

聚乙二醇修饰的阳离子脂质体作为 siRNA 传递系统的处方优化

李颖寰, 宗 莉, 朱家璧*

(中国药科大学药剂学教研室, 南京 210009)

摘 要 研究摩尔分数为 0% ~ 5% 的聚乙二醇(PEG)修饰的阳离子脂质体作为 siRNA 传递系统的优劣。制备了两组高低电荷的空白阳离子脂质体, 分别含有摩尔分数为 40% 和 20% 的 1, 2-二油酰基-3-三甲氨基丙烷(DOTAP), 以人胰腺癌细胞株 Hs-766T 作为细胞模型, 比较了细胞膜表面结合量及内吞量分别随时间和细胞外给药浓度变化的动力学曲线; 结果显示 4 h 时细胞表面结合达到稳态, 高电荷脂质体组与细胞的结合量明显高于低电荷脂质体组, PEG 的加入使脂质体与细胞表面的不饱和型结合转变为可饱和型。采用共聚焦显微镜定性观察载 siRNA 的阳离子脂质体在 6 h 的细胞内分布情况, 结果表明摩尔分数为 40% DOTAP 与 0% ~ 2% PEG 组合有效地将 siRNA 转运至细胞质, 而 40% DOTAP 与 5% PEG 组合对转运无效。

关键词 阳离子脂质体; 聚乙二醇修饰; 细胞膜表面结合; 细胞内吞; 基因传递系统

中图分类号 R944.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-5048(2011)05-0412-06

Formulation optimization of PEGylated cationic liposomes as siRNA delivery system

LI Ying-huan, ZONG Li, ZHU Jia-bi*

Department of Pharmaceutics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract PEGylated cationic liposomes containing 0% -5% (mole fraction) 1, 2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-[methoxy(polyethylene glycol)-2000] (PEG) were studied as siRNA delivery system. Two groups of cationic liposomes containing 1, 2-dioleoyl-3-trimethylammoniumpropane (DOTAP) with mole fraction of 20% and 40% respectively were prepared. The kinetic changes on tumor cellular membrane binding and internalization *vs* different time and different extracellular liposomal concentration were compared. Binding reached the equilibrium at 4 h for all tested liposomes. Cationic liposomes containing 40% (mole fraction) of DOTAP showed higher cell-association amount than those containing 20% (mole fraction) of DOTAP. Cell-membrane binding time course was changed from nonsaturable to saturable kinetics after PEGylation. Cationic liposomes containing 40% (mole fraction) of DOTAP and 0% -2% (mole fraction) of PEG were shown to successfully transfer siRNA to cytosol under confocal microscope, while those with 5% (mole fraction) PEG failed.

Key words cationic liposomes; PEGylation; cell-membrane binding; internalization; gene delivery system

基因治疗肿瘤的目标靶点通常位于细胞内, 例如, 小干扰 RNA (siRNA) 的靶点在细胞质^[1], DNA 的靶点在细胞核^[2]。裸核酸分子具有相对分子质量大、亲水性及表面电荷呈负性等性质, 使其易于被网状内皮系统(RES)所清除, 难以进入细胞。阳离子脂质体通过电荷作用使带负电的 siRNA 与脂质体有效地结合, 保护 siRNA 免受核酶降解, 并且易于与带负电的细胞表面结合, 触发细胞内吞

摄取^[3]。

聚乙二醇(PEG)修饰阳离子脂质体表面, 赋予了脂质体“隐形”的性质, 降低了脂质体被 RES 清除的概率, 提高了脂质体在血液系统的循环时间, 从而使更多的脂质体通过增强的透过和滞留(EPR)作用进入肿瘤组织; 另一方面, PEG 增加了脂质体表面的亲水性和位阻, 不易被细胞表面受体所识别, 从而降低了脂质体在肿瘤间质中的转运和细胞摄取量, 因

此有必要研究阳离子脂质体中优化的 PEG 含量,同时兼顾 EPR 作用和细胞内生物利用度。

siGLO™ siRNA 荧光标记对照产品(简称 siGLO)是一种特异性修饰的、荧光标记的、无靶点的双链 RNA 分子,自身带有核定位信号,当到达细胞质后,可自动实现细胞质到细胞核的转运,荧光信号定位于细胞核,方便转染效率的评价。因此本研究选择 siGLO 来考察测试脂质体的细胞内递送能力。

