

载脑源性神经营养因子脂质体纳米微粒脂膜微泡 超声造影剂的制备与初步评价

程伟 赵大威 田猛 胡加银 阳建政 杜鹏 王翔

摘要 目的 制备一种新型的载脑源性神经营养因子(BDNF)脂质体纳米微粒脂膜微泡超声造影剂(BDNF-UMCA), 并对其应用进行初步评价。方法 以冷冻干燥法在“脂氟显”制备的基础上加入与二棕榈酰磷脂酰胆碱等量的含生物素化棕榈酰磷脂酰甘油钠-聚乙二醇 2000-生物素, 制备含生物素化脂膜超声微泡造影剂, 通过链亲和素耦连含生物素化聚乙二醇载 BDNF 脂质体纳米微粒制备 BDNF-UMCA, 检测其物理性质、载药量、包封率、稳定性及体内声学特性。结果 BDNF-UMCA 平均粒径(4.20 ± 0.79) μm , 浓度 $1.02 \times 10^9/\text{ml}$, 总药物含量(1.18 ± 1.96) mg/ml , 包封率(71.6 ± 2.6)%。在 4°C 下, BDNF-UMCA 平均粒径和包封率各时间点无明显变化; 在(24 ± 2) $^\circ\text{C}$ 下, BDNF-UMCA 的平均粒径随时间推移逐渐增大, 第 1、3、5、7 天的粒径与初始粒径比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$), 包封率在(24 ± 2) $^\circ\text{C}$ 下各时间点比较差异无统计学意义。BDNF-UMCA 能显著增强实验动物肝脏显影, 平均峰值强度(21.5 ± 3.5) dB , 平均达峰时间(19.2 ± 5.2) s 。结论 应用生物素-亲和素耦连可成功制备 BDNF-UMCA; BDNF-UMCA 可为靶向显影及药物通过血脑屏障释放提供工具。

关键词 超声检查; 造影剂; 脑源性神经营养因子; 生物素; 脂质体; 微泡; 血脑屏障

[中图分类号] R445.1

[文献标识码] A

Preparation and primary evaluation of brain-derived neurotrophic factor liposome nanoparticles-loaded microbubbles as ultrasound contrast agent

CHENG Wei, ZHAO Dawei, TIAN Meng, HU Jiayin, YANG Jianzheng, DU Peng, WANG Xiang

Department of Ultrasound, Daping Hospital & Institute of Surgery Research, Army Medical University, Chongqing 400042, China

ABSTRACT Objective To explore the preparation of a new type of brain-derived neurotrophic factor(BDNF) liposome nanoparticles-loaded lipid ultrasound microbubble contrast agent(BDNF-UMCA), and to preliminarily evaluate its application. **Methods** Ultrasound microbubbles contrast agent(UMCA) were prepared by adding a certain proportion of DPPG-PEG(2000)-biotin based on “Zhifuxian” using cryochem and mechanical agitation method, BDNF-UMCA were prepared by coupling with biotinylated BDNF-loaded liposome nanoparticles via streptavidin. The physicochemical properties, drug loading, entrapment efficiency, stability and acoustic characteristics of BDNF-UMCA in vivo were tested. **Results** The average diameter of BDNF-UMCA was (4.20 ± 0.79) μm , the concentration was $1.02 \times 10^9/\text{ml}$, and the total drug content was (1.18 ± 1.96) mg/ml , the entrapment efficiency was (71.6 ± 2.6)%. The average size and entrapment efficiency of BDNF-UMCA were not significantly changed at 4°C at different time. The average size of BDNF liposome nanoparticle increased gradually at (24 ± 2) $^\circ\text{C}$, there was difference at day 1, day 3, day 5 and day 7 compared with initial particle size(all $P < 0.05$). While there was no significant difference of the entrapment efficiency at different time at (24 ± 2) $^\circ\text{C}$. BDNF-UMCA could significantly enhance the contrast imaging of experimental animal liver with the average peak strength of (21.5 ± 3.5) dB and the average peak time of (19.2 ± 5.2) s . **Conclusion** BDNF-UMCA can be successfully prepared by biotin-avidin conjugation method, and it will provide a tool for targeted imaging and drug delivery through blood brain barrier.

