



NAC 負載於具光熱感應的 SF/HA/PDA 水膠作為藥物由鼻腔傳遞至腦部的研究

NIR irradiation to photo thermally responsive HA/PDA/SF hydrogels highly enhances nasal drug delivery to brain

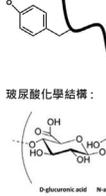
摘要: 本研究將具生物黏附性的蠶絲蛋白 (Silk fibroin, SF)、玻尿酸 (Hyaluronic acid, HA) 和不同含量的胎貝蛋白聚多巴胺 (Polydopamine, PDA) 交聯形成水膠 (HDS hydrogel 1~10)。水膠由多層網結構交聯而成 (HA/PDA/SF/IPN)。以抗氧化劑 NAC 作為藥物，將 NAC 與水膠透過鼻腔的嗅覺神經送至腦部。從 1H-NMR 的頻譜，且 $\delta = 8.4\text{ppm}$ 處的訊號因有 NH/EDC 存在顯示 Amide bond 的形成；UV-Vis 頻譜在波長 480nm 的訊號較弱，推測 DA 的胺基可能與 BDDE 的環氧基團反應，使得 DA 的聚合程度下降；AFM 量測結果為水膠中 PDA 的含量越多，水膠的黏著性會增加；從光熱感應結果：顯示 PDA 的含量增加促使快速升溫。綜合材料測試結果，本研究選擇 HD5s 水膠進行鼻腔傳遞實驗。HD5s 水膠與鼻黏膜的上皮細胞 RPMI 2650 共培養後，以跨上皮電阻值 (transepithelial electrical resistance, TEER) 量測 RPMI 2650 細胞之電阻變化。於 90 分鐘的結果顯示 HD5s/NAC 水膠組別比控制組下降至 55%。照射 NIR 其細胞電阻值明顯下降至 63%；細胞免疫螢光染色結果也顯示，RPMI 2650 細胞的緊密連接 (tight junction) 蛋白 ZO-1 呈現不連續的環狀，表示 HD5s/NAC 水膠可幫助打開 tight junctions，增加藥物透過細胞旁運輸。HD5s/NAC 水膠經隔性的進行鼻噴 NIR 光熱效應 (808nm, 45°C 照射 5 分鐘)，經大鼠鼻腔 / 腦部螢光影像系統 (IVIS) 150 分鐘的觀察，水膠因黏著性及黏彈性增加，故可延長 NAC 於鼻腔停留的時間；重要的是光熱感應作用的 HD5s/NAC 水膠可將 NAC 鼻腔至腦部之傳遞量較鼻腔注射的 NAC 溶液達 17 倍 ($t = 90\text{ min.}$)，顯示新開發具 NIR 光熱效應作用的 HD5s/NAC 水膠能有效增進 NAC 從鼻腔送至腦部達 17 倍。可作為很好的鼻腔藥物傳遞之載體。關鍵字：蠶絲蛋白、聚多巴胺、水膠、鼻腔傳遞、tight junction

引言

鼻腔遞送途徑為一種方便的方法，繞過血腦障壁 (BBB) 並將藥物從鼻腔直接輸送到大腦 [1]。藥物分子進入到腦，主要：嗅覺區域的嗅覺神經元和三叉神經，而藥物運輸透過細胞間的路徑 [2]。SF 及 HA 可與鼻腔黏膜上的黏蛋白 Occludens 產生互鎖，可作為鼻腔的藥物載體。本實驗將抗氧化的 NAC 藥物結合 HDS hydrogel 作為鼻腔的藥物載體，應用於鼻腔到腦部的藥物遞送。

材料與方法

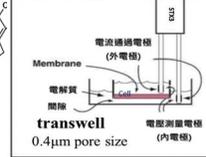
蠶絲蛋白化學結構：



聚多巴胺化學結構：



TEER 量測細胞電阻值示意圖：



玻尿酸化學結構：



NAC 化學結構：



¹H NMR (400MHz) / UV-Vis: HDS hydrogel 的結構分析。AFM: 水膠黏著力 (nN) 量測。光熱感應：用 808 nm NIR 照射，觀察水膠的升溫程度。TEER: 透過電極量測鼻黏膜的上皮細胞 RPMI 2650 細胞電阻值。當 tight junction 開啟時，TEER 值會下降。ZO-1 染色：探討 HD5s/NAC 是否會促使開啟 RPMI 2650 細胞的 tight junction (不連續環狀)。活體即時影像系統 (IVIS): 藉由 HDS 水膠將 NAC-FITC 從大鼠鼻腔遞送到腦部的含量。

結果與討論

HDS hydrogel 材料性質分析

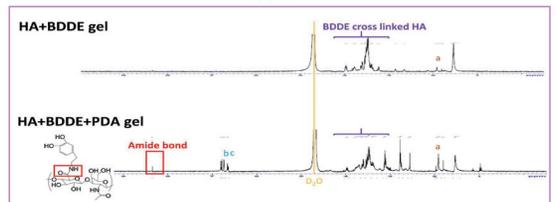
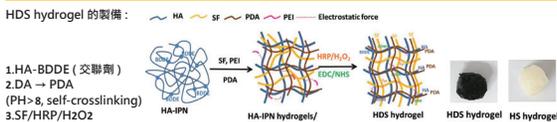


圖 1. ¹H NMR 圖譜。HDS 水膠中的 HA 和 PDA 有交聯形成網結。HA+BDDE gel 高於 BDDE 的 δ (1.5 ppm) 的積分值 -HA 和 BDDE 有交聯反應；HA 與 DA 交聯為 Amide bond 於 δ 8.4 ppm。

