

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.15.003

文章编号: 1005-8982 (2019) 15-0012-04

## Angiopep-2 修饰脂质体的构建 及其脑靶向性研究

李培育, 吴成吉

(佳木斯大学附属第一医院 神经内科, 黑龙江 佳木斯 154002)

**摘要:** **目的** 构建 Angiopep-2 修饰脂质体, 并对其理化性质和跨血脑屏障能力进行评价。**方法** 采用薄膜分散法制备 Angiopep-2 修饰脂质体 (AP-LP), 研究其理化特征。原代培养脑毛细血管内皮细胞 (BCEC), 通过定量细胞摄取实验研究 BCEC 对 AP-LP 脂质体的摄取率。复制体外模型, 观察不同修饰的 AP-LP 穿过血脑屏障的能力。**结果** 制备的 AP-LP 粒径为  $(125.0 \pm 15.5)$  nm, Zeta 电位为  $(8.35 \pm 3.64)$  mV。BCEC 对 AP-LP 脂质体的摄取率是普通脂质体的 4.1 倍, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); AP-LP 的透过血脑屏障能力是普通脂质体的 3.6 倍, 两者比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。**结论** AP-LP 制备方法简便易行, Angiopep-2 修饰脂质体后, 脂质体的血脑屏障穿透力增加, 靶向性增加, 是一种潜在高效的脑部靶向给药系统。

**关键词:** 脑疾病; Angiopep-2; 脂质体; 分子靶向治疗

**中图分类号:** R742

**文献标识码:** A

## Delivery capability study of Angiopep-2 Modified liposomes into brain

Pei-yu Li, Cheng-ji Wu

(Department of Neurology, The First Affiliated Hospital of Jiamusi University,  
Jiamusi, Heilongjiang 154002, China)

**Abstract: Objective** To construct angiopep-2 modified liposome and evaluate its delivery capability into brain. **Methods** Angiopep-2 liposome (AP-LP) was prepared by thin film dispersion method. Physical and chemical characteristics were studied. In the primary culture of BCEC cells, the uptake efficiency of AP-LP by BCEC cells was studied by quantitative cell uptake assay. In vivo study of AP-LP Crossing blood brain barrier was also investigated. **Results** The AP-LP diameter was  $(125.0 \pm 15.5)$  nm, and the Zeta potential was  $(8.35 \pm 3.64)$  mV. According to in vitro cell uptake experiments, the efficiency of AP-LP uptake by BCEC cells is 4.1 times of ordinary liposomes ( $P < 0.01$ ). Capability of crossing the blood-brain barrier efficiency of AP-LP was 3.6 times of ordinary liposomes ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** AP-LP exerts increased capability of crossing blood brain barrier and may be a promising brain targeted drug delivery system.

**Keywords:** angiopep-2; liposomes; brain targeting therapy

根据 WHO 相关文件公布的数据显示, 全世界约 25% 人群患有程度不一的中枢神经系统类疾病, 而且每年患病例数都在快速增长, 据保守估计到 2020 年, 此发病例数会增加至 19 亿之多<sup>[1]</sup>。其中由中枢神经系统引发的脑部肿瘤、癫痫疾病、神经退行性疾病等中枢神经系统疾病已经严重影响人类的正常生活。目前对此类疾病的治疗办法不多, 且多受限于血脑屏障的阻碍, 疗效难以发挥, 使得脑部疾病治疗药物很难到达病变组织, 因此, 开发具有脑部靶向性的给药系统成为了当前中枢神经疾病治疗领域的热点<sup>[2-4]</sup>。有研究表明, Angiopep-2 可通过二巯基丙醇 (dimercaprol dimercaptopropanol, BBB) 上低密度脂蛋白受体及其表达的相关蛋白 (LRP) 受体, 将药物介导并以内吞的方式进入脑组织, 是一种潜在的脑靶向给药载体<sup>[5]</sup>。本研究将 Angiopep-2 连接到脂质体的表面, 研究其脑靶向性。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

激光粒度测定仪及配套的 Zeta 电位测试仪 (英国马尔文公司, 型号: Sizer Nano ZS90 型), Angiopep-2 (安徽安科生物工程有限公司), 大豆卵磷脂 (美国 Sigma 公司), DSPE-PEG2000 (美国 DOW 公司), 香豆素-6 (美国 Sigma 公司), DSPE-PEG2000-MAL (美国 DOW 公司)。实验大鼠购置于佳木斯大学实验动物中心, Wistar 大鼠体重 200 ~ 300 g。

