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

周 荣，金 铭，沈淼山，阮叶萍*

浙江中医药大学，浙江 杭州 310053

摘 要：目的 制备异硫氰酸荧光素（FITC）标记的经聚山梨醇-80（P-80）修饰的神经毒素纳米粒（P-80-NT-NP），分析其经鼻腔给药后在大鼠体内组织分布规律。**方法** 制备 FITC 标记的 P-80-NT-NP 和神经毒素纳米粒（NT-NP），经大鼠鼻腔给药后，于 5、15、30、60、120、240 min 采集血样，采集脑、心、肝、脾、肺、肾组织样品，以 FITC 标记的神经毒素（FITC-NT）为指标成分，采用荧光分光光度计分析手段，考察 NT-NP 经 P-80 修饰前后药物在大鼠体内各组织中分布状况的差异。**结果** P-80-NT-NP 和 NT-NP 经鼻腔黏膜给药后 5、15、30、60、120、240 min，药物在血浆、心、肝、脾、肺、肾和脑中均有分布，其中以肝组织中分布最高，肾组织其次。给药后 120 min P-80-NT-NP 给药组血浆、脑中 NT 的质量浓度高于 NT-NP 组，而在肝组织中低于 NT-NP 组，差异均显著（$P<0.05$）。**结论** P-80 可有效增加 NT-NP 经鼻腔吸收入脑的药量，为脑靶向制剂的进一步开发应用提供依据。

关键词：神经毒素；纳米粒；异硫氰酸荧光素标记；体内分布；鼻腔给药；聚山梨醇-80

中图分类号：R285.5 **文献标志码：**A **文章编号：**0253 - 2670(2015)17 - 2599 - 04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.17.016

Distribution in mouse tissues of P-80 modified neurotoxin nanoparticles after intranasal administration in rats

ZHOU Rong, JIN Ming, SHEN Miao-shan, RUAN Ye-ping

Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

Abstract: Objective To prepare neurotoxin nanoparticles (NT-NP) labeled by FITC and modified by polysorbate-80 (P-80), and to compare the *in vivo* tissue distribution after intranasal administration in rat. **Methods** The FITC labeled P-80-NT-NP and NT-NP were prepared, blood samples were collected after intranasal administration in rats at 5, 15, 30, 60, 120, and 240 min, and the brain, heart, liver, spleen, lung, kidney tissue samples were collected. Using FITC-NT as the index component and fluorescence analysis method, the differences of the nanoparticles distribution in rats tissues after modified by P-80 were investigated. **Results** After 5, 15, 30, 60, 120, and 240 min of intranasal administration of P-80-NT-NP and NT-NP, the drug was distributed in plasma, heart, liver, spleen, lung, kidney, and brain. After 120 min of administration, the NT concentration in plasma and brain of P-80-NT-NP group was higher than that of NT-NP group, while the NT concentration in liver was lower than that in NT-NP group, with significant difference. **Conclusion** P-80 can effectively increase the nasal absorption of NT-NP into the brain and other tissues, which provides the basis for further development and application of preparation of the drug targeting to brain.

Key words: neurotoxin; nanoparticles; FITC marker; *in vivo* tissue distribution; intranasal administration; polysorbate-80

神经毒素（NT）是眼镜蛇毒的主要成分之一。因其具有良好的中枢镇痛作用，无耐受性和依赖性，安全性高，临床上主要以肌肉注射方式用于镇痛和戒毒[1]。但由于其相对分子质量较大（约 6 700），脂溶性小，不易透过血脑屏障（blood-brain barrier，BBB），起效缓慢，故在一定程度限制了其临床应用。纳米粒（nanoparticles，NPs）被认为是脑内药物传递系统的良好载体，具有缓释、保护药物的作用。鼻腔给药可以实现脑靶向给药，但鼻腔黏膜吸收能力十分有限，需要加入吸收促进剂以促进鼻黏膜对药物载体的吸收[2]。

前期研究发现，经聚山梨醇-80（polysorbate-80，

收稿日期：2014-12-02

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：周 荣（1990—），男，硕士在读，研究方向为中药药理与新产品开发。Tel: 15869139436 E-mail: ku9658@126.com

