

聚乳酸纳米粒穿透血脑屏障的分析电镜研究

王华芳¹ 胡 豫^{1*} 孙望强^{2,3} 谢长生^{2,3}

¹(华中科技大学同济医学院血液病研究所, 武汉 430022)

²(华中科技大学纳米药物研究中心, 武汉 430074)

³(华中科技大学材料科学与工程学院, 武汉 430074)

摘 要 观察以聚乳酸(D,L-poly-lactic acid, PLA)为材料制备、经吐温-80(T-80)表面改性的纳米粒对血脑屏障的穿透效果并探讨其机制, 分别将 FITC-Dextran、叶绿素铜作为 PLA 纳米粒的示踪标记, 应用荧光显微镜、透射电镜及分析电镜观察经静脉注射入小鼠体内的 PLA 纳米粒在脑组织中的分布、穿透血脑屏障的特性。荧光显微镜观察到小鼠脑组织中散在及沿毛细血管壁分布的荧光颗粒, 透射电镜可观察到小鼠脑毛细血管内皮细胞及周围脑组织中圆形或类圆形的外源性纳米粒; 进一步采用分析电镜对颗粒处组织进行能谱分析证实其为叶绿素铜标记的 PLA 纳米粒。证实了 T-80 修饰的 PLA 纳米粒具有穿透血脑屏障的特性, 机制可能是毛细血管内皮细胞的胞吞转运作用, 同时, 为研究纳米粒在组织内的定位提供了新的标记方法。

关键词 聚乳酸纳米粒, 血脑屏障, 叶绿素铜, 分析电镜

中图分类号 Q81 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)05-0790-05

血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)因为特殊的组织学结构阻碍水溶性分子和分子量大于 500 的分子(如: 多肽和蛋白质等)从循环系统进入脑部, 同时也制约了药物在脑部疾病中应用^[1,2]。近年来, 纳米技术在药物载体方面得到成功运用^[3], 聚乳酸(PLA)纳米粒作为一种用可生物降解材料制备的纳米粒载体受到广泛关注。研究已发现某些纳米粒具有穿透血脑屏障的特性^[4-8], 但无直接证据, 并且未能对其机制提出可靠解释。本研究创新性地选择了叶绿素铜(copper chlorophyll, CC)对 PLA 纳米粒进行标记, 对上述问题进行了进一步的探讨, 结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

1.1.1 PLA(平均分子量为 5,000)购自山东省医疗器械研究所; 叶绿素铜(CC)购自青岛绿源生物工程有限公司; 异硫氰酸酯荧光素标记的葡聚糖(FITC-Dextran, 平均分子量为 77 000)、多聚甲醛、戊二醛均购自 Sigma 公司; 其它试剂主要包括乙腈、无水乙醇、氯化钠和吐温-80(T-80), 均系国产分析纯试剂;

1.1.2 仪器: UV-2102PC 分光光度计(Unico(Shanghai) Instrument Co., Ltd., China), RF-540 荧光分光光度计(Shimadzu, Japan), SPA 400 原子力显微镜(Seiko Instruments Industry, Co. Ltd., Japan), Nikon 荧光显微镜, JEM-2000FX II 透射电镜(日本电子) + IN-CA 能谱仪(oxford, UK), VOBROTOME Series 1000 振动切片仪。

1.1.3 实验动物为昆明近交系小鼠, 雄性, 体重 20 ~ 30g, 由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。

1.2 实验方法

1.2.1 PLA 纳米粒的制备和理化性能测定:

(i) 叶绿素铜标记的 PLA 纳米粒(copper chlorophyll labeled nanoparticles, CCNPs)制备: 根据文献[9]并加以改进, 简要过程为: 将含 50mg PLA 和 2.5mg CC 的乙腈溶液 10mL 缓慢加入 40mL 50% (V/V) 的乙醇水溶液中并搅拌, 旋转蒸发法去除多余的水和有机溶剂, 得到 2.5mg/mL 的 CCNPs 悬浮液, 再将此悬浮液注入透析袋(MWCO 10000)并置于蒸馏水中搅拌 8h, 进一步除去游离 CC。

