

## 多肽修饰脂质体靶向药物递送系统研究进展

吴学萍, 王驰\* (重庆医科大学药学院药物化学教研室, 重庆 400016)

**摘要:** 目的 介绍近年来多肽修饰脂质体靶向药物递送系统的研究进展。方法 查阅和归纳总结近几年相关文献。结果 阐述了精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)多肽、丙氨酸-脯氨酸-精氨酸-脯氨酸-甘氨酸(APRPG)多肽、细胞穿透肽(CPP)、血管活性肠肽(VIP)等修饰脂质体的研究进展。多肽修饰的包载药物的脂质体可以增加药物在体内的选择性, 减少药物毒副作用, 提高药物治疗指数。结论 多肽分子是机体内一类重要的生物活性物质, 将其作为导向物以配体-受体特异性结合的方式应用于靶向药物递送系统, 具有良好的研究价值和应用前景。

**关键词:** 多肽; 脂质体; 靶向药物递送系统; 配体; 受体

中图分类号: R945 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2010)08-0681-05

### Advances in Peptide-Modified Liposome Targeted Drug Delivery System

WU Xueping, WANG Chi\* (Department of Pharmaceutical Chemistry, College of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To introduce the advances of peptide-modified liposome targeted drug delivery system. **METHODS** The relevant literatures in recent years were referred and summarized. **RESULTS** The advances of liposomes modified by arginine-glycine-aspartic (RGD) peptide, alanine-proline-arginine-proline-glycine (APRPG) peptide, cell-penetrating peptide (CPP), vasoactive intestinal peptide (VIP) were elaborated. Peptide-modified drug-loaded liposomes may increase the selectivity of drugs *in vivo* and reduce side effects of drugs to improve their therapeutic index. **CONCLUSION** Peptide molecules are a class of important bioactive substances to the body, which are applied in targeted drug delivery system by specific-combination of ligand-receptor with good values and application prospects.

**KEY WORDS:** peptide; liposome; targeted drug delivery system; ligand; receptor

主动靶向药物传递是指利用特定的生物过程, 如特异性的配体-受体识别和相互作用, 来提高特定部位的药物浓度。主动靶向系统以抗体、多肽、糖类、维生素、糖蛋白等作为配体与靶细胞受体进行专属性作用。其中, 多肽分子是机体内一类重要的生物活性物质, 具有良好的生物相容性、靶向性、无免疫原性、低毒性等优点, 将其作为配体应用于靶向药物递送系统(targeted drug delivery system, TDDS), 得到越来越广泛的关注。随着对肿瘤细胞的研究深入到分子水平, 在肿瘤细胞表面或肿瘤相关血管表面发现一系列受体与肿瘤生长增殖密切相关, 并在肿瘤组织中过度表达。受体与其配体的结合具有特异性、选择性和饱和性, 且亲和力强、生物效应明显。利用多肽配体为药物载体, 通过受体的介导作用,

可以增加病灶区的药物浓度, 提高疗效, 降低不良反应, 从而达到靶向治疗的目的。

脂质体是一种定向药物载体, 具有一定的被动靶向作用, 在许多疾病尤其是癌症的治疗中显示了明显的优越性。在脂质双层中掺入对特定细胞具有选择性和亲和性的配体, 利用细胞受体对配体的识别作用可以实现主动靶向释放药物。例如, 多肽修饰的靶向脂质体借助受体与多肽配体的特异性相互作用可将脂质体靶向到含有配体特异性受体的器官、组织或细胞, 同时受体与配体结合可促进脂质体内化进入细胞内, 增加药物选择性, 减少药物毒副作用, 提高药物治疗指数, 显示了良好的研究价值和应用前景。本文综述了多肽作为配体修饰的载药脂质体这种主动靶向药物递送系统的应用研究进展。

作者简介: 吴学萍, 女, 硕士生 Tel: (023)68485578  
Tel: (023)68485578 E-mail: wchi639@sohu.com