本实验考察了摩尔分数为 0%,1%,2%,5% PEG 对于阳离子脂质体转运 siGLO 的影响,以人胰腺癌 Hs-766T 细胞作为研究对象,比较了细胞水平的药动学和细胞内转运能力的优劣,优化阳离子脂质体的处方组成。

1 材 料

1.1 试剂与细胞

1,2-二油酰基-3-三甲氨基丙烷(DOTAP)、1,2-二油酰-*sn*-甘油-3-磷脂酰乙醇胺(DOPE)、1,2-二棕榈酰-*sn*-甘油-3-磷脂酰胆碱(DPPC)、*N*-甲氧基-聚乙二醇 2000-1,2-二硬脂酰-*sn*-甘油-3-磷脂酰乙醇胺(mPEG-DSPE)、1,2-二油酰-*sn*-甘油-3-磷脂酰乙醇胺-*N*-苄基罗丹明 B 磺酰铵盐(Rhod-DOPE)和胆固醇(美国 Avanti Polar Lipids 公司);siGLO™

siRNA 荧光标记对照产品(siGLO,美国 Thermo Scientific Dharmacon 公司);4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI,美国 Invitrogen 公司);其余常用试剂均为市售分析纯。Hs-766T 细胞(美国 ATCC 菌种保藏中心),细胞培养液为 DMEM 培养液,辅以 90 μg/mL 庆大霉素,90 μg/mL 头孢噻肟钠、1% 非必需氨基酸和 10% 小牛血清(美国 Fisher 公司)。

1.2 仪 器

旋转蒸发器(上海申生科技有限公司);脂质体挤出机(美国 Avanti 公司);Zetasizer 激光粒径测定仪(英国 Malvern 公司);H-7650 型透射电子显微镜(日本日立公司);RF-5301PC 荧光分光光度计(日本岛津公司);激光共聚焦显微镜(德国奥林巴斯公司)

2 方 法

2.1 空白阳离子脂质体制备

按表 1 中处方制备罗丹明标记的阳离子脂质体,采用经典的薄膜水化-聚碳酸酯膜挤出法^[4]。简单来说,所有脂质材料溶于氯仿中,旋转蒸发成膜,进一步在真空下干燥过夜;用 10% 蔗糖溶液水合,通过 100 nm 聚碳酸酯膜 11 次,得到粒径大小在 100 nm 左右的脂质体混悬液,终浓度为 10 mg/mL。

Table 1 Formulation design of cationic liposomes

Formulation Abbr. ^a	<i>n</i> (DOTAP)/%	<i>n</i> (DPPC)/%	<i>n</i> (DOPE)/%	<i>n</i> (Rhod-DOPE)/%	<i>n</i> (mPEG-DSPE)/%	<i>n</i> (Cholesterol)/%
C20-0	20	10	19	1	-	50
C20-1	20	9	19	1	1	50
C20-2	20	8	19	1	2	50
C20-5	20	5	19	1	5	50
C40-0	40	-	19	1	-	40
C40-1	40	-	19	1	1	39
C40-2	40	-	19	1	2	38
C40-5	40	-	19	1	5	35

DOTAP: 1,2-dioleoyl-3-trimethylammoniumpropane; DPPC: 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine; DOPE: 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine; Rhod-DOPE: 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-(lissamine rhodamine B sulfonyl) ammonium salt; mPEG-DSPE: 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-[methoxy(polyethylene glycol)-2000];^aX and Y in the formulation abbreviation ‘CX-Y’ were mole fraction of DOTPA and PEG, respectively

2.2 细胞膜表面结合及内吞动力学——时间动力学研究

于 6 孔板中种植 Hs-766T 细胞,待贴壁形成细胞单层且密度达每孔 1 × 10⁶ 个(约 90% 密集)时开始实验,替换培养液为罗丹明标记的空白阳离子脂质体,用无血清 DMEM 培养液稀释脂质体至 50 μg/mL 或 100 μg/mL,在 37 ℃ 和 4 ℃ 下分别作

用 0,0.17,0.5,1,2,4,6 h;在预定时间点,弃去含脂质体的细胞外 DMEM 培养液,用冰磷酸盐缓冲液(PBS)润洗细胞 3 次,加入 0.5% Triton-X 100 PBS 溶液 0.5 mL 在 37 ℃ 下作用 30 min,待细胞全部发生渗漏并脱离底壁后,加入 PBS 0.5 mL 混匀,测定罗丹明荧光强度,激发/发射波长为 557 nm/571 nm。通过自制标准曲线将罗丹明荧光强度转

