 二油酰氯)丙基]- N, N, N- 氯化三甲铵(DOTMA)、双十八烷基二甲基溴化铵(DDAB)和 N-(N', N'- 二甲基胺乙基)胺基丙酰基 - 胆固醇(DC-Chol)等, 以及多电荷的阳离子脂质, 如精胺 -5- 羧基 - 氨基乙酸二十八烷基 - 酰胺(DOGS)、2, 3- 二油酰氯 -N-[2(精胺羧基酰胺)乙基]- N, N- 二甲基 -1- 丙基 - 三氟乙酸铵(DOSPA) 和 MVL5 等<sup>[12]</sup>. 阳离子脂质利用静电相互作用, 与带有负电荷的基因治疗药物相互作用, 有效压缩基因治疗药物由伸展结构成为体积较小的粒子, 形成负载基因治疗药物的阳离子脂质体转染复合物(lipoplexes).

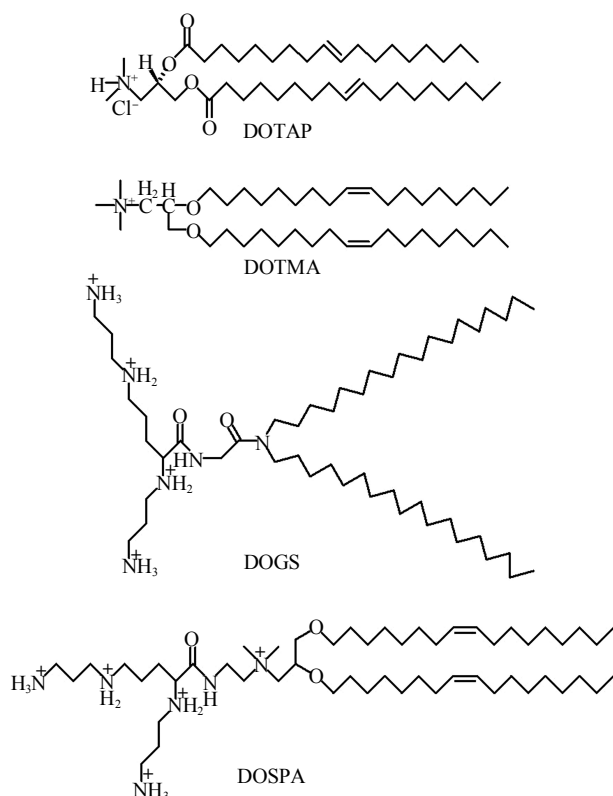


Fig. 2 Chemical structures of cationic lipids

图 2 典型的阳离子脂质结构图

常用的中性辅助脂为二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)和胆固醇(cholesterol)<sup>[13]</sup>. DOPE 具有促进膜

融合作用, 在复合物进入内涵体后, pH 降低介导 DOPE 分子结构发生变化, 有利于降低内涵体的稳定性, 促进基因治疗药物的内涵体逃逸. 胆固醇主要起稳定阳离子脂质体的作用, 可以保证脂质体完整地到达靶组织或细胞, 从而保护基因治疗药物免受核酶降解, 有利于提高基因治疗药物的治疗效果.

阳离子脂质体转染复合物表面带有正电荷, 通过静电相互作用吸附到带有负电荷的细胞表面, 利用细胞内吞作用, 形成内涵体进入细胞. 在内涵体中, 阳离子脂质与内涵体中带有负电荷的膜脂质发生静电相互作用, 带有负电荷的膜脂质由内涵体的腔外翻转(flip-flop)到腔内, 与正电荷脂质形成中性离子对, 基因治疗药物脱离阳离子脂质体后进入细胞核, 进行转录、翻译、表达相应蛋白质<sup>[14]</sup>. 阳离子脂质体可以有效提高基因治疗药物的治疗效果, 然而, 在应用中发现, 阳离子脂质体基因转染复合物由于带有正电荷, 在血液循环过程中, 易与血液中带有负电荷的血清蛋白产生非特异性吸附, 形成大尺寸的聚集体, 聚集体易被网状内皮系统(RES)清除, 造成阳离子脂质体血液循环时间短、基因治疗药物转染效率低<sup>[15]</sup>. 针对以上问题, 相关研究人员进行了大量工作对阳离子脂质体进行改性, 制备了长循环阳离子脂质体.

聚乙二醇(PEG)及其衍生物对阳离子脂质体表面进行修饰, 可以有效地降低血清蛋白对阳离子脂质体的非特异性吸附, 延长复合物的血液循环时间, 提高阳离子脂质体复合物的被动靶向性<sup>[16]</sup>. PEG 修饰的阳离子脂质体因为能够逃离网状内皮系统的清除, 被称为“隐形脂质体”. 其作用机理主要包括以下两个方面: a. 水合作用. PEG 通过氢键作用, 在被修饰的阳离子脂质体表层形成一层水分子膜, 掩盖阳离子脂质体表面的正电荷, 从而达到抑制血清蛋白非特异性吸附并减少吞噬系统识别的作用. b. 立体位阻作用. PEG 为线性聚合物, 其在阳离子脂质体表面呈部分延伸的构象, 形成立体位阻层, 这一立体位阻层如一把“刷子”, 将靠近的蛋白质隔离, 从而减弱血清蛋白的吸附作用, 延长了复合物在体内的循环时间<sup>[17-18]</sup>. Meyer 等<sup>[19]</sup>采用 PE-PEG 2000 修饰阳离子脂质体/DNA 复合物, 结果表明, PE-PEG 修饰后的阳离子脂质体复合物的细胞吸收是裸 DNA 的 4.2~4.5 倍.

