

乳铁蛋白修饰的纳米凝胶滴丸的制备及药物转运入脑性研究



董勤唯^{1,2}, 栗俏俏^{1,2}, 崔元璐^{1,2}, 陈映冰^{1,2}

1. 天津中医药大学中医药研究院组分中药国家重点实验室 (天津 301617)
2. 现代中医药海河实验室 (天津 301617)

【摘要】目的 改善天然药物的水溶性及其转运入脑的效率, 构建可负载难溶性药物的乳铁蛋白修饰的纳米凝胶滴丸剂并探究制备工艺, 为神经退行性疾病的药物开发提供参考。方法 以难溶性药物淫羊藿苷为负载药物, 利用反相微乳法制备乳铁蛋白修饰的海藻酸锌纳米凝胶, 采用 HPLC 法测定纳米凝胶中淫羊藿苷的载药率和包封率。以圆整度、丸重差异和溶散时限为评价指标, 采用单因素和 Box-Behnken 响应面法优选滴丸的最佳制备工艺, 并采用傅里叶变换红外光谱分析表征, 转篮法探究滴丸中纳米凝胶的释放行为, 荧光示踪法比较滴丸药物舌下含服和口服的入脑效率。结果 HPLC 法测得纳米凝胶的载药率为 $(2.67 \pm 0.05) \%$, 包封率为 $(84.74 \pm 0.03) \%$ 。乳铁蛋白修饰的纳米凝胶滴丸的最佳制备工艺为: 基质与纳米凝胶的比例 5:1, 滴距 5.5 cm, 冷凝温度 8.5 °C。以修饰物乳铁蛋白为标志物, 纳米凝胶体外累积释放率达到 92.25%。荧光示踪研究表明, 与口服给药相比, 滴丸通过舌下给药时, 能更快、更有效地协助药物穿过血脑屏障进入脑内, 提升了制剂将药物转运入脑的效率。结论 所制备的乳铁蛋白修饰的纳米凝胶可作为难溶性药物的负载平台, 改善药物水溶性, 进一步制备成滴丸剂舌下含服后极大提升了药物转运入脑的效率, 提高了神经退行性患者的用药依从性, 满足了临床用药需求。

【关键词】 纳米凝胶; 乳铁蛋白; 滴丸; Box-Behnken 响应面法; 舌下含服; 神经退行性疾病

Preparation of lactoferrin modified nanogel dropping pills and study on drug transport into brain

DONG Qinwei^{1,2}, LI Qiaoqiao^{1,2}, CUI Yuanlu^{1,2}, CHEN Yibing^{1,2}

1. State Key Laboratory of Component-based Chinese Medicine, Research Center of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

2. Haihe Laboratory of Modern Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

Corresponding author: CHEN Yibing, Email: chenyb@tjutcm.edu.cn

【Abstract】 Objective To improve the water solubility of natural drugs and the efficiency of their transport into the brain, to prepare nanogel dropping pills modified with lactoferrin for loading poorly soluble drugs and investigate the preparation process, and to

DOI: 10.12173/j.issn.1008-049X.202311267

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (82104399)

通信作者: 陈映冰, 博士, 高级工程师, Email: chenyb@tjutcm.edu.cn

<https://zgys.whuzhmedj.com>

provide a reference for drug development in the field of neurodegenerative diseases. **Methods** Using the insoluble drug icariin as the payload, the lactoferrin-modified zinc alginate nanogels were prepared by the reverse-phase microemulsion method. The drug loading and encapsulation rates of icariin in the nanogel were determined by HPLC. Taking the utilizing parameters such as roundness, weight difference and disintegration time as evaluation indicators, the best preparation process of dropping pills was optimized by single factor experiments and Box-Behnken response surface methodology. It was characterized by Fourier transform infrared spectroscopy, the release behavior of nanogel in dropping pills was explored by basket rotating method, and the brain entry efficiency between sublingual and oral administration of drip pills were compared by fluorescence tracing method. **Results** The drug loading rate of the nanogel was $(2.67 \pm 0.05)\%$, and the encapsulation rate was $(84.74 \pm 0.03)\%$ by HPLC. The optimal preparation process for lactoferrin modified nanogel dropping pills was as follows: the ratio of matrix to nano gel was 5:1, the drop distance was 5.5 cm, and the condensation temperature was 8.5 °C. Using the modified lactoferrin as a marker, its cumulative release rate *in vitro* reached 92.25%. Fluorescence tracing studies showed that compared to the oral group, sublingual administration of dripping pills facilitated the faster and more effective passage of drugs through the blood-brain barrier, significantly enhanced the efficiency of drug transport into the brain. **Conclusion** The prepared lactoferrin-modified nanogels can be used as a loading platform for poorly soluble drugs and enhance the drug solubility. When further formulated into dripping pills, it significantly enhances the efficiency of drug transport into the brain after sublingual administration. This also enhances medication compliance among neurodegenerative patients and fulfills the clinical demand for the drug.

【Keywords】 Nanogel; Lactoferrin; Dropping pills; Box-Behnken response surface method; Sublingual administration; Neurodegenerative disease

神经退行性疾病是一类以神经元退化或死亡而引起的神经系统疾病，常见的疾病主要包括阿尔茨海默症、帕金森病、肌萎缩侧索硬化症和亨廷顿舞蹈症等。随着人口老龄化的加剧，目前神经退行性疾病已成为继心血管疾病、癌症与脑卒中以外的第四大疾病，不仅严重影响了患者的生命健康，而且造成了极大的医疗和经济负担^[1-2]。

现有的治疗药物多以合成药物为主，存在不良反应大、靶向性差和长期使用药效减退等诸多问题。天然药物因其出色的神经保护、抗氧化和抗炎优势受到了广泛关注，被视为神经退行性疾病的潜在治疗手段。然而，活性强的天然药物多存在水溶性差及生物利用度低的缺点，因此，限制了天然药物的临床应用。选择合适的药物载体对于难溶性药物的递送至关重要，海藻酸钠是一种阴离子的亲水性多糖，可与二价金属阳离子（ Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 等）交联发生凝胶化，由于具备良好的生物相容性和低毒性常将其用于设计药物递

