

· 综述 ·

脑靶向性鼻腔给药制剂的系统评价

朱金华*, 孙昊鑫, 周军
(江西中医学院, 南昌 330004)

[摘要] 目的: 评价鼻腔给药作为脑靶向给药的途径之一。方法: 通过血脑屏障体外模型的建立、脑内药物浓度评价方法等方面的研究, 说明鼻腔给药的优越性。结果: 鼻腔给药可以提高药物在脑内的浓度, 达到脑靶向给药的目的。结论: 脑靶向给药存在的问题仍是对血脑屏障的认识不够深入, 随着对血脑屏障的转运机制、脑部与鼻腔的结构相连优势、脑内发病机制认识以及靶向药物在脑内的药物动力学规律的深入研究, 脑靶向给药研究必有突破。

[关键词] 鼻腔给药; 血脑屏障; 体外模型; 评价方法

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2010)13-0215-04

System Evaluation of Brain-Targeted Nasal Delivery Preparation

ZHU Jin-hua*, SUN Hao-xin, ZHOU Jun
(Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate intranasal administration as one of the ways of brain-targeted drug delivery system. **Method:** Showing the advantages of nasal administration through building the *in vitro* model of blood-brain barrier and researching the evaluation methods of drug concentration in brain. **Result:** The intranasal administration can increase the concentration of drug in the brain so as to accomplish brain-targeted drug delivery. **Conclusion:** Lack of in-depth understanding of blood-brain barrier is still the major problem existing in the brain-targeted drug delivery system, but with further studies on the transport mechanism of blood-brain barrier, the structural connection between nasal cavity and brain, the pathogenesis in the brain and the pharmacokinetics of brain-targeting drug a breakthrough in the research on brain-targeted drug delivery system can be expected.

[Key words] nasal delivery; the blood-brain-barrier; *in vitro* model; evaluation methods

脑部是靶向给药的一个重要部位, 很多药物必须进入脑内才能发挥疗效, 然而由于血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 的存在, 常规途径给药后在脑内的药物浓度都比较低, 限制了对脑部疾病的治疗。由于鼻黏膜在解剖生理上与脑部存在着独特的联系, 因此有望在脑内递药领域有所突破。鼻腔给药可以提高药物在脑内的浓度, 达到靶向给药的目的, 具有生物利用度高、吸收迅速、起效快、无损伤性、使用方便等特点, 已成为制剂领域研究的热点之一^[1-3]; 而靶向给药也因具有药物可在靶向部位迅速达到治疗浓度, 给药方案简单, 可减少给药剂量从而降低治疗费用等优点而备受重

视^[4]。现就脑靶向性鼻腔给药制剂的评价作一综述。

1 血脑屏障体外模型的建立

由于体内 BBB 的存在, 药物进入中枢神经系统发挥作用将受到限制, 这也是新药开发所面临的挑战之一。因此, 利用 BBB 模型进行药物研究有利于我们了解药物透过 BBB 的特征。在体内动物实验保持了 BBB 完整结构, 获得的信息更接近实际, 但是影响实验的因素不易控制, 并且操作繁琐, 时间和经济耗费大, 不适合进行物质转运机制和大规模的药物筛选研究。近 20 年来, 人们把更多的目光投向开发方便、快速、经济而又准确的体外模型。

由于 BBB 主要是由连续的毛细血管内皮细胞构成, 内皮之间形成紧密连接 (tight junctions, TJ), 很少形成吞引小泡。因此, 体外 BBB 模型的核心是培养脑微血管内皮细胞。为了准确预测药物在体内的处置, 体外模型必须具有尽可能

[收稿日期] 20100413(002)

[通讯作者] * 朱金华, Tel: 13307096120, E-mail: jzjh8160260@sina.com

多的 BBB 特征。从新药开发的角度来看, 体外模型的评价标准应该是非常重要的。良好的模型应具有以下特征: 内皮细胞间有完整的 TJ; 功能性表达代谢异物的酶如单胺氧化酶、谷胱甘肽转氨酶等; 功能性表达多药耐药性蛋白如 P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 等; 功能性表达营养物质和内源性物质的转运载体等。只有使用比较理想的体外模型, 所得出的结论才能接近体内实际情况, 预测才更具有实际意义。

