

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.24.001

• 基础研究 •

APP/PS1 小鼠中 PEG-PLA 纳米粒的表面蛋白冠组成
及其脑内递送的实验研究*汤玉云 谷 晓 高金超 章 倩 黄 萌 汪安恬 余人和 高小玲[△]

(上海交通大学医学院药理学与化学生物学系 上海 200025)

摘要 目的:研究阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)模型鼠中聚乙二醇聚乳酸(poly(ethylene glycol)-poly(l-lactide), PEG-PLA)纳米粒表面蛋白冠组成及其对脑内递送特性的影响。**方法:**制备 PEG-PLA 纳米粒,测定纳米粒的 zeta 电位及粒径,采用透射电子显微镜观察纳米粒形态。通过双光子显微镜观察 APP/PS1 小鼠与野生型(Wild Type, WT)小鼠脑内 PEG-PLA 纳米粒分布特性。采用液相色谱-质谱联用(LC-MS)技术对 PEG-PLA 纳米粒分别与 APP/PS1 小鼠和 WT 小鼠血浆孵育形成的两种不同蛋白冠进行蛋白组学分析。**结果:**制备的 PEG-PLA 纳米粒粒径均一,分散性较好。静脉注射 PEG-PLA 后,APP/PS1 小鼠脑内纳米粒量明显高于 WT 小鼠。蛋白质组学结果显示,APP/PS1 小鼠血浆孵育组 PEG-PLA 纳米粒表面蛋白冠中凝聚素(Clusterin)明显高于 WT 小鼠血浆孵育组,该蛋白与纳米粒逃避机体清除有关。此外,纳米粒蛋白冠中血管性血友病因子(Von Willebrand factor)、玻连蛋白(Vitronectin)、肌球蛋白重链-9(Myosin-9)等参与细胞粘附作用相关蛋白在 APP/PS1 小鼠血浆孵育组也明显多于 WT 小鼠血浆孵育组。**结论:**PEG-PLA 纳米粒在 AD 模型小鼠中表现出的高入脑量,可能与 AD 疾病影响纳米粒蛋白冠组成有关。

关键词:PEG-PLA 纳米粒;脑内递送;阿尔茨海默病;蛋白冠

中图分类号:R-33;R94;R749.16 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2021)24-4601-08

The Study of Protein Corona Composition and Brain Delivery of PEG-PLA
Nanoparticles in APP/PS1 Mice*TANG Yu-yun, GU Xiao, GAO Jin-chao, ZHANG Qian, HUANG Meng, WANG An-tian, YU Ren-he, GAO Xiao-ling[△]

(Department of Pharmacology and Chemical Biology, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai, 200025, China)

ABSTRACT Objective: The aim of this study is to investigate the protein corona composition and the brain delivery of poly(ethylene glycol)-poly(l-lactide) (PEG-PLA) nanoparticles in Alzheimer's disease (AD) model mice. **Methods:** PEG-PLA nanoparticles were prepared. The particle size and zeta potential of the nanoparticles were measured, and their morphology were observed under transmission electron microscope. The distribution of PEG-PLA nanoparticles in the brain of APP/PS1 mice and wild type (WT) mice were observed under two-photon microscopy. Composition of the two different protein coronas on nanoparticles incubated in the APP/PS1 mice plasma and WT mice plasma were analyzed by LC-MS. **Results:** The prepared PEG-PLA nanoparticles exhibited uniform size and good dispersion. After intravenously administered with PEG-PLA nanoparticles, APP/PS1 mice showed higher content of nanoparticles in brain than that of WT mice. Proteomic analysis showed that clusterin in the protein corona formed on PEG-PLA nanoparticles in APP/PS1 mice plasma incubation group were much higher than that of WT mice plasma incubation group. Clusterin is related to the evasion of clearance of nanoparticles in vivo. In addition, some corona components related to cell adhesion such as von Willebrand factor, vitronectin and myosin-9 were higher in APP/PS1 mice plasma incubation group compared to WT mice plasma incubation group. **Conclusions:** AD model mice showed high content of PEG-PLA nanoparticles in the brain. This may be related to the protein corona composition influenced by AD state.

Key words: PEG-PLA nanoparticles; Brain delivery; Alzheimer's disease; Disease state

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R94; R749.16 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)24-4601-08

前言

纳米粒进入生物体循环后,能够吸附体循环中的蛋白质,这些包裹在纳米粒表面的蛋白质被称为蛋白冠^[1-3]。研究表明,

蛋白冠对纳米粒在体内的生物学过程有重要的调控作用,包括药代动力学、生物分布以及靶向能力等^[2]。然而,蛋白冠与脑内递送的相关性研究甚少。

纳米粒表面的蛋白冠是动态的,可根据纳米粒所处的生化

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81973272,92068111);国家科技重大专项(2018ZX09734005,2017ZX09304016)

作者简介:汤玉云(1996-),女,硕士研究生,主要研究方向:脑靶向药物递送,E-mail: tylevelyn@163.com

[△] 通讯作者:高小玲,女,博士生导师,研究员,主要研究方向:脑靶向药物递送,E-mail: shellygao1@sjtu.edu.cn

(收稿日期:2021-05-23 接受日期:2021-06-18)

环境(如血流速度、疾病状态等)发生变化^[45]。不同材料制备的纳米粒,如多聚物、脂质体和无机材料纳米粒,在生理环境中吸附的蛋白质不同。纳米粒的粒径、表面积、表面电位、亲疏水性等也影响蛋白冠的组成^[67]。在众多聚合物中,PEG-PLA 纳米粒因其良好的安全性以及临床转化能力而被广泛应用于药物递送^[89]。除外周疾病外,PEG-PLA 纳米粒作为递药载体具有应用于中枢疾病如 AD 治疗的潜力^[90]。有研究表明,不同疾病状态下(如肿瘤)形成的蛋白冠能够影响纳米粒的靶向能力^[91]。因此,本文探究了 PEG-PLA 纳米粒在 AD 疾病下 APP/PS1 小鼠脑内纳米粒的分布。同时,对 APP/PS1 小鼠和 WT 小鼠血浆孵育的纳米粒表面蛋白冠的成分进行蛋白组学研究,分析可能介导 PEG-PLA 入脑的关键蛋白质成分,为脑靶向纳米递药系统的设计和应用提供参考,对中枢神经系统疾病治疗手段的开发具有较重要的理论价值和现实意义。

