

用于肿瘤治疗的线粒体靶向配体和 纳米载体递释系统研究进展

刘云虎 孙 涛

(复旦大学 药学院, 上海 201203)

摘 要 作为人体细胞中的重要能量来源,线粒体对肿瘤的发生与发展有重要作用.将抗癌药物靶向递送至线粒体具有较高的研究价值.目前主流的两种实现方法包括线粒体靶向配体-药物缀合物和线粒体靶向的纳米载体递释系统.对两种方法中使用的线粒体靶向配体和纳米载体的研究现状进行了综述.

关键词 肿瘤;线粒体靶向;纳米载体

中图分类号 R943

文献标识码 A

0 引言

线粒体作为活细胞中的“能量工厂”,通过三羧酸循环、氧化磷酸化和电子传递等过程产生 ATP.同时,线粒体也介导细胞中许多重要的信号通路.在能量缺乏、氧化应激或其他条件下,线粒体通过释放细胞色素 C 介导细胞凋亡信号通路.细胞色素 C 通过膜电位的降低、线粒体通透性转换孔道的开放等方式被释放到细胞质,随后与半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-9 前体蛋白形成凋亡小体并激活半胱天冬酶-9.被激活的半胱天冬酶-9 能继而激活半胱天冬酶-3 等其他半胱天冬酶,引发细胞凋亡^[1].由于对细胞产能和凋亡有重要调控作用,线粒体成为肿瘤治疗的重要靶点^[2].

相对于正常细胞,癌细胞的线粒体结构和功能存在一些变化,例如线粒体跨膜电位相对正常细胞有所增加、线粒体三磷酸腺苷(Adenosine triphosphate, ATP)生成能力受损和活性氧(Reactive oxygen species, ROS)生成异常增加等.因此,对于一些作用于直接与线粒体相互作用或通过影响线粒体功能以改变细胞代谢的药物,这些差异的存在可能为其提供了优先靶向肿瘤细胞的生物学基础^[2].例如线粒体跨膜电位的增加使一些线粒体靶向化合物能够优先累积在癌细胞线粒体;由于 ATP 与 ROS 的异常生成,癌细胞线粒体更容易发生功能障碍和线粒体 DNA 突变,这使得部分作用于线粒体的抗癌药物对可能对癌细胞具有更大的杀伤性等等.所以药物的线粒体靶向递送可能对增强其对肿瘤细胞的选择性具有一定价值.此外,已知许多抗癌药物(阿霉素、顺铂、紫杉醇、白藜芦醇和卞啉衍生物等)可在线粒体被激活^[3].因此,增强抗癌药物在线粒体的靶向积累将有助于提高治疗效果,并有可能克服耐药性问题.综上所述,将抗癌药物的线粒体靶向递送策略具有较高的研究价值.

目前实现药物的线粒体靶向递送主要有两种方法:用线粒体靶向配体与药物直接缀合,或是通过具有线粒体靶向功能的纳米载体进行药物递送.分别对用于抗癌药物缀合的线粒体靶向配体和用于线粒体靶向递药的纳米载体的研究现状进行了综述.

收稿日期:2019-09-01

基金项目:国家自然科学基金项目(21602030)资助

通讯作者:孙涛,男,汉族,博士,副教授,研究方向:功能导向的分子设计靶向递药策略、分子设计应用于靶向递药,E-mail:sunt@fudan.edu.cn.

1 用于肿瘤治疗的线粒体靶向配体

将线粒体靶向配体与药物直接缀合是实现药物的线粒体靶向递送的一种思路. 其中常用的线粒体靶向配体包括三苯基膦(Triphenyl phosphonium, TPP)、地喹氯铵(Dequalinium, DQA)、F16、胍盐、罗丹明 19、罗丹明 123、线粒体穿透肽(Mitochondrial penetrating peptide, MPPs)等等. 它们中的大多数都是离域亲脂性阳离子(Delocalization lipophilic cation, DLCs), 这些配体的脂溶性使其能够穿过细胞膜和线粒体膜, 同时其所带的正电荷使其在线粒体膜电位作用下进入线粒体基质, 使其具有线粒体靶向效应. 又因癌细胞和转化细胞的线粒体比正常细胞具有更高的跨膜电位, 离域亲脂性阳离子可优先在癌细胞线粒体中积累^[3].

线粒体靶向配体与药物直接缀合的优点是能使药物更加精准地靶向递送至线粒体. 但线粒体靶向配体-药物缀合物一般具有水溶性不佳的问题, 且一些线粒体靶向配体具有细胞毒性. 线粒体靶向配体直接与药物缀合还有可能会影响药物的化学活性^[3].

1.1 三苯基膦(Triphenylphosphonium, TPP)

三苯基膦是应用最广泛的线粒体靶向亲脂性阳离子配体, 它由一个带正电荷的磷离子和三个苯环连接而成, 后者使其具有较大的脂溶性. 三苯基膦曾经用于线粒体膜电位的测量, 其行为和与线粒体的相互作用已经非常明确^[4]. 膜电位每升高 60 mV, TPP 在膜负电位侧的相对浓度就增加 10 倍. 细胞质膜的膜电位通常在 -60 至 -30 mV 之间, 这使细胞内外 TPP 浓差达 10 倍; 线粒体膜电位则一般低至 -180 mV, 这又使线粒体内 TPP 累积高达 1000 倍. TPP 作为线粒体靶向配体, 相对于其他小分子线粒体递送方法具有如下优势: TPP 在生物系统中较稳定, 兼具亲水性和亲脂性, 合成与纯化相对简单, 对细胞组分的化学反应性低, 且在可见光和近红外光谱区域中无光吸收或荧光发射^[5]. 下面对一些使用 TPP 作为为线粒体靶向配体与抗癌药物缀合的实例进行了介绍.