*通信作者 阮叶萍 Tel: (0571)86613521 E-mail: ruanyp@zjtcm.net

P-80）表面修饰的神经毒素纳米粒（P-80-NT-NP）经鼻腔给药后可快速入脑，脑内消除相明显延长，通过抑制脑微毛细血管内皮细胞高效的外排泵作用，尤其能抑制具有外排作用的 P-糖蛋白（P-gp）的活性，从而提高脑内药物浓度，该研究成果表明以 P-80 修饰的 NPs 为载体经鼻腔给药，是实现肽类大分子入脑的有效途径[3-4]。本研究采用异硫氰酸荧光素（FITC）标记的方法，观察 FITC 标记的 P-80-NT-NP 在大鼠体内的分布，旨在研究表面 P-80 修饰后纳米递药系统在血浆、脑、心、肝、脾、肺、肾中的代谢和分布，为神经毒素新剂型的开发应用提供依据。

1 材料

1.1 仪器和试剂

神经毒素由上海紫一试剂厂提供，质量分数＞99%，批号 ZY130114；FITC 购自美国 Sigma 公司；聚氰基丙烯酸正丁酯由北京康派特医疗器械有限公司提供；泊洛沙姆和右旋糖苷购自德国 BASF 公司；P-80 购自上海山浦化工有限公司；其他试剂均为国产分析纯。

岛津 RF-5000 型荧光分光光度计（日本岛津公司）；380 ZLS 激光粒度测定仪/Zeta 电位仪（美国 NICOMP 公司）；FHS-2A 可调高速匀浆机（金坛市宏华仪器厂）；TJ-25 低温高速冷冻离心机（Beekman Coulter 公司）；大鼠鼻黏膜给药装置（浙江省中药制剂工程中心）。

1.2 实验动物

清洁级 SD 大鼠，雌雄各半，体质量 279～290 g，由浙江中医药大学实验动物中心提供，合格证号 SCXK（沪）2007-0005。动物室每天灯光照明 12 h，通风和空调设备良好，室温控制在（23±1）℃，相对湿度为 50%～70%。实验室按常规定期消毒。

2 方法

2.1 动物分组与处理

取 40 只 SD 大鼠，取 4 只以生理盐水给药作为空白对照组：用于制备空白血浆和组织样品，其余 36 只随机分为 2 组（每组 18 只）：P-80-NT-NP 组和神经毒素纳米粒（NT-NP）组，以鼻腔给药装置[5]经鼻腔给药。给药前大鼠禁食 10 h，自由饮水。

2.2 药物的制备[6]

称取泊洛沙姆 Pluronic-68 和稳定剂右旋糖苷-70 各 150 mg，加蒸馏水 25 mL 溶解，加入 FITC 标记的 NT（FITC-NT）溶液（1 mg/mL）60 μL，调节 pH 值至 2.0，缓慢加入聚氰基丙烯酸正丁酯（PBCA）60 μL，匀速搅拌 2 h（800 r/min），调节 pH 值至 7.0，滤过，定容，得 NT-NP 胶体溶液，加入适量 P-80 搅拌，37 ℃恒温箱中孵化 1 h，超速离心 30 min（40 000 r/min），去除多余 P-80，冻干，即得 P-80-NT-NP。

2.3 理化性质考察

2.3.1 形态 将经 FITC 标记的 P-80-NT-NP 胶体溶液，滴于覆盖碳膜的铜网上，用磷钨酸溶液钠负染，室温放置至形成薄膜后用透射电子显微镜观察其形态，并拍摄照片。

2.3.2 Zeta 电位和平均粒径 将经 FITC 标记的 P-80-NT-NP 胶体溶液，用 Zeta 电位/粒度分布仪测定 Zeta 电位、平均粒径及多分散系数（PDI）。

2.3.3 包封率 取 P-80-NT-NP 胶体溶液，超速离心 30 min（40 000 r/min），取上清液，采用荧光分光光度法，选择 λ_{ex}＝488 nm 作为激发波长，于发射波长 520 nm 处读取 FITC 标记的 P-80-NT-NP 溶液的荧光强度值，激发光谱的狭缝宽度为 5 nm，发射光谱的狭缝宽度为 10 nm。以荧光强度值换算其中所含 NT 的量，按下列公式计算纳米粒的包封率和载药量。

