

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00538

## 脑源性神经营养因子缓释注射纳米粒的制备及其释药特性评价

史国栋<sup>1</sup>, 贾连顺<sup>1</sup>, 袁文<sup>1</sup>, 史建刚<sup>1\*</sup>, 谭俊铭<sup>1</sup>, 储藏<sup>2</sup>

1. 第二军医大学长征医院骨科, 上海 200003

2. 第二军医大学药学院药剂学教研室, 上海 200433

**[摘要]** **目的:** 制备稳定性高、粒径小的脑源性神经营养因子(BDNF)缓释注射纳米粒, 并评价其释药过程。 **方法:** 采用乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)为载体材料, 复乳化溶剂挥发法制备载有 BDNF 的 PLGA 纳米粒。优化纳米粒处方和制备工艺, 观察纳米粒的形态、大小和粒径分布, 评价其回收率、精密度、重复性、包封率以及体外释药特性。 **结果:** 优选处方选择理论载药量 1%、聚合物浓度 3.3 mg/ml、超声时间为 40 s, 甘露醇为支架剂。BDNF 纳米粒呈圆形, 大小均匀, 平均粒径为 156.7 nm。制备的纳米粒回收率、精密度、重复性和包封率较高, 缓慢溶蚀释放为其主释药过程, 时间达 30 d。 **结论:** 成功制备的 BDNF 缓释注射纳米粒具有稳定性好、包封率高的特点。

**[关键词]** 脑源性神经营养因子; 缓释制剂; 纳米粒

**[中图分类号]** R 944.9

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 0258-879X(2008)05-0538-05

### Preparation of injectable sustained-release nanoparticles carrying brain-derived neurotrophic factor and evaluation of their drug releasing characteristics

SHI Guo-dong<sup>1</sup>, JIA Lian-shun<sup>1</sup>, YUAN Wen<sup>1</sup>, SHI Jian-gang<sup>1\*</sup>, TAN Jun-ming<sup>1</sup>, CHU Cang<sup>2</sup>

1. Department of Orthopedics, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

2. Department of Pharmacy, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433

**[ABSTRACT]** **Objective:** To prepare stable, small-sized injectable sustained-release nanoparticles harboring brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and to evaluate its drug releasing process. **Methods:** The nanoparticles were prepared using poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA) as the carrier by w/o/w double emulsion-solvent evaporation method. The formula and technique were optimized; the shape, size and the distribution of the diameters of the particles were observed; and recovery rate, precision, repeatability, encapsulation efficiency, and drug releasing characteristics were assessed. **Results:** With the optimized formula, the drug loading rate was 1%, the polymer concentration was 3.3 mg/ml, and the ultrasound time was 40 s; mannitol was used as the supporting agent. BDNF nanoparticles were round, homogenous in size, with a mean diameter of 156.7 nm. The prepared particles had high recovery rate, precision, repeatability, and encapsulation efficiency. The drug release was characterized by slow corrosion and the process lasted for 30 days. **Conclusion:** We have successfully prepared slow-release nanoparticles harboring BDNF, which are stable and have high encapsulation efficiency.

**[KEY WORDS]** brain-derived neurotrophic factor; sustained-release preparations; nanoparticles

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(5): 538-542]

腰椎间盘突出症及腰椎管狭窄症主要是由于神经根受压而引发相应的临床症状, 临床手术虽可通过减压阻止病情进一步发展, 但临床症状缓解难以令人满意。脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 能促进神经细胞生长, 具有神经保护, 缓解炎性痛、神经痛作用<sup>[1]</sup>。Xu

等<sup>[2]</sup>研究发现靶向 BDNF 基因转染对脊髓运动神经元损伤具有保护作用。但外源性 BDNF 在体内代谢较快, 且易被体内代谢酶破坏。因此, 本研究采用乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)为载体材料, 制备载有 BDNF 的纳米粒, 解决外源性 BDNF 给药的上述问题, 为 BDNF 的临床应用研究提供新的思路。

**[收稿日期]** 2007-10-08

**[接受日期]** 2008-01-17

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30300359), 上海市自然科学基金(07JC14072). Supported by National Natural Science Foundation of China (30300359) and Natural Science Foundation of Shanghai(07JC14072).