然而, 阳离子脂质体基因复合物表层的 PEG 分子掩盖了阳离子脂质体表面的正电荷, 减弱了靶细胞对复合物的吸收及基因治疗药物的内涵体逃逸

能力, 从而降低基因治疗药物的生物活性<sup>[20]</sup>. 针对以上问题, 研究人员制备了对组织或细胞环境如酸性、还原性和酶等响应的 PEG 脂质分子, 用于阳离子脂质体的表面修饰<sup>[21]</sup>. Chan 等<sup>[22]</sup>发展了酸性敏感的 PEG 脂质分子 (HPEG2K lipid, PEG MW 2000) 用于阳离子脂质体 /DNA 复合物修饰, PEG 分子在晚期内涵体的酸性条件下脱离阳离子脂质体 /DNA 复合物, 促进了复合物的内涵体逃逸, 有效地提高了 DNA 转染效率. Hatakeyama 组<sup>[23]</sup>利用基质金属蛋白酶敏感的 PEG-多肽-DOPE(PPD) 脂质分子修饰阳离子脂质体载体, 结果发现 PPD 修饰明显提高了阳离子脂质体的细胞内吞和内涵体逃逸能力, 体内肿瘤基因静默效果达到 70%, 有效地抑制了肿瘤的生长, 且无免疫反应.

**2.1.2 核酸-脂质粒子.** 目前, 针对阳离子脂质体血液循环时间短、靶向能力差、转染效率低等问题, 研发了另一种基于可离子化阳离子脂质的脂质体, 称为稳定的核酸-脂质粒子 (stabilized nucleic acid lipid particles, SNALPs). 核酸-脂质粒子的组分如图 3 所示, 主要包括可离子化的阳离子脂质如 DLinDMA 或 DLinDMA 的衍生物、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)、胆固醇(cholesterol)及 PEG 脂质<sup>[24-25]</sup>. 可离子化的阳离子脂质分子的亲水头为叔胺基团, 在低 pH 条件下, 叔胺基团质子化, 阳离子脂质带有正电荷, 利用静电相互作用有效复合基因治疗药物. 在生理 pH 条件下, 该阳离子脂质显示电中性

或低的正电荷, 有利于提高复合物的血液稳定性, 延长复合物的血液循环时间. 在核酸-脂质粒子通过内吞作用进入内涵体后, 内涵体中的酸性条件诱导该可离子化的阳离子脂质再次发生质子化, 从而有利于基因治疗药物逃离内涵体, 进入细胞质<sup>[26]</sup>. 辅助胆固醇和 DSPC 用于提高脂质粒子的稳定性, 促进基因治疗药物内涵体逃逸. PEG 脂质为脂质粒子提供中性的亲水外层, 减少血清中负电荷蛋白的非特异性吸附, 延长脂质粒子的血液循环时间. 核酸-脂质粒子的粒径一般为 100 nm 左右, 在血液循环过程中表现电中性或低的正电荷, 易与血液中的载脂蛋白 E (apolipoprotein E) 结合, 容易被肝细胞吸收, 很好地实现了肝靶向<sup>[27]</sup>. 目前, 该核酸-脂质粒子主要被应用于治疗与肝脏有关的疾病, 如高血胆固醇症、肝炎和肝癌等. Yu 等<sup>[28]</sup>设计并合成了不同亲水头和疏水尾的可离子化阳离子脂质用于小干扰 RNA 的传递, 结果表明新合成的 RNA-脂质粒子容易被肝癌细胞吸收, 且小干扰 RNA 的静默效果显著. Morrissey 等<sup>[29]</sup>采用核酸-脂质粒子负载修饰后的小干扰 RNA 用于乙型肝炎的治疗, 结果发现, 采用核酸-脂质粒子负载小干扰 RNA 提高了小干扰 RNA 的血液半衰期及肝部富集能力, 有效地降低了血清中 HBV DNA 的含量. Taberero 等<sup>[30]</sup>在肝癌患者中开展了对负载靶向血管内皮生长因子 (VEGF) 和纺锤体驱动蛋白 (KSP) 的小干扰 RNA 的核酸-脂质粒子 (ALN-VSP)

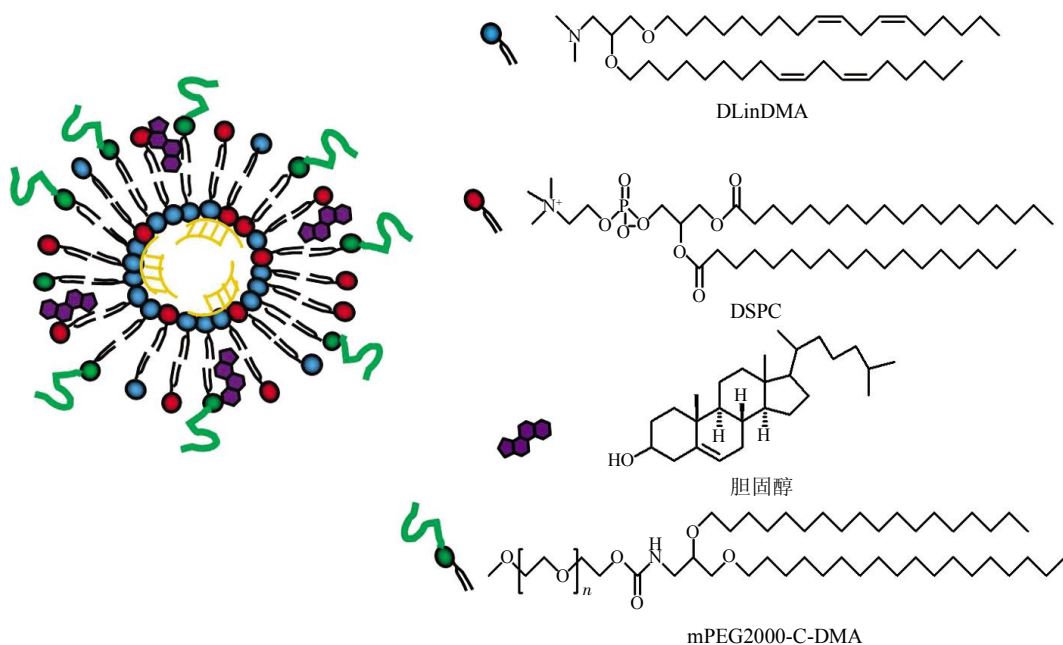


Fig. 3 Schematic diagram of stabilized nucleic acid lipid particles

图 3 稳定的核酸-脂质粒子(SNALPs)示意图

的研究, 结果发现该核酸-脂质粒子可以很好地抑制肝肿瘤的生长和转移, 毒性低, 无副反应. 虽然针对核酸-脂质粒子的研究出现较晚, 由于其对肝病具有很好的治疗效果, 安全性高, 且容易实现大规模制备, 目前已经有多项核酸-脂质粒子进入临床测试, 如由 Tekmira 制药公司开发的 TKM-ApoB、TKM-Ebola、TKM-08031 及 Alnylam 制药公司开发的 ALN-VSP、ALN-TTR01、ALN-TTR02 和 ALN-PCS02 等, 在基因治疗中具有很好的应用前景.

