

细胞外激活纳米载药系统研究进展

王晓宇¹, 高静², 张玮³, 朱全刚¹, 武鑫¹, 高中¹ (1. 第二军医大学长海医院药学部, 上海 200433; 2. 第二军医大学药学院药剂学教研室, 上海 200433; 3. 解放军第 522 医院, 河南 洛阳 471003)

[摘要] 隐蔽性和靶向性对于纳米载体能否高效、选择性的递送药物非常重要, 然而, 传统方法难以让纳米载体同时具备这两种性质。新型靶向技术的迅速发展有望克服这一难点。本文在回顾传统靶向技术, 阐述其取得的成果和面临的瓶颈的同时, 着重讨论了利用环境刺激来激活的新型纳米载体的研究进展。

[关键词] 肿瘤靶向; 纳米载体; 细胞外激活; 环境刺激

[中图分类号] R943 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2012)01-0004-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2012.01.002

Progress on extracellularly activated nanocarriers

WANG Xiao-yu¹, GAO Jing², ZHANG Wei³, ZHU Quan-gang¹, WU Xin¹, GAO Shen¹ (1. Department of Pharmacy, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 3. The 522th Hospital of PLA, Luoyang, Henan 471003, China)

[Abstract] Both the stealth and targeting features were important for effective and selective drug delivery to the tumors. However, it was difficult to achieve both features simultaneously. Some of the novel targeting strategies had the potential to overcome this challenge. The new targeting technologies with recent examples were reviewed, which utilized the environmental stimuli to activate the nanocarriers. Traditional strategies for tumor-targeted nanocarriers were briefly discussed with an emphasis on their achievements and challenges.

[Key words] tumor targeting; nanocarriers; extracellular activation; environmental stimuli

研发能够通过全身给药, 选择性的递送抗癌药物至肿瘤细胞, 且不伤害正常细胞的药物载体是纳米医学的主要发展方向。由于实体肿瘤有血管生长旺盛、脉管结构缺损以及淋巴管损伤等独特的结构特征^[1], 可使长循环纳米载体在肿瘤组织附近血管选择性的外渗和滞留, 即纳米粒的被动靶向。目前在临床应用的靶向纳米载体多数利用了纳米粒的被动靶向特性。与被动靶向相应的是主动靶向, 即在纳米载体的表面链接靶向分子能够特异性的识别肿瘤细胞。主动靶向技术依赖于载体表面的靶向分子例如抗体、多肽, 或者核酸与肿瘤组织表面的受体之间的特异性作用。例如人表皮生长因子受体-2 (HER-2)^[2]、叶酸受体^[3]、血管活性肠肽受体 (VIP-R)^[4]等常被用作主动靶向肿瘤的纳米载体的靶点。本文针对被动靶向和主动靶向纳米给药技术的局限性, 讨论了新型靶向技术——利用环境刺激来激活的新型纳米载体的研究进展。

1 被动靶向、主动靶向面临的局限性

[基金项目] 国家自然科学基金 (81172514, 30873178)。

[作者简介] 王晓宇 (1987-), 男, 硕士研究生。Tel: 13917127450, E-mail: scncwxy@yahoo.cn。

[通讯作者] 高中。E-mail: liullk@126.com。

肿瘤生理学发现肿瘤的增强渗透和滞留效应 (Enhanced Permeability and Retention, EPR 效应) 对于肿瘤靶向药物递送有重要意义。纳米载体在正常的血管中长循环, 在肿瘤组织的血管处外渗, 而肿瘤组织淋巴回流缺损使纳米载体停留在肿瘤组织起到靶向作用。虽然长循环纳米载体利用 EPR 效应增强了药物在肿瘤部位的分布, 但是还面临许多问题: ①靶向分布效果主要取决于肿瘤部位血管的增生情况^[5]、血管的密度及肿瘤的种类等^[6], 因此被动靶向的靶向性因人而异。②实体瘤中细胞间隙压力较大, 这会减少纳米载体在肿瘤组织的有效分布和吸收^[7]。

