

线粒体靶向药物的研究进展

王华伟 张宇睿 徐文清

300192 天津, 中国医学科学院北京协和医学院放射医学研究所, 天津市放射医学与分子核医学重点实验室

通信作者: 徐文清, Email: xuwenqing@irm-cams.ac.cn

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2016.04.015

【摘要】 电离辐射产生的活性氧(ROS)和自由基攻击 DNA、脂质、蛋白质等生物大分子, 造成机体细胞和组织的损伤。体内 ROS 主要来自线粒体, 辐射造成线粒体损伤, 使细胞内 ROS 持续增加。线粒体靶向抗氧化剂由于靶向在线粒体释放, 能够高效地消除辐射导致的线粒体内过量 ROS, 保护线粒体, 降低电离辐射对细胞的损伤, 被认为是一类有前景的辐射损伤防护药。近年来, 文献报道了多种线粒体靶向给药系统, 笔者主要分析了线粒体靶向给药系统的方法及其发展趋势以及在辐射防护上的应用潜能。

【关键词】 线粒体; 靶向治疗; 给药系统; 线粒体疾病; 辐射防护剂

基金项目: 国家自然科学基金(81273005); 天津市应用基础与前沿技术研究重点项目(14JCZDJC36400); 北京协和医学院青年基金(33320140124); 中国医学科学院放射医学研究所探索基金(1555)

Progress in mitochondrial targeting drug delivery systems Wang Huawei, Zhang Yurui, Xu Wenqing

Key Laboratory of Radiation Medicine and Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China

Corresponding author: Xu Wenqing, Email: xuwenqing@irm-cams.ac.cn

【Abstract】 Free radicals and reactive oxygen species (ROS) generated by ionizing radiation attack vital macromolecules, such as DNA, lipids and Proteins, thus causing cell and tissue damage. The major source of radiation-induced ROS production is believed to be associated with mitochondria. Removal of excessive mitochondrial reactive oxygen species by electron scavengers and antioxidants is a promising therapeutic strategy to reduce the detrimental effects of radiation exposure. Mitochondrial targeting antioxidants and electron scavengers have been suggested as promising radioprotectors due to their well ability to remove of excessive mitochondrial reactive oxygen species. Papers about mitochondrial targeting drug delivery systems have been published in recent years. Technique of mitochondrial targeting drug delivery system, potential application in radiation protection and its development trend are discussed in this review.

【Key words】 Mitochondria; Targeted therapy; Medication system; Mitochondrial diseases; Radiation-protective agents

Fund programs: National Natural Science Foundation of China (81273005); Natural Science Foundation of Tianjin (14JCZDJC36400); Youth Fund of Peking Union Medical College (33320140124); Research Fund of Institute of Radiation, Chinese Academy of Medical Sciences (1555)

遗传学和分子生物学方面的研究表明, 线粒体在生理功能的内稳态(包括电子传递、凋亡调节和钙稳态调节等)方面发挥着重要的作用, 这些生理功能对人体健康来说至关重要。如果这些生理功能出现了障碍, 会引起多种疾病, 例如: 糖尿病、

癌症及遗传线粒体疾病分别由能量转运系统的功能障碍、细胞凋亡调节的缺失以及线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)的突变引起^[1]。线粒体功能障碍会引起多种线粒体疾病, 因此, 线粒体是一个重要的药物靶点^[2]。研究表明, 补充线粒体缺失

的功能可以治疗线粒体疾病,但是由于缺乏合适的药物靶向系统,导致药物进入体内后,分布广泛,不能有效地浓集在靶点,导致治疗效果不佳。因此,发展针对药物小分子(电子传递系统的辅酶和抗氧化剂,如维生素E)和大分子(包括线粒体蛋白和mtDNA)的靶向药物是非常必要的^[3]。

