

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.01083

Angiopep-2 与转铁蛋白共修饰脂质体跨血脑屏障的研究

董翔*, 常庚

大连医科大学附属第一医院神经内科, 大连 116011

[摘要] **目的** 构建 angiopep-2 与转铁蛋白共修饰脂质体, 并对其跨血脑屏障能力进行评价。**方法** 制备 angiopep-2 与转铁蛋白(TF)共修饰脂质体(ANG/TF-LPs), 考察其粒径、Zeta 电位和血清稳定性等理化特征。通过定量细胞摄取实验考察脑内皮 bEnd. 3 细胞对 ANG/TF-LPs 的摄取效率。构建血脑屏障体外模型, 考察不同脂质体的跨血脑屏障能力。**结果** 所制备的 ANG/TF-LPs 粒径为(93.2±13.5) nm, Zeta 电位为(7.55±1.85) mV, 且在 24 h 内具有良好的血清稳定性。体外细胞摄取实验表明, bEnd. 3 细胞对 ANG/TF-LPs 的摄取效率分别是 TF-LPs、ANG-LPs 和 LPs 的 2.9 倍、2.4 倍和 4.8 倍, 差异具有统计学意义($P<0.01$); ANG/TF-LPs 的跨血脑屏障效率分别是 TF-LPs、ANG-LPs 和 LPs 的 3.1 倍、2.9 倍和 5.4 倍, 差异具有统计学意义($P<0.01$)。**结论** ANG/TF-LPs 制备工艺简单, 经过 angiopep-2 与转铁蛋白修饰后, 脂质体的跨血脑屏障能力显著增强, 是一种潜在高效的脑部靶向给药系统。

[关键词] angiopep-2; 转铁蛋白; 脂质体; 脑靶向; 血脑屏障

[中图分类号] R 943.42 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2014)10-1083-05

Angiopep-2 and transferrin co-modified liposome for targeted drug delivery across the blood-brain barrier

DONG Xiang*, CHANG Geng

Department of Neurology, The First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning, China

[Abstract] **Objective** To prepare angiopep-2 and transferrin co-modified liposomes (ANG/TF-LPs) and to observe their property of passing the blood-brain barrier (BBB). **Methods** ANG/TF-LPs were prepared by film-ultrasonic method. The particle size, Zeta potential and stability in fetal bovine serum (FBS) of ANG/TF-LPs were evaluated. The cellular uptake of ANG/TF-LPs by bEnd. 3 cells *in vitro* was observed to evaluate the targeting efficiency. The *in vitro* BBB model was used to evaluate the ability of liposomes passing the BBB. **Results** The diameter of the prepared ANG/TF-LPs was (93.2±13.5) nm, the Zeta potential was (7.55±1.85) mV, and they were stable in FBS within 24 h. It was found that the uptake of ANG/TF-LPs by bEnd. 3 cells was 2.9, 2.4 and 4.8 folds those of transferrin modified liposomes (TF-LPs), angiopep-2 modified liposomes (ANG-LPs) and liposomes (LPs), respectively ($P<0.01$). The efficiency of ANG/TF-LPs passing the BBB was 3.1, 2.9 and 5.4 folds those of TF-LPs, ANG-LPs and LPs, respectively ($P<0.01$). **Conclusion** The angiopep-2 and transferrin co-modified liposomes are easy to prepare, and the modification can enhance the BBB passing ability, making the prepared liposomes a promising brain drug delivery system.

[Key words] angiopep-2; transferrin; liposomes; brain targeting; blood-brain barrier

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(10):1083-1087]

据估计, 全球约有 15 亿人群患有不同程度、不同类型的中枢神经系统疾病, 至 2020 年, 全球中枢神经疾病患者可能高达 19 亿^[1]。脑肿瘤、癫痫、神经退行性疾病等日益成为威胁人类健康的极为危险的疾病。然而, 由于血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)的存在, 很大程度限制了药物的脑内递送, 阻

碍了药物对中枢神经系统疾病的治疗^[2]。如何使药物高效透过血脑屏障、实现脑部传递是目前医学领域研究的重点。

Angiopep-2 (24 000)是由 19 个氨基酸分子组成的新型多肽, 它可通过血脑屏障上表达的低密度脂蛋白受体相关蛋白(LRP)受体介导内吞进入脑组

[收稿日期] 2014-01-01 **[接受日期]** 2014-05-08

[作者简介] 董翔, 博士, 主治医师。

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0411-83635963, E-mail: 316495845@qq.com

