

生物可降解阳离子高分子基因载体研究

卓仁禧, 章雪晴, 黄世文

武汉大学化学与分子科学学院, 生物医用高分子材料教育部重点实验室,

武汉 430072

关键词: 基因传递, 聚阳离子, 树形高分子, 聚磷酸酯, 聚磷酸胺

基因传递载体将治疗基因运送到目标部位, 是基因药物的重要组成部分, 也是目前基因治疗研究的瓶颈。在现有的载体中, 病毒载体的效率高, 但是有安全隐患; 非病毒载体安全、易于制备, 将来人们更乐于选择非病毒载体。阳离子高分子基因载体作为一类新型非病毒载体, 在过去十多年发展迅速, 已成为生物医用高分子的前沿领域和研究热点。

我们在过去的工作基础上, 研究了聚酰胺胺树形高分子和含磷聚阳离子两类生物可降解高分子基因载体。合成的树形聚酰胺胺和阳离子聚磷酸酯、聚磷酸胺载体的体外转染效率接近目前效率最高的聚乙烯亚胺(PEI), 但比聚乙烯亚胺的毒性低得多。结合肝靶向基团的聚阳离子与荧光素酶基因(pRE Luc)形成的复合物通过受体介导胞吞作用对肝系细胞(HepG2 细胞)进行靶向基因传递, 大大提高了转染效率。研究了聚阳离子基因载体的分子结构与基因传递效率之间的关系, 为设计新的阳离子高分子基因载体提供实验依据。主要结果如下:

- 1 设计、合成了分别以季戊四醇、肌醇、间苯三甲酸、1,4,7,10-四氮杂十二烷为核的聚酰胺胺树形大分子; 研究了各代树形分子的体外生物相容性; 研究了各代树形大分子与质粒 DNA 的复合及组装; 详细考察了树形分子介导 pRE Luc 基因体外转染各种细胞系, 考察了树形聚酰胺胺的高缓冲能力(buffer capacity)与转染效率之间的关系。合成了树形分子分别与半乳糖(galactose)、N-乙酰半乳糖胺(N-Acyl galactosamine)、枝化 N-乙酰半乳糖胺(cluster N-Acyl galactosamine)的结合体; 研究了结合体的体外生物相容性; 研究了结合体与质粒 DNA 的复合能力; 结合体与荧光素酶基因(pRE Luc)的复合物通过受体介导胞吞作用靶向基因传

递到肝系细胞 (HepG2 细胞系)。所合成的聚酰胺胺树形高分子载体的体外转染效率接近目前效率最高的聚乙烯亚胺(PEI)，但比聚乙烯亚胺的毒性低得多。

2 设计、合成了系列水溶性、阳离子聚磷酸酯 (PPE) 和聚磷酸胺 (PPA)。PPE 和 PPA 都是高效低毒的基因载体，可以有效介导基因转染 COS7, HeLa 等多种细胞。采用两种给药途径进行体内转染实验。肌肉注射结果表明，N/P=0.5 的 PPA/DNA 复合物在小鼠肌肉中介导的荧光素酶表达比裸 DNA 高 16 倍。胆管注射是一种肝靶向给药途径，用来评估 PPA 载体介导质粒 DNA 在大鼠肝脏中的转染效率。胆管注射后第 3 天的结果表明，PPA-DEA 在大鼠肝脏中介导的荧光素酶表达水平比直接注射裸 DNA 高 225 倍。

