

## PLGA 微粒/纳米粒基因载体的研究进展

曾 萍<sup>1,3,4</sup>, 彭明利<sup>2</sup>, 徐 溢<sup>1,3,4\*</sup>

- (1. 重庆大学化学化工学院, 重庆 400030; 2. 重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室, 重庆 400016;  
3. 重庆大学微纳系统及新材料技术国际研发中心, 重庆 400030;  
4. 重庆大学新型微纳器件与系统技术国家重点学科实验室, 重庆 400030)

**摘要:** 生物可降解聚合物乳酸-羟基乙酸共聚物 (PLGA) 微粒/纳米粒是一种新型的非病毒基因载体, 由于其具有安全、无免疫原性、制备容易和装载容量大等优点而引起越来越多的关注和研究, 特别是在质粒 DNA (plasmid DNA, pDNA) 传递方面具有巨大的研究空间和潜在应用价值。本文依据 PLGA 微粒/纳米粒在基因载体中的研究现状, 重点综述了载体的制备工艺和表面修饰方法及其在基因治疗和基因疫苗传递等方面的应用研究进展。

**关键词:** 乳酸-羟基乙酸共聚物; 基因传递; 基因治疗; 表面修饰

中图分类号: Q782; R945

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 11-1346-08

## Advance in the study of poly(lactide-co-glycolide) nano/microparticles as gene vector

ZENG Ping<sup>1,3,4</sup>, PENG Ming-li<sup>2</sup>, XU Yi<sup>1,3,4\*</sup>

(1. Chemistry and Chemical Engineering College, Chongqing University, Chongqing 400030, China; 2. Key Laboratory of Molecular Biology of Infectious Disease, Chongqing University of Medical Science, Chongqing 400016, China; 3. International R & D Center of Micro-nano Systems and New Materials Technology, Chongqing University, Chongqing 400030, China; 4. National Key Disciplines Lab of Novel Micro-nano Devices and System Technology, Chongqing University, Chongqing 400030, China)

**Abstract:** Biodegradable nano/microparticles of poly(D, L-lactide-co-glycolide) (PLGA) is a novel non-viral gene vector, which has many advantages, such as safety, non-immunogenicity, easy of large-scale preparation and well load-capability. Therefore, more and more attentions and researches have been paid on its application. Especially, PLGA has shown enormous potential application value and space in the field of plasmid DNA (pDNA) delivery system. On the basis of the current situation of PLGA nano/microparticles for pDNA delivery, this paper focused on summarizing the current preparation approaches and surface modified methods of PLGA particle, furthermore showing its application in gene therapy and genetic vaccine delivery. These showed that PLGA nano/microparticles have extensive prospect in the development of controlled gene delivery system.

**Key words:** poly(lactide-co-glycolide); gene delivery system; gene therapy; surface modification

基因治疗是生物治疗的重要组成部分, 该疗法在治疗多种人类重大疾病如遗传病、恶性肿瘤、代谢性疾病以及感染性疾病 (如 AIDS、乙型肝炎) 等方

面具有良好的应用前景, 并将逐渐成为生物医学领域的研究重点。有效的目的基因和安全的基因导入载体是推动基因治疗深入研究和发展的关键<sup>[1]</sup>, 特别是如何将外源基因通过合适的载体系统运送到靶细胞是目前研究的热点。传统基因载体分为病毒载体和非病毒载体两类。病毒载体包括逆转录病毒<sup>[2]</sup>、腺病毒<sup>[3]</sup>、疱疹病毒<sup>[4]</sup>等。该类载体可有效的将外源遗传

收稿日期: 2010-03-29.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30771921).

\*通讯作者 Tel: 86-23-65111022, Fax: 86-23-65104101,

E-mail: xuyibbd@sina.com

物质转入宿主细胞,但是其潜在的免疫安全性和有限的基因携带量限制了在基因载体领域方面的应用;非病毒载体,包括脂质体<sup>[5]</sup>、分子耦联载体和裸露 DNA<sup>[6]</sup>等,对人体更安全,一般无毒性。然而,转染效率低限制了其进一步的应用。因此,开发新型安全有效的基因载体在基因治疗等研究领域中具有更大的科学意义和研究价值。

聚乳酸-羟基乙酸共聚物 [poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA] 是一类可降解的功能高分子有机聚合物,通过美国 FDA 认证,具有良好的生物相容性、无毒、无刺激性、无免疫原性和药物缓释等特性<sup>[7]</sup>,广泛应用于基因载体。PLGA 一般制成微粒或纳米粒(简称微/纳米),本文主要涉及 100 nm~10 μm 的微/纳米基因载体。大量研究表明细胞对载体的摄取效率和靶向性具有明显的尺寸依赖性,PLGA 微/纳米颗粒粒径小,显著提高了细胞的摄取率和目的基因的表达水平<sup>[8]</sup>。同时,微/纳米载体比表面积大,可在表面进行亲水性修饰和靶向性修饰。在提高基因携带率的同时实现基因治疗的主动靶向性。由此可见,PLGA 微/纳米基因载体在基因治疗中具有明显优势。

本文主要介绍 PLGA 微/纳米粒基因载体的研究进展,重点介绍 PLGA 微/纳米粒基因载体的特点、制备方法、不同的表面修饰方式以及在基因治疗和基因疫苗方面的应用研究进展。

