

· 药 学 进 展 ·

## 壳聚糖及其衍生物作为基因载体的研究进展\*

杨 洪<sup>1</sup>, 魏 婉<sup>2</sup>, 田 月<sup>2</sup>, 向 明<sup>2</sup>

(1. 湖北省罗田县人民医院药剂科, 438600; 2. 华中科技大学同济医学院药学院药理室, 武汉 430030)

**[摘要]** 壳聚糖对 DNA 有很好的结合和保护作用, 对生物体无毒、相容性好, 本身具有一定的抑制微生物和抗癌作用, 可通过复凝聚法制备, 而且还很容易改性制成不同途径给药的基因治疗载体。该文介绍壳聚糖及其衍生物近年来作为基因载体的研究进展, 总结壳聚糖基因载体的制备方法、作用机制、转染效率的影响因素及改进方法和需解决的问题。壳聚糖基因载体是一种新型基因载体, 具有广阔的发展前景。

**[关键词]** 壳聚糖; 基因载体; 进展

**[中图分类号]** R944

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1004-0781(2008)10-1229-03

基因递送载体有病毒载体和非病毒载体。前者作为一种高转染效率载体已被研究多年, 但病毒载体有一些明显缺点, 如引起免疫反应, 病毒野生型突变、潜在致癌性等。为避开这些问题, 人们越来越关注非病毒载体, 其中壳聚糖基因载体是最近的研究热点之一。壳聚糖是无毒、生物相容性好的多聚阳离子, 并且有较低的免疫原性。它通过静电吸引和氢键与带负电荷的 DNA 结合, 保护 DNA 免受核酸酶的降解。它有利于在准备期内不需采用超声波生物降解和加入有机溶剂, 因此使配位过程中 DNA 可能受到的破坏最小化, 而且装载 DNA 的壳聚糖微粒在储存时较为稳定<sup>[1]</sup>。所以用壳聚糖作为非病毒基因递送载体具有应用潜力。

### 1 壳聚糖的基本特性及制备

壳聚糖(chitosan)是甲壳素的脱乙酰衍生物, 具有生物相容性良好、细胞毒性低、可生物降解、无免疫原性等优点, 本身具有一定的抑制微生物和抗癌作用, 而且还很容易改性制成不同途径给药的基因治疗载体。在酸性条件下, 壳聚糖氨基质子化的荷正电可与荷负电的 DNA 起静电作用, 形成相对致密的纳米级多聚复合物。这种纳米级多聚复合物增强了 DNA 抵抗核酸酶的能力<sup>[2]</sup>, 有利于细胞对 DNA 的摄取<sup>[3]</sup>, 还有利于在准备期内不需采用超声波生物降解和加入有机溶剂。因此使配位过程中 DNA 可能受到的破坏最小化, 而且装载 DNA 的壳聚糖微粒在储存时较为稳定。近年来人们利用这一特点采用复凝聚法制备基因壳聚糖纳米粒: 将分别装有一定体积壳聚糖溶液(450  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , pH 值 5.5)和等体积 DNA 溶液(120  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 含 10 mmol 硫酸钠)的 Ep 管置于 55  $^{\circ}\text{C}$  水浴恒温 30 min, 将两者迅速在旋涡混合器上混合 30 s, 即得基因壳聚糖纳米粒混悬液。复凝聚法制备工艺简单, 不使用有机溶剂, 制

备条件温和, 对质粒基因的结构和功能基本没有破坏作用, 为目前应用最广泛的一种方法。

### 2 壳聚糖基因载体的作用及其机制

壳聚糖作为载体的机制集中于它的助渗作用和生物黏附性。前者是由于它可以打开上皮细胞之间的紧密连接, 促进大分子物质通过上皮组织转运。ARTURSSON 等<sup>[4]</sup>用穿越上皮的电阻(TEER)来研究不同脱乙酰度和分子量的壳聚糖对于人上皮细胞(Caco-2)渗透性的影响, 发现高脱乙酰度和聚合度 > 50 的壳聚糖对连接细胞的结合点间隙有较大的影响。最近的研究显示只有质子化的可溶性壳聚糖的舒展结构才能打开紧密连接, 从而使亲水性成分转运入细胞, 而后者是因为黏膜上的黏液具阴性电荷, 而壳聚糖是一种聚阳离子, 与黏液之间存在静电相互作用, 而使壳聚糖具备生物黏附性。将疫苗与微粒系统相结合, 加强了黏膜淋巴组织的抗原摄取。因此, 诱导了对抗原的强免疫反应, 而壳聚糖的非特异性佐剂活性依赖于脱乙酰度及形成物的类型。

