

新型非病毒载体聚乙烯亚胺体内应用的研究进展

李经忠¹, 王青青综述 曹雪涛审校
(浙江大学免疫学研究所, 浙江 杭州 310031)

摘要: 聚乙烯亚胺是 1995 年发现的重要的真核细胞基因转染载体, 在非病毒载体的研究中处于重要的地位。聚乙烯亚胺体外研究已取得显著的进展, 但在体内基因治疗的应用面临着一系列局限。本文综述了非病毒载体聚丙烯亚胺体内应用的障碍和克服办法, 包括聚乙烯亚胺-DNA 复合物的脂质体包裹或聚乙二醇化修饰等。

关键词: 基因治疗; 非病毒载体; 聚乙烯亚胺

中图分类号: R34; R730.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0971(2004)01-0034-04

基因治疗的关键之一是转基因载体, 转基因载体主要分为病毒载体系统和非病毒载体系统。病毒载体系统转染效率高, 是体内基因治疗的主要工具, 但安全性存在隐患且有免疫原性, 体内不能反复应用。非病毒载体是病毒载体的重要补充途径, 一般认为较安全, 免疫原性低, 而且是基于质粒的转染, 易于组装。非病毒载体已是体外基因转染的主要手段, 但转染效率低, 体内应用还存在许多障碍, 如何克服体内应用的障碍是目前研究的热点。

非病毒载体利用多价阳离子聚合物或脂质体来包裹质粒 DNA 或反义寡核苷酸形成复合物, 通过表面多余的阳离子电荷与细胞表面的阴离子粘蛋白(如硫酸乙酰肝素粘多糖蛋白)结合, 然后被动吞噬到细胞内, 转入细胞核表达。体内应用的非病毒载体一般用阳离子多聚物作为 DNA 结合的骨架, 偶联靶向配体, 与细胞受体结合, 转染细胞。1987 年, 多聚赖氨酸 (polylysine, PLL) 是最早报道的非病毒载体阳离子多聚物, 其包裹质粒 DNA 转染真核细胞并表达。其后, 精胺 (spermine)、多聚精氨酸、鱼精蛋白 (protamine)、聚乙烯亚胺 (polyethylenimine, PEI)、聚丙烯亚胺树状物 (polypropylenimine dendrimers)、多聚胺树状物 (polyamidoamine dendrimers)、组氨酸赖氨酸分枝状聚合肽和壳聚糖 (chitosan) 等相继问世。1995 年, Boussif 等^[1] 首先报道了 PEI 可作为非病毒载体, 其后, PEI 成为非病毒载体研究最快的领域。PEI 单体 (-CH-CH₂-NH₂-) 中每三个原子含一个氨基, 富含阳离子, 有较强的结合 DNA 和粘附细胞的能力。

1 机体水平的应用障碍

尽管体外试验用 PEI/DNA 转染真核细胞取得了长足的进展, 但最终目的是体内基因治疗应用。与体外细胞转染相比, 体内应用面临着一系列问题, 例如, 解剖大小的限制、与体液和细胞外基质 (ECM, 如透明质酸和硫酸肝素) 的相互作用及结合到非靶细胞上。PEI/DNA 复合物静脉注射后很快聚集在肺毛细血管床, 大部分被肺、肾、肝和脾截留。PEI/DNA 复合物静脉应用后, 在血流中可产生成簇的多聚物, 血浆中大部分 PEI/DNA 复合物快速由肺内皮细胞、肝窦中 Kupffer 细胞及脾中的巨噬细胞清除。

1.1 PEI 的细胞毒性

PEI 的细胞毒性与 PEI 的浓度有关。作者体外细胞实验发现, 细胞毒性也与 PEI 的浓度有关, 当 PEI 浓度 $\geq 6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 培养液即可明显引起细胞死亡。而 PEI 有效的转染需要 N/P 比 [PEI 的氨基氮与 DNA 的磷酸根的比例, $N/P = 7.53 \times b/c$, 其中 b 为 PEI 的质量 (μg), c 为质粒 DNA 的质量 (μg)] 为 5~10。这就制约了质粒的最大用量。