E-mail: xuepingw.8503@yahoo.com.cn \*通信作者: 王驰, 男, 博士, 副教授

## 1 精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)多肽修饰的脂质体

RGD是由精氨酸(Arg)、甘氨酸(Gly)、天冬氨酸(Asp)3个氨基酸组成的序列肽,是近几年来发现的具有高生物活性的短肽序列之一。RGD肽作为整合素和其配体相互作用的识别位点,介导细胞与细胞外基质(extra cellular matrix, ECM)及细胞间的黏附作用,同时具有信号传导功能。由于RGD肽无免疫原性、无毒副作用,因此成为抑制肿瘤转移研究的一个热点。

XIONG等<sup>[1-2]</sup>将RGD3肽连接到立体稳定脂质体(sterically stabilized liposomes, SSL)末端,制备得到了包载阿霉素(doxorubicine, DOX)的RGD修饰的立体稳定脂质体(RGD-SSL-DOX)。以游离的DOX和SSL-DOX作为对照,考察了RGD-SSL-DOX的体外吸收情况和细胞毒性,并在患有黑色素瘤B16肿瘤的小鼠体内对RGD-SSL-DOX进行了生物分布和治疗效用的考察。流式细胞仪和共聚焦显微镜研究显示,通过整合素介导的胞吞作用,RGD-SSL可以促进黑色素瘤细胞对DOX的吸收。相较于SSL-DOX, RGD-SSL-DOX对黑色素瘤细胞具有更高的细胞毒性。经过RGD-SSL-DOX和SSL-DOX处理的小鼠平均存活时间分别为55d和44d。尽管RGD-SSL-DOX和SSL-DOX都可以延长循环时间,增加肿瘤积聚,但是RGD-SSL-DOX在脾脏的吸收明显高于SSL-DOX。与注射相同剂量的SSL-DOX和游离DOX的小鼠相比,注射RGD-SSL-DOX的小鼠的肿瘤生长明显滞后。实验结果表明,RGD修饰的SSL作为一种很有前景的细胞内靶向载体,可以将化疗药物有效地传送到肿瘤细胞,从而改善对实体瘤的治疗效用。

在一种自发性肺转移模型研究中发现,与游离的5-氟尿嘧啶和非靶向脂质体对照组相比,RGD修饰的脂质体化的5-氟尿嘧啶具有更强的肿瘤转移和血管生成活性<sup>[3]</sup>。Pattillo等<sup>[4]</sup>将该方法应用于增强考布他汀(一种抗血管生成药物)的治疗作用。研究发现,在同源性B16F10肿瘤模型中,联合应用传统紫外照射与RGD修饰的脂质体化的考布他汀可抑制肿瘤生长,而采用单一疗法却无法抑制肿瘤的生长。

Ito等<sup>[5]</sup>制备了RGD修饰的磁性阳离子脂质体(RGD-MCLs),以角质化细胞株HaCaT为模型细胞,考察了RGD-MCLs在细胞形成过程中的作用。结

果发现RGD-MCLs可以诱导该细胞黏附,构建细胞支架,表达纤连蛋白。这项研究表明,应用RGD-MCLs构建细胞将会成为组织工程学和细胞生物学研究中很有前景的一种方法。

ZHAO等<sup>[6]</sup>制备了RGD修饰的包载紫杉醇(paclitaxel, PTX)的立体稳定脂质体(RGD-SSL-PTX),考察了其体外细胞毒性及细胞内摄取情况,并评价了其对接种人卵巢癌细胞SKOV-3的裸鼠的体内抗肿瘤活性。结果表明,与SSL-PTX对照组相比,RGD-SSL-PTX对SKOV-3细胞具有显著的细胞毒性,脂质体的细胞内摄取量增加了6.21倍。与SSL-PTX和紫杉醇注射液对照组相比较,RGD-SSL-PTX接种了SKOV-3细胞的裸鼠具有更强的体内抗肿瘤活性,可能是由于RGD-SSL-PTX与肿瘤细胞上过表达的整合素受体结合增加了对肿瘤的靶向性。RGD-SSL-PTX是一种很有前景的药物递送系统,可以增加药物递送的选择性,提高治疗效果。