**[作者简介]** 史国栋, 博士生. E-mail: shgd008@163.com

\* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 021-63610109-73331, E-mail: shijiangang616@tom.com

## 1 材料和方法

1.1 药品及试剂 hu-BDNF (Prospec Techno-Gene,批号:115PBDNF06); hu-BDNF ELISA 试剂盒; PLGA(美国 Birmingham Polymers 公司, LA:GA=50:50); 聚乙烯醇 1788(PVA1788,北京有机化工厂); 叠氮钠(纯度>99.9%,Amerson 分装); 甘露醇(注射用),泊洛沙姆 F-68、PEG6000、二氯甲烷等其他试剂均为分析纯。

### 1.2 纳米粒的制备

1.2.1 复乳化溶剂挥发法制备纳米粒 参照文献<sup>[3-9]</sup>将 hu-BDNF 冻干粉(25 μg)溶解于 75 μl 10 mmol/L pH7.4 磷酸盐缓冲液,作为内水相,与 25 mg PLGA 乙酸乙酯溶液 0.75 ml 混合,冰浴条件下超声乳化 40 s(功率 60 W),制成初乳,将初乳快速滴加到(1%,W/V)PVA 水溶液 1.5 ml 中,冰浴条件下超声乳化 40 s(功率 60 W),制成复乳,复乳加至 15 ml 0.3%PVA 溶液中,37℃水浴低速搅拌挥发有机溶剂,12 000×g 离心 20 min,收集沉淀,蒸馏水洗涤 3 次,冷冻干燥,备用。空白纳米粒内水相用蒸馏水代替。

1.2.2 正交设计优化 考察下列因素(表 1)对纳米粒含药量和包封率的影响,优化纳米粒的处方制备工艺。因素包括理论载药量、聚合物浓度及超声时间。

表 1 纳米粒含药量和包封率的影响因素

Tab 1 Factors influencing drug loading and encapsulation efficiency of nanoparticles

Levels	Factors		
	Drug/PLGA	PLGA concentration $\rho_B/(mg \cdot ml^{-1})$	Sonification time t/s
1	0.8%	1.7	20
2	1.0%	3.3	40
3	1.2%	5.0	60

1.3 纳米粒外观形态观察 取纳米粒混悬液,加蒸馏水稀释,用 1.5%(W/V)磷钨酸负染色,滴于镀膜的电镜铜网上,晾干后,置于透射电镜(JEM-1230型)下观察纳米粒子的形态和粒径范围,用 Malvern 激光粒度分析仪测定其粒径分布。

1.4 纳米粒冻干品的制备及支架剂选择 对乳糖、蔗糖和甘露醇 3 种支架剂进行筛选,进行冻干后纳米粒的外观和再分散性实验。称取支架剂,加至 PLGA 纳米粒混悬液中,使溶解完全,以每支 2 ml 分装于塑料试管中,按常规方法冷冻干燥 15 h,得各

处方的纳米粒冻干品,进行质量评价。外观评分标准:固体块状物,质地疏松、细腻,能保持原液体积,不塌陷,不收缩,表面光洁为最佳,以 10 分计。重分散性评分标准:冻干品加入蒸馏水 2 ml,轻轻振摇即得均匀混悬的溶液为最佳,以 10 分计。

### 1.5 纳米粒药物含量测定

1.5.1 回收率及精密度测定 采用 ELISA 试剂盒测定 BDNF 含量<sup>[7]</sup>,在波长 450 nm 读取光密度(D)值,以 D 值为纵坐标,标准 BDNF 浓度 c 进行对数直线回归,绘制标准曲线。方法回收率:精密称取一定量的 BDNF 冻干粉,分别用 PBS(pH7.4)溶液配成高、中、低 3 个浓度的溶液各 3 份,根据回归方程计算溶液的浓度,并与原始浓度比较求得回收率。精密度试验:取上述配制的高、中、低 3 个浓度的样品进行日内和日间精密度测定,日内、日间重复测定 5 次。