(ii) 荧光标记的 PLA 纳米粒(fluorescein labeled

收稿日期: 2004-02-03, 修回日期: 2004-05-12。

基金项目: 国家自然科学基金项目资助(No. 30170392, 50271029)。

* 通讯作者。 Tel: 86-27-85755457; Fax: 86-27-85755457; E-mail: huyu1964@163.net

nanoparticles, FNP_s)制备:不添加叶绿素铜,采用与(i)相似方法制备无表面活性物质的空白 PLA 纳米粒(surfactant-free nanoparticles, SFNP_s)悬浮液,再加入 FITC-D,使 SFNP_s 与 FITC-D 的比例为 10:1(W/W),于室温下(20~25℃)静置 24h。

(iii) PLA-NP 理化性能及标记率测定:用新鲜剥离的云母片取上述悬浮液一滴,室温干燥后以 SPA 400 原子力显微镜(AFM)观察;荧光分光光度计法测定 FNP_s 中 FITC-D 的标记率(激发波长 495nm,发射波长 520nm);紫外分光光度计法测定 CCNP_s 中 CC 的标记率(检测波长 415nm),所制备 CCNP_s 含 Cu 总量可由下式计算得

$$C_{Cu} = \frac{M_{CC} \times A_{Cu} \times 10^6}{M_{NP} \times A_{CC}}$$

其中 C_{Cu} (μg/g) 为 CCNP_s 中 Cu 的含量, M_{CC} (mg) 为 CCNP_s 中 CC 的量, A_{Cu} (= 63.5) 为 Cu 的原子量, M_{NP} (mg) 为 CCNP_s 的量, A_{CC} (≈ 940) 为 CC 的分子量。

1.2.2 用于动物实验的静脉注射液配制:分别在上述制备的 CCNP_s 和 FNP_s 悬浮液中加入适量 T-80,使 PLA 与 T-80 比例为 1:1(W/W),再用旋转蒸发法(RVE)去除有机溶剂和多余的水分,得到 2%(M/V)的纳米悬浮液,于室温静置 24h 后用 1.8% NaCl 溶液稀释为 1% 的浓度^[8],即制成静脉注射液。各组静脉注射液配方列于表 1 中,溶剂均为生理盐水(0.9% NaCl 溶液),并均经 0.22μm 滤膜过滤除菌。

表 1 静脉注射液的主要成分

Table 1 Main components in injections used in the *in vivo* Experiments

Group	Type of injections	Main components of injections (W/V)
1	A suspension of SFNP _s in saline	SFNP _s (1%)
2	A suspension of FNP _s in saline	SFNP _s (1%), FITC-dextran(0.1%), T-80(1%)
3	A suspension of CCNP _s in saline	SFNP _s (1%), CC(0.1%), T-80(1%)
4	A mixture of FITC-dextran and T-80 in saline	FITC-dextran(0.1%), T-80(1%)
5	A mixture of CC and T-80 in saline	CC(0.1%), T-80(1%)
6	A solution of FITC-dextran in saline	FITC-dextran(0.1%)
7	A solution of CC in saline	CC(0.1%)
8	A solution of T-80 in saline	T-80(1%)

1.2.3 荧光显微镜观察 FITC-D 示踪的纳米粒:24 只健康小鼠按表 1 随机分为 8 组,每组 3 只,分组后每只动物按 0.01mL/g(体重)尾静脉注射每组对应的溶液;45min 后以 4% 多聚甲醛行心脏灌注固定,取脑组织置于 4% 多聚甲醛再固定 2h,其中第 1、2、4、6、8 组小鼠的脑组织用振动切片机切片,厚度 20~30μm,置于 Nikon 荧光显微镜下观察,激发光波长 495nm。