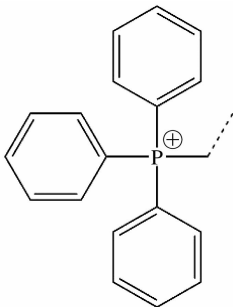


图 1 三苯基膦结构

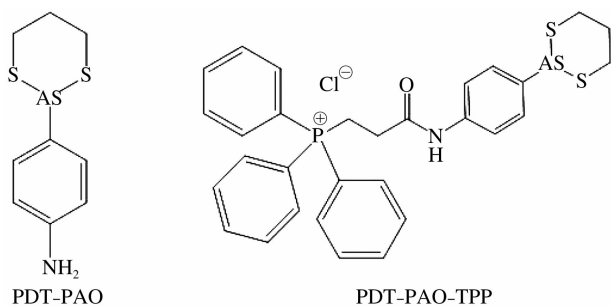


图 2 PDT-PAO、PDT-PAO-TPP 结构

Fan 及其团队设计并合成了线粒体靶向前体 PDT-PAO-TPP^[6]. PDT-PAO 是一种有机砷(图 2), 其对白血病、淋巴瘤和实体瘤有一定抗癌功效^[7]. 将之与 TPP 缀合, 在细胞毒筛选中, 相对 PDT-PAO, PDT-PAO-TPP 显示出对 NB4 细胞更好的抑制能力. PDT-PAO 对 NB4 细胞的半抑制浓度(IC₅₀)为 1.25±0.02 (24 h)和 0.82±0.15(48 h), 而 PDT-PAO-TPP 对 NB4 细胞的 IC₅₀为 0.65±0.05(24 h)和 0.51±0.01(48 h), 低于 PDT-PAO. 研究证实大部分 PDT-PAO-TPP 在线粒体中积累, 并可诱导线粒体去极化. 此外, PDT-PAO-TPP 对丙酮酸脱氢酶复合物(PDHC)和呼吸链复合物具有双重抑制作用, 能介导细胞色素 C 的释放和激活胱天蛋白酶依赖性 ROS 介导的细胞凋亡. 另外, Zhu Z Z 及其团队用-CH₂Ph₃P⁺修饰 Pyriplatin 设计了三种单功能线粒体靶向的 PtII 复合物 OPT, MPT 和 PPT. (图 3)^[8]单官能 PtII 复合物 Pyriplatin 此前

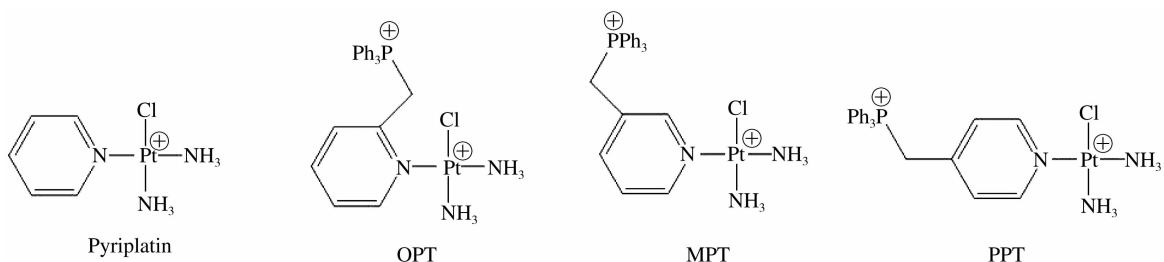


图 3 Pyriplatin、OPT、MPT、PPT 结构

被报道具有抗肿瘤活性^[9]. 进一步研究证明这三种复合物均可穿透线粒体并在线粒体基质中积累. 其中

OPT 对小鼠 A549 肺癌细胞具有最高的细胞毒性,在相同条件下,OPT 对 A549 细胞处理 48 h 的 IC_{50} 为 8.7 ± 1.6 ,远远低于 Pyriplatin(125.5 ± 5.8),且低于顺铂(12.6 ± 1.1).

对肺癌异种移植瘤小鼠,OPT 注射 19 d 后,肿瘤体积增长低于注射生理盐水或顺铂的对照组.研究其在小鼠中的组织分布发现,相比正常肺组织,OPT 在肿瘤组织中的积累量提高近 1.5 倍,而顺铂则不具有该肿瘤组织靶向性.

1.2 地喹氯铵(Dequalinium, DQA)

地喹氯铵由两个阳离子喹啉基团经 10 个碳的烷基链连接而成,是一种离域的亲脂性阳离子分子,具有线粒体靶向定位效应.该化合物在体外能够抑制多种癌细胞系的增殖,在体内亦具有抗肿瘤活性^[10,11].研究表明其能诱导 ROS 的产生、抑制 ATP 的合成,导致线粒体膜电位的下降,造成细胞色素 C 的释放,激活半胱天冬酶-9/半胱天冬酶-3 依赖性的内源性细胞凋亡途径^[12].部分研究使用了地喹氯铵与抗肿瘤药物多柔比星(Doxorubicin, DOX)的缀合物 DQA-DOX 以实现多柔比星的线粒体靶向递送,其在 MCF-7/ADR 细胞中主要积累在线粒体,且对 MCF-7/ADR 展现出高细胞毒性^[13].

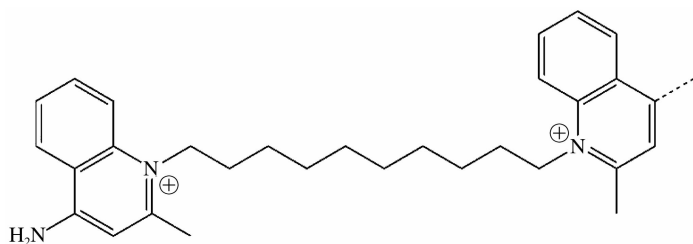


图 4 地喹氯铵结构

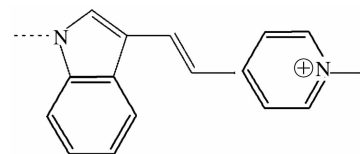


图 5 F16 结构

1.3 (E)-4-(1H-咪唑-3-基乙烯基)-N-甲基吡啶碘化物(F16)

F16 作为一种离域亲脂性阳离子配体,具有线粒体靶向定位效应.它最初通过细胞水平的高通量筛选被发现,这种小分子能够选择性抑制乳腺上皮细胞,神经过度表达细胞以及多种小鼠乳腺肿瘤和人乳腺癌细胞系的增殖^[14].F16 本身具有细胞毒性,其在线粒体的累积会引起线粒体膜的去极化,破坏线粒体结构的完整性,导致线粒体通透性转换孔道的开放,随后造成细胞色素 C 的释放,促使细胞凋亡^[14].将其作为线粒体靶向配体的实例包括 He H 及其团队所报道的研究^[15].该研究将 F16 和广泛使用的硼二吡咯亚甲基荧光染料(Boron-dipyrromethene, BODIPY)通过苯乙炔基接头进行结合,制成了具有光学监测能力和选择性抗癌活性的双功能线粒体靶向抗癌剂 FPB(图 6).细胞毒筛选显示,FPB 对 SGC-7901 细胞的 IC_{50} 比其不含 BODIPY 的前体 F16-Ph-Ace 低 5 倍,这说明硼二吡咯甲烷(游离形态时无明显毒性)可能在 FPB 对细胞毒性起特殊作用.

