

# 不同粒径神经毒素 - 纳米粒大鼠鼻腔给药脑药动力学研究

包 强, 蔡鑫君, 李范珠

(浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053)

中国图书分类号: R-332; R 322.81; R 452; R 969.1; R 977.6; R 996.3

文献标识码: A 文章编号: 1001-1978(2010)06-0731-05

**摘要:**目的 制备不同粒径甲基化聚乙二醇 (methylated-polyethyleneglycol, Me-PEG) 修饰的神经毒素 - (neurotoxin, NT-) 聚乳酸 (polylactic acid, PLA) 纳米粒 (NT- MePEG-PLA-NP, NT- NP), 并考察不同粒径 NT- NP 大鼠鼻腔给药后脑药动力学特征。方法 以聚乙二醇单甲醚聚乳酸共聚物 (MePEG-PLA) 为纳米材料, 采用复乳 - 溶剂挥发法制备 NT- NP。以尾静脉注射 NT- NP 为对照组, 4 组不同粒径 NT- NP 大鼠鼻腔给药, 运用脑微透析取样技术分析 NT- 在大鼠中脑导水管周围灰质 (periaqueductal gray, PAG) 部位浓度的经时变化。结果 不同粒径的 NT- NP 呈圆形或类圆形, 大小均匀。大鼠鼻腔给药后小于 100 nm 的 NT- NP 的  $AUC_{(0-6)}$  分别是 100 ~ 200、200 ~ 300 和大于 300 nm NT- NP 的 1.22、1.34、1.60 倍 ( $P < 0.05$ ), 表明粒径小于 100 nm 时 NT- 在脑靶部位的浓度明显高于其他粒径的纳米粒。结论 纳米粒的粒径对 NT- 的脑内递送有着较为明显的影响, 粒径小于 100 nm 的 NT- NP 可以明显增加 NT- 的脑内浓度, 这一结果为研究适宜粒径的 NP 用于蛋白多肽类大分子药物入脑奠定了基础。

**关键词:**神经毒素; 甲基化聚乙二醇; 粒径; 纳米粒; 大鼠; 鼻腔给药; 微透析; 脑药动力学

神经毒素 - (neurotoxin, NT-) 是从云南眼镜蛇毒液中分离得到的一种短链神经毒素的主要成分, 分子量约为 6700 u, 是一种水溶性碱性多肽, 其理化性质相对稳定<sup>[1]</sup>。NT- 具有良好的镇痛作用, 药理研究已表明<sup>[2,3]</sup>其作用部位为中枢神经系统, 临床上主要以肌肉注射方式用于控制各种疼痛及戒毒治疗, 属于非麻醉性神经抑制剂<sup>[4]</sup>。但是 NT- 分子量相对较大和大多数水溶性大分子多肽

类药物相似, 不易透过血脑屏障 (blood brain barrier, BBB) 进入大脑, 需要经过一个较长时间的给药过程才能在中枢靶部位蓄积到有效的治疗浓度, 故起效缓慢, 难以满足患者的治疗需求<sup>[5]</sup>。鼻腔给药 (intranasal administration, N) 是研究较多的有望成为多肽类药物注射给药替代途径的新型药物传输系统之一<sup>[6]</sup>, 它是一种实现多肽类药物脑内递药的有效方法, 尤其适合透过 BBB 能力低的中枢性大分子极性药物。采用生物降解型高分子材料将蛋白多肽类药物制成纳米粒 (nanoparticle, NP), 可有效保护肽类药物的活性, 并能实现缓释、控释和靶向释药目的<sup>[7]</sup>。本研究以聚乙二醇单甲醚聚乳酸共聚物 (MePEG-PLA) 为载体材料, 采用复乳 - 溶剂蒸发法制备不同粒径的 NT- NP。采用微透析取样技术结合荧光分光光度法测定脑靶部位药物的浓度, 探讨不同粒径 NT- NP 大鼠鼻腔给药后脑药动力学特征。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 药品与试剂** 神经毒素 - (中国科学院昆明动物研究所, 质量分数 > 99%, 批号 060530); 异硫氰酸荧光素神经毒素 (FITC-NT-, 杭州中泰生物技术有限公司标记, 批号 CH-05-00301); 聚乙二醇单甲醚聚乳酸共聚物 (山东岱罡生物科技有限公司, 批号 070601); 泊洛沙姆 188 (德国 BASF 公司, 批号 WPIB649C); 右旋糖苷 -70 (美国 Sigma 公司, 批号 17-0280-01); 人工脑脊液 (自制: 145 mmol · L<sup>-1</sup> NaCl, 3.7 mmol · L<sup>-1</sup> KCl, 1.0 mmol · L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 1.2 mmol · L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, 10 mmol · L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub>, 0.1 mmol · L<sup>-1</sup> 抗坏血酸, pH 7.4); 其余试剂均为国产分析纯。

