穿膜肽 TAT 和脑肿瘤靶向肽 T7 双修饰脂质体的制备和 体外靶向性评价

袁端锋^{1,2}, 宗太丽¹, 高会乐¹, 何 勤^{1*}

(1. 四川大学华西药学院, 靶向药物与传递系统教育部重点实验室, 四川 成都 610041;2. 四川天联药业有限公司, 四川 成都 610000)

摘要:本文旨在制备 T7 肽和穿膜肽 TAT 双修饰的脂质体 (T7 and TAT dual modified liposomes, T7-TAT-LIP) 用于血脑屏障和脑肿瘤细胞双级靶向药物递送。研究以 CFPE 为荧光探针, T7 修饰的 PEG-DSPE、TAT 修饰的 PEG-DSPE、卵磷脂、PEG-DSPE 和胆固醇为材料,采用成膜水化法制备脂质体,对 T7 浓度、TAT 浓度、连接 T7 和 TAT 的 PEG 长度进行优化,表征其粒径、zeta 电位、形态和稳定性。以 bEnd.3 细胞和 C6 细胞为模型,考察 T7-TAT-LIP 的细胞摄取能力,表征其穿过血脑屏障和脑肿瘤细胞靶向能力。结果表明,T7 用量为脂质的 6%、修饰 T7 所用 PEG 链长为 2000、TAT 用量为脂质的 0.5%、修饰 TAT 所用 PEG 链长为 1000 时所得到的双修饰脂质体被 C6 细胞摄取能力最强。优化后 T7-TAT-LIP 粒径为 118 nm, zeta 电位为-6.32 mV,透射电镜下形态圆整。脂质体在 PBS 中较为稳定, 37 ℃放置 24 h,浊度和粒径无明显变化;4~8℃放置 1 个月,粒径和 PDI 无明显变化。在不同时间点,bEnd.3 和 C6 细胞摄取 T7-TAT-LIP 的强度均高于单配体修饰脂质体,且随着孵育时间提高,摄取浓度逐渐提高。这些结果说明,双修饰脂质体具有血脑屏障和脑肿瘤细胞双级靶向能力,且效果优于单配体修饰 脂质体。

关键词: 脂质体; 穿膜肽; 血脑屏障; 脑肿瘤 中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870 (2015) 01-0104-07

Cell penetrating peptide TAT and brain tumor targeting peptide T7 dual modified liposome preparation and *in vitro* targeting evaluation

YUAN Duan-feng^{1, 2}, ZONG Tai-li¹, GAO Hui-le¹, HE Qin^{1*}

 (1. Key Laboratory of Drug Targeting and Drug Delivery Systems, Ministry of Education, West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China;
 2. Sichuan Tianlian Pharmaceutical Co., Ltd, Chengdu 610000, China)

Abstract: The purpose of this study is to prepare T7 and TAT dual modified liposomes (T7-TAT-LIP) to penetrate through blood brain barrier and target to brain tumor cells. The liposomes were prepared with CFPE, T7 modified PEG-DSPE, TAT modified PEG-DSPE, soybean phospholipid, PEG-DSPE and cholesterol. The CFPE was used to track the cellular uptake efficiency. The density of T7 and TAT and the length of PEG were optimized, and then the liposomes were characterized by particle size, zeta potential, morphology and stability. Afterwards, the cellular uptake by bEnd.3 and C6 cells were evaluated. The results showed that the optimized parameters were 6% of T7, 0.5% of TAT, the molecular weight of PEG for T7 was 2000 and the molecular weight of PEG for TAT was 1000. After optimization, the particle size of T7-TAT-LIP was 118 nm, the zeta potential was -6.32 mV and the particles were spherical. The turbidity and particle size of liposomes were not obviously

收稿日期: 2014-09-23; 修回日期: 2014-11-08.

基金项目:国家自然科学基金面上项目 (81373337);国家重大科学研究计划资助项目 (2013CB932504). *通讯作者 Tel / Fax: 86-28-85502532, E-mail: qinhe@scu.edu.cn

changed after 24 h incubation in PBS at 37 $^{\circ}$ C. The particle size and polydispersity index were also stable during 1 month incubation at 4–8 $^{\circ}$ C. The cellular uptake by both bEnd.3 and C6 cells of T7-TAT-LIP was higher than that of T7 or TAT modified liposomes, suggesting dual modified liposomes possessed better blood brain barrier targeting ability and brain tumor targeting ability than the single ligand modified liposomes.

