

• 综 述 •

纳米微粒与脑卒中的诊断和治疗

金桐 熊晓星

【中图分类号】 R743 【文献标识码】 A 【文章编号】 1007-0478(2018)05-0597-04

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2018.05.028

纳米微粒搭载传统药物可以使后者能在机体复杂内环境及代谢系统中保持相对稳定,并能跨越血脑屏障,在脑卒中病灶稳定释放药物,从而可以在脑卒中病程较长阶段中发挥诊断、治疗和监测作用。

脑卒中的发生难以预料且症状严重。目前临床上对于缺血性脑卒中的治疗方法仅有溶栓使血管再通效果显著,而营养神经、抗血管痉挛、降压、抗凝等治疗措施虽然有效,但不能直接对抗脑缺血及再灌注造成的急性脑损伤,而一些在体外实验中被证实很有潜力的药物面对机体的复杂的代谢环境和屏障作用等障碍难以在临床实际中投入使用;在诊断方面虽然目前在脑卒中发病入院后可以利用 CT、MRI 等传统影像学方法快速检查出梗死部位、体积等,但对于梗死原因的诊断缺乏有效性。由于多种病因共存,诊断直接病因较为困难,常规的血液学和生化检验并不能准确及时地评估血液成分异常。近些年来,纳米材料的兴起给脑卒中的诊断和治疗提供了更有效的新途径。

1 血脑屏障和脑卒中

1.1 血脑屏障的结构和功能

血脑屏障由内层脑微血管内皮细胞、内皮细胞间紧密连接、基底膜和包绕在毛细血管外的周细胞(类似于平滑肌细胞)、星形胶质细胞足突及血管周围巨噬细胞共同构成^[1]。周细胞可通过自身收缩来控制通过分子的大小,负责内皮细胞囊泡运输和紧密连接形成,还抑制增加血管渗透性的相关分子表达^[2]。星形胶质细胞足突穿插在周细胞间且与基底膜接触,共同促进内皮细胞间紧密连接的形成和维持,并且能增加跨内皮细胞电阻(TEER)。紧密连接主要由三种蛋白构成,包括跨膜蛋白(含 claudin、occludin、连接黏附分子 JAM)、胞质附着蛋白即闭锁小带(Zonula Occludens proteins, ZO-1, 2, 3)以及细胞骨架蛋白如肌动蛋白。除紧密连接外,还有钙粘素/链蛋白粘附连接复合体与细胞骨架相连。大脑毛细血管腔侧表达的 P-糖蛋白(P-gp)具有 ATP 依赖性外排泵功能,能降低某些对此蛋白具有亲和力的药物在胞内蓄积。正常情况下血脑屏障可以限制绝大多数小分子和几乎全部大分子物质进入脑组织。

1.2 脑卒中后血脑屏障破坏和继发性损伤

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81571147)

作者单位:430060 武汉大学人民医院神经外科[金桐 熊晓星(通信作者)]

发生脑卒中后血脑屏障严重受损,在 7 d 内无法重建正常功能^[3]。缺血性脑卒中不仅使血脑屏障紧密连接受到破坏,也会损伤形成和维持血脑屏障的周细胞、星形胶质细胞等,连接复合体上闭合蛋白减少,跨内皮细胞电阻减小,血脑屏障通透性增加。其结果是原本不存在于中枢神经系统的血管腔内流动成分如中性粒细胞、单核-巨噬细胞、前列腺素等细胞和分子可穿过血管壁离开管腔到达脑组织,促进局部炎症反应,加剧脑水肿,加上局部缺血缺氧、氧化应激导致的细胞毒性作用、凋亡以及外周免疫抑制^[4]的发生,可能导致局部和全身继发性损伤^[5]。神经元坏死和凋亡可以在脑卒中后的几个月内持续发生,且会波及到非梗死区域如海马、杏仁核、丘脑等,神经递质释放失衡、肺部感染^[6]、脑卒中再发、甚至自身免疫性疾病可能参与到继发性损伤过程并导致严重疾病如运动障碍和神经精神疾病^[7-8]。

