

基于线粒体靶向机制的抗肿瘤制剂的研究进展

刘爱赞, 侯晓双, 丁 娅*

(中国药科大学, 药物质量与安全预警教育部重点实验室, 江苏 南京 210009)

摘要: 线粒体是细胞内重要的细胞器, 在肿瘤的发生、发展中起着重要的作用。将抗癌药物靶向线粒体可以有效提高药物治疗效果, 降低对正常组织的毒副作用。本文从线粒体膜电位、线粒体外膜通透性和线粒体膜转位酶 3 个方面, 综述线粒体靶向制剂在肿瘤治疗中的研究进展, 为线粒体靶向治疗系统的构建提供参考。

关键词: 肿瘤; 线粒体; 靶向; 线粒体膜电位; 正电性制剂; 线粒体外膜通透性; Bcl-2 蛋白

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 06-0879-09

Advances of antineoplastic agents based on mitochondrial targeting mechanism

LIU Ai-yun, HOU Xiao-shuang, DING Ya*

(Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance, Ministry of Education, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: Mitochondrion is an important organelle in cells and plays a crucial role in tumor development. Therefore, improvement of the targeting ability of anticancer drugs to mitochondria will increase the treatment efficacy for tumor and reduce the side effect on normal tissues. Here, research progresses in mitochondrial targeting have been reviewed in three aspects for tumors treatment: the potential, permeability and translocase of mitochondrial membrane. The review provides a reference for the development of mitochondria targeted therapeutic systems.

Key words: neoplasms; mitochondria; targeting; mitochondrial membrane potential; mitochondrial outer membrane permeabilization; preparation with positive charge; Bcl-2 protein

中国癌症统计数据显示, 2015 年我国有 429.2 万个癌症新发病例, 相当于平均每天会增加 12000 例^[1]。预计 2030 年发病人数将上升至 500 万^[1], 癌症已经成为威胁人类健康的一大顽疾。目前, 化疗是癌症治疗的主要方式之一, 但这种全身性的治疗手段, 对正常组织具有严重的毒副作用。因此, 人们开始关注组织、细胞乃至细胞器的精确靶向治疗研究, 以提高癌

症的治疗效果, 并降低对正常组织的不良反应^[2,3]。

线粒体是真核细胞的一种重要细胞器, 是糖、脂肪和氨基酸等营养物质通过三羧酸循环、电子传递和氧化磷酸化等步骤生成 ATP 并最终氧化放能的场所, 是细胞生命活动的能量供应工厂^[4]。此外, 大量研究表明, 肿瘤的发生、发展与细胞凋亡有关。在大多数脊椎动物中, 细胞凋亡主要由线粒体来调节^[5,6]。在能量缺乏、氧化应激或其他条件下, 线粒体通过改变自身结构, 如膜电位下降、膜通透性增加等方式将细胞色素 C (cytochrome C, Cyt C) 从线粒体释放至细胞质, 开启线粒体介导的细胞凋亡模式。Cyt C 释放入胞质后, 首先在脱氧腺苷三磷酸存在的条件下, 与凋亡蛋白酶活化因子-1 结合, 形成多聚体, 随后与含

收稿日期: 2017-02-24; 修回日期: 2017-04-03.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31470916, 31500769); 药物质量与安全预警教育部重点实验室开放课题资助项目 (DQCP2015MS01).

*通讯作者 Tel: 86-25-82171326, Fax: 86-25-82171326,

E-mail: ayanju@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0177

半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 (caspase) 前体蛋白, 主要是 caspase-9 前体蛋白结合, 形成凋亡小体, 从而激活 caspase-9。被激活的 caspase-9 随后又激活其他 caspase, 如 caspase-3, 继而导致细胞凋亡的发生^[7]。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, 其靶向制剂成为近年来的研究热点^[3]。本文将着重从线粒体膜电位、线粒体外膜通透性和线粒体膜转位酶 3 个方面, 对线粒体靶向制剂在肿瘤治疗中的研究进展进行简要综述, 为线粒体靶向制剂在医药领域的应用提供参考。

1 基于线粒体膜电位设计药物治疗系统

线粒体是双层膜包被的细胞器, 由线粒体外膜 (outer mitochondrial membrane, OMM)、线粒体膜间隙 (mitochondrial intermembrane space, IMS)、线粒体内膜 (inner mitochondrial membrane, IMM) 和线粒体基质 (mitochondrial matrix, MM) 4 部分组成, 见图 1。存在于线粒体内膜的质子泵 (proton pump, PP) 将线粒体基质内质子泵入线粒体膜间隙, 导致线粒体膜间隙带有大量正电荷, 而线粒体基质带有大量负电荷, 从而形成横跨线粒体内膜的跨膜电位 (mitochondrial transmembrane potential, MTP), 简称为线粒体膜电位。MTP 内负外正, 在机体正常细胞内膜电位值为 130~150 mV^[8], 而在肿瘤细胞中 MTP 增高^[9]。因此, 正电性制剂进入细胞, 在肿瘤细胞高 MTP 的驱动下, 靶向至线粒体中。随后, 释放出的生物活性分子在线粒体中积聚, 将表现出线粒体毒性, 诱发肿瘤细胞死亡或凋亡。

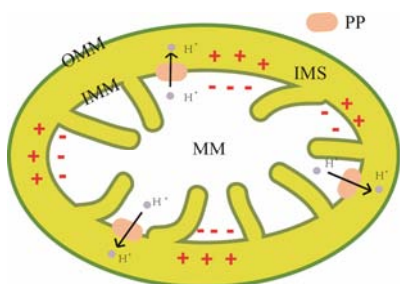


Figure 1 Mitochondrial structure and mechanism of mitochondrial transmembrane potential. OMM: Outer mitochondrial membrane; IMS: Mitochondrial intermembrane space; IMM: Inner mitochondrial membrane; MM: Mitochondrial matrix; PP: Proton pump