电离辐射诱发自由基及活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生,是辐射损伤的主要因素。线粒体呼吸链是ROS的主要来源,因此,减少辐射后ROS的产生,以及加快照射后组织细胞内ROS的清除成为辐射防护药物的研发重点,线粒体靶向抗氧化剂成为辐射防护药研究的新方向。Rwigema等^[4]通过研究提出了两条发展线粒体靶向小分子辐射防护药的新策略,他们合成了线粒体靶向小分子辐射防护药JP4-039(氮氧自由基)和P53/MDM2/MDM4(P53:肿瘤转化相关蛋白53;MDM2:鼠双微体2;MDM4:鼠双微体4,MDM2和MDM4是P53的主要负调控蛋白)等抑制剂,体内、体外实验均验证其具有辐射防护作用^[4]。Jiang等^[5]也报道了一种新型的线粒体靶向辐射防护药,他们通过三苯基膦和氮氧自由基连接形成新化合物TPEY-Tempo (mitochondria-targeted triphenylphosphonium-conjugated nitroxide),三苯基膦可以把氮氧自由基靶向到线粒体中清除电离辐射产生的自由基,从而保护细胞免受损伤,达到辐射防护的作用。近些年,线粒体靶向技术发展迅速,线粒体靶向抗氧化剂在辐射防护方面具有自己独特的优势,因此,笔者综述最近几年发展较为成熟的线粒体靶向技术和方法,着重分析线粒体靶向给药系统的研究进展,讨论各个系统的优缺点及线粒体的靶向治疗策略。

1 小分子药物靶向线粒体的研究

1.1 利用亲脂阳离子实现线粒体靶向

线粒体具有150~180 mV的膜电势(外正内负),细胞内带正电荷的复合物由于电势能的驱动,可以有效地积累到线粒体中^[6]。维生素E和亲脂阳离子三苯基膦可以轭合成复合物MitoE,MitoE带有正电荷,可以靶向到线粒体中。同时体外细胞实验表明,与单纯的维生素E相比,MitoE能够更有效地通过脂质双分子层到达线粒体中^[7]。此外,MitoQ是辅酶Q和三苯基膦轭合的复合物,进入到线粒体后,MitoQ在线粒体呼吸链中被代谢为活性成分

辅酶Q,其可以阻止脂质过氧化并清除线粒体内的ROS,保护线粒体使其不受氧化应激损伤^[8-9]。除此之外,基于亲脂阳离子而形成的线粒体靶向药物还有MitoF、Mito(CEHC)、TPMP [MitoF:辅酶F和三苯基膦轭合的复合物;Mito(CEHC):线粒体靶向的2,5,7,8-四甲基-2-(2'-羧基乙基)-6-羟基苯并二氢吡喃;TPMP:三苯基膦磷酸酯]等^[10]。

1.2 利用SS肽(Szeto-Schiller peptides)实现线粒体靶向

Zhao等^[11]研究表明,可以用细胞渗透性肽靶向抗氧化剂到线粒体中,从而降低细胞内ROS的含量。该研究开发了一种新方法,即利用SS肽进入到线粒体内膜。SS肽包含有酪氨酸和芳香族阳离子肽,芳香族阳离子肽可以依赖线粒体的膜电势实现线粒体靶向,酪氨酸可以清除过氧化氢、过氧硝酸盐,抑制脂质过氧化^[12]。这些肽抗氧化剂具有细胞渗透性,可以在线粒体内膜中浓集到1000倍,同时这些肽抗氧化物能显著降低细胞内的ROS和由叔丁基过氧化氢(tBHP)引起的神经元N₂A细胞死亡。Zhao等^[11]推测这些线粒体内膜靶向的抗氧化剂可能对线粒体疾病、与年龄相关的氧化应激等有很好的疗效。

1.3 选择性电子接受剂的线粒体靶向

最近Wipf等^[13]报道了一种具有线粒体靶向电子接受ROS清除作用的XJB-5-131。它把具有ROS清除活性的有效载荷部分和线粒体靶向部分连接起来,其中,XJB-5-131的有效载荷部分由氮氧自由基组成,氮氧自由基接受一个电子转变成羟胺,羟胺是很好的ROS清除剂,并且在清除ROS的过程中重新转变为氮氧自由基^[14]。XJB-5-131的靶向部分由短杆菌肽S的Leu-D-Phe-Pro-Val-Orn片段组成,这是一种具有膜活性的环肽抗生素^[15]。由于这种类型的抗生素对细菌膜有很高的亲和力,同时由于细菌和线粒体之间具有紧密的联系,所以该片段可以高效地把XJB-5-131靶向到线粒体中^[16]。Wipf等^[13]已经在大鼠身上证实XJB-5-131可以改善回肠黏膜屏障的功能障碍,XJB-5-133也可以降低这些大鼠回肠黏膜上线粒体磷脂和心磷脂的过氧化,同时也能降低回肠黏膜严重的出血性休克诱导的促凋亡酶caspases 3和caspases 7的激活。

