



论文

HI-6 人体血清白蛋白纳米粒的制备及其对梭曼中毒小鼠脑 AChE 重活化作用评价

王飞剑[†], 杨军[†], 程凤, 李万华, 魏朝, 郑志兵, 王永安^{*}, 房彤宇^{*}

军事毒理与生化药理研究室; 药物合成研究室; 军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850

^{*}通讯作者, E-mail: yonganw@sina.com; fangty@bmi.ac.cn[†]同等贡献

收稿日期: 2013-11-29; 接受日期: 2014-02-26; 网络版发表日期: 2014-03-28

doi: 10.1360/N032013-00065

摘要 迅速恢复中毒乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)活性是神经性毒剂中毒救治最关键的环节. 血脑屏障的存在限制了具有重活化作用的抗毒药物以有效治疗剂量进入中枢. 本研究以已知重活化作用最强的重活化剂酰胺磷定(HI-6)为目标药物, 通过去溶剂化法制备了人体血清白蛋白纳米粒, 通过静电作用将 HI-6 分子装载在纳米粒表面, 合成装载 HI-6 的人体血清白蛋白纳米粒; 在斑马鱼及神经性毒剂梭曼染毒小鼠上, 对药物穿透血脑屏障能力及中枢中毒 AChE 重活化作用进行了评价. 结果表明, 装载 HI-6 人体血清白蛋白纳米粒在物理表征上符合纳米药物基本特征; 相对于自由 HI-6, HI-6 人体血清白蛋白纳米粒能够透过血脑屏障, 并将中枢中毒 AChE 活性提升 2 倍以上, 表明人体血清白蛋白纳米粒成功携带 HI-6 分子进入中枢. 本文建立了一种无毒、高效、小尺寸中枢靶向性纳米粒的制备方法, 基于该方法制备的纳米重活化剂, 在脑内可有效释放目标药物并迅速发挥解毒作用.

关键词HI-6
白蛋白纳米粒
血脑屏障
重活化作用
乙酰胆碱酯酶
神经性毒剂

1 引言

神经性毒剂中毒后能迅速抑制中枢及外周乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)活性, 导致乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)大量蓄积, 进而引发以“胆碱能神经系统功能亢进”为特征的中枢及外周中毒症状表现, 最终导致严重的并发症或死亡^[1]. 对于神经性毒剂的中毒救治, 最关键的措施是给予能够对中毒酶具有高效、迅速重活化作用的药物^[2, 3], 使与神经性毒剂磷酸化结合的 AChE^[4]从毒剂分子上脱离, 进而恢复水解 ACh 的功能. 这类使中毒 AChE 重新恢复水解 ACh 功能的药物, 称为重活化剂.

目前, 临床应用的重活化剂主要包括氯解磷定、双复磷、双解磷和 HI-6 等(图 1). 上述药物对外周中

毒的 AChE 有显著、快速的重活化作用, 但是, 血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)的存在导致现有重活化药物均无法进入中枢, 因而难以恢复中枢中毒 AChE 活性^[5]. 而中枢 AChE 被大量抑制导致脑内一些对调节基础生命体征起重要作用的人体功能中枢如呼吸、循环及神经中枢等被抑制, 进而引起呼吸、心跳停止及惊厥现象, 最终导致迟发性神经损伤等严重并发症或死亡^[6]. 因此, 寻找能有效进入中枢的重活化剂, 以迅速恢复被神经性毒剂抑制的中枢 AChE 功能, 一直是神经性毒剂中毒救治的重点与难点. 近年来, 国外在此领域进行了大量研究^[7-9], 合成了 K 系列(K203、K074、K048、K117 和 K127)及 HI-6 系列(HLA-6)重活化剂, 但均未寻找到能快速进入中枢, 并对中枢中毒酶具有较好重活化作用的

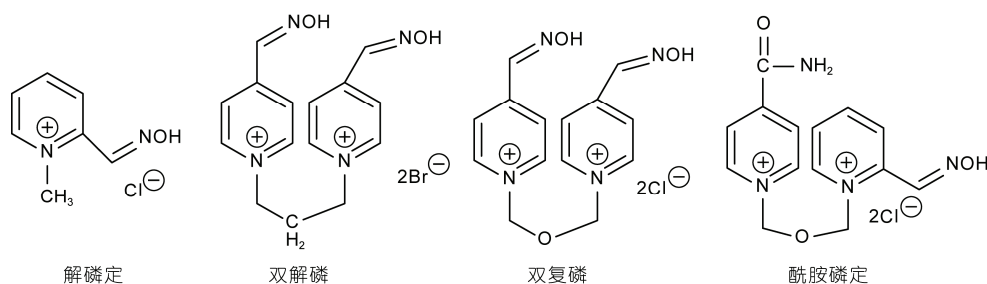


图1 临床常用重活化剂的化学结构

药物。

近十年来,纳米技术飞速发展为实现药物中枢靶向性递运提供了新的解决思路^[10]。以往研究已经发现,多种纳米尺寸粒子可在体内自由输运,并通过特定的介导转运途径进入中枢^[11]。因此,采用纳米载体装载重活化剂,将为实现脑部靶向给药提供可能。鉴于此,本研究在以往的工作基础上^[12, 13],选择了已知重活化作用最强的重活化剂 HI-6 为目标递送药物,将携带负电荷的人体血清白蛋白纳米粒(human serum albumin nanoparticles, HSA NPs)外层装载正电荷的 HI-6 分子,制备得到了 HI-6 人体血清白蛋白纳米粒,并采用透射电子显微镜与 Zeta 粒径分布仪,对已制备药物的形貌、粒径、Zeta 电位及分散系数(PDI)进行物理表征。最后,在斑马鱼及梭曼染毒小鼠模型上,观察了纳米药物对血脑屏障穿透效率及其对中枢中毒 AChE 的重活化作用。