KEY WORDS Ultrasonography; Contrast agent; Brain-derived neurotrophic factor; Biotin; Liposome; Microbubbles; Blood brain barrier

基金项目:重庆市自然科学基金资助项目(cstc2014jcyjA10103)

作者单位:400042 重庆市,陆军军医大学大坪医院野战外科研究所超声科

通信作者:王翔, Email: wangx1976@163.com

脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)具有保护神经元,减少神经元凋亡,促进神经元在有害环境下生存等作用^[1]。作为潜在的药物分子,BDNF 可用来治疗缺血性脑梗死等多种神经系统疾病^[2-3]。然而外周大分子物质很难通过血脑屏障进入中枢神经系统^[4],且外周血液系统内存在 BDNF 内切酶^[1],导致外周给予 BDNF 时因半衰期短,剂量不稳定,限制了其临床应用。因此,如何确保 BDNF 安全、稳定、高效地跨血脑屏障到达靶区,是应用 BDNF 治疗缺血性脑梗死的关键。本实验在“脂氟显”^[5-6]脂质成膜材料的基础上,加入棕榈酰磷脂酰甘油-聚乙二醇 2000-生物素[DPPG-PEG(2000)-Biotin]制得含生物素化脂膜超声微泡,通过链亲和素耦连含生物素化聚乙二醇载 BDNF 脂质体纳米微粒,制备具有高效包封率和载药率的新型载 BDNF 脂质体纳米微粒的脂膜超声微泡造影剂(BDNF-UMCA),观察其物理性质和体内显影效果,并初步评价其应用价值。

材料与方 法

一、药品与试剂

BDNF 冻干粉(美国 Sigma 公司);DPPG-PEG(2000)-Biotin 和二棕榈酰磷脂酰胆碱(美国 Avanti Polar lipids 公司);聚乙二醇-4000(美国 Hercules 公司);3β-[N-(N1,N1-二甲基胺乙基)胺基甲酰基]胆固醇(美国 Avanti Polar lipids 公司);链亲和素(美国 Promega 公司);BDNF ELISA 试剂盒(美国 R&D 公司);氢化蛋黄卵磷脂(德国 Lipoid 公司);50%葡萄糖、丙二醇及丙三醇(重庆川东化工集团有限公司)。

二、实验仪器

GLZY-0.5B 型冷冻干燥机(上海浦东冷冻干燥仪厂);机械振荡仪(安泰科技股份有限公司);库尔特颗粒计数仪(珠海欧美克科技有限公司);GE Logiq 9 彩色多普勒超声诊断仪,9L 探头,频率 7 MHz。

三、实验方法

1.含生物素化聚乙二醇长臂脂膜超声造影剂的制备:按照“脂氟显”脂质成膜材料配比,将 3β-[N-(N1,N1-二甲基胺乙基)胺基甲酰基]胆固醇、二棕榈酰磷脂酰胆碱及聚乙二醇-4000 以质量比 1:1:150 置于 20 ml 三角烧瓶中,再加入 1 份 DPPG-PEG(2000)-Biotin,按各自的相变温度以超纯水分散、混悬制得混悬液,将混悬液置于冷冻干燥机干燥成粉,加入 50%葡萄糖、丙二醇及丙三醇按体积比 8:1:1 组成的混合溶媒液 1 ml 充分溶解,并加入全氟丙烷气体,机械振荡

仪进行振荡,频率为 4000~5000 次/min,时间 60 s,即得到含生物素化聚乙二醇长臂脂膜超声造影剂。

2.含生物素化聚乙二醇载 BDNF 脂质体纳米微粒的制备:以卵磷脂、胆固醇及 DPPG-PEG(2000)-Biotin 为成膜材料,以质量比 1:1:1 于氯仿制得混悬液,旋转蒸发除去氯仿并于-45℃下冷冻干燥 24 h 成膜。用超纯水充分溶解并于 60℃下超声乳化 5 min,于液氮和水浴中反复冻融 5 次,并过 0.22 μm 微孔滤膜 3 次进行整粒,即得到含生物素化聚乙二醇脂质体纳米微粒。为加载 BDNF,将制得的脂质体薄膜用 250 mM 的硫酸铵溶液溶解,然后溶液反复用 0.22 μm 微孔滤膜挤出 5 次,13 000 r/min,5 min 离心去除硫酸铵溶液,此时硫酸铵主要位于脂质体内部。将脂质体用 500 μM BDNF 以体积比 1:1 重悬,并于 60℃孵育 2 h,离心除去未加载的 BDNF,即得到含生物素化聚乙二醇载 BDNF 脂质体纳米微粒。

3.BDNF-UMCA 的制备:应用“生物素-亲和素”法对生物素化后的载 BDNF 脂质体纳米微粒和脂膜超声造影剂进行耦连,按照体积比 1:1 混合上述两种微泡和纳米粒,然后按照 0.025 mg/ml 的比例加入亲和素,常温下孵育 2 h,离心去除未耦连的微泡、脂质体微粒及亲和素,用超纯水重悬即制得 BDNF-UMCA。