1.1 正电性化合物

1.1.1 离域亲脂阳离子 离域亲脂阳离子 (delocalized lipophilic cations, DLC) 是一类双亲性阳离子化合物, 在结构上有两个特点^[10]: ① 由一个亲水的带电基团与一个疏水基团通过化合键连接而成; ② 其

π 电子云的密度扩展至 3 个原子上, 而不是局限于杂原子和邻近碳原子间的区域, 这种电子离域现象使整个分子带正电荷。DLC 中最常见的是三苯基膦 (triphenylphosphine, TPP) 和地喹氯铵 (dequalinium, DQA), 化学结构见图 2。DLC 可在线粒体膜电位的驱动下, 选择性靶向至线粒体并杀死癌细胞, 其作为线粒体靶向载体得到了广泛的应用。

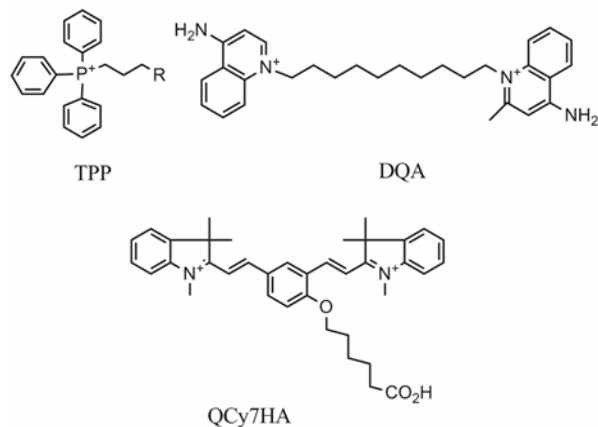


Figure 2 Chemical structures of triphenylphosphine (TPP), dequalinium (DQA), and QCy7HA

TPP 是一种可穿越线粒体膜的 DLC, 其化学结构中含有 3 个苯基, 使得整个分子具有很强的脂溶性。同时, TPP 磷原子上的正电荷可以离域到 3 个苯环, 形成离域正电荷, 促使 TPP 穿越磷脂膜。这两大特征使其成为实现线粒体靶向的基本结构单元。首先, 最简单的方法是将 TPP 与活性小分子通过共价键直接连接, 如通过酰胺键、醚键和碳磷键将 TPP 修饰于多柔比星 (doxorubicin, DOX)^[11]、姜黄素 (curcumin)^[12] 和维生素 E 琥珀酸盐 (α -TOS)^[13] 结构上, 形成带有 TPP 靶头的前药分子。结果表明, TPP 修饰的 DOX、curcumin 和 α -TOS 均可明确靶向到线粒体中, 并且相对于游离的 DOX、curcumin 和 α -TOS, 可导致活性氧自由基 (reactive oxygen species, ROS) 增多、膜电位降低和细胞毒性的显著增加。其次, 将 TPP 与蛋白质共价连接, 如将 TPP 修饰于亲水肽血球凝集素 A (HA) 结构上, 采用 FITC 标记后发现, 难以被细胞摄取的 HA 蓄积在 HeLa 细胞的线粒体中^[14]。虽然, HA-TPP 细胞毒性较低^[14], 但将能诱导线粒体凋亡的肽 (TEAM-VP) 与 TPP 连接有望实现抗肿瘤的目的^[15]。此外, 纳米载体 (脂质体、树枝状大分子等) 与 TPP 化学键合, 可将包载的药物靶向到线粒体。TPP 化学连接的硬脂酰多柔比星脂质体^[16]、聚乙二醇-磷脂酰乙醇胺 (TPP-PEG-PE) 紫杉醇脂质体^[17]、维生素 E 琥

珀酸酯 (TPGS₁₀₀₀-TPP) 紫杉醇脂质体^[18]、树枝状大分子^[19,20]、聚丙交酯纳米粒 (PLGA-b-PEG-TPP)^[21]和聚(乙烯亚胺)超支化聚合物 (PEI-TPP)^[22]均表现出明确的线粒体靶向功能。这些功能化载体将紫杉醇^[17,18]、DOX^[16,22]、肿瘤抗原产生剂 T-ZnPc-NPs^[20]、NO 产生剂^[23]和量子点^[24]等化疗药物,以及免疫药物或荧光探针递送到肿瘤细胞线粒体中,可实现化疗、免疫治疗、光动力治疗及亚细胞成像等诸多功能。

DQA 含双季铵盐结构,具有两个正电荷中心,且含长脂肪链,能够穿透细胞脂质双分子层,进而聚集于线粒体内。利用 DQA 这一特性,可将具有抗癌活性的药物准确导入癌细胞线粒体中。例如, DQA 直接修饰的正定霉素、奎纳克林脂质体^[25]和 DQA-PEG₂₀₀₀-DSPE 修饰的白藜芦醇脂质体^[26],通过线粒体膜电位将药物成功靶向并累积至线粒体后,线粒体膜电位降低,线粒体依赖的凋亡途径被激活,最终防止了乳腺癌的复发^[25],在非耐药和耐药肺癌中都表现出显著的抗肿瘤效果^[26]。

1.1.2 含胍基的小分子及多肽 胍基靶向线粒体的发现源于细胞渗透肽。人类免疫缺陷病毒 1 型编码的 TAT 蛋白是被首次发现的细胞渗透肽^[27]。TAT 蛋白的核心肽段 (YGRKKRRQRRR) 含有碱性氨基酸精氨酸和赖氨酸,精氨酸、赖氨酸分别具有的胍基、氨基使 TAT 带有强烈的正电荷,其中胍基的作用最大。TAT 蛋白通过自身强正电荷与带负电荷的细胞膜结合将生物分子运送入细胞内^[28]。因此,含有胍基的小分子及多肽,如线粒体渗透肽、SS 肽,被应用到线粒体靶向抗肿瘤的研究。在许多含胍基的分子中,四胍基化合物靶向线粒体的效率最高^[29]。与荧光素连接后,可以有效靶向到 HeLa 细胞线粒体中^[30],但是其抗肿瘤效果未见报道。