2 实验部分

2.1 试剂与仪器

二甲基亚砜、氯化钠、碳酸钠、碳酸氢钠、氯化铵、无水乙醇及 25%戊二醛购自国药集团(中国);氢氧化钠购自西陇化工股份有限公司(中国);N-羟基丁二酰亚胺(NHS)及 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二酰亚胺盐酸盐(EDC)购自 Acros 公司(美国);人体血清白蛋白及转铁蛋白(transferrin, Tf)购自北京中生瑞泰科技有限公司(中国);异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)、5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)及硫代乙酰胆碱(ASCh)购自 Sigma 公司(美国);吡啶-2-醛肟-1-1 甲基)-(4-氨基甲酰基-吡啶-1-甲基)醚氯盐(酰胺磷定, HI-6)由军事医

学科学院毒物药物研究所药物合成研究室合成,纯度 95%以上;梭曼由中国人民解放军防化指挥工程学院合成,纯度 95%以上。

数显磁力搅拌器(MS-H-Pro⁺型,大龙兴创实验仪器有限公司,中国),数控超声波清洗仪(KQ-50DE 型,昆山市超声仪器有限公司,中国),台式冷冻离心机(3-18K 型, Sigma 公司,美国),智能溶出仪(ZRG-83 型,天津鑫洲科技有限公司,中国),显微注射仪(NT-88-V3, Nikon 公司,日本),激光共聚焦显微镜(LSM 510 META 型, Zeiss 公司,德国),透射电子显微镜(H-7650 型, Hitachi 公司,日本),Zeta 粒径分布仪(Zeta Sizer Nano-ZS90 型, Malvern 公司,英国),多参数测试仪(S220 型, Mettler-Toledo 公司,瑞士),电子天平(BT25S 型, Sartorius 公司,德国),紫外分光光度计(UV-4802, Unico 公司,美国),酶标仪(550 型, Bio-Rad 公司,美国)。

2.2 实验动物

健康 AB 系 4 日龄斑马鱼幼鱼,体长为 0.4 cm 左右,雌(♀)、雄(♂)各半,由北京大学生命科学院提供。

昆明小鼠,SPF 级,♂,体重 18~22 g,由军事医学科学院实验动物中心提供。动物生产许可证为:SCXK-(军)2012-0004。

2.3 人体血清白蛋白纳米粒的制备及表征

2.3.1 人体血清白蛋白纳米粒制备

在已有文献[14, 15]报道基础上进行改进,采用去溶剂化法制备 HSA NPs。具体实验过程为:将 20 mg 人体血清白蛋白溶解于 1 mL NaCl 溶液(10 mmol/L)中,用 NaOH 溶液(0.1 mol/L)将溶液 pH 调至 8.3,再用

0.22 μm 水系滤头过滤溶液; 在 1000 r/min 转速搅拌下, 将续滤液缓慢匀速(1 mL/min)滴入 5 mL 96% 乙醇中; 搅拌 3 min 后调大搅拌速度至 1500 r/min, 将 22 μL 8% 戊二醛注入溶液中继续搅拌反应 1 min, 再向溶液中加入 22 μL 戊二醛溶液, 室温避光反应 24 h. 反应停止后, 收集 HSA NPs 混悬液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、14000 r/min 下离心 12 min; 再用蒸馏水离心洗涤样品 2 次, 除去残留的戊二醛和乙醇等物质, 得到 HSA NPs. 将离心后得到的 HSA NPs 超声分散于 2 mL 去离子水中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存, 用于下一步实验.

2.3.2 FITC 标记的 HSA NPs 的制备

首先配制碳酸缓冲液, 即分别称取 7.56 g NaHCO_3 , 1.06 g Na_2CO_3 , 7.36 g NaCl , 加水定容至 1 L. 称取 HSA 60 mg 溶于 9 mL NaCl 溶液中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下, 利用上述碳酸缓冲液将 HSA 透析 3 次, 直至透析液 pH 约为 9.0. 按 HSA:FITC = 1 mg:150 μg 的比例称取 9 mg FITC, 溶于 9 mL 二甲基亚砜中, 并在搅拌状态下将 FITC 溶液缓慢滴加至 HSA 溶液中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应 8 h, 反应生成 FITC-HSA, 反应结束后加入 180 μL 氯化铵 (0.005 mol/mL) 终止反应 2 h, 将反应后产物在 PBS 中透析至少 4 次以上, 直到透析液清亮, 完全透析除去体系中游离的 FITC, 此时, FITC-HSA 溶液总体积约为 40 mL. 取 1 mL 该溶液, 向其中加入 19 mg 空白 HSA, 其余制备步骤同 HSA NPs, 最终制备得到 FITC-HSA NPs.

2.3.3 人体血清白蛋白纳米粒的产率测定

将离心所得样品准确定容至 2 mL, 超声充分分散样品, 取 100 μL 的 HSA NPs 混悬液滴于已称重的硅片上. 待混悬液充分挥发干后, 称量硅片重量, 减去空白硅片重量即得 HSA NPs 重量. 取 3 次样品称量的平均值乘以 20, 即可得到 HSA NPs 产量. 产率计算公式如下:

$$\text{HSA 产率} = M_{(\text{HSA NPs})} / M_{(\text{HSA 投入量})} \times 100\%$$

2.3.4 人体血清白蛋白纳米粒的靶向修饰

为提高纳米粒的中枢靶向性, 在 HSA NPs 表面修饰上在脑部具有广泛表达转铁蛋白受体的配体蛋白——转铁蛋白(Tf)^[16]. 具体实验过程如下: 在 N_2 保护下, 向 HSA NPs 混悬液中加入适量 NHS 及 EDC

两种交联剂, 充分混匀后向反应体系中加入 200 μL 转铁蛋白, 避光室温反应 24 h 后, 得到 Tf-HSA NPs 混悬液. 用蒸馏水离心 2 次, 除去 NHS 与 EDC, 样品收集后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下避光保存.

