

重组人睫状神经营养因子脂质体制备及性质

高剑坤¹, 范开^{2,3}, 侯再金¹, 张兵兵⁴, 杨黎³, 胡春兰³ (1.四川中医药高等专科学校, 四川 绵阳 621000; 2.重庆理工大学, 重庆 400050; 3.重庆富进生物医药公司, 重庆 400041; 4.重庆大学生物工程学院, 重庆 400044)

摘要: 目的 制备重组人睫状神经营养因子(recombinant human ciliary neurotrophic factor, rhCNTF)脂质体, 提高 rhCNTF 穿透血脑屏障能力。方法 采用薄膜超声法制备 rhCNTF 脂质体, 测定包封率。分别用 rhCNTF 原液、rhCNTF 脂质体及生理盐水尾静脉注射 Balb/C 小鼠, 0, 2, 6, 12, 24 h 后测小鼠脑组织中 rhCNTF 含量。结果 制得的 rhCNTF 脂质体形态圆整, 平均直径为 85.0 nm, 包封率为 93.14%。用 ELISA 法测定小鼠脑组织中 rhCNTF 的含量, rhCNTF 原液组和 rhCNTF 脂质体组存在显著差异。结论 制备的 rhCNTF 脂质体能提高 rhCNTF 穿越血脑屏障的能力, 为 rhCNTF 的进一步应用和研究提供了依据。

关键词: 睫状神经营养因子; 脂质体; 血脑屏障

中图分类号: R943.41

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2011)02-0146-04

Preparation and Evaluation of Liposome-encapsulated Recombinant Human Ciliary Neurotrophic Factor

GAO Jiankun¹, FAN Kai^{2,3}, HOU Zaijin¹, ZHANG Bingbing⁴, YANG Li³, HU Chunlan³ (1. *Sichuan College of Traditional Chinese Medicine, Mianyang 621000, China*; 2. *Chongqing University of Technology, Chongqing 400050, China*; 3. *Chongqing Fagen Biomedical Inc., Chongqing 400041, China*; 4. *Bioengineering College of Chongqing University, Chongqing 400044, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To enhance the penetration ability to cross the blood-brain barrier efficiently of recombinant human ciliary neurotrophic factor (rhCNTF) by encapsulated into liposome. **METHODS** rhCNTF liposomes were prepared by thin film dispersion-sonication method. Encapsulation efficiency was detected by HPLC. Mice were killed 0, 2, 6, 12 and 24 h after i.v. administration of rhCNTF solution, rhCNTF liposomes or saline, and then the content of rhCNTF in brain tissues was analyzed by ELISA. **RESULTS** rhCNTF liposomes were regular in its morphology with a mean diameter of 85.0 nm. The entrapment efficiency of rhCNTF was 93.14%. rhCNTF in mice brain tissue were different between rhCNTF solution group and rhCNTF liposomes group. **CONCLUSION** Liposome-encapsulated rhCNTF could efficiently cross the blood brain barrier, which provides a basis for further application and research of rhCNTF.

KEY WORDS: ciliary neurotrophic factor; liposomes; blood brain barrier

睫状神经营养因子(ciliary neurotrophic factor, CNTF)最初是从鸡胚的眼组织睫状节中提取出来, 因对睫状节神经元有营养作用并可维持鸡副交感神经节的存活而得名^[1-3]。经研究发现, CNTF 具有多种功能, 在神经系统, 肌肉系统, 肥胖症及其相关疾病的治疗中有重要意义, 具有广阔的临床开发前景^[4-5]。天然序列的 CNTF 蛋白因其不良反应较大, 在临床应用上受到影响^[6], 为寻找安全有效的 CNTF, 人们已研究出多种 CNTF 的突变体。另外, 由于血脑屏障的阻隔, CNTF 到达中枢神经系统的剂量受限^[7], 妨碍了 CNTF 用于帕金森氏症、老年痴呆症等疾病的治疗。脂质体作为药物的载体, 具有生物降解性和生物相容性, 可通过吸