**1.1.2 仪器与设备** 超速离心机 (美国 Beckman 公司); 超声波细胞粉碎机 (中国宁波新芝生物科技股份有限公司); 小型冷冻干燥机 (美国 Labconco 公司); 激光粒度测定仪 / Zeta 电位仪 (美国 Nicomp 公司); Modulus™ 单管型多功能光度计 (美国 Tumer Biosystems 公司); 荧光分光光度计 (日本岛津公司); 大鼠鼻黏膜给药装置 (专利号: 200520013525.5); 微透析脑立体定位架及实验装置系统 (美国 BAS 公

收稿日期: 2010-02-04, 修回日期: 2010-03-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No 30772793, 30371781); 浙江省卫生高层次创新人才培养工程资助项目

作者简介: 包 强 (1984-), 男, 硕士生, Tel: 0571-86613726, E-mail: tunshu2008@163.com;

李范珠 (1964-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 药物新剂型与新技术, 通讯作者, Tel: 0571-86633030; E-mail: lifanzhu@zjtan.net

司)。

**1.1.3 实验动物** 清洁级 SD 大鼠, 兼用, 体重约 300 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)。所有动物实验均按照浙江大学动物饲养和使用指南进行。

## 1.2 方法

**1.2.1 4组不同粒径的 NT- NP制备** 称取 40 mg MePEG-PLA 溶于 1.0 ml 乙酸乙酯中, 精密加入 40  $\mu$ l 的 FIIC-NT- ( $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 水溶液, 涡旋乳化 40 s, 再加入 2 ml 泊洛沙姆 188 水溶液 (或右旋糖苷-70), 冰浴下探头超声乳化 30 s, 将制得的复乳转移至 0.3% PVA 水溶液 100 ml 中, 旋转蒸发 30 min 除去有机溶剂, 超速离心 ( $30\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ) 30 min, 并用蒸馏水洗涤 3 次, 沉淀冻干后即得 NT- NP。

**1.2.2 形态** 取 4 组不同粒径的 NT- NP 胶体溶液适量, 蒸馏水稀释后滴于覆盖碳膜的铜网上, 室温放置至形成薄膜后用透射电子显微镜观察其形态。

**1.2.3 粒径和 电位** 取 4 组不同粒径的 NT- NP 胶体溶液适量, 用激光粒度仪测定其粒径、多分散系数 (P. D) 及 电位。

**1.2.4 包封率和载药量** NT- 的投料量计为  $C_0$ , 取离心后的上清液测定浓度计为  $C_1$ , 计算包封率  $[(C_0 - C_1) / C_0 \times 100\%]$ ; NT- NP 的浓度计为  $M$  (NT- NP 冻干后的质量与胶体溶液的体积比即为  $M$ ), 计算载药量  $[(C_0 - C_1) / M \times 100\%]$ 。

**1.2.5 溶液配制** FIIC-NT- 溶液: 称取一定量的 FIIC-NT- 溶液, 置于 2 ml 的容量瓶中, 加人工脑脊液溶解并定容至刻度, 得到浓度为  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的 FIIC-NT- 人工脑脊液溶液对照品。