1.2.4 透射电镜观察 CC 示踪的纳米粒:1.2.3 中的第 3、5、7 组小鼠脑组织经 4% 多聚甲醛固定 2h 后,将组织块分割为约 1mm³ 的小块,再以 2.5% 戊二醛固定 2h,经 1% 四氧化锇后固定,梯度乙醇逐级脱水,EPON812 树脂包埋,LKB-III 型超薄切片机切片,载于喷碳的不锈钢网上,经醋酸铀、柠檬酸铅染色,在连有 INCA 能谱仪的 JEM-2000FX II 分析电镜下观察并进行 X 线能量散射谱分析(能谱分析, X-ray energy-dispersive spectrometry, EDS),加速电压 60kV,共计数 30s(50~70 次/s),束斑直径 5~7nm。

2 结果

2.1 PLA 纳米粒的性状

2.1.1 原子力显微镜观察到的 PLA 纳米粒的形貌如图 1 所示,由图中可见我们制备的 PLA 纳米粒为粒径为 20~50nm 的近似球体。

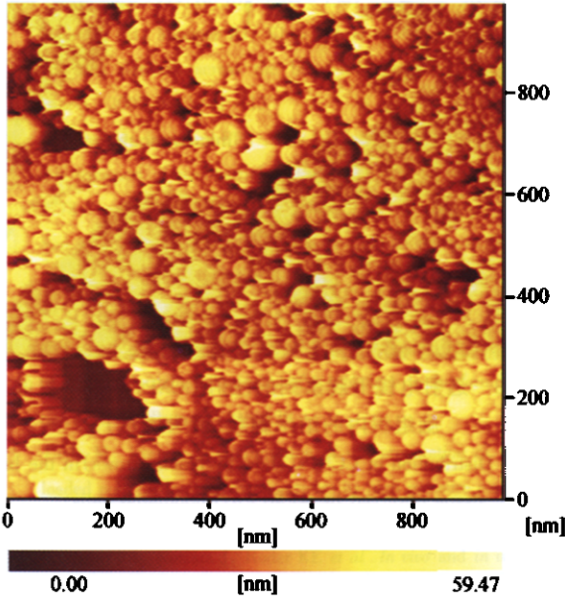


图 1 新鲜剥离的云母片上承载的 PLA-NPs 的原子力显微镜图像

Fig.1 A representative AFM image of PLA-NPs deposited on the freshly cleaved mica

2.1.2 荧光分光光度计测得 PLA 纳米粒上 FITC-D

的标记率为 $15.3\mu\text{g}/\text{mg}$ (1.53% W/W); 紫外分光光度计检测并计算 CCNPs 的叶绿素铜量为 $42.4\mu\text{g}/\text{mg}$ (4.24% W/W)。

2.2 荧光显微镜观察结果

应用荧光显微镜观察第 1、2、4、6、8 组小鼠, 发

现静脉注射 FNP 悬液 (即第 2 组) 小鼠的脑组织内有沿微血管壁分布的明亮的黄绿色荧光 (见图 2), 而其余各组小鼠脑组织内均未见荧光 (未显示), 初步表明以 FITC-D 为标记 T-80 修饰的 PLA 纳米粒能够定位于脑血管。

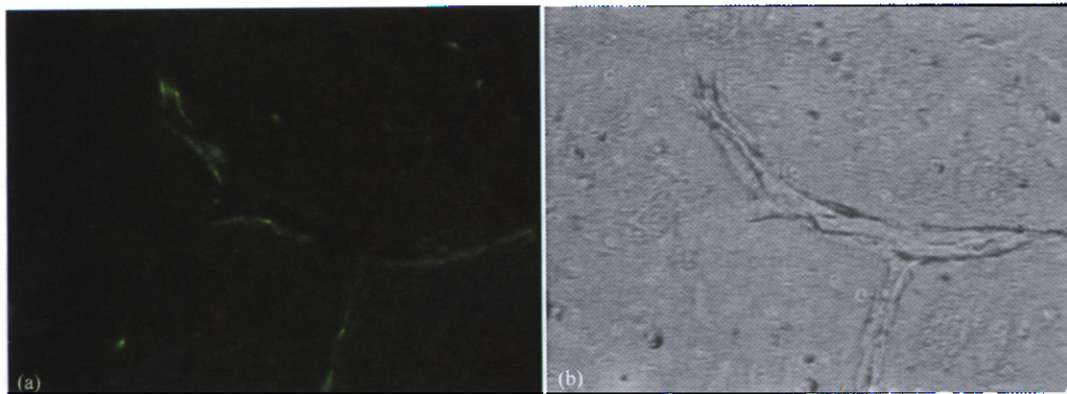


图 2 荧光显微镜下观察第 2 组小鼠脑组织内的 FNP 的分布 (放大倍数 $400\times$)