主动靶向修饰是指将靶向分子接在纳米载体表面, 利用靶向分子如抗体、配体、多肽、核酸等直接与肿瘤表面的受体结合, 增强纳米载体与肿瘤细胞之间的特异性相互作用, 选择性的增加药物递送至肿瘤组织的比例和程度。主动靶向技术虽然能够有效的增强抗癌疗效, 但是仍存在许多问题。其中之一就是靶向分子的修饰使纳米载体粒径显著增大, 从而增加了在循环过程中的纳米载体被 RES 识别清除的几率^[8]。这会加快其在循环过程中被清除的速率, 减少药物到达靶部位的量。需要通过修饰 PEG 长链来延长循环时间。但是纳米载体表面

PEG化在降低被RES系统识别的同时也阻碍了其靶分子与肿瘤细胞表面受体的接触^[9],影响了肿瘤细胞对纳米载体和药物的吸收。因此需要在靶分子的靶向作用和PEG链的屏蔽作用中做出取舍^[10]。这些问题的存在可以部分解释至今无FDA批准的主动靶向制剂上市的原因。

2 细胞外激活肿瘤靶向技术

理想的纳米粒应该有隐蔽性,可利用EPR效应,同时能与肿瘤之间特异性、高亲和力的相互作用,使载药纳米粒能够最大程度的分布到肿瘤组织和被肿瘤细胞吸收。为此,设计一种既隐蔽又靶向的纳米载药系统是新型靶向技术的核心任务。近年来一些新的靶向技术正在朝这一目标发展,如细胞外激活肿瘤靶向技术。其目的是使纳米载体在循环过程中维持隐蔽的状态(被动靶向)然后在到达肿瘤部位后转化成细胞激活状态(主动靶向)。这些纳米载体被认为是“可被激活纳米载体”。这些新的靶向策略是利用了细胞外环境独特的性质来触发纳米载体的转化。肿瘤组织有独特的细胞外环境例如,低pH^[11],酶表达异常^[12]。

2.1 pH激活的系统 正常组织的细胞外基质pH值维持在7.4,细胞内pH为7.2,而在肿瘤组织pH梯度是相反的。细胞外pH值低于正常组织^[13]。这主要的原因是肿瘤组织在有氧和无氧条件下糖代谢异常,产生大量乳酸^[14]。酸环境有益于肿瘤细胞增生和侵蚀周围细胞,降解细胞外基质和破坏周围正常组织^[15]。pH敏感的靶向纳米载药系统主要包括两大类:一是在肿瘤部位裂解释放药物的pH敏感型胶束;二是在表面修饰有靶头或者穿膜肽的胶束能够随着pH值变化从隐蔽状态转化成激活态。这些纳米载药系统大多利用了pH敏感的聚组氨酸(poly-L-His)或者聚磺酰胺(poly-sulfonamide)为材料。聚组氨酸的pKa=7.0,由于咪唑环的不饱和氮原子上的孤对电子使它在pH小于7的环境中质子化带正电荷^[16]。聚磺酰胺则相反,在血液pH环境中带负电荷(pH7.4)在酸性环境中电荷中和。

2.1.1 肿瘤外pH触发胶束释放药物 此类型pH敏感型胶束在正常组织的pH环境中保持稳定,在肿瘤组织的低pH值环境中裂解释放药物。

Ko等^[17]报道了由甲氧基聚乙二醇-聚β氨基酯(mPEG-poly-β-amino ester)嵌段共聚物构成pH敏感性胶束。甲氧基聚乙二醇部分是亲水性外壳,聚β氨基酯是疏水性内核。聚β氨基酯pKa为6.5,当pH大于6.9时形成胶束(粒径为40~60nm)。在pH值为6.4时胶束内部疏水核质子化,在

