

脑靶向非病毒基因递释系统的研究进展

黄容琴, 柯伟伦, 蒋晨, 裴元英

[摘要] 脑靶向非病毒基因递释系统可有效介导基因药物跨越血脑屏障, 到达病变部位发挥疗效, 已成为研究热点之一。多项研究结果显示, 通过适当机制如配体-受体特异性结合作用可显著提高非病毒基因递释系统在脑部的蓄积量, 从而提高所携带外源基因在脑部的表达量。本文主要从受体介导和吸附介导两种机制入手, 综述脑靶向非病毒基因递释系统的最新研究进展。

[关键词] 脑靶向系统; 非病毒载体; 基因药物; 受体介导机制; 吸附介导机制

[中图分类号] R94 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-0440(2010)01-0036-04

Progress on brain-targeting non-viral gene delivery systems

HUANG Rong-qin, KE Wei-lun, JIANG Chen, PEI Yuan-ying

(School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 201203, China)

[Abstract] Brain-targeting non-viral gene delivery systems could efficiently mediate gene drugs to cross blood-brain barrier and reach the diseased regions. Many researches have demonstrated that enhanced brain accumulation and gene expression could be achieved via appropriate mechanisms such as specific ligand-receptor binding function. In this review, progress on brain-targeting non-viral gene delivery systems mainly based on receptor- and adsorptive-mediated mechanisms is reviewed.

[Key words] brain-targeting system; non-viral vector; gene drugs; receptor-mediated mechanism; adsorptive-mediated mechanism

许多脑部疾病如老年痴呆、帕金森病等, 发病率高, 缺乏有效治疗方法。基因治疗是极具潜力的手段, 但由于血脑屏障(BBB)连接紧密, 治疗基因难以自主通过。目前脑部基因导入的主要方法是脑实质直接定位注射, 该方法伤害大, 难以多次给药, 不能将基因产物转运到脑的广泛范围^[1]。因此, 开发有效的基因载体并提高其脑靶向性成为脑部基因治疗的关键。目前存在的基因载体有病毒载体和非病毒载体。病毒载体存在多种安全性问题^[2]。特异性修饰的非病毒载体可经血管途径给药、以非侵袭性方式实现外源基因药物在脑部的表达, 目前研究较为广泛, 但其基因转染和表达的效率普遍较低^[3]。探索具有脑靶向性且高效表达的非病毒基因载体, 实现经血管给药达到外源基因在脑部的广泛表达, 成为目前脑部疾病基因治疗领域的重点和难点之

一。本文就近年来脑靶向非病毒基因递释系统的研究进展进行综述。

1 基因递释系统的脑靶向机制

脑靶向基因递释主要是通过受体介导机制实现, 即利用配体或抗体和脑部受体特异性结合将基因或其递释系统定向运输至脑部。研究显示, 脑毛细血管内皮细胞膜上存在一些受体, 如转铁蛋白(Tf)受体、胰岛素受体、胰岛素样生长因子受体、低密度脂蛋白受体等, 这些受体能与相应的配体或单克隆抗体特异性结合, 介导配体、抗体及其修饰的递释系统进入脑内。已有研究采用Tf、抗Tf受体单克隆抗体、抗胰岛素受体单克隆抗体等修饰基因递释系统, 使其依靠脑毛细血管内皮细胞固有的主动转运机制, 实现外源基因的脑内转运^[4-7]。同时, 有学者^[8-10]提出通过吸附介导的机制实现脑靶向基因递释, 即利用基因递释系统表面的正电荷与脑毛细血管内皮细胞膜上阴离子之间的静电作用进入细胞, 常用的有阳离子化白蛋白等修饰的基因递释系统。基因及其递释系统的主要入脑方式如图1所示。

2 受体介导的脑靶向基因递释

通过特异性的配体-受体或抗体-受体相互作用促使药物浓集于靶点是目前研究最多、应用最广的

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973计划)资助项目(2007CB935802); 国家自然科学基金资助项目(30901861, 30973652)