送的载体，海藻酸盐纳米制剂在脑部释药系统中也取得了良好的进展^[3-4]。

此外，血脑屏障（blood brain barrier, BBB）是影响药物进入中枢神经系统的主要障碍，提高药物的转运入脑效率是治疗神经退行性疾病的关键^[5-6]。目前促进药物穿过 BBB 入脑的策略主要有脑室注射等侵入性给药法；超声干扰增强 BBB 的通透性；增加分子脂溶性的药物化学策略；配体-受体相互作用的智能递送策略^[7]。然而，脑室内注射给药可造成患者颅内损伤和感染^[8]；同时，BBB 干扰给药也可破坏脑内稳态^[9-11]。

利用配体-受体介导的胞吞作用来改善药物跨 BBB 的转运是一种很有前途的非侵入性入脑方式^[12]。研究发现，脑微血管内细胞壁上存在转铁蛋白（transferrin, TF）受体、乳铁蛋白（lactoferrin, LF）受体和胰岛素受体等特异性受体^[13]。其中，LF 属于 TF 家族，参与铁离子的转运，还具有抗菌、抗氧化和调节免疫系统等药理

活性^[14]。研究表明,将这些可与受体结合的配体修饰于药物载体,有助于促使药物载体通过配体-受体介导的胞吞转运作用穿过 BBB 进入脑内,从而有效提升药物的生物利用度^[15]。

目前,大多数研究主要采用静脉给药的方式来考察 LF 修饰药物载体对神经退行性疾病的治疗效果^[14],鉴于患者临床治疗的实际意义,本研究将纳米凝胶释药系统进一步制成滴丸,采用舌下含服的方式进行给药。舌下经由口腔黏膜丰富的毛细血管吸收,随后经颈内静脉进入全身循环,从而避免药物被胃酸或消化酶破坏的风险,同时也规避了肝脏的首过效应^[16]。由于制备工艺简单、携带方便、质量稳定且易控制,药物的生物利用度高,滴丸在临床的应用较为广泛^[17-18]。

本试验以难溶性药物淫羊藿苷为负载药物,为提高其水溶性,设计了海藻酸锌纳米凝胶释药系统,以 LF 修饰释药体系并制备滴丸剂(LF-SA-NGDP@ICAR),探究其制备工艺,最后研究滴丸经舌下含服后的入脑效率,为神经退行性疾病的治疗提供一种新的途径。

1 材料

1.1 主要仪器

ME204 型电子分析天平[梅特勒托利多仪器(上海)有限公司];JT1003D 型分析天平(上海力辰邦西仪器科技有限公司);QL-901 型涡旋振荡器[其林贝尔仪器制造(海门)有限公司];RWD 50 型顶置式电动搅拌器(上海高致精密仪器有限公司);BT100-2J 型蠕动泵(保定兰格恒流泵有限公司);VaCo 5-80 冷冻干燥机(ZIRBUS);2998 型高效液相色谱仪(Waters 公司);Spark 多功能酶标仪(Tecan 公司);IVS Lumina III 小动物活体光学成像系统(PerkinElmer 公司);FTS3000 型红外光谱仪(BIO-RAD 公司);D1524R 型高速冷冻型微量台式离心机(大龙兴创实验仪器有限公司)。

1.2 主要药品与试剂

海藻酸钠(SA,批号:67H03232)、吐温 80(批号 316F011SX)、司盘 80(批号:1045492201)、罗丹明 B 异硫氰酸酯(RBITC,批号:MKBS2591V)和溴化钾(KBr,批号:BCCD7234)均购自 Sigma-Aldric;LF(来源于牛乳,上海源叶生物科技有限公司,批号:A16GS145363);淫羊藿苷(ICAR,

江苏永健医药科技有限公司,批号:101141,纯度 98%);无水氯化锌($ZnCl_2$,伊诺凯,批号:KCEDC22,纯度 98%);聚乙二醇 4000(PFG 4000,批号 521E036)、PBS 缓冲液(批号:P1003)均购自北京索莱宝科技有限公司;液体石蜡(分析纯,天津市风船化学试剂科技有限公司,批号:YTSL001);BCA 蛋白定量试剂盒(赛默飞世尔科技有限公司,批号:WE325506);1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC,Alfa Aesar 公司,批号:L2128245);N-羟基丁二酰亚胺(NHS,阿拉丁生化科技股份有限公司,批号:02019238);枸橼酸钠(天津市风船化学试剂科技有限公司,批号 KMTSC0081);甲醇和乙腈为色谱纯;水为纯化水。

1.3 动物

健康 C57BL/6J 小鼠,雄性,8 周龄,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,动物合格证号:SCXK(京)2019-0008,饲养于天津中医药大学动物实验中心,小鼠在 20~25 °C、相对湿度 40%~60% 的条件下正常饮食饮水,适应性喂养 1 周后进行实验。本研究通过天津中医药大学实验动物伦理委员会审查批准(批件号:TCM-LAEC2023066)。

2 方法与结果

2.1 SA-LF 的合成

称取 1.0 g 的 SA 粉末于 250 mL 圆底烧瓶中,向圆底烧瓶中加入 100 mL 去离子水,40 °C 条件下 600 r/min 搅拌 4 h,得到 1% 的 SA 溶液;将适量 EDC 和 NHS 加入圆底烧瓶并将温度降低至 30 °C,继续搅拌 2 h。称取 100 mg 的 LF 加至上述反应液并搅拌 24 h,反应完毕后将转移至超滤管内(截留分子量:80 kDa),380 ×g 离心 10 min 纯化,最后预冻并冷冻干燥,密封保存样品备用。