四、质量评价

1.微泡粒径、粒径分布及微泡浓度测定:激光粒度仪检测耦连前后微泡粒径和粒径分布,库尔特颗粒计数仪测量微泡浓度。

2.BDNF-UMCA 的载药量和包封率测定:取 1.0 ml BDNF-UMCA,于 35 000 r/min 下离心 15 min 分离 BDNF-UMCA 与游离药物,取上清液按照 BDNF ELISA 试剂盒操作说明测定 BDNF 含量,即得到游离药物含量($W_{游}$);取 1.0 ml BDNF-UMCA,用甲醇固定,取样测定,即得到 1.0 ml BDNF-UMCA 混悬液中总药物含量($W_{总}$)。载药量= $W_{总}-W_{游}$;包封率= $(W_{总}-W_{游})/W_{总} \times 100\%$ 。

3.稳定性试验:将制得的 BDNF-UMCA 分别于温度 4℃和(24±2)℃,相对湿度(65±5)%的条件下静置,于静置即刻和静置第 1、3、5、7 天测量平均粒径和包封率。

4.体内声学特性试验:选取健康新西兰大白兔 12 只(陆军军医大学大坪医院实验动物中心提供,动物使用许可证号:SYXK-PLA-2012-0036),雌雄不限,体质量(2.05±0.26)kg。将其随机分为两组,每组 6 只,分别使用 BDNF-UMCA 微泡和 SonoVue 微泡(意大利博莱科公司)对其进行肝脏超声造影检查。首先

建立耳缘静脉通道,注入2.5%戊巴比妥钠 30 mg/kg 实施麻醉,8% 的硫化钠脱去肝区体毛,取仰卧位固定于实验台。彩色多普勒超声诊断仪调节成像深度至 4 cm,待充分显示肝脏满意切面后,启动超声造影条件,机械指数 0.1,按照 0.01 ml/kg 经耳缘静脉团注 BDNF-UMCA 微泡或按照 0.1 ml/kg 经耳缘静脉团注 SonoVue 微泡,随后尾随生理盐水0.5 ml 冲管,整个造影检查中上述各设置条件及显示的肝断面均保持不变。动态采集造影图像,应用机器自带软件分析肝脏二维灰阶强度变化,描记肝实质增强的时间-强度曲线,对比 BDNF-UMCA 微泡与 SonoVue 微泡对肝脏增强显像的效果,记录峰值强度和达峰时间。

五、统计学处理

应用 SPSS 23.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,粒径变化、峰值强度及达峰时间比较行非配对双尾 t 检验;稳定性随时间的变化采用单因素方差分析并行 Dunnett's 多重比较检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、BDNF-UMCA 的一般物理特性

BDNF-UMCA 外观呈白色混悬液,普通光镜下观察其呈圆形,表面光滑,分布较均匀。未耦连 BDNF 的含生物素化聚乙二醇长臂脂膜超声微泡造影剂粒径为 1.5~5.5 μm ,平均粒径 $(3.50 \pm 0.65) \mu\text{m}$,浓度 $1.35 \times 10^9/\text{ml}$ (图 1);BDNF-UMCA 粒径为 1.2~6.8 μm ,平均粒径 $(4.20 \pm 0.79) \mu\text{m}$,浓度 $1.02 \times 10^9/\text{ml}$ (图 2)。超声微泡在耦连 BDNF 脂质体纳米微粒前后的粒径比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

二、BDNF-UMCA 的载药量和包封率

ELISA 检测显示,1 ml BDNF-UMCA 中 $W_{\text{游}}$ 为 $(0.34 \pm 0.82) \text{mg}/\text{ml}$, $W_{\text{总}}$ 为 $(1.18 \pm 1.96) \text{mg}/\text{ml}$,载药量为 $(0.84 \pm 0.95) \text{mg}/\text{ml}$,包封率为 $(71.6 \pm 2.6) \%$ 。

三、BDNF-UMCA 的稳定性

在 4℃ 下,BDNF-UMCA 的平均粒径和包封率各时间点比较差异均无统计学意义。而在 $(24 \pm 2)^\circ\text{C}$ 下,随着放置时间的延长,BDNF-UMCA 的平均粒径逐渐增大,粒径的变化主要发生在载 BDNF 脂质体纳米微粒,第 1、3、5、7 天的粒径与初始粒径比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);超声微泡的粒径随时间延长无明显变化(图 3)。BDNF-UMCA 的包封率在 4℃ 和 $(24 \pm 2)^\circ\text{C}$ 下各时间点比较差异均无统计学意义(图 4)。见表 1。