作者简介: 黄容琴, 女, 博士, 讲师, 研究方向: 靶向给药系统的设计和评价, Tel: 021-51980078, E-mail: rqhuang@fudan.edu.cn

作者单位: 201203 上海, 复旦大学药学院(黄容琴, 柯伟伦, 蒋晨, 裴元英)

通讯作者: 蒋晨, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 靶向给药系统的设计和评价, Tel: 021-51980079, E-mail: jiangchen@shmu.edu.cn

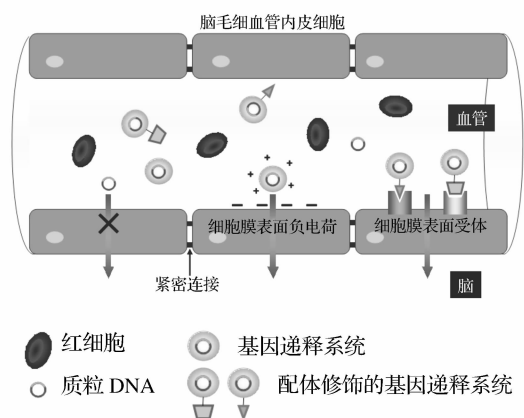


图1 基因及其递释系统主要入脑方式示意图

靶向药物递释机制。BBB和脑细胞上存在的特异性受体为通过受体介导的机制实现脑靶向基因递释提供生理基础。

2.1 转铁蛋白受体介导

Tf受体(TfR)是一种跨膜糖蛋白,在脊椎动物所有具核细胞中均有表达,尤其在肿瘤细胞、BBB、快速分裂等代谢旺盛且需要大量铁的组织中高表达。研究证实,BBB上TfR含量丰富,可介导脑部基因递释。Huang等^[4]使用Tf修饰聚酰胺-胺(PAMAM)树枝状高分子和质粒DNA复合形成载DNA纳米粒,静脉给药后脑部报告基因的表达量约是未修饰纳米粒的2倍。另外,da Cruz等^[5]在纹状体内直接注射携带 β -半乳糖苷酶报告基因或神经生长因子(NGF)治疗基因的Tf修饰阳离子脂质体,发现 β -半乳糖苷酶在正常大鼠纹状体具有更广泛的表达,表达范围约是未修饰脂质体的3倍;在兴奋性毒素红藻氨酸损伤的大鼠模型上,Tf修饰组的NGF转基因表达使损伤体积较未修饰组减少75%,表明Tf修饰的脂质体可有效介导外源基因进入中枢神经系统。

研究显示,生理状态下血液循环中内源性Tf的浓度约为25 $\mu\text{mol/L}$,而BBB上TfR的解离常数在1 $\mu\text{mol/L}$ 左右,故生理状态下脑中大部分TfR可能被内源性Tf占据从而降低Tf修饰基因递释系统的脑靶向效率^[11]。抗TfR的抗体与TfR的结合位点与Tf不同,彼此互不干扰,可避免TfR被内源性Tf饱和对基因递释造成的负面影响。目前使用最多的抗TfR抗体是OX26,Xia等^[6]利用亲和素(avidin)和生物素(biotin)的特异性结合反应制备OX26修饰的干扰荧光素酶基因的siRNA递释系统,同时制作荧光素酶基因稳定表达的C6和RG2脑胶质瘤大鼠模型,评价脑部基因递释效率。结果显示,静脉注

射48 h后,OX26修饰组在C6脑胶质瘤的荧光素酶表达量较生理盐水组下降69%,而在RG2脑胶质瘤的荧光素酶表达量较未修饰组下降81%,表明OX26的修饰可提高siRNA的脑内递释效率^[12]。另有学者^[13]评价了OX26修饰的长循环脂质体携带编码胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)基因治疗帕金森病模型动物的疗效,结果表明,经免疫脂质体治疗后大鼠的行为能力显著提高,表现为阿扑吗啡诱导的对侧旋转减少87%,苯丙胺诱导的同侧旋转减少90%,同时酪氨酸羟化酶活性增加77%,再次显示TfR介导的免疫脂质体治疗中枢神经系统疾病的效果。该研究组报道的一系列相关数据都显示了OX26修饰免疫脂质体治疗帕金森病的良好效果^[14]。

