

单克隆抗体 OX26 修饰的丹酚酸 B/黄芩苷纳米结构脂质载体研究

吴玉梅^{1,2}, 李新悦^{1,2#}, 张 谦^{1,2}, 刘静静^{1,2}, Dereje KEBEBE^{1,2}, 郭 盼^{1,2}, 刘志东^{1,2*}

1. 天津中医药大学 现代中药发现与制剂技术教育部工程中心, 天津 300193

2. 天津中医药大学 天津市现代中药重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地, 天津 300193

摘要: 目的 制备转铁蛋白受体单克隆抗体 OX26 修饰的丹酚酸 B/黄芩苷纳米结构脂质载体 (Sal B/BA-NLC), 并对其表征和细胞摄取研究。方法 采用乳化-固化法制备 Sal B/BA-NLC, 用 2-亚氨基硫烷盐酸盐 (2-iminothiolane hydrochloride) 将 OX26 进行硫醇化后连接于 Sal B/BA-NLC 表面, 以形态、粒径、Zeta 电位及包封率等为评价指标考察其理化性质, 并用差示扫描量热法 (DSC) 与核磁共振波谱 (NMR) 进行验证。以香豆素-6 (coumarin-6, C6) 为荧光探针, 代替黄芩苷和丹酚酸 B 制备制剂, 利用高内涵成像仪考察脑微血管内皮细胞 bEnd.3 对其的摄取情况。结果 所制备的 OX26 修饰的 Sal B/BA-NLC 粒径为 (27.50 ± 3.37) nm, PDI 为 0.39 ± 0.04 , Zeta 电位为 (-7.06 ± 1.85) mV。DSC 与 NMR 结果表明, 药物是以无定形的形式存在于纳米结构脂质载体中。细胞摄取结果显示, 当考察时间一致时, bEnd.3 细胞摄取 3 组溶液体系的荧光强度为 OX26-C6-NLC > C6-NLC > C6-SL。结论 所制备的 OX26 修饰的 Sal B/BA-NLC 粒径较小、分布均匀, 且包封率高。与溶液组和未修饰的 NLC 组相比, OX26 修饰的 NLC 组具有更高的摄入量。

关键词: 纳米结构脂质载体; 单克隆抗体 OX26; 丹酚酸 B; 黄芩苷; 血脑屏障; bEnd.3 细胞; 细胞摄取

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)12-2801-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.12.011

Research on monoclonal antibody OX26 modified salvianolic acid B/baicalin nanostructured lipid carriers

WU Yu-mei^{1,2}, LI Xin-yue^{1,2}, ZHANG Qian^{1,2}, LIU Jing-jing^{1,2}, Dereje KEBEBE^{1,2}, GUO Pan^{1,2}, LIU Zhi-dong^{1,2}

1. Engineering Research Center of Modern Chinese Medicine Discovery and Preparation Technique, Ministry of Education, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Tianjin State Key Laboratory of Modern Chinese Medicine-Province and Ministry Co-Established State Key Laboratory Cultivation Base, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To prepare, characterize, and study cellular uptake of transferrin receptor monoclonal antibody OX26 modified nanostructured lipid carrier loaded with salvianolic acid B and baicalin (Sal B/BA-NLC). **Methods** Sal B/BA-NLC was prepared by emulsification-solvent evaporation method. OX26 was thiolated with 2-iminothiolane hydrochloride and then conjugated to the surface of Sal B/BA-NLC. The morphology, particle size, Zeta potential, and encapsulation efficiency (EE) were evaluated for the physicochemical properties, and OX26 modified Sal B/BA-NLC was verified by differential scanning calorimetry (DSC) and nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR). Coumarin-6 (C6) was used as the fluorescent probe instead of baicalin and salvianolic acid B to prepare the formulations in cellular uptake study. The cellular uptake study was conducted by brain microvascular endothelial cells bEnd.3 using high content cell imaging analysis system. **Results** The prepared OX26 modified Sal B/BA-NLC had particle size of (27.50 ± 3.37) nm, PDI of 0.39 ± 0.04 , and Zeta potential of (-7.06 ± 1.85) mV. The DSC and NMR results indicated that the drug was encapsulated in the nanostructured lipid carrier in an amorphous form. The results of cell uptake showed that the fluorescence intensities of the three solutions in bEnd.3 cells were: OX26-C6-NLC > C6-NLC > C6-SL. **Conclusion** The prepared OX26 modified

收稿日期: 2018-05-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81001645)

作者简介: 吴玉梅 (1991—), 女, 博士研究生, 研究方向为药剂学。Tel: 15285135654 E-mail: wym91116@163.com

*通信作者 刘志东, 博士生导师, 研究员, 主要从事中药新剂型与新技术研究。E-mail: lonerliuzd@163.com

#并列第一作者 李新悦 (1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向为药剂学。Tel: 15122990167 E-mail: 1136467265@qq.com

Sal B/BA-NLC has smaller particle size, uniform distribution, and high EE. The OX26-modified NLC group had a higher intake than the solution group and the unmodified NLC group.

