

# 阳离子脂质体介导的基因转移机制\*\*☆◆

王冰<sup>1,2</sup>, 张树彪<sup>2</sup>, 周集体<sup>1</sup>, 赵不凋<sup>2</sup>, 杨宝灵<sup>2</sup>, 崔绍辉<sup>2</sup>, 赵轶男<sup>2</sup>

## Mechanisms of cationic liposome-mediated gene transfer

Wang Bing<sup>1,2</sup>, Zhang Shu-biao<sup>2</sup>, Zhou Ji-ti<sup>1</sup>, Zhao Bu-diao<sup>2</sup>, Yang Bao-ling<sup>2</sup>, Cui Shao-hui<sup>2</sup>, Zhao Yi-nan<sup>2</sup>

### Abstract

**BACKGROUND:** Compared with viral vector, many cationic lipids naturally occurred or synthesized have been used for gene transfer in the form of liposomes, which have the advantages of non-immunogenicity, simple production, plasmid protected against nuclease degradation and non-oncogenicity, etc. And cationic lipids as an effective alternative of viral vector, cationic liposomes can be used for cell transfection *in vivo* and *in vitro*.

**OBJECTIVE:** To introduce research progress on mechanisms of cationic liposome-mediated gene transfer.

**METHODS:** CNKI database from 1987 to 2010 and PubMed database from 1987 to 2010 were retrieved by the first author with computer. The index words were "gene therapy, cationic liposome, gene transfer, mechanism" in Chinese and English.

Literatures were limited to Chinese and English languages. From cationic liposome gene transfer and gene transfer mechanisms were summarized, the cationic liposome-mediated gene transfer mechanisms were reviewed.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Totally 108 literature were retrieved and selected according to inclusion and exclusion criteria, 20 of them were included. The cationic liposome-mediated gene transfer mechanisms were reviewed, including the formation of the cationic lipid / DNA complexes, cell uptake, inclusion body release, complex dissolution, and nucleus intake research. The results indicated that research on structure-activity relationship of lipids and the mechanism of gene transfer is the key to improve cationic liposome transfection efficiency and optimize gene therapy.

Wang B, Zhang SB, Zhou JT, Zhao BD, Yang BL, Cui SH, Zhao YN. Mechanisms of cationic liposome-mediated gene transfer. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2011;15(8):1459-1462. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

### 摘要

**背景:** 与病毒载体相比, 许多天然与合成的阳离子类脂以脂质体的形式用于基因转移, 具有无免疫原性、易生产、质粒免受核酸酶降解和无致癌性等优点, 并且作为病毒载体的有效替代物, 阳离子脂质体用于细胞的体内和体外转染。

**目的:** 介绍阳离子脂质体介导的基因转移机制研究进展。

**方法:** 由第一作者用计算机检索中国期刊全文数据库(CNKI: 1987/2010)和 PubMed (1987/2010)数据库, 检索词分别为“基因治疗、阳离子脂质体、基因转移、机制”和“gene therapy, cationic liposome, gene transfer, mechanism”, 语言分别设定为中文和英文。从阳离子脂质体基因转染和基因转移机制进行总结, 综述了阳离子脂质体介导的基因转移机制。

**结果与结论:** 共检索到 108 篇, 按纳入和排除标准对文献进行筛选, 共纳入 20 篇文章。综述了阳离子脂质体介导的基因转移机制, 包括阳离子脂质体/DNA 复合物的形成、细胞吸收、内含体释放和复合物解体以及细胞核摄入等方面的研究内容。结果提示, 对类脂构效关系和基因转移机制的研究, 是提高阳离子脂质体转染效率和优化基因治疗的关键。

**关键词:** 基因治疗; 阳离子脂质体; 基因转移; 基因转染; 组织工程

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.08.031

王冰, 张树彪, 周集体, 赵不凋, 杨宝灵, 崔绍辉, 赵轶男. 阳离子脂质体介导的基因转移机制[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(8):1459-1462. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

## 0 引言

基因治疗是一种通过载体将目的基因转移到靶细胞内进行适度表达以治疗疾病为目的的生物学治疗方法。其有效性已得到临床验证<sup>[1-3]</sup>。基因转移系统的发展必将推动基因治疗向常规治疗方法转变。基因治疗载体一般分为病毒型载体和非病毒型载体, 因非病毒载体具有低毒、无免疫原性、易生产、质粒免受核酸酶降解和无致癌性等优点, 所以备受关注<sup>[1]</sup>。Felgner等<sup>[4]</sup>利用阳离子类脂作为转染载体以来, 作为病