1.3 当下脑卒中治疗方法的局限性

发生缺血性卒中后几分钟内梗死区域细胞主要是神经元出现坏死和凋亡,促炎症细胞如小胶质细胞的激活,外周中性粒细胞渗出,释放多种炎症因子,造成缺血区域周围组织可逆性损伤形成缺血半暗带,脑梗死中心区域由于长时间缺血缺氧,组织坏死严重难以恢复,但如果尽早采取有效治疗措施(如使血管再通),半暗带可以恢复^[9]。现阶段治疗缺血性脑卒中的药物疗效并不理想,一是因为缺血区域血流灌注不足,摄入的药物只有极少量可以到达梗死区域发挥作用,而周边区域血脑屏障功能正常,亦无法使药物通过;二是脑卒中时的血脑屏障损伤是可逆的,血脑屏障功能会逐步重建,此过程中药物将更难到达脑组织;三是通透率低的同时,药物自身降解以及被机体代谢将无法保证系统的有效药物浓度。目前药物通过血脑屏障的成功率为 4%~7%^[10]。通常血脑屏障允许通过的药物特点是亲脂性小分子。同时应用血管舒张药可以使药物通透率增加,但这种非选择性作用亦会让有害物质通过。

目前临床上真正实现商业应用的药物只有重组组织型纤溶酶原激活剂(rt-PA)。rt-PA 可使部分血管再通而减轻局部缺血缺氧,但这项治疗的有效性高度依赖时间,且如果缺血组织损伤过重,应用 rt-PA 可能会增加出血风险^[11]。抗凝药物也可以用于治疗缺血性脑卒中,但其应用仅限于预防或者怀疑有发病风险时,并不能阻止缺血后病情进展。治疗脑卒中的药物如果要保持其治疗的功效,那么在通过血脑屏障时不但要有足够的量,而且要能够维持其分子结构。因此,治疗缺血性脑卒中理想的药物须有高度稳定性以抵抗机

体的自然防御和代谢,同时不产生明显的细胞毒性而影响机体的正常功能,纳米微粒可以帮助实现这些。

2 纳米微粒的概述

2.1 药物输送和纳米微粒

目前纳米微粒在医学上分为三类,一是金、银、氧化锌等无机纳米微粒,尺寸介于1~100 nm;二是人工合成的有机高分子材料,包括聚氰基丙烯酸丁酯(PBCA)、聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)等,尺寸介于10~500 nm,碳量子点(CDs,1~10 nm)因其高生物学相容性和无毒特性,近来被用于神经系统疾病的研究中^[12];第三类是纳米脂质体(liposomes),尺寸介于400~2 500 nm。血脑屏障的物质转运可分为主动途径和被动途径。主动式包括三种,一是受体介导的胞吞作用,有机高分子材料大多经此途径;二是吸附后介导胞吞,纳米脂质体和无机金属纳米微粒可经此途径通过血脑屏障;三是与载体结合穿越细胞。通过被动途径转运的主要是一些亲脂性的小分子和无机金属纳米微粒,可以通过自由扩散的方式跨越血脑屏障。

纳米微粒的厚度和大小可显著影响疗效。囊性纳米微粒核心体积表面积比例(以下简称体表比)随着纳米微粒尺寸的变化而变化。例如在微粒囊厚度不变的情况下较小尺寸的纳米微粒体表比较小,一旦颗粒膜打破药物可以立即充分释放;大分子纳米微粒载药较多,但释放药物会不均匀、不彻底,故不如小分子纳米颗粒,而且如果纳米微粒被分解或者药物被包裹入胶囊隔层,则不能有效输送和释放药物。药物的释放时间点和速率也是纳米微粒载体有效性的指标,过早和过快的释放可能在药物到达病灶之前就会由机体代谢和分解,过慢的释放则难以起到有效的治疗作用。在脑卒中的诊疗方面理想的纳米微粒应该是能够高效率跨越血脑屏障,并可以在病灶中长期均匀释放药物。