6h内释放了71%的药物,而pH为7.4时在24h内释放不超过20%。在B16F10移植瘤小鼠上的实验表明胶束能有效的递送阿霉素至肿瘤部位,抑制肿瘤生长。相比于单纯注射阿霉素能显著延长生存时间。

Lee等^[18]报道了聚乳酸-b-聚乙二醇-b-聚组氨酸(poly-lactic acid-b-PEG-b-poly-L-His)三嵌段共聚物组成的pH敏感性胶束系统。聚合物是一种“花朵样”胶束,由PEG“花瓣”和由聚乳酸和聚组氨酸组成的“核”(包含疏水性药物),粒径大约在80nm左右,pKa为7.0。当pH值低于7,聚组氨酸质子化,使核膨胀裂解释放药物。理论上,系统在循环过程中是稳定的胶束,包裹药物在其核心,到达肿瘤部位微酸性的环境中释放药物^[18]。但是,此类纳米系统存在一个潜在的缺陷,药物被释放后是以游离形式进入肿瘤细胞,而不是与载体结合的形式,易被多药耐药的肿瘤排出。第二种pH敏感的纳米载药系统则可以有效的克服这一缺陷。

2.1.2 肿瘤外pH触发载体表面靶头或者穿膜肽暴露 这类型的载体在正常组织的pH值环境下细胞靶头或者穿膜肽处于隐蔽状态,在肿瘤组织的pH值环境中胞靶头或者穿膜肽暴露,转化为细胞应答态,与肿瘤表面发生作用。

Lee等^[19]的后续研究中混合两种嵌段共聚物构成了新的混合胶束:聚组氨酸-b-聚乙二醇(ploy-His-b-PEG)和聚乳酸-b-聚乙二醇-b-聚组氨酸-生物素(poly-lactic acid-b-PEG-b-poly-L-His-biotin)。在pH为7.4时,聚乳酸-b-聚乙二醇-b-聚组氨酸-生物素共聚物中的聚组氨酸是非质子化疏水状态与另一共聚物中的聚乳酸聚集在一起组成疏水性核心,此时生物素靶头靠近胶束核心,隐藏在PEG链中。当环境pH值低于7.0时,聚组氨酸核质子化转变为亲水性,从胶束核心中脱离,伸出生物素靶头,与肿瘤组织的生物素受体结合。这个转化增强了肿瘤组织对胶束的特异性吸收。进入细胞后,内吞体中pH值进一步降低使胶束彻底裂解,释放药物^[19]。研究表明pH激活的生物素-胶束携带的阿霉素能够有效的杀死耐药和非耐药的肿瘤细胞,其对肿瘤部位的靶向性和抗肿瘤活性均优于对照的生物素修饰的pH非敏感胶束。

当胶束到达肿瘤组织附近,pH<7生物素靶头从胶束核心伸出;当胶束进入内吞体后,pH<6.5胶束彻底分解释放药物。

Sawant等^[20]报道的脂质体利用pH敏感键实现激活,由隐蔽状态转变成细胞应答形式。此系统中脂质体表面通过脲键连接了亲水性PEG长链,同

时修饰了穿膜肽(transactivator of transcription, TAT)片段。在 pH7.4 时脐键保持稳定, TAT 片段被 PEG 所覆盖, 此时脂质体为长循环隐蔽状态。在 pH5 ~6 时, 随着脐键的水解 PEG 链脱去后暴露出 TAT 多肽, 转化成细胞应答状态。在体外实验中, 在 pH 为 5 的环境下, pH 敏感的脂质体比 pH 非敏感的脂质体更加有效的进入细胞^[20]。