毒载体的有效替代物, 阳离子类脂脂质体用于细胞的体内和体外转染。近年来, 关于转运机制的研究方面, 在脂质体/DNA复合物的形成, 细胞结合, 细胞摄入等方面取得了一定进展<sup>[5]</sup>, 然而核摄入机制仍然存在争议。对类脂构效关系和基因转移机制的研究, 是提高阳离子脂质体转染效率和优化基因治疗的关键<sup>[6]</sup>。文章综述了阳离子脂质体介导的基因转移机制。

## 1 资料和方法

1.1 纳入和排除标准 纳入标准: ①具有原创性,

<sup>1</sup>School of Environmental and Biological Science, Dalian University of Technology, Dalian 116024, Liaoning Province, China; <sup>2</sup>Key Laboratory of State Ethnic Affairs Commission-Ministry of Education, Dalian Nationalities University, Dalian 116600, Liaoning Province, China

Wang Bing ☆, Studying for doctorate, Lecturer, School of Environmental and Biological Science, Dalian University of Technology, Dalian 116024, Liaoning Province, China; Key Laboratory of State Ethnic Affairs Commission-Ministry of Education, Dalian Nationalities University, Dalian 116600, Liaoning Province, China wangbing@dlnu.edu.cn

Correspondence to: Zhang Shu-biao, Doctor, Professor, Key Laboratory of State Ethnic Affairs Commission-Ministry of Education, Dalian Nationalities University, Dalian 116600, Liaoning Province, China zsb@dlnu.edu.cn

Correspondence to: Zhou Ji-ti, Doctor, Professor, School of Environmental and Biological Science, Dalian University of Technology, Dalian 116024, Liaoning Province, China zji@dlnu.edu.cn

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 20876027; Youth Foundation of Dalian Nationalities University, No. 2008A202\*

Received: 2010-09-16 Accepted: 2010-12-17

<sup>1</sup> 大连理工大学环境与生命学院, 辽宁省大连市 116024; <sup>2</sup> 大连民族学院国家民委-教育部重点实验室, 辽宁省大连市 116600

王冰☆, 女, 1975年生, 辽宁省朝阳市人, 汉族, 大连理工大学环境与生命学院在读博士, 讲师, 主要从事环境生物工程和病毒基因载体的研究。  
wangbing@dlnu.edu.cn

通讯作者: 张树彪, 博士, 教授, 大连民族学院国家民委-教育部重点实验室, 辽宁省大连市 116600  
zsb@dlnu.edu.cn

并列通讯作者: 周集体, 博士, 教授, 大连理工大学环境与生命学院, 辽宁省大连市 116024  
zji@dlut.edu.cn

中图分类号: R318  
文献标识码: A  
文章编号: 1673-8225(2011)08-01459-04

收稿日期: 2010-09-16  
修回日期: 2010-12-17  
(20100731001/MJ-L)

论点论据可靠的阳离子脂质体介导的基因转移机制进展类文章。②观点明确, 分析全面的载体胞内路径类文章。③文献主题内容与阳离子脂质体基因转移研究进展及胞内递送机制联系紧密的文章。排除标准: ①Meta分析。②阳离子类脂基因载体合成类文章。③重复性研究。

1.2 资料检索策略 第一作者用计算机检索中国期刊全文数据库(CNKI: 1987/2010)和PubMed (1987/2010)数据库, 检索词分别为“基因治疗、阳离子脂质体、基因转移、机制”和“gene therapy, cationic liposome, gene transfer, mechanism”, 语言分别设定为中文和英文。

