

## · 综述 ·

## 纳米载体在胶质瘤治疗中的研究进展

阎亚涛 综述 彭英\* 审校

中山大学孙逸仙纪念医院神经内科,广东 广州 510120

**摘要:**胶质瘤是最常见的人脑原发性肿瘤,临床上通常结合手术和放-化疗综合治疗,但是其疗效和预后均较差,因此基因治疗或药物治疗得到了广泛的关注。目前应用于胶质瘤治疗研究的转移载体主要分为病毒载体和非病毒载体两大类。但是病毒载体有诸多缺陷,而纳米载体凭借其诸多优势,成为新型非病毒载体中研究的热点。本文对近年来纳米载体在胶质瘤治疗中的研究作一综述。

**关键词:**纳米载体;胶质瘤;基因治疗

胶质瘤是最常见的人脑原发性肿瘤,在所有颅内肿瘤中约占40%,其中胶质母细胞瘤(Glioblastoma, GBM)是成人最常见且恶性程度最高的一种胶质瘤<sup>[1]</sup>。目前,GBM的标准治疗方法是手术切除后进行放疗<sup>[2]</sup>。但是,由于GBM细胞弥漫性地浸润性侵袭周围组织导致边缘不清,从而导致外科手术不能完全切除肿瘤组织,而且,GBM对放化疗治疗不敏感,容易产生明显的抵抗<sup>[1-3]</sup>,因而增加了GBM治疗的难度。尽管GBM手术和常规放化疗经过改进已取得较大的进步,但是GBM患者的平均生存期仅仅不到15个月<sup>[4]</sup>。随着对胶质瘤发生发展的分子病因的了解,针对胶质瘤分子生物学机制的治疗逐渐成为有望治愈肿瘤的一种新途径,随之各种基因或药物载体的研究也得到了极大的发展。

目前应用于胶质瘤治疗研究的转移载体主要分为病毒载体和非病毒载体两大类。目前很多基础研究和临床试验使用病毒载体,主要是由于其保留了高的基因转染效能,但是病毒载体有几大缺陷,如制备困难、目的基因插入长度受限,还存在潜在的免疫反应和生物安全等问题<sup>[5-7]</sup>。而非病毒载体由于其制作简单、免疫原性低,不与宿主基因整合,可重复应用,克隆能力不受限等优点而收到广泛的关注<sup>[8]</sup>,而其中的纳米载体凭借其诸多优势,成为新型非病毒载体中研究的热点。

## 1 纳米载体概述

## 1.1 纳米载体

以纳米颗粒(nanoparticle, NP)为基因或药物转移载体就是将DNA、RNA、肽核苷酸、dsRNA和寡核苷酸等基因治疗分子或药物包裹在纳米颗粒之中或吸附在其表面,在细胞摄粒作用下,纳米颗粒进入细胞内,释放基因治疗分子或药物,发挥其治疗效能<sup>[9]</sup>。纳米载体包含的纳米颗粒大小从10~1000 nm不等。

理想的纳米载体的特性如下<sup>[10-11]</sup>:①非毒性、可生物降解和生物相容性;②颗粒大小<100 nm(除非通过单核或巨噬细胞转运);③在血中很稳定(不会聚集和分解);④血液循环时间延长;⑤非免疫原性;⑥部分靶向血脑屏障(Blood brain barrier, BBB)(受体或吸附介导机制或通过单核或巨噬细胞摄取);⑦源药物的稳定性很好的维持;⑧药物释放可调;⑨适用于运载小分子、蛋白、肽或核酸。

## 1.2 纳米载体的分类

纳米载体的种类很多,有聚合物纳米颗粒、聚合物纳米复合物、聚合物胶束、树形聚合物、脂质体等。

1.2.1 聚合物纳米颗粒 聚合物正在发展成为一种负载药物和蛋白并能释放出他们的运输系统,

基金项目:国家自然科学基金青年项目(81200922);广东省科技计划项目(2011b031800141)