1.5.2 纳米粒含量测定 测定结果称取冻干纳米粒子 5 mg,加入 0.5 ml 氯仿溶解,加入 2 ml TE 缓冲液(pH7.4)旋涡提取 hu-BDNF,12 000×g 离心 5 min,取上清液,测定纳米粒子的药物含量。取 3 批按优化工艺制备的纳米粒进行含量测定。

1.5.3 纳米粒包封率测定 参照文献<sup>[10-12]</sup>,取制备的离心上清液测定 BDNF,按下式计算包封率。包封率(%)=(PLGA 纳米粒中 BDNF 的测得含量/制备时 PLGA 纳米粒中 BDNF 的理论载药量)×100%。取 3 批按优化工艺制备的纳米粒进行包封率测定。

1.6 纳米粒冻干品释药特性评价 称取冻干纳米粒,加入 50 mmol/L pH7.4 磷酸缓冲液(含 0.02%叠氮钠,0.02%Tween-80)作为释放介质,置于恒温水浴摇床中,100 次/min 振荡,37℃进行微球的体外释放度测定。在设定时间点,取出样品,12 000×g 离心 5 min,吸取上清液,测定 BDNF 含量。

## 2 结果

2.1 纳米粒的制备情况 正交设计优化考察因素分析结果(表 2)及极差分析结果(表 3)表明:3 种因素对纳米粒包封率的影响大小依次为理论载药量>聚合物浓度>超声时间。其中理论载药量越高,包封率越低;聚合物的浓度越高,包封率越高;超声时间对包封率的影响不明显。综合考虑各方面因素,优选处方和工艺选择理论载药量为 1%、聚合物浓度为 3.3 mg/ml、超声时间为 40 s。

表2 正交设计优化考察因素分析结果

Tab 2 Design and results of L<sub>9</sub>(3<sup>3</sup>) orthogonal test

Drug/PLGA	PLGA concentration ρ <sub>B</sub> /(mg·ml <sup>-1</sup> )	Sonification time t/s	Drug encapsulation efficiency(%)
1	1	1	68.2
1	2	2	73.2
1	3	3	75.8
2	1	2	64.7
2	2	3	71.2
2	3	1	67.4
3	1	3	52.1
3	2	1	55.5
3	3	2	61.0

1,2,3 were the levels in Tab 1

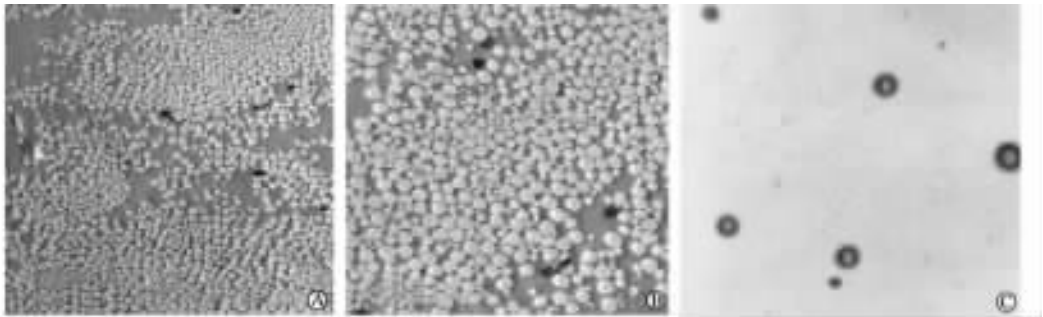


图1 透射电镜下纳米粒观察结果

Fig 1 Transmission electron microscopy of nanoparticles

A: Transmission electron micrograph shows the vacant nanoparticles(original magnification: ×5 000); B: Transmission electron micrograph shows the nanoparticles after loading BDNF(original magnification: ×12 000); C: Transmission electron micrograph shows the nanoparticles after loading BDNF(original magnification: ×60 000)