2 蛋白质靶向线粒体的治疗系统

线粒体蛋白在体内发挥着重要的生理功能,蛋

白质的功能性障碍可以造成许多线粒体疾病。通过线粒体靶向系统导入正常的蛋白质以替代有缺陷的蛋白质来改善和治疗这些疾病^[17]。

2.1 线粒体靶向信号肽(mitochondrial targeting signal peptide, MTS)介导的线粒体蛋白导入机制
线粒体包含大量蛋白质, 其中仅有 13 种蛋白质是由 mtDNA 编码的。99%的线粒体蛋白是由核基因编码, 在细胞质的核糖体上合成, 再通过 MTS 转运到线粒体中。MTS 位于前区蛋白的 N 端, 包含 10~70 个氨基酸, MTS 一旦转运到线粒体中, 会经过一步或者两步水解反应完成降解^[18-19]。基于以上过程可实现线粒体靶向的目标蛋白有超氧化物歧化酶、凋亡诱导蛋白和抗凋亡蛋白。靶向蛋白进入线粒体可以保护 mtDNA 和核 DNA 免受 ROS 和过度凋亡的损伤^[20]。应用 MTS 可以有效地把蛋白质导入到线粒体中, 目前已经报道了数例关于靶向限制酶到线粒体的治疗方法^[21-23]。Tanaka 等^[24]选择限制性核酸内切酶 SmaI 作为目标蛋白, SmaI 选择性酶切由 8993T→G 突变引起 mtDNA 突变的疾病。该研究结果显示, 线粒体靶向 SmaI 具有对突变 mtDNA 较强的清除能力, 由此表明这是一种创新的线粒体疾病治疗方法。

尽管 MTS 呈现了很好的前景, 但对于一些特殊情况, 这种方法是不适用的。第一种情况是线粒体导入蛋白机制存在缺陷, 使得 MTS 融合蛋白在转运至线粒体中受到扰动。第二种情况是导入 mtDNA 编码的蛋白, 由于这些蛋白一般具有疏水性, 不能维持展开的构象, 而该构象是 MTS 导入机制所必须的。同时, MTS 介导的导入机制对蛋白质的分子大小有严格的要求^[25], 不能传送展开的蛋白质和 DNA、肽核酸等高分子^[26]。

2.2 通过蛋白质转导结构域(protein transduction domain, PTD)来传送治疗蛋白

最近研究发现, 通过 PTD 来传递蛋白是一种很有前途的方法, 可以实现各种类型的生物活性分子的转运^[27-28]。其中一种 PTD 是由 HIV-1 反式转录激活因子(trans-activator of transcription, TAT)衍生的, 它是 HIV-1 在感染早期产生的一种重要调节蛋白, PTD 由 11 个氨基酸组成(其中包括 6 个精氨酸和 2 个赖氨酸残基)。体内和体外实验都表明, 这种 PTD 能快速地透过细胞膜把药物转运到细胞中; TAT 肽已经作为一种膜渗透肽用来传送寡核

苷酸、多肽、全长蛋白质甚至 200 nm 的脂质体^[27-28]。近年来, 多种蛋白质通过 TAT 肽被转运到细胞内, 不仅如此, 进一步研究发现, TAT 肽能够通过核膜来转运药物进入线粒体^[29]。Del 等^[30]开发了一种 TAT 融合蛋白, 其是由线粒体苹果酸脱氢酶和绿色荧光蛋白(TAT-mMDH-GFP)(mMDH: 线粒体苹果酸脱氢酶; GFP: 绿色荧光蛋白)的 MTS 衍生而来。TAT-mMDH-GFP 通过 MTS 介导的通道转运药物进入线粒体, 如果 TAT 是非选择性的渗透进入线粒体, 转运进入线粒体的治疗蛋白将会重新分布, 进而影响治疗效果, 为了避免这种情况, TAT 和 mMDH 的 N 端连接, 这样在基质集合区 MTS 被特异性裂开, 实现了 GFP 和 TAT 分离, GFP 被有效地保留在基质中。Shokolenko 等^[31]利用 PTD 和 MTS 的结合物传送核酸外切酶 III(exonuclease, Exo III)进入线粒体, Exo III 的 N 端和 C 端分别与 MTS 和 TAT 结合形成 MTS-Exo III-TAT 融合蛋白, Exo III 的过表达使癌症细胞对氧化损伤更敏感, 癌细胞的存活率下降。在这个实验中, 具有细胞质传送功能的 PTD 和具有线粒体靶向活性的 MTS 的结合可以弥补 PTD 的非特异性蛋白导入, 也就是说, 利用这个策略可以把蛋白质有效地导入细胞质和线粒体中。