### 1.2 方法

**1.2.1 Angiopep-2 (AP-LP) 的制备** 根据文献 [6-7] 方法首先合成 AP-PEG2000-DSPE。具体方法: 先称取大豆磷脂 22.50 mg、胆固醇 1.88 mg、DSPE-PEG 2000 1.75 mg、AP-PEG2000-DSPE 1.20 mg 及其他实验材料, 模型药物溶解在有机溶剂氯仿中, 采用化学中的减压蒸馏法操作并使其成膜, 然后将有机溶剂去除干净, 将此成膜材料置于干燥器中干燥, 干燥结束后, 加入 2 ml PBS 水化得到 AP-LP。取脂质体适量, 用马尔文激光粒度仪测量其粒径及电位。

**1.2.2 体外细胞摄取实验** 参照文献 [8-9] 方法原代培养脑毛细血管内皮细胞 (brain capillary endothelium cell, BCEC)。取 10 只 7 ~ 10 d 的 SD 大鼠, 断颈处死后置碘伏中消毒, 于无菌培养皿中 75% 酒精脱碘, 取出的全脑组织装入盛有缓冲液的培养皿中, 包括

小脑组织、间脑组织 (包括海马)、大脑白质、残余大血管。将大脑半球在润湿的滤纸上缓慢滚动以吸除软脑膜及大血管。将大脑皮质经缓冲液漂洗后, 剪碎成 1 mm × 1 mm × 1 mm 大小, 加入 0.1% Collagenase II 溶液 10 ml 混匀后 37℃ 水浴缓慢振摇消化 1 h, 室温下 1 500 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 于沉淀中加入 25% BSA 溶液混匀, 低温 3 000 r/min 离心 15 min, 去除中上层神经组织及大血管, 用缓冲液轻轻漂洗, 底部沉淀加入 2 ml 0.1% Collagenase II 溶液吹打混匀后于 37℃ 水浴缓慢振摇消化 30 min, 室温下 1 500 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 加入 2 ml DMEM 培养液悬浮。50% Percoll 经 15 000 r/min 梯度离心形成连续梯度后, 将悬浮液铺于页面, 4℃、2 000 r/min 离心 10 min, 距离梯度液面 4/5 处的红细胞层之上白黄色的层面即为纯化的微血管段, 漂洗 1 次, 加入 BCEC 的培养液悬浮于接种于涂布 1% 明胶的 35 mm 的表面皿中, 加入 37℃、5% 二氧化碳 CO<sub>2</sub> 培养箱内培养。

将培养的生长期细胞接种于 6 孔板中, 37℃ 培养 24 h 后, 在孔板的每个孔中加入相应的不同种类的脂质体, 其浓度均为 0.25 mg/ml, 37℃ 时孵育 2 和 4 h 后, 除去含脂质体培养基, 然后温度较低的 PBS 洗涤 2 次, 采用浓度为 0.25% 胰酶处理后进行离心操作, 缓冲液洗涤 2、3 次后, 检测细胞荧光响应值。细胞对脂质体的摄取率的测定步骤是将细胞漂洗 3 次后, 加入 DAPI 溶液, 浓度为 2 μg/ml, 培育时间设置为 15 min。加 4% 甲醛多聚物溶液固定, 低温磷酸盐缓冲液保存, 显微镜观察细胞对脂质体摄取数。

**1.2.3 脂质体膜转运研究** 按  $2 \times 10^5$  个/cm<sup>2</sup> 的速率浓度将 BCEC 接种于在聚碳酸酯膜上, 进行 3 周培育, 然后以细胞跨膜电阻仪进行细胞电阻的测定, 当电阻值 >250 Ω/cm<sup>2</sup> 时, 则可进行跨膜转运研究。此时上腔 A 面加入现配的脂质体溶液, 下腔 B 面加入等浓度的 PBS。定时取出下腔 B 面溶液, 用荧光分光光度法测定其荧光值。

### 1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 21.0 统计软件。计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 比较采用 *t* 检验和重复测量设计的方差分析, 两组比较采用 LSD-*t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 脂质体的表征

AP-LP 粒径为  $(125 \pm 15.5)$  nm, Zeta 电位为  $(8.35 \pm 3.64)$  mV。

### 2.2 大鼠的 BCEC 形态

原代培养后的 BCEC, 在光学显微镜下观察显示, 成长 7 d 后呈现明显的铺路石状态。见图 1。

### 2.3 脂质体的摄取率

AP-LP 的摄取率在 4 h 是 2 h 的 1.7 倍, 2 个时间点摄取率的比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。BCEC 对 AP-LP 的摄取效率是普通脂质体的 4.1 倍, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) (见表 1)。共聚焦观察显示, AP-LP 的荧光强度强于其他组 (见图 2)。

### 2.4 AP-LP 穿透血脑屏障能力的比较

AP-LP 组与 LP 组在 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、6.0、8.0、10.0 和 12.0 h 不同时间点荧光强度的比较采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点的荧光强度有差异 ( $F = 23.387, P = 0.000$ ); ② AP-LP 组与 LP