1.1 脑微血管内皮细胞培养 原代培养脑微血管的目的是获得大量的微血管内皮细胞而使各种杂细胞(如周皮细胞、成纤维细胞等)污染减少到最小。近年来, 已经有许多实验室建立了各种培养方法, 核心是用机械分散或者是酶消化将微血管与其他组织分离, 并将杂细胞、鞘磷脂、细胞碎片等通过离心分离出去。由于动物的种类、来源以及分离方法不同, 各实验室报道的内皮细胞特性有所不同。尽管原代培养的微血管内皮细胞是特征最明显的体外 BBB 模型, 但是由于分离微血管的步骤非常繁琐, 需多次重复才能得到大量细胞, 缺点十分明显。因此, 有些实验室采用传代的内皮细胞或内皮细胞系作为替代模型。这些模型的缺点是失去表达一些 BBB 特异性的酶和功能蛋白, 使细胞失去分化, 不再适用于特性或转运研究。由于 BBB 上内皮细胞被星形胶质细胞突起围绕起来, 因此, 胶质细胞对保持 BBB 的完整性有重要作用。已有大量报道, 体外将脑微血管内皮细胞和胶质细胞共培养可克服单独培养带来的一些局限。胶质细胞可诱导内皮细胞分化, 使特异性酶表达增强, 跨细胞电阻增加 (tran endothelial electrical resistance, TEER), 对蔗糖等小分子通透性减少^[5]。由于内皮细胞和胶质细胞在体内并不直接接触, 其间隔着基底膜, 因此胶质细胞的作用可能是通过分泌活性物质作用于内皮细胞, 例如胶质源神经营养因子 (glia derived neuro tropic factor, GDNF)^[6]。有的实验室将内皮细胞的培养基中加入星型胶质细胞的培养液(星形细胞培养的上清液), 内皮细胞同样重现并维持 BBB 特性^[7]。这种方法相对于共培养要简单得多。高永红等^[8]采用脑微血管内皮细胞单层培养模型体外模拟血脑屏障, 用 LC-MS 分析方法, 检测清开灵有效组分栀子苷、黄芩苷、牛胆酸、猪去氧胆酸、去氧胆酸 24 h 内的透过率, 结果显示透过率从高到低依次为栀子苷、牛胆酸、猪去氧胆酸和去氧胆酸, 而在滤液中未检测到黄芩苷。范祥等^[9]采用大鼠脑微血管内皮细胞、星型胶质细胞共培养技术, 建立血脑屏障体外模型, 在给药 24 h 后, 用 LC-MS 未能检测到收集的共培养池外侧培养基中丹酚酸 B, 说明冰片对丹酚酸 B 透过血脑屏障并无促进作用。

1.2 体外和体内 BBB 模型的相关性 研究药物在体内通过 BBB 转运的方法很多, 体内测定值通常用药物的脑血流比值的对数 (logBB)、脑摄取系数 (BUI) 等来表示^[10]。Eddy 等人^[11]的实验数据表明, 对于跨单层转运实验, 无论是单独培养模型, 还是共培养模型, 体外和体内所得的数据具有良好的相关性。Dehouck 等^[12]实验则证明共培养模型与单独

培养的模型相比“漏性”明显下降, 而与整体模型的相关性不变。Johnson 等^[13]比较了单层摄取模型和跨单层转运模型, 对于以被动扩散转运的极性分子, 单层摄取实验具有良好的预测性, 而跨单层转运实验的相关性很差, 说明后一种模型中小分子极性物质主要从细胞间通过内皮单层。

以上结果说明可以用体外模型进行大规模的药物筛选来预测化合物体内通过 BBB 的能力。Cecchelli 等^[14]经过多次实验重复, 共培养模型是相当稳定的, 对照物的标准差较小, 可以快速、灵敏地检测将对照物进行化学结构改造后通透性的变化。

体外 BBB 模型可以较好地反映药物在体内 BBB 的处置情况, 并且可以弥补体内模型的一些缺陷。因此, 在新药开发中, 体外模型是一个良好的预测药物通过 BBB 能力的工具。