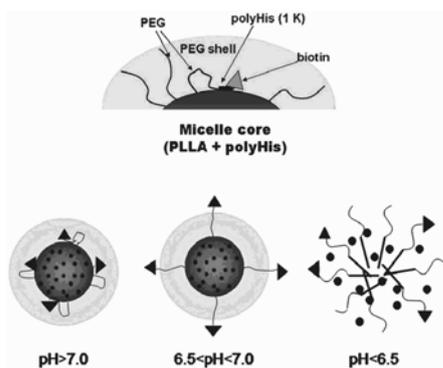


图1 pH 触发生物素-胶束产生应答的原理图

Sethuraman 等^[21] 设计了基于胶束系统的 TAT 多肽(见图 2)。通过将嵌段共聚物聚乳酸 (poly-L-lactic acid) 和聚乙二醇 (PEG) (PLLA-b-PEG) 与 TAT 多肽相连接, 构成末端带有 TAT 多肽的聚合物胶束。然后将此 TAT 胶束与两段共聚物聚异丁烯酰基磺胺地托辛-聚乙二醇 (PSD-b-PEG) 混合, 通过 PSD (pH > 7.0 时阴离子) 与 TAT 多肽 (阳离子) 的电荷作用连接在一起, 在胶束外部增加额外的 PEG 链, 在正常组织 pH 值环境中保持隐蔽状态, 延长长循环时间。在肿瘤组织附近, pH < 7 时 PSD 部分转变成了非离子形式, 与 TAT 脱离, 使胶束失去了 PEG 层暴露出 TAT 多肽末端 (转变成了 TAT 胶束) 增强了肿瘤细胞对胶束的吸收。

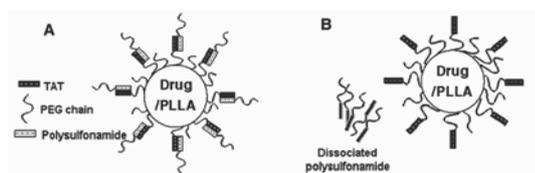


图2 pH 触发载体应答示意图

载体由两部分: PLLA-b-PEG-TAT 胶束和 pH 敏感性的 PEG-PSD 组成, 在正常组织 pH > 7 时, PSD 负电荷与 TAT 电荷吸附结合, PEG 阻碍其与细胞接触; 在肿瘤组织附近 pH < 7 时, PSD 转变为电中性脱落, 暴露 TAT, 促进载体穿膜进入细胞。

2.2 酶激活系统 利用肿瘤组织外环境表达

异常的酶是另一种特异性纳米载体激活的方法。基质金属蛋白酶 (Matrix Metalloproteinases, MMP) 是一类 Zn²⁺ 依赖的细胞外蛋白水解酶, 在肿瘤组织过量表达, 它可以降解基底膜, 促进恶性肿瘤细胞的侵袭和转移, 同时也与肿瘤组织血管新生密切相关^[22]。因此, 基质金属蛋白酶适合作为肿瘤组织细胞外靶点。

Chau 等^[23] 将右旋糖酐和甲氨嘌呤由酶敏感性多肽链接形成药物-聚合物共轭物结构, 且用于链接的多肽可以被基质金属蛋白酶 2 (MMP-2) 和基质金属蛋白酶 9 (MMP-9) 裂解。体内分布研究发现该药物-聚合物共轭物通过 EPR 效应实现肿瘤靶向^[24], 但有无 MMP 敏感性多肽链对于其肿瘤靶向分布影响不大, 表明 MMP 在药物肿瘤靶向递送上并未起到显著作用, 在过表达 MMPs 酶肿瘤移植模型中发现, MMP 敏感性和非敏感性的药物共轭物相比于游离药物均表现出了很高的抗肿瘤活性^[24]。其原因可能是多肽链段被酶断裂之前已被细胞内吞^[24]。在纳米载体系统适合应用此方法, 因其入胞速度不如药物-右旋糖酐共轭物迅速。

