聚山梨酯 80 修饰的神经毒素纳米粒跨血脑屏障转运及细胞毒性

赵燕敏, 夏爱晓, 魏颖慧, 阮叶萍, 李范珠*

(浙江中医药大学药学院,浙江 杭州 310053)

摘要:研究聚山梨酯 80 修饰的神经毒素纳米粒 (polysorbate-80 modified neurotoxin nanoparticle, P-80-NT-NP) 在血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 体外模型上的通透性及细胞毒性。采用 SD 大鼠大脑分离培养脑微血管内 皮细胞 (rat brain microvascular endothelial cells, rBMECs) 建立 BBB 体外模型, 以神经毒素 (neurotoxin, NT) 组、 空白纳米粒 (nanoparticle, NP) 组和未修饰的神经毒素纳米粒 (neurotoxin nanoparticle, NT-NP) 组作为对照, MTT 法考察 P-80-NT-NP 对 rBMECs 的细胞毒性;采用 Millicell insert 培养 rBMECs, 荧光分光光度法测定 P-80-NT-NP 在基底侧中 NT 浓度,计算其表观通透系数。结果显示,当 NT 质量浓度 <200 ng·mL⁻¹时,NT 组、 NP 组、NT-NP 组和 P-80-NT-NP 组均无细胞毒性; NT 质量浓度>200 ng·mL⁻¹时, NP 组、NT-NP 组和 P-80-NT-NP 组的细胞毒性显著大于 NT 组 (P < 0.01), 且 P-80-NT-NP 组的细胞毒性较 NP 组和 NT-NP 组稍大,但无显著性差 异 (P > 0.05)。当 NT 质量浓度为 150 ng·mL⁻¹时,NT-NP 组和 P-80-NT-NP 组的转运量均显著大于 NT 组 (P < 0.01), 且 P-80-NT-NP 通的转运量较 NT-NP 组亦有显著增加 (P < 0.05),表明 P-80 修饰的 NT 纳米粒能跨 BBB 转运;但 当 P-80-NT-NP 质量浓度>200 ng·mL⁻¹时,对 rBMECs 产生细胞毒性,为脑靶向纳米粒跨 BBB 转运的机制研究奠 定基础。

关键词:聚山梨酯 80;神经毒素纳米粒;血脑屏障;体外转运;细胞毒性
中图分类号: R943
文献标识码: A
文章编号: 0513-4870 (2010) 10-1312-05

Polysorbate-80 modified neurotoxin nanoparticle with its transport and cytotoxicity against blood-brain barrier

ZHAO Yan-min, XIA Ai-xiao, WEI Ying-hui, RUAN Ye-ping, LI Fan-zhu

(College of Pharmaceutical Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

Abstract: This study was aimed at the transport across blood-brain barrier (BBB) of polysorbate-80 modified neurotoxin loaded polybutylcyanoacrylate nanoparticle (P-80-NT-NP) and its cytotoxicity. An *in vitro* model of BBB using rat brain microvascular endothelial cells (rBMECs) was established. The cytotoxicity of P-80-NT-NP was measured by the MTT assays, where neurotoxin (NT), nanoparticle (NP), neurotoxin nanoparticle (NT-NP) as control, and the permeability of P-80-NT-NP was determined by using of Millicell insert coculture with rBMECs and fluorescence spectrophotometry. MTT results showed that NT, NP, NT-NP and P-80-NT-NP were avirulent to rBMECs when the concentration of NT was lower than 200 ng·mL⁻¹. But the cytotoxicity of NP, NT-NP and P-80-NT-NP would be augmented accordingly as concentration increased (P < 0.01), causing obvious reductions of cell survival rate, with no significant difference between them (P > 0.05). When the concentration of NT was 150 ng·mL⁻¹, the permeability on rBMECs of P-80-NT-NP and NT-NP were both significantly higher than that of NT (P < 0.01), and the permeability of P-80-NT-NP was greater than that of NT-NP (P < 0.05). In conclusion, polysorbate-80 modified neurotoxin nanoparticles can transport across the BBB, while concentration

收稿日期: 2010-05-21.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30772793); 浙江省自然科学基金资助项目 (R207722).