FIIC-NT- NP 溶液: 取按“1.2.1 项下得到的 NT- NP 适量, 置于 100 ml 的容量瓶中, 均匀分散在人工脑脊液胶体溶液中既得。

**1.2.6 标准曲线** 精密量取 FIIC-NT- 溶液适量, 置 1 ml 容量瓶中用人工脑脊液定容, 准确稀释至浓度为 0.5、5、25、50、75、100  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  标准系列溶液。以人工脑脊液为空白, 在激发波长  $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ , 发射波长  $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$  下进行荧光测定, 以荧光强度  $F$  对药物浓度 ( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 进行线性回归, 得到回归方程。

**1.2.7 大鼠脑微透析手术操作** SD 大鼠水合氯醛 ( $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) ip 麻醉, 俯卧位固定于脑立体定位仪上。颅顶皮肤消毒后矢状切开大鼠头部正中皮肤, 暴露颅骨。用牙科高速钻机在颅骨上钻开一直径约 0.5 mm 的小孔。将微透析探针插入脑骨表面下 6.4 mm (即左侧 PAG 部位), 用牙托粉和螺钉将

微透析底座固定在颅骨上, 缝合皮肤。

**1.2.8 微透析探针在体回收率测定<sup>[8]</sup>** 运用反透析法测定 NT- 微透析脑探针的在体回收率。按“1.2.7 项下操作, 微透析脑探针埋植手术结束后, 使用浓度分别为 10、50 和 100  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的 FIIC-NT 溶液灌流, 流速为  $2 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$ , 每 30 min 收集 1 次透析液, 收集 3 h。

采用单管型多功能光度计测定透析液中对照品浓度, 根据公式  $[\text{回收率} / \% = \frac{C_{\text{per}} - C_{\text{dia}}}{C_{\text{per}}} \times 100\%]$  计算探针在体回收率 ( $C_{\text{dia}}$ 、 $C_{\text{per}}$  分别是透析液、灌流液中 FIIC-NT- 对照品浓度)。

**1.2.9 NT- NP 鼻腔给药脑药动学** 取 SD 大鼠 25 只, 随机分成 5 组, 每组 5 只: NP- 尾静脉注射组 [NP (iv)], NP- 鼻腔给药组 [NP- (in)], NP- 鼻腔给药组 [NP- (in)], NP- 鼻腔给药组 [NP- (in)], NP- 鼻腔给药组 [NP- (in)]。按“1.2.7 项下进行手术, 探针透析膜埋植手术结束后灌流人工脑脊液, 流速  $2 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$ , 平衡 30 min。采用大鼠鼻腔给药装置给药, 剂量相当于  $60 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  的 NT-, 同时使用自动恒温冷冻收集器收集透析液, 间隔 30 min, 收集 480 min。透析液测定其荧光强度, 并折算成 NT 浓度。通过 NT- 在体回收率校正, 得到各时间点的脑内 NT- 实际浓度。

**1.2.10 数据处理与药动学参数的计算** 使用非隔室模型方法处理数据, 计算相关药代动力学参数,  $C_{\text{max}}$ 、 $T_{\text{max}}$  为实测值,  $\text{AUC}_{(0-t)}$  采用梯形法计算。用 Origin 6.0 软件进行方差分析及配对  $t$  检验, 药物动力学参数见 Tab 2。

## 2 结果

**2.1 NT- NP 形态** 不同粒径的 NT- NP 外观为乳白色胶体溶液, 电镜下呈圆球形, 大小均匀。

**2.2 NT- NP 的粒径、电位、包封率和载药量** 用复乳-溶剂挥发法制备的不同粒 NT- NP 的粒径、电位、包封率和载药量见 Tab 1。

**2.3 透析样品测定的标准曲线** 结果表明, FIIC-NT- 在 0.5~100  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  范围内与荧光强度呈良好的线性关系, 回归方程  $F = 75.704 + 5.802 (n = 6, r = 0.9995)$ 。

