

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.01.046

基因治疗的输送屏障及输送载体的研究*

吕楠 马柳青 陈顺 兰维华 黄袭雯 袁伟恩[△]

(上海交通大学药学院 上海 200240)

摘要:基因治疗是将可具有治疗性的基因导入病变细胞以达到治疗遗传性疾病或获得性功能缺损疾病的治疗手段,是一种极具潜力的新型治疗方法。然而基因治疗面临着一系列临床应用障碍,其中缺乏理想的基因输送载体是首要问题。绝大多数基因治疗方案受困缺乏安全有效的基因输送手段,载体要到达目的地发挥作用,需要克服一系列复杂的体内生物屏障,包括细胞外屏障和细胞内屏障。目前基因输送载体主要分为病毒载体和非病毒载体,其中病毒载体天然进化至可进入宿主细胞,具有输送效率高,靶向性好的特点,但存在长期安全性的缺点。非病毒载体主要包括阳离子脂质体和阳离子聚合物,由于易于制备和无免疫原性、安全性好,被认为是更有潜力的输送载体,是目前研究的重点。本文结合基因治疗输送屏障的理论基础及临床研究,对基因输送载体系统的现状进行了综述。

关键词:基因治疗;输送屏障;非病毒载体

中图分类号:R45 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)01-177-03

Study on Gene Delivery Barriers and Vectors for Therapy*

LV Nan, MA Liu-qing, CHEN Shun, LAN Wei-hua, HUANG Xi-wen, YUAN Wei-en[△]

(Shanghai Jiao Tong University School of Pharmacy, Shanghai, 200240, China)

ABSTRACT: Gene therapy, i.e., the expression in cells of genetic material with therapeutic activity, holds great promise for the treatment of a wide range of both inherited and acquired diseases. The lack of delivery system becomes the only key obstacle for bringing DNA/siRNA to clinical therapy. Majority of clinical projects suffer from lacking of safe and vectors, in order to target and play its role, carries need to overcome a series of complex bio-barriers in the body, including extracellular barriers and cellular barriers. Between the two major systems for gene delivery, viral vectors take advantage of the facile integration of the gene of interest into the host and high probability of its long-term expression but are plagued by safety concerns. Non-viral vectors, including cationic liposome and cationic polymer, have been proposed as a more promising alternatives to viral vectors because they avoid the inherent immunogenicity and production problems that are seen when viral systems are used. This paper summarizes basic principles and clinical researches in gene therapy, giving an overview of gene therapy vector systems.

Key words: Gene delivery; Delivery barriers; Non-viral vectors

Chinese Library Classification(CLC): R45 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)01-177-03

前言

随着分子生物学技术和人们对人类基因组研究的迅速发展,基因本质的新认识给治疗人类重大疾病带来了转机,DNA/siRNA有巨大潜力成为革命性的新药。基因治疗(Gene Therapy)是将可具有治疗性的目的基因导入患者体内并使其有效表达从而达到治疗遗传性疾病或获得性功能缺损疾病的治疗手段。不同于大多数传统治疗的仅仅只针对症状,基因治疗的目的在于一方面可以通过阻碍甚至消除病变细胞的突变基因,从而实现纠正遗传缺陷治疗,达到治疗白化病、结肠息肉、肌肉萎缩症等先天遗传病的目的;或者可以直接输送遗传物质至人体靶细胞,通过改变现有基因表达、调控天然蛋白表达,成为治疗心血管、神经系统疾病和肿瘤等后天疾病的新型分子治疗手段。基因治疗作为一个新的广阔治疗平台,适用于大多数疾病,有重要优势。

1 基因治疗的临床研究

涉及基因治疗的体外研究实验始于1989年,Rosenberg^[1]等第一次使用逆转录病毒介导的新霉素抗性基因编码的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)前输注到黑色素瘤患者,人们把基因治疗发展的二十多年分为两个时期,第一个十年里,科学家们主要作体外试验探索这种新的治疗方式的安全性,90年代后期发展迅速,全世界的科学家们报告了无数小型、大型人类疾病的动物模型的成功治疗案例^[2]。后期主要期望能够获得基因治疗的临床实验成功。治疗重症联合免疫缺陷病(SCID)是迄今为止最成功的临床试验案例之一,明确建立了证明基因治疗的确可以助于治疗疾病的证据。目前为止在临床治疗上,取得了最大成就的当属单基因遗传病基因的治疗。