## 2.2 聚合物

聚合物载体材料主要包括合成性高分子材料和天然高分子材料, 这些聚合物载体材料利用静电作用有效压缩基因治疗药物, 将基因治疗药物递送到靶组织或细胞, 进行基因治疗. 聚合物具有易合成、易改性、无免疫原性等优点, 在基因治疗中具有广泛的应用前景.

### 2.2.1 合成性高分子聚合物.

合成性高分子聚合物多是带有大量氨基基团的高分子, 如聚-L-赖氨酸(PLL)、聚-L-谷氨酸(PGA)和聚乙烯亚胺(PEI)等<sup>[31]</sup>. 这些聚合物分子由于含有大量的氨基基团, 在生理 pH 条件下易发生质子化, 质子化的氨基带有正电荷, 基于静电相互作用与带有负电荷的基因治疗药物相互作用, 有效压缩基因治疗药物形成聚合物-基因复合物载体(polyplexes), 保护基因治疗药物免受核酶降解. Clements 等<sup>[32]</sup>采用聚-L-赖氨酸-棕榈酸(PLL-PA)负载表达绿色荧光蛋白的质粒 DNA, PLL-PA 聚合物载体可以在 5 h 内将质粒成功递送到骨髓基质细胞核内, 且质粒表达效率高于商品化的 Lipofectamine™ 2000. 聚合物载体进入细胞后, 在内涵体中通过“质子海绵效应”发生内涵体逃逸. 然而, 由于不同聚合物的  $pK_a$  值不同, 聚合物材料的内涵体逃逸能力存在很大差异. 例如, PLL 的氨基基团在生理 pH 条件下可以完全质子化, 在内涵体酸性条件下没有质子缓冲能力, 内涵体逃逸能力差, 因此需要氯喹或膜渗透肽辅助基因治疗药物的内涵体逃逸. PEI 的氨基基团在生理 pH 条件下仅有 20% 发生质子化, 在 pH 为 5.0 的酸性条件下, 仅有 50% 的氨基基团发生质子化. 因此, 在内涵体中 PEI 可以利用“质子海绵效应”捕获大量质子, 并引起  $Cl^-$  内流, 导致内涵体渗透性肿胀, 从而促进基因治疗药物的内涵体逃逸<sup>[12]</sup>. Farrell 等<sup>[33]</sup>比较了 PLL 和 PEI 负载质粒 DNA 后对骨髓基质细

胞的转染效果, 结果表明, PLL 和 PEI 复合物二者的细胞吸收效果好, 但是 PEI 负载的绿色荧光蛋白质粒在细胞内的表达明显, 这主要是由于 PEI 在细胞内递质粒的能力强.

聚合物载体有效地提高了基因治疗药物的转染效率, 然而, 由于聚合物载体带有大量的正电荷, 易与血清中的负电荷蛋白产生非特异性吸附, 被吞噬细胞清除而造成转染效率低. 同时, 大量的正电荷也导致复合物的细胞毒性较大. 为了减少聚合物载体的非特异性蛋白吸附和细胞毒性, 通常对载体材料进行 PEG 修饰, 制备 PEG 化的合成性高分子, 如 PLL-PEG、PGA-PEG 和 PEI-PEG<sup>[31]</sup>. Kim 组<sup>[34]</sup>制备了一类不同 PEG 化程度的 PLL-PEG 聚合物, 结果表明, PLL-PEG 明显地降低了 PLL 的细胞毒性, 且其 DNA 转染效率是未修饰的 PLL 的 5~30 倍, 同时, PLL-PEG 负载的 DNA 可以高效稳定表达长达 96 h. Gupta 组<sup>[35]</sup>采用 PEG 分子修饰 PEI, 修饰后的 PEI-PEG 载体其毒性低于 PEI, 且其转染效率与商品化的 Lipofectin 和 PEI 相比, 是后两者的 5~16 倍. 合成性高分子聚合物材料明显提高了基因治疗药物的转染效率, 然而, 一些聚合物材料为非生物可降解材料, 尤其在反复给药后这些材料容易积聚于体内, 可能会引发一系列的副反应, 以上缺点给其临床应用带来很大限制.

### 2.2.2 天然高分子聚合物.

相对于合成性高分子聚合物, 天然高分子聚合物具有生物相容性好, 可生物降解等优点. 目前较常使用的天然高分子聚合物主要包括环糊精、壳聚糖、透明质酸、葡聚糖和明胶等<sup>[31]</sup>. 环糊精是一种以葡萄糖为单元构成的环形寡聚物, 是一种特殊结构的两亲性物质, 其具有疏水的空腔和亲水的外围. 环糊精具有大量的活泼羟基, 可以与含有氨基的单体结合, 制备具有生物活性、生物相容性的基因载体材料<sup>[36]</sup>. 环糊精聚合物与基因治疗药物作用, 可以形成粒径为 100 nm 左右的载体, 明显地提高了基因治疗药物的转染效率. Davis 组<sup>[37]</sup>构建了基于环糊精聚合物(cyclodextrin containing polymer, CDP)的载体用于基因治疗药物的传递. 组分 CDP 是一种由三部分组成的多正电荷聚合物, 其中, 辛二亚酰胺为聚合物提供正电荷, 其利用静电相互作用组装负载基因治疗药物. 两侧的咪唑基团在酸性条件下可以质子化, 利用“质子海绵作用”帮助基因治疗药物实现高效的内涵体逃逸. 该聚合物载体还包括金刚烷-聚乙二醇(AD-PEG)和



金刚烷-聚乙二醇-转铁蛋白(AD-PEG-Tf), 金刚烷分子对环糊精具有很高的亲和性, AD-PEG 分子和 AD-PEG-Tf 分子嵌于载体表面, 用于延长环糊精聚合物载体的血液循环时间和肿瘤细胞靶向性. 载体明显地提高了基因治疗药物的转染效率, 且安全性高, 研制 5 年后, 被用于临床 I 期测试 (CALAA-01), 对黑素瘤患者进行治疗. Chen 等<sup>[38]</sup>构建了环糊精修饰的 PEI 聚合物载体负载 Bcl-x1 寡聚核苷酸用于转染肺癌细胞, 结果表明, 该载体可以有效地抑制肿瘤生长, 以及 Bcl-x1 mRNA 和蛋白质的表达, 同时, 其抑制效果优于商品化的 Lipofectamine 2000 和分枝状 PEI(25 000 u).