化成细胞结合的脂质体量。观察细胞表面结合量达稳态的时间(t_{ss})。

2.3 细胞膜表面结合及内吞动力学——稳态浓度研究

用无血清 DMEM 培养液分别稀释脂质体至 5, 10, 20, 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 和 4 $^{\circ}\text{C}$ 下分别按 t_{ss} 作用于 Hs-766T 细胞单层; 在预定时间点, 弃去含脂质体的细胞外 DMEM 培养液, 用冰 PBS 润洗细胞 3 次, 加入 0.5% Triton-X 100 PBS 溶液 0.5 mL 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下作用 30 min, 待细胞全部发生渗漏并脱离底壁后, 加入 PBS 0.5 mL 混匀, 测定罗丹明荧光强度并转化为细胞结合的脂质体量, 实验方法同“2.2”项。

2.4 载 siGLO 阳离子脂质体制备

采用常规的基因脂质体制备方法^[5], 将“2.1”项中得到的罗丹明标记的空白阳离子脂质体与含 siGLO 的缓冲液按 4:1 正负电荷比混匀, 放置 20 min, 形成载 siGLO 的阳离子脂质体。全程采用 siRNA 专用缓冲液及无酯酶水稀释, 避免 siGLO 的降解。

2.5 载 siGLO 脂质体细胞内分布的定性观察

于 6 孔板中放置的盖玻片上种植 Hs-766T 细胞, 待贴壁后形成细胞单层且盖玻片上细胞密度达每孔 6×10^5 个(约 60% 密集)时开始实验, 替换培养液为载 siGLO 的空白阳离子脂质体, 用无血清 DMEM 培养液稀释脂质体浓度至 50 $\mu\text{g/mL}$ (siGLO 浓度为 200 nmol/L), 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 6 h, 弃去含脂质体的细胞外 DMEM 培养液, 用冰 PBS 润洗细胞 3 次后, 用 10% 福尔马林固定细胞 20 min, 再用 1.7 $\mu\text{mol/L}$ 的 DAPI-PBS 溶液染色细胞核 20 min, 水洗 3 次后, 将盖玻片小心取出, 转移至载玻片上, 并用指甲油密封边缘, 于共聚焦显微镜下观察不同阳离子脂质体转运 siGLO 至细胞质的能力差异。DAPI、siGLO 和罗丹明的激发/发射波长分别为 401 nm/421 nm, 495 nm/519 nm 和 543 nm/594 nm。

2.6 统计学分析

多组分间的统计学显著性差异分析采用 SPSS 10.0 统计软件中 ANOVA 的 Tukey 分析。

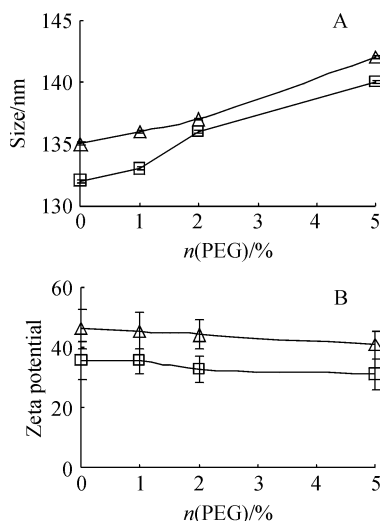
3 结果

3.1 空白阳离子脂质体性质

罗丹明标记的阳离子脂质体, 以 DOTAP 作为

主要脂质材料, 辅以中性磷脂 (DPPC、DOPE) 和胆固醇, 采用 PEG2000 修饰的磷脂酰化合物 (mPEG-DSPE) 调节 PEG 含量。据报道 DOPE 可增加脂质体双分子层的弹性, 促进脂质体与细胞膜及内涵体膜的融合, 有利于脂质体从内涵体逃逸进入细胞质^[6]。

空白脂质体以 CX-Y 表示, 其中 X, Y 分别代表 DOTAP 和 PEG 的摩尔分数, 设计了 2 组高低电荷的阳离子脂质体 C40-Y 和 C20-Y, 分别含有 40% 和 20% 的 DOTAP, 考察不同 PEG 含量对 2 组阳离子脂质体细胞运送的作用。图 1 显示了测试脂质体的粒径和电位分布, 增加 PEG 的含量, 粒径略有增大, 但粒径均在 100 ~ 150 nm 之间; 表面电荷略有降低, 这是由于 mPEG-DSPE 的负性磷酸基团部分中和了脂质体的正性电荷^[7]。



