

HIV-1 反式转录激活因子介导的脂质体在脊髓损伤大鼠体内分布的靶向性

魏志坚¹, 冯世庆¹, 张大鹏¹, 王颖¹, 赵鹏¹, 焦新旭¹, 常津², 王汉杰²

(1 天津医科大学总医院骨科 300052 天津市; 2 天津大学材料学院纳米生物技术研究所 300072 天津市)

【摘要】目的:探讨 HIV-1 反式转录激活因子(trans-activator transcription, TAT)介导的脂质体作为药物载体在脊髓损伤大鼠体内分布的靶向性。**方法:**构建 HIV-1 TAT 介导的纳米脂质体, 外接异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)作为标记。取 8 周龄雌性 Wistar 大鼠 60 只, 随机分为 2 组, 每组 30 只, 每组分为未损伤、伤后 24h 及伤后 1 周 3 个时间点, 每个时间点各 10 只。每组 20 只采用 Impactor Model II 打击建立 T10 脊髓损伤模型。I 组每个时间点尾静脉注射外接 TAT 的脂质体(9 μ g/ml, 500 μ l), II 组尾静脉注射不接 TAT 的脂质体(9 μ g/ml, 500 μ l)。注射后 1h 取出 T7~L1 节段脊髓组织, 冰冻组织切片暗视野下观察脂质体在脊髓组织中的分布情况。**结果:**I 组未损伤、伤后 24h 及伤后 1 周均在脊髓内部观察到 FITC 标记的脂质体, 但未损伤脊髓中脂质体未进入神经元, 伤后 24h 及伤后 1 周脂质体在损伤中心神经元中聚集, 伤后 24h 距离损伤中心近端 1.5cm 处和远端 1.5cm 处神经元中脂质体的 FITC 荧光平均光密度(AOD)明显小于损伤中心($P<0.05$)。II 组在未损伤脊髓及伤后 1 周脊髓损伤中心区未观察到脂质体, 伤后 24h 在脊髓损伤中心区观察到脂质体在神经元中聚集。两组伤后 24h 脊髓损伤中心 AOD 比较无统计学差异($P>0.05$)。**结论:**外接 TAT 的脂质体可以穿过大鼠正常的血脊髓屏障进入脊髓内部, 并且具有进入受损脊髓组织神经元的靶向特异性。

【关键词】脊髓损伤; 脂质体; 血脊髓屏障; 靶向; 大鼠

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2010.09.17

中图分类号: R683.2, R965.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2010)-09-0771-05

Distribution targeting of HIV-1 trans-activator transcription mediated liposomes following spinal cord injury in rats/WEI Zhijian, FENG Shiqing, ZHANG Dapeng, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2010, 20(9): 771~775

【Abstract】 Objective: To investigate the in vivo distribution targeting of HIV-1 trans-activator transcription (TAT)-mediated liposomes as drug carriers in rats. **Method:** HIV-1 TAT-mediated nanoliposome connected with fluorescein isothiocyanate (FITC) acting as a marker were constructed. 60 female Wistar rats (8 week) were randomly divided into 2 groups with 30 animals in each group, 3 subgroups ($n=10$) of each group were determined as no damage, 24h and 1 week after injury. T10 spinal cord injury models were established by Impactor Model II. Group I were administered with tail-vein injection of external TAT liposomes (9 μ g/ml, 500 μ l) at each time point; group II with tail-vein injection of liposomes alone (9 μ g/ml, 500 μ l). 1h after injection, the T7-L1 spinal cord specimen were harvested and observed under dark field microscopy for liposome distribution in spinal cord. **Result:** FITC-liposomes were observed in the spinal cord in group I at 3 time points, but liposomes in intact spinal cord did not enter the neuron. At the time points of 24h and 1 week after injury, liposomes aggregation were noted in injury center inside neurons. 24h after injury, FITC fluorescence average optical density (AOD) in neurons liposomes 1.5cm proximal and distal to injury centers were significantly less than in injury center ($P<0.05$). While in group II, liposomes were not observed in the center of spinal cord injury at preinjury and 1 week after injury, and liposome aggregation were observed in neurons in the center of injury site 24h after injury. AOD at center of injury site 24h after injury showed no significant difference between two groups ($P>0.05$). **Conclusion:** The external TAT liposomes can cross the normal

