文章编号:1000-5404(2005)24-2475-03

综述

阳离子脂质体的研究进展

Current development of cationic liposome

雷 撼 综述,钱桂生 审校 (第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室,重庆 400037)

基因治疗面临的首要技术问题是基因药物的载体,目前用于基因治疗的载体主要分为两大类:病毒载体和非病毒载体。病毒载体虽然在基因转移方面具有一定的优点,但在体内具有较大的潜在危险,限制了它在临床基因治疗上的应用。非病毒载体中最具典型的是阳离子脂质体(cationic liposomes)载体,它具有可自然降解、无免疫原性、可重复转染等优点,近年来备受研究者的重视,至今已有数10种阳离子脂质体被研制合成出来。现就其进展综述如下。

1 阳离子脂质体的结构和组成

阳离子脂质体通常由一个单一的阳离子两亲化合物和一个中性脂质组成,而前者又称为细胞转染素(cytofectin),研究发现细胞转染素的结构和它与中性脂质、辅助成分的组合,对阳离子脂质体的转染效率有重要影响。

1.1 细胞转染素的结构

细胞转染素的基本结构是一个带正电荷的头基团(亲水基团)连接在一个疏水基团上,头基团一般是带有一个或数个氨基的长链胺类基团,疏水基团则主要有两类:脂肪酰链和胆固醇环。细胞转染素分子结构的差异很大,目前以DOTMA类似体、烷基胺复合物、胆固醇衍生物应用较为广泛,种类较多。

最先出现的胆固醇衍生物类细胞转染素是1991年Gao报道的DC-Chol,它是由一个单一的可质子化胺与胆固醇缩合而成,以后又出现了多个胆固醇衍生物类细胞转染素的合成报道。一般认为,含多价电荷头基团较只有单价电荷头基团的细胞转染素转染效能更高,多胺的多阳离子易与核酸形成静电复合物,胆固醇的亲脂性使其可顺利通过质膜,因此多胺胆固醇缀合物是细胞转染素中效果较好的核酸运载载体。研究表明,多胺胆固醇缀合物构成的细胞转染素中,支链多胺胆固醇缀合物的多阳离子电荷分布较直链多胺胆固醇更为集中,是更好的核酸运载载体。Okayama等[1]合成了3个多胺胆固醇类的细胞转染素,其中带羟乙基氨基头基团的化合物Ⅰ的转染效率最高,认为在该类细胞转染素中提高氨基头基团的亲水性有助于促进转染效率。Huang等[2]将含硫胆固醇通过双硫键连接在细胞转染素的阳离子胺基上,以此构成的阳离子脂质体能较好的包裹DNA,避免被DNA酶消化并快速释放DNA,因此具有较高的转染效率。

作者简介:雷 撼(1965-),男,重庆市人,博士,主治医师,讲师,主要从事人β防御素方面的研究,现在上海市东方医院呼吸科。电话:(021)38004518-7217

收稿日期:2005-07-28;修回日期:2005-09-25

1.2 阳离子脂质体的构成及制备

将细胞转染素制备成阳离子脂质体通常需要中性或兼性辅助脂(colipid)与之结合,如二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)、磷脂酰胆碱(PC),这些中性磷脂起到稳定双层膜和降低阳性成分毒性的作用,同时提供阳性脂质的细胞渗透功能。DOPE是应用最广的中性磷脂,它具有很强的细胞膜去稳定化作用,在阳离子脂质体介导的基因转染中起到关键作用。

阳离子脂质体的制备通常是先将细胞转染素和中性脂质溶解混合,经反相蒸发后加入水或含水的混合溶液,再用漩涡和/或超声振荡的方式来制成悬液。用DOTMA类似体制备的阳离子脂质体一般是等摩尔比的细胞转染素和DOPE在室温下混合,用漩涡振荡制成较大的多层膜囊泡,然后用超声振荡形成适于基因转染的小的单层膜囊泡。但阳离子脂质体LipofectAMINE中DOSPA:DOPE为3:1,而用DOTAP制备的脂质体不加中性脂质也有转染活性。胆固醇衍生物类脂质体通常也是细胞转染素与DOPE按不同摩尔比率制成,但由亚精胺胆固醇构成的Transfectall却不含辅助脂。研究表明用油/水乳剂制备阳离子脂质体能获得更好的稳定性,可减少血清对脂质体的抑制作用[3]。用冻融薄膜法制备的阳离子脂质体被认为有较好的包埋率和较大的脂质体颗粒[4]。