## 2 丙氨酸-脯氨酸-精氨酸-脯氨酸-甘氨酸(APRPG)多肽修饰的脂质体

APRPG(Ala-Pro-Arg-Pro-Gly),即丙氨酸-脯氨酸-精氨酸-脯氨酸-甘氨酸序列,能够特异性作用于肿瘤的新生血管部位,可以作为探针主动靶向于新生血管。APRPG修饰的脂质体有利于将包裹的药物递送到血管生成脉管系统。

Maeda等<sup>[7]</sup>分离出了APRPG五肽,它能够特异性结合于肿瘤新生血管部位。体内实验表明,APRPG修饰的包载DOX的脂质体可以高度特异性地积聚在肿瘤组织,显著抑制肿瘤生长,延长存活时间(达到74d),具有显著的抗肿瘤活性。用APRPG修饰的脂质体稳定,大小在120~170nm且近中性,在血中无明显聚集。采用荧光标记的磷脂分子*N*-4-硝基苯并-2-乙二酸-1,3-二唑磷酸酯乙醇胺(*N*-4-Nitrobenzo-2-Oxa-1,3-Diazole Phosphatidylethanolamine, 简称为NBD-PE)检测APRPG修饰的脂质体的细胞亲和力。结果显示:APRPG修饰的脂质体对血管内皮生长因子高表达的人脐静脉内皮细胞具有显著的亲和力,NBD-PE的量为58ng;而对于不表达血管内皮生长因子的结肠癌细胞C26NL17则几乎没有亲和力,NBD-PE的量仅为6ng。肿瘤新生血管是肿瘤生长、增殖、转移的关键性因素,应用APRPG修饰的脂质体针对肿瘤新生血管进行的抗肿瘤血管新生疗法几乎

可以主动靶向到所有的实体瘤,而且不会产生药物耐受,是一种新型、高效的抗肿瘤方法。

Katanasaka 等<sup>[8]</sup>利用噬菌体展示肽程序库鉴定出一种血管生成复位肽 APRPG,设计并确认了 APRPG-聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)修饰的脂质体血管生成抑制剂。将一种血管内皮生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptors, VEGFR)酪氨酸激酶抑制剂 SU1498 包裹于脂质体中,制备得到了 APRPG-PEG 修饰脂质体化的 SU1498(APRPG-PEG-Lip-SU1498)。结果发现 APRPG-PEG-Lip-SU1498 不仅能够抑制体外由 VEGF 刺激引起的的内皮细胞增殖,而且能显著降低患有结肠癌的小鼠体内 Colon26 NL-17 细胞肿瘤微血管的密度,延长小鼠存活时间。实验结果表明,APRPG-PEG-Lip-SU1498 可以将 SU1498 有效地递送到肿瘤血管生成内皮细胞,进而抑制肿瘤诱导的血管生成。因此,靶向于肿瘤新生血管的脂质体可以作为血管生成抑制剂的有效载体,应用于抗肿瘤血管新生疗法。

Asai 等<sup>[9]</sup>制备了化疗药物 2'-C-氰基-2'-脱氧-1-β-D-阿拉伯-戊呋喃糖基胞嘧啶(2'-C-cyano-2'-deoxy-1-β-D-arabino-pentofuranosylcytosine, CNDAC)的磷脂衍生物 DPP-CNDAC 脂质体,用 APRPG 和 PEG 进行修饰,得到 APRPG-PEG 修饰的 DPP-CNDAC 脂质体(LipCNDAC/APRPG-PEG)。激光扫描显微镜观测结果显示, LipCNDAC/APRPG-PEG 可以大幅度诱导肿瘤细胞凋亡,而 PEG 修饰的 DPP-CNDAC 脂质体(LipCNDAC/PEG)却无此作用。与 LipCNDAC/PEG 相比, LipCNDAC/APRPG-PEG 能更有效地抑制肿瘤生长,从而延长小鼠的寿命。该研究表明, APRPG 修饰的脂质体可以作为一种有效的主动药物递送系统应用于抗肿瘤血管新生疗法。