近期还有研究使用TfR单克隆抗体8D3修饰基因递释系统,靶向递释外源基因至脑。Zhang等^[15]利用8D3单抗修饰长循环脂质体包载编码 β -葡糖醛酸糖苷酶(GUSB)基因,静脉给药用于VII型黏多糖贮积症(GUSB缺失)小鼠的治疗。结果显示,单次注射8D3单抗修饰脂质体后,小鼠脑部的GUSB活性是生理盐水组10倍以上,达到有效治疗浓度,但同时在除心脏以外的其他主要器官的基因表达也显著提高,因此尚需对基因递释系统进一步优化。Ko等^[16]制备聚乙二醇(PEG)修饰的长循环脂质体,包封聚乙烯亚胺(PEI)/DNA复合物,静脉给药后显著延长复合物在血液循环的滞留时间并抑制网状内皮系统的摄取,进一步使用8D3单抗修饰脂质体后其脑部蓄积量较未修饰组提高约10倍。虽然利用抗TfR单抗能够避免体内Tf的干扰,但这些抗体价格昂贵,且有研究报道市售OX26没有原研究组纯化的OX26效果好^[17],因此需要寻找其他配体用于脑靶向基因递释。

2.2 乳铁蛋白受体介导

乳铁蛋白(Lf)是一种离子结合单链糖蛋白,属于转铁蛋白家族,主要由腺上皮细胞表达和分泌,存在于大多数哺乳动物的乳汁中。研究表明,Lf具有多种生理功能,不仅参与铁的转运,且具有抗微生物、抗氧化、抗癌及免疫调节等功能。进一步研究发现,Lf主要通过与其靶细胞表面的受体特异性结合而发挥其生理功能。有研究^[11]比较了Tf、OX26和Lf经大鼠尾静脉注射后的脑内摄取特性,结果显示Lf的脑内摄取量显著高于Tf和OX26,提示Lf作为脑靶向配体的可能性。Huang等^[18]在此基础上考察了Lf和脑细胞的结合亲和性,结果显示脑部Lf受体(LfR)至少具有两类结合位点,结合常数分别在6~10 nmol/L 和2000~5000 nmol/L 。由于内源性

Lf 的浓度约为 5 nmol/L^[19], 低于高结合位点的解离常数(K_d)值, 不会大量占据 LfR 而对外源性 Lf 修饰的基因递释系统形成竞争性抑制, 是 Lf 作为脑靶向配体的优势之一。基于此, Huang 等^[20]首次使用 Lf 修饰 PAMAM 后评价其脑部基因递释效率。结果显示, 经 Lf 修饰后纳米粒的脑部基因表达量显著提高, 约是未修饰纳米粒的 5.2 倍, 是 Tf 修饰纳米粒的 2.3 倍。由于荷正电的高分子和 DNA 复合后形成的基因递释系统仍然荷正电, 其较高的靶向性细胞摄取是受体介导和吸附介导协同作用的结果。

结合相关实验结果和文献可知, Lf 作为脑靶向配体具有如下优势: (1) Lf 自身带有弱正电, 可与细胞膜表面的负电荷结合, 增加细胞摄取; (2) 血浆中 Lf 浓度低, 约 5 nmol/L, 低于 Lf 与脑细胞膜的 K_d 值。因此生理条件下脑细胞膜上的 LfR 不会被内源性 Lf 饱和, 可有效结合外源性 Lf, 提高脑摄取; (3) LfR 介导的跨 BBB 转运是从血液循环到脑间隙的单向转运^[21], 有利于 Lf 修饰的载药系统在脑组织浓集; (4) 某些病理状况如帕金森病患者脑部神经元和微血管上 LfR 表达增加, 特别是多巴胺能神经元缺失严重的区域, LfR 的增加更为显著^[22], 有利于某些特定疾病情况下采用 Lf 修饰的递释系统向脑部靶向递释药物。因此, Lf 有望成为一种新型高效的脑靶向配体。

