

# 阳离子脂质体与基因治疗

张园,展佳悒,孟柯,孙勇,邢影

**摘要** 阳离子脂质体作为一种非病毒载体,以其制备简单、低毒性、低免疫原性、可生物降解等优点,成为近年来基因治疗中的常用载体,具有良好的应用前景。本文从阳离子脂质体的结构、转移机制着手,对其在基因治疗方面的应用以及尚存在的问题作一综述。

**关键词** 阳离子脂质体;非病毒载体;基因治疗;机制

**中图分类号** R741;R741.05 **文献标识码** A **DOI** 10.16780/j.cnki.sjssgncj.2018.09.009

张园,展佳悒,孟柯,等.阳离子脂质体与基因治疗[J].神经损伤与功能重建,2019,14(1):33-35.

基因治疗(gene therapy)是指将外源正常基因序列导入靶细胞,取代患者体内的缺陷DNA序列,纠正或补偿因基因缺陷和异常引起的疾病,从而达到治疗目的。在基因治疗的过程中,最关键的步骤是构建基因载体,通过基因载体将外源目的DNA序列递送到靶细胞,从而进行有效的转染与表达<sup>[1]</sup>。迄今所应用的转导目的基因的方法可分为两大类:病毒载体和非病毒载体。病毒载体作为高效的基因递送系统,具有转染及表达效率高等优点,是体内高效表达外源基因最有效的工具之一。但由于其具有免疫原性高、容量小、制备困难、损伤靶器官、生产成本高等缺陷,限制了其在基因治疗中的应用。与病毒载体相比,非病毒载体以其制备简单、低毒性、低免疫原性、可生物降解等优点,成为近年来基因转运中的常用载体<sup>[2]</sup>。阳离子脂质体作为非病毒载体中研究最多的一种载体,在基因治疗中有着广阔的前景,本文就阳离子脂质体在基因治疗方面的作用进行综述。

## 1 脂质体及阳离子脂质体结构特点

脂质体(liposomes)由具有类似生物膜的磷脂结构及其他脂类组成,在水中,这种结构分散形成多层微囊,每个微囊就是脂质体。按所包含脂质双分子层的层数不同,分为单室脂质体和多室脂质体,小单室脂质体(small unicompartiment liposomes)粒径约0.02~0.08 μm;大单室脂质体(large unicompartiment liposomes)为单层大囊泡,粒径为0.1~1 μm,多层双分子层的泡囊称为多室脂质体(multi-chamber liposomes),粒径为1~5 μm。按结构分:单室脂质体、多室脂质体、多囊脂质体;按电荷分:中性脂质体、负电荷脂质体、正电荷脂质体;按性能分:一般脂质体、特殊功效脂质体、热敏脂质体、pH敏感脂质体、光敏脂质体和磁性脂质体等<sup>[3]</sup>。阳离子脂质体(cationic liposome)由一个正电荷的两性化合物(即阳离子脂质)及一个中性脂质形成。阳离子脂质也称为细胞转染素,作为阳离子脂质体进行细胞转染的核心部位,其基本结

构是一个带正电的基因连接在一个疏水基上,因其携带的正电荷可与目的基因上的负电荷相互作用而结合,从而形成稳定的复合物,增加在机体内的循环时间<sup>[4]</sup>。最常见的阳离子基因是铵、咪唑、赖氨酸和胺/多胺<sup>[5-8]</sup>;疏水基团则主要有:脂肪酰链和胆固醇环;常用的辅助脂质则有:二油磷酰乙醇胺(Two oil phosphoryl ethanolamine, DOPE)、磷脂酰胆碱(Phosphatidylcholine)、十八烷氨(Octadecane ammonia)等<sup>[9]</sup>。1987年Felgner等首先报道荷正电脂质体,证明阳离子脂质体可与质粒相结合,促进体外细胞基因序列的高效转染,这一发现对于类脂/脂质体介导的基因传递研究具有决定性的意义<sup>[10]</sup>。

## 2 阳离子脂质体介导的基因转移机制

作为一种基因载体,简单描述阳离子脂质体介导的基因转移过程为:携带正电荷的阳离子脂质体与携带负电荷的目的基因(DNA或RNA)序列通过静电作用相互吸引结合,形成DNA/阳离子脂质体复合物,并可通过细胞内吞作用或膜融合作用进入细胞内,脂质复合物在细胞质中或进一步进入核内释放基因,完成细胞内转录和翻译。

