

微循环，纳米医学的研究平台

李爱玲 综述 修瑞娟 审校

(中国医学科学院, 北京协和医学院, 微循环研究所, 北京 100005)

[摘要] 微循环作为机体最小的循环单位,极大地影响纳米药物的运输、代谢,成为纳米医学研究的重要平台;特别是微血管内皮细胞在纳米医学的靶向性研究、安全性检测和疾病诊断中发挥了重要作用,推动了肿瘤及其他微血管相关疾病的诊断、治疗。建立纳米医学的微循环检测平台,对纳米药物的临床可应用性进行评估亟待进行。

[关键词] 纳米医学; 微循环; 内皮细胞

[中图分类号] R331.35 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-2588(2008)03-0273-04

Microcirculation, the study platform for nanomedicine

LI Ai-ling, XIU Rui-juan

(Institute of Microcirculation, Chinese Academy Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100005, China)

[Abstract] As the least circulatory unit, microcirculation affects the delivery and metabolism of drugs greatly, and has become the important responsive stage of nanomedicine research. Especially the discovery of protein markers expressed by micro-vascular endothelium and its targeting role in nanomedicine research improved the possibility in diagnosis and therapy of diseases including tumor, vascular-related diseases and so on. It is necessary to establish the detective platform of microcirculation about nanomedicine for evaluation of the clinical availability of nano-drug.

[Key words] nanomedicine; microcirculation; endothelium

[Int J Pathol Clin Med, 2008, 28(3):0273-04]

微循环对多种物理、化学及生物的刺激十分敏感,其变化不仅可以反映疾病的进程,还可以观察、评估药物对机体的影响和可能的应用前景。早在20世纪60年代,我国学者通过研究流行性脑脊髓膜炎患儿甲皱微循环的变化,确立了山莨菪碱的临床应用。而当前国际上,已将微循环检测与糖尿病微血管并发症和高血压等常见病的研究密切结合^[1-2]。纳米医学是一门在分子水平上,利用分子工具和人体的分子知识,从事疾病诊断、治疗、预防和保健的全新学科。创造并利用纳米装置和纳米结构来防病治疗,可以改善人类的整个生命系统^[3-4]。在目前的纳米医学研究中,任何的纳米器件包括所谓的纳米药物、可能的纳米机器人等进入人体循环,不可避免地渗透、进入或滞留微血管发挥作用,直接

受到微血管本身的功能状态的影响;另一方面又与其中的有形和无形成分相互作用。通过微循环的变化,可以了解纳米器件的作用特点;而纳米技术的发展,也为微循环的研究提供了有利的手段。

1 微循环与纳米医学

微循环是机体最小的循环单位,主要功能是负责物质的运送与交换,纳米药物的运输、代谢和发挥作用则直接受到微循环灌注压、血流、管壁通透性的影响。纳米器件进入微循环在微血管内运行,由于小尺寸效应、量子效应和巨大比表面积等,纳米材料具有特殊的物理化学性质。在进入生命体和环境以后,它们与生命体相互作用所产生的化学特性和生物学活性与化学成分相同的常规物质有很大不同,二者之间相互作用、相互影响。最近的分子生物学

收稿日期:2007-11-19

修回日期:2008-02-19

作者简介:李爱玲(1970-),女,山东广饶人,副研究员,博士,主要从事肿瘤及心血管疾病的血管新生机制方面的研究。

基金项目:国家“973”计划(2006CB933305) This work was supported by the “973” program of China (2006CB933305).

研究进展揭示血管和淋巴管信息非常丰富,特别是微血管内皮细胞的管腔面,可表达多种蛋白分子并已应用于纳米医学靶向性研究、疾病诊断和安全性检测,极大地推动了纳米医学的研究进展^[5]。

从实际意义讲,微循环包括负责与细胞交换物质部位的小血管、小淋巴管以及在其中流动的有形、无形成分,还包括微血管管道的构成部分以及其组织细胞间隙中流动物质的理化特性、流速、管周一些状况等,对疾病的发展和药物治疗起到了映像作用。特别是在微循环调节中起重要核心作用的微血管内皮细胞作为纳米颗粒的首发接触单元,对纳米分子的血液内运输、代谢、分布和排泄起着重要的调节作用,在纳米医学靶向性研究、疾病诊断和安全性检测中发挥重要的靶标作用。