2.3 其他相关受体介导

除 TfR 和 LfR 外, 用于脑靶向基因递释的受体还包括胰岛素受体、低密度脂蛋白受体相关蛋白等。抗胰岛素受体的 83-14 单抗和抗 TfR 的 8D3 单抗同时修饰长循环脂质体, 包载编码小发夹 RNA (shRNA) 的质粒, 干扰具致癌性的表皮生长因子受体 (EGFR) mRNA 的表达^[7]。结果显示, 多次静脉给予 RNA 干扰基因治疗后, 高级颅内脑肿瘤模型小鼠的肿瘤 EGFR 表达量较生理盐水组小鼠显著降低, 生存时间延长 88%, 表明针对 EGFR 的 RNA 干扰基因治疗是沉默实体瘤致癌基因的新途径, 通过受体特异性的靶向配体修饰后的免疫脂质体可携带质粒 DNA 跨越 BBB。Mousazadeh 等^[23]利用 BBB 上表达低密度脂蛋白受体的特性, 使用其配体载脂蛋白-E (apoE) 的特异序列多肽 (apoEdp) 修饰聚赖氨酸后浓缩 DNA, 通过受体介导的转运机制靶向递释外源基因至脑部。结果表明, 经 apoEdp 修饰的复合物所携带外源基因的脑内表达量为 (30 ± 10) ng/mg 蛋白, 显著高于裸 DNA, 后者为 (0.05 ± 0.02) ng/mg 蛋白。Kratzer 等^[24]使用荷正电的鱼精蛋白复合寡核苷酸制备纳米粒, 并在纳米粒表面修饰载

脂蛋白 A-I (apoA-I)。apoA-I 修饰纳米粒的跨 BBB 转运效率较未修饰纳米粒提高 2 倍左右, 阻断 B 类清道夫 (scavenger) 受体 (脑毛细血管内皮细胞膜上 apoA-I 的主要受体) 后其跨 BBB 转运能力下降到与未修饰纳米粒同一水平。

3 吸附介导的脑靶向基因递释

研究显示, 脑部存在的负电屏障主要由三层静电屏障构成: (1) BBB 腔面侧的唾液酸糖蛋白、唾液酸糖脂和类肝素硫酸蛋白聚糖; (2) BBB 近腔侧的类肝素硫酸蛋白聚糖和软骨素硫酸蛋白聚糖; (3) 基底膜侧的类肝素硫酸蛋白聚糖、软骨素硫酸蛋白聚糖和 IV 型胶原蛋白。为此, 使用某些阳离子物质修饰基因递释系统, 通过其表面正电荷与负电屏障的静电作用, 可实现脑靶向基因递送。

3.1 阳离子化白蛋白介导

多数多肽和蛋白自身不具备阳离子特性, 经过适当的化学修饰将其阳离子化后可通过吸附介导转运入脑, 阳离子化白蛋白 (CBSA) 是一个较为成功的例子。Lu 等^[8]使用 PEG 修饰的聚乳酸为载体包载编码肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (TRAIL) 的基因, 进而使用 CBSA 修饰制备的纳米粒静脉给药治疗裸鼠脑胶质瘤。结果显示, CBSA 修饰后可通过吸附介导的转运提高纳米粒的脑部摄取, 脑胶质瘤裸鼠经 CBSA 修饰的纳米粒治疗后, 平均存活时间 (31.3 d) 显著长于未修饰组 (21.5 d)。此外, CBSA 修饰纳米粒已被证实可通过吸附介导的转运机制有效提高小分子药物如多柔比星、NC-1900 等的脑部蓄积^[25,26]。

