

• 药理与临床 •

聚山梨酯-80 包裹神经毒素-I 聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒
脑内药动学研究

刘福和, 赵燕敏, 冯 健, 魏颖慧, 李范珠

(浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053)

摘要:目的 制备聚山梨酯-80 包裹的神经毒素-I (NT-I) 聚氰基丙烯酸正丁酯 (PBCA) 纳米粒 (T-80-NT-I-PBCA-NP), 并考察其脑内药动学特征。方法 以 PBCA 为纳米材料, 采用乳化聚合法制备 T-80-NT-I-PBCA-NP, 以大鼠为实验对象, 经鼻腔给药后, 运用脑微透析取样技术, 以未包裹的 NT-I PBCA 纳米粒 (NT-I-PBCA-NP) 为对照组, 研究神经毒素-I 在脑中脑导水管周围灰质 (PAG) 的动力学过程。结果 大鼠鼻腔给药后, 聚山梨酯-80 包裹与未包裹的 NT-I PBCA 纳米粒药物浓度-时间曲线符合开放性二室模型, 其主要药动学参数 $t_{\max}$ 分别为 (71.018 ± 7.641) 、 (55.830 ± 6.072) min; $C_{\max}$ 分别为 (117.189 ± 10.036) 、 (52.277 ± 6.217) ng/mL; $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ 分别为 $(22\,836.633 \pm 51.052)$ 、 $(12\,786.934 \pm 30.723)$ ng · min · mL⁻¹。结论 T-80-NT-I-PBCA-NP 鼻腔给药后延长 NT-I 达峰时间, 且显著提高 NT-I 的脑内浓度。

关键词: 聚山梨酯-80; 神经毒素-I; 聚氰基丙烯酸正丁酯 (PBCA); 纳米粒; 药动学

中图分类号: R285.61

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)11-1760-04

Pharmacokinetic study on polysorbate-80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles
of neurotoxin - I in brain after intranasal administration

LIU Fu-he, ZHAO Yan-min, FENG Jian, WEI Ying-hui, LI Fan-zhu

(College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China)

Abstract: **Objective** To prepare neurotoxin-I (NT-I) polybutylcyanoacrylate (PBCA) nanoparticles (NP) coated by polysorbate-80 and conduct its pharmacokinetic study in brain after intranasal administration in rats. **Methods** NT-I Nanoparticles were prepared by emulsion polymerization method with PBCA as nanoparticle material. The pharmacokinetics in brain of NT-I nanoparticles coated or uncoated by polysorbate-80 after nasal application was characterized using brain microdialysis sampling technique. **Results** The concentration-time curve of NT-I nanoparticles coated and uncoated polysorbate-80 after intranasal administration in rats accorded with the two-compartment model. The pharmacokinetic parameters of $t_{\max}$ were (71.018 ± 7.641) and (55.830 ± 6.072) min; $C_{\max}$ were (117.189 ± 10.036) and (52.277 ± 6.217) ng/mL, and $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ were $(22\,836.633 \pm 51.052)$ and $(12\,786.934 \pm 30.723)$ ng · min · mL⁻¹, respectively. **Conclusion** Polysorbate-80 coating of PBCA nanoparticles could extend the time to peak of NT-I administered intranasally and significantly improve the NT-I concentration level in brain.

Key words: polysorbate-80; neurotoxin-I (NT-I); polybutylcyanoacrylate (PBCA); nanoparticle (NP); pharmacokinetics

神经毒素-I (neurotoxin-I, NT-I) 是从云南眼镜蛇毒液中分离得到的一类短链神经毒素中的主要成分之一, 相对分子质量约为 6 900, 具有良好的镇痛作用, 其作用机制尚未完全阐明, 但药理研究

已明确其主要作用于中枢, 是一种安全有效的新型镇痛药物^[1]。目前已开发的 NT-I 制剂有克痛宁、科博肽等, 临床主要用药方式为肌肉注射。但 NT-I 为水溶性大分子多肽, 肌肉注射给药, 不易透

