

脂质体在介导核酸传递时存在的问题及解决方法

张莹莹, 陈建明*

(第二军医大学药理学教研室, 上海 200433)

摘要: 脂质体在介导核酸传递方面已成为当今研究热点, 而在传递过程中所遇到的一些问题严重限制了核酸发挥治疗作用。本文综述了脂质体在介导核酸传递时所遇到的问题, 如血液稳定性差、网状内皮系统吸附、脂质体的低靶向性、内涵体逃逸的阻碍等, 并针对近几年对这些问题所采取的解决方案如 PEG 化、配体修饰、光化学内化作用 (PCI)、降解脂质体和膜融合肽的应用等进行了详细的阐述。

关键词: 脂质体; 核酸传递; 网状内皮系统; 内涵体逃逸; 解决方法

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 03-0261-08

Existing problems and strategies in liposome-mediated nucleic acid delivery

ZHANG Ying-ying, CHEN Jian-ming*

(Department of Pharmaceutical Science of the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: Liposome-mediated nucleic acid delivery has been a focus recently, but in the course of delivering nucleic acid, some hurdles seriously limit the nucleic acid exerting treatment effect. This review refers to a series of problems such as low blood stability, reticuloendothelial system absorption, the lower targeting of liposome and the restriction of endosomal escape which are suffered in liposome-mediated nucleic acid delivery; and gives a detail introduction of strategies such as PEGylation, ligand modification, photochemical internalization, the application of degradation liposome and membrane-lytic peptide, to overcome those problems.

Key words: liposome; nucleic acid delivery; reticuloendothelial system; endosomal escape; strategy

核酸是携带遗传信息的遗传物质, 分为 RNA 和 DNA 两种。核酸对人体生理功能的重要性, 主要是通过它所携带的遗传信息而体现。由于核酸分子量很大, 细胞膜在正常状态下不能吸收生物大分子, 需要一定的载体使其进入细胞内。脂质体作为一种非病毒类载体, 在核酸传递中具有明显的优势, 为推动核酸在临床上的应用发挥了巨大的推动作用, 但是仍有一些问题困扰着科研工作者。这些问题主要包括: 血液稳定性差、网状内皮系统吸附、脂质体的低靶向性、内涵体逃逸的阻碍及细胞核核膜屏障等^[1], 不仅存在于脂质体介导核酸传递过程中, 也存在于其他非病

毒核酸载体 (如固体脂质纳米粒和乳剂) 传递核酸的过程中, 严重限制了核酸在临床中的应用。本文主要从这些问题入手, 综述了近几年来人们解决这些问题所采取的方法, 为以脂质体为载体的核酸传递研究提供指导。

1 核酸传递过程中常见的问题及影响因素

1.1 血液稳定性及网状内皮系统 (RES) 吸收

1.1.1 影响血液稳定性的原因 载有核酸的脂质体, 静脉注射后首先进入血液, 血液中的脂肪酶、核酸酶、白蛋白和高/低密度脂蛋白等严重干扰脂质体复合物, 引起脂质体复合物粒径和 zeta 电位的改变, 导致脂质体内含物的释放, 使得大部分核酸被破坏^[2, 3], 不能有效的发挥其作用。因此脂质体核酸复合物在血液中的稳定性成为人们在研究脂质体介

收稿日期: 2010-09-06.

*通讯作者 Tel / Fax: 86-21-81871291, E-mail: yjcjm @163.com

导核酸传递中首要解决的问题。

1.1.2 产生 RES 吸收的原因 所谓的网状内皮系统吸收是指: 由于血清蛋白如免疫球蛋白、补体系统的 C3、C4、C5 层粘连蛋白等一般带负电, 其容易结合带正电荷阳离子脂质体, 使其易被巨噬细胞如肝的星型细胞的清道夫受体所识别而被吞噬^[4]。这种典型 RES 吸收能使注入体内的药物剂量在几小时内减少 50% 以上^[5], 从而使载药的脂质体在血液循环中的时间减少, 导致药物进入肿瘤组织的几率降低, 而不能发挥有效的治疗作用。

1.2 细胞或组织低靶向性

常规脂质体经历长循环后, 主要是通过 EPR 效应进入肿瘤组织。这种只能利用天然的靶向性而不能主动靶向于核酸作用靶点的常规脂质体, 只能将小部分核酸传递到特定组织和细胞, 不能有效发挥治疗肿瘤的作用。因此提高肿瘤组织或细胞的靶向性是亟待解决的问题。

1.3 内涵体逃逸障碍

带有正电荷的纳米级的脂质体复合物与细胞表面带有负电荷的蛋白或糖结合, 获得在细胞表面的锚定。通过这种方式会激发细胞内吞途径导致内涵体的形成。含有脂质体复合物的内涵体从初期渐变成晚期内涵体, 最终被溶酶体降解。只有少部分的核酸从内涵体释放发挥作用^[6]。因此控制核酸从内涵体释放是整个核酸传递过程中最具挑战的步骤。现在很多实验室着力于从内涵体释放机制来研究促进内涵体释放的方法。

1.4 细胞核核膜的屏障

在现代生物技术中, 将外源基因导入细胞核是非常关键的环节。在此过程中, 核膜成为最大的阻碍。除有丝分裂外, 大分子是通过与核孔上的蛋白形成核孔复合物 (nuclear pore complex, NPC) 进入细胞核的。NPC 的直径约为 9 nm, 可以自由地进入细胞核^[7], 而对于其他大分子如裸露质粒 DNA 分子即使在超螺旋结构 (最紧密的状态) 时也大于 200 nm, 若将其运送到核内, 必须将其压缩到一个更小的直径范围。

