

精蛋白在改进非病毒载体基因转染中的应用

陆平^{1,2}, 杜永忠², 胡富强², 袁弘², 周建平^{1*} (1.中国药科大学药剂教研室, 南京 210009; 2.浙江大学药学院, 杭州 310058)

摘要: 非病毒基因载体的出现, 为基因治疗提供了低毒、易于大规模制备的载体。但与病毒载体相比, 非病毒基因载体的转染效率仍然偏低, 阻碍了非病毒基因载体的临床应用。本文旨在探讨精蛋白在改进非病毒基因载体方面的应用, 希望通过合理的载体设计与优化, 制备出一种高效、低毒的基因载体。

关键词: 基因载体; 精蛋白; 基因转染; 非病毒基因载体; 基因治疗

中图分类号: R349.83 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2011)04-0307-05

Potential of Protamine for Improving Non-viral Gene Transfection

LU Ping^{1,2}, DU Yongzhong², HU Fuqiang², YUAN Hong², ZHOU Jianping^{1*} (1. Department of Pharmaceutics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; 2. College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

ABSTRACT: Non-viral gene vector, even has merits of nontoxic and easy preparation, has low transfection efficiency compared with viral vector, which handicaps its clinical application. This review tends to provide a new method of improving gene transfection efficiency by protamine. With proper design and optimization, it is possible to prepare an efficient and nontoxic gene vector.

KEY WORDS: gene vector; protamine; gene transfection; non-viral gene vector; gene therapy

基因治疗是指应用基因工程技术手段将正常基因导入患者的靶细胞, 达到治疗目的的一种新型治疗手段。基因治疗最早成功应用于人体免疫缺陷。1990年, 美国国立卫生研究院的安德森教授首次采用基因打靶技术治愈了一名严重复合型免疫功能缺陷患儿^[1]。安德森教授的成功为人类医学治疗开辟了一条新的道路。从那之后, 基因治疗先后成功用于恶性肿瘤、纤维囊泡症、关节炎和心血管病的治疗^[2]。2000年, 人类基因组计划的完成为人类寻找用于有治疗效果的基因提供了更扎实的理论支持。

从第一个基因治疗案例至今的20年间, 全世界有532例临床基因治疗试验在各国医学中心进行, 超过4000名受试者参与到这些研究计划当中^[3]。但是, 直到今天, 通过基因治疗实验痊愈的案例仍然有限, 基因治疗仍无法大规模地开展临床运用, 其最大的困难在于开发一种无毒、高效、无免疫原性的基因治疗载体。当前基因治疗普遍采用转染效率较高的病毒载体^[4], 如腺病毒、逆转录病毒、

单纯疱疹病毒及腺相关病毒等^[2,5]。但病毒载体存在表达持续时间短、较小的基因携带能力, 以及由于病毒本身的免疫原性所带来的安全性问题。1999年, 美国宾西法尼亚大学的威尔森医师在以腺病毒为载体, 进行鸟胺酸甲酰转移酶(OTC)治疗时, 因严重的不良反应, 导致了一名青少年死亡。此外, 在美国还发生了其他6起与基因治疗有关的死亡案例。鉴于基因治疗过程中可能产生的严重问题, 美国食品与药品管理局于2003年1月暂停了国内所有基因治疗的临床运用^[6]。能否找到合适的基因载体, 已经成为基因能否成功治疗的关键。

近年来, 非病毒基因载体的研究为基因治疗带来了一线曙光。文献报道的非病毒基因载体主要包括: 脂质体、树状共聚物及阳离子聚合物^[7-9]。非病毒载体具有较大的载药量、更高的安全性、易于进一步修饰, 以及相对更容易大规模制备的优越性。但是, 与病毒基因载体相比, 其较低的转染效率阻碍了非病毒载体在临床上的应用。目

作者简介: 陆平, 男, 硕士 Tel: (0571)88206741 E-mail: maxworth.lu@163.com
Tel: (025)83271102 E-mail: jpzhoucpu@126.com

*通信作者: 周建平, 男, 博士, 教授, 博导

前的研究采用化学改性或制备多元复合物的方法, 试图提高非病毒载体的转染效率^[10-12], 制备出高转染率、低毒性的非病毒载体。本文旨在总结近期国内外采用精蛋白提高非病毒载体基因转染效果的研究进展。

1 非病毒载体在细胞内的转染机制

非病毒载体在体内的基因转染包括 3 个过程:

- ①细胞对载体的摄取;
- ②载体从内吞体中逃逸;
- ③载体的核转运^[13-14]。

细胞对载体的摄取是载体实现转染的第一步。在这一过程中, DNA 复合物的粒径大小^[15]、复合物的电位、复合物的表面是否含有特异性配体都影响到细胞对载体的摄取。研究表明: 复合物的基因转染效果与复合物粒径相关。Ogris 等^[16]认为: 小粒径的粒子有利于快速的内吞, 但通常较大粒径的 DNA 复合物具有更高的基因转染。Ishii 等^[13]的研究也支持类似的观点。Ishii 等制备了两种类型的复合物, 一种过膜, 除去其中较大粒径 DNA 复合物; 另一种不过膜。两种复合物转染实验表明: 未过膜的复合物具有更强的基因转染。电位也是影响复合物细胞摄取的一个参数。由于细胞膜表面通常带负电, 一般认为: 带正电的粒子倾向于吸附在细胞表面, 更易于被细胞吸收。采用特异性配体修饰也是常用的提高载体细胞摄取的方法^[11,17]。

载体从内吞体中逃逸是基因转染中的另一个限速过程。如前所述, DNA 复合物首先黏附在细胞膜表面, 之后经过细胞内吞作用进入到细胞内。此时, 复合物需要顺利地内吞体中释放出来, 才有可能实现基因的表达。病毒载体, 如腺病毒载体表面含有融合肽, 病毒载体可以通过融合肽与内吞体的膜融合作用从内吞体中逃逸出来。而一些非病毒载体中不含有融合肽, 因而不能通过膜融合这一过程逃逸。一些 pKa 略小于生理 pH 的物质^[18], 如聚乙烯亚胺(PEI)、精氨酸、聚 L-赖氨酸等, 虽然不含有融合肽, 但是在细胞水平上也能实现基因表达。对于类似于 PEI 的这类非病毒载体, 学界提出了“质子海绵效应”解释它们从内吞体内逃逸的过程。研究表明: PEI 在很大的 pH 范围内具有缓冲能力^[19]。PEI/DNA 复合物在进入内吞体后, PEI 能不断地吸附内吞体内的质子, 导致 PEI 链段中的亚胺基因质子化而带正电。电荷的相互排斥作用直接导致了 PEI 的膨胀。此外, 在质子泵入内吞体的同时, 氯离子也不断地进入

到内吞体中。氯离子的进入, 导致内吞体内的渗透压增加, 吸水量增多, 内吞体膨胀。PEI 的膨胀以及内吞体内渗透压的不断增大最终导致内吞体的破裂, PEI/DNA 复合物被释放到胞浆中, 实现了逃逸。传统的脂质体则主要是通过脂质与内吞体膜的相互作用完成从内吞体中的释放。

现代生物技术的发展使得人们对病毒表面的融合肽有了更加深入的了解。许多研究将融合肽整合到非病毒载体中, 促进非病毒载体从细胞内吞体中的逃逸。Sasaki 等^[20]模拟病毒的结构, 将胆固醇化的 pH 敏感融合肽整合到脂质基因载体中去, 极大地提高了脂质基因载体从内吞体内的逃逸速率。Oliveira 等^[21]依据流感病毒表面融合肽结构, 合成了融合肽 diINF-7, 并将这种融合肽整合载有针对 EGFP 和 K-ras 致癌基因的干扰 RNA (SiRNA) 的非病毒载体中。结果表明: diINF-7 的加入显著提高了 SiRNA 的抑制效果。这也从侧面证明了非病毒载体从内吞体中的逃逸过程是实现非病毒载体基因表达的限速过程。

在分裂细胞上通常能观察到比非分裂细胞更高的基因表达。因为外源性的基因只有在有丝分裂期间, 核膜消失的时候, 才能进入细胞核^[22]。由此可见, 核膜是基因表达过程的一个主要障碍。基因进入细胞核内的量直接影响到基因的表达效果, Tachibana 等^[22]定量研究了基因入核量与基因的表达量之间的关系。在将核定位信号整合到基因治疗载体后, 基因表达效果有一定的增加。但是, 进入细胞核中基因的量与基因表达并不是完全的正相关。随着基因进入细胞核中的量增加, 基因表达是先增加后平衡。这可能与进入细胞核内的基因饱和有关。通过优化载体中核定位信号的量, 有望提高非病毒载体的基因表达量, 进而提高基因治疗的效果。