2 基因输送的屏障

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81001416)

作者简介:吕楠(1988-),女,硕士研究生,主要研究方向:聚阳离子核酸载体

[△]通讯作者:袁伟恩,电话:+86(21) 3420-5072, E-mail: yuanweien@126.com

(收稿日期:2013-03-10 接受日期:2013-04-09)

把基因从试管输送到穿过靶细胞膜面临一系列障碍。包括理化性质的挑战如细胞外环境中,载体必须保护核酸,避免体内核酸酶的降解并保持稳定,以及体内屏障包括在血管中血液流动中保持稳定、穿透血管壁和周围组织,并特定靶向到靶细胞上等。

2.1 细胞外输送屏障

2.1.1 核酸凝聚 通过聚阳离子核酸载体通过本身结构携带的正电荷与核酸物质磷酸骨架上的负电荷之间的静电结合力,聚阳离子可以包裹、压缩核酸物质形成紧实的纳米颗粒,通常是环形或球形的结构。不受保护的质粒 DNA 等核酸物质会迅速被酶降解,而聚阳离子-核酸复合物结构则可以通过空间位阻阻碍核酸酶的接近,从而保护了核酸在细胞外环境的稳定性。

2.1.2 细胞靶向 基因输送的病变细胞不同,则所需基因治疗的特异性程度有很大的差别。很多膜上蛋白的受体配体的相互作用也常被作为靶集团用来增加细胞靶向,例如叶酸修饰的衍生化糖苷聚合物^[9],可以选择性靶向到对应类型细胞的受体蛋白。

2.2 细胞内输送屏障

2.2.1 细胞中传输及核内定位 阳离子载体-核酸复合物逃出内吞体进入细胞质后,携带 DNA 的载体就要穿过细胞质到达细胞核,然而,胞浆中充满了大量的阻碍聚合物移动的蛋白,微管以及其他细胞器。研究表明,复合物在胞质的移动能力依赖于复合物粒子尺寸的大小^[9],长度 3000 对以上的 DNA 基本上没有流动性。

2.2.2 内吞逃逸 内吞逃逸往往被认为是在基因传递中的最关键的步骤。聚合物进入细胞一般是通过细胞内吞机制,内吞后进入细胞形成内涵体,释放 DNA/siRNA 的生物途径是从早期内涵体开始的,在质子泵-ATP 酶的作用下,囊泡内持续积累质子产生酸化作用使 pH 降至 5-6,晚期内涵体的 pH 约为 5.0-5.5,最终晚期内涵体将与溶酶体融合(此时 pH 值约为 4-5)。融合后的酸性内涵体-溶酶体中充满了降解核酸的酶,此时存在的任何核酸被假定为被降解。只有在前期逃逸出内涵体进入细胞质的 DNA/siRNA 才可能进入细胞核。所以人们在设计核酸载体时,希望控制核酸及时从早期内涵体逃逸出,防止最终被降解。

为了克服这个障碍,研究者们曾设计出许多策略。氯喹可以在酸性囊泡内聚集从而缓冲 pH 的降低,体外转染时,同时用氯喹处理细胞,可以提高载体的输送机能^[9],虽然氯喹在体外研究中被广泛使用,但无法应用于临床试验。还有一些研究人员曾做过这样的尝试:将灭活的完整腺病毒接到聚赖氨酸上,由于病毒本身已进化到具备内吞逃逸的能力,此聚合物输送基因的效率提高了 2000 倍^[9],有些研究者利用融合膜的病毒^[7]接枝,但是这个策略由于其难以制备以及难以避免的免疫安全性问题同样不能应用与临床实验中。另外,合成的 pH 敏感的多肽也可接枝到聚合物上介导内吞逃逸的过程,原理是多肽在酸性条件下结构发生变化并破坏囊泡的膜。值得一提的是,1997 年,Behr 首次提出了质子海绵假说^[8],"质子海绵假说"化合物^[9]包括聚乙烯亚胺(PEI)和聚酰胺-胺树枝状聚合物(PAMAM)等可利用其特有的机制完成自身的内吞逃逸。