收介导的胞吞作用更为高效地进入血脑屏障^[8]。由于一个 100 nm 的脂质体分子可以包裹上万个药物分子, 所以脂质体可以显著地增加药物在脑部的转运量, 脂质体复合制剂为 CNTF 在中枢神经系统中用药提供了可行的途径^[9]。本试验研究了 C 端去掉 15 个氨基酸, 同时将 17 位 Cys 突变为 Ala, 63 位 Gln 突变为 Arg 的重组人睫状神经营养因子(recombinant human CNTF, rhCNTF)脂质体的制备工艺及其经静脉注射后进入 Balb/C 小鼠脑组织中的情况。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

rhCNTF 原液(重庆富进生物医药公司制备);

基金项目: 绵阳市科技计划项目(08S002-4)

作者简介: 高剑坤, 女, 博士, 副研究员 Tel: (0816)2385301

Email: gjk_712@163.com

Human CNTF ELISA 试剂盒(美国 R&D Systems Inc., 批号: KX0016B); 单唾液酸四己糖神经节苷脂(GM1, 重庆富进生物医药公司); 胆固醇、磷脂酰乙醇胺(DSPE, 美国 Sigma 公司)。健康 Balb/C 小鼠[♀♂不限, 体重(25±2.0)g, 重庆医科大学, 实验动物合格证号: SYXK(渝)2002007]。

JYD-650 智能型超声波细胞粉碎机(上海三信仪器有限公司); 85A 旋转蒸发仪(上海医械专机厂); EF-C5 纳米高压均质机(加拿大 AVESTIN); LC-2010 高效液相色谱仪(日本岛津); Zetasizer 3000 激光粒子测定仪(英国马尔文); CP100MX 超速冷冻离心机(日本日立)。

1.2 rhCNTF 脂质体的制备

精密称取 250 mg GM1、500 mg DSPE 和胆固醇 1 000 mg 溶解于 50 mL 氯仿-甲醇(7:3)有机溶剂中, 充分溶解, 减压旋转蒸发成薄膜, 真空去除残余有机溶剂, 加入溶有 rhCNTF 的 10 mmol·L⁻¹ pH 7.4 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer, PB)洗膜, 在 37 °C 水浴中水合 2 h, 制得水性混悬液, 再经探头超声(功率 50 W, 超声 5 s, 间隔 4 s, 超声 25 次), 均质后过挤出器(滤膜孔径 100, 200 nm), 获得 rhCNTF 脂质体。

1.3 rhCNTF 脂质体包封率的测定

色谱条件: 色谱柱: LiChrospher C₁₈(250 mm×4 mm, 5 μm), 流动相 A 为: 0.1%三氟乙酸(TFA), 流动相 B 为: 0.1%TFA+70%乙腈。先用流动相 A 平衡柱子, 再由流动相 B 从 5%~95%梯度洗脱。时间: 30 min, 流速: 1 mL·min⁻¹, 检测波长: 280 nm, 柱温: 30 °C, 进样量: 20 μL。

用 10 mmol·L⁻¹ pH 7.4 PB 配制 1 mg·mL⁻¹ 的 rhCNTF 储备液 1, 精密量取储备液适量, 用流动相 A 稀释成质量浓度为 10, 20, 50, 100, 250, 500, 750, 1 000 μg·mL⁻¹ rhCNTF 溶液, 分别进样 20 μL HPLC 测定峰面积, 以峰面积 *Y* 对质量浓度 *X* 作线性回归, 确定峰面积与质量浓度间的关系。将 rhCNTF 脂质体溶于 1 mL 双蒸水, 再稀释 10 倍后, 100 000 r·min⁻¹ 离心 2 h, 洗涤收集各离心液, 将沉淀移至 10 mL 量瓶中, 用甲醇破乳, 并用流动相 A 定容至刻度, 摇匀, HPLC 测定浓度。根据离心沉淀和上清的峰面积, 确定 rhCNTF 浓度及含量, 按以下公式计算包封率。

$$\text{包封率}\% = 1 - \frac{\text{上清中rhCNTF含量}}{\text{rhCNTF总含量}} \times 100\%$$

1.5 ELISA 测定 rhCNTF 含量标准曲线

用 10 mmol·L⁻¹ pH 7.4 PB 配制成 1 μg·mL⁻¹ 的 rhCNTF 储备液 2, 精密量取储备液 2 适量, 用 Human CNTF ELISA 试剂盒样品稀释液稀释成 10, 20, 50, 100, 250, 500, 750, 1 000 ng·mL⁻¹ 的溶液, 加入酶标板进行测定, 同时取 Human CNTF ELISA 试剂盒样品稀释液作为空白对照。450 nm 测定 OD 值后, 根据 OD 值和样品浓度得出标准曲线。