图 1 培养第 7 天时的 BCEC 形态 (×400)

表 1 BCEC 对不同脂质体的摄取率比较  
( $n = 3, \%, \bar{x} \pm s$ )

组别	2 h	4 h	t 值	P 值
LP 组	$28.35 \pm 2.55$	$42.58 \pm 3.60$	5.585	0.003
AP-LP 组	$101.27 \pm 6.62$	$172.32 \pm 7.50$	12.475	0.000
t 值	17.804	27.220	-	-
P 值	0.000	0.000	-	-

组荧光强度有差异 ( $F = 10.643, P = 0.000$ ), AP-LP 荧光强度高于对照组; ③ AP-LP 组与 LP 组荧光强度变化趋势有差异 ( $F = 13.442, P = 0.000$ )。见表 2 和图 3。

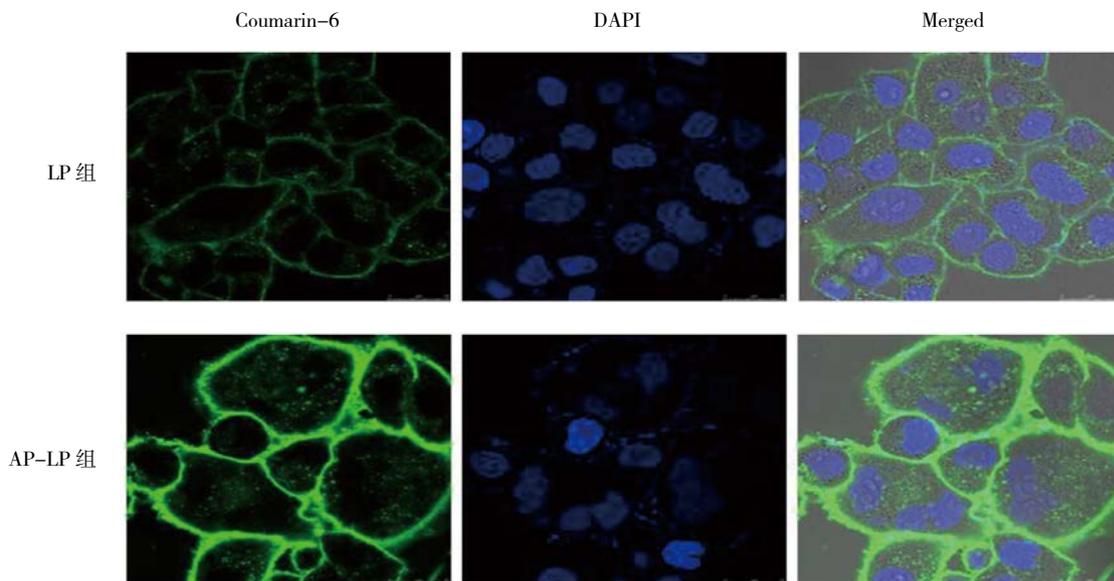


图 2 共聚焦观察 BCEC 对香豆素-6 脂质体的摄取 (×400)

表 2 AP-LP 穿透血脑屏障的能力比较 ( $n = 3, \bar{x} \pm s$ )

组别	0.5 h	1.0 h	2.0 h	3.0 h	4.0 h	6.0 h	8.0 h	10.0 h	12.0 h
LP 组	$2.12 \pm 0.98$	$4.31 \pm 1.89$	$9.12 \pm 3.30$	$13.76 \pm 4.87$	$18.78 \pm 5.12$	$22.71 \pm 5.78$	$25.21 \pm 6.12$	$29.45 \pm 6.43$	$36.42 \pm 7.42$
AP-LP 组	$2.31 \pm 1.01$	$5.17 \pm 2.38$	$11.11 \pm 4.39$	$26.11 \pm 5.90$	$35.23 \pm 6.31$	$47.45 \pm 6.87$	$61.23 \pm 8.31$	$83.12 \pm 7.23$	$115.34 \pm 8.31$

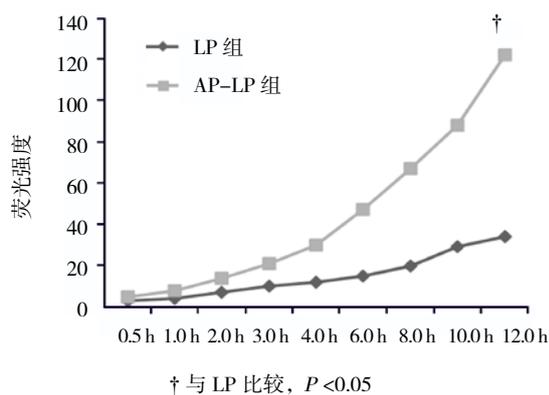


图 3 两组荧光强度变化趋势 (n=3)

