

一种新型纳米材料——树枝状聚合物介导的基因治疗研究

A Study on Genic Therapy of Dendrimers

陆华中

(上海市血液中心、上海市输血研究所血液工程研究室 上海 200051)

无论是在基因治疗研究兴起之初,还是在经历了基因治疗临床试验 10 余年之后的今天,载体问题一直是基因治疗研究领域中最至关重要的核心问题之一。一个理想的载体系统至少必须满足两个条件,即有效性和安全性。有效性包括所介导的遗传物质能够高效地进入所期望的靶细胞,而且不被血浆或组织细胞中各种补体以及各种酶所破坏。同时,转导基因能够透过核膜,进入细胞核,并整合于染色体 DNA 中,从而获得转基因的高效、稳定表达而发挥治疗作用。安全性则是指用于基因转移的载体不会引起宿主严重的免疫反应,不会产生严重的遗传毒性与细胞毒性,不会因发生同源重组、回复突变,导致野生病毒的产生,不会导致生殖细胞的感染以及不会导致插入位点的基因失活与基因突变等。目前,被普遍用于基因治疗临床试验的载体仍以病毒载体为主^[1]。这些病毒载体曾因其所表现出的多方面的优势给人们带来过希望,同时,也因其所存在的多种潜在的危险,给人们留下了遗憾。美国基因治疗临床试验中所发生的杰西·哥尔辛格死亡事件,使人们对病毒载体的担忧成为了现实,也给整个基因治疗临床试验蒙上了阴影。载体问题,仍然是载体问题,再一次赫然地摆在了基因治疗研究者们的面前^[2]。

事实上,基因治疗自从它诞生的那一天起,就充满了坎坷,同时,也充满了奇迹。今天,一种新型的纳米材料——树枝状聚合物(dendrimers)正在被人们悄悄地用于基因治疗的载体研究之中,或许,将给基因治疗研究带来新的奇迹。Dendrimers 是一种人工合成的新型纳米材料。最早由美国化学家 Tomalia DA 博士于 80 年代初发明,并成功合成。此后,dendrimers 的研究与应用得到了不断的发展。10 多年来,dendrimers 在从材料科学到生物医药诸多领域中都受到了日益广泛的关注。在生物医学领域,从简单的药物运送载体,到复杂的医疗成像等多个方面都得到了应用。主要包括:纳米级生物传感器、纳米级催化剂、微型纳米泵、纳米级药物及基因载体,以及免疫诊断纳米试剂等。

Dendrimers 具有精确的纳米构造,它是按一个纳米一个纳米合成的。其合成的步骤决定了 dendrimers 精确的代数(generations,或层数 layers)与体积。Dendrimers 的合成方法有两种:(1)发散法

(divergent synthesis method);(2)会聚法(convergent synthesis method)。发散法以一个中央分子,或起始分子(central, initiator),如氨、乙二胺、丙胺,或三羧酸氯苯等为核心(core)向四周生长、发散。通过逐步聚合反应,向外生长、加层,最终形成树状枝结构。每循环一次,产生一代,记作, G0, G1, G2……以及 G10 等。起始核心的选择非常重要,它决定了整个聚合物分子及其表面电荷的密度。会聚法是 dendrimers 的另一种合成方法,主要涉及两个步骤,首先是一系列小的分支单位(branch units)的反复的耦合,以生成树状石结构(dendron),然后,锚定一个核心分子,从而产生一个由多个 dendron 组成的树枝状聚合物。

Dendrimers 是一种真正的纳米级分子,其直径范围从 G0 代到 G10 代分别为 10Å-130Å,而且,与普通高分子聚合物不同,dendrimers 具有低粘度、高溶解性、可混合性以及高反应性等特点。同时,其体积和形态还可在合成过程中加以专一性的控制。比如,设计出具有巨大内部疏水空间(hydrophobic void spaces),而表面却是亲水性质的树枝状聚合物。Dendrimers 的表面可制成由不同分子基团组成的密集区域。这些分子基团可起到挂钩的作用,尤其是各个末端基因可以与病毒和细胞表面的多价分子附着点结合,从而用于粘附各种有用的分子。当末端基团是阳离子时,他们可以中和 DNA 或寡核苷酸上磷酸基因的电荷,协助基因或反义药物进入细胞。Dendrimers 还可以作为单分子微粒,使携带表面基团的药物或基因载体具有靶向性。而且,自组装型树枝状聚合物药物传送系统(self-assembling dendrimeric drug delivery systems)能选择性地聚集在肿瘤组织部位。Dendrimers 的这些特性使其正在成为一种新型的药物载体以及非病毒基因转移载体而引起人们的广泛关注。