1.6 精密度试验

HPLC 测定 rhCNTF 浓度精密度: 精密量取 rhCNTF 储备液 1 适量, 用流动相 A 稀释成质量浓度为 100, 250, 500 μg·mL⁻¹ 溶液。于 1 d 和 1 周内重复进样 5 次, 进样量 20 μL, 计算日内和日间精密度。

ELISA 测定 rhCNTF 含量精密度: 精密量取 rhCNTF 储备液 2 适量, 用 Human CNTF ELISA 试剂盒样品稀释液稀释成 100, 250, 500 ng·mL⁻¹ 溶液。于 1 d 和 1 周内重复测定 5 次, 计算日内和日间精密度。

1.7 rhCNTF 提取回收率

处死 18 只 Balb/C 小鼠, 取大脑用 PBS 清洗 3~4 次, 将小鼠大脑分为 6 组, 分别为空白脑+1 mL Human CNTF ELISA 试剂盒样品稀释液; 空白脑+1 mL 100 ng·mL⁻¹ rhCNTF; 空白脑+1 mL 150 ng·mL⁻¹ rhCNTF; 空白脑+1 mL 200 ng·mL⁻¹ rhCNTF; 空白脑+1 mL 250 ng·mL⁻¹ rhCNTF; 空白脑+1 mL 300 ng·mL⁻¹ rhCNTF, 进行匀浆后, 10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 取上清稀释后用 Human CNTF ELISA 试剂盒测定 OD 值, 根据标准曲线方程计算回收率。

1.8 rhCNTF 脂质体进入脑组织测定

将 78 只 Balb/C 小鼠, 分为 A, B, C, D 4 组。对 A 组 24 只小鼠尾静脉注射 5 mg·kg⁻¹ rhCNTF 原液(10 mmol·L⁻¹ PB pH7.4), B 组 24 只小鼠尾静脉注射 5 mg·kg⁻¹ rhCNTF 脂质体, C 组 24 只小鼠尾静脉注射 1.5 mg·kg⁻¹ rhCNTF 脂质体, D 组 6 只小鼠尾静脉注射同体积生理盐水。2, 6, 12, 24 h 后处死各组小鼠 6 只, 取大脑用 PBS 清洗 3~4 次, 充分去除血液及脑表面血管, 组织匀浆器匀浆后用 0.5 mL Human CNTF ELISA 试剂盒样品稀释液将匀浆液体洗出, 离心 10 000 r·min⁻¹, 10 min 取上清再用 Human CNTF ELISA 试剂盒样

品稀释液稀释 5 倍后用试剂盒进行测定 rhCNTF 含量。

2 结果

2.1 rhCNTF 脂质体制备条件及理化性质

采用有机溶剂为氯仿、甲醇, 超声功率 50 W, 间隙时间 4 s, 超声时间 5 s 超声次数 25 次制得的 rhCNTF 脂质体重复性好, 粒度分布均匀, 包封率稳定。峰面积 Y 对质量浓度 X 作线性回归, 回归方程为: $Y=12\ 244X+22\ 423(r=0.999\ 9)$, 表明在 10~1 000 μg 内线性关系良好。制备得到的 rhCNTF 脂质体的包封率为 $93.14\pm 3.21(n=5)$, rhCNTF 脂质体粒径为 20~200 nm, 分布均匀, 平均粒径为 85 nm, 见图 1。

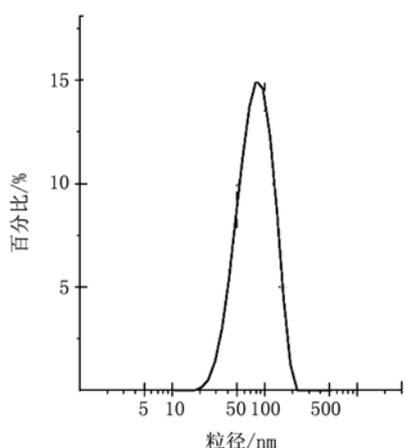


图 1 rhCNTF 脂质体粒径分布大小

Fig 1 Diameter size distribution(intensity) of liposome-encapsulated rhCNTF

2.2 ELISA 测定 rhCNTF 含量标准曲线

ELISA 测定 rhCNTF 含量的标准曲线为: $Y=66.011X-1.665\ 8(Y$ 为浓度, X 为 OD 值), $r=0.999\ 9$, 线性范围为 10~1 000 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

