

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.16.006

[http://www.crter.org]

包国庆, 龙大宏, 陈艳, 刘菲菲, 张君度. 载神经生长因子纳米药物体外诱导PC12细胞的药效[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(16):2891-2898.

## 载神经生长因子纳米药物体外诱导PC12细胞的药效\*\*\*

包国庆<sup>1</sup>, 龙大宏<sup>2</sup>, 陈艳<sup>3</sup>, 刘菲菲<sup>1</sup>, 张君度<sup>1</sup>

1 广州医学院人体解剖教研室, 广东省广州市 510182

2 广州医学院继续教育学院, 广东省广州市 510182

3 广州医学院第二附属医院康复科, 广东省广州市 510260

### 文章亮点:

1 以亲水性和柔顺性较好的新型生物可降解材料聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸共聚物制备高包封率的载神经生长因子的纳米粒, 并探讨其对PC12细胞的体外诱导效果评价。

2 载神经生长因子的聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸共聚物纳米粒理化性质优良, 在体外有良好的缓释效能及无毒性作用。

### 关键词:

生物材料; 纳米生物材料; 神经生长因子; 聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸共聚物; 纳米药物; 复乳化溶剂扩散法; 纳米粒; PC12细胞; 省级基金

### 摘要

**背景:** 研究发现经表面修饰过的聚合物纳米粒能通过血脑屏障, 可以改善药物对中枢神经系统疾病的疗效。

**目的:** 以生物可降解材料聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸共聚物制备高包封率的载神经生长因子的纳米粒, 并初步探讨其对PC12细胞的体外诱导效果评价。

**方法:** 采用复乳化溶剂扩散法制备载牛血清白蛋白的聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸共聚物纳米粒, 用单因素分析及正交设计对工艺进行优化筛选; 扫描电镜观察纳米粒形态; 纳米粒分析仪测定平均粒径和分散指数; BCA法测定纳米粒包封率及载药量, 并进一步研究纳米粒体外释放特性。得到最好的制备方案后, 制备载神经生长因子的聚合物纳米粒, 并以此处理PC12细胞, 倒置荧光显微镜观察载神经生长因子的聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸共聚物纳米粒对PC12细胞的体外诱导状况, 对其诱导效果、毒性及缓释效果进行评价。

**结果与结论:** 最优处方制备的载牛血清白蛋白的聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸共聚物纳米粒呈球形、大小均匀, 平均粒径(258.9±5.73) nm, 包封率为(80.56±2.23)%, 内水相中投药量10 mg时载药量约(4.24±0.12)%, 体外释放符合Higuchi方程, 分初期突释释放和后期缓释释放2个阶段, 0-56 d的累积释放总量分别为76.61%(牛血清白蛋白)、62.34%(神经生长因子)。载神经生长因子的聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸共聚物纳米粒可以诱导PC12细胞像神经元样分化效能, 表现出良好的缓释性能及无毒性作用。提示制备的载神经生长因子的聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸共聚物纳米粒理化性质优良, 在体外有良好的缓释效能及无毒性作用。

## Pharmacodynamics effect of nerve growth factor-loaded nanoparticles to induce PC12 cells

Bao Guo-qing<sup>1</sup>, Long Da-hong<sup>2</sup>, Chen Yan<sup>3</sup>, Liu Fei-fei<sup>1</sup>, Zhang Jun-du<sup>1</sup>

1 Department of Anatomy, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182, Guangdong Province, China

2 School of Continuing Education, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182, Guangdong Province, China

包国庆★, 男, 1983年生, 内蒙古自治区科尔沁右翼中旗人, 蒙古族, 广州医学院在读硕士, 主要从事神经生物学方面的研究。  
Baoguoqing1319@163.com

通讯作者: 龙大宏, 博士, 博士生导师, 教授, 广州医学院继续教育学院, 广州市 510182  
dahonglong88@yahoo.com

中图分类号:R318  
文献标识码:A  
文章编号:2095-4344  
(2013)16-02891-08

收稿日期: 2013-01-19  
修回日期: 2013-02-19  
(20120927004/YJ·W)

Bao Guo-qing★, Studying for master's degree, Department of Anatomy, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182, Guangdong Province, China  
Baoguoqing1319@163.com

3 Department of Rehabilitation, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510260, Guangdong Province, China

### Abstract

**BACKGROUND:** It is found that the surface-modified polymer nanoparticles can pass through the blood-brain barrier, and improve the drug effects on the central nervous system diseases.

**OBJECTIVE:** To prepare nerve growth factor-loaded high encapsulation efficiency nanoparticles with a iodegradable material, polyethylene glycol-poly(lactic acid glycolic acid) copolymer, and to explore its effect on PC12 cells.