织。研究表明 angiopep-2 修饰的纳米递药系统通过 LRP 介导显著增加脑部的蓄积^[3]。转铁蛋白受体在脑内皮细胞表面有大量表达^[4],有学者将转铁蛋白连接到纳米粒表面增强了脂质体的脑部靶向性^[4-5]。这些结果表明 angiopep-2 和转铁蛋白单独修饰的纳米给药系统均能够增强脑部蓄积能力。本研究将 angiopep-2 和转铁蛋白共同修饰到脂质体的表面,探讨经过 angiopep-2 和转铁蛋白共同修饰后对脂质体的脑部蓄积的增强效果。

1 材料和方法

1.1 材料及细胞 Zetasizer Nano ZS90 型激光粒度仪及 Zeta 电位分析仪(英国 Malvern 公司)。Angiopep-2(上海吉尔生物科技有限公司);转铁蛋白(美国 Sigma 公司);大豆磷脂(SPC,美国 Sigma 公司);DSPE-PEG2000(美国 Avanti polar lipids 公司);FITC-PE(美国 Sigma 公司);DSPE-PEG2000-MAL(美国 Avanti Polar Lipids 公司);其余试剂为分析纯。鼠脑内皮细胞(bEnd.3 细胞)购自 ATCC。

1.2 方法

1.2.1 Angiopep-2 修饰脂质体(ANG-LPs)的制备 参照文献^[6]方法合成 ANG-PEG2000-DSPE。精密称取大豆磷脂 15.20 mg,胆固醇 1.26 mg,白藜芦醇 3.85 mg,DSPE-PEG2000 1.45 mg,将以上材料和药物溶于氯仿中,在茄形瓶中减压蒸馏成膜,除去有机溶剂,置于真空干燥器中过夜,使其充分干燥,加入 2 mL 磷酸盐缓冲液(PBS)水化得到 angiopep-2 修饰白藜芦醇脂质体。

1.2.2 转铁蛋白修饰脂质体(TF-LPs)及 Angiopep-2 和转铁蛋白共同修饰脂质体(ANG/TF-LPs)的制备 采用后插入法^[5]制备 ANG/TF-LPs。首先将转铁蛋白巯基化,再与商品化的 DSPE-PEG2000-MAL 孵育得到转铁蛋白胶束,将胶束后插入普通脂质体或已经制备的 ANG-LPs 得到 TF-LPs 和 ANG/TF-LPs。用 FITC 标记的磷脂取代适量的大豆磷脂,制备得到 FITC 标记的脂质体。

1.2.3 脂质体的粒径、Zeta 电位、包封率和血清稳定性测定 取脂质体适量用 Zetasizer Nano ZS90 型激光粒度仪测定其粒径以及 Zeta 电位。取制备得到的白藜芦醇脂质体 0.1 mL,过 G50 葡萄糖凝胶柱, PBS (pH 7.4)洗脱,将脂质体用甲醇破乳,用

十八烷基键合硅胶柱在 306 nm、乙腈:0.02%磷酸水溶液(27:73 体积比)为流动相,检测白藜芦醇的含量。按照 $W_{包}/W_{投} \times 100\%$ 计算包封率(EE), $W_{包}$:脂质体中包载的药物量, $W_{投}$:制备脂质体的投药量。

取各组脂质体 500 μ L,分别与等体积的 PBS、含有 50%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的 PBS 混合,于 37 $^{\circ}$ C 下孵育 1、4、8、24 h,分别测定其在 750 nm 的透光率。以脂质体在 PBS 中的透光率值为空白,以脂质体在含有 50%FBS 的 PBS 中的透光率与其在 PBS 中的透光率的比值来评价纳米粒在血清中的稳定性。

1.2.4 体外细胞摄取实验 将对数生长期的 bEnd.3 细胞以 5×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板中,37 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后,每孔加入适量不同脂质体使孔中脂质体浓度为 0.2 mg/mL,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h 和 4 h 后除去含脂质体培养液,冷 PBS 清洗 2 次,0.25%胰酶消化后离心, PBS 清洗 3 次,流式细胞仪测定细胞荧光值。为了定性观察细胞对脂质体的摄取情况,将脂质体与细胞共同孵育 4 h 后,将细胞用 PBS 漂洗 3 次,加入 2 μ g/mL DAPI 溶液,室温孵育 15 min,加冰 PBS 漂洗 3 次,加 4%多聚甲醛固定 15 min,弃去多聚甲醛,用冰 PBS 保存。置激光共聚焦显微镜下观察细胞摄取情况。