Dendrimers 用于基因转移的研究最早见于 Szoka 等的报道。Szoka 等于 1993 年使用热降解的多聚物进行了基因转导的探讨。通过对两个报告基因、荧光素酶(luciferase)与 β -半乳糖苷酶(β -galactosidase)基因在多种贴壁,或悬浮培养哺乳类细胞的转导与表达的观察,开创了以纳米材料为载体介导基因转移的先河。结果显示,dendrimers 可介导上述基因在多种细胞的高效基因转移与转基因的表达。同

时,文章还对 dendrimers 介导基因转移的影响因素,比如 dendrimers 与 DNA 混合物的电荷比(末端胺分子与磷酸盐的比例)、dendrimers 分子的直径等进行了初步的探讨。随后,多个研究小组对 dendrimers 及其介导的体内外基因转移进行了广泛的探讨,包括 dendrimers 与 DNA 的相互作用、复合物的形成与特点、电荷对复合物形成的影响、dendrimers 介导 DNA 进入细胞的机制,以及 dendrimers 介导各种外源基因的体内外基因转移与表达。其中,聚酰胺-胺型树枝状聚合物(polyamidoamine, PAMAM)是研究最多的一种 Dendrimers 分子。

Dendrimers 与 DNA 分子相互接触,并形成复合物是其介导基因转移的起始步骤与关键性参数。与其它多种合成载体系统,如:多聚赖氨酸、阳离子脂质体以及阳离子多聚物等相似,PAMAM 可与质粒 DNA 表达载体进行自我组装成复合物。Dendrimers-DNA 复合物的理化性质取决于其所选用阳离子载体的类型。然而,这一相互作用具有普遍规律。与其它多价阳离子大分子相似,PAMAM dendrimers 通过其表面氨基团正电荷与核苷酸分子的磷酸根负电荷发生静电作用,从而与 DNA 形成复合物,并导致载体 DNA 的浓缩。复合物的形成和特征可通过多种方法对其溶解性及密度的检测分析来进行,如,紫外光吸收法、激光散射法(ELS),以及对放射标记的 DNA 或 dendrimers 的测量分析方法等。由于 DNA、dendrimers 复合物的聚集和沉淀,与其它多价大分子化合物相似,二者的结合常数常难以确定。高分子量、高密度复合物的形成主要取决于 DNA 的浓度。在无盐水溶液中,沉淀的形成随 DNA 浓度(10ng ml^{-1} 到 1mg ml^{-1})的增加而增加。当 DNA 浓度 $< \text{或} = 10\text{ng ml}^{-1}$ 时, DNA 与各种大小的 dendrimers 分子(如 G5、G7 及 G9,以 NH_3 或 EDA 为核心)则形不成不溶性、高密度聚集物,而是悬浮于水溶液中;当 dendrimers 的浓度提高时,其与 DNA 的电荷比加大,这将导致复合物的形成增加^[4]。静电效应(吸引或排斥)可能受 dendrimers 分子大小的影响。比较 DNA 分子同小的聚合物(如 G5、G7 EDA)与大的聚合物(如 G9 EDA)形成复合物的情况,可以看出,前两者在低电荷比时,比后者更容易形成高凝聚性的复合物,提示静电效应受 dendrimers 直径及其分子量大小的影响。PAMAM 可与各种类型的核苷酸形成复合物,包括短的单链寡核苷酸、环状质粒 DNA、线性 RNA 分子以及不同大小的双链 DNA 等。核苷酸分子越大,则在产生高密度复合物时所需要的 dendrimers 的浓度越低。随着 dendrimers-DNA 复合物电荷比的递增(如 > 20),低密度、可溶性复合物的产生就越多。研究显示,大多数($> 90\%$)的转染是由上述低密度、可溶性复合物携带的,而此类复合物可能仅占复合物 DNA 总量的 $10\% \sim 30\%$ 。