**METHODS:** Bovine serum albumin-loaded polyethylene glycol-poly(lactic acid glycolic acid) copolymer nanoparticles were prepared using complex emulsion solvent diffusion method. The production process was screened by univariate analysis and orthogonal design method. The nanoparticle morphology was observed under scanning electron microscopy, and the average particle diameter and the dispersion index were measured by nanoparticle analyzer. The nanoparticle encapsulation efficiency and drug loading were analyzed by BCA method. Nanoparticle release *in vitro* was also investigated. After optimization of the preparation program, nerve growth factor-loaded polymer nanoparticles were prepared and applied to PC12 cells. The cells were then observed by inverted fluorescence microscope, and the induction effects, toxicity and slow-release effect of polyethylene glycol-poly(lactic acid glycolic acid) copolymer nanoparticles loaded with nerve growth factor were evaluated.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Bovine serum albumin-loaded polyethylene glycol-poly(lactic acid glycolic acid) copolymer nanoparticles were prepared by optimal method. The nanoparticles were spherical, and uniform in size, with an average particle size of  $(258.9 \pm 5.73)$  nm, and the encapsulation efficiency was  $(80.56 \pm 2.23)\%$ . When the dosage within the aqueous phase was 10 mg, the drug loading was  $(4.24 \pm 0.12)\%$ . The *in vitro* release of nanoparticles was in accordance with the Higuchi equation of. Release of the nanoparticles could be divided into two stages: initial burst release stage and late sustained release. The total cumulative release amount of bovine serum albumin and nerve growth factor in 0-56 days was 76.61% and 62.34%, respectively. The PC12 cells could be induced to differentiation by polyethylene glycol-poly(lactic acid glycolic acid) copolymer nanoparticles loaded with nerve growth factor, and the nanoparticles exhibited good release properties and no toxic effects. It was showed that nerve growth factor-loaded polyethylene glycol-poly(lactic acid glycolic acid) copolymer nanoparticles prepared by the optimal method had excellent physicochemical properties, good release properties *in vitro* and no toxic effects.

**Key Words:** biomaterials; nanobiomaterials; nerve growth factor; polyethylene glycol-poly(lactic acid glycolic acid) copolymer; nano-drugs; complex emulsion solvent diffusion method; nanoparticles; PC12 cells; provincial grants-supported paper

Corresponding author: Long Da-hong, Doctor, Doctoral supervisor, Professor, School of Continuing Education, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182, Guangdong Province, China  
dahonglong88@yahoo.com

Supported by: the Natural Science Foundation of Guangdong Province, No. 9151063101000016\*; the Applied Basic Research Plan of Guangzhou Science and Technology Bureau, No. 2009J1-C361-2\*; Scientific Research Plan in Colleges and Universities of Guangzhou City, No. 2012C042\*

Received: 2013-01-19  
Accepted: 2013-02-19

Bao GQ, Long DH, Chen Y, Liu FF, Zhang JD. Pharmacodynamics effect of nerve growth factor-loaded nanoparticles to induce PC12 cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(16): 2891-2898.

## 0 引言

神经生长因子是神经系统重要的生物活性分子之一, 在正常情况下参与神经元存活、分化及突触功能, 在病理情况下, 可保护神经元避免损伤, 促进损伤修复<sup>[1-3]</sup>。神经生长因子通过TrkA和P75受体产生生物学效应, 其受体主要存在于交感神经元与感觉神经元, 促进胆碱能神经元的存活, 抑制其死亡, 从而改善神经系统退变性疾病阿尔茨海默症等<sup>[4-5]</sup>。但是, 由于神经生长因子难以通过血脑屏障以及在体内环境中半衰期短, 会降低药物的有效利用率。目前对阿尔茨海默症的发病机制尚不清楚, 而且治疗手段非常有限, 效果也不甚理想<sup>[6]</sup>。早期临床治疗当中采取了脑室内注入神经生长因子的治疗措施虽然有效, 但增加患者的痛苦及感染概率<sup>[6]</sup>。已有研究宣称表面修饰的纳米粒药物载体能在不改变血脑屏障正常生理功能的情况下穿过血脑屏障发挥生物学效应<sup>[8-9]</sup>, 为神经生长因子治疗中枢神经系统疾病带来新的方向。纳米粒作为药物载体具有靶向性、缓释性、控释性、穿透性以及保护药物不被降解等多重效应, 有利于药物在特殊部位的治疗<sup>[10]</sup>。聚乳酸-聚羟基乙酸共聚物是常用的聚合物材料之一, 已被美国食品药品监督管理局批准, 具有支架和缓释的双重作用高分子<sup>[11-12]</sup>。聚乙二

醇修饰的聚乳酸-聚乙醇酸共聚物是一种生物相容性好、可生物降解、无毒性、亲水性好的聚酯类高分子, 在体内最终代谢成水和二氧化碳<sup>[13]</sup>。如果以聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸共聚物为材料制备神经营养因子纳米粒, 则不仅可以使神经营养因子进入脑内, 其纳米粒的缓释作用还可以避免短期内重复给药, 提高药物的利用率<sup>[14]</sup>。

实验以神经生长因子为模型药物, 聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸共聚物为药物载体, 采用复乳化溶剂扩散法制备载神经生长因子的聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸纳米粒<sup>[15]</sup>, 但因为神经生长因子价钱昂贵, 因此先以牛血清白蛋白为模型药物, 在单因素考察的基础上利用正交设计优化制备工艺, 并进一步表征纳米粒外表形态, 平均粒径及其分布状况, 包封率, 载药量。得到最好的制备方案后, 制备载神经生长因子的聚合物纳米粒, 并对2种纳米粒进行药物释放规律的研究和比较, 最终建立了适合本实验的纳米药物载体制备工艺。并初步探讨载神经生长因子的聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸纳米粒体外诱导PC12细胞药效评价。

## 1 材料和方法

**设计:** 分子水平、细胞水平体外观察。

**时间及地点:** 于2011年3月至2012年8月在广州医学院人体解剖楼神经生物学实验室完成。

**材料:**

**实验细胞:** PC12细胞购自中国科学院上海细胞库。

**纳米药物制备和药效评价的主要试剂:**

**Main reagents:**

| 试剂   | 来源                     |
|--|------------------------|
| 聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸共聚物<br>(相对分子质量 25 000, 甲基聚乙二醇嵌段相对分子质量 5 000) | 山东岱罡生物科技有限公司           |
| 牛血清白蛋白, 聚乙烯醇, 吡啶橙  | 美国 SIGMA 公司            |
| 重组小鼠 $\beta$ -神经生长因子                                     | 美国 Peptrotech 公司       |
| BCA 试剂盒  | 美国 Thermo 公司           |
| 小鼠 $\beta$ -神经生长因子 ELISA 试剂盒                             | 上海劲马实验设备有限公司<br>(进口分装) |
| DMEM+F12, 马血清, 胎牛血清                                      | 美国 GIBCO 公司            |
| 扫描电子显微镜  | 美国 FEI 公司              |
| Zetasizer Nano-ZS90 粒度分析仪                                | 英国马尔文公司                |
| 酶标仪  | 奥地利 TECAN 公司           |
| 倒置相差显微镜  | 日本奥林巴斯公司               |