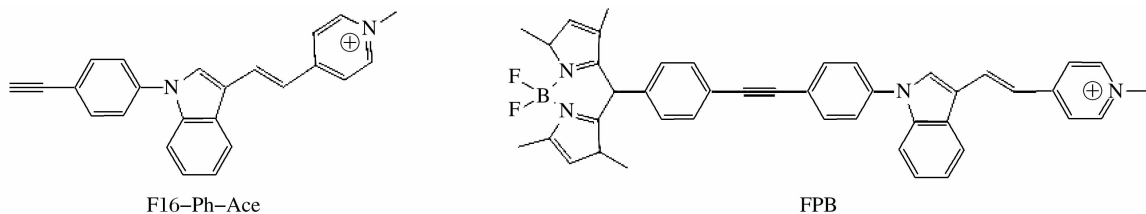


图 6 FPB 及其前体结构

1.4 胍/双胍(Guanidine/Biguanidine)

胍和双胍都是离域亲脂性阳离子配体,其具有离域正电荷,因此比带有定域电荷的基团表现出更强的亲脂性.有研究指出基于两亲性阳离子喹啉的光敏剂与胍和双胍单位缀合能够提高其线粒体靶向定位效果与光毒性^[16].该研究亦指出胍基团的存在可使胍-喹啉结合物发生溶酶体逃逸,其机制可能为质子海绵效应引起的溶酶体膜破裂^[16].

1.5 罗丹明(Rhodamine)

罗丹明 123 作为一种荧光染料曾被用于测量线粒体膜电位^[17].因为具有亲脂性和阳离子特性,它能在膜电位的驱动下穿过线粒体内膜,并在线粒体基质中积累.罗丹明 123 在动物肿瘤模型中表现出选择

性抗癌活性,这种选择性的细胞毒性还可通过联用 2-脱氧葡萄糖或甲基乙二醛双脒基脲进一步增强^[18-20].但在相关临床实验中,罗丹明 123 的最大耐受剂量较低,而被认为无法满足治疗的需求^[21].

与罗丹明 123 类似的罗丹明 19 被认为是一个潜在的线粒体靶向定位基团.用罗丹明 19 取代 TPP-药物缀合物上的 TPP,新的缀合物表现良好的线粒体靶向定位性,证明罗丹明 19 具有良好的线粒体定位能力^[22].

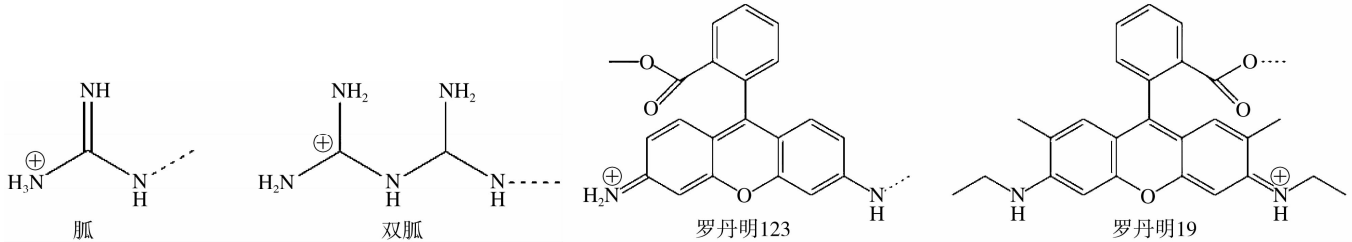
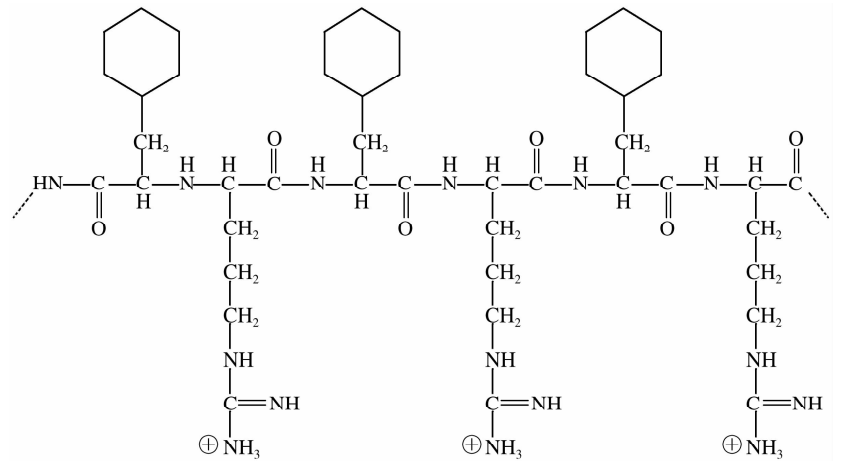


图 7 胍、双胍结构

图 8 罗丹明 123、罗丹明 19 结构

1.6 线粒体穿透肽(Mitochondria-penetrating peptide, MPPs)

线粒体穿透肽是一般具有重复的亲脂残基和阳离子残基的、具有线粒体通透性的短肽,例如(L-环己基丙氨酸-D-精氨酸)₃,即(Fx,r)₃,其由重复的亲脂残基环己基丙氨酸和阳离子残基精氨酸构成.线粒体膜电位驱动摄取是该线粒体穿透肽的主要线粒体导向机制.线粒体穿透肽作为线粒体靶向辅基具有合成简单、衍生物容易制备及生物相容性好等优点^[23].在针对其与多柔比星(Doxorubicin, Dox)缀合形成的肽-Dox 缀合物(mtDox)的研究中,发现相对游离 Dox, mtDox 在 A2780ADR 耐药细胞中显示出更强的活性^[24].该研究指出其机制可能与

图 9 (Fxr)₃ 结构

mtDox 的线粒体靶向性,以及 P-gp 转运蛋白结合位点的阻断有关.但在药物敏感细胞中,mtDox 的细胞毒性低于游离 Dox.

1.7 线粒体靶向序列(Mitochondria-targeting sequence, MTSs)

由于绝大多数线粒体蛋白的前体蛋白合成于胞浆核糖体,因此这些前体蛋白需要有能被线粒体表面受体识别的特定线粒体靶向信号序列,以完成线粒体靶向.这些序列一般具有 20-40 个氨基酸的长度.此前,MTSs 已被成功应用于一系列生物大分子的线粒体靶向递送,包括 DNA 和蛋白质等^[25,26].Wang 等将编码线粒体基质酶鸟氨酸氨甲酰化酶(OTC)前导肽的线粒体靶向序列(LFNLRILLNN AAFRNGHNFVVRN-FRCGQPLQNK)与来源于腺病毒的受体调节细胞内吞作用信号(CKKKKKKSEDEYPYVPN)连接,再以其修饰 3-氨基丙基三乙氧基硅烷改性磁性纳米粒子,以期通过纳米粒子的线粒体靶向来改善肿瘤纳米热疗的治疗效果^[27].实验结果表明,相对仅修饰受体调节细胞内吞作用信号的磁性纳米粒子(经纳米热疗后 HepG2 细胞存活率 72.35 ± 5.04%),修饰了受体调节细胞内吞作用信号和线粒体靶向序列的磁性纳米粒子细胞毒性明显提升(HepG2 细胞存活率 53.23 ± 4.48%).