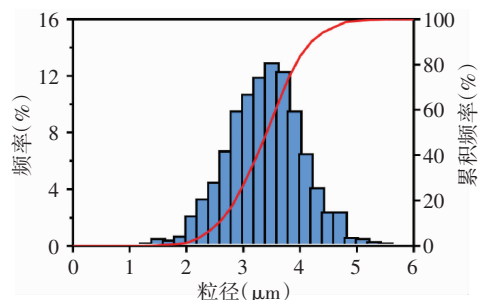


图 1 含生物素化聚乙二醇长臂脂膜超声微泡造影剂的粒径分布图

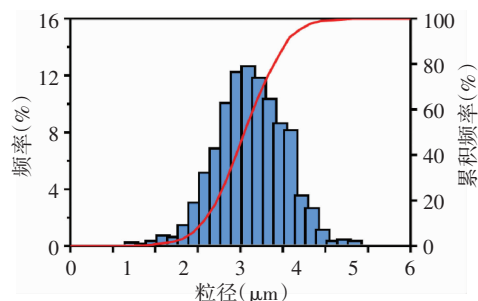


图 2 BDNF-UMCA 的粒径分布图

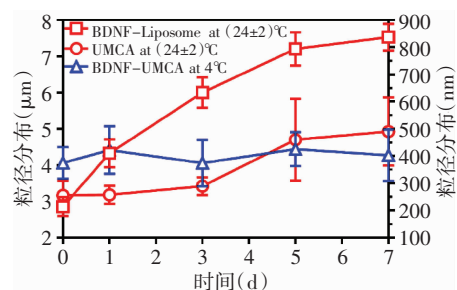


图 3 BDNF-UMCA 平均粒径的变化

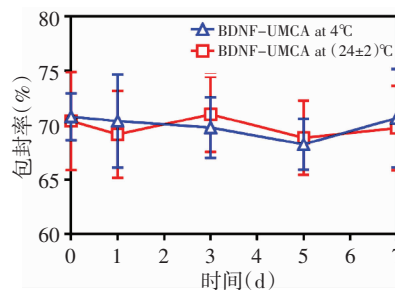


图 4 BDNF-UMCA 包封率的变化

四、BDNF-UMCA 的声学特性

BDNF-UMCA 能显著持续增强实验动物的肝脏显影,BDNF-UMCA 峰值强度为 $(21.5 \pm 3.5) \text{dB}$,与 SonoVue 峰值强度 $[(23.3 \pm 4.7) \text{dB}]$ 比较差异无统计学意义;BDNF-UMCA 达峰时间为 $(19.2 \pm 5.2) \text{s}$,与 SonoVue 达峰时间 $[(17.8 \pm 6.4) \text{s}]$ 比较差异无统计学意义。

讨 论

近年来,随着超声造影剂的不断革新,超声靶向药物输送和选择性成像已成为医学影像学领域的研究热

表 1 不同温度下各时间点 BDNF-UMCA 平均粒径和包封率比较($\bar{x}\pm s$)

不同温度	平均粒径(μm)	包封率(%)
4℃		
静置即刻	4.06±0.44	70.80±1.25
静置第 1 天	4.42±0.65	70.40±4.29
静置第 3 天	4.06±0.38	69.80±2.78
静置第 5 天	4.44±0.47	68.30±2.35
静置第 7 天	4.27±0.71	70.70±4.52
(24±2)℃		
静置即刻	3.59±0.38	70.40±4.53
静置第 1 天	4.00±0.21*	69.20±4.01
静置第 3 天	4.69±0.22*	71.00±3.46
静置第 5 天	6.29±1.24*	68.90±3.42
静置第 7 天	6.60±1.04*	69.70±3.89

与(24±2)℃下静置即刻比较,* $P<0.05$ 。

点和重要发展方向。将药物、基因或蛋白等配体连接在微泡造影剂表面,可实现对体内特定靶点药物和基因的靶向输送,以及特异的选择性成像,从而提高局部药物浓度和治疗效果^[7-8]。由于血脑屏障的存在,大分子药物很难进入神经系统,且外周血液中还存在着 BDNF 内切酶^[1],使得 BDNF 在血液中的半衰期很短,剂量不稳定,限制了其临床应用。如何使 BDNF 安全、稳定及高效地跨过血脑屏障到达靶区,是神经疾病治疗领域的关键。研究^[4]表明,超声引发的微泡空化效应能够可逆地开放大脑的血脑屏障,这为大分子药物透过血脑屏障进入神经系统创造了机会^[9],而如何将携带 BDNF 的配体与超声微泡造影剂耦连是技术的基础和关键。