1 材料与方法

1.1 试剂

聚乙二醇-聚乳酸(MePEG3000-PLA40000)由成都电子科技大学提供,DiI 荧光染料(美国 Thermo fisher 公司),二氯甲烷(国药集团化学试剂有限公司),胆酸钠(百灵威科技有限公司),磷钨酸溶液(中镜科仪技术有限公司),自凝牙托水、自凝牙托粉购自上海新世纪齿科材料有限公司。

1.2 实验动物

APP/PS1 小鼠与野生型(WT)同窝对照小鼠(雌性,7 月龄)购自南京大学-南京生物医学研究院(许可证号:SCXK(苏)2015-0001)。实验用鼠饲养于上海交通大学医学院动物科学部,动物实验严格遵守上海交通大学医学馆实验动物管理规范。

1.3 仪器

低温高速离心机、液相色谱质谱联用仪购自美国 Thermo fisher 公司,盖玻片(江苏世泰实验器材有限公司),超声波细胞粉碎机(新芝生物科技股份有限公司),电位粒度测定仪(英国 Malvern 公司),小鼠颅骨钻(韩国 Saeshin 精密仪器公司),双光子显微镜(日本 Olympus 公司),透射电子显微镜(日本 JEOL 公司)。

1.4 PEG-PLA 纳米粒的制备

称取 10 mg MePEG3000-PLA40000 化合物,分别加入 1 mL 二氯甲烷以及 2 mL 1%胆酸钠溶液。超声波细胞粉碎机 4%功率冰浴超声 2 min 后,将乳液倾入 18 mL 0.5%胆酸钠溶液中,采用磁力搅拌器搅拌 5 min,倒入干燥的 500 mL 烧瓶,采用旋转蒸发仪低温旋蒸约 10 min,将二氯甲烷溶剂充分挥发。随后于 4 °C、18000× g 离心 45 min。弃上清液,沉淀加入 1 mL PBS 复溶,制得 PEG-PLA 纳米粒。PEG-PLA 采用 DiI 作为荧光探针,制备方法与上述流程基本相同。首先,称取 10 mg MePEG3000-PLA40000 和 0.1 mg DiI,超声、搅拌、旋蒸以及离心的方法步骤同上。PBS 复溶后,采用 Sepharose CL-4B 凝胶柱去除溶液中游离的 DiI。

1.5 纳米粒的表征

纳米粒浓度采用浊度法进行测定。通过倍比稀释法制得一系列浓度梯度的纳米粒标准溶液,使用紫外分光光度计测定

350 nm 波长下的吸光度并绘制浓度 (mg/mL)-吸光度标准曲线,将样品吸光度代入标准曲线,得到纳米粒样品浓度。纳米粒的 zeta 电位及粒径采用电位粒度分析仪测定。纳米粒样品经磷钨酸溶液负染后,采用透射电子显微镜(Transmission electron micrograph, TEM)观察形态。

1.6 双光子显微镜观察小鼠脑内 DiI-PEG-PLA 分布

APP/PS1 小鼠(n=6)及 WT 小鼠(n=6)腹腔注射氯胺酮(100 mg/kg)和赛拉嗪(10 mg/kg)麻醉后,固定于适配器上。将小鼠头部毛发剃除,剪开头部表皮,用含有 5% H₂O₂ 的棉球轻轻擦拭颅骨以腐蚀去除骨膜。随后在前囟侧后方 1 mm 作直径为 2~3 mm 的颅窗,将修裁好的盖玻片浸泡于 0.9% NaCl 中,盖于颅窗上。随后用牙科水泥在颅窗周围封上一圈,固定盖玻片。随后尾静脉注射 DiI-PEG-PLA(50 mg/kg)纳米粒溶液,采用双光子显微镜观察脑内纳米粒的分布情况。

1.7 LC-MS 检测血浆蛋白及纳米粒表面蛋白冠的组成

① 血浆蛋白样品处理:APP/PS1 与 WT 小鼠血浆用 PBS 稀释 20 倍,取 80 μL 于 EP 管,加入 20 μL 10% SDS,于 100 °C 加热 10 min。② 蛋白冠样品处理:取 300 μL 10 mg/mL PEG-PLA 纳米粒与 300 μL 50%血浆(APP/PS1 或 WT 小鼠血浆)混合后 37 °C 恒温摇床孵育 1 h。于 4 °C、18000× g 离心 10 min, PBS 清洗 2 遍,除去血浆残留,获得孵育了蛋白冠的纳米粒(APP-NP-corona 或 WT-NP-corona)。将纳米粒-蛋白冠复合物用 80 μL PBS 重悬,加入 20 μL 10% SDS 洗脱蛋白冠,100 °C 加热 10 min,于 4 °C、18000× g 离心 10 min,收集上清液。将制得的 APP/PS1 与 WT 小鼠血浆蛋白样品(各组 n=4)、APP-NP-corona 与 WT-NP-corona 蛋白冠样品(各组 n=3)进行 LC-MS 检测。

1.8 统计方法

本文计量系数采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。利用 Spec-tronaut X (Biognosys, Switzerland)对 LC-MS 数据进行分析,将 Spectronaut 输出文件中的样本进行归一化处理,并使用 ANOVA(3.5.1)进行蛋白质丰度的计算。两组间的比较采用 t 检验,筛选出 $P < 0.05$ 的蛋白质。