Key words: nanostructured lipid carrier; monoclonal antibody OX26; salvianolic acid B; baicalin; blood-brain barrier; bEnd.3 cells; cellular uptake

丹酚酸 B (salvianolic acid B, Sal B) 和黄芩苷 (baicalin, BA) 均具有修复神经元损伤作用以及改善脑缺血-再灌注损伤的作用。Sal B 通过 PI3K/Akt 信号通路作用促进神经干细胞的增殖, 而 BA 能够限制神经干细胞分化为神经元趋势^[1-7]。当 Sal B 与 BA 的物质的量比为 5:3 配伍应用时, 在体外能够协同发挥作用, 促进神经再生, 促进海马区神经元数目的增长, 对脑缺血损伤大鼠模型的学习记忆能力有明显的治疗效果, 明显改善缺血性卒中及其后遗症的症状^[8-10]。但由于血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 的存在, 使得到达脑部的药物浓度极低, 很难发挥药效。常用于脑部的治疗方法有开颅手术、鞘内注射和脑部植入等, 这无不给患者带来了极大痛苦^[11]。

据报道, 胶体给药系统具有良好的生物屏障透过性, 将其加以受体的靶向修饰后, 具有一定的脑内透过性^[12]。纳米粒作为靶向胶体给药系统已然成为现阶段新剂型研究中的中流砥柱。纳米结构脂质载体 (nanostructured lipid carriers, NLC) 包封率高、稳定性好, 具有药物的控释特性和较好的生物相容性^[13-16]。将受体配体或抗体作为靶向分子与纳米粒连接, 构建靶向纳米制剂或以药物复合物的形式, 通过受体结合的特异性帮助药物进入脑内。目前, 受体介导转运方式 (receptor mediated transcytosis, RMT) 是较为成熟的传递药物入脑的方式之一^[17]。将制备好的载神经肽的聚合物泡囊用 OX26 抗体进行修饰后, 静注给药, 结果显示修饰后的聚合物泡囊能够明显增加药物在脑内的含量^[18]。

因此, 本实验利用 OX26 作为靶向配体修饰 Sal B/BA-NLC, 并以香豆素-6 (coumarin-6, C6) 为荧光探针, 用 bEnd.3 细胞对其进行摄入研究, 评价其体外靶向性, 以探讨 OX26-Sal B/BA-NLC 改善 BBB 通透性和脑靶向性, 探讨提高 BA 和 Sal B 治疗脑部疾病的生物利用度的可行性。

1 材料与仪器

1.1 材料

对照品 BA (批号 GR-133-140106, 质量分数≥98%)、Sal B (批号 GR-133-140929, 质量分数≥

98%), 南京广润生物制品有限公司; Sal B 提取物 (批号 W16-6-6, 质量分数≥90%)、BA 提取物 (质量分数≥85%), 天津中新药业现代生物技术工程中心; 大豆卵磷脂 (Lipoid S100, 德国 Lipoid 公司); Myrj52, 南京威尔化工有限公司, 批号 20130706; 山嵛酸甘油酯 Compritol 888 ATO, 法国 Gatteofosse 公司; mPEG-MAL (质量分数>99.3%)、mPEG-OH (批号 P0407A, 质量分数>98.0%), 上海炎怡生物科技有限公司; 辛酸癸酸甘油三酯 Miglyol 812, 北京凤礼精求商贸有限公司, 批号 120411; 转铁蛋白受体的单克隆抗体 OX26, Bio-Rad 公司, 批号 0515; 小鼠脑微血管内皮细胞株 bEnd.3, 美国 ATCC, CRL-2299; 2-亚氨基硫烷盐酸盐 (2-iminothiolane hydrochloride, Traut's 试剂), 美国 Sigma 公司, 批号 100M1187V; Hitrap 脱盐柱, GE Healthcare 公司, 批号 10041507; DMEM 高糖培养基 (批号 C11995500BT)、胎牛血清 (FBS)、0.25%胰酶+0.02% EDTA (批号 1606137)、双抗 (批号 1430661), Gibco 公司; DAPI (批号 094M4053V)、DMSO (批号 RNBD4071), Sigma 公司; C6 (批号 S2137139, 质量分数≥98%), 美国 Acros 公司; CCK-8 试剂盒 (批号 GH688), 日本 Dojindo Lab; 甲醇、乙腈、三氯甲烷, 天津康科德科技有限公司; 三氯甲烷、无水乙醇均为分析纯, 甲醇、乙腈为色谱纯。C6, 批号 MKBV4602V, 美国 Sigma-Aldrich 公司。

1.2 仪器

EMS-8B 型磁力搅拌, 天津欧诺仪器仪表有限责任公司; SPD-10Avp Plus 岛津高效液相色谱仪, 日本 Shimadzu 公司; KQ-300B 超声清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; AX205 十万分之一电子天平, 瑞士 Mettler Toledo 公司; FA124 万分之一电子天平, 天津仁诺科学仪器有限公司; Milli-Q 超纯水系统, 美国 Millipore 公司; 台式冷冻离心机, 美国 Thermo Scientific 公司; Nano ZS 激光粒径测定仪, 英国 Malvern 公司; 透射电子显微镜 (TEM), 日本 JEOL 公司; 低温高速离心机, 美国 Beckman 公司; 差示扫描量热仪 (DSC), 美国 Jade 公司;

FORMA3111 CO₂ 型恒温培养箱, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 超净台, 苏州佳宝净化工程有限公司; DMIL 倒置相差显微镜, 德国 Leica 公司; 多功能酶标仪, 美国 PerkiElmer; InCell Analyzer 2000 高内涵细胞成像分析系统, 美国 GE 公司。