Key words: liposome; cell penetrating peptide; blood-brain barrier; brain tumor

脑肿瘤的治疗仍然是世界性的难题,其发病率 随着人口老龄化而逐年提高,但是治疗效果并未随 着科技进步而得到显著改善^[1]。目前脑肿瘤的临床治 疗手段主要有手术、化疗和放疗。一方面脑部功能区 非常重要,"禁区"较多,手术切除倾向于保守。另 一方面脑肿瘤成浸润生长,肿瘤组织与正常脑组织 的边界模糊,手术难以将肿瘤细胞切除干净,从而极 易复发。放疗的副作用较大,极大降低了患者生存质 量,因此化疗仍然是治疗脑胶质瘤的主要手段^[2]。

不同于外周系统肿瘤,血脑屏障 (blood brain barrier, BBB)的存在极大限制了药物进入脑部。研究 表明,超过98%小分子药物和几乎100%大分子药物 不能透过血脑屏障^[3]。从而使得很多对外周系统肿瘤 有良好治疗效果的一线抗肿瘤药物对脑肿瘤无效, 因此设计能够进入脑部的药物递送系统成为药剂学 的研究热点之一^[4,5]。另外,药物进入脑部后如果在 脑部弥散性分布,在提高对脑肿瘤治疗效果的同时 也会对正常脑组织造成极大的伤害,因此研究者越 来越关注具有双级靶向能力的药物递送系统,该系 统既能透过血脑屏障,又能进一步靶向脑肿瘤细胞, 从而有望具有更好的治疗效果^[1]。

研究表明,多种受体在脑肿瘤细胞和血脑屏障 高表达,如转铁蛋白受体、低密度脂蛋白受体等^[1]。 因此该类受体的特异性配体可以用作血脑屏障和脑 肿瘤细胞双级靶向分子。转铁蛋白 (transferrin, Tf) 为转铁蛋白受体的特异性配体 (transferrin receptor, TfR),将其修饰于纳米载体表面可以达到靶向 BBB 和脑肿瘤的双级靶向效果, 该设想已经在许多研究 中得到证实^[6,7]。然而,内源性的 Tf 能竞争性抑制 Tf修饰的纳米粒与TfR 特异性结合^[8],且蛋白构象的 改变容易导致其功能的丧失,从而不利于发挥靶向 作用^[9]。T7 (HAIYPRH) 是一种通过噬菌体展示技术 筛选得到的短肽, 能够与 TfR 特异性结合, 结合常数 高达10 nmol·L⁻¹,并且由于结合位点的不同,内源性 Tf不会抑制反而会促进T7修饰的纳米粒与TfR 特异 性结合^[10]。所以 T7 更适合作为靶向分子, 且目前已 有多篇报道单独应用 T7 肽^[8,11]。

虽然特异性靶向分子修饰的纳米粒能提高靶向效果,但该靶向效果因受体饱和现象而受到限制^[12]。为了提高药物递送的入胞能力,本课题引入细胞穿膜肽 (CPPs)。TAT (AYGRKKRRQRRR) 是一种细胞穿膜肽,能够将各种性质的药物高效率地传递进入细胞^[13],该传递过程不需要配体-受体特异性结合,且无饱和现象^[14]。但 TAT 缺乏细胞选择性,能够穿透所有细胞膜,这一缺点极大地限制了其在全身给药的肿瘤靶向系统中的应用^[15]。

鉴于细胞穿膜肽和特异性配体各有优劣,为了 达到优势互补目的,本课题将T7和TAT共同修饰到 脂质体表面,以期利用T7的双级靶向能力和TAT入 胞能力高的特点,进一步提高脂质体对脑肿瘤的靶 向性。本文对T7和TAT双修饰脂质体的处方进行了 优化,以脑肿瘤细胞C6的摄取为参照,考察了不同 处方对细胞摄取的影响,并以bEnd.3 细胞代表血脑 屏障内皮细胞、C6 细胞代表脑肿瘤细胞,对双修饰 脂质体的靶向性进行了初步评价。

材料与方法

激光粒度仪/zeta 电位分析仪 仪器和材料 (Nano ZS90, Malvern, 英国); 流式细胞仪 (Cytomics[™] FC500, Beckman Coulter, 美国); 透射电镜 (Hitachi, 日本); NHS-PEG₁₀₀₀-Mal、NHS-PEG₃₅₀₀-Mal(北京 键凯科技有限公司); 1, 2-dimyristoryl-sn-glycero-3phosphoethanolamine (DSPE), DSPE-PEG₂₀₀₀-Mal (Avanti polar lipids, 美国); TAT peptide (Cys-AYGR-KKRRQRRR) (成都凯杰生物科技有限公司); T7 (上 海强耀生物科技有限公司);注射液用大豆磷脂 (SPC, 上海伟太药业有限公司); 胆固醇 (CHO, 成都市科 龙化工试剂厂); DSPE-PEG2000, 2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(carboxyfluorescein) (CFPE) (Avanti lipids, 美国); DSPE-PEG₁₀₀₀-TAT、DSPE-PEG₂₀₀₀-TAT、DSPE-PEG₂₀₀₀-T7、DSPE-PEG₃₅₀₀-T7(由 本实验室合成); Triton X-100 (北京华美生科生物技 术有限公司); 1640 培养基 (Gibco, 美国); Sephadex-G50 (Pharmacia, 美国); 胎牛血清 (FBS, Hyclon, 美

