

学校编码: 10384
学号: 24520091153039

分类号 _____ 密级 _____
UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

血管活性肠肽纳米粒的制备及其对帕金森病细胞模型保护作用的研究

Study on preparation of VIP nanoparticles and its protection on the cell model of Parkinson's disease

王吴芳

指导教师姓名: 杜青云 教授
朱 铨 副教授

专业名称: 药 理 学

论文提交日期: 2012 年 4 月

论文答辩时间: 2012 年 5 月

学位授予日期: 2012 年 月

答辩委员会主席: _____
评 阅 人: _____

2012 年 月

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为()课题(组)的研究成果，获得()课题(组)经费或实验室的资助，在()实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘 要

帕金森病是继老年痴呆症之后世界第二大威胁人类健康的神经退行性疾病，已经严重影响 1 ~ 2 % 老年人口的生活质量。随着生物医学技术的迅速发展，目前已经发现许多对中枢疾病（如帕金森病、老年痴呆症）具有治疗活性的多肽和蛋白类药物。但血脑屏障的存在，很大程度上限制了这些药物的临床给药和治疗作用的发挥。因此，研究多肽和蛋白类药物的新型给药系统，具有很大的研究价值和社会意义。

血管活性肠肽（Vasoactive intestinal polypeptide, VIP）是具有重要调节作用的神经多肽，它对帕金森病和老年痴呆症的防治都有较好的作用。但是血管活性肠肽在体内的半衰期较短，稳定性差，不易透过血脑屏障，因此和其他内源性多肽一样，其临床运用受到限制。因此本课题目的在于研究包封血管活性肠肽的纳米粒及其体外神经保护作用。

本论文主要包括以下内容：

1. VIP 体外方法学的建立和稳定性考察。利用高效液相色谱法对 VIP 的含量进行测定，研究了 VIP 多肽的稳定性。结果表明：VIP 在 -80 °C 下保存最稳定，至少可保存一个月不降解，故该药制成制剂宜冷冻保存。在室温（~ 25 °C）范围内、pH 值 2.0 ~ 7.0 之间以及搅拌速度为 800 ~ 1000 rpm 搅拌 4 h 的条件下，制备成的纳米粒不会影响 VIP 的稳定性。

2. 纳米粒的制备。采用改良的乳化聚合法制备纳米粒，对表面活性剂的种类和用量、载体材料的用量、药物与材料比例、pH 值等进行单因素实验考察；采用正交设计优化处方，确定最佳处方，得到粒径为 147.7 nm，包封率为 95.3 %，载药量为 4.77 % 的聚山梨酯-80（Polysorbate 80, P80）修饰的 VIP 纳米粒。同时制备了可以被 SH-SY5Y 细胞摄取的 FITC 纳米粒，为下一步体外药效学研究奠定基础。

3. VIP 纳米粒体外药效学研究。在体外细胞模型实验中，以 6-羟基多巴胺（6-hydroxydopamine, 6-OHDA）诱导 SH-SY5Y 细胞凋亡成功建立了帕金森病细胞模型。实验结果显示：制备的聚山梨酯-80 修饰的纳米粒无细胞毒性。聚山梨酯-80 修饰的 VIP 纳米粒显著提高了 6-OHDA 诱导的 SH-SY5Y 细胞活力和抗

凋亡能力，并显著改善了 6-OHDA 诱导的 SH-SY5Y 细胞线粒体膜电位。说明聚山梨酯-80 修饰的 VIP 纳米粒提高了 VIP 的稳定性和被细胞摄取能力，与 VIP 溶液相比有更强的体外神经保护活性。因此聚山梨酯-80 修饰的 VIP 纳米粒可能具有更好的预防帕金森病的潜力。

关键字：血管活性肠肽；纳米粒；帕金森病

厦门大学博硕士论文摘要库

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disorder, after Alzheimer's disease. It has affected about 1 ~ 2 % of the population over the age of 60 years seriously. The development of Biomedical Technology has contributed to the discoveries of peptides and proteins with considerable potential in the treatment of central nervous system (CNS) diseases (such as Parkinson's disease and Alzheimer's disease). However, a significant challenge to their clinical administration and treatment is their ideal drug delivery to the CNS crossing the blood-brain barrier (BBB). New drug delivery system of peptides and proteins is necessary and full of esperance for both the Pharmacy research and the social meaning.