### 3 细胞穿透肽(CPP)修饰的脂质体

细胞穿透肽(cell-penetrating peptide, CPP),也称为蛋白转导域(protein transduction domain, PTD),是一类少于 30 个氨基酸的小肽片段,能携带大分子物质进入细胞,其穿膜能力不依赖经典的胞吞作用。CPP 是带有正电荷的肽段,它通过共价键与多种大分子物质结合且高效地跨越细胞膜,并能运送多种不同的物质至细胞质和细胞核,包括多肽,蛋白质, DNA, siRNA, 电中性的核酸类似物 PNA(peptide nucleic acid), 噬菌体颗粒, 磁性纳米

颗粒, 脂质体以及其他小分子化合物等,这一性质为其成为靶向药物的良好载体提供了可能。目前已经发现了 3 种天然存在的 CPP,分别来自 HIV-1 和猴免疫缺损病毒(SIV)-2、-3 的 TAT, 果蝇同源异型转录因子 ANTP 和单纯疱疹病毒(HSV)-1 的 VP22 转录因子<sup>[10]</sup>。

Torchilin 等<sup>[11]</sup>在脂质体膜上及其内部用荧光进行标记,然后将其与 TAT-PTD 肽段结合。荧光显微镜观察发现, TAT-PTD-脂质体复合物可以进入细胞内,在刚穿透细胞膜进入细胞的 2 h 内,该复合物保持完整性,2 h 后脂质体开始缓慢移向细胞核,9 h 左右脂质体与内部标记物完全分离。该研究表明, TAT-PTD-脂质体复合物是一种很具前景的运载工具,可以将药物和 DNA 运至细胞内部。

### 4 血管活性肠肽(VIP)修饰的脂质体

血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)是由 14 种 28 个氨基酸残基组成的碱性多肽,属于胰泌素/VIP 族的胃肠肽类激素,在机体内分布十分广泛,在胃肠道以及中枢神经、外周神经末梢中含量很高,且具有广泛的生理作用。近年来研究表明, VIP 对肿瘤的发生、增殖和分化起双重调节作用。某些肿瘤细胞(如胰腺癌、小细胞肺癌)既能合成、分泌 VIP,又能表达 VIP 受体,具有 VIP 的自分泌调节作用。VIP 受体在乳腺、胃肠道、胰腺、前列腺肿瘤上都有大量的表达。

VIP 受体在人乳腺癌细胞中的表达量是正常乳腺细胞的 5 倍。Dagar 等<sup>[12]</sup>制备了 VIP 肽修饰的立体稳定脂质体(VIP-SSL),应用放射性核素钨-六甲基胍胺(Tc99m-HMPAO)标记 VIP-SSL 和 SSL,考察它们对人乳腺癌细胞的显像能力。结果显示, Tc99m-HMPAO 标记的 VIP-SSL 在肿瘤组织与正常组织累积量的比值明显大于 Tc99m-HMPAO 标记的 SSL,这表明 VIP-SSL 的主动靶向性很可能是因为脂质体化的 VIP 肽与乳腺癌细胞上的 VIP 受体之间的相互作用。此外, Tc99m-HMPAO 标记的 VIP-SSL 在乳腺癌细胞中的累积量显著高于 SSL,证明经过 VIP 修饰的脂质体确实被主动靶向到了乳腺癌细胞中。体内实验结果表明,通过 VIP 肽将 Tc99m-HMPAO 标记的脂质体靶向到肿瘤细胞,提高了对大鼠体内乳腺癌细胞的抑制率。因此, VIP 受体有望成为乳腺癌的主动靶向载体,用于乳腺癌的有效诊断和治疗。Torchilin<sup>[13]</sup>用放射性核素标记法得到了相同的结果。

## 5 甘氨酸-精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸-丝氨酸 (GRGDS)多肽修饰的脂质体

甘氨酸-精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸-丝氨酸 (glycine-arginine-glycine-aspartic acid-serine, GRGDS) 是一种含 RGD 序列的五肽, 在监测肿瘤组织周围血管生成方面有重要作用, 可用于抗癌药物靶向递送系统的设计。

