

[文章编号] 1007-385X(2003)01- 0001- 04

纳米树突状多聚物颗粒在基因治疗中的应用

徐 茏¹, 益 敏², 徐宇虹¹(1. 上海交通大学药学院, 上海 200030; 2. 上海第二医科大学, 上海 200025)

基因治疗作为一种新型的治疗方法,其首要的技术问题就是实现外源基因的输送。在基因输送的研究领域中人们一直在探寻一种安全、高效的基因运输载体。许多种合成的载体被研究作为可能的基因传输工具。这些合成的载体包括带正电的多肽,阳离子脂质体和阳离子多聚物等,与病毒载体相比,这些载体具有制备方法简单,免疫原性较低,安全低毒等优点。但它们的基因转染效率都低于重组病毒载体,如腺病毒。

PAMAM(Polyamidoamine) Dendrimer 是最早被合成、定性并商业化的一种纳米级球状多聚物。其大小、形状及功能基团的放置位置都可以精确控制,在直径上呈现出可被较好控制的单分散性。同时,它还具有较好的水溶性。

PAMAM 树状多聚物表面基团为氨基,在生理环境的 pH 时带正电荷,可与带负电荷 DNA 结合并将 DNA 有效转染入许多种细胞系的细胞,包括原代细胞。同时 PAMAM 树状多聚物也被作为寡聚核苷酸、反义寡核苷酸及寡核苷酸类探针的载体。

1 Dendrimer 的合成与特征

80 年代早期, Tomalia 等^[1]报道了 PAMAM Dendrimer 的成功合成。Dendrimer 由中间的核和向周围散发的分枝组成。核的选择非常重要,它将决定整个分子及表面电荷的密度,如氨[NH_3]核将伸出三支臂,而乙二胺(ethylenediamine[EDA])将伸出四支臂。常用的核主要有氨、乙二胺和丙二胺。

Dendrimer 合成主要有两种方法^[2]:一种是分枝法,即分子由核心(根部)开始向外生长。这种方法根据树木分枝的规律将预先制好的单体按放射状的顺序、分支的枝梢再接分支,依次重复组装起来的。其合成是一种重复的两步反应,包括乙二胺(EDA)的酰胺化反应,和形成的甲基丙烯酸酯与氨基的 Michael 加成反应。每一次重复都形成新一代的聚合物,可用连续的整数表示。如 G_0 代、 G_1 代、 G_2 代等。经过这样反复的聚合反应,就在 Dendrimer 的表面形成了高密度的氨基基团,使得 Dendrimer 在正常的生理 pH 下带正电性。这种方法是目前世界上商业合成 Dendrimer 的首

选合成途径。第二种方法是会聚法。它从树状分子表面部分(即将成为树梢端的部分)向根部聚合,逐渐聚拢形成有活性的树状单体。几个树状单体与一个高活性的核反应就生成了一个树状多聚物。

PAMAM 树状多聚物由 0 代至 10 代,其分子直径在 10\AA 到 130\AA 之间,属于纳米尺度的分子。根据合成时所用的核以及代数,可以对 PAMAM Dendrimer 命名,如以 EDA 为核形成的 Dendrimer,记作 G_x EDA,其中 x 表示代数。PAMAM 树状多聚物的大小通常由代(层)数决定。每增加一代(层),分子直径增大约 10\AA ,同时表面的氨基数目加倍。随着代数的增加, Dendrimer 分子表面末端分支单位的密度增加,从而影响 Dendrimer 分子的形状。较低代的分子(G_0 至 G_4)呈现平面椭圆形,较高代的分子(G_5 至 G_{10})则为球形结构。随着代数的增多, Dendrimer 的空间结构也越来越拥挤,从 G_4 开始,分子形成表面封闭、内部疏水的纳米结构。

目前在细胞基因转染实验中普通使用的 Dendrimer 是 6 代以上、经降解的 Dendrimer。这种降解的 Dendrimer 可以通过加热处理完整的 Dendrimer 得到^[3]。加热处理后的 Dendrimer 仍然保留了大量的末端胺基,因而保留了原有的正电性;同时降解后的结构高度分支化,而且残留的分支不再受到临近分支在空间位阻上的影响。加热时间从 1 h 到 25 h 不等,所得到的降解后的 Dendrimer 的转染效率也各有不同。另外,这也与加热时使用的溶剂有关^[3]。在水以及丁醇等溶剂中,降解后的转染效率和这些溶剂的离解作用有关。而在一些非离解溶剂(如 DMF)中,加热处理则不会提高转染效率。