### 3 讨论

血脑屏障一方面可以保护脑部组织不受侵害, 另一方面也制约了药物向脑部组织的传递, 使得药物的疗效降低。目前随着中枢神经系统疾病的复杂性和多边形的特点, 人们对促进药物透过血脑屏障的新策略的需求日益迫切<sup>[10-12]</sup>。非侵袭性给药途径因其安全性及顺应性好等优势, 成为药物脑内递送的研究重点<sup>[13]</sup>。本研究设计并构建了一种具有脑部递药能力的脂质体给药系统。将 Angiopep-2 连接到脂质体表面, 并且以 BBB 表达的 LDL 受体以及其 LRP 进行跨越血脑屏障的尝试。

本项研究以原代培养血脑屏障的主要功能性大鼠 BCEC, 并通过研究 BCEC 对 Angiopep-2 修饰的脂质体的摄取, 结果显示, 药物脂质体在以 Angiopep-2 进行修饰后, 可降低 BCEC 对脂质体的摄取。实验结果表明, Angiopep-2 修饰的脂质体组的荧光强度强于普通脂质体, 这与定量实验结果相一致。BCEC 吸收摄取脂质体的数量还存在不足, 不能完全模拟脂质体跨血脑屏障能力, 为研究 BCEC 对修饰后的脂质体摄入透过血脑屏障的数量大小, 有研究尝试构建体外培育的 BBB 细胞模型, 通过该模型进行血脑屏障的模拟性试验, 并以此探究患者的生理功能, 同时还连接脑内转运蛋白, 得出药物脂质体在体内的转运过程。结果显示, 脂质体经过 Angiopep-2 修饰后, 跨膜能力显著增强。

综上所述, 本研究构建的 Angiopep-2 修饰的脂质体与 BCEC 具有良好的亲和力, 能够有效跨越血脑屏障, 是一种潜在高效的脑部递药系统。

### 参考文献:

- [1] BRASNJEVIC I, STEINBUSCH H W M, CHRISTOPH S. Delivery of peptide and protein drugs over the blood-brain barrier[J]. Progress in Neurobiology, 2009, DOI: 10.1016/j.pneurobio.2008.12.002.
- [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, DOI: http://dx.doi.org/.
- [3] GAO H, PAN S, YANG Z. A cascade targeting strategy for brain neuroglial cells employing nanoparticles modified with angiopep-2 peptide and EGFP-EGF1 protein[J]. Biomaterials, 2011, DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.07.069.
- [4] INGE van R. Comparison of five different targeting ligands to enhance accumulation of liposomes into the brain[J]. Journal of Controlled Release, 2011, DOI: 10.1016/j.jconrel.2010.11.014.
- [5] JIANG X. Solid tumor penetration by integrin-mediated pegylated poly(trimethylene-carbonate) nanoparticles loaded with paclitaxel[J]. Biomaterials, 2013, 34(6): 1739-1746.
- [6] YING X, WEN H, LU W L. Dual-targeting daunorubicin liposomes improve the therapeutic efficacy of brain glioma in animals[J]. Journal of Controlled Release, 2010, DOI: 10.1016/j.jconrel.2009.09.020.
- [7] YAO Q. Liposome formulated with TAT-modified cholesterol for improving brain delivery and therapeutic efficacy on brain glioma in animals[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2011, 420(2): 304-312.
- [8] QIN Y. Liposome formulated with TAT-modified cholesterol for enhancing the brain delivery[J]. Int J Pharm, 2011, 419(1/2): 85-95.
- [9] CHEE W G, SI S F. Transferrin-conjugated nanoparticles of poly (lactide) -D-a-Tocopheryl polyethylene glycol succinate diblock copolymer for targeted drug delivery across the blood-brain barrier[J]. Biomaterials, 2010, DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.06.053.
- [10] GUO J, GAO X, SU L, et al. Aptamer-functionalized PEGPLGA nanoparticles for enhanced anti-glioma drug delivery[J]. Biomaterials, 2011, 32(31): 8010-8120.
- [11] ULBRICH K, HEKMATARA T, HERBERT E, et al. Transferrin- and transferrin receptor-antibody-modified nanoparticles enable drug delivery across the blood-brain barrier (BBB)[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2009(71): 251-256.
- [12] GARCIA-GARCIA E, ANDRIEUX K, GIL S, et al. Colloidal carriers and blood brain barrier (BBB) translocation: a way to deliver drugs to the brain[J]. Int J Pharm, 2005, DOI: 10.1016/j.ijpharm.2005.03.031.
- [13] CHANG J, JALLOULI Y, KROUBI M. Characterization of endocytosis of transferrin-coated PLGA nanoparticles by the blood-brain barrier[J]. Int J Pharm, 2009, 379(2): 285-292.

(张西倩 编辑)