2.2 生物化学修饰可使纳米微粒效能增强

纳米微粒的载体作用可通过其包装或者结合药物的功能实现。要增强纳米微粒作为药物载体的运输能力,可以引入由内皮细胞或免疫细胞(如吞噬细胞)识别的表面受体分子,或延长其类脂酸链,以增加亲脂性^[13],也可以利用生化材料包裹或化学修饰,或其它细胞组件或因子(如抗体、多肽、糖蛋白等)结合,通过前文所述多种途径而使药物到靶位。最近研究显示给纳米微粒添加1个聚乙二醇(PEG)高分子聚合物保护层,可以增加纳米微粒在循环系统中存在的时间,也增强了穿越细胞的能力^[14]。聚山梨醇酯包被的纳米微粒可与内皮细胞表面特定脂蛋白结合,增强其通过胞吞途径跨越血脑屏障的能力。针对与血脑屏障相关的转运蛋白是将药物准确送达中枢神经系统的最好方法之一。例如与不同分子量的聚乙二醇(PEG)结合的纳米脂质体(直径25~1 000 nm)上的胆固醇以葡萄糖修饰后可以被大脑血管内皮细胞葡萄糖转运体 GLUT1 识别并介导转运^[15]。

多种聚合物的使用相结合,或其它类型介质结合,能使有关药物输送和释放更可控。Nair 等^[16]将纳米脂质体与铁粒子结合,在磁力的作用下纳米脂质体穿过血脑屏障的效率增加了50%~100%。Zhang 等^[17]开发出一种酵母细胞

包裹的载有雷帕霉素的纳米材料,经口服后可在小肠由 M 细胞吸收,进入 Peyer's 淋巴结通过淋巴循环进入血液循环,由巨噬细胞摄取后可携带运送到炎症反应部位如聚集在粥样斑块。脑卒中时外周单核-巨噬细胞会进入缺血区域参与炎症反应,可以用此酵母细胞包裹载有更多类型的药物来进行“特洛伊木马”式的治疗,本团队目前正在进行相关工作。

3 脑卒中诊断与纳米微粒

得益于近些年对纳米材料的研究^[13],药物释放时间、纳米微粒尺寸、抗降解能力等将不再成为药物治疗缺血性脑卒中的障碍。有体外研究显示,他汀类药物或坎地沙坦可以封装在纳米微粒中,通过胞吞作用或跨细胞途径通过血脑屏障^[10,18]。传统与新兴技术可以结合,比如用纳米微粒搭载带标记的抗体(抗中枢神经系统损伤生物标志物如 S100 钙结合蛋白 B(S100B)、血管细胞黏附分子(VCAM)、胶质原纤维酸性蛋白 GFAP 等),用计算机断层扫描(CT)或磁共振成像(MRI)扫描快速检测出损伤部位和范围^[19]。如果纳米微粒有良好的抵抗体液成分分解的能力,可使其与凝血因子结合以达到对脑血栓形成的早期诊断,甚至破坏导致血栓形成的凝血因子级联反应^[19]。Lin 等在纳米微粒表面连接了一种凝血酶敏感性多肽,可以检测血液中凝血酶水平,进而对可能存在的血栓相关风险进行监控^[20]。

4 脑卒中治疗和纳米微粒

载药纳米微粒治疗效果的实验性研究、临床前研究以及早期临床试验的历史并不长。纳米材料在中枢神经系统疾病中的研究相比于其它学科也显得滞后。Hurtado 等^[21]将胞苷二磷酸胆碱——一种对再灌注损伤和局部缺血有神经保护功能的药物封装在适当纳米微粒中可以让药物通过循环系统进入中枢神经系统。在大鼠大脑中动脉闭塞(MCAO)模型中包裹碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)或 caspase-3 抑制剂(z-DEVD-FMK)的壳聚糖纳米微粒可通过转铁蛋白受体-1 介导的跨细胞转运途径大量穿透血脑屏障到达脑组织中,可检测到梗死侧大脑中动脉灌注区域血流灌注流失量减少^[22]。腺苷是一种具有神经药理活性的药物,但会在血液中快速代谢和清除,Alice 等最近的一项研究表明,鲨烯乙酸和腺苷共价结合后组装成鲨烯腺苷(SQAd)纳米药物在血液中可以保持稳定状态,在给大鼠腹腔注射用药后1h血液中有85%,2~4 h 稳定保持在70%^[23]。最近的研究表明,某些纳米微粒可以作为活性氧(ROS)清道夫。这些活性氧族在脑缺血期间增加,特别是在再灌注后。纳米微粒的使用并不局限于封装的药物或与表面受体结合。体内实验证实铂纳米颗粒具有清除超氧化物阴离子和过氧化氢的能力^[24]。二氧化铈纳米微粒具有同样的清除属性,铈由还原态变为氧化态的过程,类似于生物体抗氧化方式。这些纳米微粒尺寸更细微(小于10 nm),有作为药物治疗脑缺血再灌注损伤的潜力。