线粒体渗透肽同样源于细胞渗透肽。仿照 TAT 肽并对其进行改造,合成由精氨酸 (R) 和赖氨酸 (L) 提供正电荷,由苯基丙氨酸 (phenylalanine, F) 和环己基丙氨酸 (cyclohexylalanine, Fx) 提供亲脂性残基的一系列短肽,分析脂水分配系数和电荷对其线粒体定位的影响。结果表明,线粒体渗透肽必须同时具有两个条件:带正电荷和亲脂性^[31]。另外,已有研究证实这些亲脂的阳离子肽可以将带负电和两性小分子靶向到线粒体^[32],且线粒体渗透肽 R (FxR)₃ 对人类细胞无毒性^[33],作为线粒体靶向的载体非常有前景。R(FxR)₃ 的 N 端与铂复合物 [Pt(succac)(NH₃)₂](NO₃) 连接构建的肽/铂结合物 mtPt,可以成功靶向到线粒

体,并且对耐顺铂型人卵巢癌细胞的毒性稍大于顺铂,远远大于 [Pt(succac)(NH₃)₂](NO₃)^[34]。

SS 肽是一类结构基序为交替的芳香环、氨基酸残基的芳香族阳离子肽。SS 肽中精氨酸中胍基提供阳离子,芳香基亲脂性较强,因此也可以靶向到线粒体^[35]。应用最多的是含 2',6'-二甲基酪氨酸残基 (Dmt) 的 SS 抗氧化肽。研究表明,抗氧化肽 SS-31 (D-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH₂) 可以靶向线粒体,清除过多的 ROS,保护缺血性脑损伤^[36],提高移植到糖尿病小鼠的胰岛细胞的功能^[37],治疗阿尔茨海默病^[38]等。SS-20 (Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂) 由于不含 Dmt,没有抗氧化剂活性^[39],但是同样可以靶向到线粒体中。因此,未来可以利用 SS-20 靶向线粒体的性质将抗癌药物传递到癌细胞线粒体中发挥治疗作用。

1.1.3 其他 除 DLC 外,还有一些强正电性化合物,也可作为线粒体靶向的结构单元,应用于抗肿瘤治疗。利用十八胺的正电性构建的自主装纳米载体 SA-TSN 可以将替尼伯昔靶向至线粒体,克服多药耐药现象,显著提高替尼伯昔对耐药乳腺癌细胞 (MCF-7/ADR) 的杀伤作用^[40]。具有强正电性的化合物 QCy7HA,与 DOX 共价连接后将药物大量导入线粒体,抑制药物外排,提高 DOX 的肿瘤细胞杀伤能力^[41]。利用正电性季铵结构构建的 N-季铵壳聚糖将二甲马钱子靶向至肝癌细胞线粒体,抑制肝癌的增长,提高抗肿瘤的效果^[42]。

1.2 正电荷纳米粒

1.2.1 带正电荷的纳米粒 经过 DLC、胍基等修饰的纳米粒,均带有很强的正电荷,可以成功靶向到线粒体,并进行相应的抗癌治疗,在这里不赘述。

有趣的是单壁碳纳米管 (single-walled carbon nanotubes, SWNT),这种由碳原子 sp² 杂化形成的石墨烯片层卷成的无缝、中空和单层的管体新型纳米材料可以通过线粒体膜电位靶向到线粒体,虽然机制尚不明确,但猜想其具有一定的正电性。研究表明,磷脂-聚乙二醇 (phospholipid-polyethylene glycol, PL-PEG) 功能化的 SWCNT (SWNT-PL-PEG) 在肿瘤细胞中通过 MTP 成功靶向到线粒体^[43]后,可进行光热治疗^[43,44]、光声治疗^[45]及声热治疗^[46]。结果显示,SWCNT 将激光转换为热能或机械能,导致线粒体去极化、Cyt C 释放和 caspase-3 激活,最终造成肿瘤细胞凋亡。这些特性促进了 SWCNT 在线粒体靶向治疗肿瘤方面的应用。

1.2.2 pH 响应反转的正电荷纳米粒 在细胞水平,

由于细胞膜及线粒体膜的膜电位均为负值，带正电的纳米粒易于进入细胞或靶向至线粒体，有利于药物的传输和递送。但正电荷纳米粒在静脉注射后，通常会被血浆蛋白迅速结合并快速清除，且造成细胞膜破裂，导致严重的细胞毒性，不能达到预期效果。因此，有研究者利用血液、体液 (pH 7.4) 与肿瘤微环境 (pH 6.0~7.0) 或内涵体溶酶体 (pH 4.0~6.0) 的 pH 差异，构建具有电荷反转功能的线粒体靶向功能纳米制剂。将短肽 KLA 用 2,3-二甲基马来酸酐 (2,3-dimethylmaleic anhydride, DMA) 和磷脂酰乙醇胺 (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, DSPE) 修饰，合成的具有类磷脂结构的化合物 DSPE-KLA-DMA (DKD) 制备成脂质体^[47]。该脂质体在 pH 中性的血液中保持稳定，从血液进入肿瘤后，由于肿瘤组织微环境 pH 降低，DKD 中的 DMA 发生水解，暴露出氨基基团，正电性增强，借助 MTP 靶向到线粒体，实现抑制肺癌增长。借助同样的原理^[48]，六氢苯甲酸-组氨酸-谷氨酸-疏水碳十八长链构成的类磷脂结构化合物 (1,5-dioctadecyl-L-glutamyl 2-histidyl-hexahydrobenzoic acid, HHG2C18) 制备的脂质体 (HHG2C18-L) 通过实体瘤的高通透性和滞留效应 (enhanced permeability and retention effect, EPR) 到达肿瘤细胞后发生 pH 响应，HHG2C18-L 的表面电荷由负变正，增加了癌细胞的摄取。该脂质体经内吞途径进入内涵体/溶酶体后，pH 值进一步降低，组氨酸中的咪唑基促进质子海绵效应，内涵体溶酶体破裂，同时酰胺键断裂，暴露出氨基，正电性进一步加强，最终带有很强正电荷的脂质体靶向到线粒体中，减少了对正常细胞的毒性，增加抗肿瘤的效果。