**2.4 FIIC-NT- 微透析探针在体回收率** FIIC-NT- 微透析探针在 PAG 部位的在体平均回收率为  $(15.1 \pm 1.1)\%$ 。该回收率用于透析部位药物实际浓度的校正。

**2.5 NT- NP 的药时曲线与药动学参数** 大鼠脑微透析实验过程示意图见 Fig 1。4 组不同粒径

Tab 1 Particle size, P. I, electric potential, entrapment efficiency and loading capacity of NT- NP ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

	Particle size/nm	P. I	Electric potential/mV	Entrapment efficiency/%	Loading capacity/%
NP-	70.4 ± 8.6	0.126 ± 0.05	-9.94 ± 1.53	81.14 ± 2.95	0.34 ± 0.10
NP-	127.8 ± 12.3	0.166 ± 0.06	-14.91 ± 1.31	81.50 ± 2.35	0.42 ± 0.11
NP-	266.8 ± 10.5	0.080 ± 0.03	-12.87 ± 1.08	83.38 ± 3.22	0.29 ± 0.12
NP-	322.5 ± 8.9	0.034 ± 0.02	-21.36 ± 1.36	83.73 ± 3.43	0.35 ± 0.08

Tab 2 The pharmacokinetical parameters in PAG after intranasal administration of four NT- NP ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Parameter	NP-	NP-	NP-	NP-	NP (iv)
$C_{max}/\mu g \cdot L^{-1}$	24.89 ± 1.56*	21.64 ± 0.77	18.25 ± 0.81	16.37 ± 1.88	14.95 ± 1.90
$T_{max}/h$	1.78 ± 0.08	1.80 ± 0.12	1.97 ± 0.05	2.01 ± 0.09	2.41 ± 0.16
MRT/h	3.32 ± 0.14	3.59 ± 0.09	3.62 ± 0.16	3.71 ± 0.15	3.98 ± 0.16
$AUC_{(0-\infty)}/\mu g \cdot h \cdot L^{-1}$	127.01 ± 12.32	103.69 ± 9.78	94.45 ± 9.09	89.59 ± 10.74	72.26 ± 15.77

\*  $P < 0.05$  vs NP-, NP-, NP- ;  $P < 0.05$  vs NP-, NP-, NP- .

NT- NP大鼠鼻腔给药后的药时曲线见 Fig 2。药动学参数见 Tab 2。与尾静脉注射组 [NT-NP (iv)] 相比, 4组不同粒径 NT- NP经鼻腔给药后的  $AUC_{(0-\infty)}$ 、 $C_{max}$ 均高于静脉注射组 ( $P < 0.05$ )。NP- 的  $AUC_{(0-\infty)}$ 、 $C_{max}$ 均高于 NP-、NP- 和 NP- , 而  $T_{max}$ 均小于其他 3组 ( $P < 0.05$ )。

姆 188 或右旋糖苷 -70) 和浓度 (泊洛沙姆 188 2.4 %和 1.5 %, 右旋糖苷 -70, 0.6% 和 1.5%), 超声时间 (30 s, 18 s, 15 s, 9 s), 制备 4组不同粒径的 NT- NP, 记做: NP-、NP-、NP-、NP-。

在中枢神经系统中从 PAG到脊髓的下行抑制通路是比较肯定的与镇痛有关, 即中脑 PAG与中枢镇痛部位有着密切的联系<sup>[10]</sup>。PAG对痛觉有高度选择性抑制性作用, 可调节 GABA、谷氨酸等神经递质的释放<sup>[11, 12]</sup>。所以, 本实验中透析液采集选择 PAG部位。