Vasoactive intestinal peptide (VIP), as a important regulatory neuropeptide, has been proposed as a therapeutic drug candidate for the treatment of Parkinson's disease and Alzheimer's disease. However, like most endogenic peptides, its potential therapeutic applications are limited by its its rapid elimination after intravenous administration and poor passage across the BBB. The aim of the current study was to investigate the VIP loading nanoparticles and its neuroprotective effect in vitro.

The following parts are included in this paper:

1. The study on analysis method in vitro and stability of VIP. By using high performance liquid chromatography (HPLC) method, we studied the effect of different factor upon VIP under the preparation condition. The optimum maintaining condition is to be preserved by $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. And the rotation speed of 800 ~ 1200 revolutions per minute for 4 hours at room temperature and pH value 2.0 ~ 7.0 is safe for the preparation. The experiment indicates that VIP is stable enough to survive through the whole preparation process.
2. Preparation of nanoparticles. Nanoparticles was prepared by modified emulsion polymorization method. The factors in the formulations such as different species and concentration of surfactant, the ratio of drug and polymer, the pH value and so on were tested, the formulation was further optimized by orthogonal experiment. We use the best kind of method to obtain Polysorbate 80-VIP-NP, which diameter is 147.7 nm, ER is 95.2 % and DR is 4.77 %. At the same time, we prepare Polysorbate 80-FITC-NP, which can be uptaken by SH-SY5Y cell, and make contribution to the pharmacodynamics in vitro.

3. Study on pharmacodynamics of VIP nanoparticles in vitro. The cell model of PD have been established successfully by inducing SH-SY5Y apoptosis with 6-OHDA. Polysorbate 80 modified nanoparticles showed no effect on cell viability, indicating that they have no role in cell survival. In vitro cell culture study showed enhanced cell viability of Polysorbate 80-VIP-NP against 6-OHDA induced cytotoxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells compared to VIP solution. Polysorbate 80-VIP-NP increased the antiapoptosis activity and restored the loss of mitochondrial membrane potential (MMP) significantly compared to VIP solution. From all the experiments, it was found that the activity of VIP was enhanced with Polysorbate 80 modified PBCA nanoparticles compared to VIP solution suggesting enhanced stability and cell uptake. These results suggest that Polysorbate 80-VIP-NP has more protective effects against 6-OHDA induced apoptosis, which might be a potential therapeutic agent for preventing Parkinson's disease.

Key words: Vasoactive intestinal peptide; nanoparticles; Parkinson's disease

目 录

摘 要	I
ABSTRACT	III
第一章 绪论.....	1
1.1 帕金森病的简介.....	1
1.2 血管活性肠肽的简介.....	2
1.3 聚氰基丙烯酸烷基酯类纳米粒的简介.....	4
1.4 本课题的立体依据及研究思路.....	6
第二章 血管活性肠肽体外方法学的建立.....	7
2.1 材料.....	7
2.1.1 药品和试剂	7
2.1.2 实验仪器	7
2.2 方法.....	7
2.2.1 色谱条件	7
2.2.2 样品处理方法	8
2.2.3 方法专属性	8
2.2.4 标准曲线的绘制	8
2.2.5 精密度试验	8
2.2.6 回收率实验	8
2.3 结果.....	9
2.3.1 方法专属性	9
2.3.2 标准曲线的绘制	10
2.3.3 精密度试验	11
2.3.4 回收率实验	12
2.4 讨论.....	12
2.5 小结.....	13
第三章 血管活性肠肽稳定性考察	14
3.1 材料.....	14
3.1.1 药品和试剂	14

3.1.2 实验仪器	14
3.2 方法.....	14
3.2.1 不同温度的影响	14
3.2.2 不同 pH 值的影响	15
3.2.3 不同盐类的影响	15
3.2.4 不同搅拌速度的影响	15
3.2.5 不同超声时间的影响	15
3.3 结果.....	16
3.3.1 不同温度的影响	16
3.3.2 不同 pH 值的影响	17
3.3.3 不同盐类的影响	18
3.3.4 不同搅拌速度的影响	19
3.3.5 不同超声时间的影响	20
3.4 讨论.....	20
3.5 小结.....	20
第四章 血管活性肠肽纳米粒的制备及表征.....	22
4.1 材料.....	22
4.1.1 药品和试剂	22
4.1.2 实验仪器	22
4.2 方法.....	22
4.2.1 非修饰的 VIP 纳米粒(VIP-NP) 的制备.....	22
4.2.2 单因素考察	23
4.2.3 正交试验	25
4.2.4 聚山梨酯-80 修饰的 VIP 纳米粒 (P80-VIP-NP) 制备.....	25
4.2.5 纳米粒质量评价	26
4.3 结果.....	26
4.3.1 单因素考察	26
4.3.2 正交试验	34
4.3.3 纳米粒质量评价	35
4.4 讨论.....	39
4.5 小结.....	40
第五章 荧光素纳米粒的制备.....	41