收稿日期: 2009-01-14

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30772793, 30371781); 浙江省卫生高层次创新人才培养工程

作者简介: 刘福和 (1982-), 男, 福建省龙岩市人, 在读硕士研究生, 研究方向为药物新剂型与新技术。

Tel: (0571) 86613726 E-mail: kexie552@163.com

过血脑屏障 (blood brain barrier, BBB) 到达神经中枢充分发挥镇痛作用。鼻腔给药是近年来研究较多的跨 BBB 中枢神经系统给药途径之一^[2]。由于鼻黏膜在解剖生理上与脑部存在着独特的联系, 药物经鼻腔吸收后可经嗅神经通路和嗅黏膜上皮通路绕过 BBB 直接进入脑内^[3]。但鼻腔吸收量是有限的, 故促进蛋白多肽类药物经鼻腔吸收, 增加药物的脑内递送是提高脑内药物浓度的关键。

纳米粒 (nanoparticles, NP) 是粒径 10~1 000 nm 的聚合物粒子。药物经吸附或化学结合于纳米粒后, 可在特定部位以一定速率释放, 从而实现靶向、缓释或控释目的^[4], 被认为是可以运载药物跨 BBB, 从而提高脑内药物浓度的一种载体微粒^[5]。自 1995 年 Kreuter 等^[6]首次报道了聚山梨酯-80 包裹的聚氰基丙烯酸正丁酯 (polybutylcyanoacrylate, PBCA) 纳米粒可运载肽类药物达拉根 (Dalargin) 入中枢神经系统发挥镇痛作用以来, 有关以 PBCA 纳米粒为载体增加药物脑内浓度的研究逐渐活跃。

自从 1969 年 Reynolds 发现电刺激中脑导水管周围灰质 (midbrain periaqueductal gray matter, PAG) 可引发持久的镇痛效应后, 解剖、生理、药理等学科开始对 PAG 的复杂结构和功能进行了深入研究, 并进一步发现 PAG 是中枢内源性镇痛系统的关键结构, 处在承上启下的重要地位^[7]。因此, 本研究选择 PAG 作为 NT-I 鼻腔给药吸收入脑的考察部位。通过制备聚山梨酯-80 包裹的神经毒素-I PBCA 纳米粒 (T-80-NT-I-PBCA-NP), 以大鼠为实验对象, 经鼻腔给药后, 用脑微透析取样技术, 以未包裹的 NT-I-PBCA 纳米粒 (NT-I-PBCA-NP) 为对照组, 研究 NT-I 在 PAG 的动力学过程, 以期提高鼻腔给药后 NT-I 脑内药物浓度, 增强镇痛效果。

1 仪器与材料

SN-685 放免 γ 测量仪 (上海原子核研究所日环仪器厂); OptimaMAX Ultrac-elrifuge 超速离心机 (美国 Beckman 公司); LABCONCO 冷冻干燥机 (美国 LABCONCO 公司); 微透析脑探针 (MD-2200; 外径 0.5 mm, 膜长 2 mm, 分子截留量 38 000) 及其成套设备 (美国 BAS 公司); 大鼠鼻黏膜给药装置 (专利号: ZL200520013525.5)。

NT-I (中国科学院昆明动物研究所提供, 质量分数 > 99%, 批号 060530); ^{125}I -NT-I (1.38 g/L, 1.99×10^8 Bq, 质量分数 > 99%, 标记率为

97%, 复旦大学药学院放射药理学教研室协助标记和检测); PBCA (批号 070601s, 广州白云医用胶有限公司); 右旋糖苷-70 (Sigma 公司); 泊洛沙姆 (批号 WPWA544C, 德国 BASF 公司); 聚山梨酯-80 (批号 20070803, 温州清明化工有限公司); 其他试剂均为国产分析纯。