PEI 的细胞毒性是由于其对细胞膜有较高的亲合粘附所致, PEI 在细胞膜上可形成 2~6 μm 的团状物, 低分子量的 PEI 形成仅 10~50 nm 的小聚集物; 在光学显微镜下 ($> 100 \times$), 当 PEI 浓度 $> 6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 并作用 4 h 以上, 明显可见细胞表面粘附许多大小相似的颗粒。PEI 也就是通过这种作用将 DNA 送入到细胞内。利用脂质体或其他方法把 PEI/DNA 复合物屏蔽起来, 可降低 PEI 的细胞膜毒性。

1.2 PEI 的非特异性粘附作用

体外转染实验时, PEI/DNA 复合物依赖于其表面的阳性电荷, 非特异地结合到细胞表面富含阴离

收稿日期: 2003-06-02

基金项目: 国家高新技术研究发展计划 (863) 资助项目 (2001AA217071)

子的硫酸粘多糖等大分子上,被细胞内吞。但体内应用时,这妨碍了靶向细胞转移。

ECM特别血管组织包含高浓度富含阴离子的粘多糖(glycosaminoglycans),后者涉及到调节细胞运动、细胞增殖和调节酶活性。ECM能结合富含阳离子的分子如PLL和PEI。当阳离子多聚物血管内注射时,将结合并阻留在血管内皮细胞和ECM上。研究发现,小鼠颈动脉壁可结合84 ku的PLL和多聚胺树状物浓度达 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,经过4 h的动脉灌注而不能明显洗脱^[2]。

阳离子多聚物-DNA复合物表面多余的阳性电荷尚可活化补体系统。PEI/DNA复合物活化补体的能力与PEI/DNA的N/P值有关。体外试验发现,偶联转铁蛋白的PEI(transferrin-polyethylenimine, Tf-PEI)/DNA复合物与血浆孵育后,阳性电荷的Tf-PEI/DNA复合物发生相互聚集,并发现血浆蛋白如免疫球蛋白M(IgM)、纤维蛋白原、纤连蛋白(fibronectin)和补体C3等可结合到Tf-PEI/DNA复合物上;Tf-PEI/DNA复合物可诱导红细胞聚集;静脉注射Tf-PEI/DNA复合物尽管发现在肺部有目的基因表达,但部分小鼠引起严重的毒性反应。Kircheis等^[3]的实验表明,PEI/DNA复合物的体内毒性由其表面的阳性 ζ -电位引起。利用脂质体或其他方法把PEI/DNA复合物屏蔽起来,可以避免体内应用时PEI/DNA复合物与细胞、ECM的非特异性粘附作用。

非病毒载体-DNA复合物另外有一定颗粒大小的限制。线型25 ku的PEI与DNA在5%葡萄糖溶液中形成的颗粒,在体内发现有相对较高的转染效率。有人认为,颗粒直径小于100 nm是体内全身应用的一个前提,这样可以通过毛细血管壁弥散进入组织。据报道,线性PEI(22 ku)(商品名Exgen 500)体内应用效果优于25 ku的分支状的PEI^[4]。线性PEI/DNA复合物在低离子强度(5%葡萄糖)溶液中形成小于100 nm的颗粒,可弥散通过组织,脑室内注射后在脑中可有高水平表达。经鼠尾静脉注射,发现线性PEI携带的质粒主要在肺部表达,而其他脂质体或阳离子载体相对表达效率较低^[5]。

2 克服途径和发展方向

2.1 偶联靶向配体

体外实验表明,PEI偶联靶向配体后,可增加转染效率,降低与非靶细胞的作用。曾报道的偶联PEI的配体有许多,如半乳糖、甘露糖、叶酸、上皮细

胞生长因子(epithelial growth factor, EGF)、转铁蛋白、含RGD氨基酸序列的短肽CYGGRGUTP(靶向整合素受体)及CD3单抗等。另外,在表达质粒中,加入组织特异启动子也增加组织特异性表达和瘤体内表达。

2.2 屏蔽转染颗粒复合物表面电荷

屏蔽颗粒复合物表面可避免转染颗粒与血浆补体、白蛋白等富含阴离子的大分子相互作用,避免与非靶细胞的相互作用,并避免颗粒之间的相互聚集。屏蔽PEI/DNA颗粒复合物表面电荷目前常用的方式主要是:将PEI/DNA复合物用脂质体包裹和聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)修饰两种。

