

• 药理与临床 •

壳聚糖神经毒素纳米粒鼻腔给药对血脑屏障开放性的影响

沈淼山, 张苏宏, 邱璐琦, 阮叶萍*

浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053

摘要: 目的 制备壳聚糖神经毒素纳米粒 (CS-NT-NP), 研究其鼻腔给药对大鼠血脑屏障 (BBB) 开放性 & 小鼠血清中 S100 β 蛋白的影响。方法 采用甲酰胺提取-紫外分光光度法测定不同给药途径及不同神经毒素 (NT) 制剂给药后大鼠脑组织中伊文思蓝 (EB) 的浓度; 荧光显微镜定性分析 EB 在脑组织中的荧光强度及分布; ELISA 法测定不同 NT 制剂鼻腔给药后小鼠血清中 S100 β 蛋白量的变化。结果 分别与壳聚糖 (CS) 组和 NT 水溶液组比较, CS-NT-NP 能明显增加大鼠脑内 EB 浓度, 有一定时效关系, 且在 120 min 时达到高峰 ($P < 0.01$); 而鼻腔给药相较于 ip 和 im 给药, EB 入脑量明显增加 ($P < 0.01$), 且达峰时间短, 荧光检测结果表现出相同的趋势, CS-NT-NP 鼻腔给药后不同时间小鼠血清 S100 β 蛋白水平显著升高。结论 CS-NT-NP 鼻腔给药能显著增加 BBB 的开放性, 进一步提高脑内 NT 的浓度, 壳聚糖纳米粒是大分子药物入脑的良好载体。

关键词: 神经毒素; 纳米粒; 壳聚糖; 鼻腔给药; 血脑屏障; 伊文思蓝; S100 β 蛋白

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)12-2461-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.12.015

Effect of chitosan neurotoxin nanoparticles on permeability of blood brain barrier by intranasal administration

SHEN Miao-shan, ZHANG Su-hong, QIU Lu-qi, RUAN Ye-ping

Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

Abstract: Objective To prepare chitosan neurotoxin nanoparticles (CS-NT-NP) and study its effect on the permeability of blood brain barrier and the serum levels of S100 β by intranasal administration. **Methods** A formamide extraction-ultraviolet spectrophotometry method was employed to determine the concentration of Evans blue (EB) in brain by different routes of administration and preparations. Qualitative analysis of fluorescence intensity and distribution of EB in brain tissue was performed by fluorescence microscopy. The serum S100 β protein concentration was determined by ELISA. **Results** Compared with the control group and NT group, CS-NT-NP could significantly increase the content of EB in the brain with time-effect relation and reached the peak at 120 min ($P < 0.01$); Compared with muscle injection and ip injection, intranasal administration could significantly increase the content of EB and reached peak time quickly. The results were consistent with the experimental results of qualitative analysis of fluorescence intensity and distribution of EB in brain tissue by fluorescence microscopy and S100 β protein in serum. It was consistent with the experimental results of S100 β protein. **Conclusion** CS-NT-NP by intranasal administration can significantly increase the permeability of BBB, and further increase the drug concentration in the brain, which is a good carrier of macromolecular drugs into the brain.

Key words: neurotoxin; nanoparticles; chitosan; intranasal administration; blood brain barrier; Evans blue; S100 β protein

神经毒素 (neurotoxin, NT) 是从眼镜蛇毒中提取的一类具有中枢镇痛作用的大分子蛋白类物质, 因血脑屏障 (blood brain barrier, BBB) 的相对不通透性, 其天然屏障作用限制了 NT 进入脑内发挥药效^[1-4]。纳米粒 (nanoparticles, NP) 是近年来

研究较多的具有脑靶向作用的给药系统, 研究表明其能改变药物的药动学性质, 尤其是表面改性的聚合物纳米粒, 通过 BBB 定向作用于中枢神经系统^[5-6]。而由于鼻腔在生理结构上与脑部存在着特殊的联系, 药物经鼻黏膜给药后可通过 BBB 直接进入脑

收稿日期: 2016-11-15

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (81102842)

