

基于“鼻-脑”通路细胞模型组探索相对分子质量及粒径因素对药物制剂经鼻入脑的影响

杨 冰, 陆 洋, 杜守颖*, 李鹏跃*, 张 翼

北京中医药大学, 北京 102488

摘要: 目的 基于“鼻-脑”通路体外细胞模型, 探索药物制剂经鼻入脑的影响因素。方法 将 Calu-3 细胞与嗅神经鞘细胞(OECs)细胞共培养, 构建“鼻-脑”通路细胞模型组。以荧光素异硫氰酸酯右旋葡萄糖苷(FD)和荧光纳米银粒子(AgNPs)为模型药物, 探索药物相对分子质量(M_w)因素及制剂粒径因素对药物经鼻入脑的影响。结果 FD 随 M_w 增大其跨细胞单层膜转运表观渗透系数(P_{app})减小; OECs 对不同 M_w FD 的摄取在 90 min 后摄取量趋于饱和, 随其 M_w 增大, 相同摄取时间 OECs 摄取量有明显下降趋势。不同粒径荧光 AgNPs 在“鼻-脑”多通路细胞模型组 Calu-3 单层的 P_{app} 随纳米粒的粒径增大而减小, 粒径 <40 nm, 其在 Calu-3 的转运特性表现为中等吸收 ($1 \times 10^{-6} < P_{app} < 10 \times 10^{-6}$), 粒径 >60 nm, 其转运特性为难吸收 ($P_{app} < 1 \times 10^{-6}$); OECs 对不同粒径荧光 AgNPs 的摄取在 60 min 趋于饱和且随其粒径增大, 相同摄取时间 OECs 摄取量有明显下降趋势。结论 药物 M_w 大小及纳米制剂的粒径对于药物经鼻转运入脑具有重要影响, $M_w < 4\ 000$ 的药物, 粒径 <40 nm 的纳米粒子具有更好转运和摄取特性。

关键词: “鼻-脑”多通路细胞模型组; 药物转运与摄取; OECs 细胞; Calu-3 细胞; 荧光素异硫氰酸酯右旋葡萄糖苷; 荧光纳米银

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2020)22-5748-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.22.011

Influences of molecular weight and particle size to intranasal drug delivery based on cell model of “nose-brain”

YANG Bing, LU Yang, DU Shou-ying, LI Peng-yue, ZHANG Yi

Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

Abstract: Objective To explore the factors affecting the nasal entry of the pharmaceutical preparations into the brain based on the established model of the “nose-brain” pathway *in vitro*. **Methods** Calu-3 cells and OECs cells were co-cultured to construct a “nasal-brain” pathway cell model group. Taking fluorescein isothiocyanate dextran (FD) and fluorescent silver nanoparticles (AgNPs) as model drugs, the effects of drug molecular weight (M_w) factors and preparation particle size factors on the drug transnasal transport into the brain were explored. **Results** The apparent permeability coefficient (P_{app}) of transcellular monolayer transport of FD decreased with the increase of molecular weight. The uptake of fluorescein isothiocyanate dextran with different molecular weights by OECs tended to be saturated after 90 min. As the molecular weight of FD increased, the uptake of OECs decreased significantly during the same uptake time. The apparent permeability coefficient of fluorescent AgNPs with different particle sizes in the “nose-brain” multi-channel cell model group of calu-3 monolayer decreased with the increase of the particle size of the nanoparticles. When the particle size was less than 40 nm, its transport characteristics in Calu-3 were shown as medium absorption ($1 \times 10^{-6} < P_{app} < 10 \times 10^{-6}$), and when the particle size of nanoparticles was more than 60 nm, its transport characteristics were shown as difficult to absorb ($P_{app} < 1 \times 10^{-6}$). The uptake of OECs of fluorescent AgNPs with different particle sizes tended to be saturated at 60 min, and with the increase of the particle size of fluorescent AgNPs, the uptake of OECs at the same uptake time showed a significant decline. **Conclusions** The M_w of the drug and the particle size of the nano-formulation have an important influence on the nasal transport of the drug into the brain.