基金项目:国家自然科学基金(30872603)、天津市卫生局科技重点基金(07KG2)、天津市卫生局科研基金(09KZ104)

第一作者简介:男(1984-), 硕士研究生, 研究方向: 脊柱脊髓损伤

电话: (022)60363936 E-mail: weizhijian2002@126.com 通讯作者: 冯世庆 E-mail: fengsq321@sina.com

blood and spinal cord barrier, which shows damaged neurons targeting characteristics.

[Key words] Spinal cord injury; Liposomes; Spinal cord barrier; Targeting; Rat

[Author's address] Department of Orthopaedics, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin, 300052, China

严重脊髓损伤(SCI)可导致不可逆的运动及感觉功能障碍。随着技术的发展,更多新的治疗脊髓损伤的大分子药物及具有治疗作用的基因应运而生,但由于血脊髓屏障的存在,使得这些大分子物质无法进入损伤的脊髓内部起到治疗作用^[1]。纳米高分子材料载体,具有靶向运载药物的作用,以往研究证实其能够介导大分子物质穿越血脑屏障^[2]。本研究探讨由 HIV-1 反式转录激活因子(trans-activator transcription, TAT)介导的脂质体对血脊髓屏障的穿透能力及其对受损脊髓组织神经元的靶向性作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物、主要试剂及仪器

健康雌性 Wistar 成年大鼠 60 只, 8 周龄, 体重 220 ± 10 g, 中国医学科学院放射医学研究所提供。异双功能 $H_2N-PEG-COOH$ (PEG: Mn 5000) (Nektar, USA); TAT (吉尔生化有限公司); 壳聚糖(脱乙酰化 >99%, Mn 5×10^4) (青岛海普生物技术有限公司); Impactor Model II 打击器, 超净工作台(天津医药设备厂); CO_2 培养箱(NAPCO 5410, USA); 荧光倒置显微镜 (OLYMPUS BX-60, Japan); 恒温冰冻切片机(LEUCER, USA)。

1.2 脂质体的制备及表征分析

采用反相蒸发法制备脂质体。用羧甲基壳聚糖十八烷基季铵盐(octadecyl quaternized carboxymethyl chitosans, OQCMCs)及胆固醇形成稳定的双层膜结构, 制备出阳离子高聚物脂质体。脂质体表面连接聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)作为脂质体的膜稳定剂。分别构建外接 HIV-1 TAT 和不连接 TAT 的两种脂质体颗粒。构建完成后使用透射电子显微镜观察脂质体形状, 激光粒度仪和 Zeta 电位仪测定脂质体粒径和 Zeta 电势。脂质体均外接异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)进行示踪。其中 FITC、TAT、PEG 均通过 N-琥珀酰亚胺 3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)相连接。

1.3 动物分组及 SCI 模型制作

60 只大鼠随机分为 2 组, 每组 30 只, 每组分

为未损伤、伤后 24h 及伤后 1 周共 3 个时间点, 每个时间点 10 只。每组 20 只大鼠用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉(0.35ml/100g)后, 取俯卧位, 固定在手术台上, 常规备皮、消毒, 以 T10 为中心纵行切开背部皮肤及皮下组织, 剥离两侧椎旁肌, 暴露并咬除 T10 棘突及椎板, 显露硬膜。应用 Impactor Model II 脊髓打击器 10g 重量从 25mm 高度自由落体打击, 大鼠立即出现一过性鼠尾摆动和后肢痉挛。操作中均未出现硬脊膜破裂。逐层缝合肌肉、筋膜和皮肤, 术后 1 周内肌注青霉素(每日两次, 每次 20 万单位)。I 组大鼠每个时间点尾静脉注射外接 TAT 的脂质体, II 组大鼠每个时间点尾静脉注射不接 TAT 的脂质体, 脂质体定量为实验安全剂量, 终浓度为 $9 \mu\text{g/ml}$, 每只注射 $500 \mu\text{l}$ 。