2 精蛋白的化学组成及特性

精蛋白是从成熟雄鱼体内的精细胞中分离出来的天然物质。其本身具有很好的安全性(鱼精蛋白硫酸盐注射液已通过 FDA 批准用于临床)。精蛋白分为两种: 精蛋白 I 型和精蛋白 II 型。精蛋白 I 型存在于多数哺乳动物的精细胞内, 它的结构相对保守。鱼类精细胞内的精蛋白与哺乳动物的精蛋白 I 型相类似。精蛋白 II 型在自然界中较少见, 其结构相对多样。目前实验中常用到的精蛋白基本都是精蛋白 I 型, 因为这类精蛋白相对容

易获得, 比如从鲑鱼、鳟鱼、青鱼等鱼类或公牛的精细胞中就可能提取到精蛋白 I 型。

不同来源的精蛋白结构上也稍有不同。比如, 从公牛精细胞中提取的精蛋白富含半胱氨酸侧基, 而来自于鲑鱼精细胞的精蛋白则不含半胱氨酸侧基^[23]。但它们之间有一个共同点, 即都富含精氨酸片段。由于精氨酸中含有胍基, 因此, 精蛋白在中性、酸性以及弱碱性环境中都带正电。在自然界中, 精蛋白对压缩 DNA 至关重要。以脊椎动物为例: 在精子的形成过程中, 染色体中的组蛋白或非组蛋白染色体蛋白逐渐变成富含精氨酸的寡肽, 即精蛋白。经精蛋白压缩的 DNA 结构致密, 体积较小, 且不具有转录活性^[23]。据文献报道, 精蛋白是一种核定位信号, 具有一定的核定位功能, 能够靶向进入细胞核^[24]。

3 运用精蛋白改进非病毒载体基因转染的研究

精蛋白带有正电性, 能与 DNA 进行复合, 其本身即可作为基因载体使用。Park 等^[25]采用鲑鱼精蛋白, 将其用嗜热杆菌蛋白酶降解, 得到一种结构类似于 HIV 转录激活蛋白(HIV-TAT 蛋白)的低分子量精蛋白(LMWP)。LMWP 与 HIV-TAT 蛋白具有类似的细胞摄取特性, 15 min 左右即可在胞浆中观察到摄取。经过一段时间后, 进入细胞中的 LMWP 载体大部分富集在细胞核中。转染实验中发现, 当 LMWP 与质粒比例为 2 时, 即可观察到转染, 并且, 在两者比例达到 10 时, 达到最大的转染率。用质量比为 2:1 的 LMWP/DNA 复合物与 DNA 酶(DNase I)孵育 80 min, 未观察到 DNA 遭到降解。这说明 LMWP 对所包含的质粒具有明显的酶保护作用。

精蛋白已用于增加腺病毒载体的转染活性。此外, 近年来, 也有研究将精蛋白与脂质基因载体配合使用, 达到增加脂质基因载体转染活性的目的, 并取得了显著的效果。Li 等^[26]设计了一种精密的非病毒载体, 模仿病毒的结构, 将有治疗效果的 SiRNA 与精蛋白混合, 制备出结构紧密的内核, 之后在外层包裹一层含有 1,2-二油酰-3-三甲胺基丙烷(DOTAP)和胆固醇脂质, 脂质表面接有聚乙二醇(PEG)及茴香酰胺, 使得这种脂质非病毒载体具有长循环及对肺肿瘤的靶向性。Li 等发现, 当复合物中精蛋白的量增加, 基因的转染效率增加。但过多加入精蛋白会使得内核带有正电荷, 使得内核与外层脂质的相互作用力减弱, 进而导

致转染效率下降。Li 等^[27]在上述实验的基础上, 通过调节小牛胰腺 DNA 与精蛋白的量, 控制复合物粒径和电位, 进一步增加复合物靶向效果。其制备得的复合物电位约为 15~20 mV, 弱正电性的电位有利于复合物在肺部的积累。复合物的粒径为 120~150 nm 时可以观察到肿瘤部位有显著的复合物聚集。研究表明: 平均粒径约为 100 nm 的粒子具有最长的血液循环时间和最显著的肿瘤滞留^[28]。

XU 等^[29]模拟病毒结构, 设计出一种十分有效的非病毒载体。作者先将 DNA 与精蛋白结合, 得到一个紧密的结构。之后在外层包裹一层 PEG 化乙烯基磷脂-二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)脂质。DOPE 在低 pH 条件下具有很好的膜融合能力, 外部的 PEG 层能保证载体在体内的稳定性。体外基因转染结果证明了这种基因载体有比 Lipofectamine™ 2000 更好的转染效果, 以及更低的细胞毒性。实验中, 作者发现: 质粒 DNA(pDNA)先与精蛋白复合后, 再包裹在纳米载体中不仅能增加酶保护作用, 也能减小超声及脂质非病毒载体制备过程中对 pDNA 的破坏。此外, 作者从共聚焦图片中看到, 与精蛋白结合后, 精蛋白/DNA 复合物要么聚集在细胞核内, 要么吸附在细胞表面。这可能是因为精蛋白/DNA 复合物在血清中易聚集, 不易被细胞摄取。但精蛋白/DNA 复合物具有很明显的细胞核靶向。