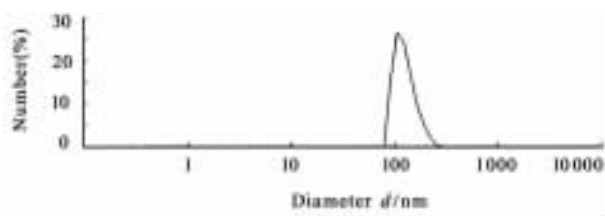


图2 纳米粒子粒径的大小分布

Fig 2 Diameter distribution of nanoparticles

2.3 纳米粒冻干品支架剂的选择 乳糖作支架剂外观和重分散性比较欠缺,蔗糖和甘露醇作支架剂外观和重分散性都较理想,但以甘露醇为最佳。因此,本研究采用甘露醇为支架剂,用量为6%(表4)。

2.4 回收率、精密度及包封率测定结果 该法制备的纳米粒回收率(表5)和精密度(表6)较高,重复测定标准差为0.012,药物平均包封率为87.7%。

2.5 纳米粒冻干品释药特性评价 体外释放具有:初始突释(1 d),较高速度的恒速释药(2~14 d),第

表3 极差分析结果

Tab 3 Analysis of variance of orthogonal test

Levels	Drug/PLGA	PLGA concentration ρ <sub>B</sub> /(mg·ml <sup>-1</sup> )	Sonification time t/s
1	72.4	62.5	61.3
2	71.0	68.1	65.4
3	56.8	68.9	65.9
R	16.3	7.2	2.8

2.2 纳米粒形态观察结果 粒子呈圆形,大小较均匀(图1A、1B),有的粒子表面有孔洞,为溶剂挥发时形成的(图1C);粒径分布范围窄,呈正偏态分布,粒径集中分布在100~400 nm内,平均为156.7 nm,多分散系数DPI为0.170(图2)。

三相突释(16~20 d)和渐弱释药(22~30 d)的四相特征。体外释放第三相结束时(20 d)释放掉96.1%的药量。纳米粒体外释药试验显示缓慢溶蚀释放为其主释药过程,时间达30 d(图3)。

表4 冻干后乳糖、蔗糖和甘露醇对纳米粒外观和重分散性的影响

Tab 4 Effects of lactose, sucrose and mannitol on nanoparticles redispersibility and shape after freezing-dried process

Supporting agent	W/W(%)	Shape	Redispersibility	Total score
Lactose	2	4	6	10
	6	7	8	15
	10	8	8	16
Sucrose	2	7	8	15
	6	7	8	15
	10	8	8	16
Mannitol	2	10	7	17
	6	10	9	19
	10	10	9	19

表5 BDNF回收率测定  
Tab 5 Recovery rate of BDNF

(n=3)		
Added $\rho_B / (\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1})$	Found $\rho_B / (\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1})$	Recovery(%)
25	24.32	98.98±2.30
25	24.53	
25	25.39	
200	198.3	99.90±0.87
200	199.4	
200	201.7	
500	501.8	99.81±0.57
500	498.1	
500	499.3	

表6 高效液相法测定精密度  
Tab 6 Precision of HPLC method

(n=5)				
Index	Added $\rho_B / (\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1})$	Found $\rho_B / (\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1})$	SD	CV(%)
Intra-day	25	23.94	0.74	3.09
	200	202.7	2.69	1.33
	500	499.3	3.78	0.76
Inter-day	25	24.57	0.89	3.62
	200	201.9	2.93	1.45
	500	499.1	4.36	0.87

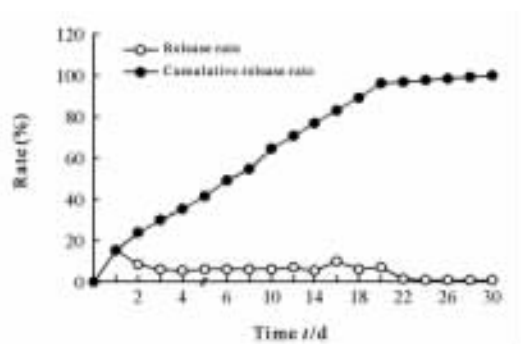


图3 PLGA纳米粒体外释药曲线

Fig 3 *In vitro* release curve of PLGA nanoparticles

### 3 讨论

神经营养因子是指机体产生的能够促进神经细胞存活、生长和分化的一类蛋白质因子。神经营养因子不仅可以影响发育早期胚胎神经元或者前体细胞的生长与分化,而且能够促进成熟神经细胞的存活与生长,对治疗一些神经系统退行性疾病以及促进神经损伤后修复具有非常重要的作用<sup>[10]</sup>。BDNF对黑质多巴胺神经元、脊髓运动神经元、面运动神经元等具有较强的促进存活作用,有希望用于治疗肌