国); 其他试剂均为市售分析纯。

CFPE 标记的双修饰脂质体的制备根据文献^[16], 采用薄膜分散-超声法制备脂质体,称取处方量的 SPC、CHO、DSPE-PEG₂₀₀₀、DSPE-PEG₁₀₀₀-TAT/DSPE-PEG₂₀₀₀-TAT,溶于混合溶剂中(氯仿:甲醇=2:1), 加入 DSPE-PEG₂₀₀₀-T7/DSPE-PEG₃₅₀₀-T7、适量 CFPE 荧光标记脂质 (CFPE 终浓度: 15 µg·mL⁻¹),在 37 ℃ 条件下旋转蒸发 10 min 除去有机溶剂,形成脂质膜, 真空干燥 2 h,以除去残留有机溶剂。加入 pH 7.4 PBS 1 mL,在 37 ℃、180 r·min⁻¹ 摇床中避光水化 1 h;再 水浴超声 2~5 min,使脂质膜从瓶壁上完全脱落;探 头超声 (200 W、75 s)以形成均匀的脂质体,备用。

DSPE-PEG₂₀₀₀-**T7** 用量对脂质体的细胞摄取的影 响 采用 DSPE-PEG-TAT 的 PEG 链长 2000, 用量为 1%, DSPE-PEG-T7 的 PEG 链长为 2000, 筛选 DSPE-PEG₂₀₀₀-**T7** 的用量分别为 2%、4%、6%和 8% (表 1)。 按照上述方法制备脂质体, 采用激光粒度仪/zeta 电位 分析仪测定所得脂质体的粒径和 zeta 电位。

Table 1Composition of liposomes (mol%) used for optimizing
of amount of DSPE-PEG-T7.LIP: Liposomes; T7: Brain tumor
targeting peptide; TAT: Cell penetrating peptide; SPC: Soybean
phospholipid; CHO: Cholesterol

Sample	SPC	СНО	DSPE- PEG ₂₀₀₀	DSPE- PEG ₂₀₀₀ - T7	DSPE- PEG ₂₀₀₀ - TAT
PEG-LIP	57	33	10	-	_
1% TAT-LIP	57	33	9	-	1
2% T7-LIP	57	33	8	2	-
2% T7-1% TAT-LIP	57	33	7	2	1
4% T7-LIP	57	33	6	4	-
4% T7-1% TAT-LIP	57	33	5	4	1
6% T7-LIP	57	33	4	6	-
6% T7-1% TAT-LIP	57	33	3	6	1
8% T7-LIP	57	33	2	8	-
8% T7-1% TAT-LIP	57	33	1	8	1

脑胶质瘤细胞 C6 对各脂质体的摄取 考察 DSPE-PEG₂₀₀₀-T7 的用量对 C6 细胞摄取的影响。C6 细胞接 种于 6 孔板内, 待细胞融合度达 80% 左右且细胞形态 饱满后, 分别加入适量未修饰脂质体 (PEG-LIP)、T7 修饰脂质体 (T7-LIP)、TAT 修饰脂质体 (TAT-LIP) 和 双修饰脂质体 (T7-TAT-LIP), 用培养基调整脂质浓度 为 0.3 µmol·mL⁻¹。在 37 ℃、5% CO₂孵箱中孵育 4 h, 用胰酶消化、离心、重悬后, 采用流式细胞仪检测细 胞摄取的脂质体的荧光强度。

DSPE-PEG-T7 中 PEG 链长对双修饰脂质体的 细胞摄取的影响 采用 DSPE-PEG-TAT 的 PEG 链长 为 2000、用量为 1%, DSPE-PEG-T7 的用量为 6%, 筛 选 PEG 的链长分别为 2000 和 3500 (表 2)。按照上述 方法制备脂质体, 并测定 C6 细胞对各脂质体的摄 取。考察 DSPE-PEG-T7 中 PEG 链长对 C6 细胞摄取 的影响。

Table 2 Composition of liposomes (mol%) used for optimizingof length of PEG of DSPE-PEG-T7