清洁级 SD 雄性大鼠, 体质量 (330 ± 10) g, 由浙江中医药大学动物实验中心提供 (合格证号: SCXK 沪 2007-0005)。所有动物实验均按照浙江大学动物饲养和使用指南进行。

2 方法与结果

2.1 NT-I-PBCA-NP 的制备及包裹: 精密称取右旋糖苷-70 和泊洛沙姆 F68 各 0.125 g, 充分溶于 25 mL 蒸馏水中并混匀, 精密移取 1.38 g/L ^{125}I -NT-I 60 μL , 用 0.01 mol/L 的盐酸液调 pH 至 2.0, 将溶液置磁力搅拌器上恒速搅拌 (800 r/min), 缓慢滴入 PBCA 60 μL , 继续搅拌 2 h, 用 0.01 mol/L 氢氧化钠溶液调 pH 至 7.0, 超速离心 (40 000 r/min) 40 min, 用蒸馏水洗涤 3 次, 冻干即得 NT-I-PBCA-NP。NT-I-PBCA-NP 加水复溶后外观呈蓝色透明状, 乳光明显, 平均粒径为 78.94 nm, ζ 电位为 -11.4 mV, 包封率为 70.25%。

将 NT-I-PBCA-NP 溶于 25 mL 蒸馏水中, 并加入与 NT-I-PBCA-NP 等质量的聚山梨酯-80, 充分搅拌, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温水浴中孵化 2 h, 40 000 r/min 超速离心 30 min, 去除多余的聚山梨酯-80, 再次冷冻干燥, 即得 T-80-NT-I-PBCA-NP。

2.2 脑微透析实验

2.2.1 动物准备: SD 大鼠以 10% 的水合氯醛 (300 mg/kg) ip 麻醉, 将头固定于大鼠脑立体定位仪上, 暴露颅骨, 定位前囟, 并以前囟为微透析探针定位的参考点。在前囟后 6.4 mm、矢状线左旁开 0.2 mm 的骨表面处, 用牙科高速钻机在颅骨上钻开一个能插入微透析探针底座 (MD-2251) 的小洞。将微透析探针插入脑骨表面下 6.4 mm, 即左侧 PAG, 并用牙托粉和颅骨螺钉将底座固定于颅骨上。术后大鼠单笼生理恢复 7 d。

2.2.2 微透析过程: 微透析脑探针 (MD-2200) 的进端通过 PE 导管与微量进样泵相连, 出端与恒温冷冻收集器相连。SD 大鼠以乙醚吸入麻醉, 拔出管心针, 将连接好的探针插入微透析底座中。微透析探针插入前后, 用人工脑脊液 (MgCl_2 1.0 mmol/L, NaCl 145.0 mmol/L, CaCl_2 1.2 mmol/L, KCl 2.7 mmol/L, NaH_2PO_4 0.45 mmol/L, Na_2HPO_4

1.55 mmol/L, pH=7.4) 冲洗, 流速为 10 μ L/min。探针插入 5 min 后, 流速调为 2 μ L/min, 平衡 30 min。

2.2.3 鼻腔给药及透析液的收集: 取 SD 雄性大鼠 10 只, 随机分成两组, 每组 5 只, 按 2.2.1 及 2.2.2 方法手术后采用大鼠鼻腔给药装置分别从左侧鼻腔给予 T-80-NT-I-PBCA-NP 和 NT-I-PBCA-NP (每只大鼠给药剂量相当于 80 μ g/kg NT-I)。大鼠鼻腔给药前, 用反透析法^[8]测定¹²⁵I-NT-I 微透析脑探针的在体回收率。以含¹²⁵I-NT-I 浓度为 40、80、160 ng/mL 的人工脑脊液灌流, 流速为 2 μ L/min, 每 10 min 收集一管透析液, 共收集 1 h。给药后, 以人工脑脊液灌流, 流速为 2 μ L/min, 前 150 min 每 10 min 收集一管, 后 210 min, 每 30 min 收集一管, 共收集 360 min。收集后, 透析液存放在 -20 $^{\circ}$ C 的冰箱里。微透析后大鼠 ip 过量水合氯醛麻醉, 用 4% 多聚甲醛溶液心脏灌注固定, 取大脑进行冠状切片, 显微镜下观察微透析探针植入部位。植入部位不正确的透析液不予使用。