4 精蛋白增加非病毒载体转染的机制探讨

Alderson 等^[30]比较了异硫氰酸荧光素(FITC)标记的精蛋白/DNA 复合物与纯 FITC 标记质粒在 Hela, SOJ, A549 细胞上的摄取, 发现质粒与精蛋白结合后, 其摄取并未增加, 但其转染显著增加。这表明精蛋白增加基因转染效率并不是通过增加载体的摄取来实现的。XU 等^[29]在研究中也发现, 精蛋白/DNA 复合物吸附在细胞表面, 精蛋白的加入, 并没有显著提高细胞对 DNA 的摄取。同时, Alderson 等^[30]发现: 精蛋白并不能帮助载体从内吞体中逃逸。

精蛋白增加非病毒载体的基因转染主要通过细胞内的核定位^[31]以及对 DNA 一定的酶保护作用^[29-30]。Masuda 等^[31]确认了精蛋白的这种核定位功能。Masuda 分别采用胞浆内注射及细胞核内注射的方法, 确定精蛋白在基因转染中的作用。在胞浆注射中, 随着精蛋白/DNA 复合物中精蛋白的质量比从 2 增加到 9, 复合物的入核量增加。在精

蛋白/DNA/脂质体三元复合物中，当精蛋白与DNA的比例 >2 时，三元复合物的转染显著增强，但聚左旋赖氨酸/DNA/脂质体三元复合物的转染并没有显著增强。这说明精蛋白具有显著的核定位作用，并且这种核定位作用与转染率的增加相关。

除核定位外，精蛋白可以提供一定的酶保护功能。例如，Alderson等^[30]通过将荧光蛋白质粒(pCX-EGFP)与精蛋白结合，就成功避免了DNase I对质粒的降解。XU等^[29]也在研究中发现将精蛋白与DNA结合，可以减少外部因素对DNA的影响，增加DNA的稳定性。

精蛋白已被FDA批准用于与DNA联合使用。之前许多研究已经证明了精蛋白可以增加脂质基因载体的转染效果。精蛋白增加非病毒载体的基因转染主要通过细胞内的核定位以及对DNA一定的酶保护作用来实现。将精蛋白与非病毒载体配合使用，通过合理的设计与处方优化，有望增加基因转染，减小载体用量，降低基因载体的毒性。目前将精蛋白与聚合物载体配合使用的研究还不多，因而可以考虑将精蛋白的应用拓展到聚合物基因载体上去。精蛋白在基因载体运用有望推动基因载体朝着低毒、高效的方向迈进一大步。