为了模拟内源性的转铁蛋白对 ANG/TF-LPs 的入胞能力的影响,本研究在细胞摄取实验中加入游离转铁蛋白,研究其对 ANG/TF-LPs 的竞争性抑制作用。在加入各脂质体前 30 min 预先加入游离的转铁蛋白(4 mg/mL),于 37 $^{\circ}$ C 下共同孵育 30 min。30 min 后弃去旧培养液,加入新鲜培养液,再分别对应加入 ANG/TF-LPs、TF-LPs、ANG-LPs 3 种脂质体,用不含 FBS 的基础培养液调整各脂质体的脂质浓度,使其脂质体终浓度为 0.2 mg/mL。于 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h 除去含脂质体培养液,冷 PBS 清洗 2 次,0.25%胰酶消化后离心, PBS 清洗 3 次,流式细胞仪测定细胞荧光值。

1.2.5 脂质体的跨膜转运实验 将 bEnd.3 细胞以 2×10^5 个/ cm^2 接种于 Transwell 聚碳酸酯膜上,培养 3 周后,用 WPI 细胞跨膜电阻仪测定跨膜电阻值(TEER),当 TEER 值大于 250 $\Omega \cdot cm^2$ 时,可用作跨膜转运实验。跨膜转运实验时,上腔 A 面加入脂

质体溶液,下腔B面均为PBS。定时(0.5、1、2、3、4、5、6 h)取出下腔B面溶液,用荧光分光光度法测定其荧光值。

1.3 统计学处理 应用SPSS 21.0统计软件进行数据分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较用方差分析。检验水准(α)为0.05。

表1 不同脂质体的表征

Tab 1 Characteristics of different liposomes

 $n=3, \bar{x} \pm s$

Formulation	Size d /nm	PDI	Zeta-potential φ /mV	EE of Res (%)
LPs	92.8 \pm 4.4	0.110 \pm 0.020	-2.52 \pm 3.46	92.4
ANG-LPs	91.9 \pm 7.4	0.130 \pm 0.030	2.82 \pm 2.26	90.2
TF-LPs	105.5 \pm 10.8	0.180 \pm 0.050	4.55 \pm 1.35	88.9
ANG/TF-LPs	93.2 \pm 13.5	0.140 \pm 0.060	7.55 \pm 1.85	92.6

LPs: Liposomes; ANG-LPs: Angiopep-2 modified liposomes; TF-LPs: Transferrin modified liposomes; ANG/TF-LPs: Angiopep-2 and transferrin co-modified liposomes; PDI: Polydispersity index; EE: Encapsulation efficiency; Res: Resveratrol

2.2 脂质体的血清稳定性 脂质体的血清稳定性测定结果如图1所示:不同脂质体在50%FBS中的透光率与其在PBS中的透光率的比值均大于90%,表明4种脂质体24 h在FBS中均具有较好的稳定性。

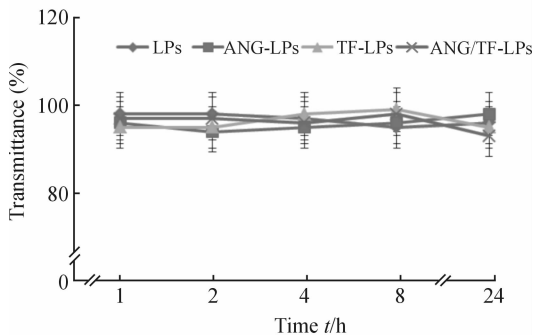


图1 不同脂质体在50%FBS中的透光率变化
Fig 1 Transmittance variation of different liposomes in 50% FBS

LPs: Liposomes; ANG-LPs: Angiopep-2 modified liposomes; TF-LPs: Transferrin modified liposomes; ANG/TF-LPs: Angiopep-2 and transferrin co-modified liposomes; FBS: Fetal bovine serum. $n=3, \bar{x} \pm s$

2.3 脑内皮细胞对脂质体的摄取 体外细胞定量摄取实验(图2)表明,ANG/TF-LPs在4 h摄取效率是2 h的1.85倍,差异具有统计学意义($P < 0.05$),说明bEnd.3细胞对脂质体的摄取是一个时间依赖的过程。在4 h,bEnd.3细胞对ANG/TF-