## 1 PLGA 微/纳米基因载体的特点

PLGA 由乳酸 (lactic acid, LA) 和羟基乙酸 (glycolic acid, GA) 两种单体聚合而成,通过改变聚合物单体比例和分子量可以调控共聚物在体内的降解速度、DNA 包封率以及基因体外释放速度。目前 LA 和 GA 常用比例为 75:25 和 50:50<sup>[9]</sup>,由于 LA 具有疏水性,随着 LA/GA 值下降,PLGA 对亲水性 pDNA 的包封率增高,同时,随着 PLGA 分子量增大,pDNA 包封率亦增高<sup>[9]</sup>。这主要是由于高分子量的 PLGA 黏度较大,固化成固体颗粒的时间短,pDNA 短时间内不易从内水相泄露,这不仅可提高 pDNA 包封率,而且可以保持 pDNA 结构和功能的完整性,避免基因体内传递时被核酸酶溶解<sup>[10]</sup>。然而,高分子量的 PLGA 最大的不足在于本身不易降解,容易造成机体中毒,且 pDNA 的释放速度较慢。因此,适当分子量的 PLGA 可提高 pDNA 释放速度和自身降解速度,更适合用作基因载体。

PLGA 微/纳米载体与 pDNA 的结合方式也会影响 pDNA 的包封率和释放速度。其结合方式主要有

两种,一种是将 DNA 包裹于 PLGA 微/纳米颗粒内部,这种方式能避免 pDNA 在细胞转染时受外部环境的影响,更好保护 pDNA 的结构完整性,但是其释放速度慢,pDNA 易受制备过程中有机溶剂和机械力破坏;另一种方式是将 pDNA 吸附在 PLGA 表面,即 PLGA 载体制备完成后,在温和条件下与 pDNA 反应完成。该方式反应条件温和,制备过程对 pDNA 影响较小,但是细胞转染时外部环境如 pH 等对 pDNA 结构影响较大。因此,在应用过程中可根据实际需要选择合适的结合方式。

另外,PLGA 微/纳米载体在介导基因传递方面也具有一定的优势。微/纳米颗粒的特殊结构和表面电荷具有较高的基因转移效率,可介导外源基因在细胞染色体 DNA 中的整合,从而获得基因长期稳定的表达;同时,微/纳米载体可以保护转导基因,减少机体血浆或组织细胞中各种补体以及各种酶的破坏,有利于目的基因在转导进入靶细胞后更好更稳定地发挥作用。基于上述优势,PLGA 微/纳米基因载体受到人们越来越多的关注,其应用也得到不断推广。

## 2 PLGA 微/纳米基因载体制备方法

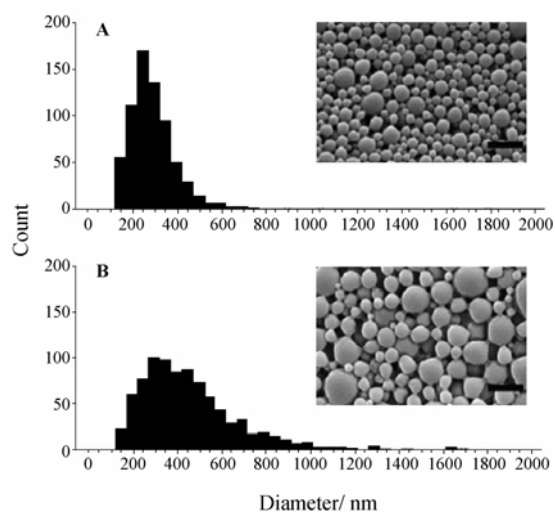
PLGA 微/纳米基因载体的制备方法有多种,目前主要有复乳溶剂蒸发法,自乳化溶剂扩散法,喷雾干燥法,CO<sub>2</sub> 超临界流体乳液萃取法,溶剂置换法和纳米粒沉淀法等<sup>[11]</sup>。不同的制备方法影响载体粒径大小和 pDNA 包封率,不同粒径大小的 PLGA 微/纳米基因载体又有不同的用途。用于基因疫苗传递的 PLGA 载体,直径在 1~10 μm 时更容易被抗原提呈细胞,如巨噬细胞和树突细胞 (dendritic cell, DC) 吞噬而引发免疫反应<sup>[12]</sup>。反之,用于基因治疗的 PLGA 载体,粒径应控制在 300 nm 以下,以提高基因包封率和细胞摄取率<sup>[8]</sup>。因此,选择合适的制备方法在 PLGA 微/纳米基因载体的研究中显得非常关键。表 1 总结了近年来 PLGA 微/纳米基因载体常用的制备方法,以及相应的粒径大小和 pDNA 包封率。

**2.1 复乳溶剂蒸发法** 复乳溶剂蒸发法是制备 PLGA 载体常用的一种方法。该法将 DNA 溶于内水相,PLGA 溶于有机溶剂作为中间相,聚乙烯醇 (polyvinyl alcohol, PVA) 等乳化剂作为外水相,通过高速均质或超声乳化等方式得到 PLGA 乳状液,室温搅拌蒸发有机溶剂得到 PLGA 微/纳米颗粒。该法可以通过调节搅拌速度和乳化剂浓度来改变粒径大小,当搅拌速度达到 10 000 r·min<sup>-1</sup> 和 PVA 浓度为 9% 时,粒径可控制在 300 nm 以下,pDNA 包封率可达 90% 以上<sup>[20]</sup>。

**Table 1** Summary of conventional approaches to formulating PLGA pDNA particles and corresponding particle size and entrapment efficiencies obtained

| Method   | Particle size         | Encapsulation efficiency/% |
|--|-----------------------|----------------------------|
| Emulsion solvent-evaporation <sup>[13]</sup>                               | 1 $\mu\text{m}$       | 92                         |
| Double-emulsion solvent-evaporation <sup>[14]</sup>                        | 200-600 nm            | >90                        |
| Emulsion-diffusion-evaporation <sup>[15]</sup>                             | 181 nm                | Low                        |
| Spontaneous emulsification solvent diffusion method (SESD) <sup>[16]</sup> | 200-300 nm            | 50                         |
| DNA-organic phase self-emulsification (DOPSM) <sup>[17]</sup>              | 1.0-2.0 $\mu\text{m}$ | 76                         |
| Spray drying <sup>[18]</sup>   | 100-250 nm            | 57                         |
| Supercritical fluid extraction of emulsions (SFEE) <sup>[19]</sup>         | 100 nm                | 98                         |