收稿日期:2014-04-15;修回日期:2014-06-23

作者简介:阎亚涛(1988-),女,博士研究生,研究方向:胶质瘤基因治疗

通讯作者:彭英,教授,博士生导师,主要研究方向:神经系统疾病的基因治疗。

有较长的储存期,很少的毒性<sup>[12-13]</sup>。聚合物,如聚乳酸 (poly-lactic acid, PLA)、聚乙醇酸 (poly-glycolic acid, PGA)、聚乳酸乙醇酸 (poly-lactic glycolic acid, PLGA)、聚  $\epsilon$  己内酯、多聚谷氨酸、聚苹果酸以及他们的共聚物已经被广泛的研究。一些可生物降解的聚合物很适合用于制备运输药物的纳米大小的颗粒。聚合物也可以用于包被其他类型的纳米颗粒。聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 是一种亲水聚合物,已经被用于包被在纳米颗粒的表面,使他们能够避免网状内皮系统的清除<sup>[14]</sup>,从而通过 BBB 到达中枢神经系统<sup>[10]</sup>。虽然亲水性药物不能渗透 BBB,但是纳米级的亲水纳米颗粒可以使他们通过 BBB。这种现象的机制被认为来自受体介导的吞噬作用和通过肿瘤内有渗透性的毛细血管被动泄漏<sup>[10]</sup>。聚合物还可以用于组织工程。功能化 PLGA 颗粒已经被用于作为一种支架帮助干细胞来移植到中枢神经系统<sup>[15-16]</sup>。

**1.2.2 聚合物纳米复合物** 聚合物纳米复合物是纳米医学中高度创新的技术。它们通常是由一种聚合物加入如-OH、-COOH 或-NH<sub>2</sub> 功能团而合成的。合成需要逐步的化学结合反应和小心避免化学反应中无法控制的部分。他们可以承担很多可用于共价结合多种生物活性物的官能团,通过这些他们可以直接靶向恶性肿瘤,从而释放药物作用于肿瘤靶点 (如 mRNA 和/或蛋白质)<sup>[17-19]</sup>。携带不止一个官能团的纳米复合物可以同时抑制多个肿瘤途径,为治疗部位提供最佳药物浓度,并减少对健康组织的不良影响<sup>[17]</sup>。

**1.2.3 聚合物胶束** 聚合物胶束基本上是由两亲分子的球形集合体,其亲水的头部分散在水中,疏水尾端聚集在里面。聚合物胶束一个重要的特性是他们可以增加难溶药物的溶解性和生物利用度。另一方面,聚合物胶束,也认为是聚合物囊泡,是自己组装的聚合物壳体,含有双亲分子的嵌段聚合物<sup>[20]</sup> 如 PEG-PLA。

**1.2.4 树形聚合物** 树形聚合物是一种最多用途的并被广泛研究的纳米结构载体系统<sup>[21]</sup>。它是由中间的一个核心不断地发出分枝的树枝状聚合物,每发出一层分枝就增加了一代。传代的数量、核心的化学成分、分枝以及表面功能团决定了大小、形状和树形聚合物的反应活性。他们通常是由不同类型的聚合物,如 PGA、PEG、聚醚酰亚胺 (polyether imide, PEI) 和聚酰胺-胺 (poly-

amidoamine, PAMAM) 通过聚合或发散的步骤逐步生长聚合而成。在合成过程中,精确地控制他们的大小、形状和功能使树形聚合物成为了最多用途并且可以定制的纳米技术中的一种。

**1.2.5 脂质体** 脂质体是磷脂和其它两亲性物质分散于水中,由一层或多层同心的脂质双分子膜包封而成的超微球状载体制剂。由于其结构类似生物膜,故又称人工生物膜。脂质体具有的双重特性——亲水性和疏水性,决定了脂质体可以较好地包裹亲水性物质和亲脂性物质,因此脂质体是目前运用较广泛的基因载体之一。用单克隆抗体等配体修饰脂质体,可使药物靶向病变部位。其中,用单克隆抗体修饰的脂质体称为免疫脂质体。而且,脂质体与 PEG 共价结合可以降低其与血浆蛋白的结合<sup>[22]</sup>,从而降低肝脏和脾脏巨噬细胞的摄取和延长在血液循环的时间。此外,脂质体可以延长药物的释放,因此可以提高生物活性并减少药物的系统毒性<sup>[23]</sup>。