1.4 脂质体分布检测

注射完脂质体之后的大鼠平静放置 1h, 用 10% 水合氯醛溶液腹腔注射麻醉, 剪开胸腔, 暴露心脏, 经左心室插入导管至升主动脉, 剪开右心房; 先快速灌注生理盐水约 200ml, 再灌注 4°C 4% 多聚甲醛磷酸盐缓冲液 500ml, 其中前 1/3 量快速灌注, 后 2/3 量慢灌注。随即取 T7~L1 脊髓节段, 于后固定液(4°C 4% 多聚甲醛磷酸盐缓冲液)中固定 12h, 0.1M pH 值 7.4 的 PBS 彻底冲洗, 逐级脱水, 石蜡包埋, 垂直脊髓纵轴连续 $5 \mu\text{m}$ 石蜡切片。每组每个时间点每只大鼠随机抽取损伤中心 5 张切片, 另外外接 TAT 组伤后 24h 在损伤中心远端与近端再各随机抽取 5 张切片, 使用荧光倒置显微镜, 激发光波长 490~520nm, 直接观察连接 FITC 的脂质体暗视野下在组织中的聚集情况。应用 Image pro plus 6.0 软件进行图像分析, 分析对象为镜下 FITC 荧光的平均光密度(average optical density, AOD), 每张切片随机抽取灰质内 3 个不连续视野进行测量, 结果取所得 AOD 的平均值。

1.5 统计学方法

用 SPSS 16.0 软件包进行统计学分析。数据以均数 $\pm$ 标准差表示, 同一时间组间 AOD 值比较采用两组独立样本资料的 t 检验, $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 脂质体表征分析

制备的脂质体用激光粒度仪测定其粒径约为 15.5nm, Zeta 电势高达 38.22mV。透射电镜观察, 脂质体粒径大约为 15nm, 与粒径仪所测结果类似, 粒子呈球形, 分布比较均匀, 分散性较好, 几乎没有发生团聚现象(图 1)。

2.2 大鼠脊髓中脂质体分布情况

外接 TAT 组在倒置荧光显微镜下观察, 未损伤、伤后 24h 及伤后 1 周脊髓内部均可见 FITC 标记的脂质体, 未损伤时外接 TAT 脂质体在脊髓血管处聚集, 并且在脊髓组织内部可见 FITC 荧光(图 2a), 提示脂质体穿越血脊髓屏障, 进入脊髓内部, 荧光主要分布于血管周边及接近血管的白质组织, 灰质中神经元未见明显颗粒聚集; 伤后 24h, 可见外接 TAT 脂质体不仅进入脊髓实质内部, 并且在神经元内聚集(图 2b), 高倍镜可见脂质体围绕细胞核分布, 细胞核不着色(图 2c), 提示脂质体不能进入核膜; 伤后 1 周外接 TAT 脂质体在脊髓内分布情况与伤后 24h 类似(图 2d)。尽管脊髓未损伤与损伤后 1 周血脊髓屏障都保持完整, 但外接 TAT 的脂质体只在有炎症损伤的脊髓组织中的神经元内聚集, 正常脊髓中只在血管周围的非实质组织中存在 FITC 荧光。在伤后 24h 脊髓连续横切片中, 远离损伤中心的荧光 AOD 值明显降低, 神经元中的脂质体越来越少, 其中损伤中心 AOD 值为 41.07 ± 9.47 , 近端 1.5cm 处为 21.56 ± 8.97 , 远端 1.5cm 处为 17.87 ± 13.44 , 远近端 AOD 值与损伤中心比较均有统计学差异 ($P < 0.05$)。