**方法:**

**载牛血清白蛋白的聚乳酸聚乙醇酸纳米粒的制备:** 将一定量牛血清白蛋白溶于50  $\mu$ L去离子水溶液中, 形成内水相(W1)。180 mg的聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸共聚物溶于1 mL体积分数二氯甲烷/丙酮(1/1)的混合溶液中, 将蛋白溶液加入到聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸共聚物溶液中, 在冰浴条件下超声1 min(功率为55 W), 形成油包水(W1/O)型乳液。将获得的(W1/O)型乳液加入到20 mL一定浓度的聚乙烯醇水溶液中, 在冰浴条件下再次超声7 min(功率为100 W), 即形成水包油包水(W1/O/W2)型复乳液。在室温常压下磁力搅拌3 h, 挥发有机溶剂。然后, 将固化的纳米粒通过低温高速离心(4  $^{\circ}$ C, 12 000 r/min, 20 min)收集, 弃去上清液, 去除残留的聚乙烯醇以及游离的牛血清白蛋白。双蒸水悬起纳米粒, 重复洗条2次, 将得到的纳米粒冻干后, 4  $^{\circ}$ C环境下冷藏。

**聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸纳米粒最优处方的筛选:**

**单因素考察:** 根据课题组以往的实验结果及预实验的基础上<sup>[16-17]</sup>, 固定内水相中牛血清蛋白的浓度为200 g/L, 油相体积为1 mL, 二氯甲烷与丙酮的体积比为1:1, 外水相体积为20 mL, 选取可能影响纳米粒大小及包封率的4个因素, 进行单因素分析, 见表1。

表1 聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸共聚物纳米粒最优处方筛选的单因素考察水平表

Table 1 Single factor level table for optimal prescription screening of polyethylene glycol-poly(lactic acid glycolic acid) copolymer nanoparticles

| 实验号 | 聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸共聚物质量浓度(g/L, 在油相中) | 聚乙烯醇质量浓度(g/L) | 超声时间(min) | 内水相与油相体积比 |
|-----|--------------------------------|---------------|-----------|-----------|
| 1   | 30                             | 10            | 3         | 50/1 000  |
| 2   | 60                             | 15            | 7         | 100/1 000 |
| 3   | 90                             | 20            | 11        | 200/1 000 |
| 4   | 120                            | 25            | 15        | 300/1 000 |
| 5   | 150                            | 30            | 19        | 500/1 000 |

注: 影响纳米粒大小及包封率的因素包括聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸共聚物质量浓度、聚乙烯醇质量浓度、超声时间和内水相与油相比例。

**正交设计:** 根据单因素实验得到的结果, 选择聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸共聚物(g/L)、聚乙烯醇质量浓度和超声时间(min)3个因素, 每个因素各取3个水平按照 $L_9(3^4)$ 正交实验设计表设计实验, 以纳米粒粒径为评价指标对各个处方进行综合评定, 正交设计因素水平见表2。

表 2 聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸共聚物纳米粒最优处方筛选的正交设计因素与水平

Table 2 The orthogonal design factors and the level of optimal prescription screening of polyethylene glycol-poly(lactic acid glycolic acid) copolymer nanoparticles

| 实验号 | 聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸共聚物浓度(g/L, 在油相中) | 聚乙烯醇质量浓度(g/L) | 超声时间(min) |
|-----|------------------------------|---------------|-----------|
| 1   | 60                           | 20            | 7         |
| 2   | 90                           | 25            | 11        |
| 3   | 120                          | 30            | 15        |

重现性考察: 按优化处方制备5批样品, 分别测定其平均粒径和包封率, 考察优化处方的稳定性。

载神经生长因子的聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸纳米粒制备: 生物可降解微球能够持续释放神经生长因子, 部分学者已经成功制备了神经生长因子缓释微球<sup>[18]</sup>。为了寻找到适合制备载神经生长因子的聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸纳米粒的条件, 在前面研究当中已经通过正交设计制定了优化方案。与载牛血清白蛋白的聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸纳米粒制备过程比较制备载神经生长因子的聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸纳米粒是5 μg神经生长因子加入含10 mg牛血清白蛋白的溶液中成内水相, 其余步骤和制备载牛血清白蛋白的聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸纳米粒完全相同。

纳米粒表面形态观察、平均粒径、包封率、载药量及体外释放度的测定:

形态的观察: 取纳米粒混悬液少量, 滴在盖玻片上, 晾干。喷金后在扫描电子显微镜观察粒子的表面形态。

纳米粒平均粒径及粒径分布的测定: 取纳米粒混悬液适量, 经适当稀释后用 Zetasizer Nano-ZS90 粒度分析仪测定, 动态光散射软件(Zetasizer软件, 英国马尔文公司)数据处理, 记录平均粒径、分散指数。