收稿日期: 2020-05-19

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81803738); 中央高校基本科研业务费专项资金资助 (2020-JYB-ZDGG-034); 中央高校基本科研业务费专项资金资助 (2018-JYBZZ-JS019)

作者简介: 杨 冰 (1989—), 女, 博士研究生, 主要从事中药新剂型与新技术研究。E-mail: zypaopao@yeah.net

***通信作者** 杜守颖, 博士, 教授, 主要从事中药新剂型与新技术研究。Tel: (010)53912123 E-mail: dushouying@263.net

李鹏跃, 博士, 副教授, 主要从事中药新剂型与新技术研究。Tel: (010)53912123 E-mail: pengyuelee@126.com

Drugs with a molecular weight of < 4 000 and nano particles with a particle size of less than 40 nm have better transport and uptake characteristics.

Key words: “nose-brain” multi-pathway cell model; drug transport and uptake; OECs cells; Calu-3 cells; fluorescein isothiocyanate dextran; fluorescent silver nanoparticles

中医学认为,鼻为清窍,其气上通于脑;又鼻窍通过督脉和足太阳膀胱经与脑直接相通,故药物经鼻给药可治疗脑部疾病。现代解剖研究认为,药物在鼻内可经嗅区黏膜上皮以细胞转运和经嗅神经摄取并通过神经细胞轴索传递入脑。其中嗅神经通路可以绕过血脑屏障,实现快速高效递药入脑,是鼻腔给药脑靶向的关键所在^[1-2]。药物跨鼻黏膜上皮细胞,吸收进入血液循环,进而穿过血脑屏障进入脑组织,是鼻腔给药靶向中枢神经系统的主要间接途径。药物经鼻腔给药后,药物的入脑过程取决于上述两种途径入脑的速度及程度^[3-4]。

现有的“鼻-脑”递送动物模型(大鼠、犬^[5-6]、兔^[7]、猴^[8])主要为在体鼻模型灌流模型和体内药动学模型,然而上述动物鼻腔结构与人类相比存在较大差异,且对于药物、制剂经鼻入脑机理的阐释不够直观^[9-12]。课题组前期基于鼻脑通路生理特点构建了体外细胞模型组^[13]。以嗅神经鞘细胞(OECs)模拟嗅神经细胞,以 Calu-3 细胞模拟鼻黏膜上皮细胞,采用共培养方式构建了鼻-脑通路细胞模型组。

荧光素异硫氰酸酯右旋葡萄糖苷(fluorescein isothiocyanate-dextran, FD)和纳米银(silver nanoparticles, AgNPs)是常用的模型药物。FD 是由异硫氰酸荧光素偶联葡聚糖形成的一种标记物,是由不同长度的葡萄糖分子链构成的被标记的多糖,可根据葡聚糖链的长度来调整相对分子质量(M_w),模拟不同 M_w 的药物。AgNPs 比表面积较大,最初被应用于催化作用,由于其具有良好的生物相容性,是目前医学领域应用最为广泛的金属纳米材料^[14-15]。AgNPs 粒径可控,分散性能好,可用于模拟不同粒径尺寸的纳米制剂。

本研究拟基于前期构建的细胞模型,以不同 M_w [FD4 (4 000)、FD10 (10 000)、FD20 (20 000)、FD40 (40 000)] FD 和不同粒径(20、40、60、80、100 nm)荧光 AgNPs 为模型药物研究药物 M_w 因素及纳米制剂粒径因素对药物经鼻转运入脑的影响,对于经鼻脑靶向递药系统的设计具有积极的意义。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Series II 型二氧化碳培养箱、Revco PLUS 型

-80 °C 低温冰箱,美国 Thermo 公司;CKX-41 型倒置显微镜,日本 Olympus 公司;WSZ600 高级体视显微镜,广州微域光学仪器有限公司;Heal Force 生物安全柜,上海力华科技公司;FACSseq 流式细胞分选仪,美国 BD 公司;Biohit 微量移液器,芬兰百得公司;BS224S 型电子天平,德国 Sartorius 公司;TDL80-2B 型台式离心机,上海安亭科学仪器厂;SIM-F124 型制冰机,日本 SANYO 公司;RiOs-DI3UV 型纯水器,美国 Millipore 公司;307057 型空气浴震荡摇床,江苏太仓豪诚实验仪器制造有限公司;30、100、200 目细胞筛网,南京优尼生物科技有限公司。