2 Dendrimer 与 DNA 的相互作用

PAMAM Dendrimer 的表面氨基带正电荷, DNA 有带负电荷的磷酸根,两者间由于静电作用相互结合。并且,这种静电作用受到 Dendrimer 的尺寸大小和分子量的影响。Tang 等^[4]通过溴化乙啶(EtBr)在溶液中的荧光亮度强弱来表征 Dendrimer 与 DNA 结合的效率。在不同的 Dendrimer/DNA 比例下,随着 Dendrimer 的增

加,荧光强度逐渐减弱,Dendrimer与DNA的结合逐渐达到饱和。同时,离子强度的不同,对两者之间的结合也有影响。在含有不同浓度的NaCl的溶液中,随NaCl浓度的增高,荧光亮度增高,表明随溶液中离子强度的增高,Dendrimer与DNA的结合减弱。表面活性剂对它们的结合也有一定的影响,其中主要是离子型表面活性剂的影响。Bielinska等^[5]在DNA溶液中分别加入不同浓度的离子型去垢剂(SDS)和非离子型去垢剂(NP-40和APO-10),再加入Dendrimer,琼脂糖凝胶电泳显示加入SDS的Dendrimer与DNA的结合受到阻碍,而NP-40和APO-10都没有这种作用。以糖、肽、OH⁻或丙烯酸等替换Dendrimer表面的氨基,则随着替换程度的增加,Dendrimer与DNA结合程度降低。这些都表明Dendrimer与DNA的结合是静电结合。

电镜下观察发现,PAMAM Dendrimer/DNA结构呈紧密的超环面结构,大多数像厚实、柔软的圆环^[4]。这与文献中长期报道的各种阳离子多聚物与DNA形成的复合物的尺寸与形状均很相似;完整的Dendrimer(intact Dendrimer)与DNA形成的复合物大多聚集成堆,在无盐水溶液中,随DNA浓度从10 ng/ml升至1 mg/ml,生成的沉淀随之增加。断裂的Dendrimer(fractured Dendrimer)与DNA形成的复合物多单个存在,偶尔可见二聚体,极少见三聚体。在一般细胞转染实验中,当DNA浓度低于10ng/ml时,DNA与不同代的Dendrimer形成的复合物不聚集。

Dendrimer对DNA有保护作用,当DNA与Dendrimer结合后,可抵御酶的降解^[4]。Dendrimer/DNA的电荷比小于1:1时,DNA不能完全抵御酶的降解。Dendrimer/DNA的电荷比在1:1到5:1之间时,核酸酶活性被抑制而RNA聚合酶II活性保留。当这个比率大于5:1时,虽然对于培养细胞的转染最有效(先已被证实),但此混合物似乎也显著抑制了体外的转录活性。

3 Dendrimer介导的对细胞的基因转染

Haensler和Szoka最早尝试将PAMAM Dendrimer作为非病毒载体用于体外基因转染^[6]。他们的实验结果证明:在许多细胞系特别是来自人与猴的瘤细胞系中,G5 PAMAM Dendrimer与DNA的复合物都有较高的转染率。进一步降解完整的Dendrimer,发现降解后的Dendrimer介导的转染效率高于完整的Dendrimer。Tang等^[4]经过进一步研究发现,转染效率应归功于降解后的Dendrimer,这一现象的机理还不清楚,可能是增加了分子结构的灵活性。目前,市场上已经商品化的Superfect™(Qiagen, Germany)就是这种经降解的

Dendrimer。

然而,Baker等^[7,8]报道以完整的Dendrimer作为载体将遗传物质有效地转染细胞。需要使用大于第5代并必须加入分散剂(如二乙胺乙基葡聚糖),才能得到较显著的转染效果。由此它们推断二乙胺乙基葡聚糖可能是通过分散已聚集的混合物而改变了Dendrimer/DNA混合物的性质。

一般而言,非病毒载体很难在原代细胞系获得高效基因表达,但PAMAM Dendrimer可以在包括人成纤维细胞(HF1)和人肺上皮细胞等广泛来源的原代细胞系中介导高效的转染^[7]。不过由于生理结构的细微差异,每种细胞系都要经实验找到最适代数的Dendrimer。