2 方法与结果

2.1 OX26-Sal B/BA-NLC 的制备与评价

2.1.1 OX26-Sal B/BA-NLC 的制备

(1) Sal B/BA-NLC 的制备: 采用乳化-固化法制备 OX26-Sal B/BA-NLC。精密称取 Sal B 提取物 3.5 mg, 加入 2 mL 去离子水溶解, 并称取 Myrj 52 300 mg 加入到 9 mL 去离子水中, 水浴 74 °C 溶解。在磁力搅拌下, 将溶解完全的 Sal B 水溶液加入到 Myrj52 中, 混合均匀, 共同构成水相。称取 BA 提取物 1.5 mg 并溶于 2 mL 无水乙醇中, 溶解完全后, 加入 50 mg 卵磷脂, 使二者混合均匀; 另外称取 Compritol 888 ATO 50 mg、Miglyol 812 20 mg 以及适量的 mPEG-MAL 与 mPEG-OH, 加 1 mL 氯仿使之溶解, 并将乙醇溶液与氯仿溶液合并, 混匀, 构成油相。保持水相在 74 °C 的水浴中磁力搅拌, 随之将混合好的油相滴入到水相中。待体系澄清时, 降低转速, 继续搅拌至总体积的 1/3, 冰水浴 2 h。最后经 0.22 μm 孔径滤膜滤过, 得到 Sal B/BA-NLC。

(2) OX26 的疏醇化: 采用 Traut's 试剂对单克隆抗体进行巯基化^[19]。将抗体 OX26 置于 0.15 mol/L 硼酸钠/0.1 mmol/L EDTA 缓冲液 (pH 8.5) 中。混合均匀后, 加入 Traut's 试剂, 加入量根据 OX26 与 2-iminothiolane 物质的量比为 1:40 计算获得。磁力搅拌下, 冲氮、避光、室温反应 1 h。将反应后的抗体经 Hitrap TM 脱盐柱洗脱分离, 洗脱液为 0.01 mol/L 的 HEPES 缓冲液 (pH 7.0)。最后将洗脱液进行超滤离心浓缩 (截留相对分子质量为 3 000), 4 °C、4 000 r/min 离心 30 min。离心结束后, 取内管溶液, 即为疏醇化后的 OX26。

(3) OX26 与 Sal B/BA-NLC 的连接: 将上述制得疏基化的 OX26 与 Sal B/BA-NLC 混合, 按照 Maleimide 与巯基比为 3:1 进行混合。混匀后将其放置在避光条件下, 充氮, 磁力搅拌 8 h。反应后, 以 0.01 mol/L 的 PBS 缓冲液 (pH 7.4) 为洗脱液, 过 Sepharose CL-4B 柱以除去游离的蛋白 OX26, 即得抗体修饰后的纳米粒混悬液体系 OX26-Sal B/BA-NLC。

2.1.2 OX26-Sal B/BA-NLC 中 Sal B 及 BA 的含量

测定方法及包封率测定

(1) 色谱条件: 色谱柱为 Diamond Dikmaods C₁₈ 柱 (200 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-乙腈-0.2%磷酸水溶液 (22.5:22.5:55); 检测波长 280 nm; 体积流量 1 mL/min; 柱温 30 °C; 进样量 20 μL。

(2) 标准曲线的绘制: 分别精密称取 Sal B 对照品和 BA 对照品适量, 甲醇溶解并定容, 作为储备液。取适量储备液, 加甲醇配制成 Sal B 质量浓度为 1.06、6.10、10.16、28.45、71.12 μg/mL, BA 质量浓度为 0.72、4.32、7.20、20.16、50.40 μg/mL 的混合对照品溶液。按照上述色谱条件, 进样 20 μL, 记录其峰面积, 以峰面积 (*A*) 对质量浓度 (*C*) 做图。得到 Sal B 的回归方程为 $A=23\,231\,C-6\,393.4$, $r=0.999\,9$; BA 的回归方程为 $A=72\,709\,C-11\,437$, $r=0.999\,9$ 。

(3) 精密度考察: 选取低、中、高 3 个质量浓度 (1.06、10.16、28.45 μg/mL) 的混合对照品溶液 1 d 内重复测定 3 次, 计算日内 RSD; 连续测定 3 d, 计算日间 RSD。结果显示, Sal B 和 BA 的日内、日间 RSD 均小于 2%, 精密度符合方法学要求。

(4) 包封率的测定: 实验选用超滤离心法测定其包封率。将 0.2 mL 纳米制剂加去离子水稀释至 3.0 mL, 置于超滤离心管中, 5 000 r/min 离心 20 min。离心后取外管中的样品进行 HPLC 测定, 即为 $W_{游}$ 。另取 0.2 mL 纳米制剂, 加入甲醇 2.8 mL 超声, 5 000 r/min 离心 20 min, 经 0.22 μm 滤膜滤过, 取续滤液经 HPLC 测定, 即为 $W_{总}$ 。计算 Sal B 及 BA 的包封率 [包封率=($W_{总}-W_{游}$)/ $W_{总}$, 其中 $W_{游}$ 为载药 NLC 中游离药物质量, $W_{总}$ 为载药 NLC 中总的药物质量]。

结果显示, Sal B/BA-NLC 中 Sal B 与 BA 的包封率分别为 (99.79±0.19)% 和 (89.60±3.53)%, OX26-Sal B/BA-NLC 中 Sal B 与 BA 包封率分别为 (95.77±2.42)% 和 (54.93±5.00)%。

2.1.3 粒径及 Zeta 电位测定 纳米制剂经去离子水稀释到适宜浓度后, 于激光粒度测定仪中测定其粒径及电位。结果显示, Sal B/BA-NLC 粒径为 (12.83±1.41) nm, PDI 为 0.25±0.09, Zeta 电位为 (-7.27±2.40) mV; OX26-Sal B/BA-NLC 粒径为 (27.50±3.37) nm, PDI 为 0.39±0.04, Zeta 电位为 (-7.06±1.85) mV。