作者简介: 沈淼山 (1992—), 女, 硕士在读, 研究方向为中药药理与新产品开发。Tel: 18768155745 E-mail: 1297476970@qq.com

*通信作者 阮叶萍 (1976—), 女, 硕士生导师, 教授, 研究方向为中药药理与新产品开发。Tel: (0571)86633112 E-mail: ruanyyp@zjtcn.net

内^[7-8], 壳聚糖(chitosan, CS)是一类具有良好生物相容性的天然黏膜黏着剂, 常用于多肽类药物的黏膜给药^[9], CS 作为鼻腔给药的载体, 能延长药物在体内循环的时间和减少巨噬细胞的捕获, 从而提高脑内的药物浓度。因此, 本实验以 CS 为 NP 的载体材料制备壳聚糖神经毒素纳米粒(CS-NT-NP), 利用伊文思蓝(EB)为示踪剂, 并采用 ELISA 试剂盒检测 CS-NT-NP 鼻腔给药后 EB 脑内浓度及小鼠血清中 S100 β 蛋白的量, 考察其对 BBB 开放性的影响, 从而为大分子蛋白类脑靶向药物的载体及给药途径选择提供参考依据。

1 材料

1.1 试剂与仪器

NT (质量分数>97%, 云南龙凤谷生物药业有限公司); CS (上海麦克林生化有限公司, 脱乙酰度>95%); 三聚磷酸钠(上海麦克林生化有限公司); EB (阿拉丁试剂有限公司); 甲酰胺(上海凌峰化学试剂有限公司); 小鼠血清 S100 β 蛋白 ELISA 试剂盒(南京建成生物工程研究所有限公司); 其他试剂均为分析纯。

UV-2800 型紫外分光光度计(上海舜宇恒平科学仪器有限公司); FHS-2A 可调高速匀浆机(金坛市宏华仪器厂); DF-101SJ 集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义市英峪予华仪器厂); TG16-WS 台式高速离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司)。

1.2 动物

清洁级 ICR 小鼠, 体质量(18 $\pm$ 2) g, 雌雄各半; 清洁级 SD 大鼠, 体质量(200 $\pm$ 20) g, 雌雄各半, 均由中国科学院上海实验动物中心/上海斯莱克实验动物有限责任公司提供, 实验动物许可证号 SCXK(沪)2012-0002, 饲养于浙江中医药大学动物实验研究中心屏障系统饲养室, 许可证号 SYXK(浙)2013-0184。

2 方法

2.1 CS-NT-NP 的制备^[10-11]

配制一定质量浓度的 NT 溶液, 将 NT 溶液缓慢滴加到含 1%醋酸的 2 mg/mL CS 溶液中, 以 800 r/min 转速磁力搅拌 5 min, 1 mol/L NaOH 溶液调节 pH 值至 5, 磁力搅拌下以每秒 2 滴的速度缓慢加入 1 mg/mL 三聚磷酸钠溶液, 继续搅拌 10 min, 得 CS-NT-NP 胶体溶液, 冻干即得 CS-NT-NP。

于 2 mg/mL CS 醋酸溶液中加入适量 EB, 配成 EB 为 2 mg/mL 的 EB-CS 醋酸溶液, 同上述步骤用纳米粒包载 NT, 配制 EB 标记的壳聚糖神经毒素纳

米粒(EB-CS-NT-NP), 备用。

2.2 EB 染色检测 BBB 通透性

2.2.1 不同制剂对 BBB 通透性的影响 取 SD 大鼠, 随机分为 3 组, 即 CS、NT 和 CS-NT-NP 组, 分别鼻腔给药(60 μ g/kg, 前期实验确定的最佳镇痛效应剂量), 处死前 20 min 尾 iv 2% EB 溶液 4 mL/kg, 分别于给药后 30、60、90、120、150、180 min 戊巴比妥麻醉, 开胸左心室灌注生理盐水至右心耳流出无色液体, 断头取左脑, 称质量, 放于装有 5 mL 甲酰胺的试管中, 50 $^{\circ}$ C 孵育箱中孵育 36 h, 离心, 吸取提取液, 在 623 nm 处测定吸光度(A)值, 绘制标准曲线, 计算 EB 的脑内浓度。