借助Dendrimer高效的细胞转染效率,可以帮助人们在体外经过筛选获得稳定表达某一外源基因的细胞株。Eichman等^[1]用含 β -半乳糖苷酶和新霉素抗性基因的质粒以磷酸钙沉淀法、DEAE葡聚糖-DNA或Dendrimer/DNA混合转染D5小鼠黑色素瘤细胞。Dendrimer/DNA混合物产生的稳定的新霉素抗性克隆多于其他混合法近90倍,同时超过1/3的新霉素抗性克隆产生 β -半乳糖苷酶,说明基因被非选择性地整合入细胞基因组并表达。这也预示着如果用Dendrimer/DNA混合物在体内转染细胞,被转染的DNA有可能随机的整合到宿主染色体上。

Dendrimer还可用于输送反义寡核苷酸,使其与互补的目标mRNA结合,阻止信息被翻译成蛋白质,从而达到基因治疗的目的。Kukowska-Latallo等^[7]将PAMAM Dendrimer与反义寡核苷酸或反义mRNA混合,加入已证实可以长期稳定表达荧光素酶的细胞系中,30%~60%的荧光素酶的表达被抑制。这种抑制与DNA浓度、Dendrimer/DNA的电荷比及研究时所用Dendrimer的代数等因素相关。使用浓度为 10^{-12} mol/L的Dendrimer即可特异性的抑制基因表达。

4 Dendrimer介导的基因输送的机理

与病毒载体不同,非病毒载体介导的基因输送的机理还不是很清楚。有关Dendrimer/DNA复合物进入细胞的可能机理,一般认为,过量的Dendrimer使得Dendrimer/DNA复合物的表面带上了正电,这种表面的正电性使得该复合物能够与细胞膜表面带负电的脂蛋白和磷脂相作用。随后,通过膜的被动运输或者细胞内吞,促使Dendrimer/DNA复合物向胞内移动。借助放射标记的DNA或Dendrimer,研究表明Dendrimer/DNA复合物进入大多数细胞的途径主要是通过主动的内吞作用^[7]。进入内涵体后,复合物必须在降解前

被释放到胞质中,这样才能达到基因输送的目的。氯喹等溶酶体特异性的试剂,可以抑制溶酶体内的酶活性或是阻碍内涵体融合形成溶酶体。因此在转染细胞时加入氯喹可以增加基因输送的效率,这也间接的证明了 Dendrimer/DNA 复合物进入细胞是通过上述的途径^[7]。另外,由于有很多氨基存在,分支化的阳离子多聚物被认为具有很强的缓冲能力^[6]。这一特点使得 Dendrimer 能够作为弱碱,阻碍由内涵体-溶酶体酸化所引起的 Dendrimer 自身的降解。

Tang 等^[3]提出 Dendrimer/DNA 从溶酶体中被释放是由于 pH 的改变而造成的。在溶酶体内,随着 pH 的降低,Dendrimer 内部的叔氨基质子化,电性也随之增强。于是,就不需要原先那么多的 Dendrimer 与 DNA 结合,多余的 Dendrimer 就从复合物中游离下来。游离的 Dendrimer 在溶酶体中扩散开来,质子化的叔氨基引发渗透性膨胀,这些最终导致 Dendrimer/DNA 从溶酶体中被释放出来,进入细胞质中。DNA 从内涵体被释放出来以后,DNA 必须穿过核膜进入细胞核才能起作用。DNA 进入细胞核确实发生在转染后的 30 min 内,但是具体的机理还不清楚。在最近的一项研究中,通过观察 PEI/DNA 复合物在细胞内的运动过程,Godbey 等^[9]发现聚合物-DNA 的彻底分离并不是 DNA 进入细胞核所必需的。这说明 Dendrimer 在 DNA 进入核的时候有可能也起了作用。

5 Dendrimer 的安全性及其在体内介导的基因转染

由于根据 PAMAM Dendrimer 的化学结构推断其在体内有较好的稳定性,不易降解,所以目前大部分的研究都集中应用在体外细胞转染实验上。但也有一些工作探讨了在体内应用的可能性。Roberts 等^[10]研究了 G₃,G₅,G₇ Dendrimer 对中国仓鼠肺成纤维细胞(*in vitro*)和雌性 Swiss-Webster 鼠(*in vivo*)的毒性。在体外,PAMAM Dendrimer(G₃,G₅,G₇)的毒性与 Dendrimer 的浓度和代数有关。G₃ Dendrimer 只在高浓度(1.0 mmol/L)影响细胞生长。G₇ Dendrimer 浓度在 1.0~100 mmol/L 时导致细胞不可逆的损伤。在体内实验时,不论是单独或与佐剂联合使用,Dendrimer 都未引起明显的毒性或免疫反应^[11]。但 Malik 等^[11]的研究指出 PAMAM Dendrimer(G₂,G₃,G₄,G₈和 G₁₀)的浓度 > 1.0 mg/ml 时可引起大鼠溶血。在体内引起这些现象的原因还不清楚。