2 基于线粒体外膜通透性设计药物治疗系统

线粒体是由双层膜围成的囊状结构，两层膜之间是膜间隙。正常情况下 OMM 仅允许分子质量为 5.0 kDa 以下的分子通过^[49]。Cyt C 相对分子质量为 14 500，在正常情况下无法透过 OMM 引发细胞凋亡^[50]。因此，增加 OMM 的通透性可促进 Cyt C 从线粒体释放到细胞质，开启基于 Cyt C 介导的细胞凋亡。目前有两种机制可实现 OMM 通透性的改变，一种是通过线粒体膜通透性转孔 (mitochondrial permeability transition porin, MPTP) 的感应开放；另一种是 B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 家族蛋白的调节。

2.1 促进线粒体膜通透性转孔开放

MPTP 是存在于线粒体内外膜之间的一组蛋白

复合体，是一种桥连线粒体内、外膜的非特异性通道，主要由位于外膜的电压依赖的阴离子通道 (voltage dependent anion channel, VDAC)、位于内膜的腺嘌呤核苷酸转位酶 (adenine nucleotide translocator, ANT) 和位于线粒体基质的环孢菌素 A 结合蛋白 D (cyclophilin D, Cyp D) 组成^[51] (图 3A)。如前文所述，IMM 的质子泵将线粒体基质中的质子泵入线粒体膜间隙。在正常生理条件下，MPTP 周期性开放，使线粒体膜间隙的质子或正离子进入线粒体基质以防止线粒体膜间隙正离子过度蓄积。在氧化应激时，ROS 持续蓄积导致 MPTP 开放，Ca²⁺等小分子大量进入线粒体基质 (图 3B)，由于线粒体基质内的蛋白质不能经 MPTP 自由进出，因此线粒体基质呈高渗性而引起小分子不断进入线粒体基质，最终使线粒体水肿，而 IMM 具有多次折叠的嵴结构，比 OMM 有更大的表面积，线粒体基质体积的逐渐膨胀虽不导致 IMM 破坏，但可引起 OMM 的破裂，使膜间隙的 Cyt C 释放到细胞质 (图 3C)，从而启动细胞凋亡过程^[52]。因此，过多的 ROS 是 MPTP 开放的关键因素之一。

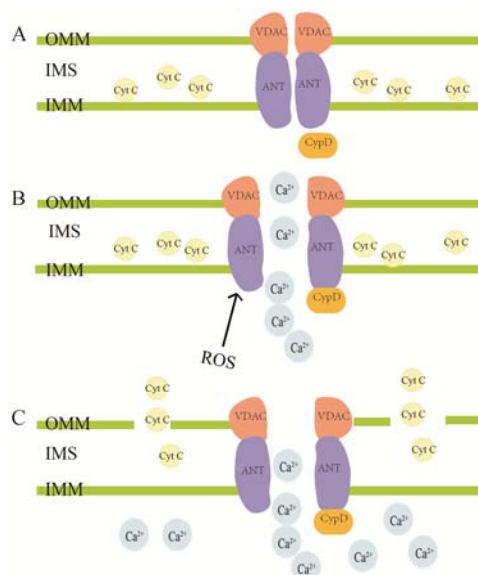


Figure 3 Structure of mitochondrial permeability transition porin (MPTP, A). ROS promotes the opening of MPTP, Ca²⁺ enter MM (B). Osmotic swelling of mitochondria and rupture of the OMM cause the release of Cyt C into the cytosol (C). Voltage dependent anion channel (VDAC), adenine nucleotide translocator (ANT), cyclophilin D (Cyp D)

光敏剂在特定波长的激光照射下激发，激发态的光敏剂把能量传递给周围的氧，可以生成 ROS。TPP 修饰的二氧化钛包覆的上转换纳米粒进入肿瘤细胞，借助线粒体膜电位靶向至线粒体后，在近红外

光 (near infrared, NIR) 转化的紫外光 (ultraviolet, UV) 照射下, 产生大量 ROS, 最终促进 MPTP 持续性开放, 开启线粒体途径的凋亡, 有效抑制肿瘤的生长^[53]。除了光敏剂, 醌类化合物 β -拉帕醌可通过氧化还原循环诱导产生大量 ROS, 促使 MPTP 持续开放, OMM 破裂。 β -拉帕醌通过酰胺键连接有线粒体靶向功能的 XJB-肽后, 可在线粒体中产生大量 ROS, 使线粒体自噬降解, 更高效地促使细胞凋亡^[54]。

2.2 Bcl-2 家族蛋白对线粒体外膜通透性的调控

Bcl-2 蛋白家族包括具有 BH 1~3 结构区域的促凋亡蛋白 (pro-apoptotic protein) (Bak、Bax), 具有 BH 1~4 结构区域的抗凋亡蛋白 (anti-apoptotic protein) (Bcl-2、Bcl-xL 和 Bcl-w) 和只有 BH3 结构区域的唯 BH3 域蛋白 (BH3-only protein) (Bid、Bik)。抗凋亡蛋白位于 OMM, 促凋亡蛋白位于细胞质。促凋亡蛋白和唯 BH3 域蛋白的 BH3 结构域形成的两亲性螺旋可以插入到抗凋亡蛋白的 BH1、BH2 和 BH3 结构域形成的疏水凹槽中^[55]。在肿瘤细胞中, 抗凋亡蛋白 (Bcl-2) 高表达, 促凋亡蛋白 (Bax) 中的两亲性螺旋插入到抗凋亡蛋白的疏水凹槽, 形成异源二聚体, 如图 4A, 抑制肿瘤细胞凋亡及在一些化疗药物刺激下的死亡。