3 线粒体疾病的基因治疗

线粒体疾病与 mtDNA 的突变和缺失有密切的关系。mtDNA 是一个环状的含有 16 569 个碱基对的分子, 它编码了 13 个与氧化磷酸化有关的蛋白, 由于没有外显子区域, 相比于核 DNA, mtDNA 具有更高的信息密度。因此, mtDNA 对基因突变更敏感, 这导致了更高概率的线粒体疾病的发生。基因突变引起各种线粒体疾病, 线粒体传送基因进入线粒体可以修复突变的 mtDNA 分子或者补偿正常的 mtDNA, 从而有效地治疗线粒体疾病^[32]。

3.1 靶向寡脱氧核苷酸(oligodeoxynucleotide, ODN)和肽核酸

研究表明, 传送具有治疗作用的 ODN 和肽核酸进入线粒体具有治疗由 mtDNA 突变引起的线粒体疾病的潜力, 把 MTS 分别结合到 ODN、双链 DNA 或肽核酸上, 这些结合物可以通过蛋白质导入机制, 跨过线粒体内膜和外膜进入线粒体^[33]。

3.2 环形 DNA

在理想的状态下, mtDNA 是难突变的, 这种

情况下的细胞表现为同质体。然而,在特定的情况下,细胞既有突变体也有野生型,这种情况表现为异质体。在线粒体相关疾病中,当突变的 mtDNA 百分比超过一个特定的阈值时,线粒体功能障碍在临床表现上比较明显。相应的,传送大量野生型 mtDNA 进入患有线粒体疾病的细胞中,其进入线粒体基质中可以降低突变 mtDNA 的百分比,从而实现线粒体疾病的抑制。所以,利用 MTS 耦合的方法传送 mtDNA 和质粒 DNA (plasmid DNA, pDNA) 这种大分子进入线粒体可以实现线粒体的基因治疗^[34]。

4 新型的线粒体靶向治疗系统

为了实现对线粒体疾病的治疗,线粒体靶向给药系统必须实现突破。包括:设计一种简单、有效的方法来包裹像化学品、蛋白质、多肽、ODN 和环状 DNA 等类型的药物;建立靶向系统,把这些化合物靶向到特定的细胞,能够调节细胞内的转运,包括从核内体到线粒体中^[16]。

4.1 多功能信封式纳米装置(multifunction envelop-type nano device, MEND)

包封药物和大分子进入药物载体的效率是发展线粒体靶向系统的重要因素,众所周知,抗癌药阿霉素通过有效包封可以提高药效,为了治疗各种类型的线粒体疾病,许多分子如 ODN、pDNA 和折叠蛋白质都应该被靶向到肝脏细胞的线粒体中^[16]。由于缺乏有效的靶向方法,基因治疗和蛋白质治疗的发展受阻。目前,MEND 是一种有前途的靶向系统,其由一个浓缩的 pDNA 和脂质的信封结构组成。MEND 有很多优势:①浓缩的 pDNA 颗粒和脂质通过电子作用能够有效地结合在一起;②MEND 具有各种功能装置,比如:延长血液循环的聚乙二醇、起靶向作用的配体和促进核内体逃逸并对 pH 敏感的融合肽等;③MEND 的尺寸大小可以被控制在 100~300 nm,这对细胞摄入是有利的。因此,这种包封方法被认为可以解决很多问题(比如:低包封率和缓控释等)。随后的研究已经成功开发出 ODN-MEND,其由浓缩的 ODN 核心和脂质信封结构组成,ODN-MEND 通过形成浓缩的 ODN 颗粒可以显著提高脂质对 ODN 的包封效率,包封率明显高于其他方法;ODN-MEND 的药效表明,MEND 可以有效地包封大分子进入细胞质,因此,可以利