2 脑内药物浓度评价方法

2.1 小脑延髓池穿刺术 先作鼻腔隔离术, 大鼠鼻腔或 iv 给药一定时间后, 剪开头颈部背侧皮肤, 暴露枕骨大孔, 注射器接 4 号针头刺入小脑延髓池, 抽取 CSF, 供色谱分析。大鼠 CSF 仅 100 ~150 μL , 抽出后无足够 CSF 补充, 正常颅内压难以维系, 故本法只能得到给药后一定时间点的 CSF 药物浓度, 不能获得药物在 CSF 中的动态分布, 也难以区分不同脑组织中药物分布的差异。Chou 等^[15-17]改进了小脑延髓池穿刺术, 将麻醉大鼠置于立体定向仪上, 定位侧脑室作-硅胶插管以微量输液泵补充人工 CSF, 补充速率为 2 ~3 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 小脑延髓池作-硅胶插管以收集含药 CSF, 从而获得了局麻药利多卡因、普鲁卡因、丁卡因等鼻腔和 iv 给药后在大鼠 CSF 中的动态数据。本法因受 CSF 体积的限制不能对同一动物连续取样, 故使用受限制。

2.2 脑部微透析法 微透析技术是以透析原理作为基础的在体取样技术, 是在非平衡条件下进行灌流, 使流出的透析液中待测化合物的浓度低于它在探针膜周围样品基质中浓度, 灌注埋在组织中微透析探针, 组织中待测化合物沿浓度梯度逆向扩散进入透析液, 被连续不断地带出, 可以连续多次、多部分、多组分同时取样, 取样量少, 对体内平衡干扰少, 且取出样品中不含大分子杂质, 可以直接进入分析系统。Chou 等^[15]以大鼠为实验动物采用微透析法获得了利多卡因在脑脊液、嗅球和小脑中的动态分布曲线。该法因损伤性小又可对同一动物连续取样而目前受到重视, 但对微透析装置要求较高, 使用有些困难。

2.3 脑组织匀浆法 iv 或鼻腔给药后, 不同时间点取血, 随即处死大鼠, 取不同脑组织(如脑脊液、嗅球、小脑等), 称质量, 捣成匀浆, 取样, 经样品预处理后测定药物含量。Chow S H 等^[18]用该法考察了可卡因经鼻吸收后的脑内分布, 该法手术要求高, 适用于给药后特定时间点药物组织分布研究, 用于药动学研究时, 即使给药途径相同, 实验动物个体间的差异也较大。该法在测定不同部位的药物浓度时, 简便易行, 缺点为必须在固定时间点处死动物而无法获得同一动物

不同时间点的连续数据。

2.4 同位素标记法 常用的放射性核素有¹²⁵I, ¹⁴C 和³H。用 相机跟踪¹²⁵I 标记药物, 能够无损伤性地考察鼻腔给药后药物在体内不同组织中的动态分布过程, 不存在个体差异的影响。Frey 等^[19] 将¹²⁵I-NGF(神经生长因子) 鼻腔给药后, 放射性迅速出现在嗅球及其他脑组织, 且放射性在嗅球的积聚与鼻腔给药剂量和放射性在嗅上皮黏膜的浓度线性相关, 而与 iv 剂量无直接关系。鼻腔给药后脑组织至少 80% 的放射性可被 5% 的冷三氯乙酸沉淀, 说明神经生长因子主要以非结合态入脑。

¹⁴C 和³H 标记药物属于同位素标记, 发射 γ 射线, 特别适用于给药后脑部放射自显影研究。当用于药动学研究时, 无须组织匀浆后繁琐的药物提取步骤, 且检测灵敏度高。Eriksson^[20] 将¹⁴C-苯甲酸、¹⁴C-对氯苯甲酸和¹⁴C-水杨酸滴入大鼠鼻腔, 发现¹⁴C 放射性从嗅黏膜吸收并积聚在同侧嗅球, 而异侧嗅球区并无放射性, 脑部放射自显影术显示, 给药后 1 h, ¹⁴C-苯甲酸及¹⁴C-水杨酸浓集于嗅球的轴突层和小球层, 给药后 4 h, 从嗅球轴突层到嗅球中心区, 放射性呈线性梯度递减, 若预先破坏嗅黏膜上皮层, 则嗅球区浓集的放射性明显减少。将嗅球区细胞外液薄层色谱分离后, 发现放射性主要是原型化合物。Dahlin 等^[21] 研究了³H-多巴胺鼻黏膜吸收入脑的过程, 发现多巴胺也是以原形药物特异地进入同侧嗅球, 但并不能进入大脑深部。