鼻腔给药是一种实现多肽类药物脑内递药的有效方法之一, 纳米粒作为多肽类药物的载体, 粒径是影响其入脑的重要因素之一<sup>[13]</sup>。从 Tab 2可知, 在给药剂量相同的前提下, 4组鼻腔给药组的  $AUC_{(0-\infty)}$ 和  $C_{max}$ 分别为 (127.01 ± 12.32)  $\mu g \cdot h \cdot L^{-1}$ 和 (24.89 ± 1.56)  $\mu g \cdot L^{-1}$ , (103.69 ± 9.78)  $\mu g \cdot h \cdot L^{-1}$ 和 (21.64 ± 0.77)  $\mu g \cdot L^{-1}$ , (94.45 ± 9.09)  $\mu g \cdot h \cdot L^{-1}$ 和 (18.25 ± 0.81)  $\mu g \cdot L^{-1}$ , (89.59 ± 10.74)  $\mu g \cdot h \cdot L^{-1}$ 和 (16.37 ± 1.88)  $\mu g \cdot L^{-1}$ , 各组不同粒径 NT- NP经鼻腔给药后的  $AUC_{(0-\infty)}$ 为静脉注射组 NP<sub>(iv)</sub>的 1.7、1.5、1.2、1.1 倍 ( $P < 0.01$ ),  $C_{max}$ 为 NP<sub>(iv)</sub>组的 1.6、1.5、1.3、1.1 倍, 说明 NT- NP经鼻腔给药后药物脑内递送的程度和速度均优于静脉注射。可能的原因是由于鼻腔和颅腔在解剖和生理上的独特联系, 药物可能绕过 BBB经嗅区鼻-脑通路直接进入脑内<sup>[14]</sup>, 因此脑内药物浓度可能高于其它给药途径。

鼻腔黏膜上皮只有一层纤毛柱状上皮细胞构成, 而且上皮细胞下存在着丰富的毛细血管和毛细淋巴管。鼻腔给药后, 少部分药物经过嗅神经通路和嗅黏膜上皮通路直接进入大脑, 但大多数药物被呼吸道黏膜吸收进入血液循环, 进而透过血脑屏障

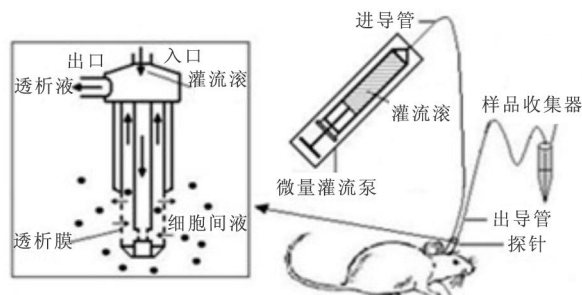


Fig 1 Schematic diagram of rat brain microdialysis

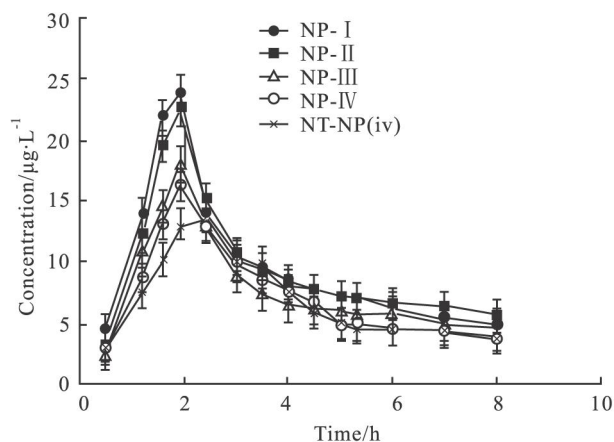


Fig 2 The profiles of mean drug PAG concentration-time after intranasal administration of four NT- NP ( $n=5$ )

### 3 讨论

根据文献和前期研究<sup>[8, 9]</sup>发现, 复乳-溶剂挥发法制备 NT- NP时, 乳化剂的种类与浓度、超声时间、稀释剂的浓度等因素对 NT- NP粒径大小都有影响, 本实验通过改变乳化剂的种类 (泊洛沙