1.2 试药

胎牛血清(FBS,澳洲血源,美国 Gibco 公司);DMEM/F12 培养基(美国 Gibco 公司);PBS 缓冲液(pH 7.2~7.4);青霉素-链霉素(双抗,含 100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素)、牛垂体提取物(BPE)、非必需氨基酸细胞添加因子(non-essential amino acids, NEAA)、0.25%胰蛋白酶(含 1% EDTA),美国 Gibco 公司;XIV 型胰酶、L-型多聚赖氨酸(PLL)、Forskolin、FD (FD4、FD10、FD20、FD40)对照品、(20、40、60、80、100 nm)荧光 AgNPs,美国 Sigma 公司;Anti-P75,美国 Abcam 公司;Calu-3 细胞,购于中国协和医科大学。

1.3 实验动物

Wistar 大鼠,不区分性别,24 h 内乳鼠,北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号 SCXK(京)2016-0006。

2 方法

2.1 “鼻-脑”多通路细胞模型组合的建立

取乳鼠处死,分离嗅球,以酶消化法收集 OECs,并采用 Anti-P75 特异性结合 OECs 神经因子受体,以流式分选技术对 OECs 细胞进行纯化与鉴定(激发波长 488 nm,发射波长 535 nm)^[12]。将 OECs 细胞以 1×10^6 个/mL 的密度接种于多聚赖氨酸包被的 12 孔板中,DMEM/F12(含 10% FBS, 1%双抗, 2 μ mol/L forskolin/L, 20 ng/mL BPE)培养 7 d(可见大量呈双极和三级状 OECs)。将 Calu-3 细胞接种于翻转的 Transwell 悬挂小室的底部,4 h

后细胞贴壁，正置 Transwell 小室，悬挂于 12 孔板中培养至汇合成细胞单层并形成紧密连接（跨膜电阻值 $TEER > 700 \Omega \cdot cm^2$ ），弃去直接接触细胞单层侧的培养基，气液培养 24 h。将接种 Calu-3 细胞单层的 Transwell 小室悬挂于接种 OECs 细胞的 12 孔板中组合构成“鼻-脑”多通路细胞模型组（图 1），用于后续试验。

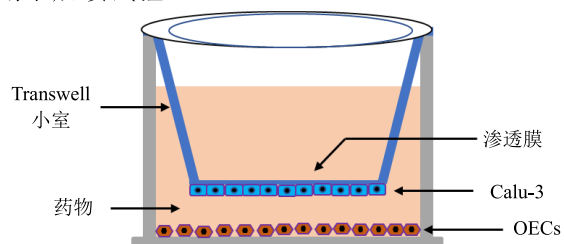


图 1 OECs、Calu-3 共培养模拟“鼻-脑”多通路体外细胞模型

Fig. 1 Co-culture of OECs and Calu-3 to simulate “nose-brain” multi-pathway cell model *in vitro*

2.2 含量测定方法的建立

2.2.1 FD (FD4、FD10、FD20、FD40) 含量测定标准曲线的建立 分别精确称取适量 FD4、FD10、FD20、FD40 对照品，用空白 HBSS 溶液配制成如下质量浓度溶液（FD4：62.625、50.100、25.050、12.525、10.020、1.002 $\mu g/mL$ ；FD10：9.400、4.700、2.350、0.940、0.470、0.235 $\mu g/mL$ ；FD20：9.800、4.900、2.450、0.980、0.490、0.245 $\mu g/mL$ ；FD40：10.160、5.080、2.540、1.016、0.508、0.254 $\mu g/mL$ ），分别移取 100 μL 于 96 孔板荧光酶标仪测定吸光度 (I)，激发波长 485 nm，发射波长 525 nm。以质量浓度为横坐标 (X)， I 值为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线，进行线性回归，得线性回归方程见表 1，结果显示不同 M_w FD 的质量浓度和 I 值在各自质量浓度范围内线性关系良好。