### 3 壳聚糖基因载体转染效率的研究及改进

**3.1 转染效率的影响因素** 荧光素酶质粒(pGL3)/壳聚糖复合物的转染效率依赖于培养基的 pH 值、pGL3/壳聚糖的化学计量、血清和壳聚糖的分子量。转染效率在 pH 值为 6.9 时比 7.6 值时高。最适合的电荷比例 pGL3/壳聚糖为 1:5。相对分子量 15 000 和 52 000 的壳聚糖聚合体很大的提高荧光素酶的活性。100 000 的壳聚糖介导的转染效率低于 15 000 和 52 000 的壳聚糖。七聚物(相对分子量 1 300)没有表现出任何基因表达。脂质体介导的基因表达被血清屏蔽了, 但是壳聚糖表现出对血清有抵抗力<sup>[5]</sup>。

质粒/壳聚糖复合粒子的转染活动和细胞吞噬之间的关系是通过用荧光素 Isothiocyanate 标记的质粒和 Texas 红标记的壳聚糖来分析的。有很多因素影响转染活动和细胞内吞, 例如: 壳聚糖的分子量和脱乙酰度、复合粒子的化学计量、血清浓度和转染递质的 pH 值等。当壳聚糖的分子量为 40 000 或者 840 000, N/P 比为 5, 转染递质含有 10% 血清且 pH 值为 7.0 时, 质粒/壳聚糖复合物的转染水平最高<sup>[6]</sup>。

体内和体外的基因转染效率和复合物的物理形态和稳定

**[收稿日期]** 2008-01-22

**[基金项目]** \* 湖北省卫生厅科研基金资助项目(基金编号: NX200601)

**[作者简介]** 杨 洪(1962-), 男, 湖北罗田人, 主管药师, 从事临床药学工作。电话: 0713-5053094, E-mail: heshaj760501@sina.com。

**[通讯作者]** 向 明, 女, 教授, 从事免疫药理及基因疫苗研究。电话: 027-65328668, E-mail: xiangming@mails.tjmu.edu.cn。

性有关。与高分子量超纯的壳聚糖 UPC 相比,只有 24 聚物形成了稳定的复合物,表现了高水平的基因表达。壳聚糖低聚物和 DNA 形成复合物是结构依赖方式的。我们认为,比 UPC 有着更可观物理特征的 24 聚物,比通常的高分子量壳聚糖 (> 5 000) 会成为更吸引人的基因传送载体<sup>[7]</sup>。

**3.2 改性壳聚糖载体** 在前期壳聚糖作为基因载体的论证成功后,目前许多研究者都把研究的重点放在壳聚糖的改性和修饰上,期望能提高壳聚糖的递送性能,研究重点是对其进行改性,然后考查其转染效率,主要是提高壳聚糖基因递送系统的细胞靶向性,从而提高转染效率。

**3.2.1 咪唑丙烯酸(UA)修饰的壳聚糖** 为了提高转染效率,可溶性壳聚糖与 UA 连接,UA 中的咪唑环可以通过质子海绵机制在内涵体破裂过程中起重要作用。UA 修饰的壳聚糖(UAC)与 DNA 结合,UAC/DNA 复合物在生理条件下(粒径 109 ~ 342 nm)和壳聚糖/DNA 复合物的粒子大小几乎是一样的。UAC 也表现出很好的 DNA 结合能力,保护 DNA 受核酸酶侵袭的能力,并具有低毒性。与 UA 连接后壳聚糖在 293T 细胞中的转染效率明显提高,并且随着 UA 在 UAC 中的含量的增加,转染效率也增高<sup>[8]</sup>。