Jeremy 等<sup>[14]</sup>采用二氯甲烷溶解 PLGA 作为中间相, 4 mg·mL<sup>-1</sup> DNA 逐滴加入中间相, 通过超声和高压均质的方法形成初乳 I, 再将初乳 I 逐滴加入水相中 (5% 聚乙烯醇和 10% 蔗糖), 分别以 24 000 r·min<sup>-1</sup> 高压均质和超声的方法形成复乳, 搅拌蒸发二氯甲烷形成 PLGA-DNA 球状颗粒。通过粒径分析, 发现超声乳化使粒径分布在 250 nm 左右, 而高速均质得到的粒径偏大, 分布在 400~500 nm。这说明外界机械力强度直接影响载体粒径大小, 机械力越大, 形成的颗粒越小 (图 1)。



**Figure 1** Size distribution and scanning electron micrographs (SEM) of particles fabricated by sonification (A) and homogenization (B)<sup>[14]</sup>

尽管复乳溶剂蒸发法对 pDNA 的包封率较高, 但水油两相之间的界面张力和制备过程中施加的机械外力会引起超螺旋 pDNA 的开环或降解, 且由于 pDNA 降解产物的活性和转染效率远不及超螺旋 pDNA<sup>[21]</sup>, 这在很大程度上限制了复乳溶剂蒸发法的

应用。

**2.2 自乳化溶剂扩散法** 自乳化溶剂扩散法 (spontaneous emulsification solvent diffusion method, SESD) 避免了复乳溶剂蒸发法中使用的强机械力, 保证了 pDNA 结构的完整性。该法将 PLGA 溶于两种有机溶剂中, 一种疏水性较强 (二氯甲烷), 一种亲水性较强 (丙酮、乙醇等), 将有机相逐滴加入水相中, 亲水性有机溶剂迅速扩散到水相中形成小液滴, 减少了界面张力, 同时通过搅拌去除有机溶剂形成 PLGA 微/纳米粒。此种方法制备的颗粒粒径分布较窄, 约在 200~300 nm。Katas 等<sup>[16]</sup>采用自乳化有机溶剂扩散法制备 PLGA-PEI 纳米粒, 粒径可达 100 nm 左右, 成功用于小分子干扰基因 siRNA 的传递。

但是, 自乳化溶剂扩散法自身也存在缺点。由于亲水性有机溶剂扩散快, pDNA 容易从内水相中泄漏, 导致 pDNA 包封率不高。因而, 改良的自乳化溶剂扩散法 (DNA-organic phase self-emulsification, DOPSM) 受到重视。该法将 pDNA 和 PLGA 同时溶解于两亲性有机溶剂中, 在温和的条件下将 pDNA 包裹于 PLGA 微/纳米粒内部。因 pDNA 不溶于有机溶剂, 所以首先将 pDNA 与阳离子脂质体, 如十六烷基-二甲基-乙基-溴化铵 (cetyldime-thyle-thylammonium bromide, CDAB)<sup>[17]</sup>、壳聚糖 (chitosan, CHS)<sup>[15]</sup>和阳离子聚合物 (1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane, DOTAP)<sup>[15]</sup>等形成亲脂性化合物。该化合物和 PLGA 可同时溶于有机溶剂, 这不仅减少了界面张力对 pDNA 结构的破坏, 而且减少了 pDNA 泄漏, 在很大程度上提高了 pDNA 包封率。Zhuang 等<sup>[17]</sup>用脂质体 CDAB 与 pDNA 形成复合物, 采用 DOPSM 法制备 PLGA-DNA 微粒。其粒径分布在 1~2  $\mu\text{m}$ , DNA 包封率达到 76%, 避免了强机械力对 DNA 的破坏。

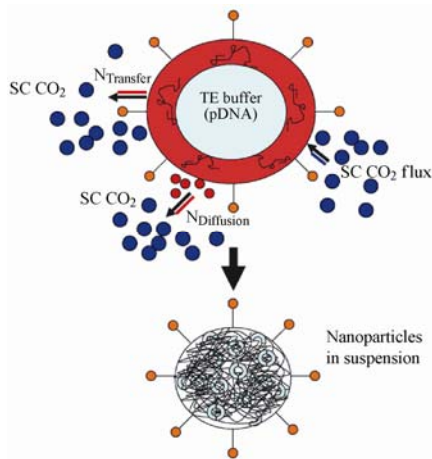
SESD 和 DOPSM 法虽然在某种程度上避免了强机械力对 pDNA 结构的破坏, 但是 pDNA 与阳离子脂质体形成的亲脂性化合物并不能有效保护 pDNA, pDNA 在有机溶剂作用下结构易发生变化甚至降解, 这将严重影响 pDNA 的活性, 不利于后续基因表达。因此, 有机溶剂对其结构的影响也是不可忽视的关键因素。

**2.3 喷雾干燥法** PLGA 固化成微/纳米粒后, 为了保持 pDNA 结构完整和生物活性, 一般通过冷冻干燥法收集颗粒。但这种方法容易引起颗粒的团聚, 粒径分布不均匀, 不利于细胞转染。喷雾干燥法将 PLGA 微/纳米乳状液用雾化器喷雾, 同时用向上流动的氮气干燥, 这种方法不仅可避免颗粒在冻干过程中发生聚

集,而且可以有效去除残留有机溶剂<sup>[18]</sup>。Takashima 等<sup>[18]</sup>在 PLGA 微/纳米乳液中加入甘露醇,采用喷雾干燥法收集微/纳米颗粒。经分析发现,干燥后的颗粒粒径分布在 100~250 nm,小于干燥前,这与冷冻干燥法恰好相反。Lane 等<sup>[22]</sup>通过细胞转染实验还发现喷雾干燥法虽然可以显著提高 pDNA 包封率,但是在干燥过程中容易导致 pDNA 失活,基因表达强度不高。