测定时，每次获得样品后随即进行检测，每次样品检测均随行标准曲线。

2.2.2 不同粒径 (20~100 nm) 荧光 AgNPs 含量测定标准曲线的建立 分别精确移取 1 mg/mL 不同粒

径的荧光 AgNPs 混悬液，用空白 HBSS 溶液稀释成如下质量浓度溶液 0.125、0.100、0.050、0.040、0.025、0.020 $\mu g/mL$ ，分别移取 100 μL 于 96 孔板荧光酶标仪测定 I 值，激发波长 488 nm，发射波长 535 nm。以质量浓度为横坐标 (X)， I 值为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线，进行线性回归，得线性回归方程见表 2。结果表明 20、40、60、80、100 nm 荧光 AgNPs 的质量浓度和 I 值在各自质量浓度范围内线性关系良好。

测定时，每次获得样品后随即进行检测，每次样品检测均随行标准曲线。

表 2 不同粒径荧光 AgNPs 标准曲线

Table 2 Standard curves of fluorescent AgNPs with different particle sizes

粒径/nm	标准曲线	R^2
20	$Y=401\ 780 X+4\ 379.9$	0.999 1
40	$Y=630\ 276 X+8\ 041.3$	0.999 5
60	$Y=2\ 382\ 222 X+9\ 190.5$	0.999 9
80	$Y=3\ 577\ 861 X+12\ 549.6$	0.999 3
100	$Y=663\ 575 X+5\ 818.6$	0.999 3

2.3 不同 M_w FD 在“鼻-脑”多通路细胞模型组的吸收

考察不同 M_w FD (FD4、FD10、FD20、FD40) 在“鼻-脑”多通路细胞模型组合转运和摄取。

实验前处理：以 37 $^{\circ}C$ 空白转运介质 HBSS 缓冲液冲洗细胞单层 3 次，冲洗时先吸弃上层培养基 (HBSS)，再吸弃下层培养基 (HBSS)，加液时先将 HBSS 加入下层，再加入上层。将细胞单层于 37 $^{\circ}C$ 空白转运介质 HBSS 缓冲液中预孵育 20 min。

细胞单层转运研究：于基底侧室给予 500 $\mu g/mL$ FD 的 HBSS 溶液 1.5 mL 作为供给池，同时接触 OECs 和 Calu-3 细胞单层，于 AP 侧给予空白 HBSS 液 0.5 mL，作为接收池。在设定时间点，于实验开始后 30、60、90、120、150、180 min 时，从接收池中取样，随即加入相同体积的新鲜转运介质。取样 100 μL 于 96 孔板荧光酶标仪测定吸光度 (I)，激发波长 485 nm，发射波长 525 nm，计算含量，绘制药物的累积透过量 (Q)-时间 (t) 曲线，计算表观渗透系数 [P_{app} , $P_{app}=dQ/(dtCA)$]，式中 dQ/dt 为药物转运速率， A 为聚碳酸酯膜面积， C 为药物在供给池中的初始质量浓度]。

OECs 摄取研究：在设定时间点，于实验给药开始后 30、60、90、120、150、180 min 时，弃去

表 1 不同 M_w FD 标准曲线

Table 1 Standard curves of FD with different M_w

FD	标准曲线	R^2
FD4	$Y=513.30 X+618.24$	0.999 8
FD10	$Y=862.68 X+118.29$	0.999 8
FD20	$Y=596.50 X+59.51$	0.999 9
FD40	$Y=689.62 X+62.08$	0.999 8

药液, 加入 4 ℃ 的 PBS 1 mL 终止摄取, 快速清洗 3 遍细胞单分子层。每皿加入 200 μ L RIPA 细胞裂解液, 4 ℃ 预孵育 30 min 至裂解完全得细胞悬液。取 150 μ L 细胞悬液加入 500 μ L 甲醇, 涡旋混合 1 min 沉淀蛋白, 4 ℃ 15 000 r/min 离心 10 min, 取上清 100 μ L 于 96 孔板荧光酶标仪检测 I 值, 测定 FD 质量浓度; 另取 20 μ L 细胞裂解液于 96 孔酶标板, BCA 法测定蛋白含量。FD 细胞摄取量以每克蛋白中所含药量表示。

2.4 不同粒径荧光 AgNPs 在“鼻-脑”通路细胞模型组合的吸收

考察不同粒径 (20、40、60、80、100 nm) 荧光 AgNPs 在“鼻-脑”多通路细胞模型组合转运和摄取。

细胞单层转运研究: 于基底侧室给予 20 μ g/mL 不同粒径 (20、40、60、80、100 nm) 荧光 AgNPs 的 HBSS 溶液 1.5 mL 作为供给池, 同时接触 OECs 和 Calu-3 细胞单层, 于 AP 侧给予空白 HBSS 液 0.5 mL, 作为接收池。取样及检测操作同前, 激发波长 488 nm, 发射波长 535 nm。