壳聚糖(chitosan)及其衍生物是另一种应用较为广泛的天然高分子聚合物, 由自然界广泛存在的甲壳素(chitin)经去乙酰化形成, 属于含有氨基的均态直链多糖, 其化学名为聚(1, 4)-2-氨基-2-脱氧- $\beta$ -D-葡聚糖, 是天然多糖中唯一的碱性多糖. 壳聚糖作为无毒、来源丰富、具有良好生物相容性及生物可降解性的天然高分子材料, 含有大量的氨基基团, 可以有效地复合基因治疗药物, 在基因治疗领域具有广泛的应用前景<sup>[39]</sup>. Mansouri 等<sup>[40]</sup>采用壳聚糖载体传递  $\beta$ -半乳糖 DNA 分子, 48 h 后,  $\beta$ -半乳糖在小鼠的前胫骨肌肉中稳定表达. 与此相比, 裸 DNA 和 Lipofectamine 在前胫骨肌肉中没有明显表达. Besenbacher 组<sup>[41]</sup>采用壳聚糖负载小干扰 RNA, 该壳聚糖-小干扰 RNA 阳离子聚合物载体转染 H1299 细胞 48 h 后, 其 EGFP 基因抑制效率达到 50%. 然而, 壳聚糖的  $pK_a$  值为 6.5, 高分子质量的壳聚糖在中性 pH 条件下溶解度低, 且其与基因治疗药物复合形成的复合物粒径大, 很大程度上限制了其应用. 为了克服高分子质量壳聚糖的缺点, 通常采用低分子质量的壳聚糖进行基因治疗药物的输送. 但是, 低分子质量的壳聚糖基因治疗药物复合物的转染效率低, 其原因主要是由于壳聚糖基因治疗药物复合物的细胞内吞效果差. 针对以上问题, 相关研究人员利用壳聚糖的伯胺基团和羟基基团的反应, 对壳聚糖进行各种化学修饰. 其中, 对壳聚糖进行疏水修饰展现出很好的应用前景, 疏水修饰可以增强壳聚糖与细胞膜间的疏水相互作用, 增加壳聚糖基因治疗药物复合物的细胞内吞和内涵体逃逸能力, 从而提高基因治疗药物的转染效率<sup>[42]</sup>. Singh 等<sup>[43]</sup>采用氨基酸对壳聚糖进行疏水修饰后, 疏水修饰后的壳聚糖有效压缩质粒 DNA 分子形成复合物, 用于 HEK 293 细胞转染,

结果表明氨基酸疏水修饰的壳聚糖衍生物有效地提高了复合物的细胞吸收和转染效率. 在前期工作中, 我们采用烷基侧链对低分子质量壳聚糖进行疏水修饰(图 4a)<sup>[44]</sup>, 疏水修饰后的低分子质量壳聚糖(HM-LMW-ch)与 DNA 分子通过静电相互作用形成复合物, 并对复合物进行体外和体内效果的评估. 在体外实验中, 采用复合物转染 HeLa 细胞, 如图 4b 所示, 3%摩尔疏水取代的低分子质量壳聚糖/DNA 复合物具有高的细胞内吞和细胞转染效率. 在体内实验中, 通过静脉注射将复合物注入小鼠体内, 如图 4c 所示, 3%摩尔疏水取代的低分子质量壳聚糖/DNA 复合物在小鼠肾脏部位表现出高的转染效率, 甚至高于分枝状的 PEI. 天然高分子聚合物由于具有生物相容性好、生物可降解、易修饰和转染效率高等优势, 在基因治疗中具有很好的应用.

### 2.3 树状大分子

树状大分子由于表面正电荷密度高, 利用静电相互作用可以有效地压缩基因治疗药物. 常用的树状大分子主要包括聚酰胺胺树枝状聚合物(polyamidoamine dendrimers)、聚丙烯亚胺树枝状聚合物(polypropylenimine dendrimers)及聚赖氨酸树枝状聚合物(poly-L-lysine dendrimers)等<sup>[12]</sup>. 树状大分子载体通过胞吞作用进入细胞, 由于树状高分子含有大量的氨基基团, 在内涵体中具有极强的质子缓冲能力, 促进了基因治疗药物的内涵体逃逸, 所以, 树状高分子具有很高的基因转染效率. Peng 组<sup>[45]</sup>采用三羟乙基胺为中心的聚酰胺胺五代树状大分子负载小干扰 RNA 转染前列腺癌细胞, 结果表明, 该树状大分子体系在体外和体内均可有效抑制热休克蛋白 27 的表达, 具有明显的抗肿瘤效果. Zhou 等<sup>[46]</sup>也采用聚酰胺胺七代树状大分子负载 GL3Luc siRNA 转染稳定表达 GL3 荧光素酶基因的 A549 细胞, 该树状大分子载体介导的小干扰 RNA 同样表现出高的抑制效率, 而裸小干扰 RNA 无明显抑制效果. Tsai 等<sup>[47]</sup>采用自发蓝色荧光的聚酰胺胺树状大分子负载小干扰 RNA, 蓝色荧光基团修饰不仅便于流式和荧光共聚焦分析, 且降低了聚酰胺胺树状大分子的细胞毒性. 同时, 修饰后的聚酰胺胺树状大分子可以有效抑制特定蛋白的表达, 效果与支状 PEI 相当.