**3.2.2 聚乙二醇(PEG)化壳聚糖** 由于壳聚糖分子间氢键的存在,使它不溶于一般的有机溶剂和水,而且由于其疏水性,所制成的 DNA 给药系统易被网状内皮吞噬系统(reticuloendothelial-system, RES)所吞噬。为了改善其水溶性,延长壳聚糖/DNA 自组装复合物在长循环中的停留时间,通过接枝共聚的方法将亲水无毒的聚乙二醇链段引入壳聚糖的氨基侧链上,得到了改性的壳聚糖-聚乙二醇接枝共聚物,流式细胞仪测得 PEG 化壳聚糖/DNA 自组装复合物在 Hela 细胞体外转染率达到 81%<sup>[9]</sup>。

未经表面修饰的载基因纳米粒能够转染人胚胎肾细胞(HEK293)和肝癌细胞(HepG 2),但转染效率仍不如脂质体转染试剂,且在转染实验后约 72 h 较高,递送基因较佳的剂量是 2 ~ 4 μg,在以上两种细胞中,转染效率也不同。经 PEG 表面修饰的纳米粒仍保持纳米粒的体外转染活性<sup>[10]</sup>。

**3.2.3 琥珀酰壳聚糖** 研究表明,水溶性 N-琥珀酰壳聚糖较壳聚糖具有更低的毒性,更长的体内半衰期,在正常小鼠体内,主要分布于血液循环中,在其他组织中分布很少;在经过 P388 白血病肿瘤细胞移植的小鼠体内,主要分布于肝脏和肿瘤组织中,在肝脏中的分布随着血液中浓度的降低而减少,在肿瘤组织中的分布却逐渐增加。表明 N-琥珀酰壳聚糖能选择性地蓄积于肿瘤组织,即具有被动靶向性<sup>[11]</sup>。这就给肿瘤的基因药物提供了很好的靶向载体。

HGC 量的增加也有利于 COS-1 细胞的内吞 HGC 纳米粒子的作用,这点被共聚焦显微镜证实。HGC 纳米粒子在有血清存在下增强了转染效率<sup>[12]</sup>。

#### 4 存在的问题

近年来对载药壳聚糖纳米微粒的研究取得了重大进展,成为载体药物技术领域的重要发展方向。但此类载体仍存在下列问题。首先,壳聚糖的溶解性较差,不溶于水和有机溶剂,仅

在稀酸中少量溶解,而酸性条件制备壳聚糖纳米药物载体势必对大分子药物的活性产生影响,也在很大程度上限制了纳米药物的产业化制备。因此,对壳聚糖予以改性,改善壳聚糖的水溶性,在适宜(或不影响药物活性)条件下制备纳米药物载体,是急需研究的课题。其次,还需考虑到壳聚糖在体内降解性问题。有学者发现壳聚糖虽然具有生物降解性但与经溶菌酶催化的壳聚糖降解相比,壳聚糖与甲氨蝶呤结合物的降解速度非常缓慢且不完全。这说明壳聚糖的生物可降解性并不高,可能产生体内积蓄等问题。因此,进一步研究壳聚糖在生物体内的降解行为及改善其降解性是十分重要的课题。此外,壳聚糖是一种亲水性多糖,仅能包裹一些亲水性大分子,而对于疏水性药物,壳聚糖要作为载体还存在难度。

为了解决上述问题,有研究采用低分子量壳聚糖(low molecular weight chitosan, MWC)和壳寡糖(chitosan oligosaccharides, COSs)替代高分子量的壳聚糖制备纳米药物载体。一般相对分子量小于 12 000 的壳聚糖具有较好的水溶性。因此,COSs 等作为纳米载体,一方面可以解决壳聚糖的水溶性问题;另一方面,笔者认为在一定程度上能降低高分子量壳聚糖体内降解的难度。KIM 等<sup>[8]</sup>采用水溶性较好的低分子量壳聚糖制备 DNA 纳米载体微粒,不但可提高壳聚糖水溶液中的稳定性,而且能降低因醋酸引起的细胞毒性。还可采用水溶性很好的 COSs 替代水溶性很差的高分子壳聚糖制备基因药物纳米载体。COSs 经脱氧胆酸(DOCA)化学改性具有两性亲性,而自组装成粒径在 200 ~ 240 nm 之间的纳米微粒,负载基因后获得较好的效果。