2 阳离子脂质体的基因转染机制

阳离子脂质体介导的基因转染过程通常被分为三步:首先阳离子脂质体与DNA通过静电作用相结合,构成脂质体/质粒复合体;其次,脂质体/质粒复合体通过某种机制进入细胞内,在细胞内分解并释放质粒NDA;最后核酸进入细胞核并在相应位点整合,使转染基因得以表达[5]。

2.1 脂质体/质粒复合体的结构和特性

质粒是表面带负电荷的亲水性大分子,具有的ζ电位,超螺旋DNA较线状或有缺口的环状DNA有更高的负电荷密度,这些特征可阻止质粒通过完整的生物学屏障,脂质体与质粒结合后将改变质粒的一些性状。脂质体/质粒复合体的组成及特性对脂质体的转染活性有重要影响。

脂质体/质粒复合体具有多种不同的构型,如线样结构、囊泡样结构、串珠形态等,至今还不能确定哪一种构型最有利于基因转染。脂质体与质粒的不同比值对脂质体/质粒复合体形态和结构有明显影响。Gershon等用DOTMA或DOPE/DOTMA(摩尔比1:1)滴定一定浓度荧光探针标记的DNA,起始时脂质体在核酸周围结合并形成群集的囊泡,到一定浓度时,阳离子脂质体中和了DNA的负电荷,引起脂质体融合和DNA发生萎

缩并被脂质体包裹，最终形成了脂质体/质粒复合体。许多研究[6]发现阳离子脂质体与 DNA 结合后，DNA 平整地夹于双分子层脂质中间，形成高度有序的多层夹心饼样层间结构。Koltover L 的实验显示脂质体/DNA 比例低时，脂质体像线形串珠附着在 DNA 上，当比例高时，线形的 DNA 插入脂质体脂双层或被脂质体包被。

脂质体/质粒复合体的粒径大小受脂质体与质粒所带电荷比例的影响[7]。当正/负电荷的比率小于 1 时，有游离的或松散连接的 DNA 存在，超过 1 时可出现粒径大于 100 nm 的具有多层膜结构的复合体，它能将 DNA 包入微囊中，保护 DNA 免于核酸酶的降解、气雾剂的剪切和超声制作时的损害。Almofti 等[8]电镜观察不同电荷比的脂质体/质粒复合体，当电荷比值为 1 时粒径最大，高于或低于 1 粒径均逐渐变小，认为电荷比值为 1 时，脂质体与 DNA 静电排斥作用消失，易于集聚成堆；大于或小于 1 时，产生的静电斥力使脂质体-DNA 均匀分散。Nakanishi 等[9]研究发现游离脂质体的粒径为 200 nm 的单层颗粒，电荷比值为 0.6 时，脂质体/质粒复合体呈沿着环状质粒分布的项圈样小颗粒串珠，电荷比值为 1.2 时，复合体则融合为将 DNA 包入其中的粒径 1 ~ 1.4 μm 的大囊泡，他认为形成这种包封样的大囊泡是脂质体介导基因转染所必需的。而 Fenske 等[10]认为脂质体粒径约 100 nm 时，在体内的半衰期及作用时间长，更适于转染 。

2.2 脂质体/质粒复合体进入细胞

脂质体/质粒复合体进入细胞的途径目前认为有 3 种模式：①直接与细胞质膜融合；②通过细胞内吞作用进入；③与细胞质膜进行脂质交换进入。最初证明脂质体/质粒复合体与细胞膜有融合发生，但进一步的研究显示胞吞作用实际上是复合体进入细胞的主要机制。Almofti[8]的研究表明膜融合与内吞作用同时存在，脂质体/质粒复合体主要是通过细胞内吞作用进入细胞内，而膜的融合过程也参与了脂质体介导的基因转染，且对较大的复合体进入细胞内具有特殊的重要意义，作者认为在与细胞膜发生融合作用之后，复合体通过细胞的内吞作用进入细胞内；膜的融合作用可能触发和/或促进了这个过程。Nakanishi 等[9]认为复合体与细胞膜结合后通过内吞进入细胞，在核内体中脂质体与核内体发生膜融合，使 DNA 从核内体内的复合物中释放出来，接着释放的 DNA 被选择性进入靶细胞核。