未接 TAT 组未损伤时在脊髓组织中不能观察到未接 TAT 的脂质体, FITC 荧光阴性(图 3a), 提示未接 TAT 的脂质体无法穿越正常血脊髓屏障; 伤后 24h 镜下可见未接 TAT 脂质体聚集于脊髓神经元内(图 3b), 分布与外接 TAT 组伤后 24h 情况相似(图 3c); 伤后 1 周未能在脊髓内观察到未接 TAT 脂质体的分布(图 3d), 提示修复的血脊髓屏障阻止未接 TAT 脂质体进入脊髓实质内部。

未接 TAT 组伤后 24h 及外接 TAT 组各时间点脂质体 FITC 荧光的 AOD 值见表 1。伤后 24h 两组脂质体均进入脊髓组织内部, 两组脂质体 FITC 荧光 AOD 值比较无统计学差异 ($P > 0.05$)。外接 TAT 组脊髓未损伤时 AOD 值明显小于伤后

24h 和伤后 1 周 ($P < 0.05$), 伤后 1 周与伤后 24h 比较无统计学差异 ($P > 0.05$)

3 讨论

3.1 外接 HIV-1 TAT 脂质体的表征分析

脂质体作为一种药物的载体, 使得药物具有生物功能、靶向功能和治疗功能, 拥有巨大的应用前景。然而目前的脂质体大都有着许多不可避免的缺点, 例如体内循环时间短, 物理和化学稳定性不足, 囊泡表面缺少靶向位点及脂质体水溶液中分散性不好等^[3]。本研究使用的脂质体为天津大学提供的阳离子脂质体, 使用十八烷基三甲基氯化铵对羟甲基壳聚糖进行改造, 制备羟甲基十八烷基季铵盐, 并用其代替合成磷脂来制备低成本高稳定性的高聚物脂质体。其具备以下特点: (1) 使用羟甲基壳聚糖作为骨架材料替代磷脂, 在制备上极大简化了步骤, 降低了成本, 更为重要的是, 有研究发现^[4]壳聚糖具有与细胞膜磷脂双分子层结构特异性结合的靶向性能, 使得这种脂质体能够仅作用于损伤的细胞, 从而减少将来脂质体的用量, 减少毒性, 增加局部浓度; (2) 合成的脂质体粒径大约 15nm, 粒子呈球形, 分布均匀, 几乎没有发生团聚, 好的分散性主要是由于高聚物脂质体表面含有大量的季铵基团, 呈正电性, 各个粒子之间由于带同种电荷而产生相互排斥作用, 小的粒径能够使脂质体更容易穿越损伤后狭小的缝隙及破损的细胞膜结构; (3) Zeta 电位可达到 38.22mV, 说明脂质体表面存在大量亲水性季铵基团, 两亲性高聚物形成一种稳定的双层膜结构, 小分子胆固醇镶嵌在双层膜内起稳定作用。脂质体表面含有大量的季铵基团而呈正电性, 高的正电性使得脂质体更加易于与表面带负电荷的细胞膜结合, 增强作为高效药物载体的跨膜能力。

3.2 HIV-1 TAT 作用

TAT 是一种由 86 个氨基酸组成的多肽, 它对于 HIV-1 病毒复制起着重要作用。有研究证明^[5], TAT 可高效通过细胞膜发挥生物学效应, 在体外实验中达到最大生物学作用时仅需 5min, 而且低温并不影响它的作用, 为人们提供了一种可行的细胞膜转导途径。实验证明它可以穿越生物膜屏障如血脊髓屏障 (blood-spinal cord barrier, BSCB), 它的膜穿透特性主要由其中的一小段肽链(第 47-57 位的氨基酸残基)决定, 即核心肽