2 用于肿瘤治疗的线粒体靶向纳米载体

虽然将线粒体靶向配体与抗癌药物直接缀合的策略起到了良好的线粒体定位效果,但这些缀合物在水溶性和生物相容性方面的缺陷使其距离临床应用还有一定距离.相比之下,使用纳米载体装载抗癌药物的策略具有生物相容性好,调节药物药代动力学特征,提高药物化学稳定性等优点,一些纳米载体还可以控制其运载药物在特定的靶点进行释放^[28].纳米载体可以通过与靶向配体相连接实现线粒体靶向,少数纳米载体

因为自身的特性而本身具有线粒体靶向能力.用于肿瘤治疗的纳米载体包括纳米颗粒、脂质体、胶束、树状大分子、碳纳米颗粒和金属纳米颗粒等.下面将分类进行讨论.

2.1 聚合物纳米颗粒与胶束

聚合物纳米颗粒由两亲聚合物组装而成,一般可在体内生物降解.其具有生物相容性高,体积小,载药量高,水溶性好,毒性低,且易于进行修饰等优点.一些聚合物纳米颗粒与胶束已经应用于线粒体靶向,包括聚乙二醇(Polyethylene glycol, PEG)、聚己内酯(Polycaprolactone, PCL)、壳聚糖、透明质酸、树枝状高分子和一些由小两亲分子形成的胶束等.下面介绍一些用于线粒体靶向药物递送聚合物纳米颗粒与胶束的实例.

Cho 及其团队报道了一种将三苯基膦连接在低分子量聚己内酯(Polycaprolactone, PCL)聚合物两端而制成的两亲多聚物 TPP-PCL-TPP(TPCL)^[29].该多聚物在水性介质中自组装形成 TPCL 纳米颗粒,该纳米颗粒由于本身表面所带的正电荷可能具有一定的细胞毒性.同时该纳米颗粒的平均直径为 100 nm,为合适的药物载体尺寸.疏水的多柔比星和亲水的盐酸多柔比星皆可被装载在该种纳米颗粒中.研究观察到了对比游离多柔比星,TPCL 纳米颗粒具有更佳的线粒体靶向能力,并使多柔比星的细胞毒性升高了 3-5 倍.

Liu 及其团队将氯尼达明(Lonidamine, LND)与 TPP 缀合,再将所得共聚物 TPP-LND 与 Dox 组装以形成 TPP-LND-Dox 纳米颗粒,最后用甲氧基聚乙二醇羧酸(mPEG-COOH)修饰其表面,使其表面呈电中性,以提高其稳定性^[30].该纳米颗粒不仅具有较高的载药量,还有 TPP 提供的良好的线粒体靶向性,LND 和 Dox 协同抗癌作用.该纳米颗粒与 Dox 耐药的 MCF-7/ADR 细胞孵育 48h 之后,细胞存活率低至 22.3%,而不具线粒体靶向功能的 Dox 纳米颗粒以及 TPP-LND 纳米颗粒相同条件下细胞存活率分别为 60.2%和 47.6%.在 BALB/c 裸鼠上构建的 MCF-7/ADR 肿瘤模型中,两周后相对于 PBS 缓冲液对照组(肿瘤体积增大 9.11 ± 0.56 倍),TPP-LND-Dox 纳米颗粒组肿瘤体积增加仅增加 2.17 ± 0.23 倍,低于 Dox 纳米颗粒(6.92 ± 0.36 倍)和 TPP-LND 纳米颗粒(5.34 ± 0.41 倍).

Liu H N 等将 Dox-TPP 和透明质酸(Hyaluronic acid, HA)以可裂解的腙键(Hydrazone bond)缀合,制成了 HA-hydra-Dox-TPP 多聚物.^[31]该多聚物自组装形成纳米颗粒,亲水端 HA 为壳,疏水端 TPP 为核;其中 pH 敏感的腙键在肿瘤组织微酸性环境下会裂解,从而实现肿瘤内药物释放.透明质酸在该纳米颗粒上作为靶向肿瘤细胞的靶头.腙键在细胞内溶酶体中被完全水解,从而释放出线粒体靶向分子 Dox-TPP.该纳米颗粒具有良好的生物相容性和肿瘤靶向能力,并显示出对 MCF7/ADR 细胞更高的细胞毒性($86 \mu\text{M}$ 浓度时细胞存活率约为游离 Dox 对照组的一半).而体内研究表明,裸鼠上的 MCF-7/ADR 肿瘤给药 18 d 后体积增长 2.15 倍,低于给游离 Dox 的对照组(肿瘤体积增长 3.62 倍),且游离 Dox 对照组裸鼠出现严重心、肝损伤,而给纳米颗粒组裸鼠的则未出现.这说明通过该纳米颗粒靶向递释 Dox 比游离 Dox 对耐药肿瘤具有更高的安全性和抗肿瘤功效.

Tan 及其团队将(4-羧基丁基)三苯基溴化磷((4-Carboxybutyl) triphenylphosphonium bromide, CTPP)与糖脂样缀合物(Glucolipid-like conjugates, CSOSA)经 $\text{NH}_2\text{-PEG}_{2000}\text{-NH}_2$ 缀合,将所得缀合物装载疏水弱酸性药物雷公藤红素(Celastrol, Cella)制成平均尺寸为 63.5 ± 18.0 nm 的 CTPP-CSOSA/Cella 胶束^[32].疏水弱酸性的雷公藤红素在线粒体内弱碱性环境中溶解度加大,导致雷公藤红素与胶束疏水核心之间的相互作用减弱,以此实现线粒体内碱性 pH 响应的药物释放,减少细胞质和溶酶体中的药物渗漏.相对游离雷公藤红素,该胶束具有相对更好的肿瘤靶向性,更高的抗肿瘤效力和相对较低的全身毒性.