2.2 LF-SA-NG@ICAR 的制备

向三颈烧瓶内加入 50 mL 的液体石蜡和 0.5 mL 亲水亲油平衡值为 7.4 的表面活性剂,将顶置式搅拌器的搅拌速度设为 500 r/min,水浴温度为 40 °C,充分混匀 30 min 后,以蠕动泵流速为 0.75 mL/min 向三颈烧瓶内缓慢加入 15 mL 的 SA-LF 溶液,滴加完毕后调节搅拌速度为 1 000 r/min,继续搅拌 1 h,调节蠕动泵流速为

0.15 mL/min, 将 5 mL 的 1.2 mg/mL 含淫羊藿苷的氯化锌溶液 (其中淫羊藿苷的浓度为 0.3%) 加入其中, 凝胶化 1 h 后停止搅拌; 将反应液 $380 \times g$ 离心 15 min, 保留下层纳米凝胶预冻并冷冻干燥, 得到 LF-SA-NG@ICAR, 密封干燥储存。

图 1A 和图 1B 所示, 纳米凝胶在冻干前呈现水油分层的现象, 将下层水相冷冻干燥, 纳米凝胶呈现疏松多孔的海绵状, 体积几乎不变, 保存备用。图 1C 和图 1D 分别比较了相同含量的淫羊藿苷和 SA-NG@ICAR (以淫羊藿苷的含量计算) 溶于等体积超纯水后溶解性的变化, 前者淫羊藿苷的水溶性较差, 呈现混悬液的状态, 而后者将其制成纳米凝胶后呈现均一、稳定的溶液状态。因此, 利用海藻酸锌纳米凝胶作为释药储库明显改善难溶性药物淫羊藿苷的水溶性。

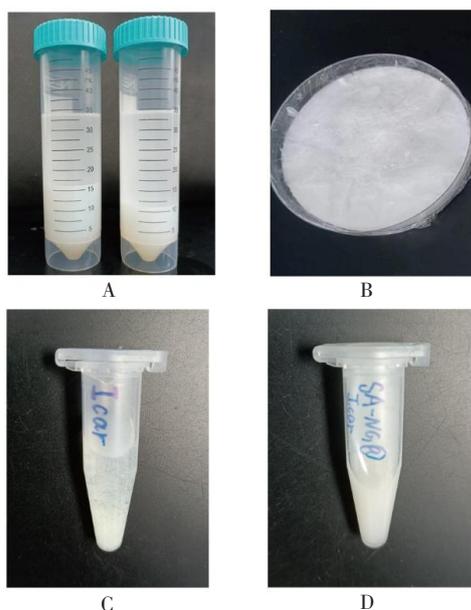


图 1 LF-SA-NG@ICAR 的外观及水溶性变化
Figure 1. The appearance and water solubility changes of LF-SA-NG@ICAR

注: A. 冻干前外观; B. 冻干后外观; C. 淫羊藿苷的水溶性变化; D. SA-NG@ICAR 的水溶性变化。

2.3 LF-SA-NG@ICAR 载药率和包封率测定

HPLC 色谱条件^[19]: 采用 ODS-2 Hypersil C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-超纯水 (30:70); 流速为 1.0 mL/min; 检测波长为 270 nm; 柱温为 25 °C; 进样量为 10 μL; 检测时间为 10 min。淫羊藿苷的线性范围为 3.90~500.00 μg/mL ($r=0.9999$), 平均回收率为 102.00%, RSD 为 1.57% ($n=3$)。

称取 3 份纳米凝胶样品于 15 mL 离心管中, 加入柠檬酸钠溶液裂解凝胶释放药物, 接着加入无水甲醇溶解淫羊藿苷, 60 Hz 超声 30 min 助溶, 溶液经 0.45 μm 孔径滤膜过滤用于 HPLC 测定, 按以下公式计算纳米凝胶的载药率和包封率:

$$\text{载药率}(\%) = \frac{C \times V}{m_1 \times 1000} \times 100\%$$

$$\text{包封率}(\%) = \frac{C \times V}{m_2 \times 1000} \times 100\%$$

其中, C 为纳米凝胶样品中药物的浓度 (μg/mL); V 为纳米凝胶样品溶解的体积 (mL); m_1 为纳米凝胶样品的质量 (mg); m_2 为投入药物的初始质量 (mg)。计算得 LF-SA-NG@ICAR 中淫羊藿苷的载药率为 (2.67 ± 0.05)%、包封率为 (84.74 ± 0.03)% ($n=3$)。

2.4 LF-SA-NGDP@ICAR 的制备

水溶性基质 PFG 4000 具有良好的分散力和内聚力^[20-21], 将冷冻干燥的 LF-SA-NG@ICAR 溶解后与 PFG 4000 按照比例混合, 在流动性良好的情况下及时转移至带水浴循环的滴制装置中, 以轻质液体石蜡为冷凝剂制备纳米凝胶的滴丸制剂 LF-SA-NGDP@ICAR。

2.4.1 LF-SA-NGDP@ICAR 单因素考察

以《中国药典 (2020 年版)》四部^[22]中规定的圆整度、丸重差异和溶散时限为考察指标, 选择制备工艺中基质与纳米凝胶的比例、滴距和冷凝温度进行单因素试验, 考察各因素对滴丸成型性的影响。滴丸圆整度和丸重变异系数的计算公式如下:

$$\text{滴丸圆整度} = \frac{\text{滴丸的短径}}{\text{滴丸的长径}} \times 100\%$$

$$\text{丸重变异系数} = \frac{\text{滴丸的标准偏差}}{\text{滴丸的丸重平均值}} \times 100\%$$

单因素试验的结果可见表 1~表 3, 分别评价各因素对圆整度、丸重差异和溶散时限的影响, 最终选择基质与纳米凝胶的比例 4:1、滴距为 6 cm 和冷凝温度 5 °C 进行后续的响应面试验研究。