树状大分子由于具有大量的正电荷, 可以有效地压缩基因治疗药物, 促进基因治疗药物的细胞内吞和内涵体逃逸, 基因治疗效果显著. 但是, 大部

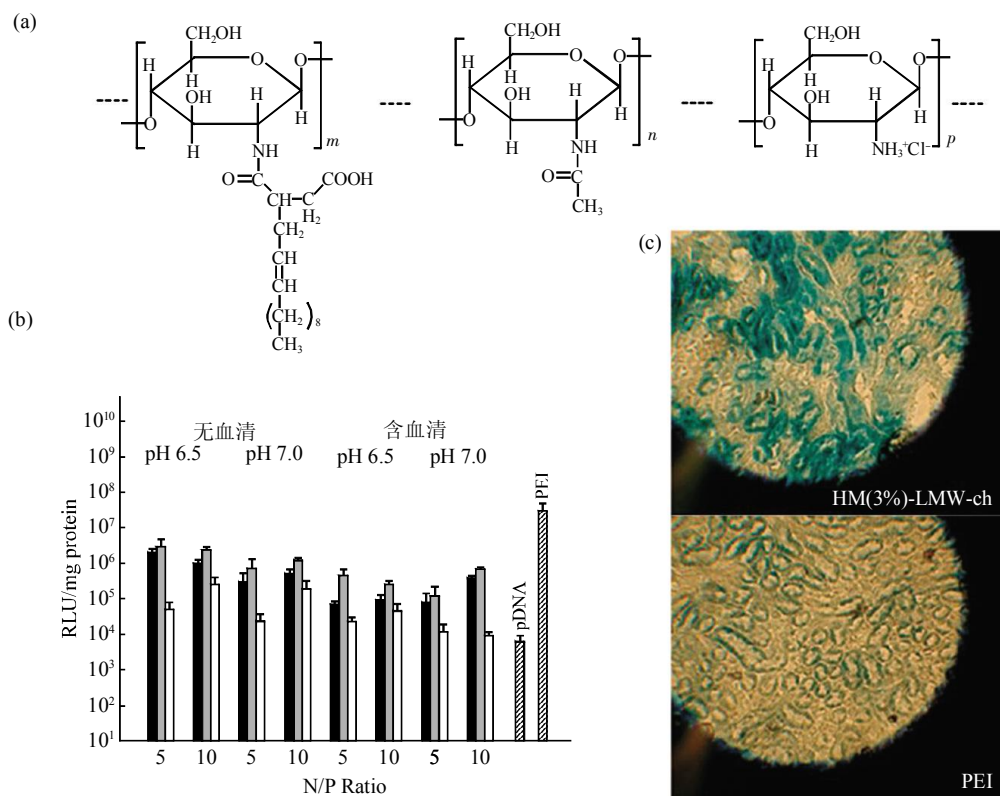


Fig. 4 Transfection efficiency of the complexes of pDNA with LWM-ch derivatives on HeLa cells *in vitro* and in mice kidneys

图 4 疏水修饰的低分子质量壳聚糖/DNA 复合物的体内和体外基因转染效率

(a) 烷基侧链疏水修饰的低分子质量壳聚糖分子式. (b) 疏水修饰的低分子质量壳聚糖/DNA 复合物对 HeLa 细胞的转染结果图. ■: LMW-ch; □: HM(3%)-LMW-ch; ▨: HM(18%)-LMW-ch. (c) 疏水修饰的低分子质量壳聚糖/DNA 复合物体内肾脏转染结果图.

分树状大分子为非生物可降解材料，反复给药后会引发副作用，同时，树状大分子具有大量正电荷，细胞毒性大，以上缺点不利于其体内的临床应用。

### 3 具有示踪功能的输递系统

无机纳米载体一般是指粒径为纳米量级(1~100 nm)的无机粒子，主要包括磁性氧化铁、磷酸钙、磷酸镁、二氧化硅、金、量子点和碳纳米管等。无机纳米载体具有可重复合成性、易表面修饰、装载量大、稳定性好、容易通过组织间隙并被细胞吸收等优点，已经成为基因载体方向中的研究热点之一<sup>[48]</sup>。无机纳米载体主要通过物理、化学等相互作用的方式吸附或接枝基因治疗药物。Lee 等<sup>[49]</sup>采用掺有锰的氧化铁磁性纳米粒子，如图 5 所示，在其表面修饰肿瘤靶向分子 RGD 以及荧光染料分子 Cy5，采用化学连接方式负载小干扰 RNA 分子，形成一个具有示踪功能和诊疗一体化的多功

能基因载体。Roy 等<sup>[50]</sup>采用粒径均一的磷酸钙纳米球负载 DNA 分子，有效保护 DNA 分子免受核酶降解，同时在磷酸钙表面修饰了 *p*-氨基-1-硫代-β-半乳糖皮葱，实现了 DNA 分子的肝靶向传递。Mao 组<sup>[51]</sup>采用 β-环糊精修饰的量子点(QDs)用

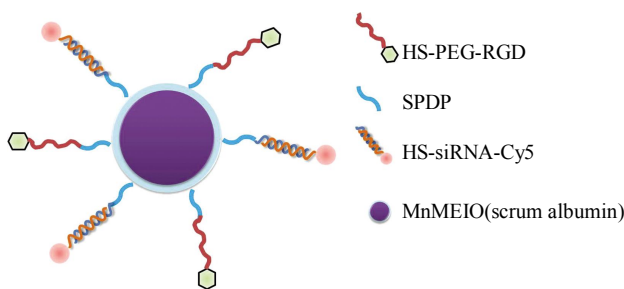


Fig. 5 Schematic diagram of MnMEIO-siRNA-Cy5/PEG-RGD nanoparticle

图 5 多功能氧化铁磁性纳米粒子示意图

于阿霉素和小干扰 RNA 的联合给药, 该给药体系很好地实现了化疗与基因治疗的联合给药, 同时可以实时追踪治疗位点, 对于肿瘤治疗具有很好的应用前景. Guo 等<sup>[52]</sup>采用电荷逆转材料修饰金纳米球以负载小干扰 RNA, 结果发现, 该金纳米球负载的小干扰 RNA 可以有效降低核纤层蛋白的表达, 且其抑制效果优于商品化的 Lipofectamine 2000. 然而, 采用无机材料制备的非病毒基因载体存在一定的局限性, 主要表现为其程序化较为复杂, 必须对无机纳米颗粒表面进行阳离子聚合物或者氨基硅烷化等功能化修饰才可用于基因治疗药物的输送.