由此可见,喷雾干燥法虽然在颗粒粒径和包封率方面优势明显,但在保护 pDNA 活性方面,效果远不如冷冻干燥法,在实际应用中也受到限制。

**2.4 CO<sub>2</sub> 超临界流体乳液萃取法** CO<sub>2</sub> 超临界流体乳液萃取法 (supercritical fluid extraction of emulsions, SFEE) 采用超临界 CO<sub>2</sub> 流体作为反应介质,协同超临界 CO<sub>2</sub> 喷射技术制备包裹 pDNA 的 PLGA 微/纳米粒。由于超临界 CO<sub>2</sub> 流体与不稳定的多肽类药物不发生作用,能够保持分子的三维结构,所以整个制备过程对 pDNA 结构破坏小,可有效保护 pDNA 的生物活性。SFEE 法制备过程简单,一般先将 PLGA 溶于有机溶剂, pDNA 溶于水相,加入乳化剂形成乳状液,再通过控制气压、CO<sub>2</sub> 和乳状液的流速来制备 PLGA-pDNA 微/纳米粒 (图 2)。该法主要优点是 pDNA 包封率高,有机溶剂残留量低于 100 μg·mL<sup>-1</sup>,避免了传统方法中有机溶剂残留量大等缺点,能有效保护 pDNA 结构完整<sup>[23]</sup>。



**Figure 2** Mechanism of mass transfer in solvent extraction during SFEE processing for plasmid DNA incorporation<sup>[19]</sup>

Mayo 等<sup>[19]</sup>采用 SFEE 法制备 pFlt23K-PLGA 纳米粒,粒径分布在 100 nm 左右, pDNA 包封率 >98%, 有机溶剂残留量 <50 μg·mL<sup>-1</sup>, 基因在细胞中高强度表达,显著抑制了血管内皮生长因子 (vascular endothelial

growth factor, VEGF) 的表达。

另外,在制备过程中也可结合多种不同的制备方法,达到最佳的制备效果。Nie 等<sup>[24]</sup>结合 CO<sub>2</sub> 超临界流体萃取法和喷雾干燥法,制备 PLGA-CHS-DNA 基因载体。研究发现,这种载体外观形态更规则,可更好的保持 pDNA 完整性, pDNA 可持续稳定释放 5~9 周,转染效率也大幅度提高,促进了 PLGA 基因载体的应用。

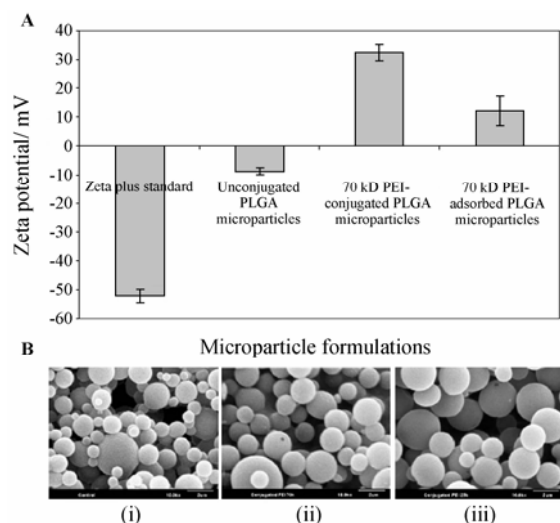
### 3 PLGA 微/纳米基因载体的表面修饰

**3.1 PLGA 表面阳离子修饰** PLGA 对 pDNA 的吸附效率较低,细胞转染率相应较低,通常采用阳离子化合物对 PLGA 表面进行阳离子修饰,通过静电作用吸附更多的 pDNA,同时由于 PLGA 表面带正电荷,增强了细胞黏附和吸收,转染率得到提高。目前常用的阳离子聚合物主要有十六烷基三甲基溴化铵 (hexadecyl trimethyl ammonium bromide, CATB)<sup>[25]</sup>、CDAB<sup>[17]</sup>、DOTAP<sup>[15]</sup>、聚赖氨酸 (poly-D-lysine hydrobromide, PLL)<sup>[14]</sup>、CHS<sup>[15, 26]</sup> 和聚醚酰亚胺 (polyetherimide, PEI)<sup>[27, 28]</sup> 等,其中 CHS 和 PEI 都带有氨基基团或类似基团,可质子化带正电荷,从而有效的吸附带负电的 pDNA。

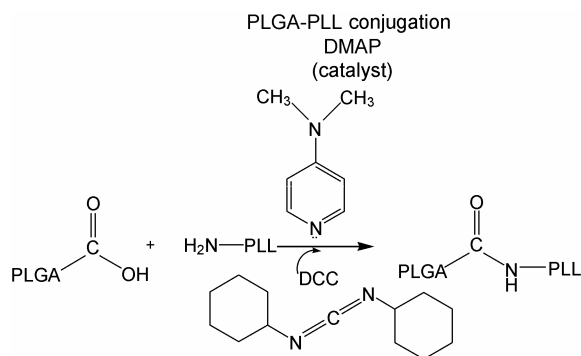
PEI 修饰 PLGA 有两种方式,一种是表面物理吸附,另一种是化学键合。化学键合是在催化剂条件下促使 PEI 以共价键的方式与 PLGA 结合,这种方式可以稳定 PLGA 表面电位,增大 pDNA 吸附效率。Kasturi 等<sup>[27]</sup>在催化剂作用下,将 PEI 键合到 PLGA 表面,研究发现化学键合比物理吸附具有更高的 zeta 电位和 pDNA 吸附效率。同时,表面形态更规则 (图 3),细胞毒性小,易于逃脱溶酶体而将 pDNA 传递到细胞质,对 DC 细胞转染效率高,在 pDNA 疫苗接种和癌症免疫治疗方面有潜在应用价值。