2 针对常见问题的解决方法

2.1 增加血液稳定性及降低 RES 吸收的方法

2.1.1 制备稳定的脂质体复合物 针对核酸药物在血液稳定性问题, 主要是制备稳定不易降解的脂质体复合物。目前常用的主要有 3β -[N-(N, N-二甲氨基乙基)] 氨甲酰基-胆固醇/二油磷脂酰乙醇胺 (DC-CHOL/DOPE)、1, 2-二油酰-3-三甲胺基丙烷/胆

固醇 (DOTAP/CHOL)、氯化 N, N-二(十八烷基)-N-甲基-N-2[N'-(N2-胍基-L-赖氨酸)] 氨乙基铵/胆固醇 (DSGLA/CHOL) 等^[8, 9], 另外非脂质的浓缩试剂如聚乙烯亚胺 (polyethyleneimine, PEI)、聚赖氨酸 (polylysine)、鱼精蛋白 (protamine sulphate)、壳聚糖已经广泛用于压缩 DNA 或 siRNA (short interfering RNA)^[10, 11], 提高脂质体核酸复合物的稳定性。目前 Leaf Huang 实验室将 DOTAP/CHOL 脂质体与包裹 siRNA 的鱼精蛋白和小牛胸腺 DNA 溶液混合制备 LPD (liposome-polycation-DNA), 能将 siRNA 包裹在脂质体内, 而不是以正电吸附的方式将 siRNA 结合在脂质体表面。这种脂质体形式可以保护 siRNA 免受血液中核酸酶的降解^[12], 极大提高了 siRNA 在血液中的稳定性。LPD 的制备为脂质体介导核酸传递提供了一种新思路。

在制备稳定的脂质体复合物的过程中, 对电荷的考察非常关键^[13]。当阳离子脂质/核苷酸的正负电荷比例较低时, 核苷酸过度暴露于血清中, 易被其中的核酸酶降解, 失去作用。当阳离子脂质/核苷酸的正负电荷比例过高时, 也会引起不稳定, 且带来免疫反应和毒性。因此寻找适宜的正负电荷比例对解决此问题是必要的。Gao 等^[14]制备的免疫脂质体包裹 siRNA 靶向 HER2 高表达的 SK-BR-3 细胞时, 以 DC-CHOL 和 siRNA 的质量比来代替正负电荷的比例。实验发现, 增加 DC-CHOL/siRNA 的质量比例时, zeta 电位变大, 脂质复合物的包封率提高, 脂质体复合物在血清中的稳定性增加。通过转染实验确定了最佳的 DC-CHOL/siRNA 的比例。因此要严格控制阳离子脂质/核苷酸的电荷比例。

2.1.2 对脂质体进行 PEG 化 针对血循环中 RES 的吸收, 目前最常用的是对纳米粒进行 PEG 化^[15]。PEG 是一种具有亲水性和柔性的聚合物, 可以提供空间障碍使脂质体核酸复合物免受调理素的作用。它能延长纳米粒在循环系统的时间, 使纳米粒被清除前能有效的聚集在肿瘤部位^[5]。PEG-PLGA (聚乳酸-羟基乙酸共聚物)、PEG-DSPE (二硬脂酰磷脂酰乙醇胺)、PEG-PLA (聚乳酸)、PEG-CHOL 等广泛用于修饰阳离子脂质体, 延长体内的循环时间^[16-18]。Xu 等^[19]新合成的 PEG-CHMC-liposomes (PEG-cholesterol derivatives) 在小鼠体内反复注射时, 能明显降低血液清除速率, 从而延长了血液循环时间。因此对脂质体进行 PEG 化, 已经成为当前降低 RES 吸收的主要途径。

2.2 提高靶向性的方法

2.2.1 配体修饰的脂质体 配体修饰的脂质体是指在脂质体表面结合了配体, 通过配体分子的特异性、专一性地与靶细胞表面的互补分子相互作用, 使脂质体在靶区释放核酸药物。这类配体有各种糖脂或糖蛋白、植物凝集素、肽类激素、小半抗原、抗体、叶酸和转铁蛋白等。而常用的受体主要是叶酸、转铁蛋白、表皮生长因子、白细胞介素和黏液蛋白 1 等^[10, 20]。可以根据临床需要选择不同的配体与脂质体连接, 从而达到特定组织或细胞。Pirolo 等^[18]将转铁蛋白连接在脂质体上, 介导 pSCMV-RB94 基因转染人类膀胱癌 HTB-9 细胞时, 对细胞呈明显的生长抑制作用, 并诱导荷瘤小鼠肿瘤的凋亡。含转铁蛋白的脂质体在肿瘤部位的分布明显高于不含转铁蛋白的脂质体。Yoshida 等^[21]用 PEG-叶酸-脂质体考察叶酸对两种细胞的靶向性, 一种是过表达叶酸受体的鼻咽表皮样癌细胞 (KB), 另一种是不表达叶酸受体的人类成纤维细胞 (WI-38)。结果表明 PEG-叶酸-脂质体能有效的诱导 KB 细胞的凋亡, 而不能诱导 WI-38 细胞的凋亡。这种通过配体-受体结合方式来诱导脂质体复合物的转染具有高的药物生物利用度、低的细胞毒性和特异靶向性等特点, 已经成为当前研究的热点^[22, 23]。