2 结果

2.1 PEG-PLA 纳米粒的表征

将制备的 PEG-PLA 纳米粒置于透射电子显微镜观察,纳米粒呈规则的圆形(图 1A)。电位粒度分析仪测得 PEG-PLA 纳米粒径为 83.20 ± 7.47 nm, zeta 电位为 -18.7 ± 3.2 mV, 分散系数(PdI)为 0.151 ± 0.008 , 具有较好的均一性(图 1B, 表 1)。红色荧光探针 DiI 标记的 PEG-PLA 纳米粒粒径为 92.07 ± 4.62 nm, zeta 电位为 -17.6 ± 1.2 mV, 分散系数为 0.135 ± 0.006 , 表明荧光探针对纳米粒的粒径和电位影响较小(表 1)。

2.2 PEG-PLA 纳米粒在 APP/PS1 小鼠与 WT 小鼠的脑内分布

采用双光子显微镜观察小鼠在疾病与健康状态下 PEG-PLA 纳米粒脑内分布的差异。观察结果显示,与 WT 小鼠相比,APP/PS1 小鼠脑血管和脑实质的 DiI-PEG-PLA 分布显著增高。纳米粒在 AD 模型鼠 APP/PS1 小鼠上表现出较 WT 小鼠更高的脑靶向性(图 2)。

2.3 APP/PS1 小鼠与 WT 小鼠血浆蛋白质组学比较

疾病状态下小鼠血浆蛋白质成分可能会发生变化,从而影响纳米粒对血浆蛋白的吸附。对 APP/PS1 小鼠与 WT 小鼠血浆进行蛋白质组学分析,结果显示,二者血浆蛋白质的种类与含量存在差异(图 3A,图 3B)。韦恩图显示 APP/PS1 小鼠血浆含 379 种蛋白质,WT 小鼠血浆含 389 种蛋白质,两者共同拥

有的蛋白质 367 种,APP/PS1 小鼠血浆特有蛋白质 12 种,WT 小鼠血浆特有蛋白质 22 种(图 3A)。对 APP/PS1 小鼠血浆中较 WT 小鼠血浆差异比值大于 1.5 的前 30 种差异蛋白质进行整理与分类(图 3C,表 2),图 3C 中显示免疫炎症相关的蛋白质种类最多,包括免疫球蛋白、补体、急性时相反应蛋白等。

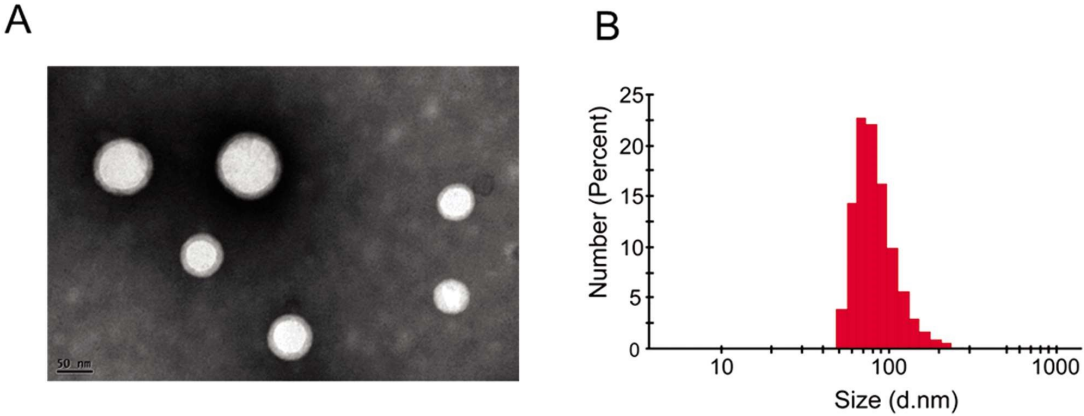


图 1 PEG-PLA 纳米粒的表征

Fig.1 The characterization of PEG-PLA nanoparticles

Note: (A) The morphology of PEG-PLA nanoparticles under TEM;

(B) The particle size distribution of PEG-PLA nanoparticles under dynamic light scattering.

表 1 纳米粒的粒径,zeta 电位值及 Pdl 值

Table 1 Particle size, zeta potential and PDI of the nanoparticles

Sample Name	PDI	Particle Size (d.nm)	Zeta Potential (mV)
PEG-PLA	0.151± 0.008	83.20± 7.47	-18.7± 3.2
DiI-PEG-PLA	0.135± 0.006	92.07± 4.62	-17.6± 1.2

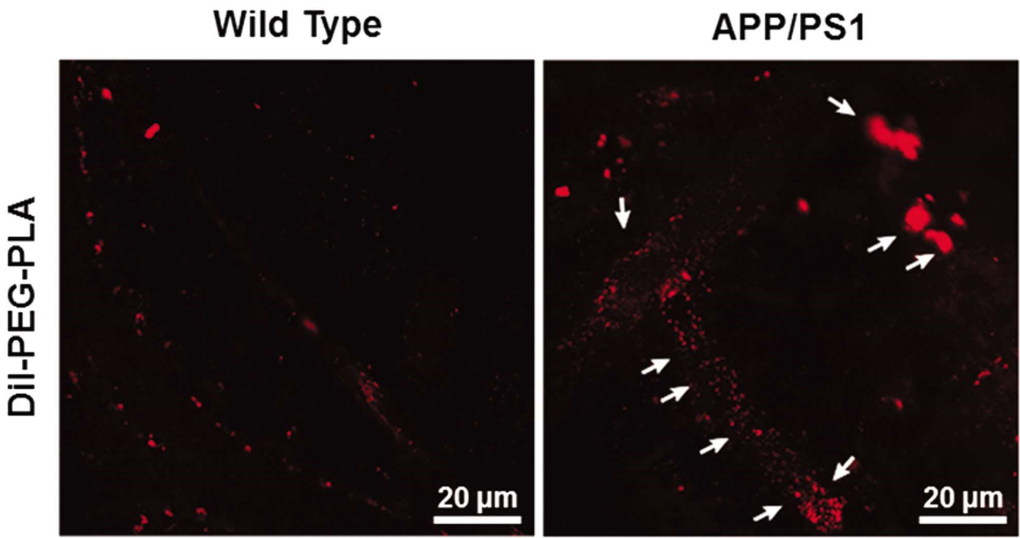


图 2 双光子显微镜观察 APP/PS1 小鼠与 WT 小鼠脑内PEG-PLA 纳米粒分布情况

Fig.2 The distribution of PEG-PLA nanoparticles in the brain of APP/PS1 mice and WT mice under two-photon microscope