## 2 纳米载体在胶质瘤治疗研究中的应用

### 2.1 纳米载体-药物

药物治疗脑部肿瘤最大的限制就是如果静脉给药的话,大多数药物不能够到达脑实质。三层屏障限制并调节了血液和神经组织或其流体间隙界面的分子交换,这三层屏障是大脑内皮细胞形成的 BBB,蛛网膜上皮细胞形成的脑膜中间层和分泌脑脊液的脉络膜上皮细胞。而纳米载体转运药物可以克服这一障碍,并控制药物的释放,从而提高疗效,同时显著减少药物或药物载体的副作用。Gao HL 等<sup>[24]</sup> 发现将纳米颗粒和拉帕替尼相结合后,不仅可以提高药物的水溶性,被 U87 细胞摄取后还能抑制其增殖,导致 G2 时相停止。同时他们发现纳米颗粒-拉帕替尼可以抑制 PI3K/Akt 信号途径,从而发挥抗增殖的作用。在另一项研究中, Jiang 等<sup>[25]</sup> 将 PEG-聚三亚甲基碳酸 (poly-trimethylene carbonate, PTMC) 纳米颗粒负载紫杉醇 (paclitaxel, PTX) 来治疗 GBM。体外的药代动力学研究表明聚合纳米颗粒显著增强了 PTX 的生物利用度。在颅内异种移植肿瘤的老鼠静脉注射药物 12 h 后,纳米颗粒在肿瘤组织内的积累明显增加。更重要的是,体内抗肿瘤效应表现为纳米颗粒/PTX 治疗小鼠的平均生存时间 (27 天) 显著长于那些接受 PTX (24 天),生理盐水 (21 天) 和无 PEG-PTMC 的纳米颗粒 (21 天) 的老鼠。Miao 等<sup>[26]</sup> 将 PEG-PLA 负

载乳铁蛋白 (lactoferrin, Lf) 与 tLyp-1 连用进行双靶点治疗 GBM。tLyp-1 是一种肿瘤表面肽, 可以通过 neuropilin-1 依赖的信号途径调节对组织的穿透力。而乳铁蛋白受体在脑上皮细胞和胶质瘤细胞中过表达, 其修饰的纳米载体可以很好的通过血脑屏障并特异性的靶向肿瘤细胞。Lf-PEG-PLA 与 tLyp-1 联用可以提高在胶质瘤中的聚集并向胶质瘤实质深处渗透, 抗癌效果明显提高。

纳米载体转运药物不仅可以增加药物的疗效, 而且还能够克服药物抵抗。药物抵抗是肿瘤治疗中的一个主要的难题。在大多数肿瘤中内源性或获得性药物抵抗常常发生, 而且常常同时对多种药物产生抵抗。最近, Mamot 等<sup>[27]</sup> 发现在多药抵抗细胞系中, 与单独的阿霉素 (doxorubicin, DOX) 相比, 免疫脂质体负载 DOX 可以产生 19 - 216 倍的细胞毒性, 但是在非药物抵抗的细胞中, 两者的细胞毒性相似。同时, DOX 可以被多药抵抗细胞系有效的泵出, 而免疫脂质体-DOX 使得 DOX 聚集在胞浆中是单独的 DOX 的 3.5 ~ 8 倍, 在胞核中是其 3.5 ~ 4.9 倍。而且, MDA-MB-231 Vb100 异种移植模型的体内研究中证实了抗 EGFR 的免疫脂质体-DOX 可以有效的靶向多药抵抗细胞, 显示出很好的抗癌效果, 明显的优于所有其他的治疗。

## 2.2 纳米载体 - 基因

目前用于治疗胶质瘤的基因主要包括自杀基因、免疫调节基因、凋亡相关基因等。自杀基因又称为酶 - 前体药物自杀基因, 载体被修饰成表达一种酶的基因, 这种酶可以转换成一种无活性的前体药物, 当运输到肿瘤部位, 可以使药物转变为细胞毒性的代谢产物, 从而导致肿瘤细胞死亡。这些靶向细胞毒性基因运输方法可以高度选择性的破坏肿瘤细胞, 而正常的中枢神经系统组织不受损伤。目前最常用的自杀基因治疗系统是单纯疱疹病毒胸腺嘧啶激酶 (Herpes simplex type 1 thymidine kinase, HSV-tk) 系统和胞嘧啶脱氨酶/5-氟胞嘧啶 (cytosine deaminase/5-fluorocytosine, CD/5-FC) 系统。免疫调节基因主要是通过基因免疫调节来诱导或增加 T 细胞介导的免疫应答, 从而达到抗肿瘤的效果。常用的有 IL-2、IL-4、IL-12、INF- $\beta$  等。凋亡相关基因是通过基因来诱导肿瘤细胞的凋亡, 常用的有 TNF 相关的凋亡诱导配体 (TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL) 基因, p53 基因等。虽然 DNA 转染效率是主要的问题, 但是与病毒载