Jeremy 等<sup>[14]</sup>在二环己基二亚胺 (dicyclohexyl carbodiimide, DCC) 催化条件下,PLL 与 PLGA 通过共价键的方式结合 (图 4)。改性后的 PLGA,表面 zeta 电位升高,对 DNA 的吸附率提高到 90% 以上,同时释放出的 PLL-pDNA 复合物避免了核酸内切酶对 pDNA 的降解。Singh 等<sup>[25]</sup>采用 CATB 修饰 PLGA,发现随着 CATB 浓度增加, pDNA 吸附效率升高,当使用 1% CATB 时,对 DNA 的吸附率达到 100%。

Tahara 和 Fischer 等<sup>[15, 26]</sup>采用 CHS 修饰 PLGA,将 CHS 和 PVA 溶于水相,采用自乳化溶剂扩散法制备 PLGA-CHS-DNA 纳米粒。在 pH 值 10~3, zeta 电位逐渐升高,对 pDNA 的吸附率随之升高,同时表面



**Figure 3** (A) Zeta potential analysis of PEI-conjugated and adsorbed PLGA microparticles in comparison with unmodified particles. (B) Scanning electron micrographs (SEM) images of (i) unmodified PLGA microparticles, (ii) PEI 70k-conjugated PLGA microparticles and (iii) PEI 25k-conjugated PLGA microparticles<sup>[27]</sup>



**Figure 4** The mechanism of PLL conjugated to PLGA<sup>[14]</sup>

的壳聚糖可增加大分子对黏膜的穿透力, 提高转染效率。

PLGA 表面阳离子修饰一方面可以明显提高 pDNA 的吸附效率, 另一方面粒子表面的正电位促使载体与细胞膜结合, 提高转染效率<sup>[29]</sup>。文献<sup>[12]</sup>报道修饰后的 PLGA, 可释放出阳离子-DNA 复合物, 有效地避免了 DNA 被核酸酶溶解, 保护其结构完整性, 但是一些阳离子聚合物的毒性会导致细胞死亡, 因此其用量是考虑的关键因素。

**3.2 PLGA 表面亲水性修饰** PLGA 具有疏水性, 对亲水性药物包封率较低。提高 PLGA 对 pDNA 包封率的另一途径是通过 PLGA 表面亲水性基团修饰, 改变表面性质, 以提高 pDNA 包封率, 避免 pDNA 降解, 增强缓释效果<sup>[7]</sup>。

常用的亲水性修饰聚合物有聚乙二醇 (polyeth-

ylene glycol, PEG)<sup>[30]</sup>和聚氧乙烯 (poly(ethylene oxide), PEO)<sup>[31]</sup>。Sun 等<sup>[32]</sup>研究发现, 采用 PEG 修饰 PLGA, 随着 PEG 用量增加, 粒径变小, PLGA 亲水性增强, 对 pDNA 表现出更强的亲和力。

PLGA 还可以与亲水性聚合物形成嵌段聚合物, 且可通过调节嵌段组成比例或引入新嵌段来调控自身的物理化学性质。通常以 PEG、PEO 等为亲水段, 制备 PLGA-PEG-PLGA 和 PEG-PLGA-PEG 等三嵌段聚合物。这类化合物极大地改善了 PLGA 的亲水性, 同时可在水溶液中形成胶束或微/纳米粒, 通过物理吸附或者静电吸附的方式结合 pDNA。目前嵌段聚合物正逐渐商品化, 很大程度上促进了基因载体的研究与发展。Moffatt 等<sup>[33]</sup>制备了水溶性三嵌段聚合物 PLGA-PEG-PLGA, 随着 PEG 用量增加, 对 DNA 的亲水性也增大, 相对裸露 pDNA, 转染效率提高了 8~10 倍。Moffatt 等<sup>[34]</sup>采用 PEG 作为亲水段, 制备了 PEG-PLGA-PEG 三嵌段聚合物, 发现 PEG-PLGA-PEG/pDNA 比 PEI/pDNA 基因传递效果更佳。

**3.3 PLGA 表面靶向性修饰** 由于 PLGA 微/纳米基因载体靶向性传递效果不佳, 对正常细胞毒副作用较强, 导致在临床应用中受到一定的限制。经表面靶向性修饰的 PLGA 微/纳米基因载体可有效提高基因传递的特异性, 降低治疗的副作用, 临床应用效果更佳。因此, PLGA 表面靶向性修饰也成为基因载体研究的热点。

靶向性修饰主要凭借 PLGA 微/纳米基因载体比表面积大的优势, 在其表面偶联靶细胞的配体或抗体 (如特异性配体、克隆抗体等), 借助配体或抗体分别与细胞表面受体或抗原特异地结合, 促使载体携带治疗基因进入细胞内, 实现靶向转移的目的。Garinot 等<sup>[35]</sup>报道了 RGD 序列 (甘氨酸-天冬氨酸) 肽整合到 PLGA 表面, 可以将 PLGA-pDNA 疫苗通过口服途径靶向性传递到人体 M 细胞, 引发机体免疫反应。Díez 等<sup>[36]</sup>采用唾液酸胎球蛋白 (AF) 修饰 PLGA, 靶向肝癌细胞, 能有效抑制肝癌细胞生长, 因而有效促进 PLGA 微/纳米基因载体在基因治疗等生物学领域方面的应用。

#### 4 PLGA 微/纳米基因载体的应用研究进展

**4.1 基因治疗** 基因治疗 (gene therapy) 主要通过内源性或外源性转染进入细胞的 DNA 和 RNA, 通过一系列反应, 在核酸内切酶作用下降解 mRNA, 从而介导沉默病毒特定基因、抑制病毒复制、抑制病毒重要蛋白的合成, 达到预防与治疗病毒感染的目的。