OECs 摄取研究操作同前。

3 结果

3.1 不同 M_w FD 在“鼻-脑”多通路细胞模型组中的转运与摄取

3.1.1 细胞单层转运研究 不同 M_w FD (FD4、FD10、FD20、FD40) 在“鼻-脑”多通路细胞模型组合 Calu-3 单层的转运均表现为极难吸收, 结果见表 3。结果显示, FD4~FD40 (M_w 4 000~40 000) 随 M_w 增大其跨膜转运表观渗透系数 (P_{app}) 减小, 且均小于 1.0×10^{-7} cm/s, 提示 M_w 4 000 以上水溶性大分子经鼻给药难以通过跨细胞转运和细胞旁路途径经鼻吸收。

表 3 不同 M_w FD 在“鼻-脑”多通路细胞模型组 (Calu-3 单层) 转运结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Transport results of FDS with different molecular weights in “nose-brain” multi-pathway cell model group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

FD	$P_{app}/(\times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1})$
FD4	0.039 2 $\pm$ 0.003 7
FD10	0.016 4 $\pm$ 0.001 7*
FD20	0.011 6 $\pm$ 0.000 8*
FD40	0.005 6 $\pm$ 0.000 5*

与 FD4 组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs FD4 group

3.1.2 OECs 摄取研究 不同 M_w FD (FD4、FD10、FD20、FD40) 在“鼻-脑”多通路细胞模型组合 OECs 的摄取结果见图 2。OECs 对不同 M_w FD 的摄取在 0~90 min 均表现出随摄取时间延长摄取量增加, 90 min 后, 药物摄取量趋于饱和。由图 2 可知, 与 FD4 组比较, 在相同摄取时间 OECs 对不同 M_w FD 的摄取量有显著性差异 ($P < 0.05$), 且随着 M_w 的增大呈明显下降趋势, 提示嗅神经鞘细胞对水溶性大分子的摄取能力随相对分子质量增加而降低。 M_w 因素对于药物经鼻转运入脑具有重要影响作用。

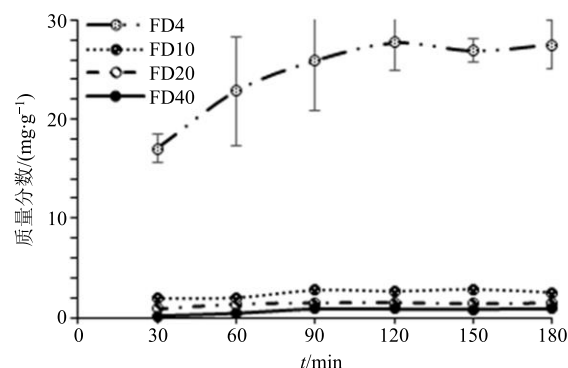


图 2 OECs 对不同 M_w FD 的摄取

Fig. 2 OECs uptake of FD with different M_w

3.2 不同粒径荧光 AgNPs 在“鼻-脑”多通路细胞模型组中的转运与摄取

3.2.1 细胞单层转运研究 不同粒径 (20、40、60、80、100 nm) 荧光 AgNPs 在“鼻-脑”多通路细胞模型组合 Calu-3 单层的转运 P_{app} , 随纳米粒的粒径增大而减小, 具体结果见表 4。当纳米粒粒径小于 40 nm, 其在 Calu-3 的转运特性表现为中等吸收 ($1.0 \times 10^{-6} < P_{app} < 1.0 \times 10^{-5}$), 纳米粒粒径大于 60 nm, 其转运特性表现为难吸收 ($P_{app} < 1 \times 10^{-6}$)。

3.2.2 OECs 细胞摄取研究 不同粒径 (20、40、60、80、100 nm) 荧光 AgNPs 在“鼻-脑”多通路表 4 不同粒径荧光 AgNPs 在“鼻-脑”多通路细胞模型组 (Calu-3 单层) 合转运结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Transport results of fluorescent AgNPs in “nose-brain” multi-pathway cell model group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