2.2.1 脂质体包裹的PEI/DNA复合物

研究发现,在脂质体和DNA的复合物中加入少量PLL或鱼精蛋白复合物等可形成类似病毒样的颗粒,减少复合物间的凝聚,增加对DNA的结合力,提高脂质体在体外的转染效率。应用PEI浓缩DNA,然后用偶联靶向配体的阴离子脂质体或中性脂质体包裹浓缩的颗粒,进行体内应用,可以避免PEI/DNA复合物与血浆蛋白、血管内皮细胞和ECM的非特异性粘附。已应用包裹PEI/DNA复合物的脂质体有阴离子脂质体、中性脂质体、pH敏感的脂质体、卵磷脂胆碱和二棕榈酰磷脂胆碱等^[6-9]。已知阳离子脂质体体内应用时可与血浆蛋白发生非特异性粘附作用及相互聚集,因此,不主张应用阳离子脂质体包裹PEI/DNA复合物。

偶联配体的脂质体应用实验有很多,如叶酸导向的pH敏感的脂质体,可用于叶酸受体表达增加的肿瘤细胞系^[10]。抗转铁蛋白受体单抗偶联的中性脂质体包裹的质粒,体内应用可广泛转染外周组织和脑^[11]。Zhang等^[12]设计了胰岛素受体抗体偶联的脂质体包裹EGF受体基因的反义表达质粒,用于治疗神经角质瘤细胞,靶向性地抑制了瘤细胞的生长等。

制备拟病毒颗粒技术的关键是将脂质体与配体寡肽偶联。脂质体或细胞膜与生物大分子的交联技术已有进展。在脂质体中添加一种磷脂衍生物,一端锚定在脂质单层中,另一端含有活性基团可结合配体寡肽或生物分子。Probe公司提供的包含马来酰亚胺的磷脂:*N*-[(4-马来酰亚胺基甲基)环己烷基-1-羰基]-1,2-双棕榈酰-甘油酰-3-磷脂酰乙醇胺的三乙铵盐,能混合到脂质体中,马来酰亚胺基团可与自由的巯基发生迅速结合;将脂质体与巯基化的配体混合,巯基化的配体就可结合到脂质体的外膜

上。配体巯基化可应用异双功能偶联剂：琥珀酰亚胺基 3-(2-吡啶基二硫)丙酸酯处理及二硫苏糖醇还原，或者在配体寡肽的末端合成时加上半胱氨酸。利用这种方法偶联巯基化的抗体、巯基化的链霉亲和素(streptavidin)、凝集素及其他蛋白质。另外，还有生物素和生物素-X(biotin-X)的磷脂衍生物可用于制备与亲和素或链霉亲和素偶联物有较高亲和力的脂质体。靶向脂质体不但可以用于包裹 PEI/DNA 复合物，也可以肿瘤靶向释放反义寡核苷、肿瘤靶向释放化疗药物^[13]。

2.2.2 聚乙二醇修饰

阳离子聚合物-DNA 复合物的另一种修饰方式是 PEG 化处理，经 PEG 修饰后，可形成囊泡状结构，屏蔽表面多余的正电荷，有利于体内应用，且可增加阳离子多聚物-DNA 颗粒的可溶性^[14]。PEG 化的 PEI/DNA 复合物减少颗粒之间的相互聚集及降低复合物与血清蛋白(如补体)、红细胞之间的相互聚集，延长在血液中的循环时间并降低全身毒性。阳性电荷的 TI-PEI/DNA 复合物 PEG 化后，能稳定复合物、对抗盐诱导的聚集，而且可以较低的 N/P 值制备转染复合物。PEG 包被的 TI-PEI/DNA 复合物尾静脉注射荷瘤小鼠，可降低 TI-PEI/DNA 复合物的毒性，降低肺、肝、脾的截留，增加在瘤组织的表达。Kircheis 等^[15]用 PEG 修饰的 TI-PEI/DNA 作动物体内全身应用，转染肿瘤坏死因子- α (TNF- α)表达质粒，可在肿瘤组织优先表达，抑制肿瘤生长，诱导肿瘤局部出血坏死，而无明显全身毒性；但如果静脉应用未 PEG 化的 PEI/DNA 复合物，则主要在肺部表达，在远处瘤组织无表达，并伴随显著的毒性。体外试验表明，PEI/DNA 复合物 PEG 化后，屏蔽了表面电荷，必须偶联靶向配体以介导内吞，否则降低 PEI/DNA 复合物的转染效率。配体靶向的 PEI/DNA 复合物用适当数量的 PEG 修饰并不封阻配体介导的内吞，但高度的 PEG 化使包含抗体或 TI-PEI/DNA 复合物转染效率降低；但是，过量 PEG 修饰并不影响 EGF 配体介导的内吞^[16]。在动物实验中，PEG 化的 PEI/DNA 复合物虽可转染远处肿瘤组织，局部注射位点和肺部仍是主要表达之处，仅减少了 PEI/DNA 复合物的毒性反应。因此，目前 PEG 化的 PEI/DNA 复合物适于局部肿瘤组织应用。