用 MEND 包封具有治疗作用的蛋白质和多肽^[35-36]。

4.2 脂质体

近年来,许多线粒体靶向脂质体被开发出来。目前,线粒体靶向脂质体主要用于抗肿瘤研究。线粒体靶向脂质体一般是由脂质体包裹小分子药物(如抗癌药),脂质体的表面由线粒体靶向分子修饰,其中大部分的靶向分子是由三苯基膦的衍生物和具有长循环性质的分子通过酯化或酰化反应连接在一起,三苯基膦作为亲脂阳离子可以在线粒体膜电势的驱动下实现线粒体靶向^[37]。线粒体靶向脂质体对耐药性肿瘤有较好的抑制作用,同时也能提高药物的细胞摄入,是一种比较有前景的抗肿瘤药^[38]。

5 小结与展望

近年来,线粒体靶向给药系统的研究取得了很大进展,但仍有很多问题亟待解决。靶向药物到线粒体后,药物在线粒体中的转运被认为是线粒体疾病治疗的重要一步。如凋亡诱导药物和凋亡抑制剂应该被转运到线粒体的外膜,因为在线粒体的外膜会引发和凋亡有关的各种反应;而与呼吸链相关的蛋白质和辅酶应该被转运到线粒体的膜间隙和内膜,因为在这两个地方有与呼吸相关的各种电子传送系统。基于这种观念,目前已经提出了一种新概念“线粒体内的转运调节”来实现更精细的药物传送^[39]。众所周知,电离辐射产生的 ROS 是由线粒体呼吸链的电子渗漏产生的,所以把抗氧化剂转运到线粒体的间隙和内膜才能最大限度地发挥药物作用。线粒体靶向技术发展迅速,在肿瘤治疗、线粒体疾病、中枢退行性疾病等方面有较多的研究,但在辐射防护方面研究较少,基于线粒体靶向抗氧化剂在辐射防护方面有自己独特的优势,我们坚信将来会有越来越多关于线粒体靶向辐射防护药的研究。所以,随着精细的线粒体内转运调节技术的发展,线粒体靶向抗氧化剂将会成为一种有前途的辐射防护药。