Dendrimers 介导外源基因进入细胞的机制与一些非病毒载体,如脂质体、脂精胺、聚氮丙啶的机制相似。Dendrimers-DNA 复合物通过其表面所携带的正电荷阳离子与细胞膜表面带有负电荷的糖蛋白及磷脂结合而进入细胞质。复合物表面阳离子电荷较小时基因的转导效率也随之降低。将复合物中 DNA,或 dendrimers 进行放射性标记后分析证实,细

胞摄取该复合物的主要机制为胞吞机制的激活。当将转导细胞与细胞内吞抑制剂(如松胞菌素 B 及去氧葡萄糖),或细胞代谢抑制剂(如叠氮化钠)共孵育后,其复合物摄取率及相应转导基因的表达率均显著降低。核内体在包裹复合物后,能将其及时地释放入胞质,以防止复合物因酸化或酶的作用而被溶酶体降解。故使用具有核内体酸化作用的抑制剂氯喹时,可提高 dendrimers 介导的基因转染率。据报道 dendrimers 因其表面的氨基团具有极强的缓冲力,可作为弱碱基对而显示出抗溶酶体酸化的作用。PH 值降低可导致核内体中聚合物膨胀,随之细胞器膜屏障破坏,从而加速 DNA 或复合物的释放。DNA 转导进入细胞质约 30 分钟后便穿过核膜,而进入细胞核内。但介导 DNA 进入细胞核的确切的分子及细胞机制目前尚不清楚。同时,复合物进入细胞核的能力可能随不同的细胞类型而有所不同。由于在分裂细胞可获得更高的转基因表达,推测多数 DNA 分子可能在细胞有丝分裂时进入细胞核内。最近,有研究发现, dendrimers 介导基因进入细胞核时,部分 dendrimers 与 DNA 复合物并未发生分离,因此,推断其所介导的进核过程也可以是以 dendrimers-DNA 复合物的形式介导进行的^[5]。

多项研究显示,以 PAMAM 与 DNA 制成的复合物在多种细胞系中所进行的基因转移均较裸 DNA 以及其它非病毒载体所介导的基因转移率显著提高,尤其是在多种猴,以及人的肿瘤细胞株中的转移效率更是如此。同时,研究显示,以热降解的 dendrimers 所介导的基因转移要高于以完整 dendrimers 分子所介导的基因转移率,如:完整的 G5 聚合物所介导的基因转染率就远不如以其降解产物所介导的基因转移效率。由于降解的聚合物自身的大小和结构被分散,因此,降解的聚合物所介导的高的转移率可能与其结构灵活性的增加有关。然而,其确切结构变化尚不明确。Baker 等所进行的另一项实验显示,与降解的 dendrimers 相比,完整的 dendrimers 中仅合成代数 $\geq G5$ 的聚合物才能介导明显的基因转染,而且,需要加入分散剂,如二乙氨基葡聚糖(DEAE)等,才能发挥更好的作用。在对以大鼠胚胎成纤维细胞株 Rat 2 为代表的一系列细胞株所进行的实验中观察到,使用 G5-G10 代(以 NH_3 或 EDA 为核心分子)的 dendrimers 所介导的基因转移,其转染率随着聚合物代数的增加而呈指数增加。在贴壁,或非贴壁细胞系中均可获得转基因的高表达。一般而言,传统非病毒载体在原代细胞系中的表达率较低。但 PAMAM dendrimers 可转染各种来源的原代细胞,包括成纤维细胞(HF1)及人肺上皮细胞等。Dendrimers 介导基因转移的转染率因细胞种类不同而存在差异,可能与细胞生理状态的细微不同有关。因此,在应用前应通过实验来确定针对某一特定细胞所应采取的最理想的聚合物的种类及代数。一些试剂可明显提高 dendrimers 所介导的基因转移率。例如,加入氯喹或带正电荷的 DEAE 可明显提高复合物在许多细胞系中所介导的基因转移率。DEAE 通过分散聚合物使其性质发生改变,然而,该化合物具有明显的细胞毒性,并有阻断基因整合的作用。