Fig.2 Fluorescence distributed in the brain tissue of the mouse from Group 2 after 45min intravenous injection (primary amplification: $400\times$)

(a) viewed under a fluorescence microscope and (b) the same site viewed under a photo microscope

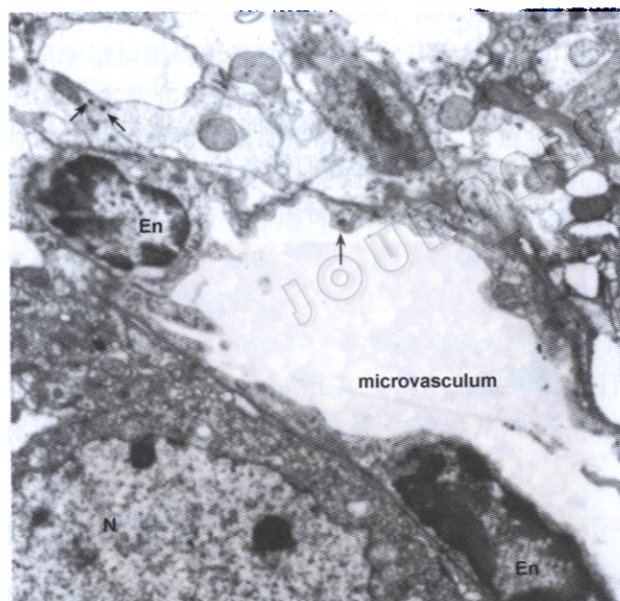


图 3 透射电镜下观察到的注射 CCNPs 悬液小鼠的脑组织内的纳米颗粒 (箭头所示)

Fig.3 Distribution of CCNPs (show by black arrows) in the brain tissue observed by AFM (En: Endothelial cells; N: Neuron primary amplification $63\,000\times$)

2.3 透射电镜观察及能谱测定结果

静脉注射 CCNPs 悬液 (即第 3 组) 小鼠的脑组织在电镜下发现脑微血管内皮细胞中及血管附近的脑组织中有呈高电子密度的圆形及类圆形颗粒存在 (见图 3), 从形态学判断这些颗粒并非细胞内的固有物质, 其大小符合所制备的纳米粒的粒径范围, 因

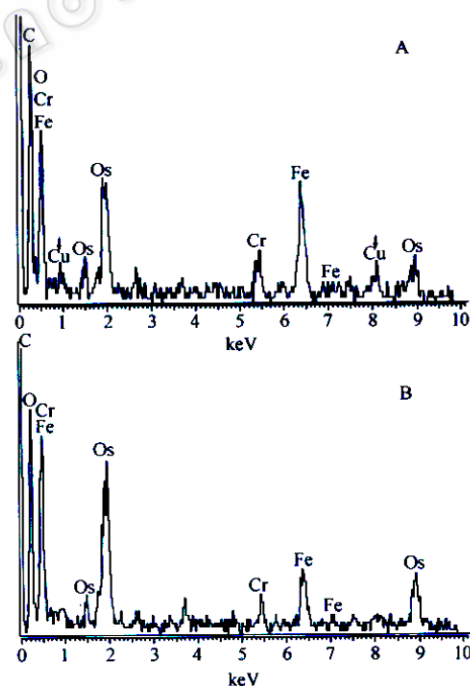


图 4 图 3 的能谱分析结果

Fig.4 X-ray energy-dispersive spectrometry (EDS) obtained in Fig.3

(A) EDS of CCNPs; (B) EDS of brain tissue surround the CCNPs and brain tissue of the control groups