2.3.5 人体血清白蛋白纳米粒吸附 HI-6

在已有文献[12]基础上进行 HSA NPs 混悬液载药实验, 研究 HI-6 载药量与 HSA NPs 投入量的关系. 取不同浓度的 HSA NPs 混悬液, 用去离子水定容至 2 mL, 最终载药时 HSA NPs 浓度分别为 2、5 和 8 mg/mL. 将其 pH 调节至 8.3 后加入含 3 mg HI-6 的微量水溶液, 室温避光下, 650 r/min 搅拌 18 h 完成载药实验, 得到 HSA-HI-6 NPs. 离心载药后形成的混悬液, 通过测定上层清液的吸收, 确定最终载药量. 在 Tf-HSA NPs 载药实验中, 载药时纳米粒投入的终浓度设为 5 mg/mL.

2.3.6 人体血清白蛋白纳米粒的物理表征

形貌表征: 取 20 μL HSA NPs 混悬液稀释适宜倍数, 滴于硅片上自然风干. 待干燥后, 置于透射电子显微镜样品架中, 在加速电压为 5 kV 条件下进行观察.

粒径与电位测定: 取 300 μL 制备的 HSA NPs 混悬液样品, 稀释 10 倍, 利用 Zeta 粒径分布仪测定样品的粒径分布与 Zeta 电位情况, 同时测定 HSA-HI-6 NPs 与 Tf-HSA NPs 两组纳米混悬液的粒径与电位.

2.3.7 载药纳米粒等各组药物光谱吸收测试实验

采用紫外分光光度计对 HSA NPs、Tf-HSA NPs 以及 HSA-HI-6 NPs 三组稀释后的混悬液进行吸收光谱测试, 测试波段为 200~400 nm, 介质为水溶液, 旨在证明外层 Tf 对 HSA NPs 在此波段内吸收的影响.

2.4 载药人体血清白蛋白纳米粒混悬液体外释药研究

2.4.1 HI-6 标准曲线的测定

配制 0.4 mg/mL HI-6, 再将溶液稀释成 5 个梯度浓度, 测定各组紫外吸收值. 以 300 nm 处峰值与 HI-6 梯度浓度拟合得到 HI-6 在 PBS 溶液中的标准曲线.

2.4.2 载药人体血清白蛋白纳米粒混悬液体外释药实验

采用 pH 7.4 的 PBS 缓冲溶液(0.01 mol/L)为实验介质, 测试药物分别为 HI-6 水溶液组与 HSA-HI-6 NPs 混悬液组, 两组体积相同, HI-6 总含量均为 6 mg. 利用智能溶出仪进行释药实验, 设定 11 个取样时间点, 每次取测试样液 2 mL, 同时补充 2 mL PBS 溶液, 样品液利用紫外分光光度计测定其在 300 nm 处的吸收值, 根据 HI-6 在 PBS 溶液中的标准曲线计算得出样品浓度, 经拟合得到 HSA 纳米载药体系的释药率曲线.

2.5 纳米粒穿透斑马鱼血脑屏障实验

将制备的 FITC-HSA NPs 稀释 20 倍, 取生长 4 日左右的斑马鱼幼鱼, 利用显微注射仪向心脏注射稀释后的 FITC-HSA NPs 溶液, 10 min 后用甲基纤维素钠将斑马鱼固定于载玻片上, 置于激光共聚焦显微镜下逐层扫描观察. 对照组斑马鱼注射生理盐水后进行观察^[17-19].

2.6 梭曼染毒小鼠中枢中毒 AChE 重活化作用评价

将昆明小鼠按体重随机分成正常对照组、染毒组以及 Tf-HSA-HI-6 NPs、HSA-HI-6 NPs 及 HI-6 水溶液组. 依据预实验结果, 动物首先皮下注射能引发小鼠 70%左右 AChE 抑制率的梭曼剂量(染毒剂量为 120 $\mu\text{g/kg}$). 之后立即尾静脉注射不同类型治疗药物(各组 HI-6 给药剂量恒为 22 mg/kg). 染毒后 10 min, 断头取脑, 脑组织经剪碎、匀浆、离心等处理后形成上清液, 再进行蛋白定量. 取 10 μL 蛋白定量后的上清液稀释于 490 μL PBS (0.1 mol/L)中. 以上各步实验均在冰上操作, 样品置于冰上保存.

采用 Ellman 法^[20, 21]测定脑酶重活化率. 将稀释后的上清液加入 96 孔板中, 每个样品设定 4 个重复孔, 前两孔均加入 80 μL PBS, 后两孔加入 50 μL PBS 与 30 μL ASCh, 离心除去各孔中气泡, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中孵育 30 min. 充分反应后, 向每孔中加入 200 μL DTNB, 振荡 30 s, 在酶标仪 415 nm 处测定各孔的光密度(OD 值). 根据下式计算各给药组的脑酶重活化率:

$$\text{重活化率(\%)} =$$

$$(\text{给药组 OD 值} - \text{染毒组 OD 值}) / \text{正常组 OD 值}$$

2.7 统计学分析

实验结果数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示, 采用 GraphPad Prism 5.01 进行统计学分析, 多组间比较采用单因素方差分析.