2.2.2 不同给药途径对 BBB 通透性的影响 取 SD 大鼠, 随机分为 3 组, 即 CS-NT-NP 鼻腔给药组、CS-NT-NP im 给药组和 CS-NT-NP ip 给药组, 均按 NT 60 μ g/kg 剂量给药, 分别于给药后 30、60、120、180、240、300、360 min 进行灌注取脑, 其他操作同“2.2.1”项。

2.2.3 荧光显微镜观察 EB 入脑情况 取 SD 大鼠, 随机分为 5 组, 每组 6 只大鼠, 即 EB-CS 鼻腔给药组、EB-NT (于 1 mg/mL NT 溶液中加入适量 EB 溶液, 配成 EB-NT 溶液)鼻腔给药组、EB-CS-NT-NP 鼻腔给药组, EB-CS-NT-NP im 给药组和 EB-CS-NT-NP ip 给药组, 给药剂量同“2.2.2”项, EB-CS-NT-NP ip 给药组于给药后 180 min 断头取脑, 其余 4 组于给药后 120 min 断头取脑, 脑组织置于-20 $^{\circ}$ C 冰箱中冷冻, 做冠状切片, 偏厚 1 μ m, 置于载玻片上, 在荧光显微镜下观察。

2.3 小鼠血清 S100 β 蛋白检测

取 ICR 小鼠, 随机分为 3 组, 每组 18 只, 即 CS、NT 和 CS-NT-NP 组, 各组鼻腔给药(90 μ g/kg), 分别于给药后 30、60、90、120、150、180 min 眼眶取血, 1 000 r/min 离心取上层血清, 保存于-20 $^{\circ}$ C 冰箱中。检测时按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作。

2.4 统计学方法

实验所得数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析, 组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 CS-NT-NP 粒径及 Zeta 电位

离子凝胶法制备的 CS-NT-NP 呈圆球形(图 1), 均匀光滑不粘连, 平均粒径为(106.23 $\pm$ 8.03) nm, Zeta 电位为(-12.38 $\pm$ 0.67) mV, 该制剂符合鼻腔给药要求。

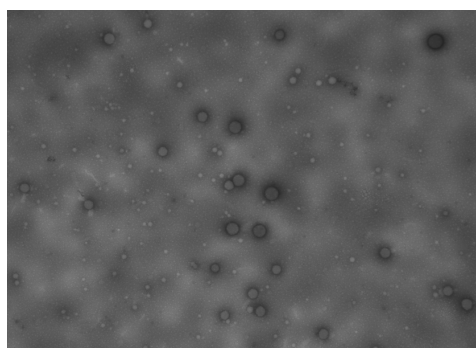


图 1 CS-NT-NP 透射电镜图 (×30 000)

Fig. 1 TEM photographs of CS-NT-NP (×30 000)

3.2 对 BBB 通透性的影响

3.2.1 EB 测定方法的建立 EB 标准曲线方程为 $Y=0.065\ 4\ X+0.003\ 5$, 相关系数 $R^2=0.999\ 8$, 其脑内

浓度在 $0.31\sim9.80\ \mu\text{g/g}$ 时 A 值与浓度呈良好的线性关系, 符合生物样品分析要求。

3.2.2 NP 对 BBB 通透性的影响 NT 水溶液与 CS-NT-NP 胶体溶液经鼻腔给药后对 BBB 的通透性均有一定程度的影响, 并有一定的时效关系。由表 1 可见, CS 醋酸溶液鼻腔给药后 180 min 内, EB 的脑内浓度没有明显的变化, 因此 CS 醋酸溶液对本实验无干扰作用。而 NT 水溶液和 CS-NT-NP 溶液在 60 min 时 EB 的脑内浓度均有一定程度的提高。与 CS 组比较, NT 组在 90 min 时 EB 脑内浓度呈现高峰, 差异显著 ($P<0.05$); 而 CS-NT-NP 组在 60~90 min 时 EB 脑内浓度明显增加 ($P<0.05$), 至 120 min 达到峰值 ($P<0.01$); 与 NT 组比较, CS-NT-NP 组在 90~120 min 时 EB 脑内浓度呈现显著性差异 ($P<0.05$ 、 0.01)。