1.3 资料提取和文献质量评价 共检索到108篇文献, 按纳入及排除标准筛选后, 共纳入20篇文章<sup>[1-20]</sup>。

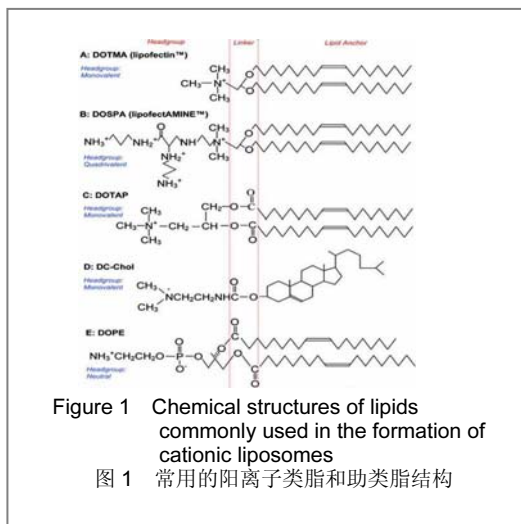
## 2 结果

2.1 纳入资料基本概况 纳入的文章包括基因治疗和病毒载体的研究背景类文章3篇<sup>[1-3]</sup>。阳离子类脂和脂质体结构及特征文章3篇<sup>[7-9]</sup>, 阳离子脂质体基因转染和基因转移机制文章14篇<sup>[4-6, 10-20]</sup>。以此为依据对阳离子脂质体介导的基因转移机制进行归纳和总结。

### 2.2 纳入资料的研究结果特征

2.2.1 阳离子类脂和脂质体 脂质体, 是类脂分子在水相中的自组装体, 它含有一个或多个类脂双层膜(Bilayer), 在每个双层膜结构中, 类脂分子中的疏水部分通过疏水相互作用结合在一起, 极性亲水部分指向环境中的水相<sup>[7-9]</sup>。

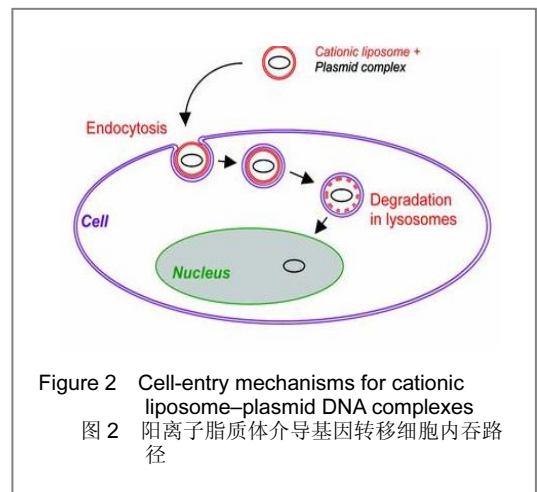
阳离子类脂分子主要由3部分构成: 阳离子头部, 连接键和疏水烃尾<sup>[9]</sup>, 见图1。



带正电的阳离子脂质体分子头部与DNA之

间产生的静电引力, 是阳离子脂质体/DNA复合物形成的主要作用力。连接键是类脂分子的重要组成部分, 影响脂质分子的化学稳定性及生物降解性, 是转染效率高以及细胞毒性大小的重要因素, 其主要由醚键、酯键和氨基甲酸酯键等组成。疏水尾部主要有两种: 一种是两条脂肪链, 另一种是胆固醇, 影响所形成脂质体的稳定性与流动性<sup>[8]</sup>。

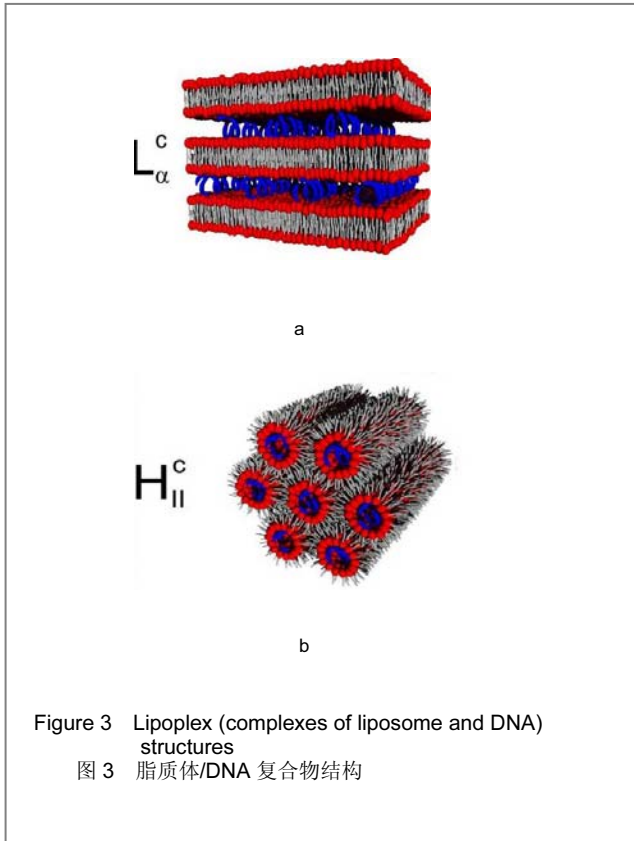
2.2.2 脂质体介导的基因转移机制 阳离子脂质体介导基因进入细胞质的主要机制为内吞路径<sup>[9]</sup>, 见图2。