表 4 rhCNTF 原液、rhCNTF 脂质体及生理盐水尾静脉注射小鼠后 rhCNTF 在小鼠脑组织中含量

Tab 4 rhCNTF in mice brain tissue after injection of rhCNTF solution, rhCNTF liposome and saline

| 组别 | 剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ | 每克脑组织中 rhCNTF 含量/ ng | | | | |
|--------------|------------------------------------|-------------------------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|
| | | 0 h | 2 h | 6 h | 12 h | 24 h |
| rhCNTF 原液 | 5 | | 11.3 ± 1.3 | 19.5 ± 1.8 | 24.7 ± 1.7 | 20.1 ± 1.4 |
| rhCNTF 脂质体 1 | 5 | | $23.1\pm 2.1^{1)}$ | $72.4\pm 2.2^{1)}$ | $132.3\pm 2.4^{1)}$ | $115.2\pm 2.0^{1)}$ |
| rhCNTF 脂质体 2 | 1.5 | | 15.9 ± 2.0 | $42.6\pm 1.9^{1)}$ | $67.2\pm 2.6^{1)}$ | $58.5\pm 1.5^{1)}$ |
| 生理盐水 | 0 | 10.2 ± 2.0 | | | | |

注: 与 rhCNTF 原液组比较, $^{1)}P<0.01$

Note: Compared with rhCNTF solution, $^{1)}P<0.01$

3 讨论

用薄膜超声法制备 rhCNTF 脂质体时, 影响脂

2.3 rhCNTF 提取回收率

在 5 个浓度水平测定了 rhCNTF 的提取回收率, 见表 1。

表 1 rhCNTF 在小鼠脑组织中的提取回收率(450 nm)

Tab 1 The efficiency of recovery of rhCNTF from mice brain tissue(450 nm)

| 剂量/ ng | 回收率/% | RSD/% |
|-----------------|-------|-------|
| 100 | 68.5 | 2.63 |
| 150 | 60.7 | 3.75 |
| 200 | 66.6 | 1.69 |
| 250 | 65.6 | 1.72 |
| 300 | 63.4 | 0.91 |

2.4 精密度试验

HPLC 测定 rhCNTF 浓度的日内和日间精密度见表 2。ELISA 测定 rhCNTF 含量的日内和日间精密度见表 3。

表 2 HPLC 测定 rhCNTF 浓度的日内和日间精密度($n=5$)

Tab 2 Intra- and inter-precision of HPLC determination for rhCNTF($n=5$)

| 含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ | 日内精密度 | | 日间精密度 | |
|--------------------------------------|---------------------------------------|-------|---------------------------------------|-------|
| | 平均值/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ | RSD/% | 平均值/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ | RSD/% |
| 100 | 100.42 | 0.19 | 101.50 | 0.22 |
| 250 | 250.34 | 0.19 | 252.42 | 0.22 |
| 500 | 500.36 | 0.15 | 502.52 | 0.24 |

表 3 ELISA 测定 rhCNTF 含量的日内和日间精密度($n=5$)

Tab 3 Intra- and inter-precision of ELISA determination for rhCNTF($n=5$)

| 含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ | 日内精密度 | | 日间精密度 | |
|--------------------------------------|---------------------------------------|-------|---------------------------------------|-------|
| | 平均值/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ | RSD/% | 平均值/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ | RSD/% |
| 100 | 101.64 | 0.41 | 102.80 | 1.20 |
| 250 | 251.46 | 0.72 | 252.90 | 1.49 |
| 500 | 502.02 | 0.90 | 502.68 | 0.92 |