2.4 蛋白质组学分析 APP/PS1 与 WT 小鼠血浆孵育纳米粒的蛋白冠成分

纳米粒表面吸附蛋白冠的成分会随着不同体液环境而发生变化。将 PEG-PLA 纳米粒分别与 APP/PS1、WT 小鼠血共孵育,制备 APP-NP-corona、WT-NP-corona 纳米粒-蛋白冠复合

物,蛋白质组学分析显示,APP-NP-corona 与 WT-NP-corona 的蛋白冠成分有明显变化(图 4A,图 4B)。韦恩图显示,APP-NP-corona 表面蛋白冠中含 621 种蛋白质,WT-NP-corona 表面蛋白冠中含 652 种蛋白质,二者共同拥有 592 种蛋白质,APP-NP-corona 吸附特有的蛋白质 29 种,WT-NP-corona 吸附

特有的蛋白质 60 种(图 4A)。值得注意的是,纳米粒吸附的血浆蛋白质有选择性富集现象,载脂蛋白在纳米粒表面大量富集,如载脂蛋白 A-IV(Apolipoprotein A-IV)在蛋白冠上为含量

最高的蛋白质,约占 25%(图 4B),而在血浆中含量约为 1%(图 3B)。饼状图统计显示,APP-NP-corona、WT-NP-corona 的蛋白冠成分中载脂蛋白的种类均最多(图 4C)。

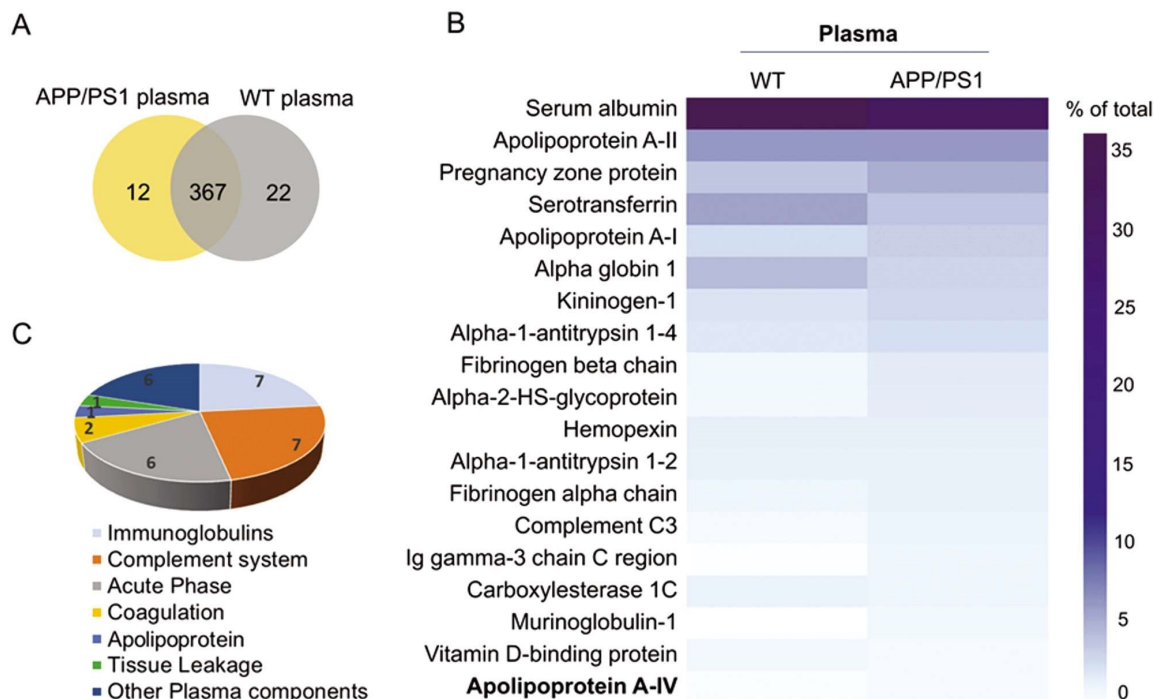


图 3 APP/PS1 小鼠与 WT 小鼠血浆蛋白质组学分析

Fig.3 Plasma proteomic analysis of APP/PS1 mice and WT mice

Note: (A) The Venn diagram of APP/PS1 and WT mice plasma. (B) Heatmap of most abundant protein detectable in the WT and APP/PS1 mice plasma. Only proteins with relative abundance over total (% of total) > 1% are shown. (C) The classification of top 30 proteins that above 1.5 fold increase in abundance in the plasma of APP/PS1 mice compared to that of WT mice.

表 2 APP/PS1 小鼠血浆中较 WT 小鼠血浆差异比值大于 1.5 的前 30 种差异蛋白质

Table 2 Top 30 proteins that above 1.5 fold increase in abundance in the plasma of APP/PS1 mice compared to that of WT mice