3 合成了不同取代度的半乳糖 - PPA 结合体 (Gal - PPA)，它们的细胞毒性随半乳糖取代度的增加而显著下降。Gal - PPA/DNA 复合物显示了与 RCA120 (一种特异性识别半乳糖基的植物凝集素) 的可逆的亲合能力，并随半乳糖取代度的增加而提高。但是 PPA 载体结合半乳糖后并没有增强基因在 HepG2 细胞中的转染效率。采用未修饰的 PPA 与 DNA 首先复合成 N/P 比为 0.5 的纳米粒子，然后在带负电的纳米粒子表面覆盖带正电的 Gal - PPA，得到表面带有半乳糖的 Gal - PPA/PPA/DNA 三元复合物。与传统的二元复合物相比，三元复合物粒径减小，能增加基因在富含 ASGPR 的细胞 (如 HepG2 和大鼠元代肝细胞) 中的转染效率。HepG2 细胞摄取 Gal - PPA/PPA/DNA 三元复合物高于 PPA/DNA，转染介质中游离半乳糖能够抑制 Gal - PPA/PPA/DNA 三元复合物在 HepG2 细胞中的转染效率，说明 Gal - PPA/PPA/DNA 三元复合物的细胞摄取是通过 ASGPR 介导的细胞内吞作用进行的。采用门静脉注射进行 Gal - PPA/PPA/DNA 三元复合物体内转染实验，发现 4%Gal - PPA-DEA 三元复合物在小鼠肝脏中荧光素酶表达效率高于未修饰的 PPA-DEA30 倍，比直接注射裸 DNA 高 35 倍。半乳糖的引入改变了 PPA-DEA 在小鼠主要器官中基因表达结果。

4 将末端连接半乳糖的 PEG 接枝到 PPA-DEA 的侧链上，考察所得到的 Gal - PEG-PPA 的物理化学性质和转染活性，并与 Gal - PPA 和未修饰的 PPA-DEA 进行

比较。MTT 分析和急性组织响应实验显示了 Gal -PEG-PPA 具有较低的细胞毒性和更好的组织相容性。Gal -PEG-PPA/PPA/ DNA 三元复合物能够可逆地与 RCA120 相互作用，增强质粒 DNA 在 HepG2 细胞中的摄取量。门静脉注射结果表明，Gal -PEG-PPA 和 Gal -PPA 三元复合物在小鼠肝脏中介导的荧光素酶表达效率都比 PPA-DEA 要高，还提高了小鼠脾、肺、肾、心中的荧光素酶表达效率。胆管注射后第 3 天的结果表明，使用相同的载体，老鼠肝脏中的荧光素酶表达效率比通过门静脉注射途径普遍高上 10 倍。Gal -PEG-PPA 三元复合物在大鼠肝脏中的转染效率最高，比 PPA-DEA 高 33 倍，比 Gal-PPA 高 4 倍。

致谢：感谢国家重点基础研究规划项目(G1999064703)和国家自然科学基金项目 (20204009 , 20474045) 资助。

参考文献

1. Huang S W, Zhuo R X. *Chin Sci Bul*, 2003, 48(13): 1304.
2. Huang S W, Fu L Z, Zhang X Q, Liu H, Li W X, Zhuo R X. *Sci Chin B*, 2003, 46(3): 271.
3. Zhang XQ, Wang XL, Huang SW, Zhuo RX, Liu ZL, Mao HQ, Leong KW. *Biomacromolecules*, 2005,6 (1): 341.
4. Wang J, Mao H Q, Leong K W. *J Am Chem Soc* **2001**, 123(38): 9480.
5. Zhang XQ, Wang XL, Zhang PC, Liu ZL, Zhuo RX, Mao HQ, Leong KW. *J Controlled Release*, 2005,102 (3): 749.

Biodegradable cationic polymer gene delivery vectors

Zhuo Renxi, Zhang Xueqing, Huang Shiwen

Key Laboratory of Biomedical Polymers , Ministry of Education; College of Chemistry and Molecular Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072

Abstract: Gene delivery system is one of the three components of a gene medicine, which controls the delivery of the plasmid to specific location of the body. Among the current gene delivery vectors, viral vectors are still the most widely investigated and clinically applied because of their high transfection efficiency. However, nonviral vector offer advantages over viral system of safety, ease of manufacturing, etc. As important nonviral gene carriers, cationic polymer gene delivery vectors have gained increasing attention and have begun to show increasing promise. In this work, we report novel polyamidoamine dendrimer, polyphosphoester and polyphosphoramidate as cationic polymer gene carriers.

Key Words: Gene delivery, polycation, polyamidoamine dendrimer, polyphosphoester, polyphosphoramidate