#### 5 结束语

壳聚糖是自然界中唯一的阳离子多糖,对 DNA 有很好的结合和保护作用,对生物体无毒、相容性好,本身具有一定的抑制微生物和抗癌作用,而且还很容易改性制成不同途径给药的基因治疗载体,体内外实验已初步显示出良好的应用前景。目前的研究重点是优化转染条件,提高转染效率。相信随着研究的深入和新剂型的开发,壳聚糖纳米粒载体会在基因治疗中发挥重要作用。

#### [参考文献]

- [1] MANSOURI S, LAVIGNE P, CORSI K, *et al.* Chitosan-DNA nanoparticles as non-viral vectors in gene therapy: strategies to improve transfection efficacy[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2004, 57(1): 1 - 8.
- [2] ZONG L, CHEN L L, ZHANG S Y, *et al.* Chitosan nanoparticles as gene vector for mucosa vaccination: preparation, characterization and ability to protect plamid DNA [J]. *Chin Pharm Univ*, 2005, 36(3): 526 - 530.
- [3] VILA A, SNCHEZA A, JANES K, *et al.* Low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for nasal vaccine delivery in mice [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2004, 57(1): 123 - 131.
- [4] ARTURSSON P, LINKDMARK T, DAVIS S S, *et al.* Effect of chitosan on the permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (Caco-2) [J]. *Pharm Res*, 1994, 11(9): 1358 - 1361.
- [5] TOSHINORI S, TSUYOSHI I, YOSHIO O. *In vitro* gene delivery mediated by chitosan. effect of pH, serum, and molecular mass of

- chitosan on the transfection efficiency[J]. *Biomaterials*, 2001, 22(15): 2075-2080.
- [6] TSUYOSHI I, YOSHIO O, TOSHINORI S. Mechanism of cell transfection with plasmid/chitosan complexes[J]. *Biochimica Biophysica Acta*, 2001, 1514(1): 51-64.
- [7] KOEPING-HOEGGARD M, MELNIKOVA Y S, VARUM K M, et al. Relationship between the physical shape and the efficiency of oligomeric chitosan as a gene delivery system *in vitro* and *in vivo*[J]. *J Gene Med*, 2003, 5(2): 130-141.
- [8] KIM T H, IHM J E, CHOI Y J, et al. Efficient gene delivery by urocanic acid-modified chitosan[J]. *J Controlled Release*, 2003, 93(3): 389-402.
- [9] WEI X H, LIANG W Q, PAN Y J. Preparation and characterization of PEGylated chitosan/DNA self-assemble complex and the research on transfection on Hela cell *in vitro* [J]. *Chem J Chin Univer*, 2003, 24(11): 1993-1996.
- [10] ZHOU X, HUANG W, HE J F, et al. Test the transfection activity of DNA-chitosan nanoparticles, preparation[J]. *Pharm J Chin PLA*, 2003, 19(4): 241-244.
- [11] WANG Y S, LI Y X, SONG N, et al. Preparation and *in vitro* stability of targeting antitumor drug methotrexate-succinyl-chitosan conjugate[J]. *Chem J Chin Univer*, 2003, 24(11): 2103-2106.
- [12] YOO H S, LEE J E, CHUNG H, et al. Selfassembled nanoparticles containing hydrophobically modified glycol chitosan for gene delivery [J]. *J Controlled Release*, 2005, 103(1): 235-243.