Wang Y 等比较了³H-二氢麦角胺(³H-DHE) 鼻腔和 iv 给药 30 min 在血浆和 7 个脑组织(嗅球、前皮质、顶叶皮层、枕部皮层、小脑、中脑和脑干) 的分布, 结果鼻腔给药后嗅球区³H-DHE 的浓度是 iv 后的 51 倍, 其余各组织则为 3 ~7 倍不等, 说明嗅球是鼻腔与脑直接通道的必经之路。

同位素标记法通常是配合上述的方法使用, 能够很大的提高检测灵敏度。

2.5 其他方法 如荧光标记抗体法、电子显微技术和免疫化学技术等, 荧光标记抗体法用来研究病毒和细菌的嗅球通路, 而电子显微技术的出现使得此项研究有了质的飞跃, 通过电子显微技术不仅能够明确地区分药物是沿着神经细胞轴转运还是沿着细胞间隙转运, 而且能够准确地观测到药物的转运途径, 如不同部位的嗅球和脑的细胞。

2.6 药效学研究 当给药后难以有效测定药物浓度时, 只能借助于药理效应来评价药物经鼻黏膜吸收入脑的情况。Perras B 等^[22] 用多睡眠描记法记录服用生长激素释放激素(GHRH) 和安慰剂的志愿者睡眠, 且每隔 15 min 检测血浆中的氢化可的松和生长激素(GH) 水平。发现鼻腔给予 GHRH 能降低睡眠开始时的氢化可的松血浆谷浓度, 减轻睡眠诱发的 GH 浓度升高, 还能延长快速动眼睡眠和慢波睡眠, 而且鼻腔给予 GHRH 的作用并不受年龄的影响。研究者推测 GHRH 鼻黏膜吸收存在着影响中枢睡眠调节和调节下丘脑分泌活动的协同作用。

Derad I^[23] 对给予血管紧张素-II(ANG-II) 和安慰剂的志

愿者进行了临床监测, 结果鼻腔与 iv 途径能诱发相同的血浆 ANG-II 水平, 升压幅度与持续时间与 iv 相当, 但鼻黏膜途径能抵消 iv ANG-II 引发的去甲肾上腺素水平下降, 并能使血浆抗利尿激素水平升高, 这与 icv ANG-II 结果相似, 提示鼻腔给予 ANG-II 可直接作用于中枢。

药效学方法既可用于动物又可用于人体, 损伤性小, 评价指标多为药物进入中枢后产生的一些便于测定的生理生化指标的变化。

3 结论

近年来, 由于中枢神经系统疾病发病率不断增加, 特别是脑肿瘤发病率以及死亡率不断增加, 脑靶向给药日益受到重视。靶向鼻腔给药制剂的生物利用度高, 毒副作用小, 疗效确切一直是世界药剂学领域研究的热点之一, 通过大量的实验证实, 只要控制好微粒的粒径和其表面性质, 药物从鼻腔入脑的可行性是很明确的。脑内注入的缓释聚合物给药系统以及细胞治疗给药系统避开了血-脑屏障, 并可达到一定的脑内缓释效果。在具体应用中我们应根据药物的理化性质以及疾病的不同选用合适的脑靶向给药系统。虽然有关脑靶向给药的研究报道很多, 但现阶段无论是胶态给药系统、化学传递给药系统还是细胞治疗给药系统, 在组织免疫兼容性、安全性及质量控制等方面还存在不少问题, 还需要进行大量深入的研究。

[参考文献]