2.1.4 形态观察 利用 TEM 对 Sal B/BA-NLC 和 OX26-Sal B/BA-NLC 进行形态观察。分别取适量的

Sal B/BA-NLC 和 OX26-Sal B/BA-NLC 置于铜网上, 室温干燥后, 用 2% 的磷钨酸对其染色, 再次自然干燥。采用 TEM 观察并摄制照片, 见图 1。结果显示, Sal B/BA-NLC 和 OX26-Sal B/BA-NLC 粒子多呈圆形, 分散较好, 且大小均匀。

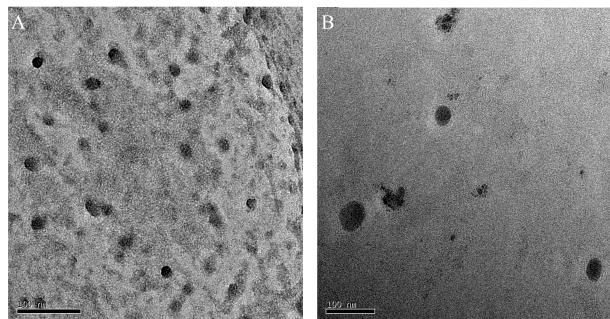


图 1 Sal B/BA-NLC (A) 与 OX26-Sal B/BA-NLC (B) 的透射电镜图

Fig. 1 TEM photos of Sal B/BA-NLC (A) and OX26-Sal B/BA-NLC (B)

2.1.5 差示扫描量热法 (DSC) 分析 差示扫描量热法 (differential scanning calorimetry, DSC) 是一种较为新型的测定方法, 可根据 DSC 图谱数据分析, 从样品吸放热的变化过程中得到相关的药物理化性质信息。

取 Sal B 及 BA 对照品以及两者的混合对照品、空白 NLC 制剂、Sal B/BA-NLC、OX26-Sal B/BA-NLC 以及物理混合物的冻干样品进行 DSC 检测。设置 DSC 仪器参数, 升温速率为 25 °C/min, 扫描范围为 30~270 °C。以空白坩埚作为对照, 另一坩埚内称量 5~10 mg 的样品, 得到各样品的 DSC 图, 见图 2。

根据图中各个样品的出峰位置可对药物在纳米粒中的存在形式进行初步判断。从图 2-A 和 B 可以看出, Sal B 在 85~110 °C 出现吸热峰, BA 在 213 °C 处有强吸热峰; 图 2-D 为空白 NLC, 并没有药物峰出现, 并且在 50 °C 和 165 °C 处出现 2 处较强的熔融吸热峰, 这说明了此处出现的吸热峰为该制剂的特征峰。在图 2-E、F 中, 只有纳米制剂的特征峰存在, 而药物的吸热峰没有出现。物理混合物 (图 2-G) 中, 同时具有 Sal B 和 BA 的吸热特征峰和空白制剂的吸热特征峰。综合上述结果, 表明 Sal B 和 BA 作为药物被包裹于纳米粒中, 并且药物是以分子分散状态存在的, 而非以晶体形式存在。

2.1.6 核磁共振波谱 (NMR) 分析 室温条件下, 取 5~10 mg OX26-Sal B/BA-NLC 冻干样品及

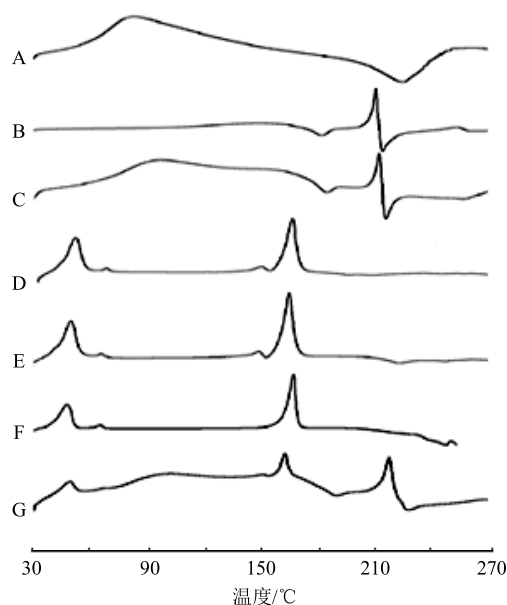


图 2 Sal B (A)、BA (B)、混合对照品 (C)、空白制剂 (D)、Sal B/BA-NLC (E)、OX26-Sal B/BA-NLC (F) 和物理混合物 (空白制剂与混合对照品, G) 的 DSC 图

Fig. 2 DSC diagrams for Sal B (A), BA (B), mixture of Sal B and BA (C), blank NLC (D), Sal B/BA-NLC (E), OX26-Sal B/BA-NLC (F), and physical mixture (blank NLC mixed with Sal B and BA, G)

mPEG-MAL (相对分子质量 5 000) 用 CDCl_3 或 D_2O 溶解后进行核磁共振分析, 得到样品核磁氢谱与碳谱, 见图 3。图 3 中的 δ 7.272 为溶剂峰, 图 3-A-H 中, δ 6.717 处的单峰为 mPEG-MAL 的马来酰亚胺环中双键氢, 抗体修饰后的纳米粒图谱 (图 3-B-H) 中并没有该峰的出现。由此推断, mPEG-MAL 结构中马来酰亚胺环上的双键氢反应后消失。

碳谱进一步证明了纳米粒上的 mPEG-MAL 与硫醇化抗体 OX26 已反应。图 3-A-C 中, 在 δ 134.41 处出现的较强峰为 mPEG-MAL 结构中马来酰亚胺环上的双键, 在图 3-B-C 中 δ 134.41 处并未出现对应峰, 该峰消失, 这进一步说明了 mPEG-MAL 结构中马来酰亚胺环的双键参与了反应。图 3-A-C 中, δ 58.00 处的峰来自 mPEG-MAL 结构中的亚甲基。纳米粒与抗体连接后, 得到的图 3-B-C 中 δ 48.81 处峰来自 OX26-SH 与 mPEG-MAL 中的马来酰亚胺环双键反应后的产物^[20-22]。