有效的基因传递载体可迅速从溶酶体向胞质释放,避免溶酶体对 pDNA 造成结构破坏,且停滞在细胞内部缓慢释放 pDNA,减少首过效应。PLGA 微粒/纳米粒具有以上优势,因此广泛作为基因治疗的一种新载体。Romeijn 等<sup>[37]</sup>采用 PEI 修饰的 PLGA 纳米粒作为基因载体,作用于人体肺上皮细胞,发现其细胞毒性小,转染效率高,由此可见,PLGA-PEI 纳米粒作为一种潜在的新型的基因传输系统,可用于肺部相关疾病的基因治疗。Zou 等<sup>[38]</sup>对 PLGA 纳米粒进行表面黏性修饰,发现对肺癌细胞 A549 的转染效率与脂质体 2000 相当,但毒性远低于脂质体 2000,避免了传统基因载体毒性大的缺点,开辟了肺癌基因治疗的新途径。

众所周知,新血管的生成是肿瘤迅速增殖和转移的重要条件之一,阻断新血管的生成可有效地抑制肿瘤的生长和转移,而血管主要是由内皮细胞组成。因此,许多内皮细胞抑制因子都成为抑制肿瘤生长和转移的首选药物。Pickel 和 Mayo 等<sup>[39, 40]</sup>将 PLGA 纳米粒作为抗血管生成质粒 DNA (pFit23K) 的载体,提高了对肺腺癌细胞的转染率,同时显著的抑制了肺上皮细胞 A549 分泌血管内皮生长因子 (VEGF),抑制了肺腺癌细胞 (A549, H358) 的增殖,说明 PLGA 纳米粒为肺腺癌基因治疗开辟了新途径。Braden 等<sup>[41]</sup>采用 PLGA 作为 pDrive-sh AnxA2 质粒的载体,通过外源性基因调节膜联蛋白 A2 的平衡,在体内持续调节膜联蛋白 A2、VEGF、mRNA 和蛋白水平,抑制前列腺肿瘤的生长,这是治疗前列腺癌的一种有效方法。

另外, Díez 等<sup>[36]</sup>采用唾液酸胎球蛋白 (AF) 对 PLGA 表面靶向性修饰,自乳化溶剂蒸发法制备 PLGA-DOTAP-AF 纳米粒,作为编码荧光素酶和白介素 12 基因质粒的载体,通过观察荧光强度发现靶向性修饰的纳米粒比未修饰纳米粒在肝癌细胞中的转染效率提高了 12 倍左右,同时在小鼠肝癌模型活体实验中,可以在小鼠血清中检测到大量的白介素 12 和  $\gamma$ -干扰素,与未治疗的模型相比,肿瘤减小 75%,并且无复发迹象,抗肿瘤作用明显增强。

**4.2 基因疫苗载体** 基因疫苗作为一种崭新的和有效的疫苗涌现出来,它是指含有编码抗原基因的真核表达 pDNA,经体内接种后,通过宿主细胞的转录系统表达蛋白抗原,细胞将表达蛋白转运至邻近的抗原提呈细胞,诱导宿主产生细胞免疫应答和体液免疫应答,从而达到预防和治疗疾病的目的。

大多数的基因疫苗都是将质粒 DNA 经肌内直接注射,但激发体内免疫反应一般需要较大的 DNA 剂量,同时裸 pDNA 在体内容易被核酸酶降解,而采用 PLGA 包裹基因疫苗,制成缓释疫苗微粒,可减少接种次数,保护抗原,使其避免受体内 pH 和酶的影响,PLGA 微粒在基因疫苗应用中发挥免疫佐剂的效应<sup>[7]</sup>。Csaba 等<sup>[42]</sup>将 FITC 标记的质粒吸附在 PLGA 微粒上,经小鼠鼻黏膜细胞给药。研究发现,与裸 DNA 相比,鼻黏膜细胞中荧光强度明显增强,同时引起持续和强烈的免疫反应,而裸 DNA 6 周后才能引起相同的免疫反应。Eratalay 等<sup>[43]</sup>将编码 HBV 和膜蛋白素 2 (IL-2) 的质粒 DNA 疫苗吸附于 PLGA 微粒上,将 PLGA-pDNA 微粒通过免疫小鼠胫前肌给药,6 个月后在小鼠体内发现抗体,且引起的免疫应答反应明显高于裸 pDNA。

研究还发现,表面阳离子修饰的 PLGA 微粒,可以吸附更多的基因疫苗以激活免疫系统中最强大的抗原提呈树突 (DC) 细胞,提高转染效率和目的基因的表达量,从而激发更强的免疫反应,这具有重要的临床意义<sup>[44]</sup>。PEI 表面修饰的 PLGA 微粒,用作各种基因疫苗的载体,经过 DC 细胞介导的抗原提呈及靶基因表达,起到肿瘤免疫治疗的作用,对乙肝<sup>[43]</sup>、痢疾<sup>[45]</sup>、淋巴瘤<sup>[46]</sup>、前列腺癌<sup>[33]</sup>、肺结核<sup>[47]</sup>和艾滋病<sup>[48]</sup>有潜在的治疗和预防作用。

Bivas-Benita 等<sup>[47]</sup>将编码结核抗原物 Rv1733c 的 DNA 质粒作为基因疫苗,与 PLGA-PEI 微粒结合,用于肺结核预防和治疗。PLGA-PEI-Rv1733c 纳米粒能有效促进 DC 细胞分泌 IL-12 和 TNF- $\alpha$ ,同时促进 T 细胞增殖和 IFN- $\gamma$  的分泌,说明 PLGA-PEI-Rv1733c 微粒可以有效地促进 T 细胞的免疫应答,为肺结核提供基因免疫治疗有效途径。Zhou 等<sup>[48]</sup>发现表面 PEI 修饰的 PLGA 微粒在 HIV 免疫中也能引起相对裸 DNA 有 2~3 倍的血清抗体水平和有效的细胞毒 T 淋巴细胞反应。