3.2 细胞穿透肽介导

细胞穿透肽 (CPP) 是一类生理条件下荷正电的多肽, 可与细胞膜表面带负电的分子结合, 自身具有膜穿透效应, 且可携带外源性物质穿过生理屏障进入细胞。构成 CPP 的氨基酸残基一般不超过 20 个, 常用 CPP 有人免疫缺陷病毒 HIV-1 的转录激活蛋白 Tat、单纯疱疹病毒转录调节蛋白 VP22、果蝇转录因子 Antp 等。研究显示, Antp 的修饰可显著提高高分子/DNA 复合物在脑毛细血管内皮细胞的转染和表达效率^[9,10]。Tat 亦被用于修饰脂质体, 在裸鼠脑肿瘤模型上, 该脂质体内注射后可靶向肿瘤细胞进行基因表达, 而在肿瘤附近正常脑组织几乎没有观察到基因表达^[27]。

4 结语

脑靶向非病毒基因递释系统因其在选择性、专

一性和安全性上的独特优点而日益受到重视,已成为近年来主动靶向药物递释领域的研究热点之一。充分利用受体介导和吸附介导的机制可增强非病毒基因递释系统的脑靶向摄取。但是脑靶向非病毒基因递释系统还存在许多问题,须进行深入的理论和实践研究,比如:如何通过对质粒DNA的改建和修饰以延长外源基因的表达时间、如何筛选更高效稳定的靶向配体以提高纳米基因递释系统的脑靶向性、如何对基因递释系统进行适当的修饰以减少外周组织的摄取等。总而言之,在研究人员共同坚持不懈的努力下,脑靶向非病毒基因递释系统正一步步朝应用研究方向迈进,有望为中枢神经系统疾病的治疗提供强有力的工具。