REFERENCES

- [1] ANDERSON W F. Prospects for human gene therapy [J]. *Science*, 1984, 226(4673): 401-409.
- [2] ROBBINS P D, GHIVIZZANI S C. Viral vector for gene therapy [J]. *Pharmacol Ther*, 1998, 80(1): 35-47.
- [3] BARAM M. Making clinical trials safer for human subjects [J]. *Am J Law Med*, 2001, 27(2/3): 253-282.
- [4] ST GEORGE J A. Gene therapy progress and prospect: adenoviral vector [J]. *Gene Ther*, 2003, 10(14): 1135-1141.
- [5] THOMAS C E, EHRHARD A, KAY M A. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy [J]. *Nat Rev Genet*, 2003, 4(5): 346-358.
- [6] JUENGST E T. What next for human gene therapy? Gene transfer often has multiple and unpredictable effects on cells [J]. *BMJ*, 2003, 326(7404): 1410-1411.
- [7] ZHANG L, NGUYEN T L U, BERNARD J, et al. Shell-cross-linked micelles containing cationic polymers synthesized via the RAFT process: toward a more biocompatible gene delivery system [J]. *Biomacromolecules*, 2007, 8(9): 2890-901.
- [8] WASUNGU L, HOEKSTRA D. Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes [J]. *J Control Release*, 2006, 116(2): 255-264.
- [9] KIM T, BAI C Z, NAM K, et al. Comparison between arginine conjugated PAMAM dendrimers with structural diversity for gene delivery systems [J]. *J Control Release*, 2009, 136(2): 132-139.
- [10] MANSOURIA S, CUIEB Y, WINNIK B F, et al. Characterization of folate-chitosan-DNA nanoparticles for gene therapy [J]. *Biomaterials*, 2006, 27(9): 2060-2065.
- [11] VEISEH O, KIEVIT F M, GUNN J W, et al. A ligand-mediated nanovector for targeted gene delivery and transfection in cancer cells [J]. *Biomaterials*, 2009, 30(4): 649-657.
- [12] OLIVEIRA S, ROOY I V, KRANENBURG O, et al. Fusogenic peptides enhance endosomal escape improving siRNA-induced silencing of oncogenes [J]. *Int J Pharm*, 2007, 331(2): 211-214.
- [13] ISHII T, OKAHATA Y, SATO T. Mechanism of cell transfection with plasmid/chitosan complexes [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1514(1): 51-64.
- [14] THOMAS M, KLIBANOV A M. Non-viral gene therapy: polycation-mediated DNA [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, 62(1): 27-34.
- [15] LEE K Y, KWON I C, KIM Y H, et al. Preparation of chitosan self-aggregates as a gene delivery system [J]. *J Control Release*, 1998, 51(2/3): 213-220.
- [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 PharmSci*, 2001, 3(3): 43-53.
- [17] KIM H S, JEONG J H, CHO K C, et al. Target-specific gene silencing by siRNA plasmid DNA complexed with folate-modified poly(ethylenimine) [J]. *J Control Release*, 2005, 104(1): 223-232.
- [18] FUNHOFF A M, NOSTRUM C F V, KONING G A, et al. Endosomal escape of polymeric gene delivery complexes is not always enhanced by polymers buffering at low pH [J]. *Biomacromolecules*, 2004, 5(1): 32-39.
- [19] HARPE V, PETERSON V, LI H, et al. Characterization of commercially available and synthesized polyethylenimines for gene delivery [J]. *J Control Release*, 2000, 69(2): 309-322.
- [20] SASAKI K, KOGURE K, CHAKI S, et al. An artificial virus-like nano carrier system: Enhanced endosomal escape of nanoparticles via synergistic action of pH-sensitive fusogenic peptide derivatives [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2008, 391(8): 2717-2727.
- [21] OLIVERIRA S, ROOY I V, KRANENBURG O, et al. Fusogenic peptides enhance endosomal escape improving siRNA-induced silencing of oncogenes [J]. *Int J Pharm*, 2007, 331(2): 211-214.
- [22] TACHIBANA R, HARASHIMA H, SHINOBARA Y, et al. Quantitative studies on the nuclear transport of plasmid DNA and gene expression employing nonviral vectors [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 52(3): 219-226.
- [23] VILFAN I D, CONWELL C C, HUD N V. Ormation of native-like mammalian sperm cell chromatin with folded bull protamine [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(19): 20088-20095.
- [24] COLLINS E, BIRCHALL J C, WILLIAMS J L, et al. Nuclear localisation and pDNA condensation in non-viral gene delivery [J]. *J Gene Med*, 2007, 9(4): 265-274.
- [25] PARK Y J, LIANG J F, KO K S, et al. Low molecular weight protamine as an efficient and nontoxic gene carrier: *In vitro* study [J]. *J Gene Med*, 2003, 5(8): 700-711.
- [26] LI S D, HUANG L. Targeted delivery of antisense oligodeoxynucleotide and small interference RNA into lung cancer cells [J]. *Mol Pharm*, 2006, 3(5): 579-588.
- [27] LI S D, CHEN Y C, HACKETT M J, et al. Tumor-targeted delivery of siRNA by self-assembled nanoparticles [J]. *Mol Ther*, 2008, 16(1): 163-169.
- [28] LI S D, HUANG L. Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles [J]. *Mol Pharm*, 2008, 5(4): 496-504.

- [29] XU Z H, GU W W, CHEN L L, et al. A smart nanoassembly consisting of acid-labile vinyl ether PEG-DOPE and protamine for gene delivery: Preparation and *in vitro* transfection [J]. Biomacromolecules, 2008, 9(11): 3119-3126.
- [30] ALDERSON J, WILSON B, LAIBLE G, et al. Protamine sulfate protects exogenous DNA against nuclease degradation but is unable to improve the efficiency of bovine sperm mediated transgenesis [J]. Anim Reprod Sci, 2006, 91(1/2): 23-30.
- [31] MASUDA T, AKITA H, HARASHIMA H. Evaluation of nuclear transfer and transcription of plasmid DNA condensed with protamine by microinjection: The use of a nuclear transfer score [J]. FEBS Lett, 2005, 579(10): 2143-2148.

收稿日期: 2010-03-17