3 基因输送载体

外源基因输送系统主要分为三类:物理导入载体、重组病毒载体和合成非病毒载体,载体物理导入是指用物理方法将核酸物质直接输送至靶细胞的方法。人们曾试验并建立了许多提高注射裸 DNA 传输效率的方法,如电穿孔(Electroporation)、超声波(Ultrasound)、高压注射(High pressure injection)、基因枪(Gene gun)、粒子轰击(Particle bombardment)等^[10],但核酸物质靶向到特定组织、细胞的能力依然非常有限。病毒的主要活动是高效地携带基因从一个宿主细胞,进入新的靶细胞,并将基因物质释放至细胞核并启动其基因组表达最终实现自我复制的目的。可以利用病毒的这种天然的能力构建一种合成基因运载工具。但安全问题一直是困扰重组病毒性基因载体临床应用的主要瓶颈。病毒载体虽然显示了高的转染效率,但由于病毒的变异会引起潜在的致病危险,并且病毒表面成分会引起人体免疫反应,同时病毒的制备和纯化困难且携带基因容量小,上述这些问题都严重阻碍了重组病毒载体成为一种临床上有效的输送载体。合成非病毒载体更具有优势是因为合成载体可以提供化学结构上的灵活性、免疫的安全性且制备简单、可大规模生产。一般情况下,合成载体利用静电作用力凝聚 DNA 或 RNA,包裹形成直径约为几十到几百纳米的颗粒,从而保护核酸物质并介导其进入细胞发挥作用。目前,合成的非病毒载体主要分为两类:聚阳离子基因载体和阳离子脂质体载体,它们与核酸复合形成的复合物分别叫阳离子脂质体复合物(Lipoplex)和聚阳离子核酸复合物(Polyplex)。Felgner^[11]在 1987 年首次发现阳离子脂质体可用于基因输送,脂质体的结构不仅影响脂质体核酸复合物表面的性质,还会影响脂质体和核酸结合时的相互作用,因为其表面带有大量正电荷,从而提供了很高的携带基因进入细胞的效率^[12]。由于其相对较高的输送效率,阳离子脂质体曾一度成为研究最广泛的合成载体^[13]。但是脂质体核酸载体有一些关键的局限,包括脂质体核酸复合物载体在体内、外不可避免的毒性,制备的难度,以及其不稳定性,限制了它的临床应用。聚阳离子包括天然现存的高分子化合物以及专门为基因输送设计合成的高分子,是一类非常有前景的非病毒基因载体,与脂质体相比有更大的可行性进行结构和修饰,同时易于用配体修饰结构改善靶向性,使得聚阳离子有潜力克服细胞内、外的一系列屏障^[15]。

4 结论和讨论

核酸输送是一个具有多步过程的复杂机制,在这过程中的任何一个过程出现不足则会导致载体效率的剧减^[14]。在过去的二十年内,基因输送系统的研究已经取得了很大进展。病毒在长期自然进化过程已经能够具备克服每个障碍的职能,但其潜在的致病危险,且病毒表面成分会引起人体免疫反应限制了其基因输送的临床应用。物理方法直接导入核酸方法虽然简单可行,但输送效率低而且缺乏对特定疾病的有效策略。

合成非病毒载体系统由于其化学结构的灵活性,输送的安全性以及易于制备的特点,合理化构建的基因载体有可能实现核酸输送必须的所有功能。聚阳离子基因输送系统期望的特性应包括生物兼容性(低毒型、非免疫原型和体内稳定性)、有效的

基因释放、能规模化生产和储存稳定。目前尚不能达到这些目标,需要进一步研究开发。随着各项研究的不断深入,相信非病毒基因治疗所遇到各种问题将会得到解决,使基因治疗成为临床治疗的新手段。

参考文献(References)