包封率和载药量的测定: 收集制备过程中离心后的上清液置于50 mL容量瓶中, 定容, 再取100 μL定容后的溶液到96孔板中, 再加入微型BCA试剂盒混合反应液100 μL, 60 °C环境下放置1 h后用酶标仪在570 nm波长下测吸光度值。将吸光度值代入标准曲线方程, 计算出上清液中游离药物量, 通过以下公式进行计算:

$$\text{包封率} = \frac{(\text{投药量} - \text{游离药物量})}{\text{投药量}} \times 100\%$$

$$\text{载药量} = \frac{(\text{投药量} - \text{游离药物量})}{\text{纳米粒的质量}} \times 100\%$$

纳米粒体外释放度的测定: 制备纳米粒, 测包封率, 再用pH 7.4的PBS稀释已收集好的纳米粒, 平均分装10组(2 mL离心管), 任选3组, 再加少许PBS, 在37 °C 100 r/min的条件下进行释放试验。4, 8, 12, 24, 48 h后取样, 之后每隔1 d各取样1次。第5周开始, 每周取样1次, 取样方法: 离心(12 000 r/min, 4 °C)取上清液, 并在离心管中加入等量的新鲜PBS缓冲液。采用BCA法测定上清液中牛血清白蛋白的含量, ELISA试剂盒测定神经生长因子含量, 并记录了56 d内的释放量。

NGF-PEG-PLGA-NPs诱导PC12细胞分化: PC12 细胞接种于鼠尾胶原包被的培养皿中, 在 DMEM+F12培养液中含体积分数10%马血清, 体积分数5%胎牛血清, 100×10<sup>6</sup> U/L 青霉素, 100 g/L链霉素, 200 mg/L的谷氨酰胺培养, 37 °C、体积分数5% CO<sub>2</sub>及饱和湿度条件下的细胞培养箱中培养, 隔天换液, 待单层培养细胞生长至 80%–90%时1:3传代培养。取对数生长期细胞, 按1×10<sup>8</sup> L<sup>-1</sup>细胞浓度接种六孔板中, 培养6 h贴壁后, 载神经生长因子的聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸纳米粒组细胞加入载神经生长因子的聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸纳米粒混悬液200 μL(含30 mg纳米粒, 纳米粒冻干粉用DMEM+F12培养基稀释)。空白对照组细胞中加入200 μL载牛血清白蛋白的聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸纳米粒含量30 mg的DMEM+F12培养基, 阳性对照组细胞中加入200 μL的含神经生长因子的DMEM+F12培养基(神经生长因子浓度为50 μg/L), 阴性对照组细胞中加入200 μL的DMEM+F12培养基。给药72 h后进行吖啶橙染色, 之后用倒置相差显微镜观察细胞形态的变化。

主要观察指标: ①扫描电镜观察纳米粒形态。②纳米粒分析仪测定平均粒径和分散指数。③BCA法测定纳米粒包封率及载药量, 并进一步研究纳米粒体外释放特性。④倒置荧光显微镜观察PC12细胞形态变化。

统计学分析: 应用统计分析软件SAS 9.0对实验数据进行方差分析。P < 0.05为差异有显著性意义。

## 2 结果

2.1 聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸共聚物纳米粒最优处方筛选的单因素考察结果 结果显示随着有机溶剂中聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸共聚物浓度的增加, 纳米粒粒径显著增大, 增加到120 g/L以上时粒径基本恒定。随着聚乙烯醇浓度的提高纳米粒平均粒径增大。随着超声时间延长, 平均粒径逐渐降低, 而且粒径分布更集中, 见表3。有机相与外水相的比例对粒径无明显影响。

表 3 聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸共聚物纳米粒最优处方筛选的单因素考察结果

Table 3 Single factor screening results for the optimal prescription of polyethylene glycol-poly(lactic acid glycolic acid) copolymer nanoparticles loaded with nerve growth factor

| 实验号 | 因素 A                           |               | 因素 B           |         | 因素 C       |         | 因素 D      |         |
|-----|--------------------------------|---------------|----------------|---------|------------|---------|-----------|---------|
|     | 聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸共聚物质量浓度(g/L, 在油相中) | 聚乙醇醇质量浓度 (nm) | 聚乙醇醇质量浓度 (g/L) | 粒径 (nm) | 超声时间 (min) | 粒径 (nm) | 内水相与油相体积比 | 粒径 (nm) |
| 1   | 30                             | 189           | 10             | 228     | 3          | 280     | 50/1 000  | 158     |
| 2   | 60                             | 230           | 15             | 241     | 7          | 262     | 100/1 000 | 155     |
| 3   | 90                             | 255           | 20             | 252     | 11         | 250     | 200/1 000 | 162     |
| 4   | 120                            | 269           | 25             | 261     | 15         | 251     | 300/1 000 | 145     |
| 5   | 150                            | 270           | 30             | 254     | 19         | 247     | 500/1 000 | 150     |

注: 不同因素对纳米粒平均粒径影响不同, 但都有规律可循。各组实验均重复 3 次。表 3 中的结果与表 1 的干预因素对应。

2.2 聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸纳米粒最优处方筛选的正交设计结果 在单因素考察的基础上, 采用正交设计对纳米粒处方进行优化, 以制备粒径较大, 分散指数较小, 高包封率的载牛血清白蛋白的聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸纳米粒, 见表 4。

表 4 聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸共聚物纳米粒最优处方筛选的  $L_9(3^4)$  正交实验结果