2.3 细胞核摄入 DNA 并表达

脂质体/质粒复合体进入细胞后，DNA 必须从中分离出来才能发挥效力，但大部分核酸常常并不能被释放，因此，DNA 进入细胞核是一较为重要的限速过程。Zabner 用阳离子脂质体转染细胞，发现 80% 以上的细胞有脂质体/质粒复合体的进入，但只有小于 50% 的细胞表达转染基因。DOPE 可能有帮助核酸释放的作用，在生理条件下，DOPE 可促进脂质发生多形态的变化，特别是在膜融合时能促使生物膜的薄层液态晶体相变为逆转的六角形相，是促进膜融合使核内体释放 DNA 的关键步骤，能明显提高转染效率[11]。当 DOPE 不是阳离子脂质体的一部分时，脂质体的去污剂效果可能是核内体释放的原因。Xu 认为脂质体与核内体膜之间的静电作用诱使核内体单层膜的阴离子脂质翻转并与脂质体/质粒复合体融合，使细胞转染素的正电荷被中和，脂质体和 DNA 之间的连接作用被破坏，从而使 DNA 释放出来。核酸的大小也是它们能否进入细胞核的重要因素，由于核膜有大约 4×10^4 的通道，因此较大的 DNA 可能难以进入细胞核。

3 影响阳离子脂质体介导的基因转移的因素

阳离子脂质体在基因转染上有很多不确定性，不同细胞、不同时间、不同结构及比率等，可获得不同的转染效果，说明阳离子脂质体介导的基因转移受诸多因素的影响[12]。主要包括以下几个方面。

3.1 阳离子脂质体的结构

细胞转染素分子结构对阳离子脂质体的基因转染效果有着突出的影响。如由于细胞转染素 DOTMA 中有醚键的存在，其介导的转基因效率比 DOTPA 高 10 倍。为了获得高转染效率的阳离子脂质体，研究者们开发合成了许多新型结构的细胞转染素，GL67 和 CTAP 就是这一方面的典型代表[13]，其在肺部的基因转染中显示出突出的转染效率。Fujiwara 等[14]认为多胺的链长、类固醇的结构、亲水和疏水基团的形状和定位可影响多胺胆固醇衍生物类细胞转染素的转染。

阳离子脂质体的制备对转染效率也有影响。首先细胞转染素与 DOPE 的构成比是一个重要因素，不同的阳离子脂质体中细胞转染素与 DOPE 都有特定的摩尔比。另外，制备的溶剂也有一定的作用，Kim 等[15]用水和不同的油成分配制脂质体悬液，在无血清条件下，水悬液较乳剂有更高的转染效率，但在有血清存在的条件下情况则相反，且以角鲨烷制成的脂质体乳剂转染效率最高。在有脂肪酸条件下制备的阳离子脂质体具有比传统阳离子脂质体更高的转染活性[16]。Futaki[17]的实验显示，在脂质体/质粒复合体中加入一种 pH 敏感融合肽 GALA，能促进质粒的释放，从而显著提高转染率。

3.2 阳离子脂质体与 DNA 的比例

脂质体/质粒复合体中两者的比例对基因转染效率有重要的影响[18]。有人认为脂质体/质粒的电荷比在 1∶1 或以上时，核酸转运的效果最佳，在体外转染中，优化的电荷比值常大于 1，而体内转染时其比值率接近 1 较好。Majeti 用 lipid 6 混合等摩尔 DOPE 或 DOPC 制备脂质体，当与 DNA 的电荷比为 1∶1 时，转染率最高[19]。Mahato 等在进行体内基因转染时，静脉注射高比率的脂质体/质粒复合体可获得较好的转染率，而直接的组织内注射则要求两者的比率低。Reed 等[20]则认为恒定的脂质体/质粒复合体浓度更有利于转染，低浓度复合体不能提高转染效率，原因可能是介质（培养基）的稀释使活性成分丢失。