3 结果与讨论

3.1 人体血清白蛋白纳米粒的制备

粒径是影响纳米粒在生物体内运输与分布的决定性因素^[22]. 对于纳米中枢靶向给药载体, 一般而言, 颗粒尺寸越小, 其对 BBB 穿透力越强. 以往文献报道制备的 HSA NPs 尺寸相对过大, 为 180 nm^[13, 14], 因而穿透 BBB 的效率较低. 分析其原因, 可能是在去溶剂化法中, 溶质的液体环境对纳米颗粒的尺寸和晶型有极大的影响^[23]. 与传统的大尺寸单晶制备条件“缓、慢、稳”相反, 纳米晶的生长需要生长环境苛刻、成核迅速及分散均匀等条件. 因此, 在本研究中, 我们对关键制备步骤进行了改进, 将乙醇滴入 HSA 溶液改为将 HSA 溶液滴入高速搅拌的乙醇中. 在此操作中, HSA 分子分散均匀, 同时液体环境急剧改变, 导致 HSA 立刻达到过饱和析出从而迅速形成晶核, 最终在稳定剂的作用下, 形成小尺寸晶体. 此外, 稳定剂 8%戊二醛的用量对 HSA NPs 的形成也具有重要影响. 本研究中减少了稳定剂的加入量, 防止因戊二醛浓度过高而造成的纳米粒粘黏团聚, 保证纳米粒生长的均一性, 稳定控制颗粒粒径. 基于上述原因, 我们在已有的研究基础上, 调整了去溶剂化法中溶媒与非溶媒的滴加顺序及稳定剂浓度^[22]. 最终基于改进方法制备的 HSA NPs, 平均粒径为 92.85 ± 3.57 nm, 平均产率可达到 60%左右.

3.2 人体血清白蛋白纳米粒的靶向修饰

在 HSA NPs 表层进行 Tf 的靶向修饰, 旨在增强 HSA NPs 的中枢靶向性. 催化剂 EDC 和 NHS 能有效地活化 HSA NPs 表面的羧基, 使之能与 Tf 上氨基基团在常温下发生反应, 从而将 Tf 键合在纳米粒表面. 图 2 为人体血清白蛋白纳米粒混悬液的吸收光谱测试结果, 未修饰 Tf 前, HSA NPs 在 279 nm 处有特征吸收峰; 当外层修饰一层 Tf 后, 该特征吸收峰被屏蔽. 由图可知, Tf-HSA NPs 在 200~400 nm 波段内

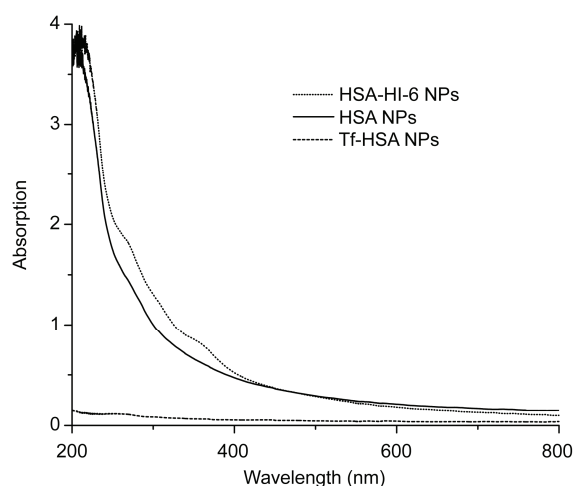


图 2 不同类型人体血清白蛋白纳米粒混悬液的紫外吸收光谱

无明显吸收峰, 证实 HSA NPs 外层已成功修饰上 Tf. 此外, 靶向蛋白修饰将减小纳米粒表面电荷, 使得 Zeta 电位绝对值降低; 而电位的降低将影响纳米粒混悬液的稳定性, 使得 HSA NPs 容易团聚沉降. 该现象可在 Tf 修饰前后纳米粒的 Zeta 电位变化中得到证实.

3.3 人体血清白蛋白纳米粒载药实验

HSA NPs 具有纳米尺寸效应, 因此, HSA NPs 也具有巨大的表面积优势; 同时, HSA NPs 表面携带大量负电荷. 这两点特殊性质分别为载药提供了容器与条件^[24]. HI-6 为带正电荷的季铵盐药物, 可通过静电作用稳定吸附在 HSA NPs 的巨大表面积上, 从而完成载药^[12], 且载药量较大. 由图 3 可知, 在 HSA NPs 投入浓度分别为 2、5 及 8 mg/mL 时, 纳米粒的平均载药量分别为 63、133 及 184 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 表明 HI-6 吸附量与 HSA NPs 投入量呈正相关, 但无线性关系.

3.4 人血清白蛋白纳米粒物理表征

透射电子显微镜扫描结果表明(图 4), HSA NPs 为规则实心圆球状纳米粒, 颗粒之间差异性较小, 粒径分布均匀. 经显微镜标尺对比可知, 样品粒径为 80~100 nm. 对 5 批样品的粒径、电位及分散系数进行测定, 样品的最终物理表征结果接近, 纳米颗粒平均粒径为 92.85 ± 3.57 nm, 表明该制备工艺稳定, 重复性良好(表 1).