$$包封率=(C_0-C_1)/C_0$$

$$载药量=(C_0-C_1)/M$$

C_0 为投入 NT 的初始浓度，C_1 为离心后 NT 的浓度，M 为冻干后的纳米粒的质量与胶体溶液的体积的比值

2.4 NT 标准曲线

精密称取恒温下干燥至恒定质量的 FITC-NT，配制 1 mg/mL 的储备液；再以甲醇进行梯度稀释，制备质量浓度分别为 500、250、100、50、25、10、5、1 μg/mL 的 FITC-NT 对照品溶液。分别精密吸取空白血浆 100 μL 或组织（脑、心、肝、脾、肺、肾）匀浆样品 300 μL，根据不同标准曲线的浓度范围，分别加入不同质量浓度的 FITC-NT 对照品溶液 100 μL，制成一系列质量浓度的模拟生物样品，分别加入甲醇 100 μL，漩涡混匀。加入醋酸乙酯涡旋提取后，吸取有机层，氮气吹干。残渣用 200 μL 甲醇溶解，涡旋混匀，1.2×10^4 r/min 离心 5 min，取上清液 100 μL，加入 96 孔板，用荧光分光光度计测定荧光强度，设置 FITC 的激发波长 488 nm，发射波长 520 nm。以质量浓度为横坐标（X），荧光强度值为纵坐标（Y），用加权（$W=1/x^2$）最小二乘法进行回归运算，求得直线方程，即为 NT 标准曲线。

2.5 组织分布研究[7]

除对照组外，给药时将清醒大鼠半仰位固定在大鼠鼻黏膜给药装置上，将 PE-10 管插入大鼠右侧鼻腔约 15 mm，使用有柔软 PE-10 管的微量泵给药（NT 剂量为 60 μg/kg）。分别于给药后 5、15、30、60、120、240 min 这 6 个时间点，每个时间点 3 只大鼠，分批断头处死，采集血样，并收集脑、心、肝、脾、肺、肾等组织。血样静置离心（1×10^4 r/min，5 min）得血浆，于−20 ℃保存备用。其余的组织样品，用生理盐水冲洗表面血污后，用滤纸吸干各组织表面残血并称质量，按质量与体积比为 1∶2 加生理盐水，制备成匀浆。精密吸取大鼠血浆 100 μL 或组织（脑、心、肝、脾、肺、肾）匀浆样品 300 μL，分别加入甲醇 100 μL，涡旋混匀。加入醋酸乙酯涡旋提取后，吸取有机层，氮气吹干。残渣用 200 μL 甲醇溶解，涡旋混匀，1.2×10^4 r/min 离心 5 min，取上清液 100 μL，加入 96 孔板，用荧光分光光度计测定荧光强度。根据荧光强度，按标准曲线方程求出 NT 在血浆或各个组织中的质量浓度。所有统计的实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，组间比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 P-80-NT-NP 的理化性质

FITC 标记的 P-80-NT-NPs 在电镜下观察呈圆球形，表面光滑，大小均匀（图 1）。测得的平均粒径为（73.4±9.8）nm，Zeta 电位为（−18.2±5.4）mV，包封率为（74.0±6.3）%，载药量（0.119±0.030）%。