1.1 微血管自律运动对纳米颗粒运输的直接调控

不难理解,药物首先要通过血液运输,直接受到微循环灌注压的影响。内皮细胞是微循环调节中的一个重要成分,可以合成、释放多种血管收缩和舒张因子,调控微循环血液动力学,维持血管壁一定的紧张度或改变血管口径,调节流入各组织、器官的血流量。近年研究发现微血管可以产生一种不从属于心脏跳动的节律性舒缩运动,拟周期性自律运动,能更精细地控制毛细血流。自律运动良好,血流通畅,流速加快,局部血流阻力降低,组织灌流充分,起到了第二心脏的作用,直接影响纳米颗粒的局部运输和穿透效果。关于自律运动的机制,目前认为与微血管内皮细胞分泌的一氧化氮(NO)^[6],及可调节生理节律的褪黑素有关^[7-8],特别是后者。Cui等^[7]研究发现,褪黑素这种随昼夜节律性分泌的物质具抑制脐静脉内皮细胞增殖和抗氧化应激的作用,在抗缺血再灌注损伤中发挥重要作用^[8]。提示我们,褪黑素的分泌可能影响到微血管内皮的功能活动,从而影响微血管的自律运动,使纳米药物在机体内因昼夜不同而出现差异作用,但这一方面的研究尚无确切数据支持。

1.2 内皮细胞对纳米分子分布及代谢的直接调控

纳米药物进入血液循环后,首先要通过管壁主要成分——内皮细胞才能进入组织发挥作用。许多实验已经证明在被动靶向的纳米颗粒的截留和分布中,特定的内皮细胞发挥一定程度的调节作用。在早期的聚苯乙烯纳米颗粒研究中发现,唯一的截留部位就是骨髓窦内皮。聚苯乙烯纳米颗粒,大小约

150 nm,可被骨髓特异性地改变方向。其机制主要就是通过细胞表面包被阻断共聚体-407(一种非离子表面活性剂),被骨髓窦状内皮通过受体介导的内吞而截留,以密度小体的方式在细胞内积聚^[9]。尽管内皮细胞不能内吞单体形式的细胞间黏附分子-1单克隆抗体,但与纳米颗粒形成的多价配体可通过受体敏感的内吞途径形成内涵体,持续约1~2 h,然后慢慢运载到溶酶体进行降解^[10]。

1.3 内皮细胞在纳米靶向的抗肿瘤血管治疗中的靶标作用

内皮细胞在肿瘤血管新生、炎症和氧化应激、血栓形成等病理过程中起作用,因此内皮细胞作为药物靶标逐渐引起了人们的注意^[5]。而纳米胶束由于其可以溶解多种难溶性药物、稳定性好、生物利用度大而被用作药物载体。结合内皮细胞分子标志的特异性纳米颗粒的靶向治疗研究较为广泛,主要集中于抗肿瘤血管新生方面。整合素 $\alpha v\beta 5$ 与阳离子纳米颗粒结合的复合物结合并运载ATP突变的Raf基因,可选择性地作用于荷瘤小鼠的新生血管内皮细胞,阻断多种生长因子作用下的内皮细胞信号转导和血管新生,破坏肿瘤组织^[11]。含氨基酸酶N的配体(NGR)结构域的蛋白质肽分子主要靶向于新生血管内皮细胞的氨基酸酶,与阿霉素脂质体偶联,治疗重度免疫缺陷(SCID)小鼠的异位神经母细胞瘤(NB),可以通过关闭血供特异性地阻击肿瘤^[12]。

2 循环细胞对纳米材料毒性的反映

2.1 循环内皮细胞(Circulating endothelial cells, CECs)

CECs是在外周血中观察到的一种形态类似于血管内皮细胞的非血液细胞。目前多数学者认为其部分来自于骨髓动员进入血中的内皮祖细胞(circulating endothelial progenitor cells, CEPs),但主要源于受损伤而脱落的血管内皮,是内皮损伤的标志,常见于累及血管的多种病理状态如心血管疾病、肿瘤、血液系统和代谢性疾病等。通过对血液中脱落的CECs或CEPs数目、形态及功能进行检测、分析,可以评估药物的细胞毒性,并可能用作血管生成程度和抗血管生成治疗效果的标志物^[13-14]。

Ho等^[15]发现直径为 (7.1 ± 2.4) nm,1~100 mg/L的纳米材料 $C_{60}(OH)_{24}$ 作用于离体培养的脐静脉内皮细胞24 h后,毒性呈剂量依赖性地增加,诱导细胞形态学改变,如胞浆囊泡形成,细胞密度降