Table 4  $L_9(3^4)$  orthogonal experiment results for the optimal prescription screening of polyethylene glycol-poly(lactic acid glycolic acid) copolymer nanoparticles

| 实验号   | 聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸共聚物浓度 (g/L, 在油相中) | 聚乙醇醇质量浓度 (g/L) | 超声时间 (min) | 聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸共聚物纳米粒平均直径 (nm) |
|-------|-------------------------------|----------------|------------|-----------------------------|
| 1     | 60                            | 20             | 7          | 211                         |
| 2     | 60                            | 25             | 11         | 226                         |
| 3     | 60                            | 30             | 15         | 206                         |
| 4     | 90                            | 20             | 11         | 223                         |
| 5     | 90                            | 25             | 15         | 245                         |
| 6     | 90                            | 30             | 7          | 251                         |
| 7     | 120                           | 20             | 15         | 250                         |
| 8     | 120                           | 25             | 7          | 272                         |
| 9     | 120                           | 30             | 11         | 269                         |
| $K_1$ | 214                           | 228            | 245        |                             |
| $K_2$ | 240                           | 246            | 239        |                             |
| $K_3$ | 264                           | 242            | 234        |                             |
| R     | 50                            | 18             | 11         |                             |

注:  $K$  是各因素下所得粒径的均值;  $R$  是均值的极差。

根据极差  $R$  及正交设计结果进行方差分析, 结果制

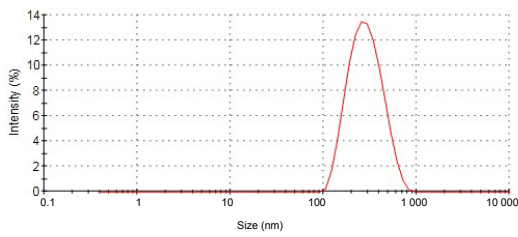
备参数聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸共聚物的差异有显著性意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 5。聚乙烯醇、超声时间的差异无显著性意义。3 个因素对纳米粒粒径大小影响的重要性顺序为 聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸共聚物浓度 > 聚乙烯醇浓度 > 超声时间, 最佳制备条件是聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸共聚物浓度 3、聚乙烯醇浓度 3、超声时间 1, 但是最佳处方制备出来的纳米粒包封率仅为 47%, 预实验时发现影响包封率的主要因素是内水相体积和油相中聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸共聚物的浓度, 内水相体积越少, 聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸共聚物的质量浓度越高, 包封率就越高。内水相体积不变的情况下, 聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸共聚物的质量浓度 120-180 g/L 是粒径增大并不显著, 但包封率明显提高, 但质量浓度到达 210 g/L 时纳米粒粒径出现 2 个分布区域, 包封率是影响纳米粒效能的一个重要指标, 因此最佳制备条件, 即: 聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸共聚物为 180 g/L、聚乙烯醇浓度为 3%、超声时间为 7 min、内水相体积为 50  $\mu$ L。根据优化方案重复制备 5 批样本的粒径分别为 250.6, 253.2, 259.8, 263.3, 269.1 nm, 包封率为 81.51%, 79.37%, 81.56%, 77.01%, 84.04%, 理论载药量分别为 4.28%, 4.18%, 4.29%, 4.05%, 4.42%。最佳处方制备出来的纳米粒具有较好的重复性, 平均粒径较大, 高包封率及较高的载药量等特点。

表 5 聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸共聚物纳米粒最优处方筛选平均粒径的方差分析结果

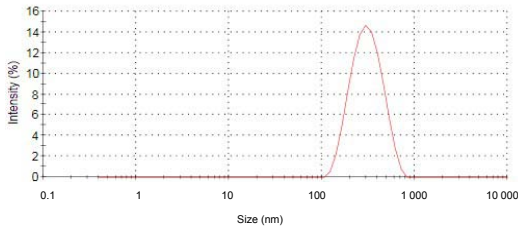
Table 5 Analysis of variance of the average particle size of polyethylene glycol-poly(lactic acid glycolic acid) copolymer nanoparticles in optimal prescription screening

| 方差来源              | 平方积      | $r$ | 均方       | $F$   | $P$     |
|-------------------|----------|-----|----------|-------|---------|
| 聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸共聚物浓度 | 3 651.55 | 2   | 1 825.77 | 26.17 | 0.036 8 |
| 聚乙烯醇浓度            | 614.88   | 2   | 307.44   | 4.41  | 0.185 0 |
| 超声时间              | 181.55   | 2   | 90.77    | 1.30  | 0.434 6 |

2.3 载神经生长因子的聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸纳米粒和载神经生长因子的聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸纳米粒的表面形态观察、平均粒径和体外释放度 最优处方制备得到的载神经生长因子的聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸纳米粒和载神经生长因子的聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸纳米粒平均粒径分别为 262.1 nm 和 264.1 nm, 粒径分布均匀, 呈单峰曲线, 分布指数分别为 0.175 和 0.172, 见图 1。纳米粒形态见图 2。



A: 载神经生长因子的聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸纳米粒

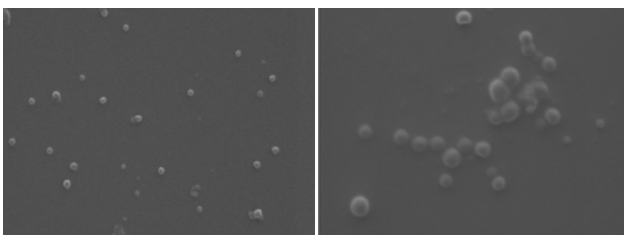


B: 载牛血清白蛋白的聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸纳米粒

注: 最优处方制备得到的载神经生长因子的聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸纳米粒平均粒径为 262.1 nm。而最优处方制备得到的载牛血清白蛋白的聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸纳米粒平均粒径为 264.1 nm, 粒径分布均匀, 呈单峰曲线, 分布指数为 0.172。

图 1 载神经生长因子的聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸纳米粒和载牛血清白蛋白的聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸纳米粒的粒径分布图

Figure 1 Distribution of the particle size of polyethylene glycol-poly(lactic acid) glycolic acid copolymer nanoparticles loaded with nerve growth factor or with bovine serum albumin



A: 载神经生长因子的聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸纳米粒( $\times 30\ 000$ ) B: 载牛血清白蛋白的聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸纳米粒( $\times 40\ 000$ )