Sample	SPC	СНО	DSPE- PEG ₂₀₀₀	DSPE- PEG ₂₀₀₀ - T7	DSPE- PEG ₃₅₀₀ - T7	DSPE- PEG ₂₀₀₀ - TAT
PEG-LIP	57	33	10	_	_	_
1% TAT-LIP	57	33	9	-	_	1
6% T7-LIP	57	33	4	6	-	-
6% T7-1% TAT-LIP	57	33	3	6	-	1
6% T7-LIP	57	33	4	-	6	-
6% T7-1% TAT-LIP	57	33	3	-	6	1

DSPE-PEG-TAT 中 PEG 链长对双修饰脂质体的 细胞摄取的影响 采用 DSPE-PEG₂₀₀₀-T7 的用量为 6%, DSPE-PEG-TAT 的用量为 1%, 筛选 PEG 链长分 别为 1000 和 2000 (表 3)。按照上述方法制备脂质体, 并测定 C6 细胞对各脂质体的摄取, 考察 DSPE-PEG-TAT 中不同 PEG 链长制备的脂质体对 C6 细胞摄取的影响。

Table 3 Composition of liposomes (mol%) used for optimizingof length of PEG of DSPE-PEG-TAT

Sample	SPC	СНО	DSPE- PEG ₂₀₀₀	DSPE- PEG ₂₀₀₀ - T7	DSPE- PEG ₁₀₀₀ - TAT	DSPE- PEG ₂₀₀₀ - TAT
PEG-LIP	57	33	10	-	-	-
1% TAT-LIP	57	33	9	-	-	1
6% T7-LIP	57	33	4	6	-	-
6% T7-1% TAT-LIP	57	33	3	6	-	1
1% TAT-LIP	57	33	9	-	1	-
6% T7-1% TAT-LIP	57	33	3	6	1	-

DSPE-PEG₁₀₀₀-**TAT** 用量对双修饰脂质体的细 胞摄取的影响 采用 DSPE-PEG₂₀₀₀-T7 的用量为 6%, 筛选 DSPE-PEG₁₀₀₀-TAT 的用量分别为 0.5% 和 1% (表 4)。按照上述方法制备脂质体,并测定 C6 细胞对 各脂质体的摄取,考察 DSPE-PEG₁₀₀₀-TAT 的用量对 C6 细胞摄取的影响。

双修饰脂质体的表征 根据优化的处方同上述 方法制备脂质体,采用激光粒度仪/zeta 电位分析仪 测定所得脂质体的粒径和 zeta 电位。采用透射电镜 观察双修饰脂质体的形态。取适量脂质体样品稀释至 合适浓度,滴加在覆有支持膜的铜筛网上,2%磷钨 酸染色,自然干燥后采用透射电镜观察其形态。

 Table 4
 Composition of liposomes (mol%) used for optimizing of amount of DSPE-PEG₁₀₀₀-TAT

Sample	SPC	СНО	DSPE- PEG ₂₀₀₀	DSPE- PEG ₂₀₀₀ - T7	DSPE- PEG ₁₀₀₀ - TAT
PEG-LIP	57	33	10	-	-
6% T7-LIP	57	33	4	6	-
1% TAT-LIP	57	33	9	-	1
6% T7-1% TAT-LIP	57	33	3	6	1
0.5% TAT-LIP	57	33	9.5	-	0.5
6% T7-0.5% TAT-LIP	57	33	3.5	6	0.5

双修饰脂质体的稳定性考察 分别取 PEG-LIP、 T7-LIP、TAT-LIP 和 T7-TAT-LIP 各脂质体 50 μL,加 入 1 mL PBS (pH 7.4)中,混合后,加到 96 孔板中, 每孔 200 μL,在 37 ℃、50 r·min⁻¹ 摇床中孵育,分别 于 0、2、4、6、8、10、12 和 24 h 采用化学发光仪 于 750 nm 测定样品的透光率,以不加脂质体的 PBS 作为对照组。各样品各时间点的透光率与 0 h 透光率 的比值为纵坐标,各时间点为横坐标,绘制透光率随 时间的变化曲线。

另分别取 PEG-LIP、T7-LIP、TAT-LIP 和 T7-TAT-LIP 各脂质体 50 μL, 加入 1 mL PBS (pH 7.4) 中, 混合后, 在 37 ℃、50 r·min⁻¹ 摇床中孵育, 分别于 0、 2、4、8、20 和 24 h 测定样品的粒径, 以粒径为纵 坐标, 各时间点为横坐标, 绘制粒径随时间的变化曲 线。