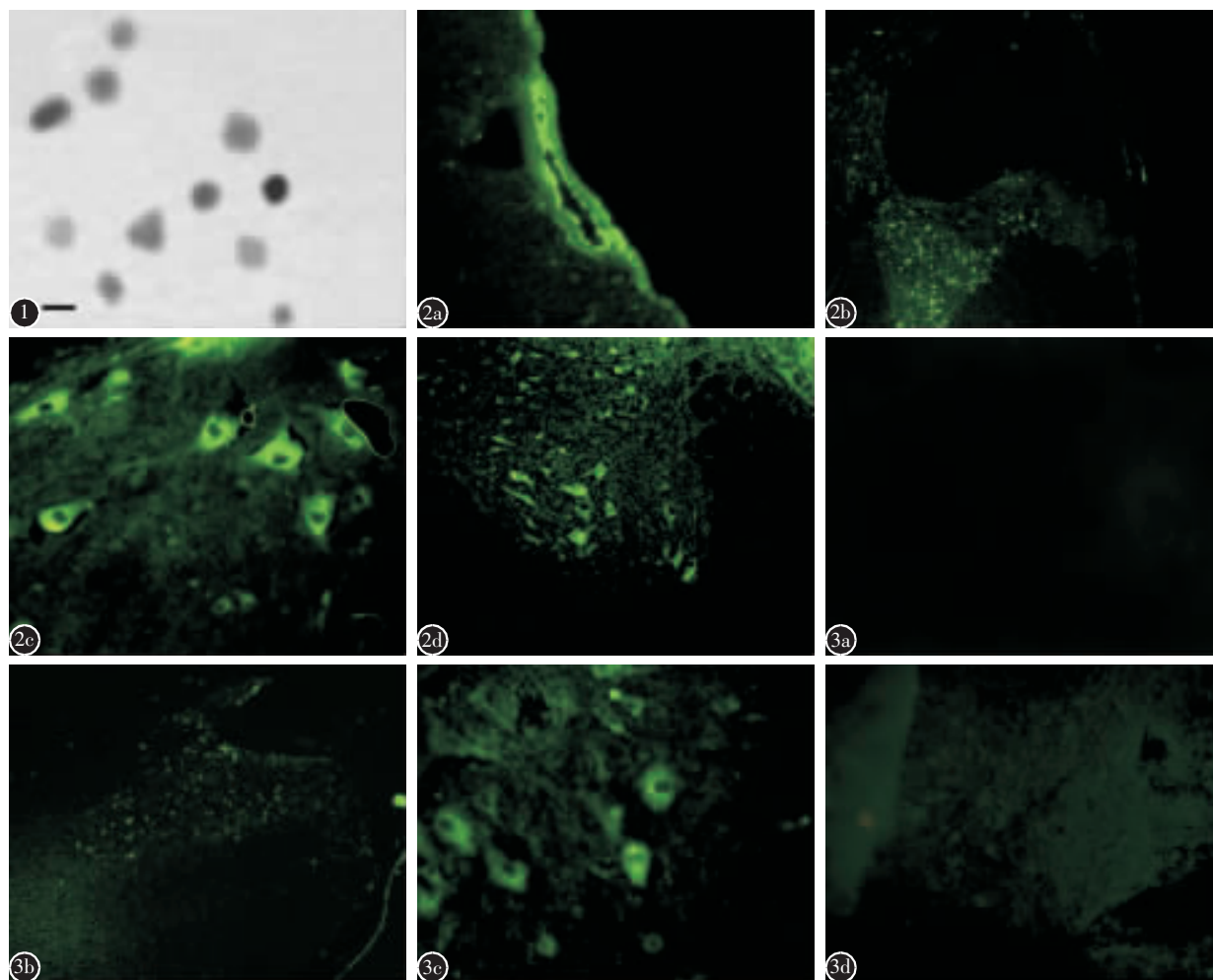


图 1 透射电镜下可见外接 TAT 的脂质体呈球形,分散性良好,粒径为 15nm 左右(bar=10nm) **图 2** 外接 TAT 组各时间点荧光显微镜观察大鼠脊髓中脂质体分布情况 **a** 未损伤时可见脂质体所接的 FITC 荧光在脊髓表面血管周围细胞中大量出现,且在脊髓实质中可见到散在的 FITC 荧光($\times 200$) **b** 伤后 24h 可见 FITC 标记的脂质体均聚集在脊髓内部,灰质中分布较多($\times 100$) **c** 伤后 24h 可见 FITC 标记的脂质体大量聚集在神经元胞体内,围绕细胞核分布,但未能进入细胞核($\times 400$) **d** 伤后 1 周可见脊髓后角神经元胞体内大量 FITC 标记的脂质体($\times 200$) **图 3** 未接 TAT 组各时间点荧光显微镜观察大鼠脊髓中脂质体分布情况 **a** 未损伤时在脊髓相应部位未见明显血管周围荧光聚集,且脊髓组织内部无 FITC 荧光出现 **b** 伤后 24h 可见 FITC 标记的脂质体聚集在脊髓内部,灰质中分布较多($\times 100$) **c** 伤后 24h FITC 标记的脂质体大量聚集在神经元胞体内,围绕细胞核分布,但未能进入细胞核($\times 400$) **d** 伤后 1 周末接 TAT 的脂质体无法穿越血脊髓屏障,脊髓组织内无明显 FITC 荧光($\times 200$)

表 1 两组大鼠不同时间点脊髓中脂质体平均光密度(AOD)值