本实验在前期“脂氟显”微泡造影剂^[5-6]脂质成膜材料的基础上,加入 DPPG-PEG(2000)-Biotin 制得含生物素化的脂膜超声微泡。聚乙二醇修饰二棕榈酰磷脂酰甘油钠的加入可防止微泡过度聚集,同时减少了其与血中蛋白、调理素、抗体及酶等的作用,避免被网状内皮系统识别吞噬,延长了微泡的循环时间,增加微泡稳定性^[6]。另外,由于聚乙二醇被生物素化,使得可以通过亲和素与其他含有生物素化的配体进行桥接形成复合体,从而为携带药物提供平台^[5],然后通过亲和素与粒径 200 nm 的含有生物素化聚乙二醇载 BDNF 的脂质体纳米微粒耦连,从而制备出粒径 1.2~6.8 μm 的新型 BDNF-UMCA。

为了验证新型 BDNF-UMCA 的载药量和包封率,本实验采用 ELISA 法对微泡溶液中游离药物含量和总体药物含量进行了检测,结果显示 BDNF-UMCA 具

有较高的药物包封率 $[(71.6\pm 2.6)\%]$,证实荧光亲和素与含生物素化脂膜微泡通过桥接作用实现稳定结合。另外, BDNF-UMCA 的稳定性在 4℃下,其平均粒径大小和包封率未随时间推移产生明显变化;而在(24±2)℃下,载 BDNF 脂质体纳米微粒是整体粒径产生变化的主要原因,说明在常温下脂质体纳米微粒粒径容易随放置时间延长逐渐变大。值得注意的是,(24±2)℃下的脂质体纳米微粒的粒径虽然变大,但整体包封率并无明显变化,说明纳米微粒并未因破裂导致 BDNF 溢出。本实验中体内声学特性检测也证明 BDNF-UMCA 可以很好地对动物肝脏进行增强显影,与 SonoVue 的造影增强效果无明显差异。

综上所述,本实验在前期“脂氟显”微泡造影剂研究的基础上,成功制备了 BDNF-UMCA,并验证了其高效的载药量和包封率,以及稳定性和声学造影增强能力,为进一步促使 BDNF 透过血脑屏障进入神经系统靶向治疗相关疾病奠定了基础。

参考文献

- [1] Numakawa T, Suzuki S, Kumamaru E, et al. BDNF function and intracellular signaling in neurons[J]. *Histol Histopathol*, 2010, 25(2): 237-258.
- [2] Iuvone PM, Boatright JH, Tosini G, et al. N-acetylserotonin: circadian activation of the BDNF receptor and neuroprotection in the retina and brain[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2014, 801(7): 765-771.
- [3] Neumann JT, Thompson JW, Raval AP, et al. Increased BDNF protein expression after ischemic or PKC epsilon preconditioning promotes electrophysiologic changes that lead to neuroprotection[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2015, 35(1): 121-130.
- [4] Wang S, Samiotaki G, Olumolade O, et al. Microbubble type and distribution dependence of focused ultrasound-induced blood-brain barrier opening[J]. *Ultrasound Med Biol*, 2014, 40(1): 130-137.
- [5] 王翔, 刘平, 高云华, 等. 含生物素化脂膜超声造影剂的制备与初步评价[J]. *临床超声医学杂志*, 2012, 14(3): 145-148.
- [6] 杨未晓, 王翔, 杨丹, 等. 一种载基因阳离子微泡的制备及与 SonoVue 的对比研究[J]. *中国超声医学杂志*, 2013, 29(4): 371-374.
- [7] Yoon YI, Kwon YS, Cho HS, et al. Ultrasound-mediated gene and drug delivery using a microbubble-liposome particle system[J]. *Theranostics*, 2014, 4(11): 1133-1144.
- [8] Shapiro G, Wong AW, Bez M, et al. Multiparameter evaluation of in vivo gene delivery using ultrasound-guided, microbubble-enhanced sonoporation[J]. *J Control Release*, 2016, 223(2): 157-164.
- [9] Aryal M, Vykhodtseva N, Zhang YZ, et al. Multiple treatments with liposomal doxorubicin and ultrasound-induced disruption of blood-tumor and blood-brain barriers improves outcomes in a rat glioma model[J]. *J Control Release*, 2013, 169(1-2): 103-111.

(收稿日期:2018-01-03)