Han K 及其团队将光敏剂原卟啉 IX(Protoporphyrin IX, PpIX)与聚乙二醇-促凋亡肽(KLAKLAK)₂ 相缀合,获得平均尺寸 91 nm 的自组装的纳米胶束^[33].在短时间光照射下,光敏剂的光化学内化(Photochemical Internalization, PCI)效应使该纳米胶束能获得更理想的细胞递送,而促凋亡肽(KLAKLAK)₂ 可启动肿瘤细胞凋亡过程并提供线粒体靶向能力.该纳米胶束可作为线粒体靶向的光动力剂,在长时间光照下原卟啉 IX 与促凋亡肽协同作用诱导 ROS 的产生,介导细胞色素 C 的释放和细胞凋亡.因此采用短时加长时照射的双阶段光照策略进行光动力治疗,荷瘤小鼠的肿瘤质量下降比例约为游离 PpIX 的 3 倍,(KLAKLAK)₂ 的 2 倍.

2.2 DQAsomes 和 DQA-脂质体

DQA 具有两亲性,其在水性介质中聚集而成的直径 70 至 700 nm 的囊泡状聚集体被称作 DQAsomes. DQAsomes 被广泛运用作载体向线粒体递送 DNA 和细胞毒性药物. DQA 作为线粒体靶向配体,因其破坏线粒体膜电位、诱导 ROS 产生和抑制 ATP 合成的活性而具有对癌细胞有一定选择性的细胞毒性^[34]. 但由于 DQAsomes 的内体逃逸能力和转染效率较低,其在转染和线粒体靶向递释药物方面的潜力受到限制^[35]. 但随着研究的进一步发展,更多性能优秀的基于 DQA-脂质体的线粒体靶向载体被发现.

Bae 及其团队利用 1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷(1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane, DOT-AP)、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, DOPE)和 DQA 按 10:10:80 的比例制备了一种 DQA80s 脂质体,该脂质体具有作为线粒体靶向载体和线粒体靶向抗癌药物的双重潜力^[35]. DQA80s 具有出比 DQAsomes 更大的细胞毒性;与 DQAsomes 相比,DQA80s 的细胞摄取显著增加,并且具有更好的溶酶体逃逸能力. 与载体 DQAsome 相比,DQA80s 在 HeLa 细胞和真皮成纤维细胞中显示了更高的转染效率.

Yu 等人将抗癌药物托泊替康盐酸盐装载到由聚乙二醇 1000 维生素 E 琥珀酸酯(D- α -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate, TPGS₁₀₀₀)和 DQA 制成的脂质体中^[36]. 作为 P-gp 抑制剂,TPGS₁₀₀₀ 可抑制耐药癌细胞中 P-gp 转运蛋白的表达. 装载托泊替康的脂质体在 MCF7 和 MCF7/ADR 细胞中的细胞毒性相对游离托泊替康分别高出 2 倍和 4 倍. 通过共聚焦激光扫描显微图像发现该脂质体能将荧光探针香豆素-6 靶向递送到线粒体,该组在线粒体中的荧光信号强度比对照组(游离香豆素-6 和用非靶向脂质体递送香豆素-6)分别提高至 21.2 倍和 12.9 倍. 通过 Cy7 进行荧光标记的脂质体在 MCF7/ADR 荷瘤小鼠的肿瘤区域有最强的荧光信号,说明该脂质体具有良好的肿瘤靶向性;体外细胞毒筛选结果显示,靶向线粒体的托泊替康脂质体对 MCF-7 和 MCF-7/ADR 细胞都具有最强的杀伤性. 应用游离拓扑替康、负载拓扑替康脂质体和线粒体靶向负载拓扑替康脂质体后,MCF-7 细胞的诱导凋亡百分比分别为 19.7%、15.8%和 33.5%;MCF-7/ADR 细胞分别为 10.4%、13.6%和 24.0%. 体内抗肿瘤研究中,相对游离拓扑替康、负载拓扑替康脂质体,线粒体靶向负载拓扑替康脂质体表现出最好的抑制肿瘤生长的效果. 与之类似的,Zhou 等将抗癌药物紫杉醇装载在 TPGS₁₀₀₀ 和 DQA 制成的脂质体中,与游离紫杉醇和常规紫杉醇脂质体相比,该靶向紫杉醇脂质体在体外和抗药性 A549/cDDP 异种移植肿瘤模型均表现出最强的抗癌功效^[37].

Wang 及其团队利用地喹氯铵-聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DQA-PEG₂₀₀₀-DSPE)制成的线粒体靶向脂质体装载白藜芦醇,以期改善白藜芦醇水溶性低、稳定性差等缺点^[38]. 装载了白藜芦醇的线粒体靶向白藜芦醇脂质体粒度约为 70 nm,具有较高的包封效率(>95%). 该脂质体能靶向性积累于线粒体,A549 细胞中线粒体内积累量约提高至约 2.65 倍,A549/cDDP 细胞中线粒体内提高至约 4.7 倍;相对于游离白藜芦醇,该线粒体靶向白藜芦醇脂质体诱导 A549 细胞凋亡率提高至 2.84 倍(72.63 \pm 0.59% / 25.59 \pm 6.28%),诱导 A549/cDDP 细胞凋亡率提高至 1.46 倍(38.14 \pm 0.74% / 26.17 \pm 0.29%).

2.3 无机纳米粒子载体

许多研究报道了用于药物递送,成像和治疗目的的无机纳米粒子载体,这些无机纳米粒子载体相对有机纳米粒子载体而言具有生物相容性好、稳定性好、毒性低、亲水性佳等优势^[39]. 近期开发的用于抗癌治疗的线粒体靶向无机纳米载体包括氧化石墨烯(Graphene oxide, GO)、碳量子点(Carbon quantum dot, CQDs)、脂质膜包被的二氧化硅-碳杂合纳米颗粒(Lipid membrane-coated silica-carbon, LSC)等等. 下面将对一些实例进行分类讨论.

2.3.1 氧化石墨烯(Graphene oxide, GO)氧化石墨烯(Graphene oxide, GO)具有稳定性高、比表面积较大、尺寸适中的良好特性,且能通过 π - π 堆积和疏水相互作用与药物进行结合. 经过生物相容涂层修饰的氧化石墨烯具有良好的生物相容性^[40]. Zhang 及其团队制备了甘草次酸(Glycyrrhetic acid, GA)官能化的氧化石墨烯(GA-GO)纳米载体^[41]. 甘草次酸本身在几种癌症中具有抗肿瘤活性,且同时具有肿瘤和线粒体双重靶向功能,因此该作者选择 GA 作为肿瘤靶向配体和线粒体靶向配体. 负载 Dox 的 GA-GO 在 HepG2 细胞中具有比游离 Dox 高两倍的细胞毒性. 生物分布研究发现其在荷瘤小鼠的肝脏中亦有较多累积,但血