2.4.2 LF-SA-NGDP@ICAR 响应面优化试验

确定影响因素后, 采用 Box-Behnken 响应面法进行处方优化, 以圆整度、丸重差异以及溶散时限综合评分为响应值^[23], 综合评分 (Y) =

(1-圆整度) × 40% + 丸重差异 × 30% + 溶散时限 × 30%, Y 值越低越好, 试验设计因素与水平见表 4。

表1 基质与纳米凝胶的比例对圆整度、丸重差异和溶散时限的影响

Table 1. Effect of matrix to nanogel ratio on roundness, pellet weight difference and dissolution

基质与纳米凝胶比例 (v/v)	圆整度	丸重差异 (%)	溶散时限 (min)
3:1	0.86	10.85	11.26
4:1	0.97	6.08	7.86
5:1	0.93	8.49	9.13
6:1	0.92	10.12	10.37

表2 滴距对圆整度、丸重差异和溶散时限的影响
Table 2. Effect of drop distance on roundness, pellet weight difference and dissolution time

滴距 (cm)	圆整度	丸重差异 (%)	溶散时限 (min)
4	0.98	5.60	8.51
6	0.97	6.08	7.86
8	0.94	10.35	8.42
10	0.92	10.58	9.28

表3 冷凝液温度对圆整度、丸重差异和溶散时限的影响

Table 3. Effect of condensing temperature on roundness, pellet weight difference and dissolution time

冷凝温度 (°C)	圆整度	丸重差异 (%)	溶散时限 (min)
0	0.94	7.88	10.86
5	0.97	6.08	7.86
10	0.93	6.17	10.83
15	0.93	9.58	11.23

表4 响应面试验设计

Table 4. Experimental design of response surface

水平	因素		
	A-基质与纳米凝胶比例 (v/v)	B-滴距 (cm)	C-冷凝温度 (°C)
-1	4:1	4	0
0	5:1	6	5
1	6:1	8	10

2.4.2.1 响应曲面模型的建立和回归方程显著性结果分析

利用 Design Expert 软件进行分析, 拟合出综合评分与基质与纳米凝胶比例、滴距和冷凝温度的高次多项回归方程: $Y=4.39+0.0625A+0.0688B-0.1763C-0.2150AB-0.3150AC+1.06BC+0.8903A^2+1.79B^2+0.3078C^2$ 。由表5可知, 该模型的F为19.74, P为0.0004, 该模型的显著性良好, 对综合得分的影响顺序依次为: 冷凝温度 > 滴距 > 基质与纳米凝胶的比例。

2.4.2.2 因素间交互作用分析

利用 Design Expert 软件对各因素之间的交互作用做响应面分析, 得到相应的响应曲面图及等高线图(图2)。由图可知, 响应曲面的坡度较为陡峭, 说明基质与纳米凝胶的比例和滴距以及滴距和冷凝温度的交互作用对综合评分较为明显。

2.4.2.3 最佳工艺的验证

根据优化结果预测基质与纳米凝胶的比例为5:1, 滴距为5.5 cm, 冷凝温度为8.5 °C, 平行制备3批 LF-SA-NGDP@ICAR, 测得其圆整度为 0.92 ± 0.02 、丸重差异为 $(8.67 \pm 0.3)\%$ 、溶散时限为 (6.32 ± 0.13) min ($n=3$), 丸形完整, 硬度较好, 无拖尾粘连现象(图3), 说明该工艺的可行性较好。

2.5 LF-SA-NGDP@ICAR的傅里叶变换红外光谱分析

用溴化钾将 PEG 4000、LF-SA-NG@ICAR 和 LF-SA-NGDP@ICAR 分别压片, 设定波长范围为 $4000\sim 400\text{ cm}^{-1}$, 在此范围内分别对样品进行傅里叶变换红外 (fourier-transform infrared, FT-IR) 光谱测定。

图4结果显示, PEG 4000 的 FT-IR 光谱中, 3410 cm^{-1} 处为 -OH 的伸缩振动吸收峰, 且吸收峰较宽, 1110 cm^{-1} 波长处为 C-O 的伸缩振动吸收峰; 在 LF-SA-NG@ICAR 的 FT-IR 光谱中, 3376 cm^{-1} 是 LF 支链或末端氨基 -NH 的伸缩吸收峰, 1658 cm^{-1} 和 1573 cm^{-1} 分别是 SA 与 LF 结合后新形成的酰胺键中 -C=O 和 -NH 的吸收峰; 将 LF-SA-NG@ICAR 与基质 PEG 4000 熔融制备成滴丸 LF-SA-NGDP@ICAR 后, 由于基质的比例较大, LF-SA-NGDP@ICAR 的 FT-IR 光谱图与 PEG 4000 的 FT-IR 光谱图相似, 且未出现新的吸收峰。这一结果表明, 在制备过程中,

表5 综合评分拟合模型的方差分析

Table 5. ANOVA for the comprehensive score fitting mode

来源	平方和	自由度	均方和	F	P
模型	23.85	9	2.65	19.74	0.000 4
A	0.031 3	1	0.031 3	0.232 8	0.644 2
B	0.037 8	1	0.037 8	0.281 7	0.612 0
C	0.248 5	1	0.248 5	1.85	0.215 8
AB	0.184 9	1	0.184 9	1.38	0.278 9
AC	0.396 9	1	0.396 9	2.96	0.129 2
BC	4.52	1	4.52	33.64	0.000 7
A ²	3.34	1	3.34	24.86	0.001 6
B ²	13.46	1	13.46	100.24	<0.000 1
C ²	0.398 8	1	0.398 8	2.97	0.128 5
残差	0.939 8	7	0.134 3		
失拟项	0.564 5	3	0.188 2	2.01	0.255 6
纯误差	0.375 3	4	0.0938		
总误差	24.79	16			