5.1 材料	41
5.1.1 药品和试剂	41
5.1.2 实验仪器	41
5.2 方法	41
5.2.1 FITC 纳米粒的制备	41
5.2.2 FITC 纳米粒质量评价	42
5.2.3 细胞摄取 FITC 纳米粒	42
5.3 结果	43
5.3.1 FITC 纳米粒质量评价	43
5.3.2 细胞摄取 FITC 纳米粒	45
5.4 讨论	46
5.5 小结	47
第六章 血管活性肠肽纳米粒的体外药效学考察	48
6.1 材料	48
6.1.1 细胞株	48
6.1.2 药品和试剂	48
6.1.3 实验仪器	48
6.1.4 主要试剂的配置	48
6.2 方法	49
6.2.1 细胞培养	49
6.2.2 细胞的冻存与复苏	49
6.2.3 MTT 法检测细胞增值活力	50
6.2.4 细胞凋亡的研究	51
6.2.5 统计学分析	52
6.3 结果	53
6.3.1 MTT 法检测细胞增值活力	53
6.3.2 细胞凋亡的结果	55
6.4 讨论	61
6.5 小结	62
全文总结及展望	64
附录	67
参考文献	69

附录.....	77
致谢.....	78

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Table of Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Introduction of Parkinson's disease	1
1.2 Introduction of VIP	2
1.3 Introduction of PB CA nanoparticle	4
1.4 Research aim and experimental plans	6
Chapter 2 Establish the analysis method of VIP	7
2.1 Materials	7
2.1.1 Pharmacon and reagents	7
2.1.2 Experimental instruments	7
2.2 Methods	7
2.2.1 Condition of HPLC	7
2.2.2 Sample preparation	8
2.2.3 Specificity of method	8
2.2.4 Standard curve	8
2.2.5 Precision experiment	8
2.2.6 Recovery experiment	8
2.3 Results	9
2.3.1 Specificity of method	9
2.3.2 Standard curve	10
2.3.3 Precision experiment	11
2.3.4 Recovery experiment	12
2.4 Discussion	12
2.5 Summary	13
Chapter 3 Study on the stability of VIP	14
3.1 Materials	14
3.1.1 Pharmacon and reagents	14
3.1.2 Experimental instruments	14
3.2 Methods	14
3.2.1 The effect of different temperature	14
3.2.2 The effect of different pH value	15

3.2.3 The effect of different salts	15
3.2.4 The effect of different rotation speed	15
3.2.5 The effect of ultrasound for different time	15
3.3 Results	16
3.3.1 The effect of different temperature	16
3.3.2 The effect of different pH value	17
3.3.3 The effect of different salts	18
3.3.4 The effect of different rotation speed	19
3.3.5 The effect of ultrasound for different time	20
3.4 Discussion.....	20
3.5 Summary	20
Chapter 4 Preparation and characterization of VIP nanoparticles ..	22
4.1 Materials	22
4.1.1 Pharmacon and reagents	22
4.1.2 Experimental instruments	22
4.2 Methods	22
4.2.1 Preparation of VIP-NP.....	22
4.2.2 Single factor investigation	23
4.2.3 Orthogonal design.....	25
4.2.4 Preparation of P80-VIP-NP	25
4.2.5 Quality evaluation of VIP nanoparticles	26
4.3 Results	27
4.3.1 Single factor investigation	27
4.3.2 Orthogonal design.....	34
4.3.3 Quality evaluation of VIP nanoparticles	35
4.4 Discussion.....	39
4.5 Summary	39
Chapter 5 Preparation of FITC nanoparticles.....	41
5.1 Materials	41
5.1.1 Pharmacon and reagents	41
5.1.2 Experimental instruments	41
5.2 Methods	41
5.2.1 Preparation of FITC nanoparticles.....	41
5.2.2 Characterization of FITC nanoparticles	42
5.2.3 Cell uptaken of FITC nanoparticles.....	42

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.