2.2.2 磁靶向性脂质体 磁性脂质体在体外磁场的作用下, 将抗肿瘤核酸药物选择性地输送和定位于靶细胞, 从而降低药量, 减少毒性, 提高疗效。在交变磁场作用下, 到达靶区的磁场粒子能迅速升温至有效治疗温度, 导致肿瘤组织坏死, 而不含磁性脂质体的正常组织则不受损伤。Zheng 等^[24]制备了磁靶向脂质体/pDNA 复合物, 并转染 THLE-3 细胞。结果显示, 在外界磁场的作用下磁靶向脂质体/pDNA 复合物的肝靶向性强于普通脂质体/pDNA 复合物, siRNA 的基因沉默效率高。另外, 磁性靶向脂质体还可用于治疗脊髓索损伤等其他疾病^[25]。

2.2.3 pH 敏感的靶向脂质体 pH 敏感的靶向脂质体是利用肿瘤间质液的 pH 值显著低于周围正常组织的特点所设计。这种脂质体在低 pH 范围内可释放药物, 通常采用对 pH 敏感类脂 (如 DPPC、十七烷磷酸酯) 为类脂质膜, 其原理是 pH 降低时, 可导致脂肪酸基的质子化形成晶相的非相层结构使膜融合而加速释药。树突状细胞 (DC 细胞) 是一种有效的抗原递呈细胞, 对肿瘤的免疫反应起着重要作用。但目前主要利用 DC 细胞递呈外源性肿瘤结合的抗原 (TAAs) 来激活 TAA 特异性的免疫反应。由于这种递呈过程使抗原片段肽结合到 MH-II 分子上的量很少,

导致免疫反应比较低。Yuba 等^[26]利用 pH 敏感的原理制备了一种新型的 pH 敏感的脂质复合物, 将表达 TAA 的质粒 DNA 有效传递到 DC2.4 细胞内, 增强了细胞的免疫反应。这证明以 pH 敏感脂质体为基础的脂质复合物能作为 DC 细胞的非病毒基因载体用于肿瘤细胞的免疫治疗。

2.3 提高内涵体中核酸释放的方法

2.3.1 从“离子对机制”入手 Xu 等^[27]首次提出阳离子脂质载体系统从内涵体释放的机制。在阳离子脂质载体被细胞内吞后, 阳离子脂质与内涵体膜的阴离子脂质结合形成离子对结构, 该结构不仅使内涵体膜去稳定化, 而且使阳离子脂质体去组装化, 从而导致内涵体破裂而释放其内容物。离子对结构能促进反六角相 (H_{II}) 的形成, 且只有那些含有小而少量的亲水性基团、含有大量疏水性酰基或烷基的脂质才易形成六角相结构, 且其不饱和度越高越有利于转染。因此具有 C18 的阳离子脂质比 C14 (C16) 的阳离子脂质更利于内涵体中核酸的释放^[28]。另外, 具有 C18:1 (含有 18 个碳和每条碳链上有 1 个双键, 如 DOTAP) 的阳离子脂质比 C18:0 (如 DSTAP) 的转染效率高^[7, 29]。

近年来, 科研工作者致力于合成新的阳离子脂质, 以提高脂质体介导核酸传递的效率。阳离子脂质的结构分为 4 部分, 即亲水的阳离子头部、连接链 (或骨架链)、连接键和疏水尾部。其中带正电的阳离子头部对结合核酸的磷酸基团是非常关键的, 因此所有的阳离子脂质都含带正电荷的氨基系统。根据其结构特点可以分为以下几类: ① 头部含有单个氨基基团的单价脂肪族 (monovalent aliphatic lipids), 如: DOTAP、DOTMA (*N*[1-(2, 3-dioleoyloxy) propyl]-*N*, *N*, *N*-trimethylammonium-chloride)、DMRIE、(*N*-(2-hydroxyethyl)-*N*, *N*-dimethyl-2, 3-bis(tetradecyloxy-1-propananion-bromide))、DOTIM (1-[2-(oleoyloxy)ethyl]-2-oleyl-3-(2-hydroxyethyl)) 等。② 头部含有多个氨基基团的多价脂肪族, 如 DOGS (dioctadecylamidoglycylspermine)。③ 胆固醇衍生物, 如 DC-CHOL、BGTC (bis-guanidium-tren-cholesterol) 等^[10]。Heyes 实验室^[30]合成了一系列不同饱和度的结构相似的阳离子脂质, 通过实验证明了核酸释放而不是核酸吸收是限制核酸发挥作用的主要途径, 并验证了新合成的 DlinDMA (1, 2-dilinoleoyloxy-*N*, *N*-dimethyl-3-aminopropane) 能促进六角相的形成, 加速内涵体中核酸的释放。Santel 等^[31]合成的新型阳离子脂质 AtuFECT01 (*b*-*L*-arginyl-2, 3-*L*-diaminopropionic acid-

N-palmityl-*N*-oleyl-amide-trihydro-chloride), 与 DOTAP 和 DOTMA 相比, 其更能有效的结合 siRNA。通过实验证明了 AtuFECT01 不仅能提高 siRNA 的细胞吸收, 更重要的是促进 siRNA 从内涵体释放, 提高了基因沉默效率。