唯 BH3 域蛋白的两亲性螺旋插入抗凋亡蛋白表面的疏水凹槽, 形成异二聚体后促凋亡蛋白和抗凋亡蛋白异二聚体解聚, 同时促凋亡蛋白被激活, 转位至线粒体并在 OMM 上形成同源二聚体, 导致 OMM 通透性增加, Cyt C 从线粒体释放到细胞质^[56], 如图 4B, 开启线粒体介导的细胞凋亡。BH3 模拟物 (BH3-only mimetic) 与唯 BH3 域蛋白具有相同的结构域 BH3, 同样可以使 OMM 通透性增加, Cyt C 释放到胞质, 高效诱导肿瘤细胞凋亡, 达到抗肿瘤的目的^[57-60]。其中,

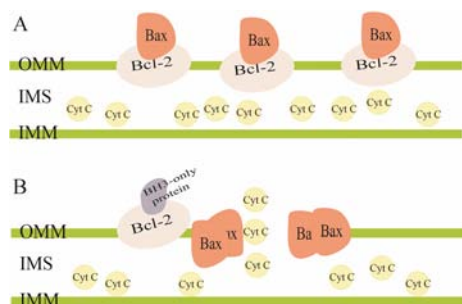


Figure 4 Pro-apoptotic protein interacts with anti-apoptotic protein (A). BH3-only protein interacts with anti-apoptotic protein; pro-apoptotic protein translocate to OMM after being activated, then form oligomerization, which increases the permeability of OMM (B)

ABT-737 已作为单个药物有效治疗淋巴瘤和小细胞肺癌细胞^[57], 萘并杂环类小分子 S1 具有广谱的抗肿瘤作用^[58], UMI-77 对胰腺癌有抗肿瘤活性^[60]。

除了 BH3 模拟物, α -TOS 也可以阻碍 Bcl-xL、Bcl-2 与 Bak 的 BH3 结构域结合, 抑制 Bcl-xL、Bcl-2 的活性^[61], 促使 Bak 构象改变, 在 OMM 上形成同源低聚物的形式, 使 OMM 的通透性增加, Cyt C 释放到细胞质基质^[62], 促进不同类型癌细胞凋亡, 如前列腺癌、乳腺癌、肺癌和结肠癌等, 但对正常细胞不造成伤害。利用 α -TOS 的这一特性, 将对细胞核有杀伤作用的活性药物与 α -TOS 共价连接, 构建一种既可以靶向细胞核使 DNA 损伤, 又可以靶向线粒体的具有双重靶向功能的递药体系, 大大提高药物的治疗效果^[63]。

OMM 通透性增加后, 必然会引起 Cyt C 的释放。Cyt C 位于线粒体内膜外侧, 在线粒体嵴上与其他氧化酶排列成呼吸链, 参与细胞呼吸过程, 在细胞能量转移中起着极为重要的作用。双 (硫代琥珀酰亚胺基) 辛二酸酯将细菌磁纳米粒 (BMPs) 与 Cyt C 的配体共价连接而构建的 BMP-Cyt C 配体复合物, 可以特异性靶向 HeLa 细胞线粒体, 并且在静磁场作用下, 细胞活性明显降低^[64]。同时包载鱼藤酮和金纳米粒的介孔二氧化硅用 Cyt C 配体修饰后, 将鱼藤酮和金纳米粒靶向至线粒体, 实现了化疗和光热治疗的联合应用, 体外细胞活性显著降低^[65]。

3 基于线粒体膜转位酶设计药物治疗系统

进入线粒体的蛋白需要依靠线粒体外膜上的转位酶 (translocase of outer mitochondrial membrane, TOM) 转运^[66]。TOM 复合物主要由 Tom 40、Tom 20、Tom 70 和 Tom 22 等多种亚基组成, 其中 Tom 40 具有 β 桶状蛋白质结构的核心亚基, 形成蛋白质跨膜转运通道^[67]。Tom 20 和 Tom 70 是 TOM 系统的两个外周亚基, 均通过其 N 端跨膜片段锚定于外膜上, 其亲水域暴露于胞质侧。被 Tom 20 和 Tom 70 识别的蛋白通过 Tom 40 转运后会定位于线粒体外膜、膜间隙、内膜和基质而发挥相应的生理功能^[68]。定位到内膜和基质还需要线粒体内膜上的转位酶 (translocase of inner mitochondrial membrane, TIM) 转运。线粒体靶向序列就是通过这种方式进入线粒体的。

线粒体中蛋白一部分由线粒体基因编码, 但大部分由细胞核基因编码, 在胞质中合成。核基因编码的蛋白质通过 N 端的氨基酸前体序列将其靶向到线粒体^[69], 这段 N 端的氨基酸前体序列即线粒体靶向序

列 (mitochondrial targeting sequences, MTSs)。线粒体苹果酸脱氢酶的线粒体靶向序列 mMDH 和人锰超氧化物歧化酶的线粒体靶向序列 hMnSOD 已被研究报道: TAT-mMDH-绿色荧光蛋白可以将绿色荧光蛋白快速定位到线粒体^[70]; hMnSOD-exonuclease III-TAT 可以将 exonuclease III 有效靶向到乳腺癌细胞线粒体并稳定表达^[71], 减少 mtDNA 在化疗等氧化应激下的修复作用^[72], 增强对癌细胞化疗效果。

4 其他

XJB 肽源于短杆菌肽 S (gramicidin S, GS)。XJB-5-131 是其序列 Leu-*D*-Phe-Pro-Val-Orn 插入线粒体内膜从而靶向线粒体^[73], 而不是依靠线粒体膜电位和增加外膜通透性, 但具体机制尚不明确。XJB-5-131 是双亲结构, Orn 的 $-(\text{CH}_2)_2\text{-NH}_3^+$ 侧链和两个 *D*-Phe 的苯环突出在分子的一个面; Leu 和 Val 的疏水侧链 $-\text{CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$ 和 $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 伸出分子的另一面^[74], 这种结构也可减少细胞毒性^[75]。XJB-5-131 或 GS 类似物^[76]与 ROS 清除剂 4-氨基-TEMPO^[77]构建的结合物, 靶向线粒体后, 可以清除线粒体内过多的 ROS, 应用于防辐射剂、保护小鼠胚胎细胞^[78]或其他由于 ROS 增多导致的疾病。但是目前未见关于 XJB 肽抗肿瘤的研究报道。