图 5 为综合整理各组纳米粒物理表征结果, 由图

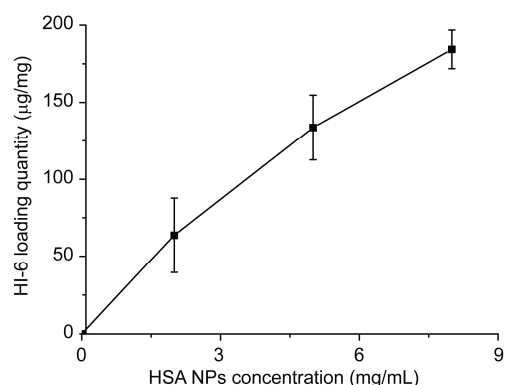


图 3 HSA NPs 混悬液浓度对载药量的影响. $\bar{x} \pm s$, $n = 3$

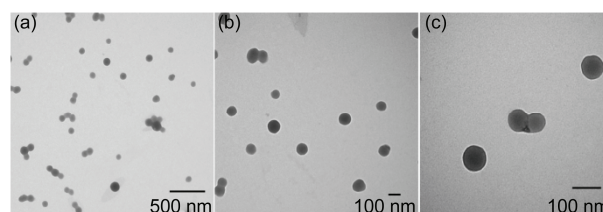


图 4 HSA NPs 的透射电子显微镜扫描照片

可见, 装载 HI-6 的 HSA NPs 各项参数较空白颗粒无显著变化. 而修饰转铁蛋白后的 HSA NPs 粒径发生突增, 达到 600 nm 左右, 且电位升高, 分散系数大于 0.5, 整个混悬液体系稳定性很低, 静置后颗粒沉降迅速. 颗粒粒径增大很可能是由于催化剂 EDC 和 NHS 的非选择性催化作用. 该催化剂不仅催化了 Tf 的氨基与 HSA NPs 的羧基键合, 同时也促进了 HSA NPs 表面残留的氨基与羧基键合, 导致颗粒再次生长, 使得颗粒间发生了团聚, 造成颗粒粒径增大.

3.5 载药人体血清白蛋白纳米粒混悬液体外释药研究

按浓度由低到高的顺序依次测定梯度浓度 HI-6 样品在 200~400 nm 波段的紫外吸收. 取 300 nm 处吸收峰值作为纵坐标, 梯度浓度为横坐标, 拟合后所得标准方程为: $y = 17.591x - 0.0052$ ($R^2 = 0.9995$) (图 6).

由释药率曲线(图 7)发现, HI-6 释药明显快于 HSA-HI-6 NPs 混悬液组, 100 min 后释药率接近 100%; 而 HSA-HI-6 NPs 组 100 min 后的释药率只达到 70%. 由图 7 还可发现, 该结构的纳米药物也具有明显突释现象, 在 30 min 时释药率达到 47%; 在 2 h 时基本达

表 1 不同批次人体血清白蛋白纳米粒粒径、电位及分散系数($n = 5$)

表征参数	样品批次					$\bar{x} \pm s$
	1	2	3	4	5	
粒径 (nm)	94.3	86.95	93.3	93.1	96.6	92.85 ± 3.57
Zeta 电位 (mV)	-38.2	-36.2	-40.7	-36	-46.2	-39.46 ± 4.22
PDI (< 0.5)	0.139	0.114	0.085	0.185	0.1	0.12 ± 0.039

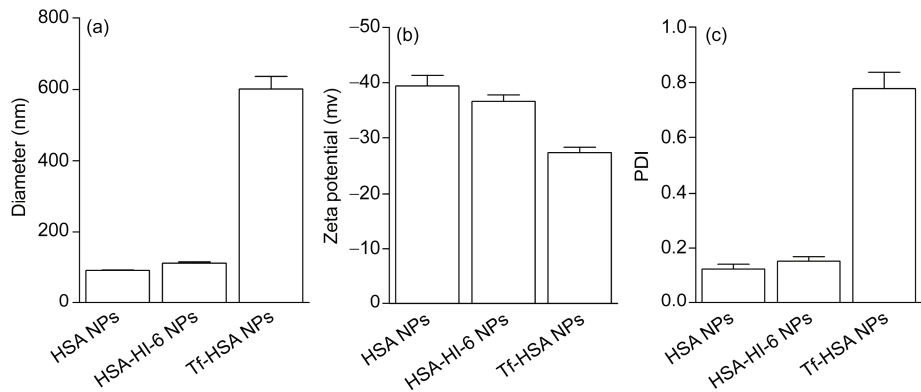


图 5 HSA NPs、HSA-HI-6 NPs 及 Tf-HSA NPs 的粒径(a)、Zeta 电位(b)及分散系数(c). $\bar{x} \pm s, n = 5$

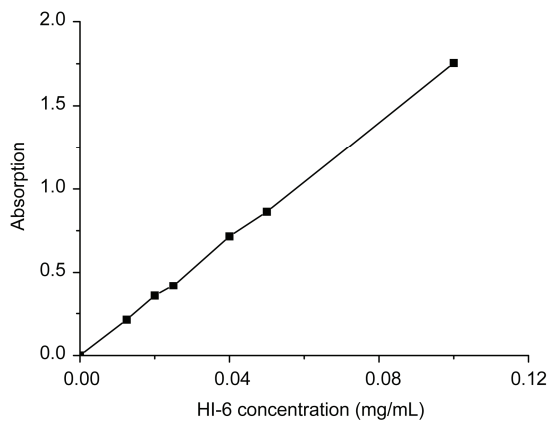


图 6 HI-6 在 PBS 溶液中的标准曲线

到体外最大释药率(75%), 因而能够满足梭曼中毒所特有的快速释药要求^[25]. 这种快速释药的特性来源于纳米载药系统所采用的载药模式, 即通过静电作用将 HI-6 吸附在 HSA NPs 巨大的表面上, 进入机体后药物可迅速从表面释放. 纳米药物在进入血液循环后即可开始释放 HI-6, 但与自由 HI-6 释药率曲线对比, 纳米重活化剂释药速率更低, 具有一定的滞后性. 而 HI-6 从 HSA NPs 表面释放的相对滞后时间可能是纳米载体携带药物到达脑部微血管及被微血管内皮细胞摄取所需要的时间^[26]. 在载体吸附作用下的释药速率并未达到 HI-6 水溶液的释药速率, HSA-HI-6 NPs 能在进入中枢给药和释药速率之间达

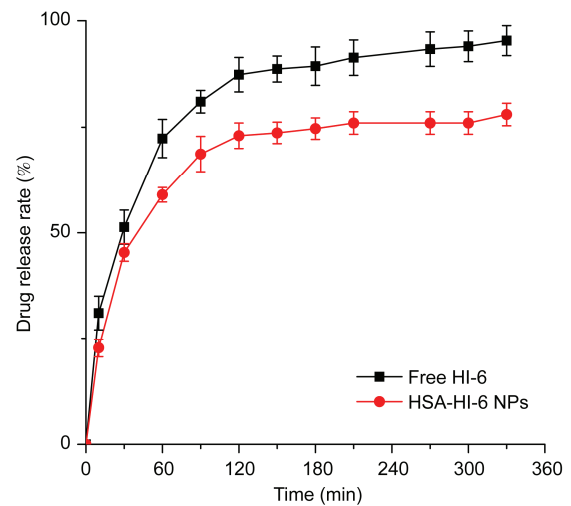


图 7 HSA-HI-6 NPs 混悬液与 HI-6 水溶液的释药率曲线. $\bar{x} \pm s, n = 3$

到一个有效的平衡, 这使得在穿透 BBB 时, 载体系统还装载相当量的 HI-6; 在穿透 BBB 后, 依然有足够的药物能从系统中释放, 从而有效地重活化中枢中毒酶.