2.3 在体回收率及药动学参数的测定

2.3.1 在体回收率的测定: 透析液用 SN-685 放免 γ 测量仪测定其放射性强度 (测定效率: 0.44), 再将放射性强度折算成 NT-I 的浓度, 最后根据以下公式计算每根探针在左侧 PAG 的在体回收率。

$$\text{回收率} = \frac{C_{\text{NT-Iper}} - C_{\text{NT-I dia}}}{C_{\text{NT-Iper}}} \times 100\%$$

$C_{\text{NT-Iper}}$ 和 $C_{\text{NT-I dia}}$ 分别为灌流液和透析液中¹²⁵I-NT-I 的浓度

所得¹²⁵I-NT-I 的平均在体回收率为 14.3%。该回收率用于 PAG 部位透析液中实际药物浓度的校正。

2.3.2 脑内药动学结果: 透析液用 SN-685 放免 γ 测量仪测定其放射性强度, 并折算成 NT-I 浓度; 通过在体回收率进行校正, 得到各时间点 NT-I 实际浓度。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异用 t 检验进行统计分析, $P < 0.05$ 为显著性差异。聚山梨酯-80 包裹与未包裹的 NT-I-PBCA-NP 大鼠鼻腔给药后脑内平均药时曲线见图 1。全部数据应用 3P97 软件处理后, 进行曲线拟合, 两者均符合开放性二室模型, 其药动学参数见表 1。结果可知, 聚山梨酯-80 包裹的 PBCA 纳米粒介导 NT-I 的 t_{max} 增大, 用 C_{max} 和 $\text{AUC}_{0 \rightarrow \infty}$ 升高 1 倍。表明聚山梨酯-80 包裹的 PBCA 纳米粒鼻腔给药后延长 NT-I 达峰时间, 且能显著提高 NT-I 的脑内浓度。

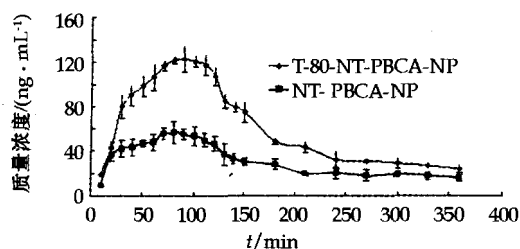


图 1 T-80-NT-I-PBCA-NP 大鼠鼻腔给药后脑内平均药时曲线 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Fig. 1 Mean brain drug concentration-time of T-80-NT-I-PBCA-NP after intranasal administration of rats ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

表 1 T-80-NT-I-PBCA-NP 大鼠鼻腔给药后脑内药动学参数 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Table 1 Pharmacokinetic parameters of T-80-NT-I-PBCA-NP in brain after intranasal administration of rats ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

参 数	单 位	T-80-NT-I-PBCA-NP 组	NT-I-PBCA-NP 组
K_a	min^{-1}	0.016 ± 0.004	0.036 ± 0.006
α	min^{-1}	0.015 ± 0.003	0.017 ± 0.002
β	min^{-1}	0.012 ± 0.002	0.005 ± 0.001
$t_{1/2(\alpha)}$	min	43.711 ± 3.739	40.006 ± 3.274
$t_{1/2(\beta)}$	min	$56.121 \pm 5.537^*$	136.104 ± 11.354
$t_{1/2(k_a)}$	min	$43.565 \pm 5.328^*$	19.424 ± 2.152
t_{max}	min	$71.018 \pm 7.641^*$	55.830 ± 6.072
C_{max}	$\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	$117.189 \pm 10.036^*$	52.277 ± 6.217
$\text{AUC}_{0 \rightarrow \infty}$	$\text{ng} \cdot \text{min} \cdot \text{mL}^{-1}$	$22\,836.633 \pm 51.052^*$	$12\,786.934 \pm 30.723$