将制备好的 PEG-LIP、T7-LIP、TAT-LIP 和 T7-TAT-LIP 放置于 4~8 ℃环境中,分别于制备的当天 (第 0 天) 和制备后第 30 天取样测定样品的粒径、电 位和分布,考察 4~8 ℃放置条件下样品的稳定性。

bEnd.3 细胞对双修饰脂质体的摄取 bEnd.3 细胞以每孔 1×10⁵个接种于6孔板内,3 天后,移去培养基,分别加入适量 PEG-LIP、T7-LIP、TAT-LIP 和 T7-TAT-LIP,用培养基调整脂质浓度为 0.3 µmol·mL⁻¹。在 37 ℃、5% CO₂孵箱中孵育 0.5、1、2 和 6 h 后,弃去脂质体悬液,细胞用 PBS 冲洗 3 次, 0.25% 胰酶消化成单个细胞悬液,3000 r·min⁻¹离心 5 min,弃去上清液,再将细胞用 0.5 mL PBS 重悬后,用流式细胞仪检测细胞摄取的脂质体的荧光强度。

C6 细胞对双修饰脂质体的摄取 C6 细胞以每 孔 1×10⁵个接种于 6 孔板内, 24 h 后,移去培养基,分 别加入适量 PEG-LIP、T7-LIP、TAT-LIP 和 T7-TAT-LIP, 用培养基调整脂质浓度为 0.3 µmol·mL⁻¹。在 37 ℃、 5% CO₂ 孵箱中孵育 0.5、1、2 和 6 h 后,以下操作步 骤同"bEnd.3 细胞对双修饰脂质体的摄取"。

结果

1 DSPE-PEG2000-T7用量对脂质体的细胞摄取的影响

为了实现最佳的入胞效果,本课题对 DSPE-PEG₂₀₀₀-T7 的用量进行了筛选。由该粒径和电位结果 (表 5)可知,随着 DSPE-PEG₂₀₀₀-T7 用量的增加,脂 质体的粒径略有增加; DSPE-PEG₂₀₀₀-T7 的用量对脂 质体的电位无显著影响。由 C6 细胞对不同脂质体的 摄取结果 (图 1)可知,随着 DSPE-PEG₂₀₀₀-T7 用量增 加,C6 对 T7-LIP 的摄取相对于 C6 对 PEG-LIP 摄取 的倍数由 1.02 倍增加至 1.58 倍,表明 T7 单配修饰脂 质体被 C6 细胞摄取的效果随着 DSPE-PEG₂₀₀₀-T7 用 量增加而增加;C6 对 T7-TAT-LIP 的摄取相对于 C6 对 TAT-LIP 摄取的倍数由 1.37 倍增加至 1.64 倍,表明 T7 和 TAT 的协同效果随着 DSPE-PEG₂₀₀₀-T7 用量增 加而增加。由于 DSPE-PEG₂₀₀₀-T7 的用量≥8%时,脂 质膜不易从瓶壁上脱落,不利于脂质体的制备。因此, 本课题确定 DSPE-PEG₂₀₀₀-T7 的用量为 6%。

Table 5 Size and zeta-potential of liposomes with differentamount of DSPE-PEG2000-T7

Different amount	Size /nm	PDI	Zeta /mv
0%	108.4	0.212	-6.78
2%	111.8	0.189	-4.68
4%	113.5	0.214	-5.31
6%	116.2	0.196	-6.31
8%	118.3	0.201	-5.73



Figure 1 The uptake index of liposomes with different amount of DSPE-PEG₂₀₀₀-T7 by C6 cells. n=3, $\bar{x}\pm s$. Number represents the ratio between two column, ${}^*P < 0.05$, ${}^{**}P < 0.01$

2 DSPE-PEG-T7 中 PEG 链长对双修饰脂质体的细 胞摄取的影响

由于不同 PEG 链长对脂质体入胞的影响不同, 为了实现最佳的入胞效果,本课题对 DSPE-PEG-T7 中 PEG 的链长进行筛选。随着 DSPE-PEG-T7 中 PEG 链长从 2000 增加到 3500, 粒径从 112.4 nm 增加到 119.0 nm; DSPE-PEG-T7 中 PEG 链长对脂质体的电 位无显著影响,保持在-6 mV 左右。由 C6 细胞对不 同脂质体的摄取结果(图 2)可知,C6对T7(3500)-LIP的摄取是PEG-LIP的1.45倍,C6对T7(2000)-LIP的摄取是PEG-LIP的1.39倍,表明T7单配体修饰的脂质体在C6细胞中的摄取,PEG为3500的链长优于2000。对于T7和TAT双修饰脂质体,C6细胞对T7(3500)-TAT-LIP的摄取是TAT-LIP的1.39倍,C6细胞对T7(2000)-TAT-LIP的摄取是TAT-LIP的1.55倍,表明DSPE-PEG-T7中PEG链长为2000所制备的双修饰脂质体在C6细胞中的摄取优于PEG链长为3500,此结果与T7单配体脂质体摄取结果正好相反,其原因可能是随着PEG链长的增加,PEG屏蔽了TAT的入胞效果,所以本课题选择DSPE-PEG-T7中PEG链长为2000,即DSPE-PEG₂₀₀₀-T7。在此链长条件下,T7和TAT的协同效果最好。