体介导的基因转移相比, 非病毒载体相对容易制备, 较少的免疫原性和致瘤性, 没有潜在的病毒重组和转移基因大小的限制。此外, 他们可以在结构上进行修饰从而携带遗传物质靶向细胞。目前, 纳米载体已经在体内和体外均被证明可以成功的用于基因运输<sup>[28,29]</sup>。最近, An 等<sup>[30]</sup> 通过精氨酸修饰 PAMAM 树形聚合物表面 (PAMAM-RG4) 负载凋亡蛋白基因治疗胶质瘤, 结果显示肿瘤的生长明显受到抑制, 而且没有水肿、皮肤刺激或其他损害。Liang 等<sup>[31]</sup> 为了克服 PEI 的毒性和 PEG-PEI 的低转染效率, 将肿瘤细胞特异性靶向分子叶酸 (folate, FA) 连接于 PEG-PEI 上, 由此提高转染效率; 并应用 FA-PEG-PEI 通过介导 CD/5-FC 基因和 TRAIL 基因转染 C6 胶质瘤细胞进行体外实验<sup>[32]</sup>, 结果显示其细胞毒性显著提高。动物研究显示联合治疗明显抑制了 C6 胶质瘤异种移植物的生长。

## 3 结语与展望

目前纳米载体由于其缺乏免疫原性、可以控制药物的释放、低的安全隐患等优势, 在胶质瘤治疗的研究中得到了很大的进展。虽然纳米载体在临床前期动物模型中有很好的结果, 并且在 I 期临床试验中确定是安全的, 但是 II、III 期临床试验中并没有显示出明显的效果。这种限制其运用到临床的原因如下: 瘤内的低分布和转导效率, 需要增加肿瘤特异性的靶向, 对治疗系统没有充分临床前期知识<sup>[33]</sup>。未来的主要发展方向应当是结合不同的分子来修饰纳米载体进行药物或基因的运输, 以期提高转染效率, 特异性的靶向肿瘤组织, 延长在其中的滞留时间并增强抗癌效果。相信随着研究工作的不断深入, 纳米载体将会在胶质瘤的治疗中具有良好的应用前景。

## 参 考 文 献

- [1] Dunn GP, Rinne ML, Wykosky J, et al. Emerging insights into the molecular and cellular basis of glioblastoma. *Genes Dev*, 2012, 26(8): 756-784.
- [2] Stupp R, Roila F. ESMO Guidelines Working Group. Malignant glioma: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 2009, 20(Suppl 4): 126-128.
- [3] Masui K, Cloughesy TF, Mischel PS. Molecular pathology in adult high grade gliomas: from molecular diagnostics to target therapies. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2012, 38(3): 271-291.
- [4] Fine HA. Bevacizumab in glioblastoma-still much to learn. *N*