^{*}通讯作者 Tel: 86-571-86633030, Fax: 86-571-86613607, E-mail: lifanzhu@zjtcm.net

of NT is greater than 200 ng·mL⁻¹, P-80-NT-NP has a little cytotoxicity against rBMECs. **Key words**: polysorbate-80; neurotoxin nanoparticle; blood-brain barrier; *in vitro* transport; cytotoxicity

血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 由机械屏 障、主动屏障 (脑内药物外排系统) 和药物代谢酶屏 障共同组成。其中, 机械屏障起主要屏障作用, 由脑 微血管内皮细胞 (brain microvascular endothelial cells, BMECs) 紧密连接构成^[1]。神经毒素 (neurotoxin, NT) 是从云南眼镜蛇 (Naja naja atra) 毒液中分离 得到,具有良好的中枢镇痛作用,无耐受性和依赖性, 安全性高,其分子质量约6700 Da,属于大分子多肽 类药物,脂溶性小,不易透过 BBB,且起效缓慢 (3~5 h)^[2]。研究报道聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒 (polybutylcyanoacrylate nanoparticle, PBCA-NP) 是 此类药物的有效载体之一,具有促透 BBB 性、生物 可亲和性、生物可降解性和缓释性良好等优点[3];同 时表面修饰聚山梨酯 80 (polysorbate-80, P-80) 能 进一步促进药物跨 BBB, 提高脑内药物浓度, 且毒 性低^[4]。前期研究中发现将 NT 制成纳米粒后可显 著增加其鼻腔吸收入脑^[5], 本实验采用 NT 为模型药 物,以聚氰基丙烯酸正丁酯 (PBCA) 为纳米载体材 料,乳化聚合法制备 P-80 修饰的神经毒素纳米粒 (polysorbate-80 modified neurotoxin nanoparticle, P-80-NT-NP); 采用酶消化法分离培养大鼠脑微血管内皮 细胞 (rat brain microvascular endothelial cells, rBMECs) 建立 BBB 体外模型, 研究 P-80-NT-NP 在 rBMECs 上 的毒性与通透性考察, 为脑靶向纳米粒跨 BBB 转运 的机制研究奠定基础。

材料与方法

仪器 380ZLS 激光粒度测定仪/zeta 电位仪 (美 国 Nicomp 公司); JEM-1200EX 透射电子显微镜 (日 本 Jeol 公司); HEPA CLASS100 型细胞 CO₂培养箱 (美国 Thermo 公司); Th4-2000 荧光倒置显微镜 (日 本 Olympus 公司); PIHP01250 型 Millicell insert (滤 膜材料: PCF, 孔径: 0.4 μm), Millicell-ERS 仪 (美国 Millipore 公司); ModulusTM 单管型多功能光度计 (美国 Turner Biosystems 公司)。

药品与试剂 神经毒素 (中国科学院昆明动物 研究所, 纯度>99%, 批号 060530); 异硫氰酸荧光素 标记的神经毒素 (杭州中泰生物技术有限公司, 批号 CH-05-00301); 聚氰基丙烯酸正丁酯 (广州白云医用 胶有限公司, 批号 080701s); 泊洛沙姆 (德国 BASF 公司, 批号 WPWA544C); 聚山梨酯 80 (温州清明化 工有限公司, 分析纯); DME/F-12 培养基 (美国 Gibcobrl 公司, 批号 1344177); 新生牛血清 (美国 Gibcobrl 公司, 批号 749154); D-hanks 液 (自制); PBS 溶液 (自制); 其余试剂均为国产分析纯。

实验动物 7~10 日龄 SD 大鼠, 雌雄各半, 体 重 (16 ± 2) g, 由浙江中医药大学实验动物中心提供 (合格证号 SCXK 沪 2007-0005)。所有动物实验均按 照浙江大学动物饲养和使用指南进行。

P-80-NT-NP 的制备称取乳化剂 Poloxamer188 和稳定剂右旋糖苷-70 各 150 mg,加蒸馏水 25 mL 溶 解,加入 FITC-NT 溶液 (1 mg·mL⁻¹) 60 µL,调节 pH 至 2.0,缓慢加入 PBCA 60 µL,匀速搅拌 2 h (800 r·min⁻¹),调节 pH 至 7.0,滤过,定容,得 NT-NP 胶体 溶液,加入适量 P-80 搅拌, 37 ℃恒温箱中孵化 1 h, 超速离心 30 min (40 000 r·min⁻¹),去除多余 P-80,冻 干即得^[6]。