	未损伤	伤后 24h	伤后 1 周
未接 TAT 组	—	33.06 $\pm$ 4.27	—
接 TAT 组	23.81 $\pm$ 3.34	41.07 $\pm$ 9.47 ^{①②}	46.28 $\pm$ 5.03 ^{②③}

注:①与同一时间点未接 TAT 组比较 $P>0.05$,②与同组未损伤比较 $P<0.05$,③与同组伤后 24h 比较 $P>0.05$

链。TAT 多肽本身具有细胞核趋向性,可以在细胞核中聚集。最近 Nitin 等^[6]也证明 TAT 多肽修饰

不同粒径的纳米颗粒(最大 90nm)后,可以使颗粒快速进入活细胞的细胞核内。当脂质体(粒径为 200nm)^[7]与 TAT 连接时,它可以介导脂质体穿过细胞膜(孵育 1h),但脂质体只能聚集在细胞核周围(孵育 2h),不能进入细胞核内,经过 9h 后脂质体崩解并将内容物释放到细胞浆中,这可能与脂质体过大不能穿过核膜有关。这也为以脂质体为载体将药物释放到细胞浆内提供了一种可能的方法。Liu 等^[2]采用自组装 TAT-PEG-b-Chol,成功将环丙沙星吸附于纳米载体上,通过扫描电子显微

镜检测显示其平均直径小于 200nm, 注射入大鼠尾静脉后检测发现, TAT 修饰的纳米颗粒摄取明显多于未修饰 TAT 的纳米颗粒, 说明 TAT 在载体穿越血脑屏障的过程中起到了重要的作用。本研究证实了未接 TAT 的脂质体不能穿越正常和伤后恢复的血脊髓屏障, 而外接 TAT 的纳米颗粒能够穿越血脊髓屏障, 进入脊髓损伤区神经元, 具有作为治疗脊髓损伤的药物载体的应用价值, 特别是一些需要跨越血脊髓屏障或胞内起作用的药物。