ZHAO等<sup>[14]</sup>成功制备了GRGDS修饰的紫杉醇长循环脂质体(GRGDS-SSL-PTX), 对其体外理化性质进行了考察, 并且评价了该脂质体对人卵巢癌细胞SKOV-3和乳腺癌细胞MCF-7的体外靶向性。体外细胞毒实验结果表明, GRGDS-SSL-PTX这两种细胞株生长抑制作用均有显著程度的增强, 分别为SSL-PTX的1.42倍和2.12倍。GRGDS对SSL-PTX的修饰并不影响脂质体的理化特征, 但却增加了紫杉醇脂质体对肿瘤细胞的靶向性, 进而增加了细胞毒性。这一结果提示, GRGDS修饰的脂质体可以用作抗癌药物的载体靶向到肿瘤细胞, 为肿瘤的靶向治疗提供了新的思路。

## 6 其它多肽修饰的脂质体

### 6.1 YIGSR 多肽修饰的脂质体

YIGSR(Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg)(酪氨酸-异亮氨酸-甘氨酸-丝氨酸-精氨酸)是来源于层粘连蛋白(laminin, LN)分子  $\beta 1$  链的序列, 能干扰肿瘤细胞膜黏附分子与基底膜和细胞外基质的黏附, 可有效抑制纤维肉瘤和黑素瘤的生长和转移。YIGSR 肽具有抗肿瘤血管生成的作用, 不但可以抑制肿瘤转移灶, 而且可以抑制肿瘤原发灶的生长。将 YIGSR 肽连接到脂质体表面, 用脂质体作为 YIGSR 肽的载体, 在体内可减少酶对 YIGSR 肽的破坏, 增强抗转移效果, 有效地抑制实验性肺转移和自发性肺转移, 表明 YIGSR 多肽脂质体很有可能成为临床上有效的抗转移剂。

### 6.2 NGR 多肽修饰的脂质体

氨肽酶 N 是血管生成内皮细胞优先表达的一种蛋白酶, NGR 序列片段可促进肽与氨肽酶 N 的结合。Pastorino 等<sup>[15]</sup>将 NGR 序列片段连接到包载 DOX 的 SSL 表面, 首先以免疫缺陷性小鼠的常位神经母细胞瘤细胞为模型, 结果发现与普通 SSL 相比, NGR 肽靶向的脂质体在肿瘤部位的积聚提高了 10 倍; 再以肾上腺肿瘤细胞为模型研究 NGR 肽修饰的 DOX 脂质体的抗肿瘤活性, 发现多次低剂量给药后可以消除肿瘤。

## 6.3 SP94 多肽修饰的脂质体

Albert 等<sup>[16]</sup>通过噬菌体展示技术鉴定出一种新肽 SP94, 它可与肝癌细胞特异性结合。研究表明, 将 SP94 多肽与 DOX 脂质体结合形成的化合物 SP94-Lipo-Dox 不仅可以通过维持白细胞总数来降低血液毒性, 而且可以通过促进肿瘤细胞凋亡和减少肿瘤血管生成来提高抗肝癌药物的疗效。提示 SP94 多肽具有重要的临床用途, 可用于治疗早期肝癌患者的系统治疗。

## 7 结语与展望

多肽具有良好的生物相容性、靶向性、无免疫原性、低毒性、可降解性等优点, 这使其在主动靶向药物递送系统中的作用备受关注, 并取得了快速的研究进展。多肽修饰的脂质体可以增加药物在体内的选择性, 减少药物的毒副作用, 提高药物的治疗指数, 显示了良好的研究价值和应用前景。目前国际上抗肿瘤多肽的研究还处于起步阶段, 在 TDDS 方面的发展也存在着一些制约因素: 肽类难以预料的翻译后修饰及前体肽剪切位点的不确定性; 化学药物与肽类载体需要通过化学键进行结合, 有的还需要“间隔臂”结构作为桥梁间接参与; 肿瘤细胞表面受体表达的复杂性和多样性; 等等。影响多肽修饰的脂质体疗效的关键因素是其靶向性, 因此如何将研究重心由创新药物转移至识别特定疾病的独特靶点也是未来研究所面临的一大挑战。