3.6 纳米粒穿透斑马鱼 BBB 研究

FITC 是常用荧光标记物, 也是药物在活体生物分布的示踪剂. 本研究中, FITC 被键合于纳米粒上, 主要用于标记纳米粒在生物体内的分布. 激光共聚

焦显微镜扫描结果显示, 注射游离生理盐水的斑马鱼脑部未见明显绿色荧光; 而 FITC-HSA NPs 注射组的斑马鱼脑部可见明显绿色荧光(图 8), 提示标记了 FITC 荧光分子的 HSA NPs 成功穿透了斑马鱼 BBB 进入脑部。

3.7 在体重活化作用评价

药物对中枢中毒 AChE 的重活化效率是判断重活化剂能否进入中枢的权威评价指标。此外, 已有文献报道了脑部 AChE 活性对神经性毒剂中毒动物存活率的影响^[27], 结果发现, 在梭曼染毒后, 一般死亡动物的脑部 AChE 活性仅约为 10%, 而存活动物的脑部 AChE 活性可达到 16%, 因此, 将脑部 AChE 活性可否超过 10% 作为评价 HSA-HI-6 NPs 等药物重活化效率的重要标准。目前, 已报道的文献中并未见纳米重活化剂发挥有效在体中枢重活化作用的药效学研究结果。基于此, 本研究首先在小鼠上建立了梭曼染毒模型, 在此基础上, 完成了纳米重活化剂等药物对中枢中毒酶的重活化作用评价。结果如图 9 所示, HI-6 水溶液组与 Tf-HSA-HI-6 NPs 组对中枢中毒 AChE 重活化作用基本一致, 重活化率为 6% 左右; 与前两组药物相比, HSA-HI-6 NPs 组的中枢中毒 AChE 重活化效率则显著增大($p < 0.01$), 为前两组药物的 2 倍以上(重活化率为 15.3%), 脑部 AChE 活性超过 10%, 达到中枢解毒的重要标准。前已述及, 基于重活化剂本身携带正电荷及高水溶性等问题, HI-6 无法有效穿透 BBB 发挥解毒作用。但在本实验中, 一方面, HI-6 本身携带正电荷与携带负电荷的 HSA 通过静电作用相结合, 因而屏蔽了其电荷, 减少了穿透 BBB 的阻力^[7, 28]; 另一方面, 承担载体功能的 HSA 可与脑部表

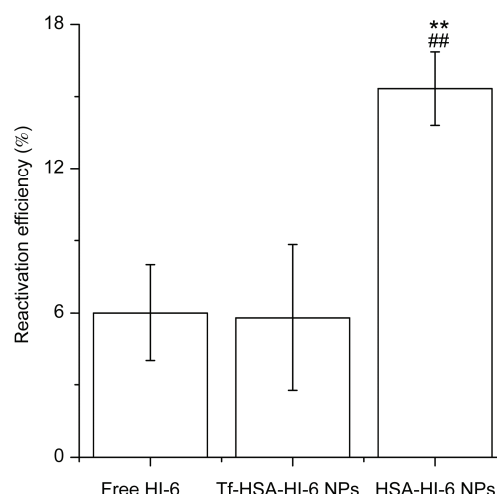


图9 HSA-HI-6 NPs 等对梭曼染毒小鼠脑 AChE 的重活化作用。 $\bar{x} \pm s$, $n = 8$; ** $p < 0.01$, 与 HI-6 水溶液组比较; ## $p < 0.01$, 与 Tf-HSA-HI-6 NPs 组比较

达的 Pg60 受体结合, 经 Pg60 介导转运作用^[24, 29], 将 HSA NPs 内化形成胞吞小泡, 进而穿透 BBB, 将原本不能进入的中枢 HI-6 分子有效地转运至中枢, 并显著提升中枢中毒酶的重活化率。此外, 为进一步提升纳米药物中枢靶向性, 我们在 HSA NPs 表面修饰了靶向蛋白。但在本研究中, 靶向修饰 Tf 的药物重活化率仅为 5.8%, 甚至略低于相同给药浓度下的 HI-6 水溶液组。分析其原因, 可能在于修饰靶向蛋白后的药物粒径偏大(平均粒径已达到 600 nm), 致使颗粒不能有效穿透 BBB 进入中枢, 导致重活化率较低。由此可见, 虽然粒径与表层修饰均为影响纳米粒载体脑部靶向性的关键因素, 但在本研究中, 粒径对药物中枢穿透能力具有决定性影响。

4 结论

HSA NPs 因具有独特的优势^[12, 24], 是最具应用前景的纳米药用载体之一: (1) 生物体对 HSA NPs 具有良好的耐受性, 给药后无明显毒副作用, 目前, 基于 HSA 制备的抗癌药物 AbraxaneTM (一种白蛋白结合紫杉醇的纳米混悬液注射剂) 已通过临床研究^[30], 在 36 个国家投入临床使用; (2) HSA NPs 表面残余的多种基团容易进行表面修饰, 可通过特定的细胞转运途径, 提高中枢靶向性; (3) 在 HSA NPs 巨大的表面上, 纳米粒表面负电荷将正电荷的 HI-6 稳定吸附在颗粒表面, 载药量可观; (4) 由于药物装载于纳米