低等,而且在最大剂量时才引起细胞的毒性损伤/死亡和生长抑制。Gojova 等^[16]将人的主动脉内皮暴露于金属氧化纳米粒子三氧化二钇(Y_2O_3)和氧化锌(ZnO),可引起显著的细胞炎症反应。3种炎症标志分子 ICAM-1, IL-1 和 MCP-1 表达增高。纳米粒子的摄取与其浓度直接相关,粒子多出现于胞内的囊泡。Ho 等^[15]和 Gojova 等^[16]都证实了纳米材料的内皮致损性,可以导致内皮细胞的脱落,如果能够结合整体实验,监测血中 CECs 的数量及其功能则更能说明问题。

2.2 淋巴细胞 多壁的碳纳米管因其独特的化学、物理、光学、磁性在工业产物和纳米技术领域广泛应用^[17],但发现 400 mg/L 的碳纳米管(相当于每个细胞内有 1 千万根碳纳米管)在氧化后比原始未经修饰时毒性更大,诱导大群的 T 淋巴细胞凋亡,但在浓度低 10 倍时几乎无毒性。所以认为碳纳米管在高浓度时具绝对的毒性,在应用时一定要多注意其毒性研究,特别是对于血液系统疾病患者。

3 微循环结构特点对纳米颗粒设计的指导作用

在进化过程中,脏器微血管和其实质细胞形成密切协调、高度适应的立体结构,在体内没有微血管构型完全相同的两种脏器。根据不同组织部位的微循环特点,设计相应的纳米药物及其运载体系是未来药物研究的重点。Lu 等^[18]研究的阳离子牛血清白蛋白(CBSA)结合纳米颗粒被设计成为一种新的脑运输载体。随纳米颗粒表面结合 CBSA 密度增大,血脑屏障通透面积增大,其脑部跨细胞穿越血脑屏障共培养层和脑运载能力增强,但降低血浆药物的曲线下面积(AUC)。而且该物的血浆清除率是加速的,对于以后发展低毒或低免疫力的高效脑运载体系非常有利。

4 纳米技术对微循环研究的促进

4.1 活体微循环观察 观察微循环不仅能了解微循环的一般状况,而且因为一些特殊疾病往往有特殊微循环改变,进行微循环观察有助于这些疾病的诊断,因此微循环观察已广泛地应用于临床诊断及实验室研究。微循环的观察必须借助于一些观察技术如最简单的显微镜观察技术、最基本的活体显微镜观察技术、较新的显微电视观察技术和目前能够突破微血流状态、血管通透性以及组织灌流量等无法观察的局限性的荧光显微技术。Wilhelm 等^[19]研究发现将 EPCs 进行磁性标记对细胞的增殖分化

均无影响,可以应用核磁共振(MRI)进行血管新生的研究。Ravnic 等^[20]制备荧光素纳米颗粒,可以更直接地反映微循环状态。用具有一定的物理和光学特性的纳米颗粒可以通过空间和时间分辨率提供局部血管内血流区域的精确信息,无疑给微循环的研究带来了便利。

4.2 内皮细胞靶蛋白的发现 噬菌体可经组织装配后在其表面显示无数的肽。应用活体噬菌体显示技术,可区分内皮细胞表面的与器官及疾病相关的特异蛋白表达,揭示正常及疾病组织血管分子标志,为将来建立血管配体-受体图谱、肿瘤靶向治疗打下基础。最近,Arar 等^[21]进行了通过噬菌体显示技术将病人血管图谱化的尝试。他观察 47 160 个序列,定向于不同的器官,并发现在许多病人中,这些序列与内皮细胞表面蛋白的配体很相似,并确定这项技术用于辨识新的内皮细胞靶蛋白,用于特别是靶向于实体瘤血管的靶向治疗。Crunis 等^[22]通过噬菌体显示研究进一步揭示环纳米肽 LyP-1,辨识肿瘤淋巴管(在某些肿瘤也结合肿瘤细胞)和进入细胞核内的可能。以上研究的进展都有力地证明纳米技术的发展提高对于全面揭示内皮细胞表达谱、了解疾病的病理过程、提供新的治疗靶标起着极其重要的作用。

微循环虽然是机体最小的循环单位,但它完成了体内最重要的物质交换工作;而且,微循环各组分包含大量的生物信息,特别是微血管内皮细胞——体内最大的内分泌器官。微循环作为纳米药物发挥作用的重要平台,一方面起着不可缺少的镜像作用,一方面又促进了纳米医学的研究。如果能够进行大量的微循环的相关变化研究,建立纳米药物作用后的微循环变化观察及评价平台,将为纳米医学的临床应用和推广提供便利。