而推断为进入细胞内的 PLA 纳米粒; 而第 5、7 两组小鼠脑组织中未观察到此种颗粒。

将图 3 中观察到的颗粒进行 X 线能量散射谱分析, 同时对周围无颗粒存在的脑组织以及第 5、7

组小鼠脑组织(能谱分析图略)也行能谱分析,结果如图 4 所示,除与对照组相同的元素 C、O、Fe、Cr、Os、U、Pb 外,颗粒部位的能谱图中出现 Cu(铜)元素(箭头所示),经计算其铜含量约为 $2.86 \times 10^3 \mu\text{g/g}$ 。

3 讨论

T-80 修饰的 PLA 纳米粒是具有穿透血脑屏障特性纳米载药系统的代表^[3,10]。研究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^[11,12],而由构成血脑屏障主要部分的脑毛细血管内皮细胞的胞吞转运目前认为是纳米粒载体穿透血脑屏障的主要机制之一^[3],但目前对经静脉进入机体组织内的纳米粒难以实现直观有效的定位,这一机制尚未得到充分证实。

运用电镜观察是研究纳米粒透过血脑屏障机制的重要方法,但是在电镜中识别与确认组织或细胞内的纳米粒却十分困难。电镜标本中纳米粒缺乏明确的标记,以往的研究仅依靠形态学和检测纳米粒包裹物质的生物活性间接进行证实。本研究创新性地将一种常用于药物、食品和美容品的色素-叶绿素铜^[13]用作纳米粒的标记物,并运用能将微观形态学研究 and 化学分析法相结合的能谱分析技术^[14]检测细胞内的颗粒是否带有铜元素,鉴定组织中的纳米粒,使上述问题得到解决。

本研究首先在荧光显微镜下观察到 FITC-D 标记 T-80 修饰的 PLA 纳米粒分布于小鼠脑微血管壁及脑组织内,对照组未观察到荧光;透射电镜观察到同组小鼠的脑微血管内皮细胞中存在外源性类圆形颗粒,直径与所制备的纳米粒相近,由于经超薄切片后用于电镜观察的脑组织量极为有限,且相对于神经元细胞及神经纤维,脑微血管的数量也较少,故观察到的内皮细胞中的颗粒呈散在分布,不及荧光镜下易见;对这些颗粒进行能谱分析发现,以周围脑组织的能谱分析作为对照(图 4),颗粒处脑组织铜元素含量明显增高,是正常鼠脑组织内铜含量(约为 $2.95 \mu\text{g/g}$)的 10^3 倍^[15],使得 CCNPs 能较容易的被区分出来,进一步确认这些颗粒是来自血液循环中包裹叶绿素铜的纳米粒。

图 3 中还显示了一些与所制备的 PLA 纳米粒粒径相近的颗粒散布于血管外脑组织中,为了排除在电镜标本的固定、包埋和染色过程中化学杂质沾染,我们也对这些颗粒及其周围脑组织进行了能谱分析,颗粒与周围脑组织的区别是存在铜元素,因电

镜标本的制备过程不涉及铜元素,说明它们也是 CCNPs,是活体时已进入脑组织的纳米粒。实验表明经静脉注射的 CCNPs 出现在脑微血管内皮细胞内和血管周围脑组织中,本实验结果从一定程度上证实脑毛细血管内皮细胞的胞吞转运是纳米粒穿透血脑屏障的机制。