5 结束语

现阶段作为治疗脑卒中药物载体的纳米颗粒仍在研发和研究当中,尚存在诸多问题。一个难点是纳米颗粒释放药物的速度还不能稳定掌控。因纳米材料尺寸越大,效率越低,大分子纳米材料可能既不被靶位组织吸收,又会在合成过程中覆盖识别受体分子。要想增加通过血脑屏障的药物量,可以增加载药纳米颗粒的量,同时剂量增加可能造成对细胞毒性作用增强。目前已有对于纳米微粒毒性的报道, M. Koltereta 等对聚氰基丙烯酸丁酯(PBCA)纳米微粒进行的毒性实验表明,在纳米微粒浓度 $\leq 500 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时,对细胞生存状态无影响,不会引起大鼠血液炎症因子表达增多和器官损害,在对人血液 12 项炎症因子的检测中仅有 IL-8 一项释放增多^[26]。此外,另一种成熟纳米微粒 PLGA/PLA 及其复合多聚物的安全性及对中枢神经系统疾病疗效的实验成果已有诸多文献证明^[27]。前文已经提到多种方法提高载药纳米微粒的诊断或治疗效果,包括引入表面受体、调整尺寸、以 PEG 或其它高分子材料被覆、结合凝血标志物、以抗体标记等。未来应进一步优化纳米颗粒的结构、理化性质等参数,使其成为低副作用的高效药物载体。

脑卒中是一种对时间很敏感的疾病,早期诊断和治疗的时间决定着患者的预后。不幸的是,卒中的治疗局限多且时间窗口窄。脑卒中后血脑屏障通透性增强的 7 d 窗口期有利于输送药物,但这并不足够。一种真正有效的神经保护药物必须能有效通过血脑屏障,在血脑屏障功能逐渐恢复或完好时到达病灶起作用,也要能克服外周和中枢神经系统的其它障碍。治疗时应全面考虑急性期和慢性期、初始的和可能继发的神经损伤。纳米颗粒研究的进步将会使其成为脑卒中的诊断、治疗工具甚至兼具两者功能,从而更好地应用到临床实践中。