进入脑组织<sup>[15]</sup>。有研究认为<sup>[16]</sup> NP可能是通过BBB表面内皮细胞的胞转作用进入大脑,而且较小粒径的NP越容易透过BBB上的血管内皮细胞。本实验中,与NP-、NP-、NP-相比,NP-的AUC<sub>(0-)</sub>分别为其它3组的1.22、1.34、1.60倍( $P < 0.05$ ),C<sub>max</sub>分别为其它3组的1.2、1.3、1.5倍( $P < 0.05$ )。说明粒径对NP的入脑有着较为明显的影响,粒径小于100 nm时NT- NP可以明显增加NT-的脑内浓度。Lockman等<sup>[17]</sup>提出,构建理想的入脑NP的粒径应小于100 nm。Kuo等<sup>[18]</sup>通过体外研究发现,随NP粒径增大,其体外BBB透过率降低。从药时曲线图及药动学参数可以看出,与NP-、NP-、NP-相比,NP-鼻腔给药后脑内浓度明显增加,入脑递送时间相对加快,但是脑内药物含量增加是否能提高NT镇痛作用,有待于药动学与药效学的结合研究,本课题组将进一步开展这方面的研究。

采用微透析取样技术<sup>[19]</sup>对具有脑靶向性的药物进行药动学研究,透析液中的药物浓度真实的代表了脑靶部位细胞外液中非结合药物浓度的经时变化,而且取样技术不影响实验动物的正常生理功能。本实验以清醒自由活动的大鼠为实验模型,运用脑微透析技术研究了不同粒径NT- NP鼻腔给药的脑内药物动力学过程。