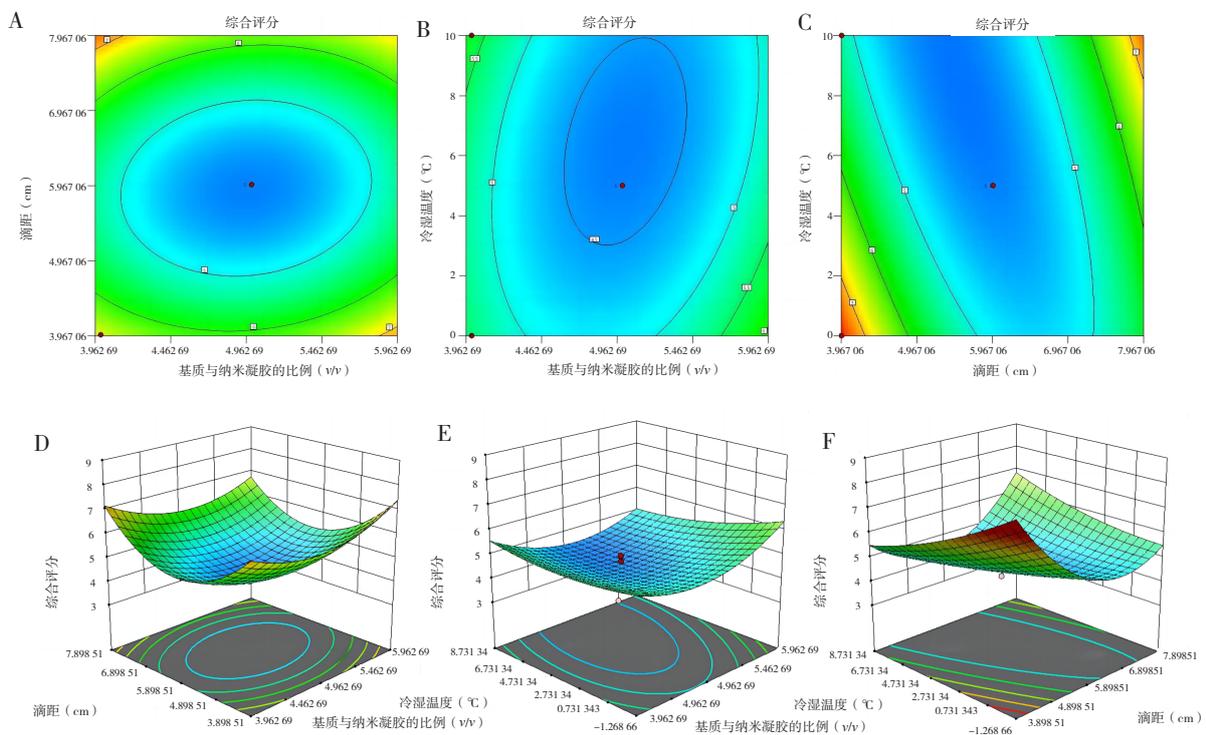


图2 基质与纳米凝胶的比例、滴距和冷凝温度对综合评分交互作用的等高线图和响应面图

Figure 2. Contour plots and response surface plots of the interaction of matrix to nanogel ratio, drop spacing and condensation temperature on comprehensive score

注：A. 基质与纳米凝胶的比例-滴距对综合评分的等高线图；B. 基质与纳米凝胶的比例-冷凝温度对综合评分的等高线图；C. 滴距-冷凝温度对综合评分的等高线图；D. 基质与纳米凝胶的比例-滴距对综合评分的响应面图；E. 基质与纳米凝胶的比例-冷凝温度对综合评分的响应面图；F. 滴距-冷凝温度对综合评分的响应面图。



图3 LF-SA-NGDP@ICAR的外观图

Figure 3. The appearance of LF-SA-NGDP@ICAR

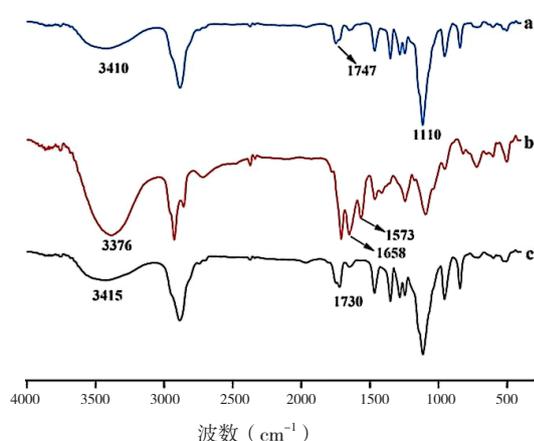


图4 PEG 4000 (a)、LF-SA-NG@ICAR (b) 和LF-SA-NGDP@ICAR (c) 的FT-IR光谱图

Figure 4. FT-IR spectra of PEG 4000 (a), LF-SA-NG@ICAR (b) and LF-SA-NGDP@ICAR (c)

纳米凝胶与 PEG 4000 两者未发生化学反应，各自保持了其化学稳定性，这一点符合《中国药典（2020年版）》四部^[22]中对于滴丸基质的要求，即基质不应与主药发生相互作用，不影响主药的性质和检测。因此，LF-SA-NGDP@ICAR 的制备过程科学合理，确保了制剂的稳定性和安全性，为后续的动物实验提供了坚实的基础。

2.6 LF-SA-NGDP@ICAR中纳米凝胶释放行为研究

以 LF 为标志物，研究 LF-SA-NGDP@ICAR 中纳米凝胶的释放行为。采用转篮法，在容器中加入 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液 100 mL，设定温度为 37 °C，调节水平转速为 100 r/min，投入 6 粒滴丸，于预先设定的时间点收集 5 mL 释放液，并补充相同体积和温度的释放介质；然后通过