将所得氢谱与碳谱相结合, 充分证明了纳米制剂中的 mPEG-MAL 与硫醇化的抗体 OX26 发生了反应, 该实验结果亦说明了单克隆抗体 OX26 与丹 Sal B/BA-NLC 连接成功。

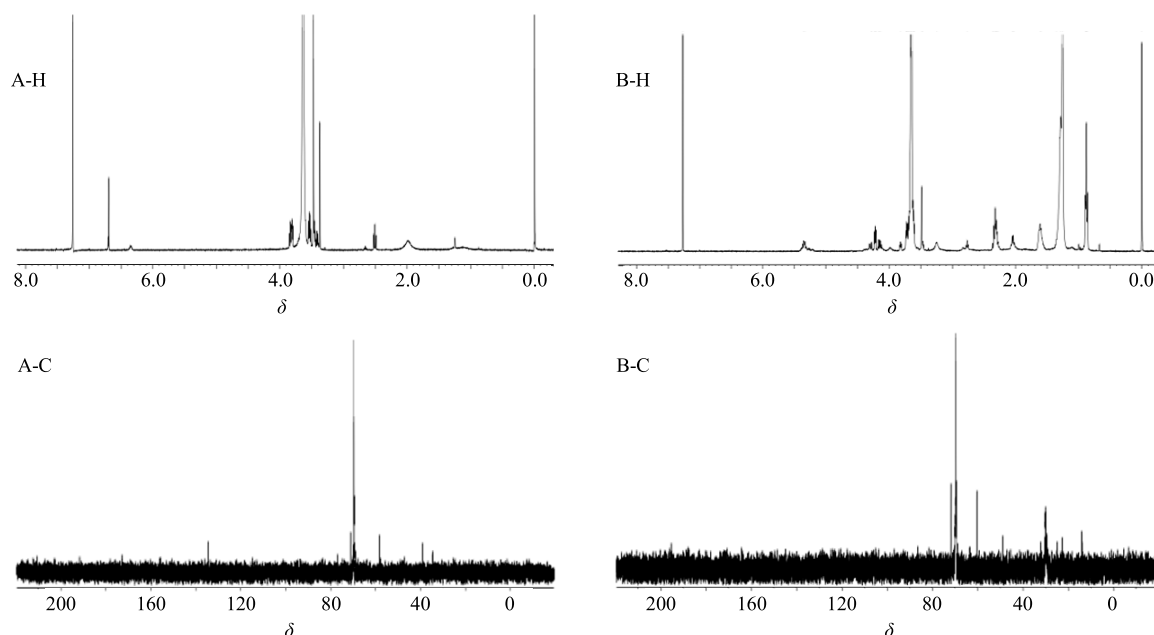


图 3 mPEG-MAL (A) 和 OX26-Sal B/BA-NLC (B) 的 ^1H -NMR (H) 和 ^{13}C -NMR (C) 谱图
Fig. 3 ^1H -NMR (H) and ^{13}C -NMR (C) spectrums of mPEG-MAL (A) and OX26-Sal B/BA-NLC (B)

2.2 OX26-Sal B/BA-NLC 的细胞摄入研究

2.2.1 载 C6 的纳米结构脂质载体的制备 使用 C6 作为荧光探针, 其余辅料保持不变, 依据上述制备方法制得载 C6 的纳米结构脂质载体 (C6-NLC)。在此基础上将疏醇化后的抗体 OX26 与 NLC 连接, 制得 OX26 修饰后的 C6 纳米结构脂质载体 (OX26-C6-NLC)。因 C6 具有荧光特性, 使用酶标仪测定 C6 含量, 设置激发波长为 496 nm、发射波长为 523 nm。测得 C6-NLC 的包封率为 99.97%, OX26-C6-NLC 的包封率为 99.83%。根据所得到的包封率, 称取适量的 C6 溶于 DMSO 中, 配制 C6 溶液 (C6-SL)。

2.2.2 bEnd.3 细胞培养 将 bEnd.3 细胞用完全培养基制成单细胞悬液, 并接种于培养瓶中, 于 37 °C, 5% CO_2 培养箱中培养, 当细胞融合至 80% 左右时进行传代培养。

2.2.3 OX26-C6-NLC 对 bEnd.3 细胞活性的影响 采用 CCK-8 法对细胞活性进行检测。将 bEnd.3 细胞以密度为 5 000 个/孔接种于 96 孔板上, 放置于培养箱中, 培养 24 h。将培养液换为不含胎牛血清的 DMEM 基础培养液, 对细胞进行同步化。同步化 12 h 后, 吸出培养液, 按质量浓度梯度为 35 600、3 560、356、35.6、3.56 ng/mL 给药。实验设置对照组、C6-SL 组、C6-NLC 组与 OX26-C6-NLC 组。每孔中加入 100 μL 药液, 对照组给予 DMEM 基础培

养液。于培养箱中继续培养 24 h 后, 吸出药液, 用 PBS 清洗细胞 2~3 遍, 向各个孔内加入 100 μL 10% CCK-8 稀释液。37 °C 培养箱中培养 1 h 后, 于酶标仪内测定在 450 nm 处的吸光度值, 以检测细胞活性。结果见表 1。从上述结果可以看出, C6-SL、C6-NLC 与 OX26-C6-NLC3 组药液均在 3 560、35 600 ng/mL 质量浓度下表现出明显的细胞毒性, 细胞存活率均在 90% 以下。当药物质量浓度为 356、35.6、3.56 ng/mL 时, 细胞存活率均在 90% 以上, 无细胞毒性。因此, 选用 356 ng/mL 作为细胞摄取实验的给药质量浓度。