辅助脂质 DOPE 能促进膜的融合及内涵体的脱稳定化^[32]。其主要机制是: DOPE 本身含带负电的磷酸二脂, 它的存在能中和带正电荷的阳离子脂质, 这种特点会导致脂质复合物表面电位的降低, 促进与内涵体膜的相互作用, 导致相的变化。另外, DOPE 也可以与 DNA 的磷酸基团相互作用, 削弱阳离子脂质与 DNA 的结合, 使得含有磷脂酰乙醇胺 (PE) 的磷脂成分在细胞介质中不稳定而降解^[28]。因此脂质和辅助脂质的选择对于药物从内涵体逃逸也很关键。

2.3.2 从“质子海绵效应”机制入手 与“离子对机制”促使内涵体释放不同, 多聚阳离子脂质复合物, 聚乙烯亚胺聚合物/脂质体^[33]是利用质子海绵效应 (proton sponge effect) 来促进内涵体释放的。根据质子海绵效应原理, 聚合物中的未质子化的伯、仲、叔胺有不同的离子解离常数 (pK_a), 可在比较宽泛的 pH 范围起到缓冲作用。这种缓冲作用可以保护 siRNA 在内涵体初期至末期, 直到被溶酶体融合的过程中不被降解。同时, 因内涵体为酸性环境, PEI 的缓冲性质会导致大量氢离子、氯离子和水分子进入内涵体, 使内涵体膨胀破裂^[34]。除 PEI 外, PAMAM (聚酰胺—胺)^[10]、组氨酸聚合物^[35]及对 pH 敏感的脂质成分^[36]也能引起质子海绵效应。

2.3.3 光化学内化作用 (PCI) PCI 促进内涵体释放的原理是: 它通过特定波长的光, 激活位于靶细胞内涵体中的光敏剂, 启动光化学反应, 产生单态氧 1O_2 和三态氧 3O_2 等活性氧成分。单态氧是强有力的氧化剂, 可氧化多种生物分子如不饱和脂肪酸、某些氨基酸和核酸碱基等, 从而诱导多种细胞结构损伤。通过光化学反应使内涵体膜损伤, 释放泡内转染的核酸进入胞浆发挥作用^[37]。PCI 能促进许多大分子在细胞内的传递, 包括 I 型核糖体灭活蛋白 (RIPs)、RIP 依赖的细胞毒素、基因和化学治疗药物等。此外 PCI 技术已经成功的应用于多种与临床相关的动物模型^[38]。在利用 PCI 技术促进内涵体逃逸时, 要控制好光照时机和光剂量, 从而使光敏剂的毒性最小却又能达到最大的治疗效果^[39]。

2.3.4 可降解的 PEG 的应用 虽然 PEG 能延长血液循环时间, 但是 PEG 化的脂质体由于空间障碍的存在, 严重限制了阳离子脂质同内涵体脂质的接触, 从

而使以 PEG 化的脂质体为载体的系统很难将核酸从内涵体释放^[40]。而可降解的 PEG 应用到脂质体上, 在很大程度上解决了这一难题。一些小肽片段应用于 PEG-lipid 的连接, 具有合成工艺简单, 容易实现等优点。小肽片段在体内很容易被一些内源性物质降解, 达到脱 PEG 链段的目的^[41]。Hatakeyama 等^[42]制备了 PEG-肽-DOPE (PPD) 三元复合物, 利用结构肽能够被肿瘤细胞表面特异性表达的金属酶裂解, 达到提高内涵体逃逸的作用。自身可降解的 PEG-ceramide (神经酰胺) 的应用同样发挥相似的作用^[43]。Ambegia 等^[44]合成了一系列可降解的 PEG-二酰基甘油-脂质 (PEG-S-DAG), 并制备了含 PEG-S-DAG 的 SPLP (stabilized plasmid lipid particles), 实验发现含此结构的 SPLP 比含 PEG-ceramide 的 SPLP 血液循环时间长、肿瘤选择性基因表达高。实验还证明含短链的 PEG-S-DMG 成分的 SPLP 基因转染效率高于其他的 SPLP。

由于内涵体内部是酸性环境, 通过酸敏感的连接键将 PEG 连接在脂质体复合物上, 可以促进 PEG 的脱稳定化。一些化学键如缩醛^[45, 46]、乙烯醚^[47]、聚原酸酯^[48]、脲^[49]等一旦被内吞为内涵体或溶酶体, 也有 pH 依赖的水解降解作用。为了改善内吞和内涵体逃逸, Walker 等^[50]通过 pH 敏感的脲键将 PEG 连接在 PEI 和聚左旋赖氨酸 (poly-L-lysine, PLL) 上, 同时这种聚合物含靶向配体转铁蛋白。体内外实验证明: 含有这类 PEG 的受体靶向的聚合物其转染效率显著高于对照组 (PEG 聚合物组)。Choi 等^[48]应用酸敏感的 POD (PEG-diorthoester-distearoylglycerol lipid) 与 DOTAP/PE 制备的 SPLP (POD-SPLP), 能通过 pH 激活内涵体逃逸来介导体外基因的转染。实验将 pH 敏感和不敏感的 SPLP 细胞内吞数量控制在相同水平条件下, 发现 POD-SPLP 体外基因转染活性是 pH 不敏感的纳米粒的 3 倍。这证明了 POD-SPLP 是通过较快的内涵体逃逸而不是较强的细胞内吞来增强体外基因转染活性的。