P-80-NT-NP 形态学考察、zeta 电位和粒径分析取 P-80-NT-NP 胶体溶液滴于铜网上,用透射电子显微镜观察形态;取 P-80-NT-NP 胶体溶液适量,采用激光粒度测定仪/zeta 电位仪测定 zeta 电位和平均粒径。

P-80-NT-NP 包封率和载药量测定 取 P-80-NT-NP 胶体溶液, 超速离心 30 min (40 000 r·min⁻¹), 取上 清液,采用荧光分光光度法,选择 λ_{ex} = 488 nm 作为 激发波长,于发射波长 520 nm 处读取 FITC-NT 荧光 强度值。激发光谱的狭缝宽度为 5 nm,发射光谱的狭 缝宽度为 10 nm。以荧光强度值换算 NT 的含量,按 下列公式计算纳米粒的包封率和载药量。

包封率 = $(C_0 - C_1)/C_0 \times 100\%$

载药量 = $(C_0 - C_1)/M \times 100\%$

其中 C_0 为投入 NT 的初始浓度; C_1 为离心后 NT 的浓度; M 为冻干后的纳米粒的质量与胶体溶液的体积比。

NT 标准曲线 精密称取恒温下干燥至恒重的 FITC-NT, 以细胞空白液溶解稀释成 1.00、2.00、4.00、 8.00、16.00 和 32.00 ng·mL⁻¹ 系列溶液, 两次离心 (15 000 r·min⁻¹, 10 min), 取上层液, 用 ModulusTM 单 管型多功能光度计在蓝波长段 (激发波长: 465~485 nm) 测定荧光强度。以荧光强度 (F) 对药物浓度 (C) 进行线性回归得标准曲线。

rBMECs 的分离与培养 采用酶消化法^[7]分离 培养 rBMECs。取 8 只 7~10 日龄的 SD 大鼠 (雌雄 各半) 大脑皮质置于 DMEM/F-12 培养基中, 仔细剔 除软脑膜及大血管, 漂洗 3 次, 剪碎, 用 0.05%胰蛋 白酶 (pH 7.8) 37 ℃培养箱消化 20 min, 加入含 20% 新生牛血清的 DMEM/F-12 培养基终止消化, 并吹打 混匀、依次通过100目(150 um)和200目(75 um) 尼龙筛绢过滤, 收集 200 目 (75 µm) 尼龙筛绢上微 血管, 离心 10 min (1 000 r·min⁻¹), 保留离心管底的细 胞混合物, 悬浮于 0.1%的 II 型胶原酶溶液中 (0.5~2 mL, 1 mg·mL⁻¹), 吹打混匀, 37 ℃培养箱消化 25 min, 再次离心后收集沉淀, 接种到预先涂有 2%明胶的玻 璃培养瓶中,常规培养4天后首次换液,以后每2天 换液1次,约12天细胞生长至致密单层,可进行传代 培养。待原代培养的rBMECs在培养瓶中贴壁生长后, 将其置于荧光倒置显微镜下观察形态特点和生长过 程。

P-80-NT-NP 对 rBMECs 的细胞毒性研究 取原 代培养的 rBMECs,用 0.25% 胰酶-0.02% EDTA 消化, 再用含 20% 新生牛血清的 DMEM/F-12 培养基配成细 胞悬液,接种于 96 孔培养板中。实验共设 17 组,每组 6 孔:空白组、对照组为 NT、NP 和 NT-NP,实验组为 P-80-NT-NP,实验组和对照组分别设 100、150、200、 300 和 400 ng·mL⁻¹ 质量浓度。取各组溶液 100 μL,与 rBMECs 作用 2 h,加入 5 mg·mL⁻¹ MTT 液 20 μL,置 培养箱反应 4 h 终止培养,弃除上清液,每孔加入 DMSO 150 μL,摇床上振荡 15 min (100 r·min⁻¹),用酶 联免疫检测仪于 492 nm 处测定光密度 (optical density, OD) 值,计算细胞相对增值率 (relative growth rate, RGR):

$$RGR = \frac{OD_{iikeal}}{OD_{2chal}} \times 100\%$$

根据 RGR 值,参照《美国药典》毒性分级法^[8] 评价细胞毒性,评价标准为:① RGR 值≥75%,细胞 毒性等级为0或1级,合格;② RGR 值为50%~74%, 细胞毒性等级为2级,应结合细胞形态综合评价;③ RGR 值≤49%,细胞毒性等级为3~5级,不合格。

rBMECs 跨膜电阻的测定 原代培养的 rBMECs 经 0.25%胰酶-0.02% EDTA 消化离心, 以细胞数 1×10⁵/ cm⁻² 接种于 Millicell insert 转运膜上, 于 37 ℃、5% CO₂的细胞培养箱中培养, 接种4天后首次换液, 以后 每 2 天换液 1 次, 并用 Millicell-ERS 仪测定 Millicell inserts 上的跨内皮细胞电阻值 (transendothelial elec-

trical resistance, TEER).