以¹²⁵I 标记的 G₃ 和 G₄ 在给 Wistar 大鼠静脉或腹腔内给药后 60 min,60%~90% 的 Dendrimer 积聚于肝脏,血中仅剩 0.1%~1.0%。也有报道 G₃,G₅ 和 G₇ 代的 Dendrimer 静脉给药,在 Swiss-Webster 小鼠中的分布

则明显不同,G₃ Dendrimer 在肾脏积聚较多,G₅ 和 G₇ Dendrimer 主要积聚在胰^[10]。这些差异可能是由于研究中选用了不同的动物模型和不同代数 Dendrimer 而造成的。

与单独的 Dendrimer 分子相比,Dendrimer/DNA 混合物在尺寸、密度及表面电荷上有所变化,混合物的毒性及体内毒性也将完全不同于单独的 Dendrimer。另外,输送基因时所需 PAMAM Dendrimer 显著地少于上述实验用量。Plank 等^[12]证实,与分别单独静脉注射相比,多聚阳离子与 DNA 混合后再注射,所引起的补体活化(经典或旁路途径)将显著减少。这种减少极大的依赖于多聚阳离子(即 Dendrimer)与 DNA 混合时的电荷比。

Dendrimer 用于体内介导基因输送还处于起步阶段,主要集中在局部基因输送效率的优化上。Qin 等^[13]将未满月的 C57BL/6 或 CBA/J 小鼠处死,取其心脏移植到受者 CBA/J 外耳壳。Dendrimer 与 vIL-10(viral interleukin 10,一种免疫抑制因子)基因混合,在移植时直接注射入移植体。同时以注射裸 DNA 的作为对照组。结果在肌原细胞和移植浸润细胞中,用 G₅ EDA Dendrimer 作载体的实验组,基因的转染效率比对照组高 1 000 倍;而且可测得的转基因表达延长至 28 d,而对照组为 14 d。实验组的移植体存活期为 39 d,对照组为 21 d。同时,用 G₅ EDA 也减少了 DNA 的用量(超过 60 倍):对照组为 20 μg,实验组为 0.31 μg。

最近,Wang 等^[14]在移植的小鼠心脏中,通过冠状动脉注射 Dendrimer/DNA 复合物,进一步考察了 Dendrimer/DNA 在体内基因输送的各种因素。这些因素包括 Dendrimer/DNA 的电荷比、DNA 和 Dendrimer 的浓度、保存移植心脏的溶液、移植时心脏的缺血时间以及血管通透性等。结果表明在 Dendrimer 与 DNA 的电荷比在 20:1 时,有最高的基因表达。另外,延长移植心脏在保存溶液中的温育时间(2 h)以及用血清素预处理移植心脏都可提高基因的表达。

6 结语

PAMAM Dendrimer 是一种高效的非病毒基因输送载体,可以在许多不同的细胞系中实现基因转染的目的,已有广泛的应用。深入研究其中的工作机理以及可能的结构功能关系,将有助于更优化树突状高聚物分子以及其他分枝型高聚物分子基因输送载体的设计和开发。

[关键词] PAMAM dendrimer; 基因治疗; 基因输送

[中图分类号] Q813.6; R456

[文献标识码] A

[参 考 文 献]

[1] Eichman JD, Bielinska AU, Kukowska-Latallo JF, *et al.* The use of PAMAM dendrimers in the efficient transfer of genetic material into cells [J]. *Pharm Sci Technol Today*, 2000, 3(7): 232-245

[2] Esfand R, Tomalia DA. Poly (amidoamine) (PAMAM) Dendrimers: From biomimicry to drug delivery and biomedical applications [J]. *Drug Discov Today*, 2001, 6(8): 427-436.

[3] Tang MX, Redemann CT, Szoka FC. *in vitro* gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers [J]. *Bioconjug Chem*, 1996, 7: 703-714.