利益冲突 本研究由署名作者按以下贡献声明独立开展,不涉及任何利益冲突。

作者贡献声明 王华伟负责论文撰写;张宇睿负责文献检索和整理;徐文清负责论文审阅和修订。

参 考 文 献

[1] Chan DC. Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and

- development[J]. *Cell*, 2006, 125(7):1241–1252. DOI:10.1016/j.cell.2006.06.010.
- [2] Heller A, Brockhoff G, Goepferich A. Targeting drugs to mitochondria[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2012, 82(1):1–18. DOI:10.1016/j.ejpb.2012.05.014.
- [3] D'Souza GG, Wagle MA, Saxena V, et al. Approaches for targeting mitochondria in cancer therapy[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1807(6):689–696. DOI:10.1016/j.bbabi.2010.08.008.
- [4] Rwigema JC, Beck B, Wang W, et al. Two strategies for the development of mitochondrion-targeted small molecule radiation damage mitigators[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2011, 80(3):860–868. DOI:10.1016/j.ijrobp.2011.01.059.
- [5] Jiang J, Stoyanovsky DA, Belikova NA, et al. A mitochondria-targeted triphenylphosphonium-conjugated nitroxide functions as a radioprotector/mitigator[J]. *Radiat Res*, 2009, 172(6):706–717. DOI:10.1667/RR1729.1.
- [6] 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(14):3626–3638. DOI:10.1016/j.biomaterials.2013.01.078.
- [7] Reily C, Mitchell T, Chacko BK, et al. Mitochondrially targeted compounds and their impact on cellular bioenergetics[J]. *Redox Biol*, 2013, 1(1):86–93. DOI:10.1016/j.redox.2012.11.009.
- [8] Mao P, Manczak M, Shirendeb UP, et al. MitoQ, a mitochondria-targeted antioxidant, delays disease progression and alleviates pathogenesis in an experimental autoimmune encephalomyelitis mouse model of multiple sclerosis[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1832(12):2322–2331. DOI:10.1016/j.bbadis.2013.09.005.
- [9] Milagros RM, Victor VM. Targeting antioxidants to mitochondria and cardiovascular diseases: the effects of mitoquinone[J]. *Med Sci Monit*, 2007, 13(7):RA132–145.
- [10] Li L, Brichard L, Larsen L, et al. Radiosynthesis of 11-(¹⁸F) fluoroundecyltriphenylphosphonium (MitoF) as a potential mitochondria-specific positron emission tomography radiotracer[J]. *J Labeled Comp Radiopharm*, 2013, 56(14):717–721. DOI:10.1002/jlcr.3109.
- [11] Zhao K, Zhao GM, Wu D, et al. Cell-permeable peptide antioxidants targeted to inner mitochondrial membrane inhibit mitochondrial swelling, oxidative cell death, and reperfusion injury[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(33):34682–34690. DOI:10.1074/jbc.M402999200.
- [12] Birk AV, Chao WM, Bracken C, et al. Targeting mitochondrial cardiolipin and the cytochrome c/cardiolipin complex to promote electron transport and optimize mitochondrial ATP synthesis[J]. *Br J Pharmacol*, 2014, 171(8):2017–2028. DOI:10.1111/bph.12468.
- [13] Wipf P, Xiao J, Jiang J, et al. Mitochondrial targeting of selective electron scavengers; synthesis and biological analysis of hemigramicidin-TEMPO conjugates[J]. *J Am Chem Soc*, 2005, 127(36):12460–12461. DOI:10.1021/ja053679l.
- [14] Hoye AT, Davoren JE, Wipf P, et al. Targeting mitochondria[J]. *Acc Chem Res*, 2008, 41(1):87–97. DOI:10.1021/ar700135m.
- [15] Xun Z, Rivera-Sánchez S, Ayala-Peña S, et al. Targeting of XJB-5131 to mitochondria suppresses oxidative DNA damage and motor decline in a mouse model of Huntington's disease[J]. *Cell Rep*, 2012, 2(5):1137–1142. DOI:10.1016/j.celrep.2012.10.001.
- [16] Gruber J, Fong S, Chen CB, et al. Mitochondria-targeted antioxidants and metabolic modulators as pharmacological interventions to slow ageing[J]. *Biotechnol Adv*, 2013, 31(5):563–592. DOI:10.1016/j.biotechadv.2012.09.005.
- [17] Yamada Y, Akita H, Kogure K, et al. Mitochondrial drug delivery and mitochondrial disease therapy—an approach to liposome-based delivery targeted to mitochondria[J]. *Mitochondrion*, 2007, 7(1/2):63–71. DOI:10.1016/j.mito.2006.12.003.
- [18] Dolezal P, Likić V, Tachezy J, et al. Evolution of the molecular machines for protein import into mitochondria[J]. *Science*, 2006, 313(5785):314–318. DOI:10.1126/science.1127895.
- [19] Bohnert M, Pfanner N, van der Laan M. A dynamic machinery for import of mitochondrial precursor proteins[J]. *FEBS Lett*, 2007, 581(15):2802–2810. DOI:10.1016/j.febslet.2007.03.004.
- [20] Murcha MW, Kmiec B, Kubiszewski-Jakubiak S, et al. Protein import into plant mitochondria: signals, machinery, processing, and regulation[J]. *J Exp Bot*, 2014, 65(22):6301–6335. DOI:10.1093/jxb/eru399.
- [21] Bacman SR, Williams SL, Duan D, et al. Manipulation of mtDNA heteroplasmy in all striated muscles of newborn mice by AAV9-mediated delivery of a mitochondria-targeted restriction endonuclease[J]. *Gene Ther*, 2012, 19(11):1101–1106. DOI:10.1038/gt.2011.196.
- [22] Bacman SR, Williams SL, Hernandez D, et al. Modulating mtDNA heteroplasmy by mitochondria-targeted restriction endonucleases in a 'differential multiple cleavage-site' model[J]. *Gene Ther*, 2007, 14(18):1309–1318. DOI:10.1038/sj.gt.3302981.
- [23] Srivastava S, Moraes CT. Manipulating mitochondrial DNA heteroplasmy by a mitochondrially targeted restriction endonuclease[J]. *Hum Mol Genet*, 2001, 10(26):3093–3099. DOI:10.1093/hmg/10.26.3093
- [24] Tanaka M, Borgeld HJ, Zhang J, et al. Gene therapy for mitochondrial disease by delivering restriction endonuclease SmaI into mitochondria[J]. *J Biomed Sci*, 2002, 9(6 Pt 1):534–541. DOI:10.1007/BF02254980.
- [25] Esaki M, Kanamori T, Si N, et al. Two distinct mechanisms drive protein translocation across the mitochondrial outer membrane in the late step of the cytochrome b(2) import pathway[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(21):11770–11775.
- [26] Kulawiak B, Höpker J, Gebert M, et al. The mitochondrial protein import machinery has multiple connections to the respiratory chain[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1827(5):612–626. DOI:10.1016/j.bbabi.2012.12.004.
- [27] Torchilin VP, Rammohan R, Weissig V, et al. TAT peptide on the surface of liposomes affords their efficient intracellular delivery