与 NT-I-PBCA-NP 比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs NT-I-PBCA-NP

3 讨论

NP 是由天然或人工的高分子材料构成, 被广泛用于递送药物的载体。本实验选用的 PBCA 纳米材料具有生物降解性和生物相容性, 并且遇水快速聚合, 易于制备^[9]。采用乳化聚合法制得的 NT-I-PBCA-NP 表面圆整光滑, 包封率较高, 粒径小, 稳定性好。

本实验中经聚山梨酯-80 包裹后的 PBCA 纳米粒介导 NT-I 跨 BBB 入脑的 t_{max} 为 (71.018 ± 7.761) min, 大于对照组 (55.830 ± 6.072) min, 其原因可能是包裹的纳米粒释放比较缓慢^[10]; 而 C_{max} 和 $\text{AUC}_{0 \rightarrow \infty}$ 分别为 (117.189 ± 10.036) ng/mL 和 $(22\,836.633 \pm 51.052)$ ng $\cdot$ min $\cdot$ mL⁻¹, 均为对照组 (52.277 ± 6.217) ng/mL 和 $(12\,786.934 \pm 30.723)$ ng $\cdot$ min $\cdot$ mL⁻¹ 的两倍, 表明聚山梨酯-80 包裹的 PBCA 纳米粒可显著增加 NT-I 的脑内浓度, 其原因一方面是未经包裹的 PBCA 纳米粒进入血液循环后大部分被网状内皮系统丰富的器官如

肝、脾等摄取,循环时间短,因此无法进入脑内^[11];另一方面是鼻黏膜在解剖生理上与脑部存在着独特的联系,药物经鼻腔给予后可经嗅神经通路和嗅黏膜上皮通路绕过 BBB 直接进入脑内^[12]。结果表明 T-80-NT-I-PBCA-NP 鼻腔给药后透 BBB 入脑,其机制可能是聚山梨酯-80 包裹的纳米粒在体内与载脂蛋白 E 或 B 结合后与低密度脂蛋白受体作用,再经受体介导的内吞作用被脑毛细血管细胞吸收^[4],也可能经聚山梨酯-80 包裹 PBCA 纳米粒诱导的非特异性的 BBB 通透性的增加有关^[13],有待进一步研究。

脑微透析取样技术不会改变脑脊液总量,即不会影响实验动物的正常生理功能;同时,测定的是脑细胞外液中非结合药物浓度随时间的变化,对于具有脑靶向、脑内活性效应的药物的跨 BBB 研究,具有独特的优势。本实验运用该技术研究 PBCA 纳米粒载 NT-I 跨 BBB 的药动学特征,取得了预期的效果。

参考文献:

- [1] Lu Q M, Meng Q X, Li D S, *et al.* Comparative study of three shortchain neurotoxins from the venom of *Naja kaouthia* (Yunnan, China) [J]. *J Nat Toxins*, 2002, 11(3): 221-229.
- [2] 程巧鹭,朱文静,李范珠. 鼻腔给药的生物利用度研究进展 [J]. 国外医学·药学分册, 2004, 31(3): 168-172.
- [3] Kumara M, Misrab A, Babbar A K, *et al.* Intranasal nanomulsion based brain targeting drug delivery system of risperidone [J]. *Int J Pharm*, 2008, 358(1-2): 285-291.
- [4] Kreuter J. Nanoparticle systems for brain delivery of drugs [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 47(1): 65-81.
- [5] Koziara J M, Lockman P R, Allen D D, *et al.* Paclitaxel nanoparticles for the potential treatment of brain tumors [J]. *Contr Rel*, 2004, 99(2): 259-269.
- [6] Kreuter J, Alvautdin R N, Kharkevich D A, *et al.* Passage of peptides through the blood-brain barrier with colloidal polymer particles (nanoparticles) [J]. *Brain Res*, 1995, 674(1): 171-174.
- [7] Fields H L, Heinricher M M. Anatomy and physiology of a nociceptive modulatory system [J]. *Philos Trans R Soc Lond*, 1998, 30: 361-381.
- [8] Baqquer M A, Bechgaard E. The potential of nasal application for delivery to the central brain—a microdialysis study of fluorescein in rats [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2004, 21(2-3): 235-242.
- [9] Sullivan C O, Birkinshaw C. *In vitro* degradation of insulin-loaded poly (nbutylcyanoacrylate) nanoparticles [J]. *Biomaterials*, 2004, 25(18): 4375-4382.
- [10] Das D, Lin S. Double-coated poly (butylcyanoacrylate) nanoparticulate delivery systems for brain targeting of daltargin via oral administration [J]. *J Pharm Sci*, 2005, 94(6): 1343-1353.
- [11] Gal K P, Jiang X G. Influence of particle size on transport of methotrexate across blood brain barrier by polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles [J]. *Int J Pharm*, 2006, 310(1-2): 213-219.
- [12] Illum L. Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2000, 11(1): 1-18.
- [13] Olivier J C. Drug Transport to brain with targeted nanoparticles [J]. *Neuro Rx*, 2005, 2(1): 108-119.

槲皮素联合吡嗪酮对小鼠日本血吸虫病心肌组织即早基因与转化生长因子 $\beta 1$ 表达的影响

徐 标, 彭定凤*, 胡勇钧

(华中科技大学同济医学院附属普爱医院, 湖北 武汉 430035)

摘要:目的 研究血吸虫肝硬化致心肌损害作用及其机制,探讨槲皮素对吡嗪酮杀虫治疗后血吸虫肝纤维化进一步发展及其致心肌损伤的抑制作用及其机制。方法 80 只小鼠随机分为 4 组。A、B、C 3 组小鼠感染日本血吸虫尾蚴, D 组小鼠为对照组。A、B、C 3 组小鼠感染尾蚴 8 周后, A 组小鼠以吡嗪酮 500 mg/kg 治疗 2 d; B 组小鼠以吡嗪酮 500 mg/kg 治疗 2 d 后继以槲皮素 30 mg/kg 治疗 8 周; C 组小鼠不作任何治疗(模型组)。D 组小鼠正常饲养。第 16 周末处死小鼠, 留取肝脏、心肌组织, 应用 HE 染色法、透射电镜、RT-PCR 及免疫组化染色法, 观察各组小鼠肝脏、心肌组织病理及心肌组织超微结构改变, 分析心肌组织中 c-fos mRNA、c-jun mRNA、转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)、I 和 III 型胶原的表达变化。结果 模型组、吡嗪酮组、吡嗪酮+槲皮素联合治疗组小鼠均存在不同程度心肌损伤。吡嗪酮治疗后肝纤维化及心肌损伤程度减轻, 心肌组织中 c-fos mRNA、c-jun mRNA、TGF- $\beta 1$ 、I 和 III 型胶原表达均明显低于模型组, 杀虫治疗后继以槲皮素治疗, 可进一步减轻肝纤维化及心肌损伤程度, 降低心肌组织中 c-fos mRNA、c-jun mRNA、TGF- $\beta 1$ 、I 和 III 型胶原表达, 但其表达仍高于对照组。结论 晚期血吸虫

收稿日期: 2009-01-09

作者简介: 徐 标(1979—), 男, 湖北省武汉市人, 内科学硕士, 住院医师, 从事肝脏疾病医疗、科研工作, 已发表论文 10 余篇。

Tel: (027) 65186827 E-mail: xubiao110@126.com

* 通讯作者 彭定凤 E-mail: pdf620630@yahoo.com.cn