#### 4 展 望

基因治疗药物输送系统在基因治疗中起着至关重要的作用, 它有效地增强了基因治疗药物的稳定性、细胞靶向性和治疗效果. 随着对基因治疗药物输送系统的不断深入研究, 基因治疗药物输送系统的研究和应用已经取得了很大的进展. 然而, 目前基因治疗药物输送系统仍然存在如安全性差、稳定性不好和制备工艺复杂等缺点, 给其临床的实际应用带来很大限制. 相信随着各项研究的不断深入, 基因治疗药物输送系统所遇到的各种问题会得以解决, 很好地实现基因治疗的临床应用.

此外, 干细胞治疗与基因治疗相结合, 在基因治疗中具有很好的应用前景. 干细胞, 如间充质干细胞、骨肌干细胞、造血干细胞、肝干细胞等, 因具有易于分离扩增、高度的自我更新能力、多向分化潜能和很好的组织相容性, 是基因治疗的理想输送系统<sup>[53]</sup>. 其输送方法如图 6 所示, 从人体内提取的干细胞, 在培养过程中利用基因载体成功转入外源基因治疗药物, 而后将改造的干细胞重新注入患者体内, 进行基因治疗<sup>[54]</sup>.

Gazit 组<sup>[55]</sup>从人体骨髓中提取间充质干细胞(human mesenchymal stem cells, hMSCs)进行培养扩增, 并转入表达人类 BMP-2 成骨因子的重组腺病毒载体, 将该改造的间充质干细胞应用于基因治疗, 进行体外和体内的评估. 在体外实验中, 该基因改造的间充质干细胞在培养过程中可以成功地增殖和成骨分化. 在小鼠体内实验中, 基因改造的间充质干细胞可以在异常部位嫁接并形成骨骼和软骨, 实现骨髓缺损再生. 在骨质疏松的患者体内也得到了相同的结果. Cartier 等<sup>[56]</sup>从因缺少肾上腺脑白质营养蛋白(adrenoleukodystrophy, ALD)而患有肾上腺脑白质营养不良的患者体内提取自身的造血

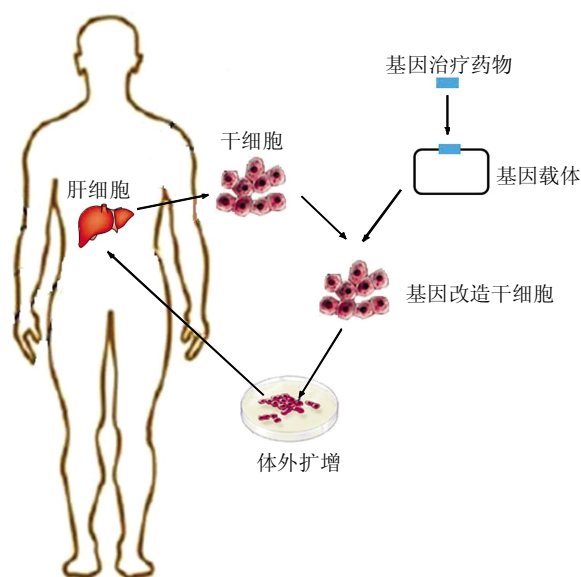


Fig. 6 Schematic diagram of the combination of stem cells therapy and gene therapy

图 6 干细胞治疗与基因治疗结合示意图

干细胞(hematopoietic stem cells)进行培养, 在培养过程中成功转入表达野生型 *ABCD1* 基因的慢病毒载体, 而后将基因改造后的造血干细胞重新递入患者体内. 观察中发现, 患者体内 9%~14%的粒细胞、单核细胞、T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞开始表达 ALD 蛋白, 表明改造后的造血干细胞成功递入患者体内进行基因治疗. 干细胞作为靶细胞进行基因治疗, 可以保证基因治疗药物在体内进行长期有效的表达, 在未来的基因治疗中具有很高的应用前景.

#### 参 考 文 献

- [1] Ilarduya C T, Sun Y, Düzgünes N. Gene delivery by lipoplexes and polyplexes. *Eur J Pharm Sci*, 2010, **40**(3): 159-170
- [2] Mao C Q, Du J Z, Sun T M, *et al.* A biodegradable amphiphilic and cationic triblock copolymer for the delivery of siRNA targeting the acid ceramidase gene for cancer therapy. *Biomaterials*, 2011, **32**(11): 3124-3133
- [3] Zhang S B, Zhao B D, Jiang H M, *et al.* Cationic lipids and polymers mediated vectors for delivery of siRNA. *J Controlled Release*, 2007, **123**(1): 1-10
- [4] Giacca M, Zacchigna S. Virus-mediated gene delivery for human gene therapy. *J Controlled Release*, 2012, **161**(2): 377-388
- [5] 姜传仓, 范乐明. 腺病毒载体及其在基因治疗研究中的应用. *生物化学与生物物理进展*, 1996, **23**(1): 9-12  
Jiang C C, Fan L M. *Prog Biochem Biophys*, 1996, **23**(1): 9-12
- [6] Follenzi A, Sabatino G, Lombardo A, *et al.* Efficient gene delivery and targeted expression to hepatocytes *in vivo* by improved lentiviral vectors. *Hum Gene Ther*, 2002, **13**(2): 243-260