液化学筛选试验发现在开始治疗后 21 d,负载 Dox 的该纳米微粒没有引起明显的肝脏或全身毒性。

Wei 及其团队制备了 $\alpha\nu\beta_3$ 单克隆抗体-氧化石墨烯-焦脱镁叶绿酸-a 复合物,该复合物能有效靶向 $\alpha\nu\beta_3$ 阳性肿瘤细胞,通过光敏剂焦脱镁叶绿酸-a 产生光毒性,并通过线粒体膜电位和极化 GO 之间的电子反应靶向线粒体^[42]。该复合物具有基于荧光共振能量转移(Fluorescence resonance energy transfer, FRET)的光毒性开/关闭功能。在血液与细胞质等水性环境中光毒性关闭,在靶向线粒体、位于脂质膜系统中时光毒性开启,以减少副作用,增大药物负荷。细胞毒性检测显示,GO-光敏剂复合物具有最小的暗毒性;在 $\alpha\nu\beta_3$ 阴性的 MCF-7 细胞中,相对游离焦脱镁叶绿酸-a,该复合物的光毒性减小,这可能是由于分子尺寸的增大降低了纳米药物的内吞作用;但在 $\alpha\nu\beta_3$ 阳性的 U87-MG 细胞中,该复合物在光照条件下对细胞的抑制作用达到游离焦脱镁叶绿酸-a 的 7 倍左右,这可以归因于药物装载和转运效率的提高和 $\alpha\nu\beta_3$ 单克隆抗体与 GO 提供的 $\alpha\nu\beta_3$ 阳性肿瘤细胞/线粒体靶向作用。

2.3.2 碳量子点(Carbon quantum dot, CQDs) 因为具有强大而稳定的荧光和极低的细胞毒性,碳量子点已在生物成像,生物标记和生物传感等领域被用作荧光探针^[43]。Ye 及其团队用 CQD 和 TPGS-TPP 制备纳米胶束,将其用于线粒体靶向递送 Dox^[44]。与游离 Dox 相比,装载 Dox 的 CQD 纳米胶束在耐药性 MCF7 细胞中具有低五倍的 IC_{50} 值。

2.3.3 脂质膜包被的二氧化硅-碳杂合纳米颗粒(Lipid membrane-coated silica-carbon, LSC)Wang 及其团队合成了直径约 45 nm 的脂膜包被的二氧化硅-碳杂合纳米颗粒(Lipid membrane-coated silica-carbon, LSC)^[45]。线粒体外表面存在将丙酮酸主动转运到线粒体中的单羧酸转运蛋白(Monocarboxylate transporters, MCTs),而葡萄糖水热法合成的胶体碳球纳米颗粒(colloidal carbon sphere, CCS)表面有与丙酮酸结构相似的丙酮醛基团,因此 CCS 能特异性靶向线粒体。以原硅酸四乙酯(tetraethyl orthosilicate, TEOS)进行处理以缩小纳米颗粒的尺寸,再用 3-氨基丙基三甲氧基硅烷((3-Aminopropyl) trimethoxysilane, APT-MS)处理其表面以吸收二棕榈酰磷脂酰胆碱(phospholipid dipalmitoylphosphatidylcholine, DPPC)形成脂质包被,以提升其生物相容性。最终得到了稳定的 LSC 纳米颗粒。装载 Dox 的该纳米颗粒线粒体靶向能力良好,且对多药耐药细胞具有理想的光毒性。在游离 Dox 和未装载 Dox 的 LSC 纳米颗粒几乎不能对 NCI/RES-ADR 多药耐药癌细胞造成抑制的情况下,在近红外光照射下装载 Dox 的 LSC 纳米颗粒使 NCI/RES-ADR 多药耐药癌细胞几乎全部死亡。其机制为 LSC 纳米颗粒靶向积累在线粒体中,并在 NIR 照射下产生 ROS,氧化 NADH、抑制 ATP 的产生。经 LSC 和近红外光照治疗后 NCI/RES-ADR 多药耐药癌细胞的 P-gp 转运蛋白表达降低,失去其耐多药能力至少 5 d。

2.4 用纳米颗粒负载线粒体靶向药物

前文已经提到,线粒体靶向配体-药物缀合物通常具有水溶性差和具细胞毒性等缺点,因此它们难以被应用于临床研究。一种解决方案是利用纳米载体递释系统将其递送到肿瘤部位,随后将其释放,药物利用其缀合的线粒体靶向配体到达线粒体。下面简要介绍一些基于这种思路的研究实例。

Battogtokh G 及其团队将抗癌药物多西紫杉醇(Docetaxel, DTX)与 4-羧基丁基三苯基膦缀合以增强其线粒体靶向能力,再将 TPP-DTX 缀合物加载到叶酸-胆固醇基白蛋白(FA-chol-BSA)纳米颗粒中以改善其生物相容性。^[46]体外研究表明该纳米颗粒具有良好的线粒体靶向性,经该纳米颗粒孵育 60 min 的 MCF-7 细胞的线粒体 TPP-DTX 的浓度是经游离 DTX 处理的细胞线粒体中 DTX 浓度的 5.3 倍。产生 ROS 介导细胞凋亡,孵育 12 h 后该纳米颗粒对 B16F10 细胞展现出较游离 DTX 高 3.9 倍的细胞毒性。该纳米颗粒对 MCF-7 细胞荷瘤小鼠的肿瘤生长产生抑制效果,给药 21 天后,荷瘤小鼠肿瘤体积是游离 DTX 处理组的大约二分之一。且该纳米颗粒的治疗指数为 69.5%,显著高于游离 DTX(24%)和游离 TPP-DTX(45.5%)。这说明该纳米颗粒提高了抗癌药物的安全性。

上述团队亦将线粒体靶向光敏剂三苯基膦脱镁叶绿酸 a (Triphenylphosphonium-pheophorbide-a, TPP-PhA)加载到叶酸-胆固醇-牛血清白蛋白(Folate-cholesteryl-albumin, FA-chol-BSA)纳米颗粒中(表示为 TPP-PheoA@FA-chol-BSA 纳米颗粒),以增强 TPP-PhA 缀合物的水溶性和生物相容性^[47]。该载药纳米颗粒主要在线粒体中积累,较游离 PhA 和装载 PhA 的 FA-chol-BSA 纳米颗粒(表示为 PheoA@FA-chol-

BSA 纳米颗粒)光毒性均增强. 体内研究表明其肿瘤靶向性良好,对肿瘤生长的抑制作用高于游离 PhA 和 PheoA@FA-chol-BSA 纳米颗粒. 且 TPP-PheoA@FA-chol-BSA 纳米颗粒具有最高的治疗指数(82.9%),高于游离脱镁叶绿酸 a(30%)和 PhA@FA-chol-BSA 纳米颗粒(45%).