#### 参考文献:

- [1] Chen R Z, Robinson S E. The effect of cholinergic manipulations on the analgesic response to cobrotoxin in cobrotoxin in mice[J]. *Life Sci*, 1990, **47**(21): 1945 - 54.
- [2] Lu 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 Taxins*, 2002, **11**(3): 221 - 9.
- [3] Phui Yee J S, Nanling G, Afifiyan F, et al Snake postsynaptic neurotoxins: gene structure, phylogeny and application in research and therapy[J]. *Biochimie*, 2004, **86**(2): 137 - 49.
- [4] 陈汝筑,吴秀荣.眼睛蛇神经毒素的镇痛作用[J]. *中国药理学通报*, 1988, **4**(2): 113 - 6.
- [4] Chen R Z, WU X R. The analgesic effect of Neurotoxin from cobra (*Naja naja*) venom[J]. *Chin Pharmacol Bull*, 1988, **4**(2): 113 - 6.
- [5] Li F, Feng J, Cheng Q, et al Delivery of 125 I cobrotoxin after intranasal administration to the brain: a microdialysis study in freely moving rats[J]. *Int J Pharm*, 2006, **328**(2): 161 - 7.
- [6] Illum L. Nasal drug delivery-possibilities, problems and solutions [J]. *J Control Release*, 2003, **87**(1 - 3): 187 - 98.
- [7] Vila A, Sanchez A, Tobio M, et al Design of biodegradable particles for protein delivery [J]. *J Controlled Release*, 2002, **78**(1 - 3): 15 - 24.
- [8] 程巧鸳,李范珠.神经毒素纳米粒大鼠鼻腔给药的脑药物动力学研究[J]. *中国药科大学学报*, 2007, **38**(1): 77 - 9.
- [8] Cheng Q Y, Li F Z, Brian. Pharmacokinetics of NT- loaded nanoparticles after intranasal administration in rats[J]. *J China Pharm Univ*, 2007, **38**(1): 77 - 9.
- [9] Kreuter J. Nanoparticulate systems for brain delivery of drug [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, **47**(1): 65 - 81.
- [10] Fields H L, Heinricher M M. Anatomy and physiology of a nociceptive modulatory system [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1985, **308**(1136): 361 - 74.
- [11] 唐敬师,袁斌.一个新的痛觉调制通路的发现[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2002, **23**(4): 329 - 32.
- [11] Tang J S, Yuan B. A new discovery of pain modulation pathway [J]. *J Xi'an Jiaotong Univ (Med Sci)*, 2002, **23**(4): 329 - 32.
- [12] 龙瑞,杜俊蓉.亲代型谷氨酸受体和相关神经疾病[J]. *中国药理学通报*, 2009, **25**(8): 998 - 1001.
- [12] Long R, Du J R. Metabotropic glutamate receptors and related nervous diseases [J]. *Chin Pharm Bull*, 2009, **25**(8): 998 - 1001.
- [13] Gao K, Jiang X. 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 - 9.
- [14] Illum L. Transport of drug from the nasal cavity to the central nervous system [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2000, **11**(1): 1 - 18.
- [15] 蒋新国.药物的鼻腔黏膜吸收[J]. *中国新药杂志*, 2003, **12**(11): 902 - 5.
- [15] Jiang X G. Intranasal drug delivery [J]. *Chin J New Drugs*, 2003, **12**(11): 902 - 5.
- [16] Kuo Y C, Chen H H. Effect of nanoparticulate polybutylcyanoacrylate and methylmethacrylate-sulfopropylmethacrylate on the permeability of zidovudine and lamivudine across the *in vitro* blood-brain barrier [J]. *Inter J Pharm* 2006, **327**(1 - 2): 160 - 9.
- [17] Lockman P R, Munper R J, Khan M A, et al Nanoparticle technology for drug delivery across the blood-brain barrier [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2002, **28**(1): 1 - 13.
- [18] Kuo Y C, Chen H H. Effect of nanoparticulate polybutylcyanoacrylate and methylmethacrylate-sulfopropylmethacrylate on the permeability of zidovudine and lamivudine across the *in vitro* blood brain barrier [J]. *Int J Pharm*, 2006, **327**(1 - 2): 160 - 9.
- [19] 李范珠,冯健.脑微透析技术及其在脑内药动学中的应用[J]. *中国药理学杂志*, 2006, **41**(6): 405 - 7.
- [19] Li F Z, Feng J. Brain microdialysis and its application in the brain pharmacokinetics [J]. *Chin Pharm J* 2006, **41**(6): 405 - 7.

## The brain pharmacokinetic study of different diameters neurotoxin- nanoparticles after intranasal administration in rats

BAO Qiang, CAIXin-jun, LI Fan-zhu

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

**Abstract:** A im To prepare NT- loaded nanoparticles with different diameters modified by Methylated-

# 丹皮酚对人肝癌 BEL-7402细胞凋亡和 COX-2、Survivin、XIAP、c-IAP1表达的影响

彭万仁,付卫争,孙国平,范璐璐,葛磊,吴志丽

(安徽医科大学第一附属医院肿瘤内科,安徽 合肥 230022)

中国图书分类号: R 284.1; R 329.24; R 329.25; R 735.702.2; R 977.3; R 977.6

文献标识码: A 文章编号: 1001-1978(2010)06-0735-05

**摘要:**目的 研究丹皮酚(paenonal, Pae)对 COX-2及凋亡抑制蛋白 Survivin、XIAP、c-IAP1表达的影响,探讨其诱导人肝癌 BEL-7402细胞凋亡的作用机制。方法 应用 MTT法检测不同浓度的 Pae对体外培养的人肝癌 BEL-7402细胞增殖抑制作用,流式细胞术和原位细胞凋亡检测法(TUNEL)检测细胞凋亡,免疫细胞化学技术检测 COX-2、Survivin、XIAP、c-IAP1的表达情况。结果 Pae可以明显抑制 BEL-7402细胞的增殖,并随着剂量的增加和时间的延长,该抑制作用增强,经 7.81、15.63、31.25、62.5 mg·L<sup>-1</sup> Pae作用 72 h后,其抑制率分别为 20.54%、25.74%、33.04%、57.97% ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ); TUNEL染色可见典型的凋亡形态学特征包括染色质凝集、边集化,呈新月形聚集于核膜下;流式细胞仪检测用药物组凋亡率明显高于对照组, Pae浓度为 7.81、15.63、31.25、62.5 mg·L<sup>-1</sup>时,其凋亡率分别为 (1.75 ± 0.32)%、(8.26 ± 0.95)%、(12.46 ± 1.37)%、(25.07 ± 1.87)%、