### 2.1 DNA/阳离子脂质体复合物的形成及构像变化

通常阳离子脂质体由带正电荷的脂类和中性辅助脂类以1:1等摩尔混合。当阳离子脂质体(包含阳离子脂质体和中性的辅助脂质)与自身带负电荷的基因靠近时,聚集的阳离子脂质可提供一种“双面粘胶带”,自发形成DNA/阳离子脂质体复合物(Lipoplexes),将阴离子DNA胶粘到阴离子细胞表面。也有研究表明,阳离子脂质体与带负电荷的DNA结合后,DNA结构上的不平衡使得DNA出现结构上的“塌陷”,裸露的表面积减少,从而能被脂质体紧紧包裹。因此,阳离子脂质体与DNA的相互作用,包括完全包裹及表面结合两种方式<sup>[11,12]</sup>。研究人员对复合物的结构进行广泛深入的研究,通过同步加速器x射线衍射,发现几个不同的纳米级结构:在阳离子膜之间夹有DNA的普遍的层状相;倒向的六角形相,DNA封装在逆脂质管中(HjC)和

**作者单位**

吉林大学中日联谊医院

长春 130033

**基金项目**

吉林省省级产业创新专项资金项目 NO.2016C050-2

**收稿日期**

2017-12-24

**通讯作者**

邢影

xingying1970@163.

com

最近发现的H<sub>3</sub>C相,即六种排列的类似的小胶束被DNA链包围着形成一个具有蜂巢对称性的连续子结构,其中倒向六角形相结构的复合体大大促进DNA的释放,并且具有较高的转染率<sup>[13]</sup>。研究表明,不仅阳离子脂质体的内部成分比例会影响Lipoplexes的结构,阳离子脂质体和DNA的摩尔比也会影响Lipoplexes的形状和大小。当正负电荷比例接近于1时,DNA/阳离子脂质体复合物结构会向倒向六角形结构变化,利于目的基因的释放,提高转染效率<sup>[14]</sup>。

## 2.2 跨膜

目前认为,DNA/阳离子脂质体复合物进入细胞的途径有2种模式:通过细胞内吞作用进入;直接与细胞质膜融合。例如真核细胞中存在多种内吞途径,较为普遍的是网格蛋白依赖性途径、小窝蛋白介导的内吞途径及巨噬细胞的吞噬作用等。丁会芹等<sup>[15]</sup>研究表明当转运平均直径小于500 nm的粒子时,内吞作用是复合物进入细胞的主要方式。通过电子和荧光显微镜观察转染细胞,可观察到脂质体复合物附着于细胞表面,同时细胞膜下方的小囊泡及细胞内也可观察到脂质体复合物的存在,证明复合物跨过细胞膜的主要途径为内吞作用。Rejman等<sup>[16]</sup>研究发现真核细胞中网格蛋白和小窝蛋白介导的内吞作用具有显著的颗粒尺寸依赖性。粒径小于200 nm的颗粒通过网格蛋白依赖途径进入细胞,随着颗粒大小的增加,逐渐转变为小窝蛋白介导途径,当颗粒大于500 nm时则通过能量依赖过程由细胞内化。另外,膜的融合过程也参与脂质体介导的基因转染。常用的两种膜蛋白为N-乙基顺丁烯二酰亚胺-敏感融合蛋白(N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein, NSF)及可溶性NSF连接蛋白(Soluble NSF ligand)。相比较于膜融合作用而言,内吞途径需要消耗能量,而当细胞处于4℃时,处于“休眠”状态的细胞主要利用膜融合作用进行跨膜转运<sup>[13,16]</sup>。

## 2.3 分离

脂质复合物进入细胞后,必须以有效的方式释放目的基因序列,才能使正确的基因序列有效表达,发挥作用。脂质体复合物进入细胞后形成早期内涵体,随后转变为晚期内涵体,在降解酶、溶酶体作用下形成内涵体-溶酶体系统,同时该过程伴随复合物pH的降低。酸化的系统引起氯离子内流,使溶酶体胀裂,复合物从内涵体-溶酶体系统中逃逸。有研究表明,DOPE可能有帮助核酸释放的作用,能明显提高转染效率,原因是在低pH值的情况下,阳离子脂质体向倒向六边形结构的转变。倒向六边形结构有利于形成稳定的脂质体结构,脂质体与溶酶体膜融合形成临时空洞释放DNA,且表面带有阴离子基团的溶酶体与阳离子脂质体相互吸引,削弱了阳离子脂质体与DNA的结合,促使DNA高效释放<sup>[16]</sup>。

## 2.4 摄取

DNA的大小是它们能否进入细胞核的重要因素,较大的DNA可能难以进入细胞核,除非它能与细胞核的主动转运系统发生相互作用,例如对神经元细胞的成功转染提示DNA可通过主动运输穿过核膜<sup>[17]</sup>。对处于有丝分裂期的细胞而言,由于核膜已经破裂,主要机制是依赖于细胞分裂时的有丝分裂被动进