参 考 文 献

- [1] Daneman R, Prat A. The blood-brain barrier[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015, 7(1): a020412.
- [2] Stark K, Pekayvaz K, Massberg S. Role of pericytes in vascular immunosurveillance[J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2018, 23(3): 767-781.
- [3] Lakhan SE, Kirchgessner A, Tepper D, et al. Matrix metalloproteinases and blood-brain barrier disruption in acute ischemic stroke[J]. Front Neurol, 2013, 4(5): 32.
- [4] Gu LJ, Xiong XX, Ito T, et al. Moderate hypothermia inhibits brain inflammation and attenuates stroke-induced immunodepression in rats[J]. CNS Neurosci Ther, 2014, 20(1): 67-75.
- [5] Chen Y. Organophosphate-induced brain damage: mechanisms, neuropsychiatric and neurological consequences, and potential therapeutic strategies [J]. Neurotoxicology, 2012, 33(3): 391-400.
- [6] 简志宏, 王雷, 金桐, 等. 缺血性脑卒中后免疫反应与肺部感染之间相互作用的研究进展[J]. 卒中与神经疾病, 2016, 23(5): 386-389.
- [7] Chen Y, Garcia GE, Huang W, et al. The involvement of secondary neuronal damage in the development of neuropsychiatric disorders following brain insults[J]. Front Neurol, 2014, 5(4): 22.
- [8] Baron JC, Yamauchi H, Fujioka M, et al. Selective neuronal loss in ischemic stroke and cerebrovascular disease[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2014, 34(1): 2-18.
- [9] Zhang PL, Wang YX, Chen Y, et al. Use of intravenous thrombolytic therapy in acute ischemic stroke patients: evaluation of clinical outcomes[J]. Cell Biochem Biophys, 2015, 72(1): 11-17.
- [10] Sierra S, Ramos MC, Molina P, et al. Statins as neuroprotectants: a comparative in vitro study of lipophilicity, blood-brain barrier penetration, lowering of brain cholesterol, and decrease of neuron cell death[J]. J Alzheimers Dis, 2011, 23(2): 307-318.
- [11] Messé SR, Fonarow GC, Smith EE, et al. Use of tissue-type plasminogen activator before and after publication of the European Cooperative Acute Stroke Study III in Get With The Guidelines-Stroke[J]. Circ Cardiovasc Qual Outcomes, 2012, 5(3): 321-326.
- [12] Zheng M, Ruan S, Liu S, et al. Self-Targeting fluorescent Carbon Dots for diagnosis of brain cancer cells[J]. ACS Nano, 2015, 9(11): 11455-11461.
- [13] Mc Carthy DJ, Malhotra M, Omahony AM, et al. Nanoparticles and the blood-brain barrier: advancing from in-vitro models towards therapeutic significance[J]. Pharm Res, 2015, 32(4): 1161-1185.
- [14] Alyautdin R, Khalin I, Nafeeza MI, et al. Nanoscale drug delivery systems and the blood-brain barrier[J]. Int J Nanomedicine, 2014, 9(3): 795-811.
- [15] Xie F, Yao N, Qin Y, et al. Investigation of glucose-modified liposomes using polyethylene glycols with different chain lengths as the linkers for brain targeting[J]. Int J Nanomedicine, 2012, 7(3): 163-175.
- [16] Ding H, Sagar V, Agudelo M, et al. Enhanced blood-brain barrier transmigration using a novel transferrin embedded fluorescent magneto-liposome nanoformulation[J]. Nanotechnology, 2014, 25(5): 055101.
- [17] Zhou X, Zhang X, Han S, et al. Yeast Microcapsule-Mediated targeted delivery of diverse nanoparticles for imaging and therapy via the oral route[J]. Nano Lett, 2017, 17(2): 1056-1064.
- [18] So G, Nakagawa S, Morofuji Y, et al. Candesartan improves ischemia-induced impairment of the blood-brain barrier in vitro [J]. Cell Mol Neurobiol, 2015, 35(4): 563-572.
- [19] Jickling GC, Sharp FR. Blood biomarkers of ischemic stroke [J]. Neurotherapeutics, 2011, 8(3): 349-360.
- [20] Lin KY, Kwong GA, Warren AD, et al. Nanoparticles that sense thrombin activity as synthetic urinary biomarkers of thrombosis[J]. ACS Nano, 2013, 7(10): 9001-9009.
- [21] Hurtado O, Lizasoain I, Moro MÁ. Neuroprotection and recovery: recent data at the bench on citicoline[J]. Stroke, 2011, 42(1 Suppl): S33-S35.
- [22] Yemisci M, Caban S, Gursay Ozdemir Y, et al. Systemically administered brain-targeted nanoparticles transport peptides across the blood-brain barrier and provide neuroprotection[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2015, 35(3): 469-475.
- [23] Gaudin A, Yemisci M, Eroglu H, et al. Squalenoyl adenosine

nanoparticles provide neuroprotection after stroke and spinal cord injury[J]. Nat Nanotechnol, 2014, 9(12): 1054-1062.

[24] Takamiya M, Miyamoto Y, Yamashita T, et al. Strong neuroprotection with a novel Platinum nanoparticle against ischemic stroke- and tissue plasminogen activator-related brain damages in mice[J]. Neuroscience, 2012, 221(1): 47-55.

[25] Kim CK, Kim T, Choi IY, et al. Ceria nanoparticles that can protect against ischemic stroke[J]. Angewandte Chemie-International Edition, 2012, 51(44): 11039-11043.

[26] Kolter M, Ott M, Hauer C, et al. Nanotoxicity of poly(n-butylcyano-acrylate) nanoparticles at the blood-brain barrier, in human whole blood and in vivo[J]. J Control Release, 2015, 197(1): 165-179.

[27] Jy L, Sabliov C. PLA/PLGA nanoparticles for delivery of drugs across the blood-brain barrier[J]. Nanotechnology Reviews, 2013, 2(3): 241-257.

(2018-01-09 收稿)