P-80-NT-NP 在 rBMECs 上的转运实验 取培 养具有 TEER 值>130 Ω ·cm⁻²的致密单层 rBMECs 的 Millicell inserts 转运膜, 以 37 ℃ D-hanks 液温孵 15 min, 腔面侧 (apical, AP) 加入 P-80-NT-NP (含 NT 150 ng·mL⁻¹) 的 PBS 溶液 0.4 mL, 以 NT 组、 NT-NP 组 (均含 NT 150 ng·mL⁻¹) 为对照, 基底侧 (basolateral, BL) 加入空白 PBS 溶液 0.6 mL, 于 30、 60、90 和 120 min 从 BL 侧取样 50 µL 用于测定, 并 同时补加等体积 PBS 溶液以平衡静水压力, 样品液 用 ModulusTM 单管型多功能光度计测定药物浓度, 按下列公式计算表观通透系数 (apparent permeability coefficient, P_{app}]^[9]:

$$P_{\rm app} = \frac{V_{\rm BL}}{A \times T} \times \frac{C_{\rm BL}}{C_{\rm AP}}$$

其中 V_{BL} 为基底侧溶液体积, A 为转运膜面积, T 为转运时间, C_{BL} 为基底侧药物浓度, C_{AP} 为腔面侧药物浓度。

统计学方法 所有统计的实验数据以 *x* ± *s* 表示, 对比较的样本进行 *t* 检验, *P* < 0.01 或 *P* < 0.05 具有统 计学意义。

结果

1 P-80-NT-NP 的性质

制备的 P-80-NT-NP 呈圆形或类圆形,大小均一 (图 1),平均粒径为 (78.3 ± 8.2) nm, zeta 电位为 (-15.37±0.98) mV,包封率为 (80.25±2.13)%,载药 量为 (0.124±0.02)%。

2 NT 标准曲线

NT 标准曲线为: F=18.776 C+85.177, R=0.999 7 (n = 5), 在 1~32 ng·mL⁻¹内荧光强度与药物浓度成 良好的线性关系。

3 rBMECs 分离与培养

rBMECs 最初贴壁时呈短梭形或多角形, 排列不规则, 核淡, 胞膜明显。随着培养时间的延长, 内皮细胞不断增殖形成细胞群落, 形态以长梭形为主呈"旋涡"状, 约 12 天 rBMECs 生长成致密单层细胞, 呈"流水"状或"铺路石"状 (图 2), 形态符合体外BBB 模型要求^[10, 11]。

4 P-80-NT-NP 对 rBMECs 的细胞毒性研究

NT 质量浓度 \leq 200 ng·mL⁻¹时, 实验组和对照组的细胞毒性等级为 1 级, 对 rBMECs 无毒性; NT 质量浓度 >200 ng·mL⁻¹时, NT 组的细胞毒性等级为 1 级, 对 rBMECs 无毒性, 而 NP 组、NT-NP 组和 P-80-NT-NP



Figure 1 Polysorbate-80 modified neurotoxin loaded polybutylcyanoacrylate nanoparticle (P-80-NT-NP, ×50 000)

组的细胞增殖率显著降低 (*P* < 0.01), 细胞等级为 2~3, 对 rBMECs 毒性增加, 且 P-80-NT-NP 组的细 胞增殖率比 NP 组、NT-NP 组略有降低, 但未见显著 性差异 (*P* > 0.05) (表 1)。结果表明, 神经毒素没有细 胞毒性, 但制成纳米粒后, 随着浓度增加, 细胞毒性 逐渐增大。

Table 1 Cytotoxicity of P-80-NT-NP. n = 6, $\overline{x} \pm s$. ${}^*P < 0.05$, ${}^{**}P < 0.01 \text{ vs NT}$