Figure 2 The uptake index of liposomes with different PEG length of DSPE-PEG-T7 by C6 cells. n = 3, $\bar{x} \pm s$. Number represents the ratio between two column, ${}^{*}P < 0.05$

3 DSPE-PEG-TAT 中 PEG 链长对双修饰脂质体的 细胞摄取的影响

DSPE-PEG-TAT 中 PEG 的链长也会影响脂质体入 胞效果,为了实现最佳的入胞效果,本课题对 DSPE-PEG-TAT 中 PEG 的链长进行筛选。随着 DSPE-PEG-TAT 中 PEG 链长从 1000 增加到 2000,脂质体的粒径 从 113.5 nm 增加到 115.7 nm; DSPE-PEG-TAT 中 PEG 链长对脂质体的电位无显著影响。由 C6 细胞对不同 脂质体的摄取结果 (图 3)可知,C6 细胞对 T7-LIP 的 摄取是 PEG-LIP 的 1.39 倍,C6 细胞对 T7(2000)-TAT (2000)-LIP 的摄取是 TAT(2000)-LIP 的 1.55 倍,C6 细胞对 T7(2000)-TAT(1000)-LIP 的摄取是 TAT(1000)-LIP 的 1.68 倍,表明 DSPE-PEG-TAT 中 PEG 链长为 1000 时,T7和TAT 的协同效果更好。因此,采用 DSPE-PEG-TAT 中 PEG 链长为 1000,即 DSPE-PEG₁₀₀₀-TAT。

4 DSPE-PEG₁₀₀₀-**TAT** 用量对双修饰脂质体的细胞 摄取的影响

为了实现最佳的入胞效果,本课题还对 DSPE-



Figure 3 The uptake index of liposomes with different PEG length of DSPE-PEG-TAT by C6 cells. n=3, $\bar{x}\pm s$. Number represents the ratio between two column, ${}^*P<0.05$, ${}^{**}P<0.01$

PEG₁₀₀₀-TAT 的用量进行了筛选。DSPE-PEG₁₀₀₀-TAT 用量从 0.5%增加到 1%时,双修饰脂质体的粒径从 113.5 nm 降低到 108.3 nm,双修饰脂质体的电位从 -6.91 mV 增加到-3.59 mV,此结果跟 TAT 带正电荷 有关。由 C6 细胞对不同脂质体的摄取结果 (图 4) 可 知,当 DSPE-PEG₁₀₀₀-TAT 的用量为 1%时, C6 细胞 对 T7-TAT-LIP 的摄取是 TAT-LIP 1.68 倍;当 DSPE-PEG₁₀₀₀-TAT 的用量为 0.5%时, C6 细胞对 T7-TAT-LIP 的摄取是 TAT-LIP 的 2.5 倍,表明 DSPE-PEG₁₀₀₀-TAT 的用量为 0.5%时, T7 和 TAT 的协同效果更好。因此, 采用 DSPE-PEG₁₀₀₀-TAT 的用量为 0.5%。



Figure 4 The uptake index of liposomes with different amount of DSPE-PEG₁₀₀₀-TAT by C6 cells. n = 3, $\bar{x} \pm s$. Number represents the ratio between two column, ${}^*P < 0.05$, ${}^{**}P < 0.01$

综上所述,本研究所得优化处方为:6% DSPE-PEG₂₀₀₀-T7、0.5% DSPE-PEG₁₀₀₀-TAT、3.5% DSPE-PEG₂₀₀₀、57% 卵磷脂和 33% 胆固醇。

5 双修饰脂质体的形态

所有脂质体的粒径在 100~120 nm (表 6, 图 5), 多肽修饰对脂质体粒径无显著影响,脂质体粒径分 布均匀,略带负电。采用优化处方制备的双修饰脂质 体形态多为规则的类球形,粒径约为 110 nm。

6 双修饰脂质体的稳定性

粒径和浊度是考察脂质体稳定性的重要指标^[17], 由于脂质体储存于 PBS 中,因此考察了双修饰脂质 体在 PBS 中的稳定性。各脂质体在 PBS 中, 37 ℃条 件下放置 24 h 的浊度无明显提高,同时粒径稳定在 110 nm 左右;脂质体在 4~8 ℃条件下放置 30 天,样

Table 6 Size and zeta potentials of different liposomes. n=3, $\overline{x} \pm s$