BCA 法测定各时间点取样的释放介质中 LF 的浓度，每个时间点设置 3 个平行对照样品。

由图 5 结果可知，在 0~2 h 内，LF-SA-NG@ICAR 纳米凝胶的释放速率较快，0.5、1、2 h 的累积释放率分别为 28.23%、43.10%、56.17%，6 h 后释放速度逐渐趋于平缓，最终的累积释放率达到 92.25%。说明纳米凝胶释药储库可以从滴丸制剂中释放，与 BBB 上的 LF 受体特异性结合，从而增加药物进入大脑的机会。通过对纳米凝胶的释放行为进行拟合，表 6 结果显示，LF-SA-NG@ICAR 的体外释放拟合更符合一级释放方程。虽然滴丸属于速释制剂，但是由于其中包载纳米凝胶释药系统，因此总体呈现出缓释行为。

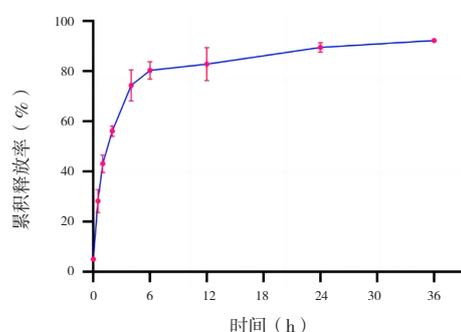


图5 LF-SA-NG@ICAR的体外释放 (n=3)

Figure 5. In vitro release of LF-SA-NG@ICAR (n=3)

表6 3LF-SA-NG@ICAR体外释放曲线拟合
Table 6. Fitting of LF-SA-NG@ICAR *in vitro* release curve

模型	拟合方程	R ²
零级释放	$M_t = 1.72t + 44.99$	0.435 8
一级释放	$M_t = 86.12 (1 - e^{-0.602t})$	0.973 4
Higuchi释放	$M_t = 13.21t^{1/2} + 28.95$	0.705 2

注：M_t为累积释放率，t为释放时间。

2.7 RBITC标记的LF-SA-NGDP@ICAR转运入脑研究

2.7.1 RBITC标记的LF-SA-NGDP@ICAR的制备

在避光条件下称取适量 RBITC 于烧杯中，加入超纯水搅拌 2 h，再加入适量 EDC 和 NHS 至反应体系中搅拌 2 h，最后加入 20 mL 1% 的 SA 溶液，反应 24 h。将上述反应液进行透析（截留分子量：7 000 kDa），结束后预冻并冷冻干燥得到 RBITC 标记的 SA。

按照“2.4”项下方法将 RBITC 标记的 SA 制备成负载纳米凝胶释药系统的滴丸剂。

2.7.2 动物分组、给药与取材

将小鼠随机分为 2 组，每组分别采用口服和舌下含服的方式给予含有 RBITC 标记的 LF-SA-NGDP@ICAR，分别于 10、60、120、240 min 取小鼠的全脑，并用预冷的生理盐水冲洗，采用小动物成像仪观察 LF-SA-NGDP@ICAR 在小鼠脑内的分布情况。

由图 6 结果可知，口服组是在 120 min 时荧光强度最强，而舌下含服组在 10 min 时的荧光强度显著高于口服组，原因是 RBITC 标记的 LF-SA-NGDP@ICAR 舌下含服后，纳米凝胶从滴丸中释放后经过舌下黏膜吸收入血，随血液循环到达脑组织，LF 修饰的释药系统与 BBB 上的 LF 受体相结合，将药物递送至脑内发挥疗效，显著提高药物的生物利用度，同时避免了口服给药导致部分 LF 被胃蛋白酶消化而脑靶向性降低的问题。

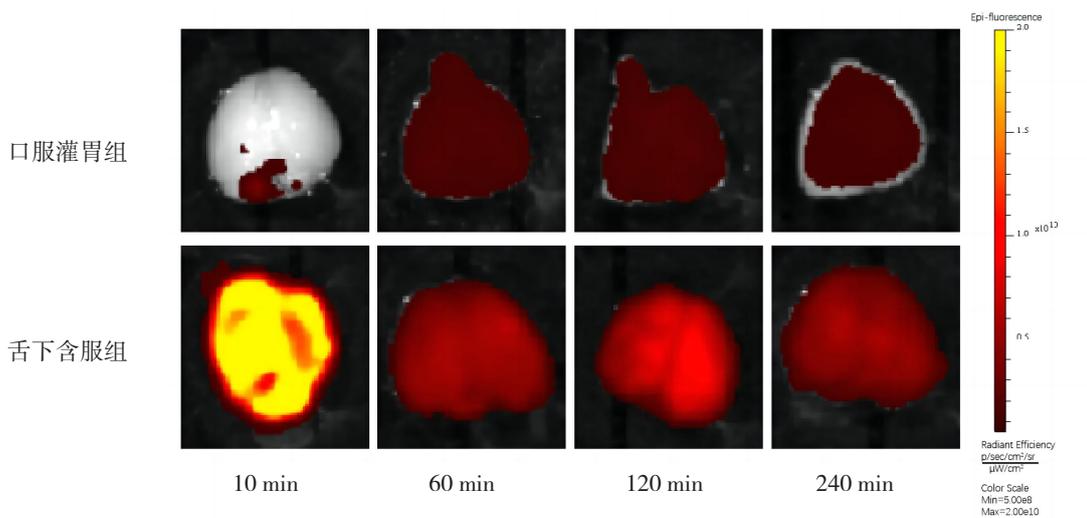


图6 RBITC标记的LF-SA-NGDP@ICAR在小鼠脑组织分布和荧光强度

Figure 6. Distribution and fluorescence intensity of RBITC-labeled LF-SA-NGDP@ICAR in mouse brain tissues