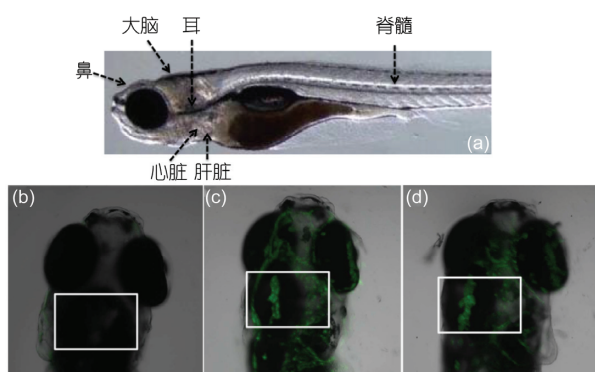


图8 (a) 斑马鱼器官分布图; (b) 注射生理盐水组激光共聚焦显微镜照片; (c, d) FITC-HSA NPs 组激光共聚焦显微镜照片

粒表面,可迅速释药,非常适用于急性中毒的救治.基于上述优势,我们选择 HSA NPs 作为重活化药物中枢递送的载体.在此基础上,我们对已有文献报道^[12]的制备方法进行改进,最终制备得到粒径更小、比表面积更大、表面活性更高的 HSA NPs.物理表征及在体重活化效率评价结果均证实,HSA NPs 作为良好的可降解型载体,能将药物有效地输运至中枢起效;利用该结构制备的纳米重活化剂,能够迅速穿透 BBB,并在给药后极短时间(给药后 10 min)内迅速释放,进而显著提高梭曼染毒所致中枢 AChE 的重活化

率.此外,通过比对 HSA-HI-6 NPs 及 Tf-HSA-HI-6 NPs 中枢重活化作用,不难看出,在影响纳米粒穿透 BBB 的诸多因素中,粒径大小对药物中枢递送效果影响至关重要,其对药物递送效果的影响远胜于靶向性的影响.综合已有文献结果,本研究的意义在于:制备出了具有中枢靶向作用、进入脑内能迅速释放、并对中枢中毒 AChE 具显著重活化作用的纳米重活化剂,该研究为未来递送效率更高、释放时间更短的小尺寸中枢靶向性纳米药物的研究提供了重要的理论支持和实验指导.

致谢 本工作得到抗毒药物与毒理学国家重点实验室、国家新药创制重大专项(2011ZXJ09102-05C, 2011ZXJ-09305)、全军医学科技“十二五”重大(AWS11C004)及重点(BWS12J042)项目资助,特此一并致谢.

参考文献

- 1 Figueiredo TH, Qashu F, Aplan JP, Aroniadou-Anderjaska V, Souza AP, Braga MF. The GluK1 (GluR5) kainate/AMPA receptor antagonist LY293558 reduces soman-induced seizures and neuropathology. *J Pharmacol Exp Ther*, 2010; 171835
- 2 Elsinghorst PW, Worek F, Thiermann H, Wille T. Drug development for the management of organophosphorus poisoning. *Expert Opin Drug Dis*, 2013, 8: 1467-1477
- 3 Soukup O, Tobin G, Kumar U, Binder J, Proska J, Jun D, Fusek J, Kuca K. Interaction of nerve agent antidotes with cholinergic systems. *Curr Med Chem*, 2010, 17: 1708-1718
- 4 Chandar NB, Ganguly B. A first principles investigation of aging processes in soman conjugated AChE. *Chem Biol Interact*, 2013, 204: 185-190
- 5 Masson P. Evolution of and perspectives on therapeutic approaches to nerve agent poisoning. *Toxicol Lett*, 2011, 206: 5-13
- 6 Shih TM, Duniho SM, McDonough JH. Control of nerve agent-induced seizures is critical for neuroprotection and survival. *Toxicol Appl Pharm*, 2003, 188: 69-80
- 7 Mercey G, Verdelet T, Saint-André G, Gillon E, Wagner A, Baati R, Jean L, Nachon F, Renard PY. First efficient uncharged reactivators for the dephosphorylation of poisoned human acetylcholinesterase. *Chem Commun*, 2011, 47: 5295-5297
- 8 Kassa J, Karasova J, Musilek K, Kuca K, Jung YS. A comparison of the therapeutic and reactivating efficacy of newly developed oximes (K117, K127) and currently available oximes (obidoxime, trimedoxime, HI-6) in tabun-poisoned rats and mice. *Drug Chem Toxicol*, 2008, 31: 371-381
- 9 Kassa J, Karasova JZ, Krejcirova M. Therapeutic efficacy of a novel bispyridinium oxime K203 and commonly used oximes (HI-6, obidoxime, trimedoxime, methoxime) in soman-poisoned male rats and mice. *J Appl Biomed*, 2013, 11: 7-13
- 10 Wohlfart S, Gelperina S, Kreuter J. Transport of drugs across the blood-brain barrier by nanoparticles. *J Controlled Release*, 2012, 161: 264-273
- 11 Kanwar JR, Mahidhara G, Kanwar RK. Recent advances in nanoneurology for drug delivery to the brain. *Curr Nanosci*, 2009, 5: 441-448
- 12 Dadparvar M, Wagner S, Wien S, Kufleitner J, Worek F, von Briesen H, Kreuter J. HI 6 human serum albumin nanoparticles: development and transport over an *in vitro* blood-brain barrier model. *Toxicol Lett*, 2011, 206: 60-66
- 13 Wagner S, Kufleitner J, Zensi A, Dadparvar M, Wien S, Bungert J, Vogel T, Worek F, Kreuter J, von Briesen H. Nanoparticulate transport of oximes over an *in vitro* blood-brain barrier model. *PloS One*, 2010, 5: e14213
- 14 Langer K, Balthasar S, Vogel V, Dinauer N, von Briesen H, Schubert D. Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles. *Int J Pharm*, 2003, 257: 169-180
- 15 Wang W, Huang Y, Zhao S, Shao T, Cheng Y. Human serum albumin (HSA) nanoparticles stabilized with intermolecular disulfide bonds. *Chem Commun*, 2013, 49: 2234-2236