3.3 转染细胞的种类

转染细胞的种类会影响到阳离子脂质体介导的基因转染效率，但原因并不清楚。细胞群体倍增时间越短，细胞分裂越快，脂质体/DNA 复合体越易进入细胞，基因转染效率就越高，如肿瘤细胞；就体内而言，血管内皮细胞、巨噬细胞、单核细胞是最易被转染的细胞类型，但就组织器官而言，肺较其他如肝、脾、肾等高出 10 ~ 1 000 倍，这可能与复合体在通过肺毛细血管时易于沉集等有关。Prasad 用脂质体对 12 种不同类型的细胞进行转染时发现，细胞内吞作用越强，转染率越高，而处于分

裂间期的细胞通过胞吞作用摄取阳离子脂质体的数量较有丝分裂期细胞多,认为可能是细胞处于不同的细胞分裂间期,内吞作用不同,从而造成了转染效率的不同[21]。

3.4　体内众多因素的干扰

阳离子脂质体介导的基因转染在体外和体内有明显的不同,体内基因转染率较低,这主要是由于机体内存在着很多的干扰因素。脂质体/质粒复合体进入体内后,将同细胞外的一些物质发生相互作用,从而影响其理化特性,降低了转染效率。这些物质包括:血液成分、细胞外介质、黏膜分泌物等,白蛋白会吸附到脂质体/质粒复合体上,减少复合体之间的电荷排斥力,导致复合体的聚集并在毛细血管上沉积。有人认为体内基因转运时 DNA 可能被从复合体中提前释放,一些带阴离子基团的细胞外物质,如肝素,可与阳离子脂质结合,而一些带阳离子基团的细胞外物质可与带负电的 DNA 结合,从而使复合体分解。另外体内转染时的途径如静脉、动脉、局部注射和气雾剂吸入等对转染效率均存在不利因素:静脉注射易被网状内皮系统摄取,雾化吸入对脂质体/质粒复合体有破坏,而瘤内局部注射缺乏选择性等。

4　阳离子脂质体在基因转染中的应用

随着阳离子脂质体研究的不断深入,其介导的基因治疗研究也在不断开展。目前,在利用阳离子脂质体进行基因治疗的研究中,研究最多、效果较好的主要在两个方面:一是肺部疾病,如肺囊性纤维化的治疗;另一个则是肿瘤,包括肝癌、肺癌等。在肺部疾病应用较多主要是由于经气道进行局部转染较为容易,且脂质体/质粒复合体容易在肺部聚集。在肿瘤方面,主要是利用脂质体把表达抗原和细胞因子的基因进行局部转染,对肿瘤进行免疫治疗,临床研究报道显示有积极的疗效。阳离子脂质体在其他系统基因治疗的研究也在开展,如心血管疾病、大脑和中枢神经系统、器官移植等。

随着阳离子脂质体研究的不断深入,其转染效率低、缺乏稳定性等主要问题的解决,阳离子脂质体将在基因转染和基因治疗中发挥更大的作用。

关键词:阳离子脂质体;细胞转染素;基因转染

中图法分类号:Q782　　**文献标识码**:A

参考文献:

[1] Okayama R, Noji M, Nakanishi M. Cationic cholesterol with a hydroxyethylamino head group promotes significantly liposome-mediated gene transfection [J]. FEBS Lett, 1997, 408(2): 232 - 234.

[2] Huang Z, Li W, MacKay J A, *et al*. Thiocholesterol-based lipids for ordered assembly of bioresponsive gene carriers [J]. Mol Ther, 2005, 11(3): 409 - 417.

[3] Kim T W, Chung H, Kwon I C, *et al*. Airway gene transfer using cationic emulsion as a mucosal gene carrier [J]. J Gene Med, 2005, 7(6): 749 - 758.

[4] 王健松, 朱家壁, 吕瑞勤, 等. 肺靶向阿奇霉素脂质体的制备及其在小鼠体内的分布[J]. 药学学报, 2005, 40(3): 274 - 278.