【参考文献】

- [1] Rainov NG, Ren H. Gene therapy for human malignant brain tumors[J]. *Cancer J*, 2003, 9(3):180-188.
- [2] Lowenstein PR, Mandel RJ, Xiong WD, et al. Immune responses to adenovirus and adeno-associated vectors used for gene therapy of brain diseases: the role of immunological synapses in understanding the cell biology of neuroimmune interactions [J]. *Curr Gene Ther*, 2007, 7(5):347-360.
- [3] de Lima MC, da Cruz MT, Cardoso AL, et al. Liposomal and viral vectors for gene therapy of the central nervous system [J]. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, 2005, 4(4):453-465.
- [4] Huang RQ, Qu YH, Ke WL, et al. Efficient gene delivery targeted to the brain using a transferrin-conjugated polyethyleneglycol-modified polyamidoamine dendrimer [J]. *FASEB J*, 2007, 21(4):1117-1125.
- [5] da Cruz MT, Cardoso AL, de Almeida LP, et al. Tf-lipoplex-mediated NGF gene transfer to the CNS: neuronal protection and recovery in an excitotoxic model of brain injury [J]. *Gene Ther*, 2005, 12(16):1242-1252.
- [6] Xia CF, Boado RJ, Pardridge WM. Antibody-mediated targeting of siRNA via the human insulin receptor using avidin-biotin technology [J]. *Mol Pharm*, 2009, 6(3):747-751.
- [7] Zhang Y, Zhang YF, Bryant J, et al. Intravenous RNA interference gene therapy targeting the human epidermal growth factor receptor prolongs survival in intracranial brain cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(11):3667-3677.
- [8] Lu W, Sun Q, Wan J, et al. Cationic albumin-conjugated pegylated nanoparticles allow gene delivery into brain tumors via intravenous administration [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(24):11878-11887.
- [9] Huang R, Yang W, Jiang C. Gene delivery into brain capillary endothelial cells using Antp-modified DNA-loaded nanoparticles [J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2006, 54(9):1254-1258.
- [10] Huang RQ, Pei YY, Jiang C. Enhanced gene transfer into brain capillary endothelial cells using Antp-modified DNA-loaded nanoparticles [J]. *J Biomed Sci*, 2007, 14(5):595-605.
- [11] Ji B, Maeda J, Higuchi M. Pharmacokinetics and brain uptake of lactoferrin in rats [J]. *Life Sci*, 2006, 78(8):851-855.
- [12] Xia CF, Zhang Y, Zhang Y, et al. Intravenous siRNA of brain cancer with receptor targeting and avidin-biotin technology [J]. *Pharm Res*, 2007, 24(12):2309-2316.
- [13] Zhang Y, Pardridge WM. Near complete rescue of experimental parkinson's disease with intravenous, non-viral GDNF gene therapy [J]. *Pharm Res*, 2009, 26(5):1059-1063.
- [14] Xia CF, Boado RJ, Zhang Y, et al. Intravenous glial-derived neurotrophic factor gene therapy of experimental Parkinson's disease with Trojan horse liposomes and a tyrosine hydroxylase promoter [J]. *J Gene Med*, 2008, 10(3):306-315.
- [15] Zhang Y, Wang Y, Boado RJ, et al. Lysosomal enzyme replacement of the brain with intravenous non-viral gene transfer [J]. *Pharm Res*, 2008, 25(2):400-406.
- [16] Ko YT, Bhattacharya R, Bickel U. Liposome encapsulated polyethylenimine/ODN polyplexes for brain targeting [J]. *J Control Release*, 2009, 133(3):230-237.
- [17] Moos T, Morgan EH. Restricted transport of anti-transferrin receptor antibody (OX26) through the blood-brain barrier in the rat [J]. *J Neurochem*, 2001, 79(1):119-129.
- [18] Huang RQ, Ke WL, Qu YH, et al. Characterization of lactoferrin receptor in brain endothelial capillary cells and mouse brain [J]. *J Biomed Sci*, 2007, 14(1):121-128.
- [19] Talukder MJ, Takeuchi T, Harada E. Receptor-mediated transport of lactoferrin into the cerebrospinal fluid via plasma in young calves [J]. *J Vet Med Sci*, 2003, 65(9):957-964.
- [20] Huang RQ, Ke WL, Liu Y, et al. The use of lactoferrin as a ligand for targeting the polyamidoamine-based gene delivery system to the brain [J]. *Biomaterials*, 2008, 29(2):238-246.
- [21] Fillebeen C, Descamps L, Dehouck MP, et al. Receptor-mediated transcytosis of lactoferrin through the blood-brain barrier [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(11):7011-7017.
- [22] Grau AJ, Willig V, Fogel W, et al. Assessment of plasma lactoferrin in Parkinson's disease [J]. *Mov Disord*, 2001, 16(1):131-134.
- [23] Mousazadeh M, Palizban A, Salehi R. Gene delivery to brain cells with apolipoprotein E derived peptide conjugated to polylysine (apoE₃-PLL) [J]. *J Drug Target*, 2007, 15(3):226-230.
- [24] Kratzer I, Wernig K, Panzenboeck U, et al. Apolipoprotein A-I coating of protamine-oligonucleotide nanoparticles increases particle uptake and transcytosis in an *in vitro* model of the blood-brain barrier [J]. *J Control Release*, 2007, 117(3):301-311.
- [25] Lu W, Wan J, Zhang Q, et al. Aclarubicin-loaded cationic albumin-conjugated pegylated nanoparticle for glioma chemotherapy in rats [J]. *Int J Cancer*, 2007, 120(2):420-431.
- [26] Xie YL, Lu W, Jiang XG. Improvement of cationic albumin conjugated pegylated nanoparticles holding NC-1900, a vasopressin fragment analog, in memory deficits induced by scopolamine in mice [J]. *Behav Brain Res*, 2006, 173(1):76-84.
- [27] Gupta B, Levchenko TS, Torchilin VP. TAT peptide-modified liposomes provide enhanced gene delivery to intracranial human brain tumor xenografts in nude mice [J]. *Oncol Res*, 2007, 16(8):351-359.