主要过程如下: 阳离子脂质体与DNA分子通过静电作用形成阳离子脂质体/DNA复合物(lipoplex), 然后带正电的阳离子脂质体/DNA复合物由于静电作用吸附于带负电的细胞膜表面, 通过内吞作用进入细胞形成内涵体, 进而复合物内涵体释放, 最后DNA分子摄入细胞核进行转录表达。

阳离子脂质体/DNA复合物的形成: 阳离子脂质体与带负电的DNA分子通过静电作用形成阳离子脂质体/DNA复合物<sup>[10-11]</sup>, 见图3(红色为类脂头部, 灰色为碳链尾部, 蓝色为DNA棒状结构)。

阳离子脂质体并不将DNA包裹在其脂质双分子层中, 两者直接混合即可得到一种稳定的复合物。这些两性分子较容易在生理离子强度及pDNA存在情况下进行有效的反向六角型( $H_{II}^C$ )相变, 从而能够进行有效的基因转染。就阳离子类脂的化学结构而言, 需要16~18碳不饱和烷基或酰基尾部, 其尾部的长短和饱和度会影响到复合物内部的作用进而影响到对DNA的包裹效率。补偿离子的释放是形成复合物的动力。而助类脂DOPE的存在是有助于复合物由 $L_\alpha^C$ 向 $H_{II}^C$ 相变<sup>[10]</sup>。



除了两性离子本身的物化特性外, 脂质体的制备差异, pDNA大小, 助类脂(DOPE)掺入等因素将最终影响到脂质体/DNA复合物的结构和稳定性, 进而影响转染效率。

阳离子脂质体/DNA复合物进入细胞的内吞机制: 阳离子脂质体/DNA复合物通过静电作用吸附(或靶向配体结合)在细胞膜上, 复合物进入细胞的模式与具体的复合物结构和细胞类型有关。首先, 复合物可直接与细胞膜融合, Felgner等<sup>[4]</sup>将细胞与用碱性蒽香红标记的DOTMA/DOPE/DNA复合物一起培养, 发现细胞膜表面分布有荧光标记物, 有力地证明了该模式的可能性。其次, 复合物进入细胞主要是以内吞作用实现的。目前已提出的主要有3种模式<sup>[10]</sup>, 包括噬菌吞噬、胞饮和受体介导的内吞作用。然而对于哪些路径主要介导阳离子脂质体的内化路径, 目前研究甚少。有实验报道由网格蛋白成功介导的多种阳离子类脂通过内吞作用转染多种类型细胞。采用何种路径根据细胞类型而定。

一个决定内吞路径的主要因子是脂质体的大小。有报道当粒径在250 nm以下, 采用网格蛋白介导的内吞机制。当粒径接近500 nm, 采用膜内陷介导的内吞机制。然而仍需进一步研究。而对于内化路径与转染效率的关系至今仍知之甚少。

阳离子脂质体/DNA复合物内涵体释放与核摄入: 进入内吞路径, 质粒一旦遇到溶酶体, 可能被降解。质粒必须采取有效的细胞质通路才能实现成功的转染。从内

涵体中释放的过早, 也有可能被降解。而适宜时机从内涵体中释放出来, DNA与复合物有效解离, 在内质网等膜系统和核定位信号系统的帮助下进入细胞核, 可实现成功的转录和表达<sup>[12]</sup>。

核酸能够有效的进入细胞质, 复合物与内涵体之间的膜相互作用至关重要。而PEG基、pH敏感型、糖基派生物阳离子脂质体的成功研制在有效的内涵体释放方面均有贡献。也有研究者通过人工囊泡研究DNA如何从内涵体中释放。既往实验证实, 质粒从内涵体的释放是有效基因转运的一个主要障碍。有研究表明DOPE可使膜不稳, 形成短暂的孔, 然而质粒是否通过这样的方式被释放出来, 许多过程至今不详, 仍需进一步研究<sup>[11, 13-14]</sup>。