- [1] Illum L. Nasal drug delivery: new developments and strategies [J]. *Drug Discov Today*, 2002, 7(23): 1184.
- [2] Illum L. Nasal drug delivery-possibilities, problems and solutions [J]. *J Controlled Release*, 2003, 87(1/3): 187.
- [3] 王东兴, 高永良, 鼻腔给药新剂型研究进展 [J]. *中国新药杂志*, 2002, 11(8): 589.
- [4] Torchilin V P. Drug targeting [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2000, 11(2): S81.
- [5] Cecchelli R, Dehouck B, Descamps L, et al. *In vitro* model for evaluating drug transport across the blood-brain barrier [J]. *Adv Drug Del Rev*, 1999, 36(2/3): 165.
- [6] Yo I, Hiroyuki U, Hideki C, et al. Glial cell line-derived neuro trophic factor induce barrier function of endothelial cells forming the blood-brain barrier [J]. *Biochim Biophys Res Com*, 1999, 261(1): 108.
- [7] Mizuguchi H, Utoguchi N, Mayumi T. P reparation of glial extracellular matrix: a novel method to analyze glial-endothelial cell interact ion [J]. *Brains Proc*, 1999, 1: 339.
- [8] 高永红, 王永炎, 肖盛元, 等. 清开灵有效组分透过体外模拟血脑屏障的研究 [J]. *北京中医药大学学报*,

- 2005, 28(2) : 26.
- [9] 范祥. 血脑屏障体外模型的建立及冰片对其影响的研究[D]. 天津: 天津中医学院, 2004: 38.
- [10] Peter L B. Animal models for studying transport across the blood-brain barrier[J]. J Neurosci Methods, 1998, 56(1) : 1.
- [11] Eddy E P, Maleet B E, Hart T K, et al. *In vitro* models to predict blood-brain barrier permeability [J]. Adv Drug Del Rev, 1997, 23(123) : 185.
- [12] Dehouck M P, Jolliet-Riant P, Bree F, et al. Drugs transfer across the blood-brain barrier: correlation between *in vitro* and *vivo* models[J]. J Neurochem, 1992, 58 (5) : 1790.
- [13] Johnson M D, Anderson B D. *In vitro* models of blood-brain barrier to polar permeants: comparison of transmonolayer flux measurement and cell up take kinetics using cultured cerebral capillary endothelial cells[J]. J Pharm Sci, 1999, 88(6) : 620.
- [14] Cecchelli R, Dehouck B, Descamps L, et al. *In vitro* model for evaluating drug transport across the blood-brain barrier[J]. Adv Drug Del Rev, 1999, 36(2/3) : 165.
- [15] Chou K J, Donovan M D. Lidocaine distribution into the CNS following nasal and arterial delivery: a comparison of local sampling and microdialysis techniques[J]. Int J Pharm, 1998, 171(1) : 53.
- [16] Chou K J, Donovan M D. The distribution of local anesthetics into the CSF following intranasal administration [J]. Int J Pharm, 1998, 168(2) : 137.
- [17] Chou K J, Donovan M D. Lidocaine distribution into the CNS following nasal and arterial delivery: a comparison of local sampling and microdialysis techniques [J]. Int J Pharm, 1998, 171(1) : 53.
- [18] Chow H S, Chen Z, Matsuura G T. Direct transport of cocaine from the nasal cavity to the brain following intranasal cocaine administration in rats [J]. J Pharm Sci, 1999, 88(8) : 754.
- [19] Frey W H, Liu J, Chen X, et al. Delivery of ¹²⁵I - NGF to the brain via the olfactory route [J]. Drug del, 1997, 4(2) : 87.
- [20] Eriksson C, Bergman U, Franzen A. et al. Transfer of some carboxylic acids in the olfactory system following intranasal administration [J]. J Drug Targeting, 2000, 7(2) : 131.
- [21] Dahlin M, Bergman U, Jansson B, et al. Transfer of dopamine in the olfactory pathway following nasal administration in mice [J]. Pharm Res, 2000, 17(6) : 737.
- [22] Perras B, Marshall L, Kohler G. Sleep and endocrine changes after intranasal administration of growth hormone-releasing hormone in young and aged humans [J]. Psychoneuroendocrinology, 2001, 24(7) : 743.
- [23] Derad I, Willeke K, Pietrowsky R, et al. Intranasal angiotensin II directly influences central nervous regulation of blood pressure [J]. Am J Hypertens, 2000, 11(8) : 971.

[责任编辑 蔡仲德]