—□— C20-Y; —△— C40-Y

Figure 1 Effect of mole fraction (%) of PEG on (A) liposome size and (B) surface charge (ZP)

当 DOTAP 的摩尔分数大于 40% 时, 细胞毒性明显增大, 例如 C50-0 (DOTAP 摩尔分数为 50%, 其余成分同 C40-0) 作用于 Hs-766T 细胞 6 h 后表现为部分细胞萎缩, 从培养皿底部脱落 (图 2); 当 DOTAP 摩尔分数小于 20% 时, 表现为脂质体与细胞的结合甚少 (数据略)。因此本研究以摩尔分数 20% ~ 40% 的 DOTAP 作为安全有效的阳离子脂质体处方组成。

3.2 细胞膜表面结合及内吞动力学——时间动力学

37 $^{\circ}\text{C}$ 实验测得的细胞结合脂质体量代表细胞

膜结合的脂质体和细胞内脂质体的总量 (TC);4℃实验测得的细胞结合脂质质量代表细胞膜表面结合的脂质质量 (**B**);细胞内吞的脂质质量 (**I**) 为两者差值^[8]。图 3 显示了测试脂质体与细胞膜表面结合和被细胞内吞量的经时变化曲线,可见,与细胞膜表面结合和细胞内吞的脂质质量随着 PEG 含量的增加而减少,所有测试脂质体的 **B** 和 **I** 在 4 h 左右达到平台值;C20-Y 和 C40-2, C40-5 的 **I**~*t* 曲线变化类似于相应的 **B**~*t* 曲线,平台值也接近;C40-0 和 C40-1 的 **I**~*t* 曲线明显高于相应的 **B**~*t* 曲线,暗示这两种脂质体与其他测试脂质体有着不同的细胞内吞动力学。

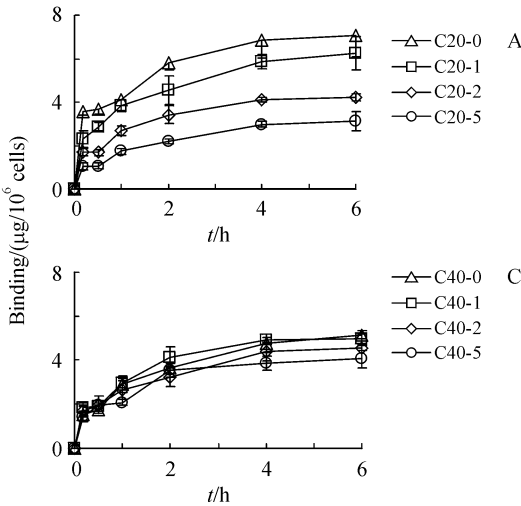


Figure 3 Amount of cell membrane binding (**B**) and internalization (**I**) with initial extracellular liposome concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (A,B) and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (C,D), respectively ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

C20-Y 和 C40-Y 选用不同的起始浓度作用于细胞,分别为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,目的是期望得到相似的细胞结合量,消除由于浓度依赖性产生的数据差异,便于 2 组数据间的平行比较。采用梯形法进一步计算各条时间曲线的曲线下面积 (AUC),并进行统计学分析,结果见图 4。C40-0 和 C40-1 的 **B**-*t* 和 **I**-*t* 曲线的 AUC 无显著性差异,说明 1% PEG 的加入对于 C40-0 影响甚微;C40-0 起始投放剂量是 C20-0 的 50%,其 **B**-*t* 曲线的 AUC 显著低于后者 ($P < 0.01$),但两者的 **I**-*t* 曲线却无差异,由于 **I** 与 **B** 直接相关,暗示 C40-0 优于 C20-0 的细胞内吞能力。