5 结语和展望

线粒体靶向制剂提高癌症治疗效果, 降低对正常组织的毒副作用, 在生物医药领域显示出独特的应用前景。研究人员利用线粒体的结构特点, 在线粒体膜电位、线粒体膜通透性和线粒体膜转位酶 3 个方面进行了大量线粒体靶向制剂研究, 取得了许多积极的成果。但从现有研究结果发现, 人们对线粒体作用途径和机制的了解不甚深入, 选用的细胞或肿瘤模型各不相同, 选择的治疗方式多样, 所用载体的种类、载药量和靶向效率各异, 对线粒体靶向制剂的自身性质和抗肿瘤效果没有统一的标准, 且都仅限于体外细胞实验和动物实验。因此, 还有很多工作亟待研究者们去探索, 包括进一步探索线粒体的作用途径和机制; 针对不同的肿瘤, 进行针对性的研究, 确定统一的标准, 优化线粒体靶向制剂; 探究线粒体靶向制剂的临床药效和长期作用。

References

- [1] Chen WQ, Zheng RS, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. *Ca Cancer J Clin*, 2016, 66: 115–132.
- [2] Pranatharhiaran S, Patel MD, Malshe VC, et al. Asialoglycoprotein receptor targeted delivery of doxorubicin nanoparticles for hepatocellular carcinoma [J]. *Drug Deliv*, 2017, 24: 20–29.
- [3] Rajendran L, Knoölker HJ, Simons K. Subcellular targeting strategies for drug design and delivery [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2010, 9: 29–42.
- [4] Milane L, Trivedi M, Singh A, et al. Mitochondrial biology, targets, and drug delivery [J]. *J Control Release*, 2015, 207: 40–58.
- [5] Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death [J]. *Science*, 2004, 305: 626–629.
- [6] Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria in cancer cells: what is so special about them? [J]. *Trends Cell Biol*, 2008, 18: 165–173.
- [7] Kim J, Parrish AB, Kurokawa M, et al. Rsk-mediated phosphorylation and 14-3-3 ϵ binding of Apaf-1 suppresses cytochrome *c*-induced apoptosis [J]. *EMBO J*, 2012, 31: 1279–1292.
- [8] Han M, Li C, Guo WW, et al. Mitochondrial drug delivery for cancer therapy [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 257–263.
- [9] Pan LL, Pan D, Liao WB, et al. Research progress on mitochondrion targeting drugs [J]. *Med Recapit (医学综述)*, 2015, 21: 37–39.
- [10] Qi XJ, Zheng NN, Gao YN, et al. Advances in mitochondrial targeting molecules in anticancer applications [J]. *J Chin Pharm Sci (中国药学杂志)*, 2015, 50: 741–744.
- [11] Han M, Vakili MR, Abyaneh HS, et al. Mitochondrial delivery of doxorubicin *via* triphenylphosphine modification for overcoming drug resistance in MDA-MB-435/DOX cells [J]. *Mol Pharmaceutics*, 2014, 11: 2640–2649.
- [12] Reddy CA, Somepalli V, Golakoi T, et al. Mitochondrial-targeted curcuminoids: a strategy to enhance bioavailability and anticancer efficacy of curcumin [J]. *PLoS One*, 2014, 9: e89351.
- [13] Dong LF, Jameson VJA, Tilly D, et al. Mitochondrial targeting of α -tocopheryl succinate enhances its pro-apoptotic efficacy: a new paradigm for effective cancer therapy [J]. *Free Radical Biol Med*, 2011, 50: 1546–1555.
- [14] Abu-Gosh SE, Kolvazon N, Tirosh B, et al. Multiple triphenylphosphonium cations shuttle a hydrophilic peptide into mitochondria [J]. *Mol Pharmaceutics*, 2009, 6: 1138–1144.
- [15] Borgne-Sanchez A, Dupont S, Langonne A, et al. Targeted Vpr-derived peptides reach mitochondria to induce apoptosis of $\alpha\text{v}\beta_3$ -expressing endothelial cells [J]. *Cell Death Differ*,