Sample	Size /nm	PDI	Zeta /mV
PEG-LIP	99.7 ± 0.51	0.157 ± 0.02	-6.69 ± 1.03
T7-LIP	110.5 ± 1.02	0.170 ± 0.04	-5.62 ± 1.06
TAT-LIP	101 ± 0.92	0.187 ± 0.07	-5.02 ± 1.6
T7-TAT-LIP	118 ± 0.76	0.204 ± 0.09	-6.32 ± 2.0

品电位稳定在-6 mV 左右、粒径始终稳定在 110 nm 左右且 PDI 无明显增加, 表明脂质体在 PBS 中的稳 定性较好。

7 bEnd.3 细胞对双修饰脂质体的摄取

如图 6A 所示, 在不同时间点, 双修饰脂质体的摄 取均明显优于单配体修饰脂质体; bEnd.3 细胞对 T7-TAT-LIP 的摄取与 TAT-LIP 的倍数随着摄取时间的延 长而降低, 倍数在 6 h 达到最低值, 表明细胞摄取的 协同效果在 6 h 时最低。但细胞摄取脂质体的绝对量 在 6 h 达到最高值, 表明随着时间的延长脂质体能够 进一步被摄取进入细胞内。

8 C6 细胞对双修饰脂质体的摄取

如图 6B 所示,在不同时间点双修饰脂质体的摄 取均显著优于单配体修饰脂质体;当摄取时间为 0.5 h 时,C6 细胞对 T7-TAT-LIP 的摄取是 TAT-LIP 的 6.38 倍,随着摄取时间延长,T7-TAT-LIP 与 TAT-LIP 的摄 取倍数逐渐降低,到6h时,倍数降至2.49倍。C6细 胞对各脂质体摄取的绝对值随着时间延长,摄取量 增加,在6h达到最高值,说明随着时间的延长同样 可以增加C6细胞的摄取,此结果与bEnd.3细胞摄取 一致。

讨论

对于药物传递系统,纳米粒的粒径是决定递药 系统体内和体外效果的关键因素之一^[18]。对于无配体 修饰、通过渗透和滞留增强效应 (EPR 效应)到达肿 瘤组织的被动靶向纳米粒,粒径的最佳范围为 100~ 200 nm^[19]。本课题采用优化处方制备的双修饰脂质 体形态多为规则的类球形,粒径为 100~120 nm,在 EPR 效应最佳粒径范围内,有利于脂质体在肿瘤部 位的蓄积。双修饰脂质体表面修饰 T7 和 TAT 后,脂 质体的粒径和电位无显著改变,双修饰脂质体略带 负电荷,有利于脂质体在生理条件下稳定,在4~8 ℃ 下可放置 1 个月。综上,本课题制备的双修饰脂质体 在体外各性质稳定,可用于体内外靶向效果的评价。 T7 肽为转铁蛋白受体的特异性配体,而转铁蛋

В С 40000 12 10 30000 counts Intensity/% 20000 Total 10000 1 10 100 1000 10000 -200 -100 0 100 200 0.1 Size / nm Zeta potential / mV

Figure 5 Transmission electron micrograph of T7-TAT-LIP (A, bar represents 100 nm); Partical size distribution of T7-TAT-LIP (B); Zeta potential of T7-TAT-LIP (C)



Figure 6 The cellular uptake of bEnd.3 cells (A) and C6 cells (B) was measured at 0.5, 1, 2 and 6 h after treated with the same concentration of each liposomes. n=3, $\bar{x} \pm s$. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001

白受体在脑毛细血管内皮细胞和脑肿瘤细胞上均高 表达,已被用于血脑屏障和脑肿瘤细胞双级靶向递 送研究。bEnd.3 细胞系由于能够表达脑毛细血管内 皮细胞的一些标志物,而常被用作评价纳米递药系 统的脑靶向性^[20]。本研究表明,修饰 T7 肽能够有效 提高 bEnd.3 细胞对脂质体的摄取,此结果与文献^[8] 报道一致,说明 T7 肽确实有血脑屏障靶向能力。同 时脑肿瘤细胞也高表达转铁蛋白受体,大鼠脑肿瘤 细胞 C6 摄取修饰 T7 肽的脂质体的能力显著高于未 修饰脂质体,说明 T7 肽能够提高脂质体对脑肿瘤的 靶向性,与文献^[8]报道一致。细胞摄取结果初步表明 T7 肽能够用于血脑屏障和脑肿瘤双级靶向药物递 送。