Rank No.	Protein names	Fold change	Rank No.	Protein names	Fold change
1	Immunoglobulin kappa chain variable 12-89	17.15	16	Properdin	2.05
2	Beta-globin	10.41	17	Gelsolin	1.95
3	Serum amyloid A-1 protein	5.72	18	Complement C4-B	1.94
4	Immunoglobulin kappa variable 8-16	3.56	19	Immunoglobulin kappa variable 1-135	1.90
5	Immunoglobulin heavy variable V1-11	3.14	20	Alpha-1-antitrypsin 1-5	1.88
6	Complement C1q subcomponent subunit A	3.03	21	Thyroxine-binding globulin	1.77
7	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1	2.94	22	Complement C1q subcomponent subunit B	1.72
8	Ig gamma-3 chain C region	2.59	23	Coagulation factor XIII A chain	1.69
9	Immunoglobulin heavy variable 6-3	2.55	24	Alpha-1-antitrypsin 1-1	1.68
10	Ceruloplasmin	2.48	25	Immunoglobulin heavy constant gamma 2C	1.67
11	Fibrinogen gamma chain	2.39	26	Complement C1q subcomponent subunit C	1.66
12	Apolipoprotein C-IV	2.28	27	Zinc-alpha-2-glycoprotein	1.66
13	Alpha-2-macroglobulin-P	2.17	28	Alpha-2-HS-glycoprotein	1.64
14	Murineoglobulin-1	2.16	29	Complement component C8 alpha chain	1.62
15	Alpha-2-antiplasmin	2.14	30	Complement factor D	1.60

随后筛选出 APP-NP-corona 较 WT-NP-corona 表面蛋白冠成分中差异比值大于 1.5 的前 30 种差异蛋白质。表 3 显示

APP-NP-corona 表面蛋白冠中存在 β -珠蛋白 (Beta-globin) 的大量富集, 目前尚未了解该蛋白对于纳米粒循环靶向的意义。

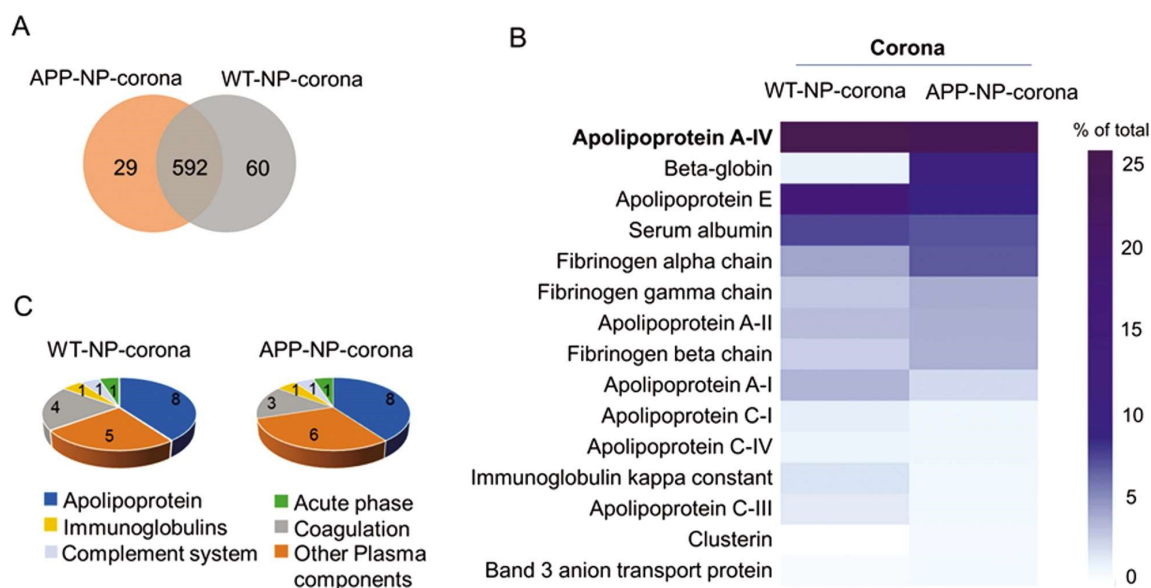


图 4 APP-NP-corona 和 WT-NP-corona 表面蛋白冠成分的蛋白质组学分析

Fig.4 Proteomic analysis of the protein corona composition of APP-NP-corona and WT-NP-corona

Note: (A) The Venn diagram of APP-NP-corona and WT-NP-corona. (B) Heatmap of most abundant protein detectable in APP-NP-corona and WT-NP-corona. Only proteins with % of total > 1% are shown. (C) The classification of top 20 most-abundant protein detectable in APP-NP-corona and WT-NP-corona.

APP-NP-corona 与 WT-NP-corona 表面蛋白冠中, beta-globin 的比例为 7.95:1, 与 APP/PS1 与 WT 小鼠血浆中该蛋白的比例 10.41:1 接近(表 2), 提示纳米粒对 beta-globin 的吸附是非特异的。值得注意的是, APP-NP-corona 表面蛋白冠中凝聚素 (Clusterin) 的含量高于 WT-NP-corona (1.99:1), 而 APP/PS1 和 WT 小鼠血浆中该蛋白的含量没有显著差异, 初步说明在 APP/PS1 小鼠血浆中, PEG-PLA 纳米粒对 clusterin 的选择性高于 WT 小鼠血浆。Clusterin 又称为载脂蛋白 J, 有研究表明, clusterin 能提高纳米粒在血液中的循环时间, 减少非特异性摄取, 对于 PEG 修饰纳米粒逃避机体清除上起关键作用^[7,12]。此外, 血管性血友病因子 (Von Willebrand factor)、玻连蛋白 (Vit-

ronectin) 及肌球蛋白重链 -9 (Myosin-9) 这些与细胞粘附有关的蛋白质在 APP-NP-corona 上的吸附均高于 WT-NP-corona, 这可能有利于纳米粒的靶向作用。表 4 和表 5 分别显示了 APP-NP-corona 及 WT-NP-corona 表面蛋白冠中测定的特有蛋白质成分。聚合酶 I 和转录物释放因子 (Caveolae-associated protein 1) 为 APP-NP-corona 特有蛋白质, 它对于小窝蛋白的形成及功能有着重要作用^[13], 可能促进小窝蛋白介导的跨细胞转运作用。而网格蛋白轻链 (Clathrin light chain) 为 WT-NP 特有蛋白质, 可能有利于网格蛋白介导的内吞作用。这些结果提示, AD 疾病与健康状态下组织摄取转运纳米粒的机制可能不同。