2.2.4 bEnd.3 对载 C6 纳米粒的摄入研究 将 bEnd.3 细胞按密度 5 000 个/孔接种到 96 孔板内, 于 37 °C、5% CO_2 培养箱内培养。待细胞融合至约 60% 时, 吸出培养液, 换用不含有血清的 DMEM 基

表 1 载 C6 的制剂对 bEnd.3 细胞活性的影响 ($n = 5$)

Table 1 Effects of C6-loaded preparations on activity of bEnd.3 cells ($n = 5$)

质量浓度/ (ng·mL ⁻¹)	细胞存活率/%		
	C6-SL	C6-NLC	OX26-C6-NLC
3.56	99.97±5.70	100.78±3.12	99.18±5.17
35.6	97.74±5.29	99.29±5.28	94.12±8.26
356	91.22±6.17	98.55±3.62	97.84±4.55
3 560	83.13±5.09	57.69±5.14	62.35±3.67
35 600	18.29±0.38	31.24±1.04	30.86±2.18

础培养液对细胞进行同步化操作。同步化 12 h 后, 进行细胞摄取实验。实验分为 C6-SL 组、C6-NLC 组与 OX26-C6-NLC 组。根据细胞毒性实验确定给药质量浓度为 356 ng/mL。每孔加入 100 μ L 药液, 设置给药时间为 2、4、8、12、24 h, 给药后置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中。孵育结束后, 吸出药液, 并向各孔内加入 100 μ L 冷的 PBS 缓冲盐溶液, 以终止摄取过程。然后以常温的 PBS 清洗细胞 3 遍,

以去除 C6 的荧光浮色。使用 4% 的多聚甲醛溶液对细胞摄取过程进行固定, 20 min 后, 吸出固定液。再次对细胞进行清洗, 每隔 5 min 清洗 1 次, 清洗 2 次。各孔中加入 40 μ L 0.20 μ g/mL 的 DAPI 稀释液, 对细胞核进行染色处理, 10 min 后, PBS 清洗 2 遍。最后, 向各孔加入 150 μ L PBS 缓冲盐溶液。将处理好的 96 孔板放入高内涵仪器中, 对细胞的摄取情况进行定性与定量分析, 见表 2 与图 4。

表 2 不同时间段内细胞摄取的荧光强度 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Fluorescence intensity of different coumarin-6-loaded formulations in bEnd.3 cells at different time intervals ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

<i>t</i> /h	C6-SL		C6-NLC		OX26-C6-NLC	
	荧光强度	RSD/%	荧光强度	RSD/%	荧光强度	RSD/%
2	3.63 $\pm$ 0.35	9.66	92.18 $\pm$ 4.47**	4.85	157.15 $\pm$ 7.46**	4.75
4	3.13 $\pm$ 0.30	9.46	104.50 $\pm$ 7.15**	6.84	161.07 $\pm$ 9.57**	5.94
8	8.34 $\pm$ 0.20	2.34	168.69 $\pm$ 1.44**	0.85	241.78 $\pm$ 11.87**	4.91
12	12.03 $\pm$ 0.11	0.95	232.02 $\pm$ 6.25**	6.25	350.08 $\pm$ 48.27**	13.79
24	9.47 $\pm$ 0.23	2.41	210.83 $\pm$ 2.24**	1.06	286.03 $\pm$ 2.52**	0.87

与 C6-SL 组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs C6-SL groups

图 4 显示, 同一时间段内 OX26 修饰的 C6-NLC 的摄取情况要明显好于未经修饰组与溶液组。随着时间的延长, 溶液组摄取情况并无明显变化, 且摄入量微小, 几乎观察不到荧光, 而 C6-NLC 组与 OX26-C6-NLC 组随着时间的推移, 摄入量随之增加, 荧光强度增强。通过表 2 结果进一步分析, 基本与定性分析结果一致。在 2~8 h, OX26 修饰过的纳米粒的荧光强度较普通纳米粒组有明显的差异, 并随着时间的延长, 荧光强度增加。12 h 后, 摄取情况减弱, 荧光强度值降低。

3 讨论

纳米粒大小对于药物脑部递送至关重要。研究表明, 粒径小于 100 nm 的纳米粒具有更好的 BBB 通透性^[23]。本研究采用高温乳化-低温固化法进行载 Sal B 及 BA 的纳米结构脂质载体的制备, 利用 2-iminothiolane 试剂对 OX26 抗体作硫醇化处理, 然后将其连接于纳米结构脂质载体表面。所制备的 OX26 修饰的 Sal B/BA-NLC 粒径为 (27.50 $\pm$ 3.37) nm, PDI 为 0.39 $\pm$ 0.04, Zeta 电位为 (-7.06 $\pm$ 1.85) mV。经核磁及 DSC 检测, 证明了抗体 OX26 与 Sal B/BA 纳米结构脂质载体连接成功, 且 Sal B 和 BA 作为药物以分子分散状态被包裹于纳米粒中。