配体与受体的相互作用具有特异性好的优点, 因此相关配体常被用作纳米递药系统的靶向分子。然 而受体往往容易饱和,从而限制了配体介导纳米系 统入胞。为克服此缺点,本研究在脂质体表面共同修 饰了具有特异性识别转铁蛋白受体能力的 T7,以及 具有非特异性穿膜能力的 TAT。研究表明,细胞摄取 双修饰脂质体的能力显著高于 T7 修饰的脂质体和 TAT 修饰的脂质体,证明二者的协同作用很好,有望 具有更好的血脑屏障和脑肿瘤靶向性。

本研究初步证明所设计的 T7 和 TAT 双修饰脂质体能够提高内皮细胞和脑肿瘤细胞的摄取,具有潜在的血脑屏障和脑肿瘤靶向性。该结果尚待进一步考察其体内靶向性、载药后的抗肿瘤活性和安全性,以全面验证该双修饰脂质体的双级靶向递药能力。

References

- Gao HL, Pang ZQ, Jiang XG. Targeted delivery of nanotherapeutics for major disorders of the central nervous system
 [J]. Pharm Res, 2013, 30: 2485-2498.
- [2] Liu Y, Lu WY. Recent advances in brain tumor-targeted nano-drug delivery systems [J]. Expert Opin Drug Deliv, 2012, 9: 671-686.
- [3] Pardridge WM. Vector-mediated drug delivery to the brain[J]. Adv Drug Deliv Rev, 1999, 36: 299-321.
- [4] Lammers T, Kiessling F, Hennink WE, et al. Drug targeting to tumors: principles, pitfalls and (pre-) clinical progress [J].
 J Control Release, 2012, 161: 175–187.
- [5] Jiang XG. Research progress in brain-targeting drug delivery systems [J]. Fudan Univ J Med Sci (复旦学报医学版), 2012: 441-448.
- [6] Li HY, Qian ZM. Transferrin/transferrin receptor-mediated drug delivery [J]. Med Res Rev, 2002, 22: 225 –250.

- [7] Recht L, Torres CO, Smith TW, et al. Transferrin receptor in normal and neoplastic brain tissue: implications for braintumor immunotherapy [J]. J Neurosurg, 1990, 72: 941–945.
- [8] Han L, Li JF, Huang SX, et al. Peptide-conjugated polyamidoamine dendrimer as a nanoscale tumor-targeted T1 magnetic resonance imaging contrast agent [J]. Biomaterials, 2011, 32: 2989–2998.
- [9] Mahmoudi M, Shokrgozar MA, Sardari S, et al. Irreversible changes in protein conformation due to interaction with superparamagnetic iron oxide nanoparticles [J]. Nanoscale, 2011, 3: 1127–1138.
- [10] Oh S, Kim BJ, Singh NP, et al. Synthesis and anti-cancer activity of covalent conjugates of artemisinin and a transferrinreceptor targeting peptide [J]. Cancer Lett, 2009, 274: 33 –39.
- [11] Kuang YY, An S, Guo YB, et al. T7 peptide-functionalized nanoparticles utilizing RNA interference for glioma dual targetting [J]. Int J Pharm, 2013, 454: 11–20.
- [12] Kibria G, Hatakeyama H, Ohga N, et al. Dual-ligand modification of PEGylated liposomes shows better cell selectivity and efficient gene delivery [J]. J Control Release, 2011, 153: 141-148.
- [13] Fonseca SB, Pereira MP, Kelley SO. Recent advances in the use of cell-penetrating peptides for medical and biological applications [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2009, 61: 953-964.
- [14] Torchilin VP, Rammohan R, Weissig V, et al. TAT peptide on the surface of liposomes affords their efficient intracellular delivery even at low temperature and in the presence of metabolic inhibitors [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98: 8786–8791.
- [15] Bechara C, Sagan S. Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? [J]. FEBS Lett, 2013, 587: 1693-1702.
- [16] Zong TL, Mei L, Gao HL, et al. Synergistic dual-ligand doxorubicin liposomes improve targeting and therapeutic efficacy of brain glioma in animals [J]. Mol Pharm, 2014, 11: 2346–2357.
- [17] Sharma G, Modgil A, Layek B, et al. Cell penetrating peptide tethered bi-ligand liposomes for delivery to brain *in vivo*: biodistribution and transfection [J]. J Control Release, 2013, 167: 1–10.
- [18] Li SD, Huang L. Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles [J]. Mol Pharm, 2008, 5: 496-504.
- [19] Zhan CY, Wei XL, Qian J, et al. Co-delivery of TRAIL gene enhances the anti-glioblastoma effect of paclitaxel *in vitro* and *in vivo* [J]. J Control Release, 2012, 160: 630–636.
- [20] Hu KL, Li JW, Shen YH, et al. Lactoferrin-conjugated PEG-PLA nanoparticles with improved brain delivery: *in vitro* and *in vivo* evaluations [J]. J Control Release, 2009, 134: 55–61.