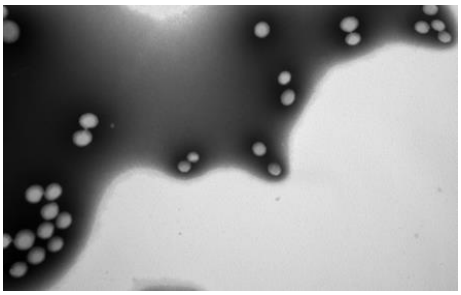


图 1 P-80-NT-NP 电镜图

Fig. 1 TEM photograghs of P-80-NT-NP

3.2 标准曲线

按照“2.4”项方法计算得到不同生物样品中 NT 的标准曲线，空白生物样品荧光强度与药物质量浓度成良好的线性关系，见表 1。

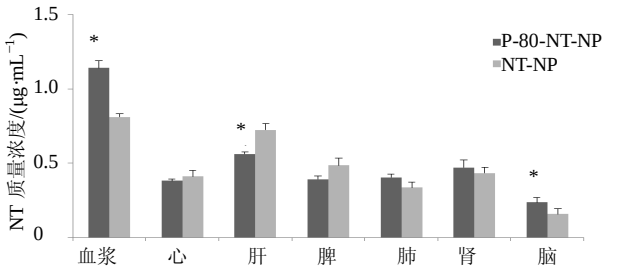
表 1 不同生物样品中 NT 的标准曲线

Table 1 Standard curves of NT in different biological samples

生物样品	回归方程	r^2	线性范围/(μg·mL^{-1})
血浆	Y=6.563 X−30.65	0.991	0.1～100.0
心	Y=5.738 X−71.44	0.994	1.0～100.0
肝	Y=5.558 X−57.83	0.992	1.0～100.0
脾	Y=5.17 X−79.88	0.993	1.0～100.0
肺	Y=4.46 X−115.67	0.991	1.0～100.0
肾	Y=3.99 X−98.1	0.992	1.0～100.0
脑	Y=3.67 X−18.29	0.993	0.5～100.0

3.3 体内组织分布

P-80-NT-NP 和 NT-NP 经鼻腔黏膜给药 120 min 后在大鼠各组织分布情况见图 2，P-80-NT-NP 和 NT-NP 在血浆、心、肝、脾、肺、肾和脑中均有分布。P-80-NT-NP 给药组血浆、脑中 NT 的质量浓度高于 NT-NP 组，而在肝组织中低于 NT-NP 组，差异均显著（P＜0.05）。P-80-NT-NP 鼻黏膜给药，脑中 NT 质量浓度为（0.236±0.100）μg/mL，NT-NP 鼻黏膜给药，脑中 NT 质量浓度为（0.158±0.070）μg/mL，两组间比较差异显著（P＜0.05）。



与 NT-NP 组比较：*P＜0.05

*P < 0.05 *vs* NT-NP group

图 2 P-80-NT-NP 和 NT-NP 鼻腔黏膜给药 120 min 药物在大鼠各组织分布情况

Fig. 2 Tissue distribution of P-80-NT-NP and NT-NP after 120 min of administration in rats

P-80-NT-NP 经鼻腔黏膜给药后 5、15、30、60、120、240 min 6 个时间点药物在大鼠各组织分布情况见图 3。结果表明 P-80-NT-NP 在脑、心、肝、脾、肺、肾各组织中均有分布，其中以肝组织中分布最高，肾组织其次。肺、脑、肝、脾组织中，NT 质量浓度 5 min 即达到峰值，而在肾、心组织中 15 min 达到峰值，之后随时间逐渐下降。NT-NP 给药后药物在各组织中质量浓度变化趋势与 P-80-NT-NP 相似。

4 讨论

P-80-NT-NP 在脑、心、肝、脾、肺、肾各组织中均有分布，P-80-NT-NP 在血浆和各组织的质量浓度从高到低依次为血浆＞肝＞肾＞脾＞肺＞心＞脑。

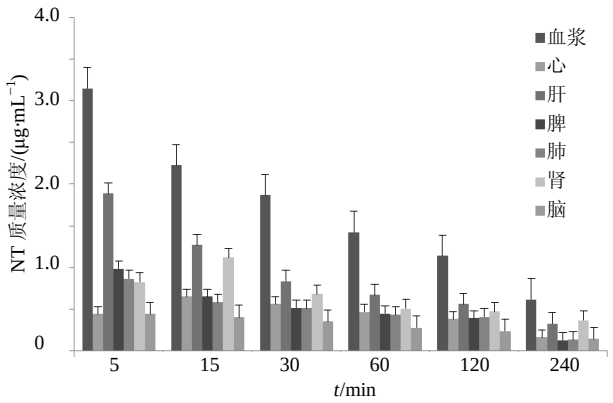


图 3　P-80-NT-NP 给药后不同时间点药物在大鼠体内组织分布

Fig. 3　Tissue distribution of P-80-NT-NP in rats at different time points after administration

脑、肝、肺和脾在 P-80-NT-NP 给药 5 min 后达到药物浓度最高值，心、肾在给药 15 min 后达到最高值，然后迅速降低，说明 P-80-NT-NP 的吸收、分布及消除迅速。所考察组织中 NT-NP 在肝中的药物量较高，与 P-80-NT-NP 组有显著性差异（$P<0.05$），提示 NT-NP 与肝组织亲和力较好，且在肺部消除慢。可能 NT-NP 经鼻腔黏膜给药后逃逸吞噬进入血液循环，载药纳米粒进入血液循环后，在调理素的作用下，被血浆蛋白、糖蛋白等多种成分吸附，随即被肝脏中网状内皮系统吞噬[8]。