## REFERENCES

- [1] XIONG X B, HUANG Y, LU W L, et al. Intracellular delivery of doxorubicin with RGD-modified sterically stabilized liposomes for an improved antitumor efficacy: *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Pharm Sci*, 2005, 94(8): 1782-1793.
- [2] XIONG X B, HUANG Y, LU W L, et al. Enhanced intracellular uptake of sterically stabilized liposomal Doxorubicin *in vitro* resulting in improved antitumor activity *in vivo* [J]. *Pharm Res*, 2005, 22(6): 933-939.
- [3] SCHIFFELERS R M, GERT S. Liposomal nanomedicines as anticancer therapeutics: beyond targeting tumor cells [J]. *Int J Pharm*, 2008, 364(2): 258-264.
- [4] PATTILLO C B, SARI-SARRAF F, NALLAMOTHU R, et al. Targeting of the antivascular drug combretastatin to irradiated tumors results in tumor growth delay [J]. *Pharm Res*, 2005, 22(7): 1117-1120.
- [5] ITO A, AKIYAMA H, KAWABE Y, et al. Magnetic force-based cell patterning using Arg-Gly-Asp (RGD) peptide-conjugated magnetite cationic liposomes [J]. *J Biosci Bioeng*, 2007, 104(4): 288-293.
- [6] ZHAO H, WANG J C, SUN Q S, et al. RGD-based strategies for improving antitumor activity of paclitaxel-loaded liposomes in nude mice xenografted with human ovarian cancer [J]. *J Drug Target*, 2009, 17(1): 10-18.

- [7] MAEDA N, TAKEUCHI Y, TAKADA M, et al. Anti-neovascular therapy by use of tumor neovasculature-targeted long-circulating liposome [J]. *J Control Release*, 2004, 100(1): 41-52.
- [8] KATANASAKAA Y, IDAA T, ASAIA T, et al. Effective delivery of an angiogenesis inhibitor by neovessel-targeted liposomes [J]. *Inter J Pharm*, 2008, 360(1/2): 219-224.
- [9] ASAI T, MIYAZAWA S, MAEDA N, et al. Antineovascular therapy with angiogenic vessel-targeted polyethyleneglycol-shielded liposomal DPP-CNDAC [J]. *Cancer Sci*, 2008, 99(5): 1029-1033.
- [10] YAN S R, WANG L L, QIU F C. Advances in cell-penetrating peptides [J]. *Letters In Biotechnology(生物技术通讯)*, 2006, 17(5): 796-798.
- [11] TORCHILIN V P, LEVCHENKO T S. TAT-liposomes: a novel intracellular drug carrier [J]. *Cur Protein Pept Sci*, 2003, 4(2): 133-140.
- [12] DAGAR S, KRISHNADAS A, RUBINSTEIN I, et al. VIP grafted sterically stabilized liposomes for targeted imaging of breast cancer: *in vivo* studies [J]. *J Control Release*, 2003, 91(1/2): 123-133.
- [13] TORCHILIN V P. Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging [J]. *AAPS J*, 2007, 9(2): 128-147.
- [14] ZHAO H, WANG J C, LUO C L, et al. *In vitro* evaluation of GRGDS peptide modified liposomes containing paclitaxel [J]. *Chin J New Drugs(中国新药杂志)*, 2008, 17(23): 2034-2038.
- [15] PASTORINO F, BRIGNOLE C, MARIMPIETRI D, et al. Vascular damage and anti-angiogenic effects of tumor vessel-targeted liposomal chemotherapy [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(21): 7400-7409.
- [16] LO A, LIN C T, WU H C. Hepatocellular carcinoma cell-specific peptide ligand for targeted drug delivery [J]. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7(3): 579-589.