通过靶向配体进行纳米粒表面修饰, 可以改善药物的 BBB 渗透性。由于 OX26 单克隆抗体对存在于脑毛细血管内皮细胞中的转铁蛋白受体 (TfR) 具有高选择性, 所以其被广泛用于将纳米粒的脑靶向给药系统中^[24]。由于其在 BBB 内皮上的高表达, 转铁蛋白受体 (TfR) 已成为研究跨越 BBB 的受体介导的转胞吞作用的主要靶标之一。抗 TfR 抗体-药物缀合物由于其以高亲和力结合 TfR 而不干扰内源转铁蛋白 (Tf) 的能力而受到最多关注^[25]。本研究使用 OX26 修饰载 Sal B 和 BA 的纳米结构脂质载体以改善它们的 BBB 通透性, 且以 C6 为荧光探针, 用 bEnd.3 细胞进行了制剂的细胞摄取研究。

bEnd.3 细胞由于生长速度快, 且在重复传代中维持 BBB 特征、功能障碍的形成以及对许多分子干预的适应性, 因此是 BBB 模型的较适合细胞。它是一种用于研究调节 BBB 的分子和生化机制的广泛使用的体外模型系统^[26]。在本研究中, 细胞摄取结果显示, 当考察时间一致时, bEnd.3 细胞摄取 3 组溶液体系的荧光强度为 OX26-C6-NLC > C6-NLC > C6-SL。这些结果初步说明 OX26 修饰的纳米结构脂质载体具有改善药物血脑屏障通透性和脑部生物利用度的巨大潜力。然而, 需要进一步的在

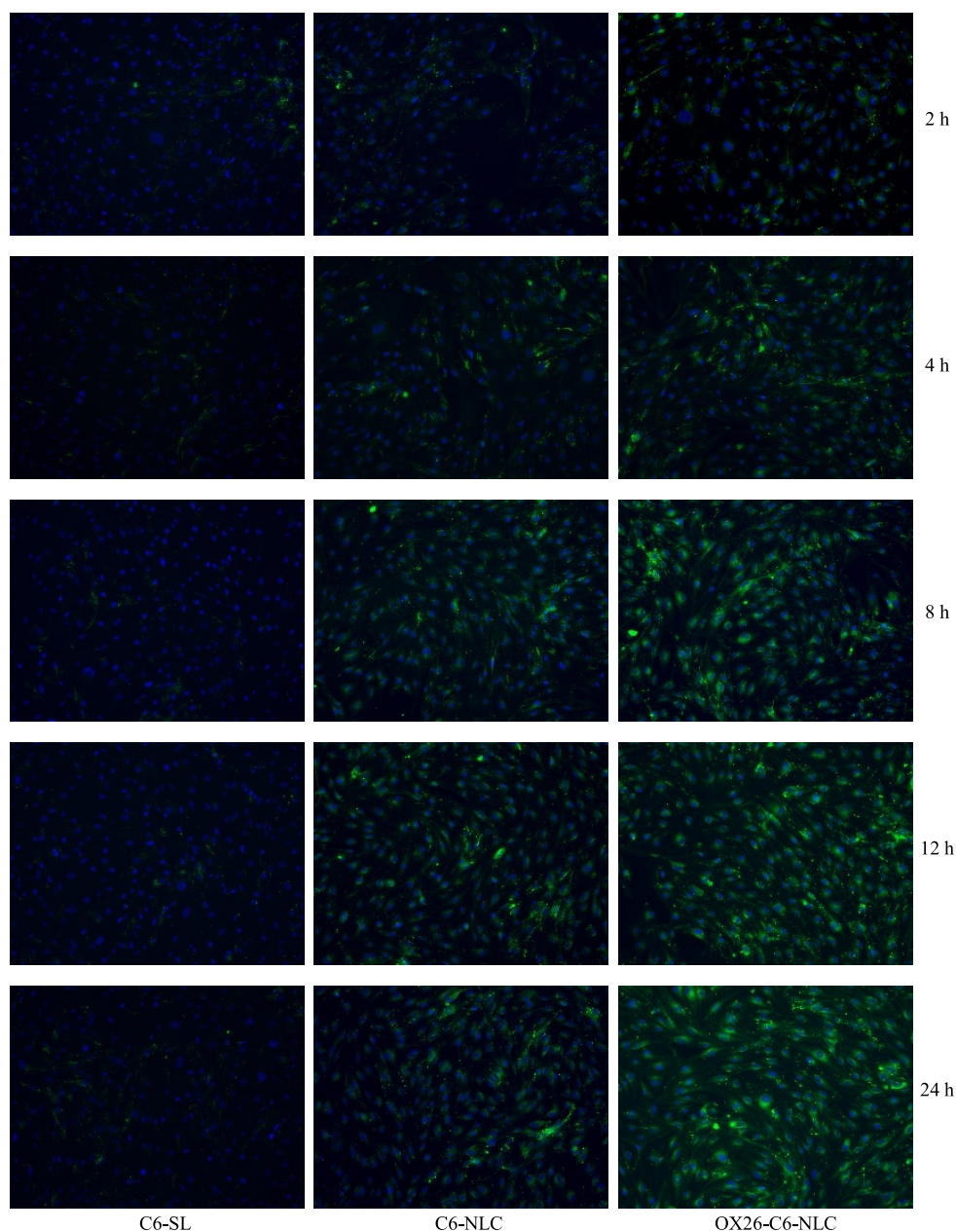


图 4 不同时间段内 bEnd.3 细胞对载 C6 制剂的摄取情况

Fig. 4 Cellular uptake of C6-loaded formulations in bEnd.3 cells at different time intervals

体研究来阐明或证实该药物递送系统用于脑靶向的可行性。

参考文献

- [1] 刘平, 隗义双, 周乾坤, 等. 黄芩苷对实验性脑出血大鼠脑损伤的保护作用 [J]. 中国中医药信息杂志, 2008, 15(4): 34-35.
- [2] 高永红, 袁拯忠, 牛福玲, 等. 清开灵有效组分对体外缺血再灌注损伤大鼠脑微血管内皮细胞的保护作用 [J]. 辽宁中医杂志, 2008, 35(7): 1104-1106.
- [3] 鞠爱春, 耿诗涵, 杨欣鹏, 等. 丹酚酸 B 鼻腔给药对脑缺血损伤大鼠学习记忆能力及神经再生的影响 [J]. 中

草药, 2017, 48(12): 2481-2485.