表 3 APP-NP-corona 较 WT-NP-corona 表面蛋白冠成分中差异比值大于 1.5 的前 30 种差异蛋白质

Table 3 Top 30 proteins that above 1.5 fold increase in abundance in the protein corona of APP-NP-corona compared to WT-NP-corona

Rank No.	Protein names	Fold change	Rank No.	Protein names	Fold change
1	Voltage-dependent anion-selective channel protein 3	11.54	16	BPI fold-containing family A member 2	2.19
2	Beta-globin	7.95	17	Platelet glycoprotein Ib alpha chain	2.09
3	Serum amyloid A-1 protein	7.13	18	von Willebrand factor	2.02
4	Immunoglobulin heavy constant alpha	3.40	19	Small integral membrane protein 1	2.01
5	Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-13	3.33	20	Clusterin	1.99
6	MCG140784	3.31	21	Glutathione peroxidase 3	1.94
7	Alpha-synuclein	3.12	22	Myosin-9	1.81
8	Immunoglobulin kappa variable 6-32	3.05	23	Vitronectin	1.79
9	Glycophorin-A	2.94	24	Fibrinogen alpha chain	1.77
10	Histone H4	2.78	25	GTP-binding nuclear protein Ran	1.74
11	Myosin regulatory light polypeptide 9	2.68	26	Sulfhydryl oxidase 1	1.67

12	Immunoglobulin kappa chain variable 19-93	2.67	27	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1.65
13	Haptoglobin	2.65	28	Fibrinogen beta chain	1.57
14	Tubulin alpha-4A chain	2.48	29	Alpha-2-HS-glycoprotein	1.53
15	Mannose-binding protein C	2.23	30	Fibrinogen gamma chain	1.51

表 4 APP-NP-corona 特有的蛋白质成分
Table 4 The unique proteins of APP-NP-corona

Rank No.	unique proteins in the APP-NP-corona	% of protein corona	Rank No.	unique proteins in the APP-NP-corona	% of protein corona
1	Programmed cell death 6-interacting protein	0.0202	16	Guanine nucleotide-binding protein subunit gamma	0.0017
2	Serum amyloid A protein	0.0079	17	Ig kappa chain V-III region PC 7175	0.0016
3	Dehydrogenase/reductase SDR family member 11	0.0078	18	Rho-related GTP-binding protein RhoG	0.0015
4	Protein S100-A10	0.0068	19	Tubulin alpha-8 chain	0.0015
5	Immunoglobulin heavy variable V1-20	0.0058	20	Heat shock protein HSP 90-beta	0.0014
6	Ig heavy chain V region 3-6	0.0046	21	Nucleosome assembly protein 1-like 1	0.0010
7	Ig kappa chain V-II region 17S29.1	0.0042	22	ATP synthase subunit delta mitochondrial	0.0010
8	Major facilitator superfamily domain-containing protein 2B	0.0040	23	40S ribosomal protein S4 X isoform	0.0006
9	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	0.0029	24	Immunoglobulin kappa chain variable 4-72	0.0006
10	Tyrosine-protein kinase SYK	0.0025	25	Glutathione S-transferase Mu 3	0.0004
11	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 1	0.0025	26	PRA1 family protein 3	0.0003
12	Plexin-A2	0.0024	27	Caveolae-associated protein 1	0.0002
13	Protein lin-52 homolog	0.0023	28	Ras-related protein Ral-B	0.0002
14	Nck-associated protein 1	0.0019	29	Desmoglein-1-alpha	0.0001
15	Immunoglobulin heavy variable 1-52	0.0018			

表 5 WT-NP-corona 特有的蛋白质成分
Table 5 The unique proteins of WT-NP-corona

Rank No.	unique proteins in the WT-NP-corona	% of protein corona	Rank No.	unique proteins in the WT-NP-corona	% of protein corona
1	ADP-ribosylation factor 5	0.0181	16	Immunoglobulin heavy constant mu	0.0025
2	60S ribosomal protein L37a	0.0113	17	Proteasome subunit beta type-5	0.0024
3	Citrate synthase mitochondrial	0.0056	18	FH1/FH2 domain-containing protein 1	0.0023
4	Ig heavy chain V region 5-76	0.0051	19	Phosphodiesterase	0.0022
5	Immunoglobulin heavy variable V14-3	0.0044	20	Immunoglobulin heavy variable 9-4	0.0019
6	DNA topoisomerase 1	0.0044	21	Zinc finger protein with KRAB and SCAN domains 3	0.0019
7	Anoctamin	0.0043	22	Phosphatidylinositol phosphatase SAC1	0.0017
8	Interferon gamma-induced GTPase	0.0040	23	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	0.0015
9	Myosin heavy polypeptide 13 skeletal muscle	0.0039	24	Immunoglobulin kappa variable 10-94	0.0015
10	Leukemia inhibitory factor receptor	0.0038	25	Immunoglobulin kappa variable 4-58	0.0015
11	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	0.0037	26	2-acylglycerol	0.0013
12	Clathrin light chain	0.0036	27	Very-long-chain enoyl-CoA reductase	0.0013

13	Adipocyte plasma membrane-associated protein	0.0029	28	Peroxioredoxin-6	0.0012
14	Immunoglobulin heavy variable 1-53	0.0028	29	60S ribosomal protein L35	0.0011
15	Unconventional myosin-X	0.0026	30	26S proteasome regulatory subunit 8	0.0011

3 讨论

血脑屏障(Blood-brain barrier, BBB)是血液系统与脑组织间存在一种屏障系统,它为保持中枢神经系统内环境的相对稳定性提供了重要的结构基础,但同时也极大限制了药物的脑内递送^[14,15]。据统计,目前临床使用的药物中,约有 98%的小分子化学药物以及接近 100%的蛋白/多肽和基因药物均难以入脑^[16]。跨越 BBB 递药是实现脑部疾病药物治疗必须解决的首要问题。近年来,纳米技术的发展为蛋白/多肽、基因、甚至小分子化学药物等的脑内递送提供了重要的手段^[17]。