- 2007, 14: 422–435.
- [16] Malhi SS, Budhiraja A, Arora S, et al. Intracellular delivery of redox cyclers-doxorubicin to the mitochondria of cancer cell by folate receptor targeted mitocancerotropic liposomes [J]. *Int J Pharm*, 2012, 432: 63–74.
- [17] Biswas S, Dodwadkar NS, Deshpande PP, et al. Liposomes loaded with paclitaxel and modified with novel triphenylphosphonium-PEG-PE conjugate possess low toxicity, target mitochondria and demonstrate enhanced antitumor effects *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Control Release*, 2012, 159: 393–402.
- [18] Zhou J, Zhao WY, Ma X, et al. The anticancer efficacy of paclitaxel liposomes modified with mitochondrial targeting conjugate in resistant lung cancer [J]. *Biomaterials*, 2013, 34: 3626–3638.
- [19] Biswas S, Dodwadkar NS, Piroyan A, et al. Surface conjugation of triphenylphosphonium to target poly (amidoamine) dendrimers to mitochondria [J]. *Biomaterials*, 2012, 33: 4773–4782.
- [20] Bielski ER, Zhong Q, Brown M, et al. Effect of the conjugation density of triphenylphosphonium cation on the mitochondrial targeting of poly (amidoamine) dendrimers [J]. *Mol Pharmaceutics*, 2015, 12: 3043–3053.
- [21] Marrache S, Tundup S, Harn DA, et al. *Ex vivo* programming of dendritic cells by mitochondria-targeted nanoparticles to produce interferon-gamma for cancer immunotherapy [J]. *ACS Nano*, 2013, 7: 7392–7402.
- [22] Theodossiou TA, Sideratou Z, Katsarou ME, et al. Mitochondrial delivery of doxorubicin by triphenylphosphonium-functionalized hyperbranched nanocarriers results in rapid and severe cytotoxicity [J]. *Pharm Res*, 2013, 30: 2832–2842.
- [23] Xu JS, Zeng F, Wu H, et al. A mitochondria-targeted and NO-based anticancer nanosystem with enhanced photoco-controllability and low dark-toxicity [J]. *J Mater Chem B*, 2015, 3: 4904–4912.
- [24] Chakraborty A, Jana NR. Design and synthesis of triphenylphosphonium functionalized nanoparticle probe for mitochondria targeting and imaging [J]. *J Phys Chem C*, 2015, 119: 2888–2895.
- [25] Zhang L, Yao HJ, Yu Y, et al. Mitochondrial targeting liposomes incorporating daunorubicin and quinacrine for treatment of relapsed breast cancer arising from cancer stem cells [J]. *Biomaterials*, 2012, 33: 565–582.
- [26] Wang XX, Li YB, Yao HJ, 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: 5673–5687.
- [27] Green M, Loewenstein PM. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat *trans*-activator protein [J]. *Cell*, 1989, 55: 1179–1188.
- [28] Nagahara H, Vocero-Akbani AM, Snyder EL, et al. Transduction of full-length TAT fusion proteins in to mammalian cells: TAT-p27Kip1 induces cell migration [J]. *Nat Med*, 1998, 4: 1449–1452.
- [29] Fernández-Carneado J, Van Gool MG, Martos V, et al. Highly efficient, nonpeptidic oligoguanidinium vectors that selectively internalize into mitochondria [J]. *J Am Chem Soc*, 2005, 127: 869–874.
- [30] Valero J, Van Gool MV, Pérez-Fernández R, et al. Non-peptidic cell-penetrating agents: synthesis of oligomeric chiral bicyclic guanidinium vectors [J]. *Org Biomol Chem*, 2012, 10: 5417–5430.
- [31] Horton KL, Stewart KM, Fonseca SB, et al. Mitochondria-penetrating peptides [J]. *Chem Biol*, 2008, 15: 375–382.
- [32] Yousif LF, Stewart KM, Horton KL, et al. Mitochondria-penetrating peptides: sequence effects and model cargo transport [J]. *ChemBioChem*, 2009, 10: 2081–2088.
- [33] Horton KL, Pereira MP, Stewart KM, et al. Tuning the activity of mitochondria-penetrating peptides for delivery or disruption [J]. *ChemBioChem*, 2012, 13: 476–485.
- [34] Wisnovsky SP, Wilson JJ, Radford RJ, et al. Targeting mitochondrial DNA with a platinum-based anticancer agent [J]. *Chem Biol*, 2013, 20: 1323–1328.
- [35] Szeto HH. Cell-permeable, mitochondrial-targeted, peptide antioxidants [J]. *AAPS J*, 2006, 8: E277–E283.
- [36] Cho S, Szeto HH, Kim E, et al. A novel cell-permeable antioxidant peptide, SS-31, attenuates ischemic brain injury by down-regulating CD36 [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282: 4634–4642.
- [37] Thomas DA, Stauffer C, Zhao KS, et al. Mitochondrial targeting with antioxidant peptide SS-31 prevents mitochondrial depolarization, reduces islet cell apoptosis, increases islet cell yield, and improves posttransplantation function [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2007, 18: 213–222.
- [38] Manczak M, Mao PZ, Calkins M, et al. Mitochondria-targeted antioxidants protect against amyloid- β toxicity in Alzheimer's disease neurons [J]. *J Alzheimers Dis*, 2010, 20: S609–S631.
- [39] Fan PC, Ge Y, Jiang W, et al. Research progress in mitochondria-targeted antioxidants [J]. *J Pharm Pract (药学实践杂志)*, 2015, 33: 1–4.
- [40] Zhang ZW, Liu ZY, Ma L, et al. Reversal of multidrug