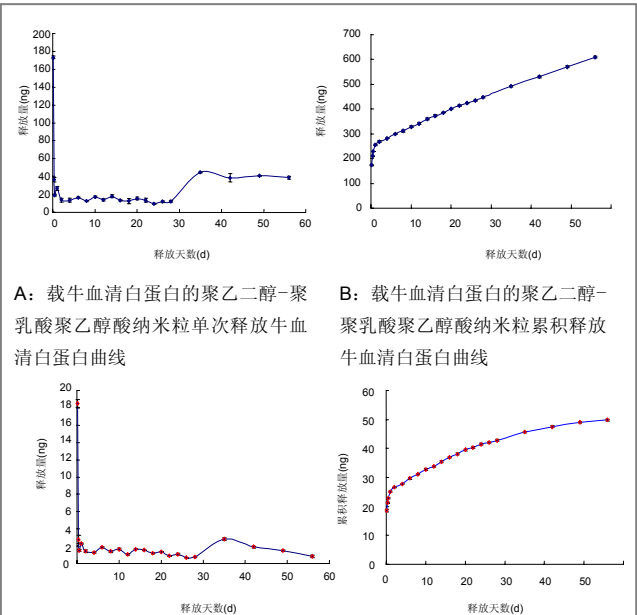
注: 扫描电镜可见载神经生长因子的聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸纳米粒和载牛血清白蛋白的聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸纳米粒呈球形, 大小均匀。

图 2 载神经生长因子的聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸纳米粒和载牛血清白蛋白的聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸纳米粒的显微镜形态

Figure 2 Morphology of polyethylene glycol-poly(lactic acid) glycolic acid copolymer nanoparticles loaded with nerve growth factor or with bovine serum albumin

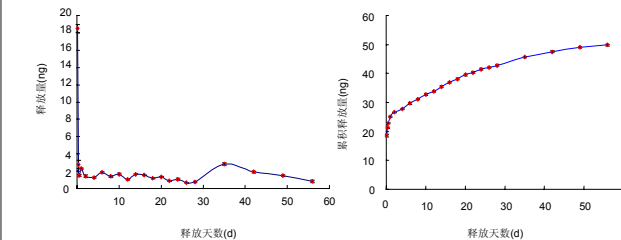
纳米粒扫描电镜可见载神经生长因子的聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸纳米粒和载牛血清白蛋白的聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸纳米粒呈球形, 大小均匀, 表面光滑, 见图2。

载牛血清白蛋白的聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸纳米粒和载神经生长因子的聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸纳米粒体外释放行为表现为初期为突释现象和后期为缓慢释放 2 种状态, 0-56 d 的累积释放行为 Higuchi 方程分别为  $Q=55.02 t^{1/2}+165.96(R^2=0.980\ 1)$ (牛血清白蛋白)、 $Q=4.38 t^{1/2}+19.46(R^2=0.988\ 9)$ (神经生长因子), 累积释放总量牛血清白蛋白为 76.61%、神经生长因子为 62.34%, 见图 3。



A: 载牛血清白蛋白的聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸纳米粒单次释放牛血清白蛋白曲线

B: 载牛血清白蛋白的聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸纳米粒累积释放牛血清白蛋白曲线



C: 载神经生长因子的聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸纳米粒单次释放神经生长因子曲线

D: 载神经生长因子的聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸纳米粒累积释放神经生长因子曲线

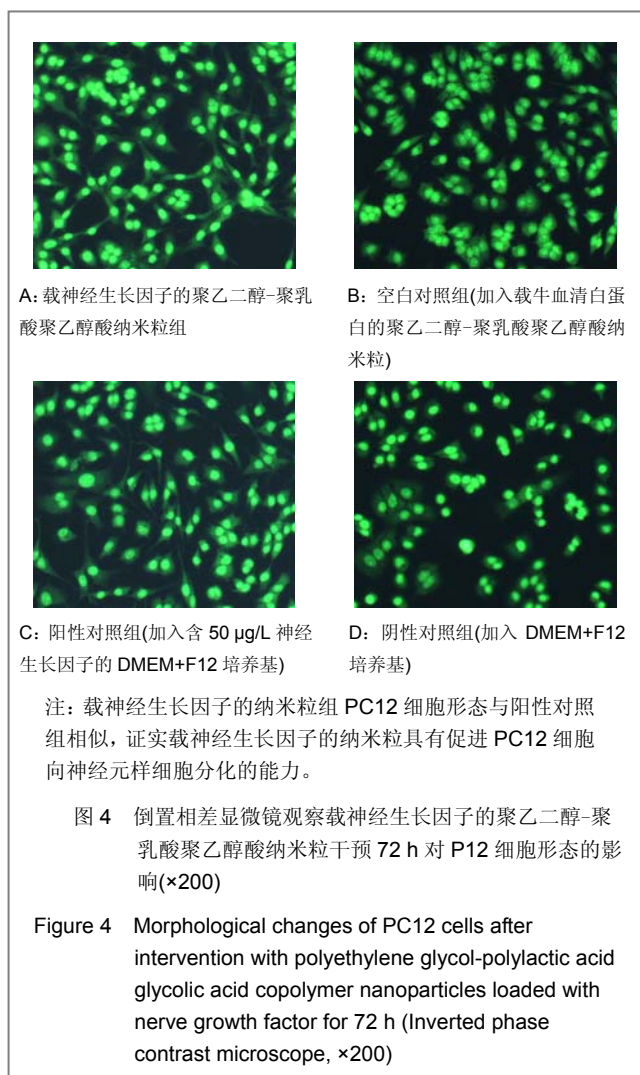
注: 牛血清白蛋白的聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸纳米粒和载神经生长因子的聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸纳米粒体外释放行为表现为初期为突释现象和后期为缓慢释放。