- [7] Tomar R S, Matta H, Chaudhary P M. Use of adeno-associated viral vector for delivery of small interfering RNA. *Oncogen*, 2003, **22**(36): 5712–5715
- [8] Wei H, Volpatti L R, Sellers D L, *et al.* Dual responsive, stabilized nanoparticles for efficient *in vivo* plasmid delivery. *Angew Chem Int Edit*, 2013, **52**(20): 5377–5381
- [9] Karmali P P, Chaudhuri A. Cationic liposomes as non-viral carriers of gene medicines: resolved issues, open questions, and future promises. *Med Res Rev*, 2007, **27**(5): 696–722
- [10] Liang Y R, Liu Z L, Shuai X T, *et al.* Delivery of cationic polymer-siRNA nanoparticles for gene therapies in neural regeneration. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, **421**(4): 690–695
- [11] Pedrosa de Lima M C, Simões S, Pires P, *et al.* Cationic lipid-DNA complexes in gene delivery: from biophysics to biological applications. *Adv Drug Delivery Rev*, 2001, **47**(2–3): 277–284
- [12] Mintzer M A, Simanek E E. Nonviral vectors for gene delivery. *Chem Rev*, 2009, **109**(2): 259–302
- [13] Zhang S B, Xu Y M, Wang Bing, *et al.* Cationic compounds used in lipoplexes and polyplexes for gene delivery. *J Controlled Release*, 2004, **100**(2): 165–180
- [14] Olivier Z, Francis C S. Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**(21): 11493–11498
- [15] Yang X Z, Du J Z, Dou S, *et al.* Sheddable ternary nanoparticles for tumor acidity-targeted siRNA delivery. *ACS Nano*, 2012, **6**(1): 771–781
- [16] Li S D, Huang L. Gene therapy progress and prospects: non-viral gene therapy by systemic delivery. *Gene Ther*, 2006, **13**(18): 1313–1319
- [17] Li W J, Huang Z H, Andrew M J, *et al.* Low-pH-sensitive poly(ethylene glycol) (PEG)-stabilized plasmid nanoliposomes: effects of PEG chain length, lipid composition and assembly conditions on gene delivery. *J Gene Med*, 2005, **7**(1): 67–79
- [18] Awasthi V D, Garcia D, Goins B A, *et al.* Circulation and biodistribution profiles of long-circulating PEG-liposomes of various sizes in rabbits. *Int J Pharm*, 2003, **253**(1–2): 121–132
- [19] Meyer O, Kirpotin D, Hong K, *et al.* Cationic liposomes coated with polyethylene glycol as carriers for oligonucleotides. *J Biol Chem*, 1998, **273**(25): 15621–15627
- [20] Sato Y, Hatakeyama H, Sakurai Y, *et al.* A pH-sensitive cationic lipid facilitates the delivery of liposomal siRNA and gene silencing activity *in vitro* and *in vivo*. *J Controlled Release*, 2012, **163**(3): 267–276
- [21] Zhu L, Kate P, Torchilin V P. Matrix metalloproteinase 2-responsive multifunctional liposomal nanocarrier for enhanced tumor targeting. *ACS Nano*, 2012, **6**(4): 3491–3498
- [22] Chan C L, Majzoub R N, Shirazi R S, *et al.* Endosomal escape and transfection efficiency of PEGylated cationic liposome-DNA complexes prepared with an acid-labile PEG-lipid. *Biomaterials*, 2012, **33**(19): 4928–4935
- [23] Hatakeyama H, Akita H, Ito E, *et al.* Systemic delivery of siRNA to tumors using a lipid nanoparticle containing a tumor-specific cleavable PEG lipid. *Biomaterials*, 2011, **32**(18): 4306–4316
- [24] Semple S C, Akinc A, Chen J X, *et al.* Rational design of cationic lipids for siRNA delivery, Lipid-like materials for low-dose *in vivo* gene silencing. *Nature Biotechnol*, 2010, **28**(2): 172–176
- [25] Jayaraman M, Ansell S M, Mui B L, *et al.* Maximizing the potency of siRNA lipid nanoparticles for hepatic gene silencing *in vivo*. *Angew Chem Int Edit*, 2012, **51**(34): 8529–8533
- [26] Liu Y, Huang L. Designer lipids advance systemic siRNA delivery. *Mol Ther*, 2010, **18**(4): 669–670
- [27] Alabi C, Vegas A, Anderson D. Attacking the genome: emerging siRNA nanocarriers from concept to clinic. *Curr Opin Pharmacol*, 2012, **12**(4): 427–433
- [28] Yu B, Hsu S H, Zhou C G, *et al.* Lipid nanoparticles for hepatic delivery of small interfering RNA. *Biomaterials*, 2012, **33**(25): 5924–5934
- [29] Morrissey D V, Lockridge J A, Shaw Lucinda, *et al.* Potent and persistent *in vivo* anti-HBV activity of chemically modified siRNA. *Nature Biotechnol*, 2005, **23**(8): 1002–1007
- [30] Taberero J, Shapiro G I, Lorusso P M, *et al.* First-in-Man trial of an RNA interference therapeutic targeting VEGF and KSP in cancer patients with liver involvement. *Cancer Discovery*, 2013, **3**(4): 406–417
- [31] Park T G, Jeong J H, Kim S W. Current status of polymeric gene delivery systems. *Adv Drug Delivery Rev*, 2006, **58**(4): 467–486
- [32] Clements B A, Incani V, Kucharski C, *et al.* A comparative evaluation of poly-L-lysine-palmitic acid and Lipofectamine™ 2000 for plasmid delivery to bone marrow stromal cells. *Biomaterials*, 2007, **28**(31): 4693–4704
- [33] Farrell L L, Pepin J, Kucharski C, *et al.* A comparison of the effectiveness of cationic polymers poly-L-lysine (PLL) and polyethylenimine (PEI) for non-viral delivery of plasmid DNA to bone marrow stromal cells (BMSC). *Eur J Pharm Biopharm*, 2007, **66**(3): 388–397
- [34] Choi Y H, Liu F, Kim J S, *et al.* Polyethylene glycol-grafted poly-L-lysine as polymeric gene carrier. *J Controlled Release*, 1998, **54**(1): 39–48
- [35] Nimesh S, Goyal A, Pawar V, *et al.* Polyethylenimine nanoparticles as efficient transfecting agents for mammalian cells. *J Controlled Release*, 2006, **110**(2): 457–468
- [36] Mellet C O, Fernández J M G, Benito J M. Cyclodextrin-based gene delivery systems. *Chem Soc Rev*, 2011, **40**(3): 1586–1608
- [37] Davis M E. The first targeted delivery of siRNA in humans *via* a self-assembling, cyclodextrin polymer-based nanoparticle: from concept to clinic. *Mol Pharmaceutics*, 2009, **6**(3): 659–668
- [38] Chen H P, Liu X P, Dou Y, *et al.* A pH-responsive cyclodextrin-based hybrid nanosystem as a nonviral vector for gene delivery. *Biomaterials*, 2013, **34**(16): 4159–4172
- [39] Romoren K, Thu B J, Evensen O. Immersion delivery of plasmid DNA: II. A study of the potentials of a chitosan based delivery system in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. *J Controlled Release*, 2002, **85**(1–3): 215–225
- [40] Mansouri S, Lavigne P, Corsi K, *et al.* Chitosan-DNA nanoparticles as non-viral in gene therapy: strategies to improve transfection efficiency. *Eur J Pharm Biopharm*, 2004, **57**(1): 1–8
- [41] Chen M L, Gao S, Dong M D, *et al.* Chitosan/siRNA nanoparticles encapsulated in PLGA nanofibers for siRNA delivery. *ACS Nano*, 2012, **6**(6): 4835–4844
- [42] Ercelen S, Zhang X, Duportail G, *et al.* Physicochemical properties of low molecular weight alkylated chitosans: a new class of