3 讨论

随着人口老龄化加剧，神经退行性疾病的发病率呈上升趋势，逐渐受到了大家的广泛关注。然而，中枢神经系统独特而复杂的生理环境以及 BBB 的难透过性使神经退行性疾病的临床治疗异常困难^[24-25]。由于内源性 TF 含量较多，可与 TF 受体结合，导致外源性 TF 修饰的载体靶向性减弱，而 LF 与 TF 不同，LF 本身带有的弱正电性将会促进与表面带有负电荷细胞的相互作用^[15, 26-28]。除此之外，LF 受体会预留未被内源性 LF 结合的靶点，不会对外源性 LF 的结合产生竞争抑制。因此，与 TF 相比较，以 LF 为脑靶向配体修饰药物载体具有更好的优势^[29]。

目前以 LF 为脑靶向配体修饰的药物载体主要采用静脉注射的方式考察其在体内的应用，但神经退行性疾病多为慢性疾病，患者需长期用药，因此，静脉注射给药的方式并不适合临床应用。

将 LF 修饰后的药物载体采用口服的形式虽然是目前最便捷的用药方式，但存在两个主要问题：一方面，首过效应降低药物疗效；另一方面，LF 会被胃蛋白酶消化，吸收进入血液后无法与 BBB 上的受体结合，从而降低制剂的脑靶向性。由于唾液中不存在分解 LF 的酶，因此采用舌下给药的形式可避免以上两种情况。除此之外，考虑到患者的顺应性及实际需求，制备了可舌下含服的纳米凝胶滴丸剂。

综上所述，本文首先利用反向微乳法制备 LF-SA-NG@ICAR，提高了难溶性药物淫羊藿苷的水溶性。进一步构建了负载纳米凝胶释药系统的滴丸剂，采用单因素考察和 Box-Behnken 响应面法进行 LF-SA-NGDP@ICAR 的工艺优化。LF 修饰的纳米凝胶释药系统首先从滴丸中释放，经过舌下静脉吸收进入血液循环，与 BBB 上的 LF 受体结合，通过配体-受体特异性结合将药物转运入脑。与口服给药比较，LF-SA-NGDP@ICAR

舌下含服的方式不仅提高了难溶性药物转运入脑的效率, 而且对于患者的用药依从性具有重要意义, 证明了其在治疗神经退行性疾病方面具有一定的潜力, 为难溶性天然药物治疗神经退行性疾病的制剂开发和临床应用提供一种新型思路。

参考文献

- 1 Armstrong MJ, Okun MS. Diagnosis and treatment of parkinson disease: a review[J]. JAMA, 2020, 323(6): 548–560. DOI: [10.1001/jama.2019.22360](https://doi.org/10.1001/jama.2019.22360).
- 2 Stephenson J, Nutma E, van der Valk P, et al. Inflammation in CNS neurodegenerative diseases[J]. Immunology, 2018, 154(2): 204–219. DOI: [10.1111/imm.12922](https://doi.org/10.1111/imm.12922).
- 3 Severino P, Da Silva CF, Andrade LN, et al. Alginate nanoparticles for drug delivery and targeting[J]. Curr Pharm Des, 2019, 25(11): 1312–1334. DOI: [10.2174/1381612825666190425163424](https://doi.org/10.2174/1381612825666190425163424).
- 4 Zhang CY, Yan L, Wang X, et al. Progress, challenges, and future of nanomedicine[J]. Nano Today, 2020, 35: 101008. DOI: [10.1016/j.nantod.2020.101008](https://doi.org/10.1016/j.nantod.2020.101008).
- 5 Segarra M, Aburto MR, Acker-Palmer A. Blood-brain barrier dynamics to maintain brain homeostasis[J]. Trends Neurosci, 2021, 44(5): 393–405. DOI: [10.1016/j.tins.2020.12.002](https://doi.org/10.1016/j.tins.2020.12.002).
- 6 Dong XW. Current strategies for brain drug delivery [J]. Theranostics, 2018, 8(6): 1481–1493. DOI: [10.7150/thno.21254](https://doi.org/10.7150/thno.21254).
- 7 周建平, 孙曼霁. 蛋白质转导结构域的跨血脑屏障药物递送 [J]. 中国药理学通报, 2007, 23(11): 1401–1405. [Zhou JP, Sun MQ, Drug delivery to the brain using PTD transport systems[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2007, 23(11): 1401–1405.] DOI: [10.3321/j.issn: 1001-1978.2007.11.001](https://doi.org/10.3321/j.issn: 1001-1978.2007.11.001).
- 8 Sethi B, Kumar V, Mahato K, et al. Recent advances in drug delivery and targeting to the brain[J]. J Control Release, 2022, 350: 668–687. DOI: [10.1016/j.jconrel.2022.08.051](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.08.051).
- 9 Lochhead JJ, Thorne RG. Intranasal delivery of biologics to the central nervous system[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2012, 64(7): 614–628. DOI: [10.1016/j.addr.2011.11.002](https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.11.002).
- 10 Keller LA, Merkel O, Popp A. Intranasal drug delivery: opportunities and toxicologic challenges during drug development[J]. Drug Deliv Transl Res, 2022, 12(4): 735–757. DOI: [10.1007/s13346-020-00891-5](https://doi.org/10.1007/s13346-020-00891-5).
- 11 Ganger S, Schindowski K. Tailoring formulations for intranasal nose-to-brain delivery: a review on architecture, physico-chemical characteristics and mucociliary clearance of the nasal olfactory mucosa[J]. Pharmaceutics, 2018, 10(3): 116. DOI: [10.3390/pharmaceutics10030116](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10030116).
- 12 Arvanitis CD, Ferraro GB, Jain RK. The blood-brain barrier and blood-tumour barrier in brain tumours and metastases[J]. Nature Reviews Cancer, 2020, 20(1): 26–41. DOI: [10.1038/s41568-019-0205-x](https://doi.org/10.1038/s41568-019-0205-x).
- 13 Hersh AM, Alomari S, Tyler BM. Crossing the blood-brain barrier: advances in nanoparticle technology for drug delivery in neuro-oncology[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(8): 4153. DOI: [10.3390/ijms23084153](https://doi.org/10.3390/ijms23084153).
- 14 Xiong S, Luo JS, Wang Q, et al. Targeted graphene oxide for drug delivery as a therapeutic nanoplatform against Parkinson's disease[J]. Biomater Sci, 2021, 9(5): 1705–1715. DOI: [10.1039/d0bm01765e](https://doi.org/10.1039/d0bm01765e).
- 15 Mittal S, Ashhar MU, Qizilbash FF, et al. Ligand conjugated targeted nanotherapeutics for treatment of neurological disorders[J]. Curr Pharm Des, 2020, 26(19): 2291–2305. DOI: [10.2174/1381612826666200417141600](https://doi.org/10.2174/1381612826666200417141600).
- 16 Goswami T, Jasti B, Li XL. Sublingual drug delivery[J]. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 2008, 25(5): 449–484. DOI: [10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.v25.i5.20](https://doi.org/10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.v25.i5.20).
- 17 汪盈盈, 柳继锋. 中药滴丸研究进展 [J]. 产业与科技论坛, 2017, 16(12): 67–68. [Wang YY, Liu JF. Research progress of traditional Chinese medicine dropping pills[J]. Industrial & Science Tribune, 2017, 16(12): 67–68.] DOI: [CNKI:SUN:CYYT.0.2017-12-036](https://doi.org/CNKI:SUN:CYYT.0.2017-12-036).
- 18 李倩. 复方丹参滴丸研究进展及临床应用 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(7): 2989–2991. [Li Q. Research progress and clinical application of compound danshen dripping pills[J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2018, 33(7): 2989–2991.] DOI: [CNKI:SUN:BXYY.0.2018-07-078](https://doi.org/CNKI:SUN:BXYY.0.2018-07-078).
- 19 范雪兰, 徐超群, 曹阳, 等. 生态因子与柔毛淫羊藿药效成分含量及花、叶性状的相关性研究 [J]. 中国中药杂志, 2024, 1–13. [Fan XL, Xu CQ, Cao Y, et al. Study on the correlation between ecological factors and the content of pharmacodynamic components, flower and leaf characters of Epimedium[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2024, 1–13.] DOI: [10.19540/j.cnki.cjcm.20240317.102](https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjcm.20240317.102).