## 5 结论与展望

PLGA 微粒/纳米粒是一类有效的基因导入载体,它不仅可以通过不同的制备方法获得不同粒径大小和用途的 pDNA 载体,而且还可以通过 PLGA 表面阳离子修饰和亲水性修饰提高 pDNA 包封率,保护 pDNA 结构完整性,减少 pDNA 体内首过效应,使基因在体内持续稳定的释放和表达。

随着研究的深入,PLGA 微粒/纳米粒广泛用于基因治疗和基因疫苗载体,通过对基因载体表面靶向性

修饰, 对于攻克威胁人类健康的癌症和各种遗传性疾病具有潜在的应用价值。尽管 PLGA 微/纳米粒在基因传递和基因疫苗治疗等方面研究较多, 但大多还处于理论研究或体外研究阶段, 在体内和临床应用上还存在问题, 如 pDNA 突释现象, pDNA 不稳定带来的降解失活, 以及 PLGA 微/纳米载体的灭菌方法都限制了 PLGA 基因载体的应用, 因此在实际临床应用方面还有待进一步研究。

## References

- [1] Gary DJ, Puri N, Won YY. Polymer-based siRNA delivery: perspectives on the fundamental and phenomenological distinctions from polymer-based DNA delivery [J]. *J Control Release*, 2007, 121: 64–73.
- [2] Lee YK, So IS, Lee SC, et al. Suppression of distant pulmonary metastasis of MDA2-MB 435 human breast carcinoma established in mammary fat pads of nude mice by retroviral-mediated TMP-2 gene transfer [J]. *J Gene Med*, 2005, 7: 145–157.
- [3] Kenneth R, Rogulshki MS, Wing DL, et al. Double suicide gene therapy augments the antitumor activity of a replication-competent lytic adenovirus through enhanced cytotoxicity and radiosensitization [J]. *Hum Gene Ther*, 2000, 1: 67–76.
- [4] Wang Z, Zhu T, Qiao C, et al. Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart [J]. *Nat Biotechnol*, 2005, 23: 321–328.
- [5] Zimmermann TS, Lee AC, Akinc A, et al. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates [J]. *Nature*, 2006, 441: 111–114.
- [6] Herweijer H, Wolff JA. Progress and prospects: naked DNA gene transfer and therapy [J]. *Gene Ther*, 2003, 10: 453–458.
- [7] Mundargi RC, Babu VR, Rangaswamy V, et al. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(*D, L*-lactide-co-glycolide) and its derivatives [J]. *J Control Release*, 2008, 125: 193–209.
- [8] Panyam J, Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2003, 55: 329–347.
- [9] Prabha S, Labhasetwar V. Critical determinants in PLGA/PLA nanoparticle-mediated gene expression [J]. *Pharm Res*, 2004, 21: 354–364.
- [10] Luten J, van Nostrum CF, De Smedt SC, et al. Biodegradable polymers as non-viral carriers for plasmid DNA delivery [J]. *J Control Release*, 2008, 126: 97–110.
- [11] Bala I, Hariharan S, Kumar M, et al. PLGA nanoparticles in drug delivery: the state of the art [J]. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 2004, 21: 387–422.
- [12] Jilek S, Merkle HP, Walter E. DNA-loaded biodegradable microparticles as vaccine delivery systems and their interaction with dendritic cells [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, 57: 377–390.
- [13] Singh M, Briones M, Ott G, et al. Cationic microparticles: a potent delivery system for DNA vaccines [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 811–816.
- [14] Jeremy S, Blum, W, Saltzman M. High loading efficiency and tunable release of plasmid DNA encapsulated in submicron particles fabricated from PLGA conjugated with poly-*L*-lysine [J]. *J Control Release*, 2008, 129: 66–72.
- [15] Tahara K, Sakai T, Yamamoto H, et al. Establishing chitosan coated PLGA nanosphere platform loaded with wide variety of nucleic acid by complexation with cationic compound for gene delivery [J]. *Int J Pharm*, 2008, 354: 210–216.
- [16] Katas H, Cevher E, Alpar HO. Preparation of polyethyleneimine incorporated poly(*D, L*-lactide-co-glycolide) nanoparticles by spontaneous emulsion diffusion method for small interfering RNA delivery [J]. *Int J Pharm*, 2009, 369: 144–154.
- [17] Zhuang FF, Liang R, Zou CT, et al. High efficient encapsulation of plasmid DNA in PLGA microparticles by organic phase self-emulsification [J]. *J Biochem Biophys Methods*, 2002, 52: 169–178.
- [18] Takashima Y, Saito R, Nakajima A, et al. Spray-drying preparation of microparticles containing cationic PLGA nanospheres as gene carriers for avoiding aggregation of nanospheres [J]. *Int J Pharm*, 2007, 343: 262–269.
- [19] Mayo AS, Ambati BK, Kompella UB. Gene delivery nanoparticles fabricated by supercritical fluid extraction of emulsions [J]. *Int J Pharm*, 2010, 387: 278–285.
- [20] Zhang XQ, Dahle CE, Baman NK, et al. Potent antigen-specific immune responses stimulated by co-delivery of CpG ODN and antigens in degradable microparticles [J]. *J Immunother*, 2007, 30: 469–478.
- [21] Walter E, Moelling K, Pavlovic J, et al. Microencapsulation of DNA using poly(*D, L*-lactide-co-glycolide) stability issues and release characteristics [J]. *J Control Release*, 1999, 61: 361–374.
- [22] Lane ME, Brennan FS, Corrigan OI. Comparison of post-emulsification freeze drying or spray drying processes for the microencapsulation of plasmid DNA [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2005, 57: 831–838.
- [23] Maczurek A, Hager K, Kenklies M, et al. Lipoic acid as an anti-inflammatory and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60: 1463–1470.