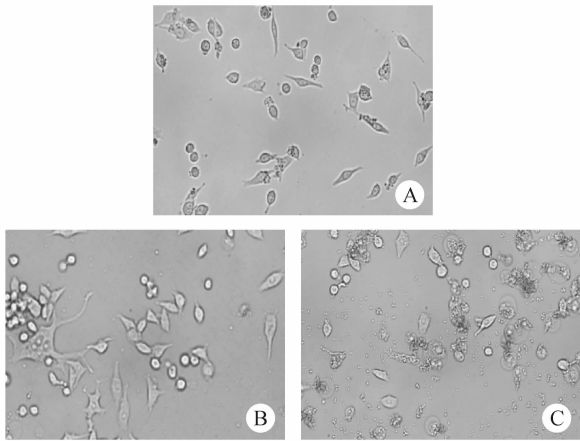


Figure 2 Hs-766T cell viability after treated with cationic liposomes containing DOTAP with mole fraction of 20% (C20-0, A), 40% (C40-0, B) and 50% (C50-0, C) for 6 h ($\times 20$)

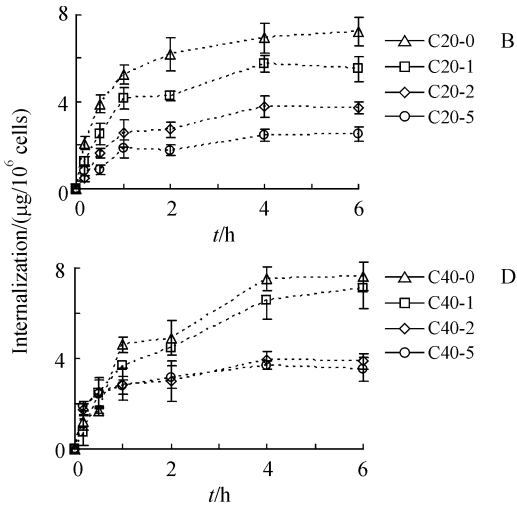


Figure 4 AUC of cellular membrane binding (**B**) and internalization (**I**) ($\bar{x} \pm s, n = 3$). Initial extracellular liposome concentration for C20-Y and C40-Y is 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectively
** $P < 0.01$ for AUC-**B** between C40-0 and C40-5, for AUC-**B** between C20-0 and C40-0; *** $P < 0.001$ for AUC-**B** and AUC-**I** between C20-0 and C20-Y ($Y = 1, 2, 5$), for AUC-**I** between C40-0 and C40-Y ($Y = 2, 5$)

3.3 细胞膜表面结合及内吞动力学——稳态浓度曲线

图 3 清晰地显示了测试脂质体的 B 值在 4 h 达到稳态,因此 t_{ss} 为 4 h。图 5 给出了 4 h 时脂质体细胞表面结合量(B_{ss})及内吞量(I_{ss})与细胞外脂质体浓度(c)的关系。不难看出,不含 PEG 的 C20-0 和 C40-0 的 $B_{ss}-c$ 曲线线性关系良好($r^2 > 0.99$),表明细胞表面结合是不饱和的;随着 PEG 含量的增加,线性关系越来越差(当含有 5% PEG

时, $r^2 < 0.9$),表明细胞表面结合由不饱和型转变为饱和型;同时发现,在低细胞外浓度范围,PEG 的作用并不显著,暗示细胞表面存在高亲和力 and 低亲和力两种结合位点,脂质体与细胞表面的结合先占用高亲和力的结合位点,待其饱和后再占用低亲和力的结合位点^[9];PEG 鲜少影响脂质体与高亲和力的结合位点,主要作用于低亲和力的结合位点,因此表现为低细胞外浓度下各条曲线差别小,高浓度下曲线间距加大。