入细胞核<sup>[18]</sup>。除此之外,核孔的直径、细胞周期等因素也会影响细胞核对DNA的摄取。

## 3 阳离子脂质体在基因治疗中的优势

与传统的手术、放疗、化疗等药物治疗方法相比,基因治疗作为一种具有突破性意义的靶向性生物基因治疗方法,优点在于针对性强、基本无副作用,对正常细胞无损伤,治疗过程中痛苦小,因此在免疫缺陷病、代谢性疾病、癌症、心脏病等疾病领域显示出良好前景。基因载体是基因治疗的关键技术之一,可保护基因不被内源性核酸酶降解,从而使基因治疗的体内应用成为可能<sup>[19]</sup>。目前基因治疗所使用的基因载体主要是病毒载体和非病毒载体两类。病毒载体包括腺病毒、逆转录病毒及慢病毒,非病毒载体样式多种多样,主要有阳离子长链肽、阳离子聚合物和阳离子脂质体等。病毒载体作为一种分子生物学工具,可在活体或细胞培养中将自身或外源的基因组侵染到其他宿主细胞中。病毒载体的转染效率很高,腺病毒的整合中具有9个癌相关基因或邻近区域,但同时病毒载体也存在诱导免疫反应、致癌等临床问题。例如,进入活体内的腺病毒载体的基因表达在1~7 d达到高峰,并且在2~4周内迅速降到无法监测的水平,同时在体内可监测到针对病毒蛋白的细胞免疫和体液免疫,导致基因表达时间过短<sup>[20]</sup>;逆转录病毒的主要优势在于它们可以整合到宿主基因中,但同时有插入到癌前基因或肿瘤抑制基因的位点的可能,随后诱导肿瘤发生<sup>[21]</sup>。阳离子脂质体作为非病毒载体的一种,与病毒载体相比具有以下优势:①保护治疗基因在体内循环中不被降解。1987年,Felgner等<sup>[10]</sup>发现第一个阳离子脂质氯化三甲基-2,3-二油烯氧基丙基铵(Trimethyl-2,3-dioleoyl ammonium chloride),通过对脂质体的表面基团进行特殊修饰后的阳离子脂质体能很好地包封DNA片段,促进复合物与细胞膜的融合,增加DNA的摄取和表达;②特异性靶向性地递送基因到靶组织或细胞。阳离子脂质体主要用于肿瘤方面,相比于病毒载体诱导肿瘤的发生来说,免疫增强、致癌基因沉默和自杀基因表达是阳离子脂质体用于肿瘤治疗的独特优势,其次为先天性单基因缺陷病和心血管疾病。在治疗转移性胰腺癌实验中,经过靶向优化后合成的紫衫醇阳离子脂质体Endo-Tag-1已进入II期临床实验<sup>[22]</sup>;张俊峰等<sup>[23]</sup>研究发现在利用生长因子和抗凋亡基因治疗缺血性卒中时,将缺氧反应元件通过基因载体转染入细胞后,可从转录、转录后及翻译后等不同分子水平特异性表达外源基因,避免治疗基因非特异性表达导致肿瘤事件发生,也为缺血性脑卒中的治疗提供新策略。③高效穿过细胞膜和核膜,转染细胞,使其表达/沉默基因<sup>[24]</sup>。研究人员在考察阳离子脂质体对神经元SH-SY5Y细胞的转染率和毒性时发现,双十六烷基-N-精氨酸-L-谷氨酸(Dodecyl-N-arginine-L-glutamic acid)(含有氨基酸的脂质材料)具有更高的转染率且毒性更低,并且在胎牛血清(Fetal bovine serum)存在时仍具有良好的血清相容性,因此可以大量使用以提高外源基因的表达。另外,在眼、口腔、鼻腔和经皮给药途径中,阳离子脂质体也有了成功尝试。

## 4 展望

阳离子脂质体作为一种新型的药物载体,具有靶向、长效、低毒、保护药物等优点,它的出现给诸多研究领域带来了新曙光。随着靶向脂质体等新型脂质的研发成功,将药物或遗传物质直接递送至患病组织或机体,使得治疗更具有特异性、高效性。但是如何更高效地传递遗传物质或药物仍然是一个巨大的挑战。为了解决上述问题,近年来新开发的阴-阳离子脂质体在阳离子脂质体表面中和了一部分正电荷,减弱了阳离子脂质体的细胞毒性,一定程度上增加了复合物在体内的循环时间,但阴离子脂质体本身也存在一定的细胞毒性,这一问题无法避免。因此,通过添加各种辅助性成分、研制并使用新型脂质材料、对阳离子脂质体表面进行结构修饰、发明并使用新制备工艺等措施来提高阳离子脂质体的稳定性、靶向性和转染效率以及从分子生物学角度阐明阳离子脂质体介导的基因转染过程的详细机制将会是未来的重点研究方向。