## 湖北麦冬的研究进展\*

刘霞<sup>1,3</sup>, 曹秀荣<sup>2</sup>, 陈科力<sup>3</sup>, 詹亚华<sup>3</sup>

(1. 武汉健民药业集团股份有限公司, 武汉 430052; 2. 湖北省食品药品监督管理局药品审评认证中心, 武汉 430071; 3. 湖北中医学院药学院, 武汉 430022)

[摘要] 通过对湖北麦冬的历史沿革、植物学特征、品种鉴定、化学成分及药理作用等各方面的研究情况进行全面综述, 为湖北麦冬这一湖北独特道地药材品种的深入研究, 提供借鉴和依据。

[关键词] 湖北麦冬; 川麦冬; 杭麦冬

[中图分类号] R282.17 [文献标识码] A

[文章编号] 1004-0781(2008)10-1231-04

湖北麦冬为湖北地区独特的道地中药材, 为百合科山麦冬属植物湖北麦冬 *Liriope spicata* (Thunb.) Lour. var. *prolifera* Y. T. Ma 的干燥块根, 是《中华人民共和国药典》(1995, 2000, 2005 年版) 一部中药材“山麦冬”中的品种之一<sup>[1]</sup>, 具有养阴生津、润肺清心的功效, 用于肺燥干咳、虚劳咳嗽、津伤口渴、心烦失眠、肠燥便秘等症, 在临床上与四川、浙江所产麦冬[百合科麦冬 *Ophiopogon japonicus* (Thunb.) Ker-Gawl. 的块根] 同等入药, 为目前国内麦冬类药材的主流商品之一。为促进对湖北麦冬的深入研究, 特对湖北麦冬现有研究情况进行全面综述。

### 1 湖北麦冬历史沿革

湖北麦冬具有悠久的药用历史。宋代《图经本草》<sup>[2]</sup> 和《证类本草》《重修政和经史政类备用本草》<sup>[3]</sup> 麦冬项下记载了“随州麦冬”和“睦州麦冬”两种植物图。古代随州经考证属今湖北省襄樊市, 表明“随州麦冬”即今湖北麦冬, 湖北襄樊一带自古就产湖北麦冬。古代睦州经考证属今浙江省建德地区, 表明“睦州麦冬”即今杭麦冬。古代本草描述与现今

《中华人民共和国药典》记载的麦冬和湖北麦冬药材的产地和形态基本一致。

### 2 湖北麦冬的品种归属及分布

麦冬类植物来源于百合科沿阶草属和山麦冬属的多种植物, 据调查全国各地以麦冬或野生麦冬为名的有沿阶草属 18 种和山麦冬属 8 种。目前国内主流商品麦冬类药材为川麦冬和湖北麦冬, 比例约各占 50%, 浙麦冬已减产至近乎消失, 短葶山麦冬产量少。经调查研究和鉴定川麦冬、杭麦冬的基源植物为沿阶草属植物麦冬 *Ophiopogon japonicus* (Thunb.) Ker-Gawl., 湖北麦冬为百合科山麦冬属山麦冬的变种湖北麦冬 *Liriope spicata* (Thunb.) Lour. var. *prolifera* Y. T. Ma, 生长周期为一年生块根。

湖北麦冬分布在汉水中游的冲积平原一带, 但主产区位于襄樊市所辖的襄阳、谷城、老河口等县市。襄樊地处汉水中游平原, 海拔 65~67 m, 属亚热带季风气候。年平均气温 10~16℃, 年降雨量约 1 000 mm, 年活动积温 4 000~5 500℃, 土壤为油沙土, 通气透水, 非常适合麦冬的生长, 是中南地区最大的麦冬集散地<sup>[4-6]</sup>。

### 3 湖北麦冬的植物学特征及鉴定特征

湖北麦冬与其他麦冬类药材的鉴别<sup>[4-14]</sup>, 见表 1。

**3.1 湖北麦冬的植物学特征** 湖北麦冬为山麦冬属山麦冬 (*Liriope spicata* (Thunb.) Lour.) 的变种, 为多年生草本, 须根系, 直径 0.10~0.25 cm, 上端有时可见皱缩横环纹, 中部或末端膨

[收稿日期] 2008-01-14

[基金项目] \* 国家科技支撑计划(基金编号: 2006BAI06A15-4-4-2)

[作者简介] 刘霞(1973-), 女, 湖北武汉人, 工程师, 博士, 研究方向: 中药的品种、质量及资源开发研究。电话: 027-84527965, E-mail: lrx1125@126.com。

[通讯作者] 陈科力, 教授, 博士生导师。E-mail: kelichen@126.com。