- resistance by mitochondrial targeted self-assembled nanocarrier based on stearylamine [J]. *Mol Pharmaceutics*, 2013, 10: 2426–2434.
- [41] Han JY, Lee TH, Tung CH, et al. Design and synthesis of a mitochondria-targeting carrier for small molecule drugs [J]. *Org Biomol Chem*, 2014, 12: 9793–9796.
- [42] Chen ZP, Zhang LJ, Song Y, et al. Hierarchical targeted hepatocyte mitochondrial multifunctional chitosan nanoparticles for anticancer drug delivery [J]. *Biomaterials*, 2015, 52: 240–250.
- [43] Zhou FF, Xing D, Wu BY, et al. New insights of transmembranal mechanism and subcellular localization of noncovalently modified single-walled carbon nanotubes [J]. *Nano Lett*, 2010, 10: 1677–1681.
- [44] Zhou FF, Wu SN, Wu BY, et al. Mitochondria-targeting single-walled carbon nanotubes for cancer photothermal therapy [J]. *Small*, 2011, 7: 2727–2735.
- [45] Zhou FF, Wu SN, Yuan Y, et al. Mitochondria-targeting photoacoustic therapy using single-walled carbon nanotubes [J]. *Small*, 2012, 8: 1543–1550.
- [46] Wen LW, Ding WZ, Yang SH, et al. Microwave pumped high-efficient thermoacoustic tumor therapy with single wall carbon nanotubes [J]. *Biomaterials*, 2016, 75: 163–173.
- [47] Jiang L, Li L, He XD, et al. Overcoming drug-resistant lung cancer by paclitaxel loaded dual-functional liposomes with mitochondria targeting and pH-response [J]. *Biomaterials*, 2015, 52: 126–139.
- [48] Mo R, Sun Q, Xue JW, et al. Multistage pH-responsive liposomes for mitochondrial-targeted anticancer drug delivery [J]. *Adv Mater*, 2012, 24: 3659–3665.
- [49] Liu XH, Dong WT, Jing EG, et al. Physiological and biochemical functions of mitochondria [J]. *Biotechnol Bull (生物技术通报)*, 2008, S1: 38–40.
- [50] Liang K, Cao BZ. Progress on cell apoptosis of mitochondrial regulation [J]. *Biomed Eng Clin Med (生物医学工程与临床)*, 2014, 18: 501–505.
- [51] Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria as targets for chemotherapy [J]. *Apoptosis*, 2009, 14: 624–640.
- [52] Duchen MR. Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology [J]. *Mol Asp Med*, 2004, 25: 365–451.
- [53] Yu ZH, Sun QQ, Pan W, et al. A near-infrared triggered nanophotosensitizer inducing domino effect on mitochondrial reactive oxygen species burst for cancer therapy [J]. *ACS Nano*, 2015, 9: 11064–11074.
- [54] Ma J, Lim C, Sacher JR, et al. Mitochondrial targeted β -lapachone induces mitochondrial dysfunction and catastrophic vacuolization in cancer cells [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2015, 25: 4828–4833.
- [55] Reed JC, Zha H, Aime-Sempe C, et al. Structure-function analysis of Bcl-2 family proteins. Regulators of programmed cell death [J]. *Adv Exp Med Biol*, 1996, 406: 99–112.
- [56] Antonsson B, Montessuit S, Lauper S, et al. Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome C release from mitochondria [J]. *Biochem J*, 2000, 345: 271–278.
- [57] Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, et al. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours [J]. *Nature*, 2005, 435: 677–681.
- [58] Ponassi R, Biasotti B, Tomati V, et al. A novel Bim-BH3-derived Bcl-XL inhibitor: biochemical characterization, *in vitro*, *in vivo* and *ex-vivo* anti-leukemic activity [J]. *Cell Cycle*, 2008, 7: 3211–3224.
- [59] Song T, Xue ZG, Zhang ZC, et al. Pan-BH3 mimetic S1 exhibits broad-spectrum antitumour effects by cooperation between bax and bak [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2013, 113: 145–151.
- [60] Abulwerdi F, Liao CZ, Liu ML, et al. A novel small-molecule inhibitor of mcl-1 blocks pancreatic cancer growth *in vitro* and *in vivo* [J]. *Mol Cancer Ther*, 2014, 13: 565–575.
- [61] Zhao Y, Neuzil J, Wu K. Vitamin E analogues as mitochondria-targeting compounds: from the bench to the bedside? [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2009, 53: 129–139.
- [62] Kovarova J, Bajzikova M, Vondrusova M, et al. Mitochondrial targeting of α -tocopheryl succinate enhances its anti-mesothelioma efficacy [J]. *Red Rep*, 2014, 19: 16–25.
- [63] Mallick A, More P, Ghosh S, et al. Dual drug conjugated nanoparticle for simultaneous targeting of mitochondria and nucleus in cancer cells [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7: 7584–7598.
- [64] Choi J, Shin J, Lee J, et al. Magnetic response of mitochondria-targeted cancer cells with bacterial magnetic nanoparticles [J]. *Chem Commun*, 2012, 48: 7474–7476.
- [65] Ju EG, Li ZH, Liu Z, et al. Near-infrared light-triggered drug-delivery vehicle for mitochondria-targeted chemophotothermal therapy [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2014, 6: 4364–4370.
- [66] Chacinska A, Koehler CM, Milenkovic D, et al. Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms [J]. *Cell*, 2009, 138: 628–644.

- [67] Xue Q, Pei HF, Duan HX, et al. Research on mitochondrial translocase of outer mitochondrial membrane complex in cardiovascular diseases [J]. *Chin Heart J (心脏杂志)*, 2014, 26: 214–217.
- [68] Waegemann K, Popov-čeleketić D, Neupert W, et al. Cooperation of TOM and TIM23 complexes during translocation of proteins into mitochondria [J]. *J Mol Biol*, 2015, 427: 1075–1084.
- [69] Schatz G. The protein import system of mitochondria [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271: 31763–31766.
- [70] Del-Gaizo V, Payne RM. A novel TAT-mitochondrial signal sequence fusion protein is processed, stays in mitochondria, and crosses the placenta [J]. *Mol Ther*, 2003, 7: 720–730.
- [71] Shokolenko IN, Alexeyev MF, Ledoux SP, et al. TAT-mediated protein transduction and targeted delivery of fusion proteins into mitochondria of breast cancer cells [J]. *DNA Rep*, 2005, 4: 511–518.
- [72] Shokolenko IN, Alexeyev MF, Robertson FM, et al. The expression of exonuclease III from *E. coli* in mitochondria of breast cancer cells diminishes mitochondrial DNA repair capacity and cell survival after oxidative stress [J]. *DNA Rep*, 2003, 2: 471–482.
- [73] Lu P, Bruno BJ, Rabenau M, et al. Delivery of drugs and macromolecules to the mitochondria for cancer therapy [J]. *J Control Release*, 2015, 240: 38–51.
- [74] Gibbs AC, Bjorndahl T, Hodges RS, et al. Probing the structural determinants of type II' beta-turn formation in peptides and proteins [J]. *J Am Chem Soc*, 2002, 124: 1203–1213.
- [75] Jelokhani-Niaraki M, Kondejewski LH, Farmer SW, et al. Diastereoisomeric analogues of gramicidin S: structure, biological activity and interaction with lipid bilayers [J]. *Biochem J*, 2000, 349: 747–755.
- [76] Kanaia A, Zabbarova I, Amoscato A, et al. Mitochondrial targeting of radioprotectants using peptidyl conjugates [J]. *Org Biomol Chem*, 2007, 21, 5: 307–309.
- [77] Wipf P, Xiao JB, Jiang JF, et al. Mitochondrial targeting of selective electron scavengers: synthesis and biological analysis of hemigramicidin-TEMPO conjugates [J]. *J Am Chem Soc*, 2005, 127: 12460–12461.
- [78] Jiang JF, Belikova NA, Hoyer AT, et al. A mitochondria-targeted nitroxide/hemigramicidin S conjugate protects mouse embryonic cells against gamma irradiation [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2008, 70: 816–825.