Hatakeyama 等^[25] 研究的脂质体基因载体也包含了 MMP 敏感性多肽链段。在该研究中, MMP 敏感性多肽链接了 PEG 与 DOPE, 形成三元共轭物 PEG-多肽-磷脂。该共轭物可在 MMPs 存在的情况下使 PEG 脱去。在过表达 MMPs 的肿瘤移植模型中, MMP 敏感性的脂质体转染效率明显的高于 MMP 非敏感的脂质体。在体内实验中, MMP 敏感性的脂质体由于有表面 PEG 的保护有长循环作用, 其 AUC 值比非 PEG 化脂质体高 9 ~ 15 倍。MMP 敏感性脂质体的基因转染效率高于 MMP 非敏感性脂质体的 3 倍。研究结果表明在细胞外基质中的 MMPs 能够有效移除 PEG, 而移除了 PEG 的脂质体则能够有效被细胞吸收。

Mok 等^[26] 制备了表面修饰 PEG 的量子点纳米粒 (见图 3)。该纳米粒可通过与 MMP-2 发生特异性作用而脱去 PEG。纳米粒表面修饰了抗生蛋白链菌素, 通过与生物素-多肽-PEG 共轭物发生亲和作用而连接。共轭物中多肽包含有 MMP-2 可断裂序列, 同时生物素-细胞穿膜肽 (Cell Penetrating Peptide, CPP) 也连接在量子点表面, 在特异性脱去 PEG 之后能够增强量子点的入胞作用。研究发现, 相比于没有 PEG 修饰的量子点, 每个量子点表面修饰 9 条 PEG 链能够有效的抑制细胞吸收。与 MMP-2 特异性的作用之后, 随着 PEG 链的脱去和 CPP 基团的暴露, 细胞对量子点的吸收大幅增加。表明经过生物素-CPP 和生物素-多肽-PEG 修饰的量子点有望成

作用^[4,5]。IRMA2 研究表明,除血压控制外,厄贝沙坦还以剂量依赖性形式直接减少白蛋白尿和糖尿病肾病的发生率^[10]。因此厄贝沙坦不仅通过拮抗血管紧张素 II 的血管收缩作用产生降压作用,同时血流动力学效应方面可降低肾小球内高压、高灌注、高滤过,非血流动力学效应方面可改善肾小球滤过膜选择通透性及减少肾脏细胞外基质积聚,以发挥肾脏保护作用。

中医认为,糖尿病肾病的病因是由于消渴日久,肾器受损,精枯血燥,脉络瘀阻^[9],血液运行不畅,瘀阻肾络,肾失封藏固涩,精微下注^[11]。糖尿病病人长期高血糖使血粘度升高导致血流缓慢,微循环障碍,脏器灌注量减少,组织缺血缺氧而产生的各种并发症^[12]。因而,可以认为瘀血是糖尿病血管、神经并发症产生的根源。

复方川芎胶囊的成分为川芎和当归,药理研究证实川芎主要有抗心肌缺血作用、有抗心律失常作用、扩张外周血管和降血压作用^[13]。当归有改善冠状动脉供血和心肌供氧作用、扩张血管,增加器官血流及改善微循环等作用^[14]。从复方川芎胶囊的组方来看,性质偏温,功效为行气通脉,养血活血,祛瘀止痛。不仅常用于冠心病稳定型心绞痛的治疗,同时还通过扩张血管来改善肾脏和全身微循环供氧、抑制肾小球电荷屏障破坏并促进肾小球屏障修复、降低肾小球内压而减少蛋白漏出以延缓肾损伤进展。因此本研究运用厄贝沙坦联合复方川芎胶囊治疗糖尿病肾病,总有效率明显优于单用西药治疗的对照组,可明显减轻糖尿病病人的临床症状,延缓肾衰病程的进展,值得临床推广。