(37.52 ± 2.56)%。与对照组相比,免疫细胞化学分析显示, COX-2、Survivin、XIAP、c-IAP1表达明显下调 ( $P < 0.01$ )。结论 Pae对人肝癌细胞株 BEL-7402有抑制增殖和诱导凋亡的作用,其机制可能与通过下调 COX-2的表达并与抑制 survivin、XIAP和 c-IAP1的表达有关。

**关键词:**丹皮酚;肝癌细胞;环氧合酶-2;细胞凋亡;凋亡抑制蛋白;流式细胞术

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC)是常见的恶性肿瘤,在我国属高发疾病,易发生肝内外转移,预后较差。化疗在肝细胞癌的综合治疗中占有重要的地位,但效果仍不理想。肝癌的发生和发展与细胞凋亡调控失常关系密切, COX-2广泛高表达于肝癌组织中,在包括 HCC的多种肿瘤发生中起重要作用, COX-2的抑制凋亡作用被认为是肝细胞癌化疗抵抗的重要原因。选择性 COX-2抑制剂可抑制多种肿瘤细胞的生长,并诱导肿瘤细胞发生凋亡,但长期应用可带来一系列心血管不良反应,限制了其广泛应用,因此高效低毒的 COX-2抑制剂是当前研究的热点。本研究旨在探讨丹皮酚 (paenonal, Pae)作用于肝癌细胞 BEL-7402观察对 COX-2、Survivin、XIAP、c-IAP1表达的影响,探讨其诱导凋亡的作用机制。

收稿日期: 2010-02-21,修回日期: 2010-03-24

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (No 30772537)

作者简介:彭万仁 (1972-),男,硕士,研究方向:肿瘤个体化治疗,

E-mail: wanrenpeng820@163.com;

孙国平 (1961-),男,博士,教授,博士生导师,研究方向:

肿瘤个体化治疗,通讯作者, E-mail: sunguoping@ahmu

edu.cn

polyethyleneglycol (Me-PEG) and evaluate their brain pharmacokinetics after administered nasally in rats  
**Methods** NT- $\gamma$ -NP was prepared by emulsion/solvent evaporation method and MePEG-PLA was used as the carrier material. Microdialysis technique and fluorospectrophotometry were used to determine NT-concentration after nasal administration in the brain of rats.  
**Results** The appearance of all NT- $\gamma$ -NP groups was round or similar. The AUC<sub>(0-1)</sub> of below 100 nm NT- $\gamma$ -NP was 1.22 fold as that of 100 ~ 200 nm NT- $\gamma$ -NP, 1.34 fold as that of 200 ~ 300 nm and 1.60 fold as that of exceed 300 nm NT- $\gamma$ -NP ( $P < 0.05$ ) treated nasal administration in rats. The quantity and

speed of below 100 nm NT- $\gamma$ -NP was remarkably higher than the other three size NT- $\gamma$ -NP.  
**Conclusions** The size of NP has some significant influence on drug delivery to the brain. When the diameter is below 100 nm, the NT- $\gamma$ -NP significantly improves the NT-concentration level in brain. The outcomes of this research provide a feasible path to develop suitable diameter NP for the administration of giant molecule drug such as protein and polypeptide.

**Key words:** neurotoxin- $\gamma$ ; Methylated polyethyleneglycol; particle diameter; nanoparticle; rats; intranasal administration; microdialysis; brain pharmacokinetics