3.3 外接 TAT 纳米脂质体的靶向性

注射入体内的脂质体在血液循环中会被选择性摄取, 这就决定了脂质体的靶向性。Jeffery 等^[8]的研究发现, 纳米颗粒能够以一种“被动靶向”的方式离开血液循环, 集中在损伤神经附近。另外, 最近 Cho 等^[9]证实, 壳聚糖作为一种膜稳定剂, 在脊髓损伤后具有神经膜保护作用, 更重要的是其具有在受损伤部位神经元中聚集的靶向性作用, 实验动物损伤脊髓局部注射外接荧光素的壳聚糖, 发现损伤组损伤脊髓组织中荧光密度远大于空白对照组。关于细胞脂质双分子层和壳聚糖的相互作用问题, Fang 等^[10]研究证实, 损伤后的细胞膜双分子层结构能和更多的壳聚糖接触, 增强之间的疏水分子聚合力。本研究中所使用的脂质体, 其基本骨架结构就是壳聚糖构成的类似细胞膜结构的双分子层, 观察正常大鼠和脊髓损伤大鼠脊髓组织中脂质体的聚集情况发现, 脂质体尽管可以穿过血脊髓屏障, 但是只分布于正常脊髓中的非实质部位, 灰质神经元中未发现; 而在损伤大鼠, 我们使用未接 TAT 的脂质体作为一种验证血脊髓屏障完整的物质, 证明了在伤后 1 周血脊髓屏障在某种程度上的恢复, 以此来排除血脊髓屏障在靶向性上的干扰作用, 证明了即使伤后血脊髓屏障完好, 但由于有损伤后炎症的持续作用, 脂质体均能在神经细胞内广泛聚集, 表现出对伤后神经组织的靶向性。对伤后 24h 大鼠脊髓进行连续横切发现远离损伤中心的脊髓组织中脂质体含量很少, 但暂时无法证实 TAT 的作用与壳聚糖在靶向性方面有重叠, 因为血脊髓屏障的干扰作用

的存在, 接 TAT 组和未接 TAT 组未见明显的区别, 或许 TAT 在促进脂质体在受损神经元中集中方面具有协调作用, 有待进一步研究探索。

本研究证明了 TAT 介导的脂质体可穿过正常的血脊髓屏障进入脊髓内部, 并且具有进入受损脊髓组织神经元的靶向特异性, 为其成为装载治疗脊髓损伤药物的载体提供了可行性依据。

4 参考文献

1. Garbuzova-Davis S, Haller E, Saporta S, et al. Ultrastructure of blood-brain barrier and blood-spinal cord barrier in SOD1 mice modeling ALS[J]. Brain Research, 2007, 1157: 126-137.
2. Liu L, Guo K, Lu J, et al. Biologically active core/shell nanoparticles self-assembled from cholesterol-terminated PEG-TAT for drug delivery across the blood-brain barrier[J]. Biomaterials, 2008, 29(10): 1509-1517.
3. Torchilin VP. Passive and active drug targeting: drug delivery to tumors as an example [J]. Handb Exp Pharmacol, 2010, (197): 3-53.
4. Fang N, Chan V. Chitosan-induced restructuration of a mica-supported phospholipid bilayer: an atomic force microscopy study[J]. Biomacromolecules, 2003, 4(6): 1596-1604.
5. Said Hassane F, Saleh AF, Abes R, et al. Cell penetrating peptides: overview and applications to the delivery of oligonucleotides[J]. Cell Mol Life Sci, 2010, 67(5): 715-726.
6. Nitin N, LaConte L, Rhee WJ, et al. Tat peptide is capable of importing large nanoparticles across nuclear membrane in digitonin permeabilized cells [J]. Ann Biomed Eng, 2009, 37(10): 2018-2027.
7. Torchilin VP. Fluorescence microscopy to follow the targeting of liposomes and micelles to cells and their intracellular fate [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2005, 57(1): 95-109.
8. Jeffery ND, McBain SC, Dobson J, et al. Uptake of systemically administered magnetic nanoparticles in areas of experimental spinal cord injury [J]. J Tissue Eng Regen Med, 2009, 3(2): 153-157.
9. Cho Y, Shi R, Borgens RB. Chitosan produces potent neuroprotection and physiological recovery following traumatic spinal cord injury [J]. J Exp Biol, 2010, 213(9): 1513-1520.
10. Fang N, Chan V, Mao HQ, et al. Interactions of phospholipid bilayer with chitosan: effect of molecular weight and pH[J]. Biomacromolecules, 2001, 2(4): 1161-1168.

(收稿日期: 2010-06-07 修回日期: 2010-08-03)

(英文编审 蒋欣/郭万首)

(本文编辑 李伟霞)