[5] Chaltin P, Margineanu A, Marchand D, *et al*. Delivery of antisense oligonucleotides using cholesterol-modified sense dendrimers and cationic lipids [J]. Bioconjug Chem, 2005, 16(4): 827 - 836.

[6] Ewert K, Ahmad A, Evans H M, *et al*. Cationic lipid-DNA complexes for non-viral gene therapy: relating supramolecular structures to cellular pathways [J]. Expert Opin Biol Ther, 2005, 5(1): 33 - 53.

[7] Bordi F, Cametti C, Diociaiuti M, *et al*. Complexation of anionic polyelectrolytes with cationic liposomes: evidence of reentrant condensation and lipoplex formation [J]. Langmuir, 2004, 20(13): 5214 - 5222.

[8] Almofti M R, Harashima H, Shinohara Y, *et al*. Cationic liposome-mediated gene delivery: biophysical study and mechanism of internalization[J]. Arch Biochem Biophys, 2003, 410(2): 246 - 253.

[9] Nakanishi M, Noguchi A. Confocal and probe microscopy to study gene transfection mediated by cationic liposomes with a cationic cholesterol derivative [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2001, 52(3): 197 - 207.

[10] Fenske D B, Cullis P R. Entrapment of small molecules and nucleic acid-based drugs in liposomes [J]. Methods Enzymol, 2005, 391: 7 - 40.

[11] Zuhorn I S, Bakowsky U, Polushkin E, *et al*. Nonbilayer phase of lipoplex-membrane mixture determines endosomal escape of genetic cargo and transfection efficiency [J]. Mol Ther, 2005, 11(5): 801 - 810.

[12] Carriere M, Escriou V, Jollet A, *et al*. New synthetic glycolipids for targeted gene transfer: synthesis, formulation in lipoplexes and specific interaction with lectin [J]. Drug Deliv, 2004, 11(6): 351 - 363.

[13] Lee E R, Marshall J, Siegel C S, *et al*. Detailed analysis of structures and formulations of cationic lipids for efficient gene transfer to the lung [J]. Hum Gene Ther, 1996, 7(14): 1701 - 1717.

[14] Fujiwara T, Hasegawa S, Hirashima N, *et al*. Gene transfection activities of amphiphilic steroid-polyamine conjugates [J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1468 (25): 396 - 402.

[15] Kim Y J, Kim T W, Chung H, *et al*. The effects of serum on the stability and the transfection activity of the cationic lipid emulsion with various oils [J]. Inter J Pharm, 2003, 252(1 - 2): 241 - 252.

[16] Majeti B K, Karmali P P, Madhavendra S S, *et al*. Example of fatty acid-loaded lipoplex in enhancing *in vitro* gene transfer efficacies of cationic amphiphile [J]. Bioconjug Chem, 2005, 16(3): 676 - 684.

[17] Futaki S, Masui Y, Nakase I, *et al*. Unique features of a pH-sensitive fusogenic peptide that improves the transfection efficiency of cationic liposomes [J]. J Gene Med, 2005, 18(4): 18 - 21.

[18] Li W, Ishida T, Okada Y, *et al*. Increased gene expression by cationic liposomes (TFL-3) in lung metastases following intravenous injection [J]. Biol Pharm Bull, 2005, 28(4): 701 - 706.

[19] Majeti B K, Karmali P P, Reddy B S, *et al*. *In vitro* gene transfer efficacies of N, N-dialkylpyrrolidinium chlorides: a structure-activity investigation [J]. J Med Chem, 2005, 48(11): 3784 - 3795.

[20] Reed C A, Peralta E R, Wenrich L M, *et al*. Transfection protocol for antisense oligonucleotides affects uniformity of transfection in cell culture and efficiency of mRNA target reduction [J]. Oligonucleotides, 2005, 15(1): 12 - 22.

[21] Prasad T K, Rangaraj N, Rao N M. Quantitative aspects of endocytic activity in lipid-mediated transfections [J]. FEBS Lett, 2005, 579(12): 2635 - 2642.

(编辑　陈聪连)