### 3 结论

关于基因转运过程的很多方面仍然不清楚, 需要进行深入研究。尤其是复合物的溶酶体释放过程和核酸进入细胞核的过程不详。值得注意的是, 每一个细胞内基因转运过程对转染效率的限制作用都依赖于很多因素, 如载体和靶细胞的类型。

对类脂构效关系和基因转移机制的研究, 是提高阳离子脂质体转染效率和优化基因治疗的关键<sup>[15-17]</sup>。为了提高阳离子脂质体的转染效率, 可以在合成和应用两个阶段入手。在合成方面, 目前研究大多集中在了针对不同的靶细胞寻找高选择性的靶向性配体方面<sup>[18-20]</sup>。

随着生物化学和分子生物学的不断发展, 阳离子脂质体转染基因机制的研究将不断深入。根据不同的治疗要求在已有的阳离子脂质体中进行选择或者设计合成新的阳离子脂质体, 以达到最好的治疗效果。

### 4 参考文献

- [1] Zhang S, Zhao B, Jiang H, et al. Cationic lipids and polymers mediated vectors for delivery of siRNA. *J Control Release*. 2007;123(1):1-10.
- [2] Liu F, Huang L. Development of non-viral vectors for systemic gene delivery. *J Control Release*. 2002;78(1-3):259-266.
- [3] Verma IM, Somia N. Gene therapy-promises, problems and prospects. *Nature*. 1997;389(6648):239-242.
- [4] Felgner PL, Gadek TR, Holm M, et al. Lipofection: a highly efficient lipid-mediated DNAtransfection procedure. *Proc Natl Acad Sci*. 1987;84(21):7413-7417.
- [5] James MB, Giorgio TD. Nuclear-associated plasmid, but not cell-associated plasmid, is correlated with transgene expression in cultured mammalian cells. *Mol ther*. 2000;1(4):339-346.
- [6] Niculescu-Duvaz D, Heyes J, Springer CJ. Structure-Activity Relationship in Cationic Lipid Mediated Gene Transfection. *Current Medicinal Chemistry*. 2003;10(14):1233-1261.
- [7] Martin CW, Puthupparampil S. Cationic liposomes and nucleic acids. *Curr Opin Colloid Interface Sci*. 2001;6:78-84.
- [8] Martin B, Sainlos M, Aissaoui A, et al. The Design of Cationic Lipids for Gene Delivery. *Curr Pharm Des*. 2005;11(3):375-394.
- [9] Lee TW, Matthews DA, Blair GE. Novel molecular approaches to cystic fibrosis gene therapy. *Biochem J*. 2005;387(Pt 1):1-15.
- [10] Wasungu L, Hoekstra D. Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes. *J Control Release*. 2006;116(2):255-264.

[11] Tresset G. The multiple faces of self-assembled lipidic systems. *PMC Biophysics*. 2009;2(1):3.

[12] Elouahabi A, Ruyschaert JM. Formation and Intracellular Trafficking of Lipoplexes and Polyplexes. *Mol ther*. 2005; 11(3):336-347.

[13] Bally MB, Harvie P, Wong FM, et al. Biological barriers to cellular delivery of lipid-based DNA carriers. *Adv Drug Deliv Rev*. 1999;38(3):291-315.

[14] Berezna S, Schaefer S, Heintzmann R, et al. New effects in polynucleotide release from cationic lipid carriers revealed by confocal imaging, fluorescence cross-correlation spectroscopy and single particle trackin. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2005;1669(2):193-207.

[15] Kumar M, Jinturkar K, Yadav MR, et al. Gemini amphiphiles: a novel class of nonviral gene delivery vectors. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 2010;27(3):237-278.

[16] Dewa T, Asai T, Tsunoda Y, et al. Liposomal polyamine-dialkyl phosphate conjugates as effective gene carriers: chemical structure, morphology, and gene transfer activity. *Bioconjug Chem*. 2010;21(5):844-852.

[17] Tros de Ilarduya C, Sun Y, Düzgüneş N. Gene delivery by lipoplexes and polyplexes. *European Journal Pharmaceutic Science*. 2010;40(3):159-170.