表 1 CS-NT-NP 鼻腔给药对 EB 脑内浓度的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 1 Effect of intranasal administration with CS-NT-NP on concentration of EB in brain ($\bar{x}\pm s, n=10$)

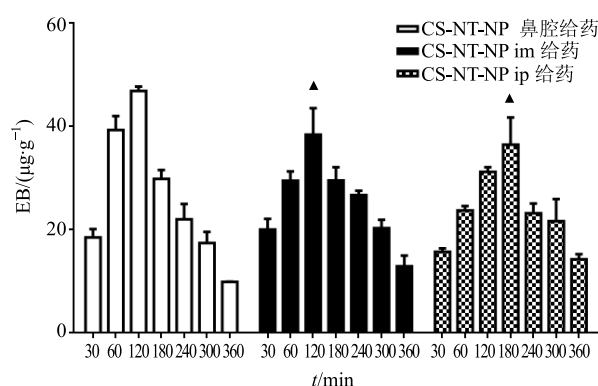
组别	剂量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	EB/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)					
		30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min
CS	—	9.32 ± 2.74	10.26 ± 2.51	10.21 ± 0.52	10.68 ± 0.81	9.74 ± 1.60	10.24 ± 0.44
NT	60	9.62 ± 1.75	16.04 ± 2.40	$25.11\pm2.16^*$	20.02 ± 6.23	10.37 ± 0.48	8.91 ± 1.44
CS-NT-NP	60	17.53 ± 3.21	$33.18\pm7.73^*$	$39.85\pm3.70^{*#}$	$48.78\pm4.49^{*##}$	$36.27\pm5.08^*$	19.14 ± 5.08

与 CS 组比较: $^*P<0.05$ $^{**}P<0.01$; 与 NT 组比较: $^{\#}P<0.05$ $^{##}P<0.01$, 表 2 同

$^*P<0.05$ $^{**}P<0.01$ vs CS group; $^{\#}P<0.05$ $^{##}P<0.01$ vs NT group, same as Table 2

3.2.3 不同给药途径 CS-NT-NP 对 BBB 通透性的影响 CS-NT-NP 制剂不同途径给药均能提高 BBB 的通透性, 由图 2 可知各组脑内 EB 浓度均在一定时间内呈明显上升趋势, 达峰以后缓慢下降。CS-NT-NP 鼻腔给药组、im 给药组脑内 EB 浓度均在 120 min 时达到高峰, 达峰时间均比 CS-NT-NP ip 组 (180 min) 短, 且 CS-NT-NP 鼻腔给药组峰浓度 ($46.91\ \mu\text{g/g}$) 明显高于 im 给药组 ($38.45\ \mu\text{g/g}$) 和 ip 给药组 ($36.51\ \mu\text{g/g}$) ($P<0.05$), 后两组间无明显差异。

3.2.4 荧光显微镜观察 EB 入脑情况 荧光显微镜蓝光状态下观察脑切片, EB 显亮红色荧光, 可以根据 EB 荧光显色情况, 来判断 BBB 的开放情况, EB 相对分子质量大, 正常情况下不易透过 BBB。图 3 中 EB-CS 鼻腔给药组脑组织在荧光显微镜下并未观察到 EB 荧光, 说明 EB-CS 没有跨过 BBB, 对



与 CS-NT-NP 鼻腔给药组比较: $^{\Delta}P<0.05$

$^{\Delta}P<0.05$ vs CS-NT-NP intranasal administration

图 2 CS-NT-NP 不同途径给药后大鼠脑内 EB 浓度变化 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Fig. 2 Concentration of EB in brain of rats treated with CS-NT-NP by different administration routes ($\bar{x}\pm s, n=10$)

实验结果无影响。EB-NT 鼻腔给药组观察到 1 个明显的亮红色斑点,说明 NT 鼻腔给药或许能绕过 BBB 直接进入脑内,但是入脑量不大;而 BE-CS-NT-NP im、ip 和鼻腔给药组分别可以观察到 3、6 和 13 个光斑,说明 NT 制备成纳米粒后能显著提高 NT 入脑量,但由于注射给药后,纳米粒容易被如肝脏等一些网状内皮细胞所吞噬,作用于网状组织,减少了靶向于脑的药物,降低了生物利用度。