Group	$C/\text{ng·mL}^{-1}$	OD	RGR/%	Cytotoxicity grade
Blank control	_	0.384 ± 0.030	100.0	0
NT	100	0.207 ± 0.003	89.1	1
	150	0.204 ± 0.001	87.8	1
	200	0.201 ± 0.003	86.6	1
	300	0.200 ± 0.002	86.3	1
	400	0.181 ± 0.005	78.0	1
NP	100	0.180 ± 0.004	77.7	1
	150	0.177 ± 0.005	76.2	1
	200	0.169 ± 0.003	72.9	2
	300	0.143 ± 0.006	61.9	2
	400	0.112 ± 0.013	48.5	3
NT-NP	100	$0.185 \pm 0.005^{**}$	79.5	1
	150	$0.175 \pm 0.004^{**}$	75.1	1
	200	$0.175 \pm 0.005^{**}$	75.2	1
	300	$0.135 \pm 0.009^{**}$	58.1	2
	400	$0.119 \pm 0.016^{**}$	51.1	2
P-80-NT-NP	100	$0.175 \pm 0.006^{**}$	75.2	1
	150	$0.174 \pm 0.006^{**}$	75.1	1
	200	$0.174 \pm 0.006^{**}$	75.0	1
	300	$0.132 \pm 0.005^{**}$	58.3	2
	400	$0.132 \pm 0.005^{**}$	38.6	3

5 rBMECs 跨膜电阻的测定

在 4~14 天内细胞 TEER 值快速上升, 15~18 天 细胞 TEER 值上升至峰值 (146.5 ± 1.43) Ω·cm⁻²并到 达了平台期 (图 3)。

6 P-80-NT-NP 在 rBMECs 上的转运

在 30~120 min 内, AP-BL 方向上, NT 组、NT-NP 组和 P-80-NT-NP 组均具有时间依赖性;在各时间点上, NT-NP 组和 P-80-NT-NP 组的 *P*_{app} 值均显著大于 NT 组 (*P* < 0.01); P-80 修饰的纳米粒与未修饰的纳米 粒相比, *P*_{app} 值也有显著提高 (*P* < 0.05) (图 4)。结果 表明,载药纳米粒能显著提高 NT 跨 BBB,且 P-80 修 饰具有一定的促脑内转运作用。



Figure 2 Primary cultured rat brain microvascular endothelial cells (rBMECs,12 d) (×200)



Figure 3 Transendothelial electrical resistance (TEER) values of rBMECs on millicell inserts (n = 5, $\overline{x} \pm s$)



Figure 4 Transport of P-80-NT-NP across rBMECs (n = 3, $\overline{x} \pm s$). *P < 0.05 vs NT-NP

讨论

体外 BBB 模型采用酶消化法分离培养 rBMECs

得到,在荧光倒置显微镜下观察细胞排列紧密,呈 "流水"状或"铺路石"状,与文献报道一致^[10,11]。 同时采用 Millicell-ERS 仪测定 TEER 值考察细胞连接 的紧密程度。结果显示, rBMECs 培养至 15 天,跨膜 电阻>130 Ω·cm⁻²,细胞排列紧密,符合 BBB 体外转 运模型的要求。由于 TEER 值与细胞连接的紧密程度 有直接关系,随着培养时间的延长,细胞的紧密连接 逐渐完善,而 TEER 值则相应的逐渐增大。采用 TEER 值考察细胞连接的紧密程度,方法灵敏、简便,主要 优势在于能适时检测内皮细胞单层对离子流的阻抗 并消除膜电容的影响从而有效地反映其"屏障"功 能,反映单层细胞膜限制纳米粒通过细胞旁路转运 的能力^[12]。

本实验制备了 P-80 修饰的 NT 的 PBCA 纳米 粒,并进行细胞毒性考察。结果表明,在 100~400 ng·mL⁻¹内, NT 组对 rBMECs 无毒性,而 P-80-NT-NP 组、NP 组和 NT-NP 组的细胞毒性有浓度依赖性,随 着浓度的增加,毒性增大,但 P-80-NT-NP 组和 NP 组、NT-NP 组比较未见显著性差异 (*P* > 0.05)。所以, 推测纳米粒的细胞毒性可能由纳米载体材料 PBCA 引起。研究报道,PBCA 在体内主要通过血清脂酶、 胰液等催化,降解为水溶性产物,从肾脏排出,故毒 性较小;但在体外 PBCA 可以降解为甲醛及异丁醇, 产生一定的细胞、组织毒性^[13];体外细胞培养的过程 中其代谢产物聚集在培养液中,对细胞产生持续的 刺激作用^[14]。因此,纳米粒的细胞毒性尚待体内进一 步研究。