萎缩侧索硬化症<sup>[11]</sup>。然而,其在水溶液中很快失活,易受温度、酸碱等多种因素的影响,在体内易被生物酶降解,这些缺点限制了其临床应用。目前正通过改善给药手段和寻找具有神经营养活性的小分子化合物来克服上述缺点,如通过基因治疗或向中枢患部植入缓释介质来实现<sup>[12]</sup>。纳米粒是一类粒径为1~1 000 nm的固体胶粒,主要由多种大分子组成,这些大分子可以吸附、包裹或共价结合治疗药物。纳米粒的用途之一就是充当新型载体将药物转运到全身组织。

本研究采用PLGA为载体材料,用复乳化溶剂挥发法制备BDNF纳米粒,在保证较高的载药量、包封率以及适宜的粒径基础上,采用理论载药量1%、聚合物浓度3.3 mg/ml、超声时间为40 s的优选处方制备BDNF纳米粒。该法制备的BDNF纳米粒呈圆形,大小均匀,粒径分布范围窄,粒度集中分布于100~400 nm。研究<sup>[13-14]</sup>已表明纳米粒及其表面修饰物质并不改变血脑屏障的完整性、膜通透性、离子通道蛋白的性状,其主要由构成血脑屏障主要部分的脑毛细血管内皮细胞胞吞转运<sup>[15]</sup>。结果表明本研究制备工艺稳定性高、重现性好,制备的纳米粒回收率、精密度和包封率较高。本研究采用的载体材料为人工合成的PLGA,是一种已由美国FDA批准应用于临床的材料,无免疫原性,可生物降解,它在体内的最终产物是水和二氧化碳,其人体内的安全性、细胞毒性等研究已得到了普遍认可<sup>[16]</sup>,因而以PLGA为载体的纳米粒,其临床应用的可行性得到极大的提高。

纳米粒是以胶体微粒形式分散于介质中,属热力学高度不稳定体系,易聚结为大颗粒。为了提高制剂的稳定性和临床使用的方便,本研究采用纳米粒的冷冻干燥工艺,并对冷冻前后外观、重分散性等理化特性进行了考察<sup>[17]</sup>。为了保证其冻干后的重分散性,冻干前必须加入适当的支架剂(supporting agents)起到分散作用,防止粒子的聚结。本研究对乳糖、蔗糖和甘露醇3种支架剂进行了筛选,以冻干品的外观和重分散性为评价指标,结果发现蔗糖和甘露醇作支架剂外观和重分散性都较理想,但重分散性以甘露醇为最佳。因此,本研究最终采用甘露醇为支架剂,用量为6%。

PLGA纳米粒中药物的释放机制主要由聚合物材料的水解溶蚀和药物的扩散来控制。体外药物释

放一般通过以下方式进行:表面吸附药物的解吸附(突释);药物通过骨架材料扩散;纳米粒骨架材料的溶蚀;溶蚀过程和扩散过程的同时进行<sup>[17]</sup>。本研究制备的 PLGA 纳米粒体外释放 1 d 内突释较小,前期释放较快,后期稳定,是由 PLGA 材料缓慢溶蚀控制的。

本研究采用的制备工艺为复乳化溶剂挥发法,该方法简便易行、稳定性好、包封率高,利于保护 BDNF,但存在着载药量较低的缺点,一般不超过 2%。另外,此方法对于实验室小规模制备尚可,对于工业化生产来说,该方法耗能高,对仪器设备要求高,存在着难以扩大生产的难题,这些缺点都将限制了纳米粒的临床应用,是后续研究亟待解决的问题。