2.3.5 可降解的脂质体的应用 Wang 等^[51]设计了可以酸催化分解的聚乙二醇磷脂衍生物 (Me PEG2000-POPA)。该衍生物由磷酸胺键将聚乙二醇胺 (MePEG2000-NH₂) 与棕榈酰油酰甘油磷脂酸 (POPA) 连接而成。这种新型聚乙二醇磷脂衍生物可以作为膜材用来构建稳定的脂质体制剂, 在酸性条件下, 磷酸胺键不稳定、易水解, 在发生酯键断裂后, 游离出来的棕榈酸油酸甘油磷脂酸使脂质体磷脂双分子层结构发生破坏, 最终导致脂质体膜的破裂, 产

生释药的现象。

2.3.6 膜融合肽的应用 为了促进内涵体逃逸, 细胞融合肽的应用也很广泛。流感嗜血杆菌凝集素肽-2^[52]、HIV gp41-derived peptide^[53]、melittin^[54] (derived from bee venom)、HIV-1 Tat-peptide^[55]以及合成肽如 KALA^[56]、GALA^[57]、EALA^[58]等可以连接在脂质体复合物上, 发挥促进内涵体释放核酸的作用。

Kwon 等^[53]将膜融合肽 HIV gp41-derived peptide 共价结合在 PEI 上, 用来加强内涵体内核酸的释放。其释放机制是: 这种膜融合肽能形成两亲性的 α 螺旋结构, 这种 α 螺旋结构能在内涵体膜上形成孔隙, 有利于 DNA 释放到细胞浆发挥作用^[33]。另外, CPPs (cell-penetrating peptides) 的研究也为内涵体逃逸提供了解决方案。常见的 CPPs 有 Tat₄₉₋₅₇、polyarginine、penetratin、HIV-Tat derived PTD4、pVEC、ARF (1-22)、EB1 和 histatin 5 等^[59]。一些化学试剂如氯喹^[60]、钙^[61]、蔗糖^[62]等与 CPPs 联用, 能显著提高 CPPs 促内涵体逃逸的作用, 但在体内实验中不能很好发挥作用, 其应用受到限制^[59]。近年来, 许多实验室对 CPPs 进行改造, Abes 等^[63]将 Tat 与聚组氨酸结合 (Tat-10H), 借助组氨酸的咪唑基团 ($pK_a = 6$) 在内涵体酸性环境下 ($pH = 5 \sim 6.5$) 发挥质子海绵效应, 来促进内涵体逃逸。这种改造的 CPPs 可以转染质粒 DNA 编码的荧光素酶报告基因 (luciferase reporter gene), 并通过 luciferase 实验发现 Tat-10H 的转染效率是未改造的 Tat 的 7 000 倍。实验证明了 Tat-10H 与原始的 Tat 相比更能增加内涵体的裂解。另一种促进内涵体逃逸的方法是在 CPP 上连接 6-氨基乙酸 (Ahx), 其作用机制是 Ahx 能增加 CPP 的灵活性, 降低 CPP 与细胞表面带负电荷的硫酸乙酰肝素的相互作用, 这种弱的相互作用可以使 CPP 及其携带的核酸有效的逃逸内涵体。

因此探寻一些新的膜融合肽对提高核酸的治疗作用是一个新的突破^[64]。

2.3.7 其他 Xiong 等^[65]证明了向溶酶体剂 (lysosomotropic agent) 氯喹 (chloroquine) 能通过增加内涵体的 pH 促进脂质体中药物的释放, 这也为其他向溶酶体剂如伯氨喹、羟氯喹等解决内涵体逃逸提供一种新思路。

2.4 促进 DNA 进入核膜的方法

聚合物 PEI 不仅能通过质子海绵效应促进基因内涵体逃逸, 还能有效压缩 DNA 使其穿过核膜, 在促进核膜融合的过程中, 其粒径及结构对转染影响是很大的。一些聚合物如聚赖氨酸、聚精氨酸也能辅

助 DNA 穿过哺乳动物的细胞核膜^[66]。因此, 脂质体与聚合物的联用, 能增强核酸进入细胞核。另外核定位信号 (NLS) 肽也能加强核膜转运^[67], 许多实验室证明 SV40NLS 肽可以共价键结合在基因载体上 (脂质体) 或质粒 DNA (pDNA) 上, 通过 “NPC 依赖的途径” 将 pDNA 有效的传递到细胞核内, 增强蛋白表达^[68-70]。Kurihara 等^[71]将 NLS 硬脂酰化 (stearylized, STR) 连接在脂质体 (Lip) 上, 同时比较了 NLS-Lip, NLS-PEG-Lip 及 PEG-Lip 核定位情况。结果显示, PEG-Lip 对细胞核的结合情况很少, 可忽略不计; NLS-Lip 对细胞核的结合情况与 STR-NLS 的程度呈正比; 而 NLS-PEG-Lip 即使在 STR 程度很低的情况下, 也表现出较高的核亲和力。这提示在改善 NLS-Lip 与细胞核的结合情况方面, PEG 空间的存在也是一个重要因素。为设计核靶向载体提供一个重要的信息。