2 结果

2.1 脂质体的表征 取适量脂质体用激光粒度仪测定粒径以及Zeta电位,结果如表1所示,ANG/TF-LPs的粒径为(93.2 \pm 13.5) nm,Zeta电位为(7.55 \pm 1.85) mV。白藜芦醇的包封率为92.6%。

LPs的摄取效率分别是TF-LPs、ANG-LPs和LPs的2.4倍、2.9倍和4.8倍,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。定性的激光共聚焦显微镜观察结果如图3所示,脂质体与bEnd.3细胞共同孵育4 h后,ANG/TF-LPs组荧光强度显著强于其他3组,与定量的实验结果一致。

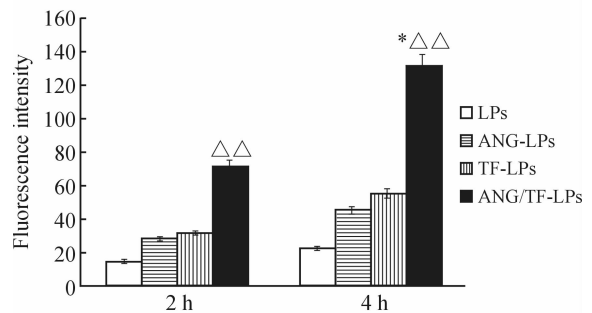


图2 bEnd.3细胞对不同脂质体的摄取效率

Fig 2 Uptake of different liposomes by bEnd.3 cells

LPs: Liposomes; ANG-LPs: Angiopep-2 modified liposomes; TF-LPs: Transferrin modified liposomes; ANG/TF-LPs: Angiopep-2 and transferrin co-modified liposomes. * $P < 0.05$ vs ANG/TF-LPs at 2 h; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs other three groups at the same time. $n=3, \bar{x} \pm s$

加入游离转铁蛋白后,bEnd.3细胞对TF-LPs和ANG/TF-LPs的摄取受到抑制,差异具体统计学意义($P < 0.01$);对LPs和ANG-LPs的摄取未发生

显著变化($P>0.05$)。ANG/TF-LPs组加入游离转铁蛋白后,bEnd.3细胞对ANG/TF-LPs的摄取效率高于TF-LPs加入游离转铁蛋白,差异具有统计学意义($P<0.05$)。详见图4。这说明 angiopep-2的修饰对内源性转铁蛋白的干扰有保护作用。

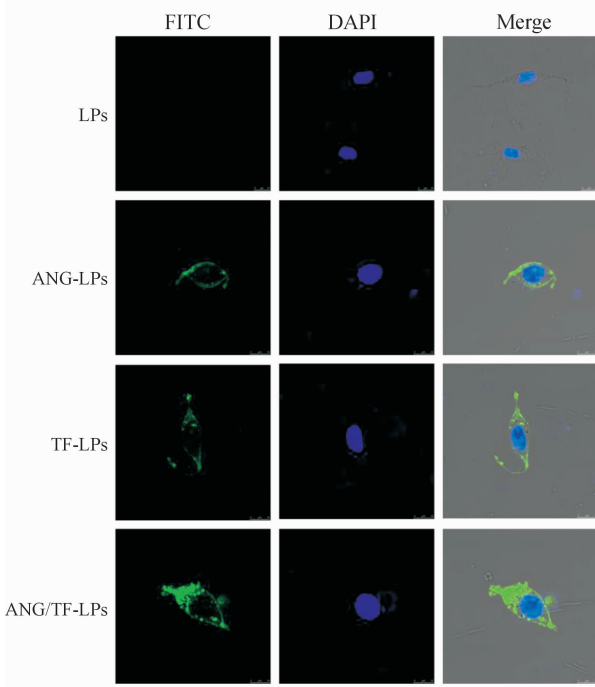


图3 激光共聚焦显微镜观察 bEnd.3 细胞对 FITC 标记脂质体的摄取

Fig 3 Uptake of FITC labelled liposomes by bEnd.3 cells under confocal laser scanning microscopy

LPs: Liposomes; ANG-LPs: Angiopep-2 modified liposomes; TF-LPs: Transferrin modified liposomes; ANG/TF-LPs: Angiopep-2 and transferrin co-modified liposomes. Original magnification: $\times 1\ 000$