- Engl J Med, 2014, 370(8):764-765.
- [5] Marshall E. Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. *Science*, 1999, 286(5448):2244-2245.
- [6] Buckley RH. Gene therapy for SCID-a complication after remarkable progress. *Lancet*, 2002, 360(9341):1185-1186.
- [7] Giacca M, Zacchigna S. Virus-mediated gene delivery for human gene therapy. *J Control Release*, 2012, 161(2):377-388.
- [8] Ibraheem D, Elaissari A, Fessi H. Gene therapy and DNA delivery systems. *Int J Pharm*, 2014, 459(1-2):70-83.
- [9] Bozkir A, Saka OM, Chitosan-DNA nanoparticles: effect on DNA integrity, bacterial transformation and transfection efficiency. *Journal of drug targeting*, 2004, 12(5):281-288.
- [10] Koo YE, Reddy GR, Bhojani M, et al. Brain cancer diagnosis and therapy with nanoplatfoms. *Adv Drug Deliv Rev*, 2006, 58(14):1556-1577.
- [11] Bhaskar S, Tian F, Stoeger T, et al. Multifunctional Nanocarriers for diagnostics, drug delivery and targeted treatment across blood-brain barrier: perspectives on tracking and neuroimaging. *Part Fibre Toxicol*, 2010, 7(3):3.
- [12] Portilla-Arias JA, García-Alvarez M, Galbis JA, et al. Biodegradable nanoparticles of partially methylated fungal poly(beta-L-malic acid) as a novel protein delivery carrier. *Macromol Biosci*, 2008, 8(6):551-559.
- [13] Portilla-Arias JA, García-Alvarez M, de Ilarduya AM, et al. Synthesis, degradability, and drug releasing properties of methyl esters of fungal poly(beta, L-malic acid). *Macromol Biosci*, 2008, 8(6):540-550.
- [14] Lockman PR, Mumper RJ, Khan MA, et al. Nanoparticle technology for drug delivery across the blood-brain barrier. *Drug Dev Ind Pharm*, 2002, 28(1):1-13.
- [15] Bible E, Chau DY, Alexander MR, et al. The support of neural stem cells transplanted into stroke-induced brain cavities by PLGA particles. *Biomaterials*, 2009, 30(16):2985-2994.
- [16] Bible E, Chau DY, Alexander MR, et al. Attachment of stem cells to scaffold particles for intra-cerebral transplantation. *Nat protocols*, 2009, 4(10):1440-1453.
- [17] Lee BS, Fujita M, Khazenzon NM, et al. Polycefin, a new prototype of a multifunctional nanoconjugate based on poly(beta-L-malic acid) for drug delivery. *Bioconjug Chem*, 2006, 17(2):317-326.
- [18] Ljubimova JY, Fujita M, Khazenzon NM, et al. Nanoconjugate based on polymalic acid for tumor targeting. *Chem Biol Interact*, 2008, 171(2):195-203.
- [19] Pinhassi RI, Assaraf YG, Farber S, et al. Arabinogalactan-folic acid-drug conjugate for targeted delivery and target-activated release of anticancer drugs to folate receptor-overexpressing cells. *Biomacromolecules*, 2010, 11(1):294-303.
- [20] Discher DE, Ahmed F, Polymersomes. *Annu. Rev. Biomed Eng*, 2006, 8:323-341.
- [21] Tekade RK, Kumar PV, Jain NK, Dendrimers in oncology: an expanding horizon. *Chemical reviews*, 2009, 109(1):49-87.
- [22] Papahadjopoulos D, Allen TM, Gabizon A, et al. Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1991, 88(24):11460-11464.
- [23] Duggan ST, Keating GM, Pegylated liposomal doxorubicin: a review of its use in metastatic breast cancer, ovarian cancer, multiple myeloma and AIDS-related Kaposi's sarcoma. *Drugs*, 2011, 71(18):2531-2558.
- [24] Gao H, Wang Y, Chen C, et al. Incorporation of lapatinib into core-shell nanoparticles improves both the solubility and anti-glioma effects of the drug. *Int J Pharm*, 2014, 461(1):478-488.
- [25] Jiang X, Xin H, Sha X, et al. PEGylated poly(trimethylene carbonate) nanoparticles loaded with paclitaxel for the treatment of advanced glioma: in vitro and in vivo evaluation. *Int J Pharmaceutics*, 2011, 420(2):385-394.
- [26] Miao D, Jiang M, Liu Z, et al. Co-administration of Dual-Targeting Nanoparticles with Penetration Enhancement Peptide for Antiglioblastoma Therapy. *Molecular pharmaceutics*, 2013, 11(1):90-101.
- [27] Mamot C, Ritschard R, Wiki A et al. Immunoliposomal delivery of doxorubicin can overcome multidrug resistance mechanisms in EGFR-overexpressing tumor cells. *Journal of drug targeting*, 2012, 20(5):422-432.
- [28] Tan W, Wang K, He X, et al. Bionanotechnology based on silica nanoparticles. *Medicinal research reviews*, 2004, 24(5):621-638.
- [29] Singh M, Briones M, Ott G, et al. Cationic microparticles: a potent delivery system for DNA vaccines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, 97(2):811-816.
- [30] An S, Nam K, Choi S, et al. Nonviral gene therapy in vivo with PAM-RG4/apoptin as a potential brain tumor therapeutic. *Int J Nanomedicine*, 2013, 8:821-834.
- [31] Liang B, He ML, Xiao ZP, et al. Synthesis and characterization of folate-PEG-grafted-hyperbranched-PEI for tumor-targeted gene delivery. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 367(4):874-880.
- [32] Liang B, He ML, Chan CY, et al. The use of folate-PEG-grafted-hybranched-PEI nonviral vector for the inhibition of glioma growth in the rat. *Biomaterials*, 2009, 30(23-24):4014-4020.
- [33] Tobias A, Ahmed A, Moon KS, et al. The art of gene therapy for glioma: a review of the challenging road to the bedside. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2013, 84(2):213-222.