- 16 Ulbrich K, Hekmatara T, Herbert E, Kreuter J. Transferrin-and transferrin-receptor-antibody-modified nanoparticles enable drug delivery across the blood-brain barrier (BBB). *Eur J Pharm Biopharm*, 2009, 71: 251–256
- 17 Umans R, Taylor M. Zebrafish as a model to study drug transporters at the blood-brain barrier. *Clin Pharmacol Ther*, 2012, 93: 567–570
- 18 Jeong JY, Kwon HB, Ahn JC, Kang D, Kwon SH, Park JA, Kim KW. Functional and developmental analysis of the blood-brain barrier in zebrafish. *Brain Res Bull*, 2008, 75: 619–628
- 19 McGrath P, Seng WL. Use of zebrafish apoptosis assays for preclinical drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*, 2013, 8: 1191–1202
- 20 Worek F, Eyer P, Thiermann H. Determination of acetylcholinesterase activity by the Ellman assay: a versatile tool for *in vitro* research on medical countermeasures against organophosphate poisoning. *Drug Test Anal*, 2012, 4: 282–291
- 21 Järvinen P, Vuorela P, Hatakka A, Fallarero A. Potency determinations of acetylcholinesterase inhibitors using Ellman's reaction-based assay in screening: effect of assay variants. *Anal Biochem*, 2011, 408: 166–168
- 22 Mehravar R, Jahanshahi M, Saghatoleslami N. Fabrication and evaluation of human serum albumin (HSA) nanoparticles for drug delivery application. *Int J Nanosci*, 2009, 8: 319–322
- 23 Kasai H, Kamatani H, Okada S, Oikawa H, Matsuda H, Nakanishi H. Size-dependent colors and luminescences of organic microcrystals. *Jpn J Appl Phys*, 1996, 35: L221–L223
- 24 Elzoghby AO, Samy WM, Elgindy NA. Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. *J Controlled Release*, 2012, 157: 168–182
- 25 Masson P, Nachon F, Lockridge O. Structural approach to the aging of phosphorylated cholinesterases. *Chem Biol Interact*, 2010, 187: 157–162
- 26 Kufleitner J, Wagner S, Worek F, von Briesen H, Kreuter J. Adsorption of obidoxime onto human serum albumin nanoparticles: drug loading, particle size and drug release. *J Microencapsulation*, 2010, 27: 506–513
- 27 Bajgar J, Fusek J, Kassa J, Jun D, Kuca K, Hajek P. An attempt to assess functionally minimal acetylcholinesterase activity necessary for survival of rats intoxicated with nerve agents. *Chem Biol Interact*, 2008, 175: 281–285
- 28 DeMar JC, Clarkson ED, Ratcliffe RH, Campbell AJ, Thangavelu SG, Herdman CA, Leader H, Schulz SM, Marek E, Medynets MA. Pro-2-PAM therapy for central and peripheral cholinesterases. *Chem Biol Interact*, 2010, 187: 191–198
- 29 Frank PG, Pavlides S, Lisanti MP. Caveolae and transcytosis in endothelial cells: role in atherosclerosis. *Cell Tissue Res*, 2009, 335: 41–47
- 30 Damascelli B, Cantù G, Mattavelli F, Tamplenizza P, Bidoli P, Leo E, Dosio F, Cerrotta AM, Di Tolla G, Frigerio LF. Intraarterial chemotherapy with polyoxyethylated castor oil free paclitaxel, incorporated in albumin nanoparticles (ABI-007). *Cancer*, 2001, 92: 2592–2602

Preparation of HI-6 absorptive human serum albumin nanoparticles and evaluation of its reactivation efficacy on inhibited brain AChE in soman-intoxicated mice

WANG FeiJian[†], YANG Jun[†], CHENG Feng, LI WanHua, WEI Zhao, ZHENG ZhiBing, WANG YongAn^{*}, FANG TongYu^{*}

Military Toxicology and Biochemical Pharmacology research laboratory; Drug Synthesis Research Laboratory; Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

^{*}Corresponding authors (email:yonganw@sina.com; fangty@bmi.ac.cn)

[†]Contributed equally

Abstract: It was essential to rapidly reactivate and restore the function of the inhibited acetylcholinesterase(AChE) in the treatment of nerve agents poisoning. However, the blood-brain barrier (BBB) restricts the rapid transport of reactivators from the blood into the brain in therapeutically relevant concentrations. In this study, human serum albumin nanoparticles(HSA NPs) were prepared via desolvent method; HI-6, the known reactivator with higher reactivating efficiency were bound to HSA NPs through electrostatic interaction; at last, on zebrafish BBB model and soman-intoxicated mice, the permeability on BBB and the reactivation on inhibited brain AChE of nanoparticulate oxime formulations were evaluated. All characterization data revealed that HSA NPs loaded with HI-6 had met the basic demand for nanodrug therapy. Compared with free HI-6, HSA NPs loaded HI-6 could cross the BBB and improve the reactivating rates two times, suggesting HSA NPs could carry HI-6 into CNS successfully. In brief, we improved and established a method to prepare the brain-targeted nanoparticles with small-size, low-toxicity and high-efficiency, the targeted drug based on this method could efficiently release and rapidly antagonize the nerve agents poisoning.

Keywords: HI-6, human serum albumin nanoparticles, blood-brain barrier, reactivation, AChE, nerve agents