2.2.3 增加 PEI 表面偶联配体的密度

PEI 表面偶联的配体蛋白可减少 PEI/DNA 复合物表面的正电荷。当 PEI/DNA 在 N/P > 6 时，

PEI/DNA 复合物表面静电位或 ζ -电位为 30 ~ 35 mV^[17]，表面偶联配体蛋白(如转铁蛋白)后可使其表面电位降至 20 mV。当 PEI 偶联转铁蛋白配体在适当的密度时，可使 PEI/DNA 复合物减少与血液中红细胞的非特异作用，复合物的体内毒性也下降了。

聚醚 123(Pluronic 123, P123)是具有膜活性的环氧丙烷聚合物[membrane-active PEO-*b*-poly(propylene oxide)-*b*-PEO molecules]^[18]。用 P123 修饰的 2 ku 的 PEI(P123 与 2 ku 的 PEI 按质量比 9:1 混合)与 DNA 形成小的稳定的复合物(110 nm)，体内外转染效率及体内分布优于 25 ku 的 PEI^[19]。另外，还可以将 PEI 糖基化，增加与细胞膜的相容性^[20]。

3 结语

目前，PEI 阳离子多聚物主要用于体外转染质粒或反义寡核苷酸。体内应用时，PEI 包裹的 DNA 复合物富含阳离子，容易受各种富含阴离子的生物大分子、ECM 和非靶细胞细胞膜的影响，发生非特异性粘附等。导向微囊技术屏蔽 PEI/DNA 颗粒复合物的表面电荷有利于克服这些缺点。展望今后发展的前景，PEI 用脂质体包裹、用 PEG 修饰、巯基化修饰及与不同导向配体的偶联等仍是今后研究的热点，并出现这些技术方法相互融合的趋势。

参考文献

- [1] Boussif O, Lezoualch F, Zanta MA, et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo*: polyethylenimine[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92(16):7297 - 7301.
- [2] Sakharov DV, Jie AF, Filippov DV, et al. Binding and retention of polycationic peptides and dendrimers in the vascular wall[J]. *FEBS Lett*, 2003, 537(1-3):6 - 10.
- [3] Kircheis R, Schuller S, Brunner S, et al. Polycation-based DNA complexes for tumor-targeted gene delivery *in vivo*[J]. *J Gene Med*, 1999, 1(2):111 - 120.
- [4] Coll JL, Chollet P, Brambilla E, et al. *In vivo* delivery to tumors of DNA complexed with linear polyethylenimine[J]. *Hum Gene Ther*, 1999, 10(10):1659 - 1666.
- [5] Bragonzi A, Boletta A, Biffi A, et al. Comparison between cationic polymers and lipids in mediating systemic gene delivery to the lungs[J]. *Gene Ther*, 1999, 6(12):1995 - 2004.
- [6] Guo W, Lee RJ. Efficient gene delivery using anionic liposome-complexed polyplexes (LPDI) [J]. *Biosci Rep*, 2000, 20(5):419 - 432.