本研究结合示踪方法和分析电镜检测技术为 T-80 修饰的 PLA 纳米粒具备穿透血脑屏障的特性提供了有力证据。但限于显微镜和电镜观察都只能做到对纳米粒的定性研究,对进入脑组织的纳米粒的定量问题尚需进一步探索。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Bickel U, Yoshikawa T, Pardridge W. Delivery of peptides and proteins through the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, **46**(1-3): 247-279
- [2] Gloor SM, Wachtel M, Bolliger MF *et al*. Molecular and cellular permeability control at the blood-brain barrier. *Brain Res Brain Res Rev*, 2001, **36**(2-3): 258-264
- [3] Kreuter J. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, **47**(1): 65-81
- [4] Kreuter J, Alyautdin RN, Kharkevich DA *et al*. Passage of peptides through the blood-brain barrier with colloidal polymer particles (nanoparticles). *Brain Res*, 1995, **674**(1): 171-174
- [5] Gulyaev AE, Gelperina SE, Skidan IN *et al*. Significant transport of doxorubicin into the brain with polysorbate 80-coated nanoparticles. *Pharm Res*, 1999, **16**(10): 1564-1569
- [6] Lockman PR, Mumper RJ, Khan MA *et al*. Nanoparticle technology for drug delivery across the blood-brain barrier. *Drug Dev Ind Pharm*, 2002, **28**(1): 1-13
- [7] Koziara JM, Lockman PR, Allen DD *et al*. *In situ* blood-brain barrier transport of nanoparticles. *Pharm Res*, 2003, **20**(11): 1772-1778
- [8] Sun W, Wang H, Hu Y *et al*. Specific role of polysorbate 80 coating on the targeting of nanoparticles to the brain. *Biomaterials*, 2004, **25**(15): 3065-3071
- [9] Fessi C, Devissaguet J, Puisieux F *et al*. Process for the preparation of dispersible colloidal systems of a substance in the form of nanoparticles. U.S. Patent 5,118,528
- [10] Ueda M, Kreuter J. Optimization of the preparation of loperamide-loaded poly(L-lactide) nanoparticles by high pressure emulsification-solvent evaporation. *J Microencapsul*, 1997, **14**(5): 593-605
- [11] Lockman PR, Koziara J, Roder KE *et al*. *In vivo* and *in vitro* assessment of baseline blood-brain barrier parameters in the presence of novel nanoparticles. *Pharm Res*, 2003, **20**(5): 705-713
- [12] Kreuter J, Range P, Petrov V *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. *Pharm Res*, 2003, **20**(3): 409-416
- [13] Zhou JH(周家华), Yang HR(杨辉荣), Li BN(黎碧娜) *et al*.

Dyestuffs: Food additive (in Chinese), Beijing, China: Chemical Industry Press, 2003

[14] Goldstein JI. Principles of thin film X-ray microanalysis: Introduction

to analytical electron microscopy, New York: Plenum Press, 1979

[15] Kubat WD, Prohaska JR. Copper status and ascorbic acid concentrations in rats. *Nutri Res*, 1996, **16**(2): 237 - 243

Polylactic Acid Nanoparticles Across the Brain-blood Barrier Observed with Analytical Electron Microscopy

WANG Hua-Fang¹ HU Yu^{1*} SUN Wang-Qiang^{2,3} XIE Chang-Sheng^{2,3}

¹ (Institute of Hematology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430022, China)

² (Nano Pharmaceutical Research Center, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430074, China)

³ (Department of Material Science & Engineering, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract The blood-brain barrier (BBB) is a huge obstacle in therapy of brain diseases, for it hinders the delivery of water-soluble molecules and those with molecular weight above 500 from the circulation system to the brain. Polysorbate 80 (Tween 80, T-80)-coated polylactid acid(PLA) nanoparticles represent a tool to transport such drugs across the BBB. Transcytosis is put forward as one mechanism of drug-loaded nanoparticles across the blood-brain barrier (BBB). However little is known about it. Electron microscopy is an important method in the investigation on nanoparticles injected into the experimental mice. In this study it was found by fluorescence microscope that fluorescence existed along the capillary dissepiment. Some nanoparticles distributed in the brain capillary endothelial cells and brain tissue outside the microvaculum, which was observed by transmission electron microscopy. These particles were proved to be the Copper chlorophyll loaded nanoparticles which containing Cu detected by AEM. The *in vivo* experiments demonstrated directly that the PLA nanoparticles can pass the BBB indeed and transcytosis by microvascular endothelial cells may be the mechanism. The results provided an efficient way of drug-delivery targeting the brain. Copper chlorophyll could be used as a new symbol of nanoparticles in *in vivo* experiment.

Key words polylactid acid nanoparticles, blood-brain barrier, copper chlorophyll, analytical electron microscopy

Received: 02-03-2004

This work was supported by Grant from the National Natural Science Foundation of China(No.30170392,50271029).

* Corresponding author. Tel:86-27-85755457; Fax:86-27-85755457; E-mail:huyi1964@163.net

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>