[18] Dass CR, Choong PF. Selective gene delivery for cancer therapy using cationic liposomes: In vivo proof of applicability. *J Control Release*. 2006;113(2):155-163.

[19] Mukthavaram R, Marepally S, Venkata MY, et al. Cationic glycolipids with cyclic and open galactose head groups for the selective targeting of genes to mouse liver. *Biomaterials*. 2009;30(12):2369-2384.

[20] Conwell CC, Liu F, Huang L. Several serum proteins significantly decrease inflammatory response to lipid-based non-viral vectors. *Mol ther*. 2008;16(2):370-377.

**关于作者:** 文章资料收集、成文由王冰完成, 文章责任人为王冰, 张树彪, 周集体, 由赵不凋, 杨宝灵, 崔绍辉, 赵轶男参与审校。

**基金资助:** 课题受国家自然科学基金资助项目(20876027)和大连民族学院青年基金资助项目(2008A202)资助。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**伦理批准:** 没有与相关伦理道德冲突的内容。

**此问题的已知信息:** 关于阳离子脂质体运载基因转移机制的研究已经取得了一定进展, 但还不够完善, 需要深入的研究。

**本综述增加的新信息:** 阳离子类脂结构特征是有效实现基因载体功能的关键, 但阳离子脂质体的胞内转运机制至关重要, 以阳离子脂质体与 DNA 分子通过静电作用形成阳离子脂质体/DNA 复合物为基础, 通过细胞膜结合, 内吞作用进入细胞形成内涵体, 进而复合物内涵体释放, 最后 DNA 分子摄入细胞核进行转录表达, 目前研究对内涵体释放和进入细胞核过程仍然需要深入研究。

**临床应用的意义:** 文章剖析了阳离子脂质体运载基因的胞内路径, 为新型载体的设计、合成和最终实现高效的基因转运提供研究依据。

本期专题: 口腔种植材料的生物相容性及临床应用(本刊中文部)①

2 牙种植材料生物学特性及生物相容性对骨结合强度的影响

高军 (解放军第四二一医院, 广东省广州市 510318)

**推荐理由:** 随着医用生物材料的开发, 金属、陶瓷、高分子及其复合材料在口腔种植方面发挥了重要作用, 但目前所使用的生物材料未能在材料与材料之间、材料与机体之间产生有效的化学性与生物性结合, 难以适应人体生长与发育、修复与改建的立体动态变化的复杂环境, 不能达到长期使用的目的。自骨结合概念提出以来, 种植体的骨结合已被公认为是种植成功的标志之一。2008年14期第2705页。

1. 口腔修复膜材料在牙种植中引导骨再生的效应, 2010年161期第2911页。
2. 牙种植材料生物学特性及生物相容性对骨结合强度的影响, 见2008年14期第2705页。
3. 胶原基纳米骨复合重组人骨形成蛋白2及钛膜修复即刻钛种植体周围骨缺损向神经细胞分化的差异比较, 2009年29期5779页。
4. Endopore短种植体在骨量不足颌骨种植中的应用, 2008年36期第7093页。
5. 溶血试验检测碳化硅种植材料的生物相容性, 见2008年10期第1873页。
6. 以口腔黏膜刺激试验检测碳化硅种植材料的生物安全性, 见2008年6期第1059页。
7. 新型牙用碳纳米管种植体材料的制备, 见2008年1期第180页。
8. 钛网连接固定种植体增强初期稳定性的临床应用, 2010年27期第4701页。
9. 新型抗菌不锈钢微螺钉种植体的细胞毒性分析, 2010年16期第2916页。

1 口腔修复膜材料在牙种植中引导骨再生的效应

谢苗苗(青岛大学医学院附属医院口腔科, 山东省青岛市 266000)

**推荐理由:** 试验将量化标准引入观察指标, 在种植手术及二期手术时测量同一位点的牙槽骨厚度, 量化的方法计算“骨生长效果”, 用骨生长效果的大小来比较不同膜材料的成骨效果。该方法的优点在于采用量化指标客观评价不同膜材料的成骨效果, 降低了直观定性评价时的系统误差。同时也避免了X射线片间接观察时结果片面性的缺点, 因此评价效果更加可靠。2010年161期第2911页。