3 展望

脂质体作为一种很有前景的非病毒核酸载体系统, 虽然在介导核酸传递过程中遇到了上述问题, 但已采取相应的措施解决, 为脂质体转载核酸的应用奠定了基础。尽管脂质体介导核酸传递目前还处于研究阶段, 相信在不久的将来, 它的发展和完善必将使人类传统用药方式发生一场全新的变革, 并为人类肿瘤的研究提供更好的治疗方案。

References

- [1] Zuhorn IS, Engberts JB, Hoekstra D, et al. Gene delivery by cationic lipid vectors: overcoming cellular barriers [J]. *Eur Biophys J*, 2007, 36: 349-362.
- [2] Rao NM. Cationic lipid-mediated nucleic acid delivery: beyond being cationic [J]. *Chem Phys Lipids*, 2010, 163: 245-252.
- [3] Zelphati O, Uyechi LS, Barron LG, et al. Effect of serum components on the physico-chemical properties of cationic lipid/oligonucleotide complexes and on their interactions with cells [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1390: 119-133.
- [4] Donald E, Owens III, Nicholas A, et al. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles [J]. *Int J Pharm*, 2006, 307: 93-102.
- [5] Li SD, Huang L. Stealth nanoparticles: high density but sheddable PEG is a key for tumor targeting [J]. *J Control Release*, 2010, 145: 178-181.
- [6] Bally MB, Harvie P, Wong FMP, et al. Biological barriers to cellular delivery of lipid-based DNA carriers [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 1999, 38: 291-315.
- [7] Akita H, Kudo A, Minoura A, et al. Multi-layered nanoparticles

- for penetrating the endosome and nuclear membrane *via* a step-wise membrane fusion process [J]. *Biomaterials*, 2009, 30: 2940–2949.
- [8] Chen YC, Sen J, Bathula SR, et al. Novel cationic lipid that delivers siRNA and enhances therapeutic effect in lung cancer cells [J]. *Mol Pharm*, 2009, 6: 696–705.
- [9] Dow S, Elmslie R, Kurzman I, et al. Phase I study of liposome-DNA complexes encoding the interleukin-2 gene in dogs with osteosarcoma lung metastases [J]. *Hum Gene Ther*, 2005, 16: 937–946.
- [10] Morille M, Passirani P, Vonarbourg A, et al. Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer [J]. *Biomaterials*, 2008, 29: 3477–3496.
- [11] Ngo KX, Umakoshi H, Shimanouchi T, et al. Chitosanase displayed on liposome can increase its activity and stability [J]. *J Biotechnol*, 2010, 146: 105–113.
- [12] Tseng YH, Huang L. Self-assembled lipid nanomedicines for siRNA tumor targeting [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2009, 5: 351–363.
- [13] Zhang Y, Li HM, Sun J, et al. DC-Chol/DOPE cationic liposomes: a comparative study of the influence factors on plasmid pDNA and siRNA gene delivery [J]. *Int J Pharm*, 2010, 390: 198–207.
- [14] Gao J, Sun J, Li HM, et al. Lyophilized HER2-specific PEGylated immunoliposomes for active siRNA gene silencing [J]. *Biomaterials*, 2010, 31: 2655–2664.
- [15] Pasut G, Veronese FM. PEG conjugates in clinical development or use as anticancer agents an overview [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61: 1177–1188.
- [16] Zhang HJ, Xia HS, Wang J, et al. High intensity focused ultrasound-responsive release behavior of PLA-b-PEG copolymer micelles [J]. *J Control Release*, 2009, 139: 31–39.
- [17] Xu H, Wang KQ, Deng YH, et al. Effects of cleavable PEG-cholesterol derivatives on the accelerated blood clearance of PEGylated liposomes [J]. *Biomaterials*, 2010, 31: 4757–4763.
- [18] Pirollo KF, Rait A, Zhou Q, et al. Tumor-targeting nanocomplex delivery of novel tumor suppressor RB94 chemosensitizes bladder carcinoma cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14: 2190–2198.
- [19] Xu H, Wang KQ, Deng YH, et al. Effects of cleavable PEG-cholesterol derivatives on the accelerated blood clearance of PEGylated liposomes [J]. *Biomaterials*, 2010, 31: 4757–4763.
- [20] Sapra P, Tyagi P, Allen TM, et al. Ligand-targeted liposomes for cancer treatment [J]. *Curr Drug Deliv*, 2005, 2: 369–381.
- [21] Yoshida T, Oide N, Sakamoto T, et al. Induction of cancer cell-specific apoptosis by folate-labeled cationic liposomes [J]. *J Control Release*, 2006, 111: 325–332.
- [22] Zhao H, Wang RZ, Wang F, et al. Preparation of brain targeted immunoliposomes [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2009, 44: 1285–1290.
- [23] Yan Y, Qi XR. Preparation and properties of folate receptor-targeted cationic liposomes [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2008, 43: 1134–1139.
- [24] Zheng XL, Lu JP, Deng L, et al. Preparation and characterization of magnetic cationic liposome in gene delivery [J]. *Int J Pharm*, 2009, 366: 211–217.
- [25] Wang HJ, Zhang SN, Liao ZY, et al. PEGlated magnetic polymeric liposome anchored with TAT for delivery of drugs across the blood-spinal cord barrier [J]. *Biomaterials*, 2010, 31: 6589–6659.
- [26] Yuba E, Kojima C, Sakaguchi N, et al. Gene delivery to dendritic cells mediated by complexes of lipoplexes and pH-sensitive fusogenic polymer-modified liposomes [J]. *J Control Release*, 2008, 130: 77–83.
- [27] Xu Y, Szoka FC Jr. Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complex used in cell transfection [J]. *Biochemistry*, 1996, 35: 5616–5623.
- [28] Zuhorn IS, Oberle V, Visser WH, et al. Phase behavior of cationic amphiphiles and their mixtures with helper lipid influences lipoplex shape, DNA translocation and transfection efficiency [J]. *Biophys J*, 2002, 83: 2096–2108.
- [29] Tseng YC, Mozumdar S, Huang L, et al. Lipid-based systemic delivery of siRNA [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61: 1721–1731.
- [30] James H, Lorne P, Kaz B, et al. Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids [J]. *J Control Release*, 2005, 107: 276–287.
- [31] Santel A, Aleku M, Keil O, et al. A novel siRNA-lipoplex technology for RNA interference in the mouse vascular endothelium [J]. *Gene Therapy*, 2006, 13: 1222–1234.
- [32] Wasungu L, Hoekstra D. Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes [J]. *J Control Release*, 2006, 116: 255–264.
- [33] Hanzliková M, Soininen P, Lampela P, et al. The role of PEI structure and size in the PEI/liposome-mediated synergism of gene transfection [J]. *Plasmid*, 2009, 61: 15–21.
- [34] Lee SY, Huh MS, Lee S, et al. Stability and cellular uptake of polymerized siRNA (poly-siRNA)/polyethylenimine (PEI) complexes for efficient gene silencing [J]. *J Control Release*, 2010, 141: 339–346.
- [35] Martin ME, Rice KG. Peptide-guided gene delivery [J]. *AAPS J*, 2007, 9: E18–29.
- [36] Kim IY, Kang YS, Lee DS, et al. Antitumor activity of