【参考文献】

- [1] 陈灏珠. 实用内科学: 七册[M]. 12 版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 1015.
- [2] 唐 兰, 朱西娥, 梁已安, 等. 磷酸川穹嗪对糖尿病周围血管病变的疗效初探[J]. 中国糖尿病杂志, 1997, 5(6): 323.
- [3] 张曼华. 中药川芎嗪合并消栓灵治疗糖尿病性周围神经病变 50 例体会[J]. 山东医药, 1995, 35(9): 32.
- [4] 朱开元. 安博维提供全面有效的肾脏保护作用[J]. 国际心血管病杂志, 2007, 4: 305.
- [5] 李春君, 张秋梅. 厄贝沙坦对糖尿病高血压的降压疗效及肾脏保护作用[J]. 实用糖尿病学, 2006, 5: 41.
- [6] 苏 毅. 糖尿病肾病发病机制研究进展[J]. 中国实用医药, 2009, 5: 231.
- [7] Tu X, Chen X, Xie Y, *et al.* Anti-inflammatory renoprotective effect of clopidogrel and irbesartan in chronic renal injury[J]. J Am Soc Nephrol. 2008, 19(1): 77.
- [8] 唐 霓. 糖尿病血液流变性改变与微血管病变关系的研究进展[J]. 微循环学杂志, 2007, 3: 60.
- [9] Parving HH, Lehnert H, Brochner-Mortensen J, *et al.* The Effect of Irbesartan on the Development of Diabetic Nephropathy in Patients with Type 2 Diabetes[J]. N Engl J Med, 2001, 345(12): 870.
- [10] 张宏宇. 中西医结合治疗早期糖尿病肾病 31 例 I 临床观察[J]. 实用诊断与治疗杂志, 2004, 18(4): 296.
- [11] 杨广智. 化瘀固肾散治疗糖尿病早期肾病 94 例临床观察[J]. 山西中医, 2003, 19(6): 14.
- [12] 焦 鹏. 益气活血化痰法治疗早期糖尿病肾病 40 例[J]. 新中医, 2004, 33(11): 34.
- [13] 周 江. 川芎有效成分及其药理作用研究概况[J]. 浙江中医杂志, 2007, 10: 614.
- [14] 玄 阳. 当归的药理作用研究进展分析[J]. 医学信息, 2011, 24(5): 1938.

[收稿日期] 2011-12-08

[修回日期] 2011-12-18

(上接第 7 页)

- [18] Lee, E. S, *et al.* Tumor pH-responsive flower-like micelles of poly(L-lactic acid)-b-poly(ethylene glycol)-b-poly(L-histidine) [J]. J Control Release, 2007, 123(1): 19.
- [19] Lee, E. S, *et al.* Super pH-sensitive multifunctional polymeric micelle for tumor pH(e) specific TAT exposure and multidrug resistance[J]. J Control Release, 2008, 129(3): 228.
- [20] Sawant, R. M, *et al.* "SMART" drug delivery systems: double-targeted pH-responsive pharmaceutical nanocarriers[J]. Bioconjug Chem, 2006, 17(4): 943.
- [21] Sethuraman, V. A. and Y. H. Bae, TAT peptide-based micelle system for potential active targeting of anti-cancer agents to acidic solid tumors[J]. J Control Release, 2007, 118(2): 216.
- [22] Kessenbrock, K, V. Plaks, and Z. Werb, Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment [J]. Cell, 2010, 141(1): 52.

- [23] Chau, Y., F. E. Tan, and R. Langer. Synthesis and characterization of dextran-peptide-methotrexate conjugates for tumor targeting via mediation by matrix metalloproteinase II and matrix metalloproteinase IX[J]. Bioconjug Chem, 2004, 15(4): 931.
- [24] Chau, Y, *et al.* Antitumor efficacy of a novel polymer-peptide-drug conjugate in human tumor xenograft models[J]. Int J Cancer, 2006, 118(6): 1519.
- [25] Hatakeyama, H, *et al.* Development of a novel systemic gene delivery system for cancer therapy with a tumor-specific cleavable PEG-lipi[J]. Gene Ther, 2007, 14(1): 68.
- [26] Mok, H, *et al.* PEGylated and MMP-2 specifically dePEGylated quantum dots: comparative evaluation of cellular uptake [J]. Langmuir, 2009, 25(3): 1645.

[收稿日期] 2011-05-07

[修回日期] 2011-06-02