2.5 rhCNTF 脂质体进入脑组织情况

rhCNTF 脂质体进入小鼠脑组织情况见表 4。

质体理化性质的因素较多。有机溶剂、超声时间、功率及均质机挤压过膜的膜孔径是影响 rhCNTF

脂质体制备的重要因素。本试验比较了氯仿、甲醇、乙醇,以及有机溶剂的比例对制剂外观及粒度的影响,以乙醇为有机溶剂时脂质体粒径分布范围较宽,当氯仿、甲醇 50%/50%为有机溶剂时脂质体粒径较大,粒径分布范围宽,当氯仿、甲醇比例 70%/30%为有机溶剂制备的 rhCNTF 脂质体,粒径分布范围变窄。分别超声 10, 20, 25, 30, 35, 40 次,每次超声时间为 5 s,超声 25 次时脂质体混悬均匀,随着超声次数增多脂质体粒径减小,但次数过多脂质体出现不稳定或被破坏迹象。分别用 20, 50, 100 W 功率超声,超声功率为 50 W 时脂质体混悬均匀。以 100, 200, 500, 1 000 nm 孔径的微孔滤膜制备 rhCNTF 脂质体,以 100, 200 nm 孔径制备脂质体的粒径较好。

测定脂质体包封率时, rhCNTF 脂质体经高速离心形成沉淀,沉淀中 rhCNTF 的含量即为形成脂质体的 rhCNTF 的含量,上清中的 rhCNTF 即为未包封的药^[10],由此可计算脂质体的包封率。

CNTF 或其神经营养因子用于治疗中枢神经系统疾病的最大困难是全身用药不能穿越血脑屏障^[11],不能到达靶组织。本试验为实现含 rhCNTF 脂质体的脑靶向给药,将在血脑屏障中存在受体,能快速主动进入脑组织的 GM1 作为脂质体配方中的主要成分,GM1 与一定的磷脂和胆固醇组合,经薄膜超声法和挤压法制备出含 rhCNTF 的独特脂质体,制备工艺简单。用本试验方法制备的 rhCNTF 脂质体和 rhCNTF 原液分别静脉注射小鼠后,取脑组织匀浆,用 ELASE 测定含量,未经脂质体包裹的 rhCNTF 有微量进入脑组织中,而 rhCNTF 经脂质体包裹后,进入脑组织中的 rhCNTF 显著提高 5 倍以上,即 rhCNTF 脂质体对

改善 CNTF 的体内行为、提高其生物利用度具有突出优势。为进一步的应用和研究提供了依据。

REFERENCES

- [1] ADLER R, LANDA K B, MANTHORPE M, et al. Cholinergic neurotrophic factors: intraocular distribution of trophic activity for ciliary neurons [J]. *Science*, 1979, 204(4400): 1434-1436.
- [2] BARBIN G, MANTHORPE M, VARON S. Purification of the chick eye ciliary neurotrophic factor [J]. *J Neurochem*, 1984, 43(5): 1468-1478.
- [3] LIN L F, MISMER D, LILE J D, et al. Purification, cloning, and expression of ciliary neurotrophic factor (CNTF) [J]. *Science*, 1989, 246(4933): 1023-1025.
- [4] STEWART C E, RITTWEGER J. Adaptive processes in skeletal muscle: molecular regulators and genetic influences [J]. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2006, 6(1): 73-86.
- [5] LAMBERT P D, ANDERSON K D, SLEEMAN M W, et al. Ciliary neurotrophic factor activates leptin-like pathways and reduces body fat, without cachexia or rebound weight gain, even in leptin-resistant obesity [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(8): 4652-4657.
- [6] REZENDE A C, PERONI D, VIEIRA A S, et al. Ciliary neurotrophic factor fused to a protein transduction domain retains full neuroprotective activity in the absence of cytokine-like side effects [J]. *J Neurochem*, 2009, 109(6): 1680-1690.
- [7] PAN W, KASTIN A J. Interactions of cytokines with the blood-brain barrier: implications for feeding [J]. *Curr Pharm Des*, 2003, 9(10): 827-831.
- [8] CHEN W, MTHTA S C, LU D R. Selective boron drug delivery to brain tumors for boron neutron capture therapy [J]. *Adv Drug Del Rev*, 1997, 26(2/3): 231-247.
- [9] TAN M L, CHOONG P F, DASS C R, et al. Recent developments in liposomes, microparticles and nanoparticles for protein and peptide drug delivery [J]. *Peptides*, 2010, 31(1): 184-93.
- [10] JOSHI M, PATRAVALE V. Nanostructured lipid carrier (NLC) based gel of celecoxib [J]. *Int J Pharm*, 2008, 346(1/2): 124-132.
- [11] Emerich D F, Thanos C G. Intracompartmental delivery of CNTF as therapy for Huntington's disease and retinitis pigmentosa [J]. *Curr Gene Ther*, 2006, 6(1): 147-159.