- EGFR targeted pH-sensitive immunoliposomes encapsulating gemcitabine in A549 xenograft nude mice [J]. *J Control Release*, 2009, 140: 55–60.
- [37] Berg K, Weyergang A, Prasmickaite L, et al. Photochemical internalization (PCI): a technology for drug delivery [J]. *Methods Mol Biol*, 2010, 635: 133–145.
- [38] Norum OJ, Selbo PK, Weyergang A, et al. Photochemical internalization (PCI) in cancer therapy: from bench towards bedside medicine [J]. *J Photochem Photobiol B*, 2009, 96: 83–92.
- [39] Raemdonck K, Naeye B, Høgset A, et al. Prolonged gene silencing by combining siRNA nanogels and photochemical internalization [J]. *J Control Release*, 2010, 145: 281–288.
- [40] Miyata K, Fukushima S, Nishiyama N, et al. PEG-based block cationomers possessing DNA anchoring and endosomal escaping functions to form polyplex micelles with improved stability and high transfection efficacy [J]. *J Control Release*, 2007, 122: 252–260.
- [41] Xu H, Deng YH, Chen DW, et al. Recent advances in the study of cleavable PEG-lipid derivatives modifying liposomes [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2008, 43: 18–22.
- [42] Hatakeyama H, Akita H, Kogure K, et al. Development of a novel systemic gene delivery system for cancer therapy with a tumor-specific cleavable PEG-lipid [J]. *Gene Ther*, 2007, 14: 68–77.
- [43] Monck MA, Mori A, Lee D, et al. Stabilized plasmid-lipid particles: pharmacokinetics and plasmid delivery to distal tumors following intravenous injection [J]. *J Drug Target*, 2000, 7: 439–452.
- [44] Ambegia E, Ansell S, Cullis P, et al. Stabilized plasmid-lipid particles containing PEG-diacylglycerols exhibit extended circulation lifetimes and tumor selective gene expression [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1669: 155–163.
- [45] Tomlinson R, Heller J, Brocchini S, et al. Polyacetal-doxorubicin conjugates designed for pH-dependent degradation [J]. *Bioconjug Chem*, 2003, 14: 1096–1106.
- [46] Murthy N, Campbell J, Fausto N, et al. Design and synthesis of pH-responsive polymeric carriers that target uptake and enhance the intracellular delivery of oligonucleotides [J]. *J Control Release*, 2003, 89: 365–374.
- [47] Shin J, Shum P, Thompson DH, et al. Acid-triggered release via dePEGylation of DOPE liposomes containing acid-labile vinyl ether PEG-lipids [J]. *J Control Release*, 2003, 91: 187–200.
- [48] Choi JS, MacKay JA, Szoka FC Jr. Low-pH-sensitive PEG-stabilized plasmid-lipid nanoparticles: preparation and characterization [J]. *Bioconjug Chem*, 2003, 14: 420–429.
- [49] Greenfield RS, Kaneko T, Daues A, et al. Evaluation *in vitro* of adriamycin immunoconjugates synthesized using an acid-sensitive hydrazone linker [J]. *Cancer Res*, 1990, 50: 6600–6607.
- [50] Walker GF, Fella C, Pelisek J, et al. Toward synthetic viruses: endosomal pH-triggered deshielding of targeted polyplexes greatly enhances gene transfer *in vitro* and *in vivo* [J]. *Mol Ther*, 2005, 11: 418–425.
- [51] Wang Z, Wang RT, Liu Q, et al. Acid-sensitive liposomes prepared with poly (ethylene glycol)-PoPA derivatives [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2009, 44: 519–524.
- [52] Wagner E, Plank C, Zatloukal K, et al. Influenza virus hemagglutinin HA-2 N-terminal fusogenic peptides augment gene transfer by transferrin-polylysine-DNA complexes: toward a synthetic virus-like gene-transfer vehicle [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, 89: 7934–7942.
- [53] Kwon EJ, Bergen JM, Pun SH, et al. Application of an HIV gp41-derived peptide for enhanced intracellular trafficking of synthetic gene and siRNA delivery vehicles [J]. *Bioconjug Chem*, 2008, 19: 920–927.
- [54] Ogris M, Carlisle RC, Bettinger T, et al. Melittin enables efficient vesicular escape and enhanced nuclear access of nonviral gene delivery vectors [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 47550–47555.
- [55] Ekoski E, Aitio O, Törnquist K, et al. HIV-1 Tat-peptide inhibits protein kinase C and protein kinase A through substrate competition [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2010, 40: 404–411.
- [56] Lee H, Jeong JH, Park TG, et al. PEG grafted polylysine with fusogenic peptide for gene delivery: high transfection efficiency with low cytotoxicity [J]. *J Control Release*, 2002, 79: 283–291.
- [57] Li W, Nicol F, Szoka FC Jr, et al. GALA: a designed synthetic pH-responsive amphipathic peptide with applications in drug and gene delivery [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004, 56: 967–985.
- [58] Turk MJ, Reddy JA, Chmielewski JA, et al. Characterization of a novel pH-sensitive peptide that enhances drug release from folate-targeted liposomes at endosomal pHs [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1559: 56–68.
- [59] Fonseca SB, Pereira MP, Kelley SO, et al. Recent advances in the use of cell-penetrating peptides for medical and biological applications [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61: 953–964.
- [60] Ciftci K, Levy RJ. Enhanced plasmid DNA transfection with lysosomotropic agents in cultured fibroblasts [J]. *Int J Pharm*, 2001, 218: 81–92.
- [61] Shiraishi T, Pankratova S, Nielsen PE, et al. Calcium ions effectively enhance the effect of antisense peptide nucleic