纳米粒由于自身特性,包括高表面自由能、表面电荷、疏水性等,进入生物体循环后,能够吸附体循环中的蛋白质而形成蛋白冠,极大影响了纳米粒的生物学特性^[18,19]。然而 AD 疾病状态下,蛋白冠对于纳米粒脑内转运的影响尚不明确。因此本研究以 APP/PS1 小鼠作为 AD 疾病模型鼠,与健康小鼠(WT)进行了 PEG-PLA 纳米粒入脑量的差异比较。研究结果显示,健康小鼠尾静脉注射 PEG-PLA 纳米粒后,脑内 PEG-PLA 分布含量极少,而 APP/PS1 小鼠脑内 PEG-PLA 分布含量较高,提示小鼠的病理生理状态影响了 PEG-PLA 纳米粒的脑内分布。

传统观点认为 AD 伴随着 BBB 损伤, BBB 通透性会增加。然而近年来的研究发现,在 AD 的发生发展过程中,尽管 BBB 受到一定损伤,药物渗透性并未增加^[20],反而脑血管密度和脑血流量的下降使药物的脑内递送面临更大的挑战^[21]。另外,AD 的发生发展与炎症免疫的相关性受到越来越多的关注^[22,23]。因此,PEG-PLA 在 AD 模型鼠 APP/PS1 小鼠脑中分布含量较高可能不是因为 BBB 通透性增加,而是体内炎症状态影响了 PEG-PLA 的生物学特性,提高了其脑靶向能力。

PEG-PLA 纳米粒进入血液循环后能够吸附血浆蛋白而形成蛋白冠。本研究推测,AD 疾病和健康状态下纳米粒表面蛋白冠的组分发生了改变,从而影响纳米粒的脑内递送特性。研究结果表明,APP/PS1 小鼠血浆与 WT 小鼠血浆蛋白质成分存在差异,且主要在免疫炎症相关的蛋白质成分上显示出差异,提示 AD 疾病进程中表现出炎症状态。此外,蛋白质组学定量分析显示,APP/PS1 小鼠血浆、WT 小鼠血浆体外孵育 PEG-PLA 纳米粒后,纳米粒表面吸附的蛋白冠成分存在显著差异,APP/PS1 小鼠血浆来源的蛋白冠显示出 clusterin 的富集,这可能有利于纳米粒逃避机体清除,延长其在血液循环系统中滞留的时间^[7,12]。与此同时,von Willebrand factor、vitronectin 及 myosin-9 等与细胞粘附相关的蛋白质的吸附明显增多,这些差异可能与 PEG-PLA 纳米粒在 AD 疾病状态下表现的高脑靶向性相关。

以往的研究多关注于蛋白冠对纳米粒主动靶向的阻碍、诱导“脱靶效应”、加速纳米粒清除甚至产生毒性^[24],而近年越来越多的研究提出蛋白冠对纳米粒应用积极的一面^[25,26]。多种具

有靶向功能的蛋白质,如载脂蛋白 A-I、载脂蛋白 E、转铁蛋白、胰岛素,被用于设计靶向肿瘤的纳米递药系统^[27,28]。通过调控蛋白冠的组成来设计新型纳米载体,为更加安全和有效的纳米递药系统的开发提供了新的方向。因此,蛋白冠的组成、性质及其发挥生物效应过程的不断探究,对于新型靶向纳米药物的设计具有重要意义。

综上所述,本文证实了 PEG-PLA 纳米粒脑靶向性提高与 AD 疾病状态存在相关性。通过蛋白质组学分析,本研究发现 AD 疾病与健康状态下的小鼠血浆在免疫相关蛋白质等成分上存在差异,这些差异导致纳米粒表面吸附蛋白冠的成分如 clusterin、参与细胞粘附的相关蛋白质等发生变化,可能引起纳米粒在 AD 疾病与健康小鼠中不同的脑靶向性。本研究揭示了 AD 疾病状态对 PEG-PLA 纳米粒脑内递送及纳米粒表面蛋白冠组成的影响,为新型脑靶向纳米药物的研究开发提供了实验依据。

参考文献(References)

- [1] Cai R, Chen C. The Crown and the Scepter: Roles of the Protein Corona in Nanomedicine[J]. Adv Mater, 2019, 31(45): e1805740
- [2] Caracciolo G, Farokhzad OC, Mahmoudi M. Biological Identity of Nanoparticles In Vivo: Clinical Implications of the Protein Corona[J]. Trends in Biotechnology, 2017, 35(3): 257-264
- [3] Weiss ACG, Kelly HG, Faria M, et al. Link between Low-Fouling and Stealth: A Whole Blood Biomolecular Corona and Cellular Association Analysis on Nanoengineered Particles [J]. ACS Nano, 2019, 13(5): 4980-4991
- [4] Polyak B, Cordovez B. How can we predict behavior of nanoparticles in vivo?[J]. Nanomedicine, 2016, 11(3): 189-192
- [5] Hadjide metriou M, Al-Ahmady Z, Buggio M, et al. A novel scavenging tool for cancer biomarker discovery based on the blood-circulating nanoparticle protein corona[J]. Biomaterials, 2019, 188: 118-129
- [6] Francia V, Yang K, Deville S, et al. Corona Composition Can Affect the Mechanisms Cells Use to Internalize Nanoparticles[J]. ACS Nano, 2019, 13(10): 11107-11121
- [7] Bertrand N, Grenier P, Mahmoudi M, et al. Mechanistic understanding of in vivo protein corona formation on polymeric nanoparticles and impact on pharmacokinetics [J]. Nature Communications, 2017, 8(1): 777
- [8] Gu X, Song QX, Zhang Q, et al. Clearance of two organic nanoparticles from the brain via the paravascular pathway [J]. Journal of Controlled Release, 2020, 322: 31-41
- [9] Shin HC, Cho H, Lai TC, et al. Pharmacokinetic study of 3-in-1 poly(ethylene glycol)-block-poly(D, L-lactic acid) micelles carrying paclitaxel, 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin, and rapamycin[J]. J Control Release, 2012, 163(1): 93-99
- [10] Yao L, Gu X, Song Q, et al. Nanoformulated alpha-mangostin ameliorates Alzheimer's disease neuropathology by elevating LDLR ex-