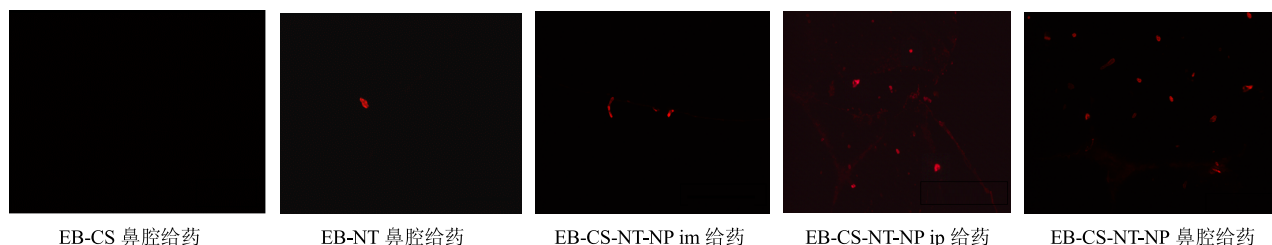


图 3 荧光显微镜下观察 EB 入脑情况

Fig. 3 Fluorescence photos of brain tissues of mice

表 2 CS-NT-NP 鼻腔给药后小鼠血清中 S100 β 蛋白量的动态变化 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Dynamic changes of S100 β protein level in serum after intranasal administration of CS-NT-NP ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	血清 S100 β 蛋白水平/($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)					
		30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min
CS	—	58.94 $\pm$ 5.90	57.97 $\pm$ 4.50	57.67 $\pm$ 4.83	56.82 $\pm$ 3.03	51.93 $\pm$ 5.20	57.67 $\pm$ 2.78
NT	90	61.96 $\pm$ 6.90	62.26 $\pm$ 3.47	64.07 $\pm$ 4.01*	65.10 $\pm$ 6.32**	59.36 $\pm$ 2.98***	56.82 $\pm$ 3.03
CS-NT-NP	90	61.05 $\pm$ 2.34	63.59 $\pm$ 2.04*	83.58 $\pm$ 1.59**	97.71 $\pm$ 2.71***	66.00 $\pm$ 1.52***	55.62 $\pm$ 4.76

4 讨论

本实验通过研究 CS-NT-NP 鼻腔给药后 EB 入脑情况及血清中 S100 β 的水平来初步探究 NT 纳米粒给药后的入脑机制。NT 是一类大分子多肽类中枢镇痛药物,其相对分子质量大,脂溶性小,不易透过由中枢神经系统毛细血管内皮细胞紧密连接的 BBB。EB 是一种能与血浆蛋白结合形成大分子物质的偶氮类染料,常用于 BBB 完整性研究^[12],而正常情况下血浆蛋白无法通过 BBB,与血浆蛋白结合的 EB 也无法进入脑内将其着色。本研究可知,NT 及其制剂给药后均能提高 EB 脑内着色量,并存在时效关系,NT 组在 90 min 时达到最高,制成纳米粒后 120 min 达到峰值且明显高于 NT 组 ($P < 0.01$);而 CS-NT-NP 鼻腔给药相较于 ip 和 im 给药,其 EB 入脑量大,达峰时间短,结合荧光实验结果,说明 NT 制成纳米粒后鼻腔给药能显著增加 BBB 的通透性,可能是由于鼻腔生理结构上的特殊性,其

3.3 小鼠血清 S100 β 蛋白表达水平

CS-NT-NP 鼻腔给药后小鼠血清 S100 β 蛋白检测结果见表 2,与 CS 组比较,NT 组在 90、120、150 min 时血清中 S100 β 蛋白水平明显上升 ($P < 0.05$ 、 0.01),而 CS-NT-NP 组在 60、90、120、150 min 时显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01),且该两组均在 120 min 时达到高峰;与 NT 组相比,CS-NT-NP 组在 120、150 min 时均明显升高 ($P < 0.01$),结果与上述实验一致。