- even at low temperature and in the presence of metabolic inhibitors [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(15): 8786–8791. DOI:10.1073/pnas.151247498.
- [28] Joliot A, Prochiantz A. Transduction peptides: from technology to physiology[J]. *Nat Cell Biol*, 2004, 6(3): 189–196. DOI: 10.1038/nch0304–189.
- [29] Torchilin VP, Rammohan R, Weissig V, et al. TAT peptide on the surface of liposomes affords their efficient intracellular delivery even at low temperature and in the presence of metabolic inhibitors [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(15): 8786–8791. DOI: 10.1073/pnas.151247498.
- [30] Del GV, Mackenzie JA, Payne RM. Targeting proteins to mitochondria using TAT[J]. *Mol Genet Metab*, 2003, 80(1/2): 170–180. DOI:10.1016/j.ymgme.2003.08.017
- [31] 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 Repair (Amst)*, 2005, 4(4): 511–518. DOI:10.1016/j.dnarep.2004.11.009.
- [32] Marin SE, Mesterman R, Robinson B, et al. Leigh syndrome associated with mitochondrial complex I deficiency due to novel mutations in NDUFV1 and NDUFS2[J]. *Gene*, 2013, 516(1): 162–167. DOI:10.1016/j.gene.2012.12.024.
- [33] Milesina D, Ibrahim N, Boesch P, et al. Mitochondrial transfection for studying organellar DNA repair, genome maintenance and aging [J]. *Mech Ageing Dev*, 2011, 132(8/9): 412–423. DOI:10.1016/j.mad.2011.05.002.
- [34] D'Souza GG, Rammohan R, Cheng SM, et al. DQAsome-mediated delivery of plasmid DNA toward mitochondria in living cells[J]. *J Control Release*, 2003, 92(1/2): 189–197. DOI:10.1016/S0168-3659(03)00297-9.
- [35] Kogure K, Moriguchi R, Sasaki K, et al. Development of a non-viral multifunctional envelope-type nano device by a novel lipid film hydration method[J]. *J Control Release*, 2004, 98(2): 317–323. DOI:10.1016/j.jconrel.2004.04.024.
- [36] Kajimoto K, Sato Y, Nakamura T, et al. Multifunctional envelope-type nano device for controlled intracellular trafficking and selective targeting in vivo[J]. *J Control Release*, 2014, 190: 593–606. DOI:10.1016/j.jconrel.2014.03.058.
- [37] 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(24): 5673–5687. DOI:10.1016/j.biomaterials.2011.04.029.
- [38] 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(3): 393–402. DOI:10.1016/j.jconrel.2012.01.009.
- [39] Yamada Y, Harashima H. Mitochondrial drug delivery systems for macromolecule and their therapeutic application to mitochondrial diseases[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60(13/14): 1439–1462. DOI:10.1016/j.addr.2008.04.016.

(收稿日期:2016-01-13)