Kreuter 等^[15]曾培养人和牛的脑毛细血管上皮细 胞建立体外 BBB 模型,用荧光和共聚焦激光扫描显 微镜法观察到 P-80 包裹的 PBCA 纳米粒跨过 BBB 的 数量约为未包裹纳米粒的 20 倍。在 NT 的大鼠脑内 递送研究中发现,单纯 NT 鼻腔给药后无法进入脑内, 而以纳米粒为载体,可显著增加其鼻腔吸收入脑,且 能较快达到峰浓度,消除缓慢^[7]。本文进一步分离培 养 rBMECs 作为体外 BBB 模型,研究 P-80 修饰的 NT 纳米粒跨 BBB 转运,结果亦发现 NT 在 rBMECs 的透 过率较少,制成纳米粒后透过率显著增加 (*P* < 0.01), 且 P-80 修饰的纳米粒透过率高于未修饰的纳米粒 (*P* < 0.05),说明表面修饰 P-80 能提高 NT 的 PBCA 纳 米粒的血脑屏障透过性。因此,以 P-80 为表面修饰材 料, PBCA 为载体材料制备的纳米粒在增加大分子蛋 白多肽类药物脑内摄入方面具有独特的优越性。

综上所述, 以培养 rBMECs 建立的 BBB 模型适用于体外细胞毒性和通透性研究, P-80 修饰的 PBCA

纳米粒能促进大分子肽类药物 NT 跨 BBB 转运,有一定的细胞毒性,随着浓度增加而逐渐增大,这为脑靶向纳米粒毒性和转运机制研究奠定基础,为蛋白多肽 类药物脑靶向制剂的开发提供理论依据和实践参考。

References

- William M. The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development [J]. NeuroRX, 2005, 1: 3–14.
- [2] Chen RZ, Wu XR. The analgesic effect of neurotoxin from cobra (Naja naja) venom [J]. Chin Pharm Bull (中国药理学 通报), 1988, 4: 113-116.
- [3] Kreuter J. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2001, 47: 65–81.
- [4] Sun WQ, Xie CS, Wang HF, et al. Specific role of polysorbate 80 coating on the targeting of nanoparticles to the brain [J]. Biomaterials, 2004, 25: 3065–3071.
- [5] Cheng QY, Feng J, Li FZ. Brain delivery of neurotoxin-Iloaded nanoparticles through intranasal administration [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2008, 43: 431-434.
- [6] Gao KP, Jiang XG. Influence of particle size on transport of methotrexate across blood brain barrier by polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles [J]. Int J Pharm, 2006, 310: 213–219.
- [7] Bowman PD, Betz AL, Wolinsky JS, et al. Primary culture of capillary endothelium from rat brain *in vitro* [J]. In Vitro, 1981, 17: 353–362.
- [8] USP XXII, NF XVII [S]. United States Pharmacopeial Convention, Inc, 1990: 2069.
- [9] Artursson P. Epithelial transport of drugs in cell culture: a model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive (Caco-2) cells [J]. J Pharm Sci, 1990, 79: 476–482.
- [10] Diglio C, Grammas P, Giacomelli F, et al. Primary culture of rat cerebral microvascular endothelial cells: isolation, growth and characterization [J]. Lab Invest, 1982, 46: 554–563.
- Begley DJ, Brightman MW. Structural and functional aspects of the blood-brain barrier [J]. Prog Drug Res, 2003, 61: 39–78.
- [12] Li G, Simon MJ, Cancel LM, et al. Permeability of endothelial and astrocyte cocultures: *in vitro* blood-brain barrier models for drug delivery studies [J]. Ann Biomed Eng, 2010, 38: 2499– 2511.
- [13] Carsten O, Peter H, Frank S, et al. The *in vitro* stability of air-filled polybutylcyanoacrylate microparticles [J]. Biomaterials, 2006, 27: 3549–3559.
- [14] Gui K, Zhang YD. A study on cytotoxicity of ADM-PBCA-NP to L-02 cells [J]. Chin J General Surg (中国普通外科杂志), 2008, 17: 159–161.
- [15] Ramge P, Unger RE, Kreuter J, et al. Polysorbate-80 coating enhances uptake of polybutylcyanoacrylate (PBCA)-nanoparticles by human and bovine primary brain capillary endothelial cells [J]. Eur J Neurosci, 2000, 12: 1931–1940.