- [1] Rosenberg SA, Aebersold P, Cornetta K, et al. Gene transfer into humans-immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction[J]. New England Journal of Medicine, 1990, 323: 570-578
- [2] Edelstein ML, Abedi MR, Wixon J. Gene therapy clinical trials worldwide to 2007-an update[J]. The journal of gene medicine, 2007, 9: 833-842
- [3] Erbacher P, Roche AC, Monsigny M, et al. Glycosylated polylysine/DNA complexes: gene transfer efficiency in relation with the size and the sugar substitution level of glycosylated polylysines and with the plasmid size[J]. Bioconjugate chemistry, 1995, 6: 401-410
- [4] Luby-Phelps K, Castle PE, Taylor DL, et al. Hindered diffusion of inert tracer particles in the cytoplasm of mouse 3T3 cells [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1987, 84: 4910-4913
- [5] Erbacher P, Roche AC, Monsigny M, et al. Putative role of chloroquine in gene transfer into a human hepatoma cell line by DNA/ lactosylated polylysine complexes[J]. Experimental cell research, 1996, 225: 186-194
- [6] Curiel DT, Agarwal S, Wagner E, et al. Adenovirus enhancement of transferrin-polylysine-mediated gene delivery[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1991, 88: 8850-8854
- [7] Plank C, Oberhauser B, Mechtler K, et al. The influence of endosome-disruptive peptides on gene transfer using synthetic virus-like gene transfer systems[J]. Journal of Biological Chemistry, 1994, 269: 12918-12924
- [8] Behr JP. The proton sponge: a trick to enter cells the viruses did not exploit[J]. CHIMIA International Journal for Chemistry, 1997, 51: 1-2
- [9] Haensler J, Szoka Jr FC. Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture [J]. Bioconjugate chemistry, 1993, 4: 372-379
- [10] Niidome T, Huang L. Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors[J]. Gene therapy, 2002, 9: 1647-1652
- [11] Felgner PL, Gadek TR, Holm M, et al. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1987, 84: 7413-7417
- [12] Koltover I, Salditt T, R dler JO, et al. An inverted hexagonal phase of cationic liposome-DNA complexes related to DNA release and delivery[J]. Science, 1998, 281:78-81
- [13] Zabner J. Cationic lipids used in gene transfer [J]. Advanced drug delivery reviews, 1997, 27: 17-28
- [14] Nguyen J, Szoka FC. Nucleic Acid Delivery: The Missing Pieces of the Puzzle[J]. Accounts of Chemical Research, 2012, 45: 1153-1162
- [15] 徐松琳,金拓. 新型聚乙烯亚胺衍生物体内转染活性的研究 [J]. 现代生物医学进展, 2008, 8(12): 2242-2243
- Xu Song-lin, Jin Tuo. Transfection activity of a novel polyethyleneimine derivative in vivo[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2008, 8(12): 2242-2243
-
- (上接第 171 页)
- [19] Cano O, Hutchinson M, Lin D, et al. Electroanatomic substrate and ablation outcome for suspected epicardial ventricular tachycardia in left ventricular nonischemic cardiomyopathy [J]. J Am Coll Cardiol, 2009, 54(9): 799-808
- [20] MBCHB DB, deKemp RA, Ruddy TD, et al. Effect of lateral wall scar on reverse remodeling with cardiac resynchronization therapy[J]. Heart Rhythm, 2009, 6: 1721-1726
- [21] Tung R, Mathuria N, Michowitz Y, et al. Functional pace-mapping responses for identification of targets for catheter ablation of scar-mediated ventricular tachycardia[J]. Circ Arrhythm Electrophysiol, 2012, 5(2): 264-272
- [22] Ciaccio EJ. Characteristics of critical isthmus sites during reentrant ventricular tachycardia[J]. Heart Rhythm, 2011, 8(12): 1950-1951
- [23] Carbucicchio C, Santamaria M, Trevisi N, et al. Catheter ablation for the treatment of electrical storm in patients with implantable cardioverter-defibrillators: short-and long-term outcomes in a prospective single-center study[J]. Circulation, 2008, 117(4): 462-469
- [24] Tschabrunn CM, Haqqani HM, Zado ES, et al. Repeat Percutaneous Epicardial Mapping and Ablation of Ventricular Tachycardia: Safety and Outcome[J]. J Cardiovasc Electrophysiol, 2012, 23(7): 744-749
- [25] Credner SC, Klingenhoben T, Mauss O, et al. Electrical storm in patients with transvenous implantable cardioverter-defibrillators. Incidence, management and prognostic implications [J]. J Am Coll Cardiol, 1998, 32: 1909
- [26] Van deursen C, Van geldorp IE, Rademakers LM, et al. Left ventricular endocardial pacing improves resynchronization therapy in canine left bundle-branch hearts [J]. Circ Arrhythm Electrophysiol, 2009, 2(5): 580-587
- [27] Cesario DA, Saxon LA, Cao MK, et al. Ventricular tachycardia in the era of ventricular assist devices[J]. J Cardiovasc Electrophysiol, 2011, 22(3): 359-363