图 3 载牛血清白蛋白的聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸纳米粒和载神经生长因子的聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸纳米粒单次释放曲线及累积释放曲线

Figure 3 Single release curve and the cumulative release curve of polyethylene glycol-poly(lactic acid) glycolic acid copolymer nanoparticles loaded with nerve growth factor or with bovine serum albumin

2.4 载神经生长因子的聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸纳米粒作用 PC12 细胞的形态学变化 载神经生长因子的聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸纳米粒作用 72 h 后, 细胞

变得扁平, 呈梭形或多角形, 胞体增大, 大部分细胞长出多个长突起, 不同细胞的突起可连接成网, 和阳性对照组的细胞形态及密度基本相同; 空白对照组与阴性对照组的细胞形态相同, 均表现为可呈圆形、短梭形或多边形, 有的细胞两极有短突起, 细胞核大而圆, 胞浆少. 瘤细胞生长迅速, 见图4。



### 3 讨论

实验采用聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸共聚物为纳米载体材料, 由于聚乳酸-聚羟基乙酸共聚物结晶性较强且有疏水性, 易被体内的网状内皮系统中的巨噬细胞识别清理掉. 聚乙二醇为亲水性分子, 通过与聚乳酸-聚羟基乙酸聚合成聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸共聚物, 可以将聚乙二醇和聚乳酸-聚羟基乙酸共聚物的优点结合起来, 有效延缓网状内皮系统的清除, 延长纳米粒子在血液循环中存在时间, 从而提高药物有效利用率<sup>[19-20]</sup>. 一个好的纳米粒载药应具备以下条件: 适合的平均粒

径、较高的包封率及良好的释放曲线, 以减少整个载药系统中载体的用量和药物的浪费. 然而制备纳米粒影响因素很多, 如聚合物的相对分子量、聚合物的化学组成、制备方法以及制备条件等. 聚合物相对分子量越低, 聚乙二醇的含量越高时制备出来的纳米粒粒径越小, 越容易降解. 另外聚合物纳米粒降解与聚乳酸-聚羟基乙酸共聚物中丙交酯与乙交酯的含量密切相关, 丙交酯含量越高, 纳米粒降解时间越长, 药物的释放时间延长<sup>[21]</sup>. 实验采用复乳化溶剂扩散法(W1/O/W2), 其制备过程诸多因素对纳米粒的粒径和包封率均有影响<sup>[22]</sup>. 上述结果得知, 随着内水相体积降低, 纳米粒平均粒径有所增大, 但包封率明显提高. 随着油相中聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸的浓度的提高, 纳米粒平均粒径显著增大, 聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸浓度提高到 120-210 g/L 是粒径增大并不明显, 但是包封率明显提高(47%-81%), 210 g/L 时粒径分布曲线出现双峰. 提高外水相中聚乙二醇的浓度时平均粒径增大, 而浓度过高, 会导致聚乙二醇本身所具有的黏性而发生纳米粒团聚现象, 从而影响其表征和特性. 制备过程中采用超声变幅杆作为分散水相及有机相的主要手段, 随着超声时间的延长纳米粒平均粒径越小, 但超声属于大功率高能量分散手段, 作用时间过长则有可能导致蛋白类药物失活. 增加聚乙二醇的浓度及改变超声时间对纳米粒的包封率几乎没有影响. 综合 4 个因素对纳米粒粒径及包封率的影响实验推断, 当内水相体积为 50 µL、聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸共聚物浓度为 180 g/L、聚乙二醇浓度为 3%、超声时间为 7 min 时, 可得分散指数较小, 平均粒径( $258.9 \pm 5.73$ ) nm, 包封率为( $80.56 \pm 2.23$ )%, 内水相中投药量 10 mg 时载药量为( $4.24 \pm 0.12$ )% 的载神经生长因子的聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸纳米粒. 从体外释放曲线中可看出, 载牛血清白蛋白的聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸纳米粒及载神经生长因子的聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸纳米粒均有明显的缓释特性, 且呈现出初期快速释放和后期缓慢释放两个阶段, 初期快速释放是因为纳米粒制备过程中部分牛血清白蛋白和神经生长因子被吸附或以弱键结合在纳米粒表面区域里, 由于牛血清白蛋白与神经生长因子有较强的亲水性, 释放实验时接触 PBS 溶液的纳米粒表面的牛血清白蛋白和神经生长因子快速的解吸所致, 呈现出明显的“突释效果”. 但是由于聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸共聚物在磷酸盐缓冲溶液中降解缓慢包裹在纳米粒内部的药物, 随纳米粒基体的降解/扩散协同效应释放入溶液中, 表现出后期较稳定的缓慢释放阶段. 此外也有研究报道聚合物纳米粒的组成, 尤其是其中亲水链段的性质, 在共聚物中的含量等也影响药物的释放<sup>[18]</sup>. 载药聚合物纳米粒体外释放符合

Higuchi方程, 分别为 $Q=55.02t^{1/2}+165.96(R^2=0.9801)$ (牛血清白蛋白)、 $Q=4.38t^{1/2}+19.46(R^2=0.9889)$ (神经生长因子), 分初期突释释放和后期缓释释放2个阶段, 0-56 d的累积释放总量分别为76.61%(牛血清白蛋白)、62.34%(神经生长因子)。从结果中可以看出神经生长因子累积释放量低于牛血清白蛋白释放量, 推测可能是在37 °C环境下神经生长因子更容易降解失活有关。载神经生长因子的聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸共聚物纳米粒体外诱导PC12细胞结果得知, 载神经生长因子的聚合物纳米粒具有促进PC12细胞向神经元样细胞分化效能, 对细胞无毒性作用。文章结果为以神经干细胞体外诱导转化成为胆碱能神经元, 并移植到阿尔茨海默症模型鼠脑内, 研究其对模型鼠的治疗奠定了基础。