- [24] Nie H, Lee LY, Tong H, et al. PLGA/chitosan composites from a combination of spray drying and supercritical fluid foaming techniques: new carriers for DNA delivery [J]. *J Control Release*, 2008, 129: 207–214.
- [25] Singh M, Ugozzoli M, Briones M, et al. The effect of CTAB concentration in cationic PLGA microparticles on DNA adsorption and *in vivo* performance [J]. *Pharm Res*, 2003, 20: 247–251.
- [26] Fischer S, Foerg C, Merkle HP, et al. One-step preparation of polyelectrolyte-coated PLGA microparticles and their functionalization with model ligands [J]. *J Control Release*, 2006, 111: 135–144.
- [27] Kasturi SP, Sachaphibulkij K, Roy K. Covalent conjugation of polyethyleneimine on biodegradable microparticles for delivery of plasmid DNA vaccines [J]. *Biomaterials*, 2005, 26: 6375–6385.
- [28] Andersen M, Lichawska A, Arpanaei A, et al. Surface functionalisation of PLGA nanoparticles for gene silencing [J]. *Biomaterials*, 2010, 31: 5671–5677.
- [29] Green JJ, Langer R, Anderson DG. A combinatorial polymer library approach yields insight into nonviral gene delivery [J]. *Acc Chem Res*, 2008, 41: 749–759.
- [30] Mok H, Park JW, Park TG. Microencapsulation of PEGylated adenovirus within PLGA microspheres for enhanced stability and gene transfection efficiency [J]. *Pharm Res*, 2007, 24: 2263–2269.
- [31] Csaba N, Sánchez A, Alonso MJ. PLGA:poloxamer and PLGA: poloxamine blend nanostructures as carriers for nasal gene delivery [J]. *J Control Release*, 2006, 113: 164–172.
- [32] Sun X, Duan YR, He Q, et al. PELGE nanoparticles as new carriers for the delivery of plasmid DNA [J]. *Chem Pharm Bull*, 2005, 53: 599–603.
- [33] Moffatt S, Cristiano RJ. PEGylated J591 mAb loaded in PLGA-PEG-PLGA tri-block copolymer for targeted delivery: *in vitro* evaluation in human prostate cancer cells [J]. *Int J Pharm*, 2006, 317: 10–13.
- [34] Moffatt S, Choi D, Kim WJ, et al. Non-ionic amphiphilic biodegradable PEG-PLGA-PEG copolymer enhances gene delivery efficiency in rat skeletal muscle [J]. *J Control Release*, 2007, 118: 245–253.
- [35] Garinot M, Fiévez V, Pourcelle V, et al. PEGylated PLGA-based nanoparticles targeting M cells for oral vaccination [J]. *J Control Release*, 2007, 120: 195–204.
- [36] Díez S, Navarro G, de Ilarduya CT. *In vivo* targeted gene delivery by cationic nanoparticles for treatment of hepatocellular carcinoma [J]. *J Gene Med*, 2009, 11: 38–45.
- [37] Bivas-Benita M, Romeijn S, Junginger HE, et al. PLGA-PEI nanoparticles for gene delivery to pulmonary epithelium [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2004, 58: 1–6.
- [38] Zou W, Liu C, Chen Z, et al. Studies on bioadhesive PLGA nanoparticles: a promising gene delivery system for efficient gene therapy to lung cancer [J]. *Int J Pharm*, 2009, 370: 187–195.
- [39] Pickel L, Matsuzuka T, Doi C, et al. Overexpression of angiotensin II type 2 receptor gene induces cell death in lung adenocarcinoma cells [J]. *Cancer Biol Ther*, 2010, 9: 277–285.
- [40] Mayo AS, Ambati BK, Kompella UB. Gene delivery nanoparticles fabricated by supercritical fluid extraction of emulsions [J]. *Int J Pharm*, 2010, 387: 278–285.
- [41] Braden AR, Kafka MT, Cunningham L, et al. Polymeric nanoparticles for sustained down-regulation of annexin A2 inhibit prostate tumor growth [J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2009, 9: 2856–2865.
- [42] Csaba N, Sánchez A, Alonso MJ. PLGA: poloxamer and PLGA: poloxamine blend nanostructures as carriers for nasal gene delivery [J]. *J Control Release*, 2006, 113: 164–172.
- [43] Eratalay A, Coşkun-Ari FF, Oner F, et al. *In vitro* and *in vivo* evaluations of PLGA microsphere vaccine formulations containing pDNA coexpressing hepatitis B surface antigen and interleukin-2 [J]. *J Microencapsul*, 2010, 27: 48–56.
- [44] Kanazawa T, Takashima Y, Murakoshi M, et al. Enhancement of gene transfection into human dendritic cells using cationic PLGA nanospheres with a synthesized nuclear localization signal [J]. *Int J Pharm*, 2009, 379: 187–195.
- [45] Liu S, Danquah MK, Forde GM, et al. Microparticle-mediated gene delivery for the enhanced expression of a 19-kDa fragment of merozoite surface protein of *Plasmodium falciparum* [J]. *Biotechnol Prog*, 2009, 26: 257–262.
- [46] Kasturi SP, Qin H, Thomson KS, et al. Prophylactic anti-tumor effects in a B cell lymphoma model with DNA vaccines delivered on polyethyleneimine (PEI) functionalized PLGA microparticles [J]. *J Control Release*, 2006, 113: 261–270.
- [47] Bivas-Benita M, Lin MY, Bal SM, et al. Pulmonary delivery of DNA encoding *Mycobacterium tuberculosis* latency antigen Rv1733c associated to PLGA-PEI nanoparticles enhances T cell responses in a DNA prime/protein boost vaccination regimen in mice [J]. *Vaccine*, 2009, 27: 4010–4017.
- [48] Zhou X, Liu B, Yu X, et al. Controlled release of PEI/DNA complexes from PLGA microspheres as a potent delivery system to enhance immune response to HIV vaccine DNA prime/MVA boost regime [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2008, 68: 589–595.