粒径/nm	$P_{app}/(\times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1})$
20	3.574 0 $\pm$ 0.119 0
40	1.983 0 $\pm$ 0.035 8*
60	0.455 0 $\pm$ 0.015 8*
80	0.328 0 $\pm$ 0.021 6*
100	0.290 0 $\pm$ 0.004 4*

与 20 nm 组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs 20 nm group

细胞模型组合 OECs 的摄取结果见图 3。OECs 对不同粒径荧光 AgNPs 的摄取在 0~60 min 均表现出随摄取时间延长摄取量增加, 60 min 后, 纳米粒摄取量趋于饱和。由图 3 可知, 与 20 nm 组比较, 相同摄取时间内 OECs 对不同粒径纳米粒的摄取量有显著性差异 ($P < 0.05$), 且随着粒子粒径增大呈明显下降趋势。

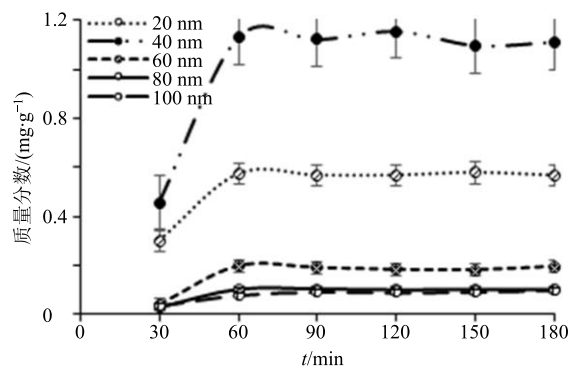


图 3 OECs 对不同粒径荧光 AgNPs 的摄取

Fig. 3 OECs uptake of fluorescent AgNPs with different particle sizes

由不同粒径 (20、40、60、80、100 nm) 荧光 AgNPs 在“鼻-脑”多通路细胞模型组合转运和摄取结果可知, 鼻腔内药物吸收与纳米制剂的粒径密切相关, 粒径在 40 nm 以内的纳米粒更易于吸收, 大粒径纳米粒不易吸收。纳米制剂主要通过膜动转运的方式进行吸收, 其吸收程度与速度随纳米粒粒径增大而降低。

4 讨论

构建细胞模型过程中, 本课题以流式分选技术纯化 OECs, 质量分数高达 99.7%, 优于常应用的差速贴壁法^[16], 有丝分裂抑制剂法^[17]和免疫亲和吸附法^[18]等纯化方法。本实验中所构建的细胞模型是由神经细胞模型和黏膜细胞模型组合而成, 二者分别建立, 然后通过 Transwell 培养板组合。本模型为实验团队首次创立, 相关标准有待进一步深入研究后逐步完善。目前初步设定 OECs 细胞纯度达到 95% 以上, Calu-3 细胞单层跨膜电阻值达到 700 Ω 以上即认为可以组合为鼻-脑多通路模型组。

相对于传统动物黏膜模型而言, 本模型具有一定的优势, 但也存在一定的不足: ①由于目前没有来源于鼻腔黏膜的细胞系, 本研究以 Calu-3 细胞 (人肺腺癌细胞) 模拟鼻黏膜细胞。虽然 Calu-3 细胞也属于上皮细胞, 但若采用鼻黏膜来源的上皮细胞构建模型, 将能够更大限度的模拟鼻-脑通路。②鼻

腔中嗅神经与黏膜细胞共生, 嗅神经由嗅鞘包裹; 由于神经细胞不可传代, 在本研究中以嗅鞘细胞模拟药物经神经吸收的入脑通路, 如能对嗅神经元进行纯化, 构建模型, 则更符合鼻腔生理特点; 但因嗅神经元不可传代, 每次实验均需取材培养, 时间成本、经济成本耗费巨大。