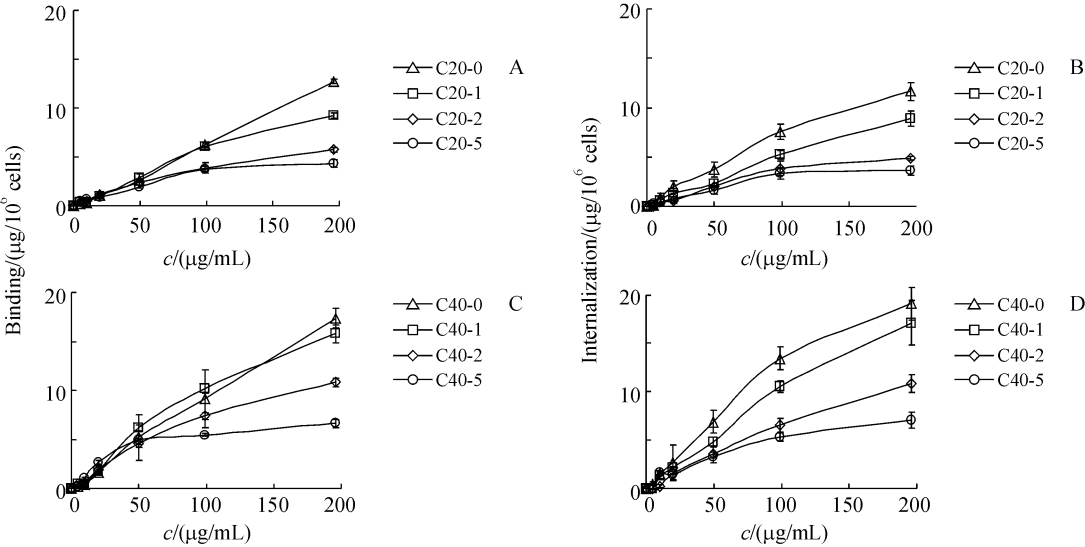


Figure 5 Cell membrane binding (B_{ss}) and internalization (I_{ss}) vs extracellular liposome concentration (c) curves at 4 h (t_{ss})

采用线性回归计算不同脂质体的 I_{ss} 与 B_{ss} 相关性的直线斜率 S ($r^2 > 0.9$), S 代表了脂质体在细胞内累积的总比例常数。进一步分析 S (图 6) 发现 PEG 的摩尔分数和从 0% 增加到 2% 时, S 急剧下降;从 2% 变化到 5%, S 变化缓慢。表明脂质体细胞内累积的变化虽然依赖于它们在细胞表面结合量的增加,但并非总与细胞表面结合的量变曲线同步。C40-Y 组的斜率 S 高于相应的 C20-Y 组,说明 C40-Y 组的内吞速率快于 C20-Y 组。

3.4 载 siGLO 阳离子脂质体 6 h 细胞内分布

采用共聚焦显微镜下观察载 siGLO 阳离子脂质体 C40-Y 给药后 6 h 细胞表面结合及内吞的分布情况(图略)。实验结果显示,载 siGLO 的 C40-5 在细胞核内无绿色的 siGLO 荧光,而其余 3 种脂质体 C40-0、C40-1 和 C40-2 在细胞核内均有强烈的 siGLO 荧光。由于 siGLO 无靶点,到达细胞质的所有 siGLO 将自动进入细胞核;说明 C40-5 不能有效

的将 siGLO 转运至细胞质,大量的 siGLO 进入内涵体-溶酶体路径被降解。C40-0、C40-1 和 C40-2 均成功的将部分 siGLO 转运至细胞质。

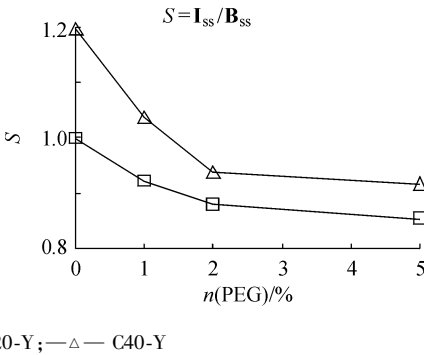


Figure 6 Relationship between the ratio constant S (I_{ss}/B_{ss}) and the mole fraction (%) of PEG

4 讨论

本研究比较了不同 PEG 含量对两组阳离子脂

质体细胞内转运的影响。空白脂质体的细胞动力学研究结果显示摩尔分数为 1%、2%、5% 的 PEG 逐渐降低细胞表面的结合量和细胞内存量;在低表面电荷 C20-Y (35 mV) 组,1% PEG 的加入就导致了 **B** 和 **I** 极显著性降低;在高表面电荷 C40-Y (46 mV) 组,2% PEG 的加入才产生 **I** 的显著性减少;预示着提高电荷可部分抵消 PEG 的消极作用。S 值 (I_{ss}/B_{ss}) 的分析结果也显示 C40-Y 组比 C20-Y 组优越。由于该实验测量的是细胞内存的脂质体总量,不能反映载基因脂质体从细胞内涵体逃逸进入细胞质的能力,因此无法预测基因递送的效果。进一步采用共聚焦显微镜观察 C40-Y 组转运 siGLO 的结果显示 0% ~ 2% 的 PEG 与 40% DOTAP 组合可以有效地将 siGLO 转运至细胞质,而 5% PEG 与 40% DOTAP 组合对转运无效。5% PEG 被广泛用于各种给药系统,然而其对于细胞膜表面结合和内存的负性作用导致无效的细胞内基因递送未有认识。上述结果表明 0% ~ 2% PEG 与 40% DOTAP 组合可以有较好的平衡 EPR 作用和较高的细胞内生物利用度。这一发现为阳离子脂质体作为 siRNA 递送系统的后续研究建立了良好的处方优化基础。