- potential nonviral vectors for gene delivery. *Colloid Surface B*, 2006, **51**(2): 140–148
- [43] Layek B, Singh J. Amino acid grafted chitosan for high performance gene delivery: comparison of amino acid hydrophobicity on vector and polyplex characteristics. *Biomacromolecules*, 2013, **14**(2): 485–494
- [44] Zhang X, Ercelen S, Duportail G, *et al.* Hydrophobically modified low molecular weight chitosans as efficient and nontoxic gene delivery vectors. *J Gene Med*, 2008, **10**(5): 527–539
- [45] Liu X X, Liu C, Laurini E, *et al.* Efficient delivery of sticky siRNA and potent gene silencing in a prostate cancer model using a generation 5 triethanolamine-core PAMAM dendrimer. *Mol Pharmaceutics*, 2012, **9**(3): 470–481
- [46] Zhou J H, Wu J Y, Hafdi N, *et al.* PAMAM dendrimers for efficient siRNA delivery and potent gene silencing. *Chem Commun*, 2006, **14**(22): 2362–2364
- [47] Tsai Y J, Hu C C, Chu C C, *et al.* Intrinsically fluorescent PAMAM dendrimer as gene carrier and nanoprobe for nucleic acids delivery: bioimaging and transfection study. *Biomacromolecules*, 2011, **12**(12): 4283–4290
- [48] 黄苏萍, 朱军, 孙虹, 等. 无机纳米基因载体的研究进展. *材料导报*, 2010, **24**(8): 33–38  
Huang S P, Zhu J, Sun H, *et al.* *Materials Review*, 2010, **24**(8): 33–38
- [49] Lee J H, Lee K, Moon S H, *et al.* All-in-one target-cell-specific magnetic nanoparticles for simultaneous molecular imaging and siRNA delivery. *Angew Chem Int Edit*, 2009, **121**(23): 4238–4243
- [50] Roy I, Mitra S, Maitra A, *et al.* Calcium phosphate nanoparticles as novel non-viral vectors for targeted gene delivery. *Int J Phar*, 2003, **250**(1): 25–33
- [51] Li J M, Wang Y Y, Zhao M X, *et al.* Multifunctional QD-based co-delivery of siRNA and doxorubicin to HeLa cells for reversal of multidrug resistance and real-time tracking. *Biomaterials*, 2012, **33**(9): 2780–2790
- [52] Guo S T, Huang Y Y, Jiang Q, *et al.* Enhanced gene delivery and siRNA silencing by gold nanoparticles coated with charge-reversal polyelectrolyte. *ACS Nano*, 2010, **4**(9): 5505–5511
- [53] Kaji E H, Leiden J M. Gene and stem cell therapies. *J Am Med Assoc*, 2001, **285**(5): 545–550
- [54] Moutsatsos I K, Turgeman G, Zhou S, *et al.* Exogenously regulated stem cell-mediated gene therapy for bone regeneration. *Mol Ther*, 2001, **3**(4): 449–461
- [55] Turgeman G, Pittman D D, Müller R, *et al.* Engineered human mesenchymal stem cells: a novel platform for skeletal cell mediated gene therapy. *J Gene Med*, 2001, **3**(3): 240–251
- [56] Cartier N, Hacein-Bey-Abina S, Bartholomae C C, *et al.* Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. *Science*, 2009, **326**(5954): 818–823

## The Advance of Gene Delivery Vectors\*

LI Yan<sup>1,2)</sup>, YANG Jun<sup>1)</sup>, LIU Gui-Ying<sup>3)\*\*</sup>, ZHANG Xin<sup>1)\*\*</sup>

<sup>1)</sup>National Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

<sup>2)</sup>University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

<sup>3)</sup>Department of Pediatrics, Capital Medical University Affiliated Beijing Anzhen Hospital, Beijing 100029, China)

**Abstract** Gene therapy has rapidly emerged as a promising method for the treatment of numerous diseases. However, the intrinsic deficiencies of gene-based drugs, such as enzymatic degradation in the body, poor membrane penetrability and lack of target ability, have limited the development of its therapeutic application. Herein, it is important for efficient gene therapy to develop efficient and safe gene vectors that can deliver the gene-based drugs to targeted cells. This paper reviews the current development in gene delivery vectors, especially summarizes the characteristic and development of viral vectors, non-viral vectors and nanoparticles with tracing ability.

**Key words** gene therapy, viral vectors, liposomes, polymers, dendrimers

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2013.00312

\* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (51103159, 51203162) and Hi-Tech Research and Development Program of China (2012AA022703, 2012AA020804).

\*\*Corresponding author.

ZHANG Xin. Tel/Fax: 86-10-82544853, E-mail: xzhang@home.ipe.ac.cn

LIU Gui-Ying. Tel: 86-10-84005105, E-mail: liugyying@126.com

Received: July 4, 2013 Accepted: July 10, 2013