- [4] Ge Q F, Hu X, Ma Z Q, *et al.* Baicalin attenuates oxygen-glucose deprivation induced injury via inhibiting NMDA receptor-mediated 5-lipoxygenase activation in rat cortical neurons [J]. *Pharmacol Res*, 2007, 55(2): 148-157.
- [5] Liu L Y, Wei E Q, Zhao Y M, *et al.* Protective effects of baicalin on oxygen/glucose deprivation-and NMDA induced injuries in rat hippocampal slices [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2005, 57(8): 1019-1026.
- [6] 赵旭, 范英昌, 杜云. 丹酚酸 B 对局灶性脑缺血/再灌注大鼠血清超氧化物歧化酶活力和丙二醛含量的

- 影响 [J]. 天津中医药, 2008, 25(1): 63-65.
- [7] 李 琴, 韩力培, 李泽慧, 等. 丹酚酸 B 通过抑制 MAPK 通路减轻大鼠脑缺血再灌注引起的血脑屏障损伤 [J]. 药理学报, 2010, 45(12): 1485-1490.
- [8] 庄鹏伟. 丹酚酸 B、黄芩苷及其配伍对成体神经再生的影响及机制研究 [D]. 天津: 天津中医药大学, 2016.
- [9] Zhuang P W, Zhang Y J, Cui G Z, *et al.* Direct stimulation of adult neural stem/progenitor cells *in vitro* and neurogenesis *in vivo* by salvianolic acid B [J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e35636.
- [10] Li Y, Zhuang P W, Zhang Y J, *et al.* Baicalin promotes neuronal differentiation of neural stem/progenitor cells through modulating p-stat3 and bHLH family protein expression [J]. *Brain Res*, 2012, 1429: 36-42.
- [11] 潘 弘, 刘 敏, 陆伟跃. 脑靶向空间稳定免疫脂质体研究进展 [J]. 药学进展, 2003, 27(3): 131-134.
- [12] Garcia-Garcia E, Andrieux K, Gil S, *et al.* Colloidal carriers and blood-brain barrier (BBB) translocation: A way to deliver drugs to the brain [J]. *Int J Pharm*, 2005, 298(2): 274-292.
- [13] 庞建云, 沈成英, 周 敏, 等. 异补骨脂素纳米结构脂质载体的体外溶出及其抗白癜风活性研究 [J]. 中草药, 2018, 49(8): 1796-1801.
- [14] 于 莲, 刘 洋, 杨金儒, 等. 葛根素纳米结构脂质载体的制备及理化性质考察 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(10): 7-11.
- [15] 陈振振, 陆 洋, 杜守颖. 脑靶向制剂的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(19): 307-310.
- [16] 刘碧林, 石明芯, 朱照静, 等. 星点设计-效应面法优化姜黄素正负离子纳米结构脂质载体处方 [J]. 中草药, 2016, 47(19): 3401-3406.
- [17] 蒋新国. 脑靶向递药系统的研究进展 [J]. 复旦学报: 医学版, 2012, 39(5): 441-448.
- [18] Pang Z Q, Lu W, Gao H L, *et al.* Preparation and brain delivery property of biodegradable polymersomes conjugated with OX26 [J]. *J Control Release*, 2008, 128(2): 120-127.
- [19] Huwyler J, Wu D, Pardridge W M. Brain drug delivery of small molecules using immunoliposomes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(24): 14164-14169.
- [20] Liu L H, Guo K, Lu J, *et al.* Biologically active core/shell nanoparticlesself-assembledfrom cholesterol-terminated PEG-TAT for drug deliveryacross the blood-brain barrier [J]. *Biomaterials*, 2008, 29(10): 1509-1517.
- [21] Kanayama N, Takarada T, Kimura A, *et al.* Poly (ethyleneglycol)-oligode-oxyribonucleotideblock copolymers for affinity capillaryelectrophoreticseparation of single-stranded DNAs with a single-basedifference [J]. *React Funct Polym*, 2007, 67: 1373-1380.
- [22] Liu Z D, Zhao H N, Shu L X, *et al.* Preparation and evaluation of baicalin-loaded cationic solid lipidnanoparticles conjugated with OX₂₆ for improved delivery across the BBB [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2013, 41(3): 353-361.
- [23] Gao K P, Jiang X G. Influence of particle size on transport of methotrexateacross blood brain barrier by polysorbate 80-coatedpolybutylcyanoacrylate nanoparticles [J]. *Int J Pharm*, 2006, 310(2006): 213-219.
- [24] Monsalve Y, Tosi G, Ruozi B, *et al.* PEG-g-chitosan nanoparticlesfunctionalized with the monoclonalantibody OX26 for brain drug targeting [J]. *Nanomedicine (Lond)*, 2015, 10(11): 1735-1750.
- [25] Clark A J, Davis M E. Increased brain uptake of targeted nanoparticles by adding an acid-cleavable linkage between transferrin and the nanoparticle core [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(40): 12486-12491.
- [26] Brown R C, Morris A P, O'Neil R G. Tight junction protein expression and barrier properties of immortalized mouse brain microvessel endothelial cells [J]. *Brain Res*, 2007, 1130(1): 17-30.