大鼠体内的组织分布研究发现，P-80-NT-NP 和 NT-NP 在肾脏中的量均较高，两组间差异无显著性（$P>0.05$）。推测可能是 P-80-NT-NP 和 NT-NP 降解的部分携带着多肽从组织上被重吸收到血液循环，再重新分布到各组织[9]；此外肾脏可能对 NT 起着解毒和分泌排泄的作用。

有学者用氯胺 T 法标记 NT，大鼠 iv 给予 ^{125}I-NT，观察其在体内的分布情况，30 min 及 120 min 后分布最多的均为心脏，肾脏以外的实质性脏器分布均较少，脑中分布最低[10]。经 P-80 修饰后，即 P-80-NT-NP 鼻黏膜给药 120 min，脑中药物的量为（0.236±0.100）μg/mL，NT-NP 组脑中药物的量显著低于 P-80-NT-NP 组（$P<0.05$）。提示 P-80-NT-NP 与脑组织亲和力较好，提高脑组织的靶向分布，且消除缓慢。NT-NP 经 P-80 修饰后，BBB 透过性增强，靶向至脑组织分布，使药物量显著增大，这有利于 NT 发挥镇痛作用。P-80 修饰的 NP 可以将血浆中的载脂蛋白 E（ApoE）或载脂蛋白 B（ApoB）吸附至其表面，利用 ApoE/ApoB 能与脑微血管内皮细胞（BMEC）上低密度脂蛋白（LDL）受体结合的特点，借助受体介导的胞饮作用穿过 BBB 并直接扩散至脑内释药[11]。

综上所述，P-80-NT-NP 可显著增加 NT 经鼻腔吸收入脑，而且消除缓慢，同时揭示了该药物经鼻腔黏膜给药入脑后，药物在大鼠体内的分布规律。本研究所使用的大鼠脑、血浆及组织内 FITC-NT 量的荧光分析方法简便、快速、准确，为其他大分子多肽类的药动学研究提供了方法学参考。此外，关于 P-80-NT-NP 如何促进鼻腔吸收入脑的分子蛋白通路尚不明确，有待进一步研究。

参考文献

[1] 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

[2] 李　玲, 马海忠, 廖明琪, 等. 鼻腔给药系统类型及临床应用进展 [J]. 中国药房, 2013, 24(17): 1615-1617.

[3] Sun W Q, Xie C S, Wang H F, *et al*. Specific role of polysorbate 80 coating on the targeting of nanoparticles to the brain [J]. *Biomaterials*, 2004, 25(15): 3065-3071.

[4] Cheng Q Y, Feng J, Li F Z. Brain delivery of neurotoxin-Iloaded nanoparticles through intranasal administration [J]. *Acta Pharm Sin*, 2008, 43(4): 431-434.

[5] 赵燕敏, 夏爱晓, 魏颖慧, 等. 聚山梨酯80修饰的神经毒素纳米粒跨血脑屏障转运及细胞毒性 [J]. 药学学报, 2010, 45(10): 1312-1316.

[6] 李范珠. 啮齿类动物鼻腔给药装置: 中国专利, 200520013525.5 [P]. 2007-03-28.

[7] 徐陆中, 赵燕敏, 潘越芳, 等. 神经毒素纳米粒的制备及在大鼠体内的组织分布 [J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(17): 1425-1428.

[8] 宋大千, 王　炎, 李　琦. 中药纳米粒靶向给药系统的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(8): 241-244.

[9] Pieter J G, Gorine C V, Albertus G B. Targeted delivery across the blood-barrier [J]. *Expert Opinion Drug Deliv*, 2005, 2(2): 299-309.

[10] 林丽丽, 许云禄. 眼镜蛇毒神经毒素的 ^{125}I 标记及其在大鼠体内的分布 [J]. 海峡药学, 2009, 21(5): 36-38.

[11] Kuar I P, Bhandari R, Bhandari S, *et al*. Protential of solid lipid nanoparticles in brain targeting [J]. *J Control Release*, 2008, 127(2): 97-109.