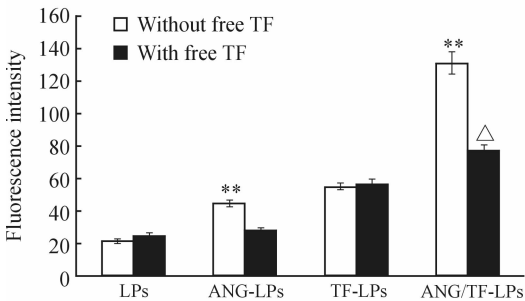


图4 游离转铁蛋白对不同脂质体被 bEnd.3 细胞摄取的影响
Fig 4 Influence of free TF on uptake of different liposomes by bEnd.3 cells

LPs: Liposomes; ANG-LPs: Angiopep-2 modified liposomes; TF-LPs: Transferrin modified liposomes; ANG/TF-LPs: Angiopep-2 and transferrin co-modified liposomes; TF: Transferrin. ** $P<0.01$ vs the same liposomes with free TF; $\triangle P<0.05$ vs TF-LPs with free TF. $n=3, \bar{x}\pm s$

2.4 脂质体跨血脑屏障能力 通过检测不同时间段下腔 B 面均为 PBS 的荧光强度,可以观察到脂质体的跨膜量随着时间的增加而增大,6 h 后,ANG/TF-LPs 的跨血脑屏障效率分别是 TF-LPs、ANG-LPs 和 LPs 的 2.9 倍、3.1 倍和 5.4 倍,差异具有统计学意义($P<0.01$,图 5)。说明 angiopep-2 和转铁蛋白共修饰后能增强脂质体跨血脑屏障能力。

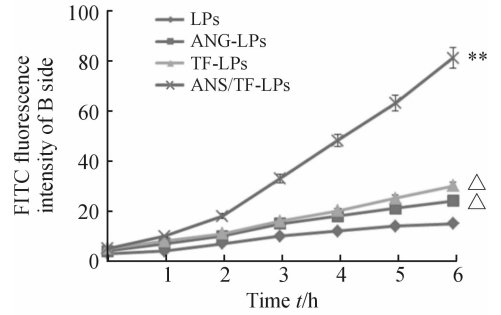


图5 跨血脑屏障的 FITC 标记脂质体荧光强度
Fig 5 Fluorescence intensity of FITC labeled liposomes crossing blood-brain barrier

LPs: Liposomes; ANG-LPs: Angiopep-2 modified liposomes; TF-LPs: Transferrin modified liposomes; ANG/TF-LPs: Angiopep-2 and transferrin co-modified liposomes. ** $P<0.01$ vs other three groups at 6 h; $\triangle P<0.05$ vs LPs at 6 h; $n=3, \bar{x}\pm s$

3 讨论

血脑屏障是由脑毛细血管内皮细胞组成的一个多样复杂的动态系统。其中,毛细血管内皮细胞及其紧密连接是血脑屏障的主要形态学基础。血脑屏障维护中枢神经组织内环境的稳定,同时也限制了药物进入中枢神经系统^[7-8]。为了使药物高效地透过血脑屏障,目前常用的手段包括脑内植入、脑室注射、鞘内注射等介入性脑内递药技术,采用高渗溶液、血管活性物质等干扰血脑屏障^[9],使血脑屏障暂时性打开或经嗅黏膜、内耳等途径实现脑部给药,然而这些手段可能使血脑屏障受到不可逆的破坏以及存在给药量有限、对黏膜有损伤等问题。本研究将血脑屏障上高度表达的低密度脂蛋白受体和转铁蛋白受体结合物——angiopep-2 和转铁蛋白共同修饰到脂质体的表面,实现了脂质体对脑内皮细胞的高效亲和力以及脂质体的高效跨膜能力。