- acids conjugated to cationic tat and oligoarginine peptides [J]. Chem Biol, 2005, 12: 923–929.
- [62] Abes S, Moulton HM, Clair P, et al. Vectorization of morpholino oligomers by the (R-Ahx-R)₄ peptide allows efficient splicing correction in the absence of endosomolytic agents [J]. J Control Release, 2006, 116: 304–313.
- [63] Abes R, Moulton HM, Clair P, et al. Delivery of steric block morpholino oligomers by (R-X-R)₄ peptides: structure-activity studies [J]. Nucleic Acids Res, 2008, 36: 6343–6354.
- [64] El-Sayed A, Masuda T, Khalil I, et al. Enhanced gene expression by a novel stearylated INF7 peptide derivative through fusion independent endosomal escape [J]. J Control Release, 2009, 138: 160–167.
- [65] Xiong SB, Li H, Yu B, et al. Triggering liposomal drug release with lysosomotropic agent [J]. J Pharm Sci, 2010, 99: 5011–5018.
- [66] Belting M, Sandgren S, Wittrup A, et al. Nuclear delivery of macromolecules: barriers and carriers [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2005, 57: 505–527.
- [67] Nagasaki T, Myohoji T, Tachibana T, et al. Can nuclear localization signals enhance nuclear localization of plasmid DNA? [J]. Bioconjug Chem, 2003; 14: 282–288.
- [68] Eguchi A, Furusawa H, Yamamoto A, et al. Optimization of nuclear localization signal for nuclear transport of DNA-encapsulating particles [J]. J Control Release, 2005, 104: 507–519.
- [69] Aris A, Villaverde A. Engineering nuclear localization signals in modular protein vehicles for gene therapy [J]. Biochem Biophys Res, 2003, 304: 625–631.
- [70] Vaysse L, Gregory LG, Harbottle RP, et al. Nuclear-targeted minicircle to enhance gene transfer with non-viral vectors *in vitro* and *in vivo* [J]. J Gene Med, 2006, 8: 754–763.
- [71] Kurihara D, Akita H, Kudo A, et al. Effect of polyethylene-glycol spacer on the binding properties of nuclear localization signal-modified liposomes to isolated nucleus [J]. Biol Pharm Bull, 2009, 32: 1303–1306.

《药学报》英文刊将在 2011 年正式出版

《药学报》英文刊经过多年酝酿、近两年的准备（见药学报网站 www.yxxb.com.cn 英文网刊）近日与荷兰 Elseviers 出版公司达成合作出版协议，拟于 2011 年正式出版。出版周期为双月刊。论文将在 Elseviers 期刊数据库 ScienceDirect 平台以 OA 方式刊出，便于广大读者免费阅读和下载。

《药学报》英文刊是《药学报》中文刊的延伸，集中报道国内外药学领域最新研究进展和成果，其内容和形式与《药学报》中文刊一致。栏目包括综述、研究论文和研究快报，专业涉及药理、药物化学、天然药物化学、药物分析、药剂及生药等药学学科。目前投稿方式和论文格式同《药学报》中文刊，但不收审稿费、版面费，也不支付稿费。

欢迎国内外药学研究工作者积极投稿。

《药学报》编辑部

2011 年 1 月