一般来讲,基因治疗的目的是希望获得遗传物

质在转导细胞中的持久整合与长期、稳定的表达。然而,传统的非病毒载体难以做到这一点,因此,常需要对大量的细胞进行多次重复转染,以获取一定数量的表达目的基因的的稳定细胞克隆。一项以磷酸钙-DNA共沉淀法、DEAE-DNA法和dendrimers-DNA复合物法将带有 β -半乳糖苷酶与新霉素抗性基因的表质粒转染进入D5小鼠黑色素瘤细胞的比较研究显示,以dendrimers-DNA复合物转导细胞所得到的新霉素抗性克隆数比以另外两种复合物介导基因转移所得到的抗性克隆数要高出90倍。其中1/3的抗性克隆产生 β -半乳糖苷酶,表明非选择基因已整合于转导细胞基因组DNA之中而获得表达。同时,另有研究显示,dendrimers可介导多种细胞的体内基因转移,并获得外源基因在宿主细胞染色体DNA中的整合与持续、稳定的表达。

此外,dendrimers还具有保护反义寡核苷酸等核酸序列不被血清,或组织细胞中各种补体及酶所降解的作用。反义寡核苷酸的生物学效应最终与其细胞内浓度和降解率相关。因此,如何阻止其被胞内或胞外核酶所降解,以获得足够的细胞内浓度是反义寡核苷酸治疗的关键。目前的办法是通过修饰磷酸二酯键,以提高其化学稳定性来延长寡核苷酸的半衰期。另外,还可以通过采用其它一些技术来提高细胞的摄取率,比如选用高浓度的寡核苷酸,使用脂质体载体,或显微注射法等。然而,这些技术都面临着体内应用的诸多问题。Bielinska等最近研究显示,PAMAM dendrimers可与反义寡核苷酸,或反义mRNA表达载体形成复合物而抑制荧光素酶的表达,其抑制效率取决于DNA浓度、dendrimers-DNA的电荷比,以及dendrimers的代数。使用dendrimers载体时,低至皮摩尔浓度的DNA分子即可发挥抑制特定基因表达的作用。因为当寡核苷酸与dendrimers形成复合物时,其磷酸二酯键稳定性增加^[6]。同时,当使用脂质体载体时,由于其细胞毒性反应,常难以持续发挥作用。而dendrimers在其转导基因浓度范围内无细胞毒性。

与此同时,一些研究还对dendrimers介导的体内基因转移与药物代谢动力学进行了探讨。Roberts等对G3、G5及G7 dendrimers分别在中国仓鼠成纤维细胞和瑞士-韦伯特雄性小鼠的体内或体外毒性的初步研究显示,在体外PAMAM dendrimers(G3、G5及G7)呈浓度及合成代数依赖性毒性。G3 dendrimers在浓度达1.0mM时可影响细胞生长,而G7 dendrimers则在浓度达100~1.0mM时可造成细胞的不可逆性损伤。而在体内单独使用,或与佐剂联合使用dendrimers的研究未发现明显的毒性以及免疫反应的发生。Malik等最近研究显示,PAMAM dendrimers(G2、G3、G4、G8及G10)在浓度>1.0mg/ml时可引起大鼠红细胞破坏。然而,体内的情况还不清楚。PAMAM dendrimers是否存在细胞毒性取决于其dendrimers的合成代数及其所作用的细胞类型。经静脉,或腹腔内途径注射^[125]I标记的G3、G4代PAMAM dendrimers主要分布于Wistar鼠的肝脏(60%~90%)。60分钟后血中仅检测到0.1%~1.0%的复合物含量。而在瑞士-韦伯特小鼠,静注G3、G5及G7后的分布则有些不同。G3 dendrimers在肾脏中聚集最多,G5及G7 dendrimers则主要分布