Song 及其团队开发了一种 pH 敏感性胶束^[13]. 将 1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(dimethylaminopyridine, DSPE)用脲键与聚乙二醇相连,该脲键在较低 pH 下断裂,因此胶束能够在溶酶体和内体中解体,从而使药物在短时间内大量释放,这将有助于克服 P-gp 转运蛋白介导的癌细胞多药耐药性. 在该 DSPE-hyd-PEG 缀合物上附着茴香酰胺(anisamide, AA)以提高对癌细胞的靶向性,最终制成 DSPE-hyd-PEG-AA 胶束. Dox 和 DQA-Dox 被装载在该胶束中. 细胞摄取和亚细胞分布研究表明该胶束可将 Dox 和 DQA-Dox 分别传递至细胞核和线粒体. 体外细胞毒性实验中,相同剂量下该载药胶束对 MDA-MB-231/ADR 细胞(对 Dox 耐药)显示出比游离 Dox 高近 10 倍的细胞毒性. 在 Dox 抗性肿瘤模型中,装载有 Dox 的胶束具有比游离 Dox 更强的抗肿瘤活性,相同剂量处理 22 d,肿瘤体积比游离 Dox 处理小大约 7 倍. 相比游离 Dox,该胶束亦对正常器官具有更小的毒性.

3 结论

迄今为止,已经有很多抗癌药物线粒体靶向递送的相关研究. 早期有许多研究基于线粒体靶向配体和抗癌药物直接缀合的思路,合成了一系列线粒体靶向抗癌药物缀合物. 这些缀合物表现出比游离抗癌药物更高的抗癌能力,但它们亦存在水溶性差、具有细胞毒性等缺陷. 而使用线粒体靶向纳米载体具有相对游离药物更高的抗癌效果、更好的生物相容性、更长的血液循环时间和在指定靶位裂解释药等等优点. 一种新的思路即用纳米载体递释系统装载线粒体靶向抗癌药物缀合物,这亦一定程度上克服后者的缺陷. 无论是缀合物还是纳米载体都在解决肿瘤耐药性方面有一定成果. 未来纳米载体递释系统可能会成为线粒体靶向抗癌药物递送研究的重要方向,期待未来更多性能优越且具有巨大临床应用潜力的线粒体靶向纳米载体研究涌现.

参 考 文 献

- [1] 梁凯,曹秉振. 线粒体调控的细胞凋亡研究进展[J]. 生物医学工程与临床,2014,18(05):501-505.
- [2] Wang F, Ogasawara M A, Huang P. Small mitochondria-targeting molecules as anti-cancer agents[J]. Mol Aspects Med, 2010, 31(1): 75-92.
- [3] Battogtokh G, Choi Y S, Kang D S, et al. Mitochondria-targeting drug conjugates for cytotoxic, anti-oxidizing and sensing purposes: current strategies and future perspectives[J]. Acta Pharmaceutica Sinica B, 2018, 8(6): 862-880.
- [4] Liberman E A, Topaly V P, Tsofin L M, et al. Mechanism of coupling of oxidative phosphorylation and the membrane potential of mitochondria[J]. Nature, 1969, 222: 1076-1078.
- [5] Zielonka J, Sikora A, Hardy M, et al. Mitochondria-targeted triphenylphosphonium-based compounds: syntheses, mechanisms of action, and therapeutic and diagnostic applications[J]. Chem Rev, 2017, 117(15): 10043-10120.
- [6] Fan X Y, Liu Y J, Cai Y M, et al. A mitochondria-targeted organic arsenical accelerates mitochondrial metabolic disorder and function injury[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2019, 27(5): 760-768.
- [7] Khairul I, Wang Q Q, Jiang Y H, et al. Metabolism, toxicity and anticancer activities of arsenic compounds[J]. Oncotarget, 2017, 8(14): 23905-23926.
- [8] Zhu Z Z, Wang Z H, Zhang C L, et al. Mitochondrion-targeted platinum complexes suppressing lung cancer through multiple pathways involving energy metabolism[J]. Chem Sci, 2019, 10(10): 3089-3095.
- [9] Lovejoy K S, Todd R C, Zhang S Z, et al. cis-Diammine(pyridine)chloroplatinum(II), a monofunctional platinum(II) antitumor agent: uptake, structure, function, and prospects[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(26): 8902-8907.
- [10] Weiss M J, Wong J R, Ha C S, et al. Dequalinium, a topical antimicrobial agent, displays anticarcinoma activity based on selective mitochondrial accumulation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987, 84(15): 5444-5448.
- [11] Christman J E, Miller D S, Coward P, et al. Study of the selective cytotoxic properties of cationic, lipophilic mitochondrial-specific compounds in gynecologic malignancies[J]. Gynecol Oncol, 1990, 39(1): 72-79.
- [12] Sancho P, Galeano E, Nieto E, et al. Dequalinium induces cell death in human leukemia cells by early mitochondrial alterations which en-