药物的吸收过程及体内行为是由物理药剂学因素和生物药剂学因素综合作用的结果。上述因素具体包括药物的理化因素 (如 M_w 、pKa、油水分配系数等)、剂型因素 (如纳米制剂粒径、辅料种类等)、机体因素 (如生理、病理等)、配伍因素 (如中药复方配伍) 等^[19-20]。通常情况下, 在研究某一因素时往往会引入多个变量, 因而所得结论不够严谨。如在研究 M_w 因素时, 若选用不同药物进行对比, 将导致多元变量同时存在, 如选用乙醇与蔗糖, 二者 M_w 不同、极性不同、药理作用不同 (乙醇本身具有一定的促透作用)。若采用模型药物或者模型制剂则更便于控制因素变量, 所得结论相对而言更为严谨。因此, 本研究在课题组前期所建立的细胞模型组的基础上, 选择模型药物 FD 和 AgNPs 对影响药物、制剂经鼻入脑的 M_w 因素、粒径因素进行了初步探索, 为大分子类药物鼻用制剂的设计与开发提供理论依据。当前研究显示 M_w 大于 400 时药物输送受其自身理化性质影响较大, M_w 大于 1 000 时药物生物利用度通常极低^[21-23]。目前, 文献研究显示经鼻递药能提高胰岛素^[24] (M_w 5 808)、神经毒素^[25] (M_w 6 951)、促红细胞生成素^[26] (M_w 34 000)、hIGF-I^[27] (M_w 7 785) 等一系列大分子药物的入脑药量^[24-26]。上述药物的跨细胞单层转运特性及细胞摄取特性尚不明确, 故本研究设计药物 M_w 为 4 000~40 000。

目前, 在大量经鼻递药研究中采用纳米制剂载药, 本研究显示, 当纳米制剂粒径在 40 nm 以下时, 其在黏膜的转运特性表现为中等吸收, 纳米粒粒径大于 60 nm 时其转运特性表现为难吸收; OECs 细胞对于 20 nm 纳米粒的摄取量约为 40 nm 组的 2 倍, 60 nm 组的 6 倍, 80 nm 组的 10 倍, 由此可知, 在制备纳米经鼻递药系统时控制粒径参数对于提高入脑药量具有重要价值。

鼻腔给药为脑病 (如肿瘤、中风等疾病) 的治疗提供了一种具有前景的给药方式, 通常认为这一给药方式为递送大分子类药物及其纳米制剂入脑带来了希望^[28-29], 然而由于目前鼻-脑通路体外模型的缺乏, 在探索药物及制剂经不同途径入脑方面的研

究还不够直观,对于药物制剂经鼻-脑通路入脑影响因素的研究尚不够深入。本研究中设计的 OECs 细胞与 Calu-3 细胞间接共培养模型可以在一定程度上模拟在体情况下的鼻腔给药,实现药物同时与黏膜上皮细胞和神经细胞的接触,黏膜转运与神经细胞摄取的同时进行,在经鼻递药制剂的研发、评价及预测方面极具应用潜力。