## 参考文献

- [1] 侯婷婷, 陈红, 张希. 基因治疗的临床研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘, 2017, 32: 33-34.
- [2] Rliey MK, Vermerris W. Recent Advances in Nanomaterials for Gene Delivery—A Review [J]. *Nanomaterials*, 2017, 7: 94-112.
- [3] 焦姣, 蒋官平, 邓意辉. 脂质体药物传递系统的50年发展历程概述[J]. *沈阳药科大学学报*, 2014, 9: 738-754.
- [4] Madni A, Sarfraz M, Rehman M, et al. Liposomal drug delivery: a versatile platform for challenging clinical applications [J]. *J Pharm Pharm Sci*, 2014, 17: 401-426.
- [5] Muñozbuda M, Misra SK, Barránberdón AL, et al. How does the spacer length of cationic gemini lipids influence the lipoplex formation with plasmid DNA? Physicochemical and biochemical characterizations and their relevance in gene therapy [J]. *Biomacromolecules*, 2012, 13: 3926-3937.
- [6] Misra SK, Muñozbuda M, Datta S, et al. Effects of a delocalizable cation on the headgroup of gemini lipids on the lipoplex-type nanoaggregates directly formed from plasmid DNA [J]. *Biomacromolecules*, 2013, 14: 3951-3963.
- [7] Zylberberg C, Gaskill K, Pasley S, et al. Engineering liposomal nanoparticles for targeted gene therapy [J]. *Gene Ther*, 2017, 24: 441-452.
- [8] Shirazi RS, Kai KE, Leal C, et al. Synthesis and characterization of degradable multivalent cationic lipids with disulfide-bond spacers for gene delivery [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1808: 2156-2166.
- [9] Junquera E, Aicart E. Cationic lipids as transfecting agents of DNA in gene therapy [J]. *Curr Top Med Chem*, 2014, 14: 649-663.
- [10] Felgner PL, Gadek TR, Holm M, et al. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987, 84: 7413-7417.
- [11] Wasungu L, Hoekstra D. Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes [J]. *J ControlRelease*, 2006, 116: 255-264.
- [12] Ruponen M, Honkakoski P, Rönkkö S, et al. Extracellular and intracellular barriers in non-viral gene delivery [J]. *J Control Release*, 2003, 93: 213-217.
- [13] Minchin RF, Yang S. Endosomal disruptors in non-viral gene delivery [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2010, 7: 331-339.
- [14] Yang Y, Zhang Z, Chen L, et al. Effect of multifold charge groups and imidazole-4-carboxaldehyde on physicochemical characteristics and transfection of cationic polyphosphazenes/DNA complexes [J]. *Int J Pharm*, 2010, 390: 191-197.
- [15] 丁会芹, 崔韶辉, 王冰, 等. 阳离子脂质体运载基因的跨膜机制[J]. *生命科学*, 2011, 23: 497-502.
- [16] Rejman J, Oberle V, Zuhorn IS, et al. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis [J]. *Biochem J*, 2004, 377: 159-169.
- [17] 黄柯鑫. 阳离子脂质体转染效率影响因素的研究进展[J]. *医学理论与实践*, 2012, 25: 1704-1705.
- [18] Araujo NM, Vianna CO, Moraes MT, et al. Expression of Hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) from genotypes A, D and F and influence of amino acid variations related or not to genotypes on HBsAg detection [J]. *Braz J Infect Dis*, 2009, 13: 266-271.
- [19] 关迪. 阳离子脂质体的细胞毒性作用研究[D]. 大连工业大学, 2014.
- [20] Kamimura K, Suda T, Zhang G, et al. Advances in Gene Delivery Systems [J]. *Pharma Med*, 2011, 25: 293-306.
- [21] Vargas JE, Chicaybam L, Stein RT, et al. Retroviral vectors and transposons for stable gene therapy: advances, current challenges and perspectives [J]. *J Transl Med*, 2016, 14: 288-302.
- [22] Fasol U, Frost A, Büchert M, et al. Vascular and pharmacokinetic effects of EndoTAG-1 in patients with advanced cancer and liver metastasis [J]. *Ann Oncol*, 2012, 23: 1030-1036.
- [23] 张军峰, 徐曦. 缺氧特异性调控基因表达在缺血性卒中治疗中的研究进展[J]. *神经损伤与功能重建*, 2015, 10: 435-437.
- [24] Pensado A, Seijo B, Sanchez A. Current strategies for DNA therapy based on lipid nanocarriers[J]. *Expert OpinDrug Deliv*, 2014, 11: 1721-1731.

(本文编辑:王晶)



新年快乐!