[4] Tang MX, Szoka FC. The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes [J]. *Gene Ther*, 1997, 4(8): 823-832.

[5] Bielinska AU, Kukowska-Latallo JF, Baker JR Jr. The interaction of plasmid DNA with polyamidoamine Dendrimers: Mechanism of complex formation and analysis of alterations induced in nuclease sensitivity and transcriptional activity of the complexed DNA [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1997, 1353(2): 180-190.

[6] Haensler J, Szoka FC Jr. Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture [J]. *Bioconjug Chem*, 1993, 4(5): 372-379.

[7] Kukowska-Latallo JF, Bielinska AU, Johnson J *et al.* Efficient transfer of genetic material into mammalian cells using Starburst polyamidoamine Dendrimers [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(10): 4897-4902.

[8] Bielinska A, Kukowska-Latallo JF, Johnson J, *et al.* Regulation of

in vitro gene expression using antisense oligonucleotides or antisense expression plasmids transfected using starburst PAMAM Dendrimers [J]. *Nucleic Acids Res*, 1996, 24(11): 2176-2182.

[9] Godbey WT, Wu KK, Mikos AG. Tracking the intracellular path of poly (ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 5177-5181.

[10] Roberts JC, Bhalgat MK, Zera RT. Preliminary biological evaluation of polyamidoamine (PAMAM) Starburst Dendrimers [J]. *J Biomed Mater Res*, 1996, 30(1): 53-65.

[11] Malik N, Wiwattanapatapee R, Klopsch R, *et al.* Dendrimers: Relationship between structure and biocompatibility *in vitro* and preliminary studies on the biodistribution of ¹²⁵I-labelled polyamidoamine Dendrimers *in vivo* [J]. *J Control Release*, 2000, 65 (1-2): 133-148.

[12] Plank C, Mechtler K, Szoka FC Jr, *et al.* Activation of the complement system by synthetic DNA complexes: A potential barrier for intravenous gene delivery [J]. *Hum Gene Ther*, 1996, 7(12): 1437-1446.

[13] Qin L, Pahud DR, Ding Y, *et al.* Efficient transfer of genes into murine cardiac grafts by Starburst polyamidoamine Dendrimers [J]. *Hum Gene Ther*, 1998, 9(4): 553-560.

[14] Wang Y, Boros P, Liu J, *et al.* DNA/Dendrimer complexes mediate gene transfer into murine cardiac transplants *ex vivo* [J]. *Mol Ther*, 2000, 2(6): 602-608.

[收稿日期] 2003 - 01 - 16

[修回日期] 2003 - 01 - 23

第 8 届全国肿瘤生物治疗学术会议征文通知

中国免疫学会肿瘤免疫和生物治疗分会、中华医学会肿瘤学分会和中国抗癌协会生物治疗专业委员会联合主办，由广州第一军医大学珠江医院承办，计划于 2003 年 12 月 2 ~ 5 日(周二至周五)在广州市召开“第 8 届全国肿瘤生物治疗学术会议”。诚邀国内各位专家与同行踊跃投稿、参加会议交流。会议期间将邀请著名专家报告肿瘤防治的新进展。

征文要求:

凡未在国内外公开刊物发表过的研究资料,请按正式发表论文的要求,寄 800 ~ 1000 字中文摘要,并加盖公章(请附软盘,用 word 97 或 word 2000 输入)。来稿参加优秀论文评选的必须寄全文。所接受的论文摘要将录入会议论文集。

征文主题:

1. 肿瘤生物治疗的新理论与新策略;
2. 肿瘤生物治疗和诊断的新技术;
3. 肿瘤免疫机制研究;
4. 细胞治疗;
5. 细胞因子治疗;
6. 抗体治疗;
7. 肿瘤疫苗;
8. 基因治疗;
9. 中药治疗;
10. 与常规治疗相结合而组成的新疗法。

征文截稿日期: 2003 年 8 月 31 日(周日),以邮戳为准。

来稿请挂号寄: 广州市工业大道中 253 号,第一军医大学珠江医院细胞治疗中心

邮政编码: 510282

联系人: 郭坤元,李江琪

联系电话: 020-61643187, 020-61643190

传 真: 020-61643188

E. mail: ljzy@sina.com

中国免疫学会肿瘤免疫和生物治疗分会
 中国抗癌协会生物治疗专业委员会
 中华医学会肿瘤学分会
 第一军医大学珠江医院