参 考 文 献

- [1] Henderson EA. Role of diabetic microvascular disease in the development of foot wounds[J]. J Wound Care, 2007, 16(6):275-278.
- [2] Serné EH, de Jongh RT, Eringa EC, et al. Microvascular dysfunction: a potential pathophysiological role in the metabolic syndrome[J]. Hypertension, 2007, 50(1):204-211.
- [3] de Silva MN. Nanotechnology and nanomedicine: a new horizon for medical diagnostics and treatment[J]. Arch Soc Esp Oftalmol, 2007, 82(6):331-334.
- [4] Emerich DF, Thanos CG. Targeted nanoparticle-based drug delivery and diagnosis[J]. J Drug Target, 2007, 15(3):163-183.

- [5] Hajitou A, Pasqualini R, Arap W. Vascular targeting: recent advances and therapeutic perspectives[J]. Trends Cardiovasc Med, 2006,16(3):80-88.
- [6] Rossi M, Carpi A, Galetta F, et al. The investigation of skin blood flowmotion: a new approach to study the microcirculatory impairment in vascular diseases? [J]. Biomed Pharmacother, 2006,60(8):437-442.
- [7] Cui PL, Luo ZH, Xiu RJ, et al. Effect and mechanism of melatonin's action on the proliferation of human umbilical vein endothelial cells[J]. J Pineal Res, 2006,41(4):358-362.
- [8] 姚朝辉,王顺蓉,李著华. 褪黑激素抗缺血再灌注损伤[J]. 国际病理科学与临床杂志,2006,26(4):363-366.
YAO Zhao-hui, WANG Shun-rong, LI Zhu-hua. Melatonin's effect of counteracting ischemia-reperfusion injury[J]. Int J Pathol Clin Med,2006,26(4):363-366.
- [9] Kreuter J, Rame P, Petrov V, et al. Direct evidence that polysorbate-80-coated poly (butylcyanoacrylate) nanoparticles deliver drugs to the CNS via specific mechanisms requiring prior binding of drug to the nanoparticles[J]. Pharm Res, 2003,20(3):409-416.
- [10] Wickline SA, Neubauer AM, Winter PM, et al. Molecular imaging and therapy of atherosclerosis with targeted nanoparticles [J]. J Magn Reson Imaging, 2007,25(4):667-680.
- [11] Hood JD, Bednarski M, Frausto R, et al. Tumor regression by targeted gene delivery to the neovasculature[J]. Science, 2002,296(5577):2404-2407.
- [12] 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.
- [13] Goon PK, Boos CJ, Lip GY. Circulating endothelial cells: markers of vascular dysfunction[J]. Clin Lab,2005,51(9-10):531-538.
- [14] Schneider M, Tjwa M, Carmeliet P. A surrogate marker to monitor angiogenesis at last[J]. Cancer Cell, 2005,7(1):3-4.
- [15] Ho D, Fung AO, Montemagno CD, et al. Engineering novel diagnostic modalities and implantable cytomimetic nanomaterials for next-generation medicine [J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2006, 12(1 Suppl 1):92-99.
- [16] Gojova A, Guo B, Kota RS, et al. Induction of inflammation in vascular endothelial cells by metal oxide nanoparticles: effect of particle composition[J]. Environ Health Perspect, 2007,115(3):403-409.
- [17] Bottini M, Bruckner S, Nika K, et al. Multi-walled carbon nanotubes induce T lymphocyte apoptosis[J]. Toxicol Lett, 2006,160(2):121-126.
- [18] Lu W, Wan J, She Z, et al. Brain delivery property and accelerated blood clearance of cationic albumin conjugated pegylated nanoparticle[J]. J Control Release, 2007,118(1):38-53.
- [19] Wilhelm C, Bal L, Smirnov P, et al. Magnetic control of vascular network formation with magnetically labeled endothelial progenitor cells[J]. Biomaterials, 2007,28(26):3797-3806.
- [20] Ravnic DJ, Zhang YZ, Turhan A, et al. Biological and optical properties of fluorescent nanoparticles developed for intravascular imaging[J]. Microsc Res Tech, 2007,70(9):776-781.
- [21] Arap W, Kolonin MG, Trepel M, et al. Steps toward mapping the human vasculature by phage display[J]. Nat Med, 2002, 8(2):121-127.
- [22] Curmis F, Sacchi A, Corti A. Improving hemotherapeutic drug penetration in tumors by vascular targeting and barrier alteration[J]. J Clin Invest, 2002,110(4):475-482.