较口服给药及注射等其他给药方式吸收及起效更快,其能选择性增加某些药物或者制剂在鼻黏膜上的分布和滞留时间,提高了药物的直接入脑量^[13]。而 CS 溶于稀酸后形成聚阳离子凝胶,易与表面带负电荷的鼻黏膜上皮细胞发生静电吸附,增大 NT 透过鼻黏膜吸收的能力。CS-NP 又能延长药物在体内循环时间从而减少巨噬细胞的捕获,提高药物的生物利用度,且推测其可以使上皮细胞间的紧密连接短暂变宽。

S100 β 蛋白被普遍认为是一种能够反映脑损伤程度的血浆标志物,也有研究发现在单纯 BBB 开放的情况下也存在血浆中 S100 β 蛋白增高的现象,由于 S100 β 相对分子质量小,在脑微血管内皮细胞紧密连接打开,即 BBB 开放时其极易从中枢神经系统进入血浆中^[14]。本实验对 CS-NT-NP 鼻腔给药后不同时间点血清中 S100 β 蛋白的水平进行检测发现,在 CS-NT-NP 鼻腔给药后一定时间内,小鼠血

清中的 S100 β 蛋白水平呈现上升趋势,且在 120 min 时达到最高水平,该实验结果与 EB 入脑检测结果相一致。推测 NT 用 CS 作为载体材料制成纳米粒后能在一定时间内显著地可逆性打开内皮细胞的紧密连接,增大 NT 的入脑量,提高生物利用度。本实验以期为蛋白多肽类药物鼻腔给药吸收入脑机制,开发其脑靶向制剂提供一定的实验基础和理论支撑。

参考文献

- [1] Li Q M, Meng Q X, Li D S, *et al.* Comparative study of three short-chain neurotoxins from the venom of *Naja kaouthia* (Yunnan, China) [J]. *J Nat Toxins*, 2002, 11(3): 221-229.
- [2] Chen R Z, Wu X R. The analgesic effect of neurotoxin from cobra (*Naja naja*) venom [J]. *Chin Pharm Bull*, 1988, 4(2): 113-116.
- [3] 金露薇,魏元锋,高 缘. 中药化学成分透血脑屏障机制及促透方法研究进展 [J]. *中草药*, 2013, 44(15): 2183-2188.
- [4] 王焱超,梁锐超,方 芳. 中枢神经系统药物穿透血脑屏障的研究进展 [J]. *华西医学*, 2015, 30(7): 1352-1356.
- [5] Kreuter J. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs [J]. *Adv Drug Del Rev*, 2001, 47(1): 65-81.
- [6] 林锦超. 载药聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒的制备 [D]. 福州: 福建医科大学, 2009.
- [7] Illum L. Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2000, 11(1): 1-18.
- [8] 周 荣,金 铭,沈淼山,等. 聚山梨醇-80 修饰的神经毒素纳米粒经大鼠鼻腔给药后体内分布研究 [J]. *中草药*, 2015, 46(17): 2599-2602.
- [9] Xu J K, Strandman S, Zhu J L, *et al.* Genipin-crosslinked catechol-chitosan mucoadhesive hydrogels for buccal drug delivery [J]. *Biomaterials*, 2015, 37: 395-404.
- [10] Calvo P, Vila-Jato J L, Alonso M J, *et al.* Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers [J]. *J Appl Polym Sci*, 1997, 63(1): 125-132.
- [11] Fan W, Yan W, Xu Z S, *et al.* Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique [J]. *Coll Surf B: Biointerf*, 2012, 90(1): 21-27.
- [12] Do J, Foster D, Renier C, *et al.* Ex vivo Evans blue assessment of the blood brain barrier in three breast cancer brain metastasis models [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2014, 144(1): 93-101.
- [13] 吴红兵,胡凯莉,蒋新国. 药物经鼻入脑转运的方法及研究进展 [A] // 中国药学会学术年会暨第八届中国药师周论文集 [C]. 石家庄: 中国药学会、河北省人民政府, 2008.
- [14] 朱凤军. S100 β -血脑屏障开放的血浆标志 [J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2007, 34(3): 249-252.