- hance ROS production[J]. *Leukemia Research*,2007,31(7):969-978.
- [13] Song Y F, Liu D Z, Cheng Y, et al. Dual subcellular compartment delivery of doxorubicin to overcome drug resistant and enhance antitumor activity[J]. *Sci Rep*,2015,5:16125.
- [14] Valeria R Fantin,Marcelo J Berardi,Luca Scorrano, et al. A novel mitochondriotoxic small molecule that selectively inhibits tumor cell growth[J]. *Cancer Cell*,2002,2(1):29-42.
- [15] He H, Li D W, Yang L Y. A novel bifunctional mitochondria-targeted anticancer agent with high selectivity for cancer cells[J]. *Sci Rep*, 2015,5:13543-13549.
- [16] Vazquez M S, Nesterova I V, Jensen T J, et al. Mitochondria targeting by guanidine-and biguanidine-porphyrin photosensitizers[J]. *Bioconjugate Chemistry*,2008,19(3):705-713.
- [17] Baracca A, Sgarbi G, Solaini G, et al. Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential;evaluation of proton flux through F(0) during ATP synthesis[J]. *Biochim Biophys Acta*,2003,1606(1/3):137-146.
- [18] Arcadi J A. Rhodamine-123 as effective agent in rat prostate tumor R3327-H; Preliminary report[J]. *Urology*,1986,28(6):501-503.
- [19] Bernal S D, Lampidis T J, McIsaac R M,et al. Anticarcinoma activity in vivo of rhodamine 123, a mitochondrial-specific dye[J]. *Science*, 1983,222(4620):169-172.
- [20] Herr H W, Huffman J L, Huryk R, et al. Anticarcinoma activity of rhodamine 123 against a murine renal adenocarcinoma[J]. *Cancer Res*,1988,48(8):2061-2063.
- [21] Jones L W, Narayan K S, Shapiro C E, et al. Rhodamine-123;therapy for hormone refractory prostate cancer, a phase I clinical trial[J]. *J Chemother*,2005,17(4):435-440.
- [22] Antonenko Y N, Avetisyan A V, Bakeeva L E, et al. Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 1. Cationic plastoquinone derivatives; Synthesis and in vitro studies[J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2008, 73(12): 1273-1287.
- [23] Horton K L, Stewart K M, Fonseca S B, et al. Mitochondria-penetrating peptides[J]. *Cell Chemical Biology*,2008,15(4):375-382.
- [24] Chamberlain G R, Tulumello D V, Kelley S O. Targeted delivery of doxorubicin to mitochondria[J]. *ACS Chem Biol*,2013,8(7):1389-1395.
- [25] Vestweber D, Schatz G. DNA-protein conjugates can enter mitochondria via the protein import pathway[J]. *Nature*,1989,338(6211): 170-172.
- [26] Mukhopadhyay A, Ni L, Yang C S, et al. Bacterial signal peptide recognizes HeLa cell mitochondrial import receptors and functions as a mitochondrial leader sequence[J]. *Cell Mol Life Sci*,2005,62(16):1890-1899.
- [27] Wang X, Zhou J, Chen B, et al. Enhanced intracellular hyperthermia efficiency by magnetic nanoparticles modified with nucleus and mitochondria targeting peptides[J]. *J Nanosci Nanotechnol*,2016,16(6):6560-6566.
- [28] Wickia A, Witzigmann D, Balasubramanian V, et al. Nanomedicine in cancer therapy;challenges,opportunities,and clinical applications [J]. *Journal of Controlled Release*,2015,200:138-157.
- [29] Cho D Y, Cho H, Kwon K, et al. Triphenylphosphonium-conjugated poly(ϵ -caprolactone)-based self-assembled nanostructures as nanosized drugs and drug delivery carriers for mitochondria-targeting synergistic anticancer drug delivery[J]. *Advanced Functional Materials*, 2015,25(34):5479-5491.
- [30] Liu Y Q, Zhang X J, Zhou M J, et al. Mitochondrial-targeting lonidamine-doxorubicin nanoparticles for synergistic chemotherapy to conquer drug resistance[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*,2017,9(50):43498-43507.
- [31] Liu H N, Guo N N, Wang T T, et al. Mitochondrial targeted doxorubicin-triphenylphosphonium delivered by hyaluronic acid modified and pH responsive nanocarriers to breast tumor;in vitro and in vivo studies[J]. *Mol Pharmaceutics*,2018,15(3):882-891.
- [32] Tan Y N, Zhu Y, Zhao Y, et al. Mitochondrial alkaline pH-responsive drug release mediated by celastrol loaded glycolipid-like micelles for cancer therapy[J]. *Biomaterials*,2018,154:169-181.
- [33] Han K, Lei Q, Wang S B, et al. Dual-stage-light-guided tumor inhibition by mitochondria-targeted photodynamic therapy[J]. *Advanced Functional Materials*,2015,25(20):2961-2971.
- [34] Pajuelo L, Calviño E, Diez J C, et al. Dequalinium induces apoptosis in peripheral blood mononuclear cells isolated from human chronic lymphocytic leukemia[J]. *Investigational New Drugs*,2011,29(6):1156-1163.
- [35] Bae Y, Jung M K, Song S J, et al. Functional nanosome for enhanced mitochondria-targeted gene delivery and expression[J]. *Mitochondrion*,2017,37: 27-40.
- [36] Yu Y, Wang Z H, Zhang L, et al. Mitochondrial targeting topotecan-loaded liposomes for treating drug-resistant breast cancer and inhibiting invasive metastases of melanoma[J]. *Biomaterials*,2012,33(6):1808-1820.
- [37] Zhou J,Zhao W Y, Ma X, et al. The anticancer efficacy of paclitaxel liposomes modified with mitochondrial targeting conjugate in resistant

- lung cancer[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(14): 3626-3638.
- [38] Wang X X, Li Y B, Yao H J, et al. The use of mitochondrial targeting resveratrol liposomes modified with a dequalinium polyethylene glycol-distearoylphosphatidyl ethanolamine conjugate to induce apoptosis in resistant lung cancer cells[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(24): 5673-5687.
- [39] Paul W, Sharma C P. *Biointegration of Medical Implant Materials*[M]. Cambridge: Woodhead Publishing, 2010.
- [40] Yang K, Feng L Z, Shi X Z, et al. Nano-graphene in biomedicine; theranostic applications[J]. *Chem Soc Rev*, 2013, 42(2): 530-547.
- [41] Zhang C, Liu Z F, Zheng Y, et al. Glycyrrhetic acid functionalized graphene oxide for mitochondria targeting and cancer treatment in vivo[J]. *Small*, 2018, 14(4): 1703306.
- [42] Wei Y C, Zhou F F, Zhang D, et al. A graphene oxide based smart drug delivery system for tumor mitochondria-targeting photodynamic therapy[J]. *Nanoscale*, 2016, 8: 3530-3538.
- [43] Lim S Y, Shen W, Gao Z Q. Carbon quantum dots and their applications[J]. *Chem Soc Rev*, 2015, 44(2): 362-381.
- [44] Zhang Y, Zhang C J, Chen J. Trackable mitochondria-targeting nanomicellar loaded with doxorubicin for overcoming drug resistance[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9(30): 25152-25163.
- [45] Wang H, Gao Z, Liu X Y, et al. Targeted production of reactive oxygen species in mitochondria to overcome cancer drug resistance[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 2041-1723.
- [46] Battogtokh G, Gotov O, Kang J H, et al. Triphenylphosphine-docetaxel conjugate-incorporated albumin nanoparticles for cancer treatment[J]. *Nanomedicine*, 2018, 13(3): 325-338.
- [47] Battogtokh G, Ko Y T. Mitochondrial-targeted photosensitizer-loaded folate-albumin nanoparticle for photodynamic therapy of cancer[J]. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2017, 13(2): 733-743.

Mitochondrial Targeting Ligands and Nanocarrier Delivery Systems for Tumor Therapy

LIU Yun-hu SUN Tao

(School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 201203, China)

Abstract Recognized as an important energy source in human cells, mitochondria play an important role in the occurrence and development of tumors. Therefore, delivering anticancer drugs specifically to mitochondria is of high researching value. Two of the current implementing methods include mitochondrial targeting ligand-drug conjugates and mitochondria-targeted nanocarrier delivery systems. The research status of mitochondrial targeting ligands and nanocarriers used in the two preceding methods is reviewed.

Key words tumor; mitochondrial targeting; nanocarrier