### [参考文献]

- [1] Kasahara K, Nakagawa T, Kubota T. Neuronal loss and expression of neurotrophic factors in a model of rat chronic compressive spinal cord injury[J]. *Spine*, 2006, 31:2059-2066.
- [2] Xu K, Uchida K, Nakajima H, Kobayashi S, Baba H. Targeted retrograde transfection of adenovirus vector carrying brain-derived neurotrophic factor gene prevents loss of mouse (twy/twy) anterior horn neurons *in vivo* sustaining mechanical compression[J]. *Spine*, 2006, 31:1867-1874.
- [3] Cheng J, Teply B A, Sherifi I, Sung J, Luther G, Gu F X, et al. Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for *in vivo* targeted drug delivery [J]. *Biomaterials*, 2007, 28: 869-876.
- [4] Zhang J X, Zhu K J. An improvement of double emulsion technique for preparing bovine serum albumin-loaded PLGA microspheres[J]. *J Microencapsul*, 2004, 21:775-785.
- [5] Wassel R A, Grady B, Kopke R D, Dormer K J. Dispersion of super paramagnetic iron oxide nanoparticles in poly(D, L-lactide-co-glycolide) microparticles[J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochem Eng Aspects*, 2007, 292:125-130.
- [6] Perez C, Sanchez A, Putnam D, Ting D, Langer R, Alonso M J. Poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) nanoparticles as new carriers for the delivery of plasmid DNA[J]. *J Control Release*, 2001, 75(1-2):211-224.
- [7] Jiang G, Thanoo B C, DeLuca P P. Effect of osmotic pressure in the solvent extraction phase on BSA release profile from PLGA microspheres[J]. *Pharm Dev Technol*, 2002, 7:391-399.
- [8] Zhang J X, Zhu K J. An improvement of double emulsion technique for preparing bovine serum albumin-loaded PLGA microspheres[J]. *J Microencapsul*, 2004, 21:775-785.
- [9] Singh M, Shirley B, Bajwa K, Samara E, Hora M, O'Hagan D. Controlled release of recombinant insulin-like growth factor from a novel formulation of polylactide-co-glycolide microparticles[J]. *J Control Release*, 2001, 70(1-2):21-28.
- [10] Widenfalk J, Lundströmer K, Jubran M, Brene S, Olson L. Neurotrophic factors and receptors in the immature and adult spinal cord after mechanical injury or kainic acid[J]. *J Neurosci*, 2001, 21:3457-3475.
- [11] Sayer F T, Oudega M, Hagg T. Neurotrophins reduce degeneration of injured ascending sensory and corticospinal motor axons in adult rat spinal cord[J]. *Exp Neurol*, 2002, 175:282-296.
- [12] Tang X Q, Cai J, Nelson K D, Peng X J, Smith G M. Functional repair after dorsal root rhizotomy using nerve conduits and neurotrophic molecules[J]. *Eur J Neurosci*, 2004, 20:1211-1218.
- [13] Lockman P R, Koziara J, Roder K E, Paulson J, Abbruscato T J, Mumper R J, et al. *In vivo* and *in vitro* assessment of baseline blood-brain barrier parameters in the presence of novel nanoparticles[J]. *Pharm Res*, 2003, 20:705-713.
- [14] Kreuter J, Ränge P, Petrov V, Hamm S, Gelperina S E, Engelhardt B, et al. Direct evidence that polysorbate-80-coated poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles deliver drugs to the CNS *via* specific mechanisms requiring prior binding of drug to the nanoparticles[J]. *Pharm Res*, 2003, 20:409-416.
- [15] Kreuter J. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 47:65-81.
- [16] Blanco M D, Alonso M J. Development and characterization of protein-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanospheres[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 1997, 43:287-294.
- [17] Vila A, Sánchez A, Tobío M, Calvo P, Alonso M J. Design of biodegradable particles for protein delivery [J]. *J Control Release*, 2002, 78(1-3):15-24.

[本文编辑] 贾泽军