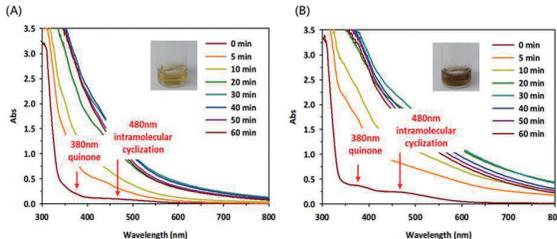


圖 2. DA 與 BDDE 的反應。(A) DA 溶液 (B) DA-BDDE 於酸性溶液下聚合的 UV-Vis 光譜。380 nm 為 quinone 結構，480 nm 為分子內環化。DA-BDDE 的吸收光譜說明有較少 catechol 轉換成 quinone 結構且較少的胺基參與分子內環化。推測 DA 的胺基可能與 BDDE 的環氧基團反應，使得 DA 的聚合程度下降 [3]。

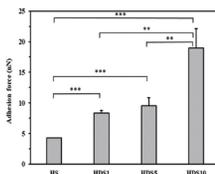


圖 3. HDS hydrogel 黏著力測試。隨著 PDA 的含量越高，水膠的黏著力越強，表示若將此製劑注入鼻腔內較不易被鼻腔中的黏液毛清除。可於鼻腔內停留較長的時間，使藥物可以更有效地透過鼻腔傳遞至腦部。($n=3, **p<0.01, ***p<0.001$)。

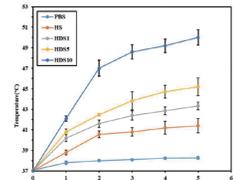


圖 4. PDA 不同濃度水膠的光熱感應：上升溫度與 PDA 濃度成正比。本研究採用 HD5s hydrogel ($n=3$)。(照射條件：持溫 45°C、5 分鐘)

TEER 及 ZO-1 確認 tight junction 開啟及表現

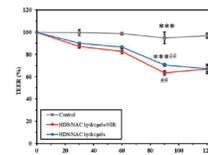


圖 5. HD5s/NAC hydrogels 可以打開 tight junctions。RPMI 2650 細胞經 HD5s/NAC hydrogels 處理之時間的 TEER 值變化 (%) 圖；HD5s/NAC hydrogels-NIR 組於 90 分鐘 TEER 下降至 63%。($n=3, ***p<0.001, \#p<0.01$)。

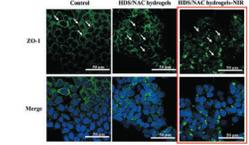


圖 6. HD5s/NAC hydrogels- 經 NIR 照射許多 ZO-1 蛋白質環成不連續的環狀。RPMI 2650 細胞之 tight junction 表現 (藍色 = DAPI，綠色 = ZO-1) 顯示 HD5s/NAC hydrogels 可促使打開 tight junction，促進藥物運輸 ($n=3$)。

體內動物實驗

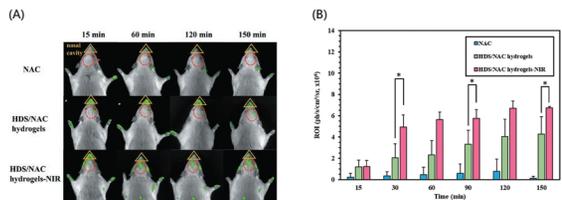


圖 7. HD5s/NAC hydrogels 可以透過鼻腔有效的將 NAC 遞送至大腦。(A) 不同組別於大鼠鼻腔給藥的體內螢光系統影像圖 (B) 鼻腔給藥後 NAC-FITC 隨時輸送至大鼠大腦的圖測值。HDS hydrogel 可延長 NAC 在鼻腔停留的時間。至 150 分鐘鼻腔遞送維持約 54% 的 NAC。於 90 分鐘時，透過 HDS hydrogels 遞送的 NAC 比 NAC 水溶液腦部中螢光強度 (NAC) 高 17 倍。光熱感應作用的 HDS hydrogel 將 NAC 遞送至大腦，明顯高於未進行光熱感應組別約 40%。($n=4, *p<0.05$)。

結論

本研究成功合成出 SF/HA/PDA 之水膠。作為 NAC 的藥物載體。研究成果顯示，搭載 NAC 的水膠可以打開鼻腔細胞 tight junctions 的通透性。透過動物實驗觀察到將 NAC 以水膠透過鼻腔遞送至腦部於 90 分鐘時，用水膠從鼻腔遞送至腦部的 NAC 比直接從鼻腔注射的 NAC 水溶液螢光強度高 17 倍。本研究所合成之具光熱感應的 NAC 的藥物載體之水膠，可以成功地由鼻腔將高劑量藥物遞送至腦部。

致謝

感謝科技部計畫 MOST 107-2221-E-010-005-MY3 和 MOST 110-2221-E-A49A-503- 對本研究的支支持，以及感謝劉耘歡同學於動物實驗的幫忙。

參考資料

- [1] Kim et al. Journal of Controlled Release 307 (2019) 76–89.
- [2] Klementiev et al. Neuroscience 145 (2007) 209–224.
- [3] Mazario et al. RSC Adv, 4 (2014) 48353–48361.

研究人員：陳彥伶¹，鄭芷菱¹，劉耘歡¹，鍾次文²
單位：¹國立陽明交通大學 生物醫學工程學系、²國立陽明交通大學 醫學工程研發中心
E-Mail：twchung@nycu.edu.tw