于胰腺。以上不同结果可能与动物模型的选择,或dendrimers合成代数的不同有关。鉴于dendrimers在与DNA形成复合物后,其表面电荷发生变化,推测体内复合物分布模式及细胞毒性与单用dendrimers的情况可能完全不同,因为形成复合物后,其分子大小、密度及表面电荷等均与单独的dendrimers有所不同。然而,到目前为止,dendrimers-DNA复合物的体内分布模式尚不清楚。总的说来,dendrimers用于体内外基因转导的初步研究结果令人鼓舞。Dendrimers是体外多种细胞株非常有效的非病毒型基因转移载体。研究显示,完整的G5或以上代数dendrimers的基因转移率显著高于G0~G4低代数聚合物。但,体外使用高代数dendrimers(如G5~G10)所获得的转染率还取决于细胞特异性,以及dendrimers与DNA的浓度。体外研究结果与体内情况并不完全一致。体内使用dendrimers转导基因尚处于初步阶段,并主要侧重于优化局部转基因的表达。Dendrimers的体内应用不存在生物不相容性,或毒性反应等问题,使其在体内基因转导的应用方面具有明显优势。

综合近年来人们在dendrimers方面所作的初步研究,可以肯定,与病毒载体以及传统的非病毒载体相比,dendrimers在介导基因转移方面至少在以下几个方面具有明显的优势:(1)由于dendrimers是非生物材料,因此,它没有免疫原性,不会引起机体的免疫反应;(2)与病毒载体不同,dendrimers无遗传毒性与细胞毒性,不会导致细胞的转化与细胞死亡;(3)由于其特殊的表面星状,或树枝状结构及表面电荷,因此,具有很高的基因转移效率;(4)dendrimers可介导外源基因在宿主细胞染色体DNA中的整合,从而获得转基因的长期、稳定表达;(5)dendrimers可保护转基因不受机体血浆,或组织细胞中各种补体以及各种酶的破坏,从而有利于目的基因在转导进入靶细胞后,能更好、更稳定地发挥其作用;(6)dendrimers本身具有抵抗,或杀死某种病毒,包括对HIV病毒的杀灭作用^[7]。因此,它既可作为载体,同时又可作为一种药物而被应用。目前,作为一种用于基因转移的新型的非病毒载体与药物释放载体,dendrimers正在引起人们的广泛兴趣,尤其是在作为药物载体方面的研究较多,部分试剂已商品化,这将大大促进dendrimers在基因治疗领域与新型药物载体开发方面的应用。然而,dendrimers在基因治疗领域的应用才刚刚开始。很多问题还有待深入研究与探讨。尤其是在国内,至今为止,尚未见任何以dendrimers为载体介导进行的基因转移与基因治疗研究的报道。国际上,此方面的研究也才刚刚起步,尚未见用于造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)基因治疗,以及基因治疗临床,或临床前研究方面的报道。

目前,笔者所在的研究室正在开展以Dendrimers为载体介导的“HSC纳米基因治疗”研究与“纳米基因药物”的开发。众所周知,HSC被公认为是基因治疗最理想的靶细胞之一。有资料显示,基因治疗临床方案近1/3涉及到HSC,充分显示了HSC作为基因治疗靶细胞的魅力^[8]。我们拟将纳米技术、基因工程技术与干细胞工程技术结合起来,

(下转第37页)

构、制定各项政策措施、提供各种科技与产业供求关系渠道,是十分必要的。但需要注意的是,在科技促进产业经济发展过程中,广义的中介系统包括产业政策的倾斜以及各项政策性服务,如通过金融、税收财政、工商管理等方面的调控,同时,促进科研机构、高校、企业和商家建立起科研—生产—市场发展的中介联合体。在进入科技—产业—市场中介关联循环后,推动产业升级和结构调整。

第三,应当重视和正确选择科技与产业经济对接的主体。改革前,我国科技与产业对接主体主要是政府,而企业和科研机构、大学处于对接的从属部门;企业为完成政府下达的生产指标,资金投向主要面向扩大产品产量,而具有“技术内涵”的产业投资比重明显偏低,消化吸收经费大大低于技术引进经费,研究开发经费主要用于实现短期的经营目标,甚至被挪用到生产性投资中去。因此,应充分发挥中介关联因素的作用,实现科技与产业的对接,加快产、学、研主体合一的步伐。应根据国家宏观调控政策,将科技产业化的主体由科研机构、大学逐渐转移到优势企业中,通过科研成果转让、技术入