本研究结果显示,脑内皮细胞对 angiopep-2 和转铁蛋白共修饰脂质体的摄取效率远高于转铁蛋白

脂质体或 angiopep-2 修饰脂质体。这是由于在血脑屏障虽然具有转铁蛋白受体和低密度脂蛋白受体的高度表达,然而受体依赖的纳米载体转运过程会受到“受体饱和效应”以及体内相关物质的竞争,因此单独的 angiopep-2 修饰脂质体或转铁蛋白修饰脂质体被脑内皮细胞摄取和跨血脑屏障的能力有限。本研究将 angiopep-2 和转铁蛋白共同修饰到脂质体的表面,使得 angiopep-2 和转铁蛋白能够起到协同作用,促进脂质体被脑内皮细胞摄取。脑内皮 bEnd. 3 细胞是形成血脑屏障能力的主要功能性细胞,因此本研究首先选取 bEnd. 3 细胞进行体外摄取实验。定量和定性的细胞摄取实验结果证实,经过转铁蛋白和 angiopep-2 共同修饰后,bEnd. 3 细胞对脂质体的摄取能力显著增强。但是由于细胞摄取实验中的 bEnd. 3 细胞为贴壁生长,仅一侧与溶液发生物质交换,因此其结果反映为细胞对脂质体的摄取能力。为了考察脂质体被 bEnd. 3 细胞摄取后进一步入脑的能力,本研究引入了体外培养的血脑屏障模型,该模型可以模拟血脑屏障的生理特征,包括紧密连接、转运蛋白等,同时可以观察脂质体的胞吞转运的作用^[10]。结果表明,转铁蛋白和 angiopep-2 共修饰脂质体的跨膜能力最强。纳米载体类药物的体内稳定性对其靶向性和药效具有直接的影响,本研究通过血清稳定性模拟脂质体在体内的稳定性,结果显示制备的脂质体在 50% FBS 中都具有很好的稳定性,可以推测本研究制备的脂质体在体内也会具有较好的稳定性。

综上所述,本研究构建了 angiopep-2 和转铁蛋白共修饰的脂质体,考察了脂质体的粒径以及 Zeta 电位,通过体外细胞摄取实验和血脑屏障跨膜实验证实了所构建的共修饰脂质体具有良好的跨血脑屏障能力,是一种潜在的脑靶向给药系统。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

[1] Brasnjevic I, Steinbusch H W, Schmitz C, Martinez-Martinez P; European NanoBioPharmaceutics Research

Initiative. Delivery of peptide and protein drugs over the blood-brain barrier[J]. Prog Neurobiol, 2009, 87: 212-251.

- [2] Takasato Y, Rapoport S I, Smith Q R. An *in situ* brain perfusion technique to study cerebrovascular transport in the rat[J]. Am J Physiol, 1984, 247(3 Pt 2): H484-H493.
- [3] Huile G, Shuaiqi P, Zhi Y, Shijie C, Chen C, Xinguo J, et al. A cascade targeting strategy for brain neuroglial cells employing nanoparticles modified with angiopep-2 peptide and EGFP-EGF1 protein [J]. Biomaterials, 2011, 32: 8669-8675.
- [4] van Rooy I, Mastrobattista E, Storm G, Hennink W E, Schiffelers R M. Comparison of five different targeting ligands to enhance accumulation of liposomes into the brain[J]. J Control Release, 2011, 150: 30-36.
- [5] Qin Y, Chen H, Yuan W, Kuai R, Zhang Q, Xie F. Liposome formulated with TAT-modified cholesterol for enhancing the brain delivery[J]. Int J Pharm, 2011, 419(1-2): 85-95.
- [6] Gan C W, Feng S S. Transferrin-conjugated nanoparticles of poly(lactide)-D-alpha-tocopheryl polyethylene glycol succinate diblock copolymer for targeted drug delivery across the blood-brain barrier[J]. Biomaterials, 2010, 31: 7748-7757.
- [7] Jiang X, Xin H, Gu J, Xu X, Xia W, Chen S, et al. Solid tumor penetration by integrin-mediated pegylated poly(trimethylene carbonate) nanoparticles loaded with paclitaxel[J]. Biomaterials, 2013, 34: 1739-1746.
- [8] Ying X, Wen H, Lu W L, Du J, Guo J, Tian W, et al. Dual-targeting daunorubicin liposomes improve the therapeutic efficacy of brain glioma in animals[J]. J Control Release, 2010, 141: 183-192.
- [9] 曹卫, 邓医宇, 黄林强, 祝森志, 朱高峰, 江稳强, 等. 高渗盐水对脑缺血再灌注大鼠血脑屏障通透性的影响[J]. 实用医学杂志, 2013, 29: 1412-1415.
- [10] Qin Y, Chen H, Zhang Q, Wang X, Yuan W, Kuai R, et al. Liposome formulated with TAT-modified cholesterol for improving brain delivery and therapeutic efficacy on brain glioma in animals[J]. Int J Pharm, 2011, 420: 304-312.

[本文编辑] 商素芳