参 考 文 献

[1] 乔 鑫 (Qiao X), 税青林 (Sui QL). RNA 干扰在组织特异性

靶向性基因治疗中的研究进展[J]. 西南军医 (J Mil Surg Southwest China), 2009, **11** (4): 734 – 736.

[2] Fisher KD, Ulbrich K, Subr V, et al. A versatile system for receptor-mediated gene delivery permits increased entry of DNA into target cells, enhanced delivery to the nucleus and elevated rates of transgene expression [J]. *Gene Ther*, 2000, **7** (15): 1 337 – 1 343.

[3] Tseng YC, Mozumdar S, Huang L. Lipid-based systemic delivery of siRNA [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, **61** (9): 721 – 731.

[4] Wu J, Lee A, Lu YH, et al. Vascular targeting of doxorubicin using cationic liposomes [J]. *Int J Pharm*, 2007, **337** (1/2): 329 – 335.

[5] 刘 洋 (Liu Y), 张振中 (Zhang ZZ), 邵彦江 (Shao YJ), 等. 载基因纳米阳离子脂质体前体制剂的制备及性质研究 [J]. 中国新药杂志 (Chin New Drugs J), 2010, **19** (1): 72 – 75.

[6] Simoes S, Moreira JN, Fonseca C, et al. On the formulation of pH-sensitive long circulation times [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004, **56** (7): 947 – 965.

[7] Hinrichs WL, Mancenido FA, Sanders NN, et al. The choice of a suitable oligosaccharide to prevent aggregation of PEGylated nanoparticles during freeze thawing and freeze drying [J]. *Int J Pharm*, 2006, **311** (1/2): 237 – 244.

[8] Duzgunes N, Nir S. Mechanisms and kinetics of liposome-cell interactions [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 1999, **40** (1/2): 3 – 18.

[9] Lee KD, Nir S, Papahadjopoulos D. Quantitative analysis of liposome-cell interactions *in vitro*: rate constants of binding and endocytosis with suspension and adherent J774 cells and human monocytes [J]. *Biochemistry*, 1993, **32** (3): 889 – 899.

· 新药信息 ·

具有开发潜力的抗帕金森病药

全球患帕金森病人数超过 150 万,开发具有较好疗效的药物成为市场迫切需要。以下为全球正在开发的并且具有潜力的抗帕金森病药。

表 1 处于晚期开发阶段的帕金森病用药

药物	商品名/代码	作用机制	开发公司	合作者	研究阶段
卡比多巴/左旋多巴	IPX066	多巴胺前体	Impax Pharmaceuticals	葛兰素史克	Ⅲ
Pardoprunox	SLV308	多巴胺激动剂	雅培	NA	Ⅲ
Safinamide	NW-105	单胺氧化酶抑制剂	默克雪兰诺	纽隆制药公司	Ⅲ
Istradefylline	KW-6500	腺苷 A2A 受体拮抗剂	Kyowa Hakko Kirin	NA	Ⅲ
Preladenant	SCH 420814	腺苷 A2A 受体拮抗剂	默沙东	NA	Ⅱ
Fipamezole	JP-1730	α2-肾上腺素受体拮抗剂	Santhera Pharmaceuticals	NA	Ⅱ
AAV2-neurturin	CERE-120	基因治疗病毒载体	Ceregene	NA	Ⅱ
GAD	NLX-P101	基因治疗病毒载体	Neurologix	NA	Ⅱ
AADC, TH and GCH1	Prosavin	基因治疗病毒载体	Oxford BioMedica	NA	Ⅱ

AADC:芳(香)族 L-氨基酸脱羧酶;AAV2:腺伴随病毒血清型 2;GAD:谷氨酸脱羧酶;GCH1:GTP 环化水解酶 1;NA:无(不适用);TH:酪氨酸羟化酶。

(医药经济报,本刊有删改)