**基金资助:** 广东省自然科学基金(9151063101000016); 广州市科技局应用基础研究计划项目(2009J1-C361-2); 广州市属高校科研计划项目(2012C042)。

**作者贡献:** 通讯作者进行实验设计、实验评估及审校, 第一作者实施实验、成文, 第一作者对文章负责, 第三、四、五作者对实验的贡献相同。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**作者声明:** 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

#### 4 参考文献

- [1] Kirkland RA, Saavedra GM, Franklin JL. Rapid activation of antioxidant defenses by nerve growth factor suppresses reactive oxygen species during neuronal apoptosis: evidence for a role in cytochrome c redistribution. *J Neurosci*. 2007; 27(42):11315-11326.
- [2] Colafrancesco V, Villoslada P. Targeting NGF pathway for developing neuroprotective therapies for multiple sclerosis and other neurological diseases. *Arch Ital Biol*. 2011;149(2):183-192.
- [3] Shi ED, Wang BC, Sun QS. Nerve growth factor and injured peripheral nerve regeneration. *Neural Regen Res* 2008;3(11): 1273-1276 .
- [4] Urbaniak A. p75NTR receptor--role in cell growth and apoptosis. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2012;66:304-310.
- [5] Allen SJ, Watson JJ, Dawbarn D. The neurotrophins and their role in Alzheimer's disease. *Curr Neuropharmacol*. 2011;9(4): 559-573.
- [6] Takeda A, Loveman E, Clegg A, et al. A systematic review of the clinical effectiveness of donepezil, rivastigmine and galantamine on cognition, quality of life and adverse events in Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2006;21(1): 17-28.
- [7] Miller DS, Bauer B, Hartz AM. Modulation of P-glycoprotein at the blood-brain barrier: opportunities to improve central nervous system pharmacotherapy. *Pharmacol Rev*. 2008; 60(2): 196-209.
- [8] Akhlaghi SP, Saremi S, Ostad SN, et al. Discriminated effects of thiolated chitosan-coated pMMA paclitaxel-loaded nanoparticles on different normal and cancer cell lines. *Nanomedicine*. 2010;6(5):689-697.
- [9] Xu F, Lu W, Wu H, et al. Brain delivery and systemic effect of cationic albumin conjugated PLGA nanoparticles. *J Drug Target*. 2009;17(6):423-434.
- [10] Juillerat-Jeanneret L. The targeted delivery of cancer drugs across the blood-brain barrier: chemical modifications of drugs or drug-nanoparticles? *Drug Discov Today*. 2008;13 (23-24):1099-1106.
- [11] Yu DH, Lu Q, Xie J, et al. Peptide-conjugated biodegradable nanoparticles as a carrier to target paclitaxel to tumor neovasculature. *Biomaterials*. 2010;31(8):2278-2292.
- [12] Lemoine D, Francois C, Kedzierewicz F, et al. Stability study of nanoparticles of poly(epsilon-caprolactone), poly(D,L-lactide) and poly(D,L-lactide-co-glycolide). *Biomaterials*. 1996;17(22):2191-2197.
- [13] Hu S, Zhang Y. Endostar-loaded PEG-PLGA nanoparticles: in vitro and in vivo evaluation. *Int J Nanomedicine*. 2010;5: 1039-1048.
- [14] Mainardes RM, Evangelista RC. PLGA nanoparticles containing praziquantel: effect of formulation variables on size distribution. *Int J Pharm*. 2005;290(1-2):137-144.
- [15] Xie S, Wang S, Zhao B, et al. Effect of PLGA as a polymeric emulsifier on preparation of hydrophilic protein-loaded solid lipid nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2008;67(2): 199-204.
- [16] Mei L, Long DH, Huang WD. Jiepo Xue Yanjiu. 2010;32(1): 1-5.  
梅林, 龙大宏, 黄婉丹, 等. 载牛血清蛋白的PLGA纳米粒制备工艺的优化及特性研究[J]. *解剖学研究*. 2010;32(1):1-5.
- [17] Liu FF, Long DH. Jiepo Xue Yanjiu. 2011;33(2):95-100.  
刘菲菲, 龙大宏. 阳离子载基因Me PEG-PLGA纳米粒的制备及优化处方的筛选[J]. *解剖学研究*. 2011;33(2):95-100.
- [18] Clavreul A, Sindji L, Aubert-Pouëssel A, et al. Effect of GDNF-releasing biodegradable microspheres on the function and the survival of intrastriatal fetal ventral mesencephalic cell grafts. *Eur J Pharm Biopharm*. 2006;63(2):221-228.
- [19] Duan Y, Xu J, Lin Y, et al. A preliminary study on MeO-PEG-PLGA-PEG-OME nanoparticles as intravenous carriers. *J Biomed Mater Res A*. 2008;87(2):515-523.
- [20] Cu Y, Saltzman WM. Controlled surface modification with poly(ethylene)glycol enhances diffusion of PLGA nanoparticles in human cervical mucus. *Mol Pharm*. 2009; 6(1):173-181.
- [21] Xu HB. Beijing: Tsinghua University Press, 2004.  
徐辉碧. 纳米医药[M]. 北京: 清华大学出版社, 2004.
- [22] Yang A, Yang L, Liu W, et al. Tumor necrosis factor alpha blocking peptide loaded PEG-PLGA nanoparticles: preparation and in vitro evaluation. *Int J Pharm*. 2007;331 (1):123-132.