- 20 马霄, 颜国华, 王世广, 等. 隐丹参酮滴丸制备及其体内药动学研究[J]. 中成药, 2023, 45(9): 2809–2815. [Ma X, Yan GH, Wang SG, et al. Preparation and *in vivo* pharmacokinetics of cryptotanshinone dropping pills[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2023, 45(9): 2809–2815.] DOI: [10.3969/j.issn.1001-1528.2023.09.001](https://doi.org/10.3969/j.issn.1001-1528.2023.09.001).
- 21 刘万路. 柚皮素磷脂酰胆碱复合物滴丸处方优化及口服药动学评价[J]. 中草药, 2023, 54(19): 6253–6263. [Liu WL. Formulation optimization of naringenin-phosphatidylcholine complex dropping pills and oral pharmacokinetics evaluation[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2023, 54(19): 6253–6263.] DOI: [10.7501/j.issn.0253-2670.2023.19.007](https://doi.org/10.7501/j.issn.0253-2670.2023.19.007).
- 22 中国药典 2020 年版. 四部[S]. 2020: 45–46.
- 23 Rey M, Fernandez-Rodriguez MA, Karg M, et al. Poly-N-isopropylacrylamide nanogels and microgels at fluid interfaces[J]. Acc Chem Res, 2020, 53(2): 414–424. DOI: [10.1021/acs.accounts.9b00528](https://doi.org/10.1021/acs.accounts.9b00528).
- 24 Li HM, Tong YN, Bai L, et al. Lactoferrin functionalized PEG-PLGA nanoparticles of shikonin for brain targeting therapy of glioma[J]. Int J Biol Macromol, 2018, 107(Pt A): 204–211. DOI: [10.1016/j.ijbiomac.2017.08.155](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.155).
- 25 Xiong S, Li ZJ, Liu Y, et al. Brain-targeted delivery shuttled by black phosphorus nanostructure to treat Parkinson's disease[J]. Biomaterials, 2020, 260: 120339. DOI: [10.1016/j.biomaterials.2020.120339](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120339).
- 26 安子璇, 张奇, 史彩云, 等. 乳铁蛋白修饰党参多糖脂质体的制备及体外评价[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(10): 1317–1329. [An ZX, Zhang Q, Shi CY, et al. Preparation and *in vitro* evaluation of lactoferrin-modified liposomes of *Codonopsis pilosula* polysaccharide[J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2023, 40(10): 1317–1329.] DOI: [10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20221362](https://doi.org/10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20221362).
- 27 Janjua TI, Ahmed-Cox A, Meka AK, et al. Facile synthesis of lactoferrin conjugated ultra small large pore silica nanoparticles for the treatment of glioblastoma[J]. Nanoscale, 2021, 13(40): 16909–16922. DOI: [10.1039/d1nr03553c](https://doi.org/10.1039/d1nr03553c).
- 28 Qiao RR, Jia QJ, Huwel S, et al. Receptor-mediated delivery of magnetic nanoparticles across the blood-brain barrier[J]. Acs Nano, 2012, 6(4): 3304–3310. DOI: [10.1021/mn300240p](https://doi.org/10.1021/mn300240p).
- 29 Huang RQ, Ke WL, Qu YH, et al. Characterization of lactoferrin receptor in brain endothelial capillary cells and mouse brain[J]. J Biomed Sci, 2007, 14(1): 121–128. DOI: [10.1007/s11373-006-9121-7](https://doi.org/10.1007/s11373-006-9121-7).

收稿日期: 2023 年 11 月 28 日 修回日期: 2024 年 04 月 09 日
本文编辑: 钟巧妮 李 阳