股、期权控股等方式,加快产、学、研的主体合一,促进企业的发展壮大。

第四,建立适应科技产业化发展的中介供求网络系统。应将科技产业化的信息系统与研究开发成果、专利、技术改造等有机地结合起来。建立科技转移的中介系统,首先要进一步完善科技产业化发展计划与市场统一机制。以往计划经济下的信息流动往往是纵向下达而横向割裂,虽然逐级传递但容易偏移或中梗。市场经济尽管提供了信息横向流动的机制,但由于一些地区的保护主义等因素,也带来了低水平的重复和引进。因此,在国家宏观战略政策的设计下,应加快建立科技与产业经济统一体制下的,以研究开发机构为中心、产业市场为载体的中介供求网络系统。当然,在经济全球化和创新全球化的环境下,一国科技产业发展需要来自全球范围的技术、资金和人才的支持,中介供求网络系统的建立已经超出一般性对接的意义。通过互联网的中介系统联接,可使我国的科技资源、金融资本得到更加快捷、便利和富有效率的配置,将产业升级和结构调整提升到国际化阶段。

(责任编辑 孙立明)

科技动态

新奇的高速汽车增速技术

据英《新科学家》2002年1月26日报道:美国密执安大学的弗朗西斯科·迪茨和沃纳·达姆发明了一种增加汽车速度的新奇方法,但不是采用“加油”的办法增速,而是在汽车表面上喷水或空气。这颇令人奇怪。在汽车表面喷水或空气为什么可以增加速度呢?

原来,经研究发现,任何物体在高速运动时,在其表面都会产生涡流,涡流引起的阻力就会使物体的运动速度减慢;如果能消除这种涡流,物体的阻力就会减少,速度就会增加。

怎样才能消除物体高速运动时靠近表面产生的涡流?答案很简单,只要能把涡流瓦解掉就能解决问题。研究发现,这种靠近物体表面的涡流只要稍加干扰就会瓦解。为了瓦解涡流,迪茨决定在汽车约30%的迎风表面

覆盖一层薄薄的聚合物瓦片,在瓦片上有上百万个细小的喷嘴,喷嘴的间隔小于0.5毫米,可用制造微型芯片的技术生产。喷嘴在一个细小的水泵或气泵驱动下,以每秒钟喷射1000次的速度喷出脉冲气流或水流。这些脉冲水流、气流可迅速将靠近车体表面的涡流瓦解掉,从而减少空气阻力,增加汽车的速度。

为了保证在几微秒内破坏涡流,在聚合物瓦片中还装有压力传感器,只要涡流一形成,就能立即检测到。传感器就会把信号传送到计算机,计算机根据情况发出调节指令指挥水泵或气泵继续驱动喷嘴喷出水雾或空气。

原则上,布满喷嘴的聚合物瓦片可以铺设在任何快速运动的汽车或船舶表面,以减少涡流的阻力、增加运动速度。

(刘先曙)

(上接第17页)

通过多学科、多技术的交叉与融合,充分发挥各个学科、各种现代技术的优势与特长,特别是利用纳米材料所具备的特性,克服目前基因治疗领域中用常规技术难以克服的障碍,从而促进基因治疗,特别是“干细胞基因治疗”与“纳米基因药物”的开发与应用,为人类最终战胜包括肿瘤、艾滋病在内的多种恶性疾病开辟一条全新的生物治疗之路。

参考文献

[1] 陆华中,卢大儒,薛京伦. 高技术通讯, 2000; 10(109): 104-107, 103

[2] Marshall E. Science, 1999; 286(5448): 2244-2245

[3] Esfand R, Tomalia D A. Drug Discovery Today 2001, 6(8): 427-436

[4] Bielinska A U, Chen C, Johnson J. et al. Biocojug Chem, 1999; 10(5): 843-50

[5] Godbey W T, Wu K K, Mikos A G. Proc Natl Acad Sci USA, 1999; 96(9): 5177-81

[6] Qin L, Pahud D R, Ding Y, et al. Hum Gene Ther, 1998; 9(4): 553-60

[7] Witvrouw M, Fikkert V, Pluymers W, et al. Mol Pharmacol, 2000; 58(5): 1100-1108

[8] 陆华中,薛京伦. 中华血液学杂志, 2000; 21(6)

(删去1998年以前的11篇英文参考文献)

(责任编辑 王宏章)