- [7] Oku N, Yamazaki Y, Matsuura M, *et al.* A novel non-viral gene transfer system, polycation liposomes[J]. *Acta Drug Deliv Rev*, 2001, 52(3):209-218.
- [8] Guo W, Gosselin MA, Lee RJ. Characterization of a novel diolefin-based LPDII vector for gene delivery[J]. *J Control Release*, 2002, 83(1):121-132.
- [9] Yamazaki Y, Nango M, Matsuura M, *et al.* Polycation liposomes, a novel nonviral gene transfer system, constructed from cetylated polyethylenimine[J]. *Gene Ther*, 2000, 7(13):1148-1155.
- [10] Sudimack JJ, Guo W, Tjarks W, *et al.* A novel pH-sensitive liposome formulation containing oleyl alcohol [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1564(1):31-37.
- [11] Shi N, Boado RJ, Partridge WM. Receptor-mediated gene targeting to tissues *in vivo* following intravenous administration of pegylated immunoliposomes[J]. *Pharm Res*, 2001, 18(8):1091-1095.
- [12] Zhang Y, Jeong Lee H, Boado RJ, *et al.* Receptor-mediated delivery of an antisense gene to human brain cancer cells [J]. *J Gene Med*, 2002, 4(2):183-194.
- [13] Drummond DC, Meyer O, Hong K, *et al.* Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors [J]. *Pharmacol Rev*, 1999, 51(4):691-743.
- [14] Harada-Shiba M, Yamauchi K, Harada A, *et al.* Polyion complex micelles as vectors in gene therapy - pharmacokinetics and *in vivo* gene transfer[J]. *Gene Ther*, 2002, 9(6):407-414.
- [15] Kircheis R, Ostermann E, Wolschek MF, *et al.* Tumor-targeted gene delivery of tumor necrosis factor- α induces tumor necrosis and tumor regression without systemic toxicity [J]. *Cancer Gene Ther*, 2002, 9(8):673-680.
- [16] Ogris M, Steinlein P, Carotta S, *et al.* DNA/polyethylenimine transfection particles: influence of ligands, polymer size, and PEGylation on internalization and gene expression [J]. *AAPS Pharm Sci*, 2001, 3(3):E21.
- [17] Kircheis R, Wightman L, Schreiber A, *et al.* Polyethylenimine/DNA complexes shielded by transferrin target gene expression to tumors after systemic application [J]. *Gene Ther*, 2001, 8(1):28-40.
- [18] Lemieux P, Vinogradov SV, Gebhart CL, *et al.* Block and graft copolymers and NanoGel copolymer networks for DNA delivery into cell [J]. *J Drug Target*, 2000, 8(2):91-105.
- [19] Nguyen HK, Lemieux P, Vinogradov SV, *et al.* Evaluation of polyether-polyethylenimine graft copolymers as gene transfer agents [J]. *Gene Ther*, 2000, 7(2):126-138.
- [20] Kursu M, Walker GF, Roessler V, *et al.* Novel shielded transferrin-polyethylene glycol-polyethylenimine/DNA complexes for systemic tumor-targeted gene transfer [J]. *Bioconjug Chem*, 2003, 14(1):222-231.

噻唑烷二酮类药物治疗 2 型糖尿病的临床应用

叶中德^{1,2}编译 沈倍奋¹校

(1. 军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850; 2. 北京国家生命科学研究所, 北京 100100)

摘要: 2 型糖尿病是以胰岛素抵抗和胰腺 β 细胞渐进性功能障碍为特征的一类糖尿病。目前, 口服降血糖药物有二甲双胍和磺酰脲。近年来, 出现了一类治疗糖尿病的新药噻唑烷二酮。它可提高病人对胰岛素的敏感性和改善胰腺 β 细胞的功能。噻唑烷二酮类药物是一种人工合成的配体, 能够结合核过氧化物酶体增殖激活受体 γ (PPAR- γ), 激活基因的转录, 从而调节脂肪细胞的分化和脂肪细胞的形成, 以及葡萄糖和油脂的代谢。目前, 对噻唑烷二酮作用的确切分子机制还不太清楚。噻唑烷二酮类药物单独给药或与二甲双胍、磺酰脲及胰岛素合用治疗 2 型糖尿病, 通过快速降低餐后血糖水平, 从而改善对血糖生成的控制, 并能提高对胰岛素的敏感性。

关键词: 噻唑烷二酮; 2 型糖尿病; 胰岛素

中图分类号: R587.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0971(2004)01-0037-04

世界范围内, 2 型糖尿病是一种多发性疾病, 并且呈逐年递增的趋势。到 2025 年, 糖尿病病人可达

到 3 亿例, 而其中超过 90% 的病人为 2 型糖尿病。2 型糖尿病是以病人对胰岛素抵抗为特征的, 它能减少胰岛素在肝脏、脂肪组织和骨骼肌的活性水平及造成渐进性的 β 细胞功能缺陷。造成胰岛素抵抗及