- pression and accelerating amyloid-beta clearance [J]. *J Control Release*, 2016, 226: 1-14
- [11] Yu L, Xu MY, Xu WW, et al. Enhanced Cancer-targeted Drug Delivery Using Precoated Nanoparticles [J]. *Nano Lett*, 2020, 20 (12): 8903-8911
- [12] Schottler S, Becker G, Winzen S, et al. Protein adsorption is required for stealth effect of poly (ethylene glycol)- and poly(phosphoester)-coated nanocarriers[J]. *Nature Nanotechnology*, 2016, 11(4): 372-377
- [13] Wang L, Yang C, Wang Q, et al. Homotrimer cavin1 interacts with caveolin1 to facilitate tumor growth and activate microglia through extracellular vesicles in glioma [J]. *Theranostics*, 2020, 10 (15): 6674-6694
- [14] Dong X. Current Strategies for Brain Drug Delivery[J]. *Theranostics*, 2018, 8(6): 1481-1493
- [15] Dai T, Jiang K, Lu W. Liposomes and lipid disks traverse the BBB and BBTB as intact forms as revealed by two-step Forster resonance energy transfer imaging[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2018, 8(2): 261-271
- [16] Furtado D, Bjornmalm M, Ayton S, et al. Overcoming the Blood-Brain Barrier: The Role of Nanomaterials in Treating Neurological Diseases[J]. *Adv Mater*, 2018, 30(46): e1801362
- [17] Zhou Y, Peng Z, Seven ES, et al. Crossing the blood-brain barrier with nanoparticles[J]. *J Control Release*, 2018, 270: 290-303
- [18] Pederzoli F, Tosi G, Vandelli MA, et al. Protein corona and nanoparticles: how can we investigate on? [J]. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2017, 9(6):doi: 10.1002/wnan.1467.
- [19] Chen D, Ganesh S, Wang W, et al. Plasma protein adsorption and biological identity of systemically administered nanoparticles [J]. *Nanomedicine (Lond)*, 2017, 12(17): 2113-2135
- [20] Ulrich JD, Huynh TP, Holtzman DM. Re-evaluation of the Blood-Brain Barrier in the Presence of Alzheimer's Disease Pathology [J]. *Neuron*, 2015, 88(2): 237-239
- [21] Love S, Miners JS. Cerebrovascular disease in ageing and Alzheimer's disease[J]. *Acta Neuropathol*, 2016, 131(5): 645-658
- [22] Gonzalez B, Abud EM, Abud AM, et al. Tau Spread, Apolipoprotein E, Inflammation, and More: Rapidly Evolving Basic Science in Alzheimer Disease[J]. *Neurol Clin*, 2017, 35(2): 175-190
- [23] Goldeck D, Witkowski JM, Fulop T, et al. Peripheral Immune Signatures in Alzheimer Disease [J]. *Curr Alzheimer Res*, 2016, 13 (7): 739-749
- [24] Chen F, Wang G, Griffin JI, et al. Complement proteins bind to nanoparticle protein corona and undergo dynamic exchange in vivo [J]. *Nat Nanotechnol*, 2017, 12(4): 387-393
- [25] Nguyen VH, Lee BJ. Protein corona: a new approach for nanomedicine design[J]. *Int J Nanomed*, 2017, 12: 3137-3151
- [26] Zhang Z, Guan J, Jiang Z, et al. Brain-targeted drug delivery by manipulating protein corona functions [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 3561
- [27] Kreuter J, Hekmatara T, Dreis S, et al. Covalent attachment of apolipoprotein A-I and apolipoprotein B-100 to albumin nanoparticles enables drug transport into the brain[J]. *Journal of Controlled Release*, 2007, 118(1): 54-58
- [28] Zensi A, Begley D, Pontikis C, et al. Albumin nanoparticles targeted with Apo E enter the CNS by transcytosis and are delivered to neurons[J]. *Journal of Controlled Release*, 2009, 137(1): 78-86

(上接第 4631 页)

- [26] Prasad PA, Fang MC, Abe-Jones Y, et al. Time to Recognition of, Sepsis, in the Emergency Department Using Electronic Health Record Data: A Comparative Analysis of Systemic, Inflammatory Response, Syndrome, Sequential Organ Failure Assessment, and Quick Sequential Organ Failure Assessment[J]. *Crit Care Med*, 2020, 48(2): 200-209
- [27] Zhou YX, Han WW, Song DD, et al. Effect of miR-10a on sepsis-induced liver injury in rats through TGF- β 1/Smad signaling pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(2): 862-869
- [28] Li X, Zhang W, Li P, et al. The protective effect and mechanism of lentinan on acute kidney injury in septic rats [J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(14): 883
- [29] Iba T, Levy JH, Warkentin TE, et al. Diagnosis and management of sepsis-induced coagulopathy and disseminated intravascular coagulation[J]. *J Thromb Haemost*, 2019, 17(11): 1989-1994
- [30] Zhou W, Zhou W, Bai J, et al. TEG in the monitoring of coagulation changes in patients with sepsis and the clinical significance [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 17(5): 3373-3382
- [31] Engoren M, Seelhammer T, Freundlich RE, et al. A Comparison of, Sepsis-2 (Systemic, Inflammatory, Response, Syndrome Based) to, Sepsis-3 (Sequential Organ Failure Assessment Based) Definitions-A Multicenter Retrospective Study [J]. *Crit Care Med*, 2020, 48 (9): 1258-1264
- [32] Zotova NV, Zhuravleva YV, Zubova TE, et al. Integral estimation of systemic, inflammatory, response, under, sepsis [J]. *Gen Physiol Biophys*, 2020, 39(1): 13-26