参考文献

- [1] Altner H, Altner-Kolnberger I. Freeze-fracture and tracer experiments on the permeability of the zonulae occludentes in the olfactory mucosa of vertebrates [J]. *Cell Tissue Res*, 1974, 154(1): 51-59.
- [2] Mittal D, Ali A, Md S, *et al*. Insights into direct nose to brain delivery: Current status and future perspective [J]. *Drug Deliv*, 2014, 21(2): 75-86.
- [3] Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Sam H, *et al*. Epithelial and endothelial barriers in the olfactory region of the nasal cavity of the rat [J]. *Histochem Cell Biol*, 2008, 130(1): 127-140.
- [4] Buchner K, Seitz-Tutter D, Schönitzer K, *et al*. A quantitative study of anterograde and retrograde axonal transport of exogenous proteins in olfactory nerve C-fibers [J]. *Neuroscience*, 1987, 22(2): 697-707.
- [5] 蓝庭剑,周祖玉,查忠斌,等. 几种血管活性物质对狗鼻腔血循环的影响 [J]. *四川生理科学杂志*, 1991, 13(Z1): 32.
- [6] 乔建忠,袁淑兰,张振清,等. 格拉司琼鼻粉剂在比格犬体内的药动学及生物利用度研究 [J]. *中国药理学杂志*, 2005, 40(16): 1249-1251.
- [7] 姚宗玲,陆洋,杜守颖,等. 醒脑静滴鼻液中栀子苷的家兔体内药动学研究 [J]. *中国中药杂志*, 2010, 35(14): 1871-1873.
- [8] 高虹,张丽兰,魏强,等. 重组人干扰素 α -2b 鼻腔喷雾剂预防治疗恒河猴感染 SARS-CoV 的试验研究 [J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2005, 19(3): 207-210.
- [9] 包强,蔡鑫君,李范珠. 不同粒径神经毒素-I 纳米粒大鼠鼻腔给药脑药动学研究 [J]. *中国药理学通报*, 2010, 26(6): 731-735.
- [10] 森林,吴瑾瑾,戴文芸,等. 灯盏乙素麻醉大鼠鼻腔给药脑内靶向性评价 [J]. *中国中药杂志*, 2010, 35(18): 2453-2456.
- [11] 张海燕,陈晓燕,万娜,等. 壳聚糖修饰栀子苷聚乳酸-羟基乙酸纳米粒的制备及经鼻入脑的靶向性 [J]. *中国新药与临床杂志*, 2010, 29(6): 448-453.
- [12] 杜秋,杜守颖,李鹏跃,等. 丹酚酸 B 大鼠在体鼻循环吸收研究 [J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(2): 303-308.
- [13] 杨冰. 构建“鼻-脑”多通路细胞模型组合及通窍散瘀方鼻用微乳吸收转运特性和机理研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.
- [14] Nowack B, Krug H F, Height M. 120 years of nanosilver history: Implications for policy makers [J]. *Environ Sci Technol*, 2011, 45(4): 1177-1183.
- [15] Esteban-Tejeda L, Malpartida F, Esteban-Cubillo A, *et al*. The antibacterial and antifungal activity of a soda-lime glass containing silver nanoparticles [J]. *Nanotechnology*, 2009, 20(8): 085103.
- [16] 杨浩,王春婷,程华玲,等. 嗅神经鞘细胞的培养纯化及体外生长特性 [J]. *细胞生物学杂志*, 2001(1): 43-47.
- [17] 杨浩,鞠冬阳,李静雯,等. 成年大鼠嗅神经鞘细胞纯化培养的研究 [J]. *神经解剖学杂志*, 2005, 21(2): 180-184.
- [18] Pavan B, Buzzi M, Ginanni-Corradini F, *et al*. Influence of oxytocin on prostaglandin E2, intracellular calcium, and cyclic adenosine monophosphate in human amnion-derived (WISH) cells [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2000, 183(1): 76-82.
- [19] 徐攀,杜守颖,黎迎,等. 经鼻脑靶向给药系统研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2013, 28(2): 247-251.
- [20] 梁会敏,刘哲鹏,刘芸雅. 脑靶向鼻腔纳米给药系统的研究进展 [J]. *生物医学工程学进展*, 2019, 40(4): 206-210.
- [21] Pardridge W M. Blood-brain barrier endogenous transporters as therapeutic targets: A new model for small molecule CNS drug discovery [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2015, 19(8): 1059-1072.
- [22] Misra A, Kher G. Drug delivery systems from nose to brain [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2012, 13(12): 2355-2379.
- [23] Bahadur S, Pathak K. Physicochemical and physiological considerations for efficient nose-to-brain targeting [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2012, 9(1): 19-31.
- [24] Yan L, Wang H Y, Jiang Y F, *et al*. Cell-penetrating peptide-modified PLGA nanoparticles for enhanced nose-to-brain macromolecular delivery [J]. *Macromol Res*, 2013, 21(4): 435-441.
- [25] 朱潇冉,柳琳,钱丽梅,等. 双修饰眼镜蛇神经毒素脂质体的制备及其经鼻黏膜给药后在大鼠脑内药动学研究 [J]. *中国药理学杂志*, 2016, 51(10): 815-820.
- [26] Malerba F, Paoletti F, Capsoni S, *et al*. Intranasal delivery of therapeutic proteins for neurological diseases [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2011, 8(10): 1277-1296.
- [27] Gartzandia O, Herran E, Pedraz J L, *et al*. Chitosan coated nanostructured lipid carriers for brain delivery of proteins by intranasal administration [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2015, 134: 304-313.
- [28] 孟甜. 鼻腔滴注脂质体 Tat-haFGF₁₄₋₁₅₄ 治疗 APP/PS1 小鼠阿尔茨海默病及其作用机制研究 [D]. 广州: 暨南大学, 2017.
- [29] 魏家保. 环维黄杨星 D 纳米粒的制备与脑靶向性评价 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2016.