

· 实验研究 ·

聚合物载体对环孢素 A 角膜通透性的促进作用

李景果 周天洋 栗占荣 梁珍 夏慧芸 何继军 张俊杰

450003 郑州, 河南省眼科研究所 河南省立眼科医院 河南省人民医院 郑州大学人民医院

通信作者: 张俊杰, Email: zhangjunjie@henu.edu.cn

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.12.004

【摘要】 **目的** 研究聚合物载体对环孢素 A (CsA) 角膜通透性的影响。 **方法** 利用化学方法合成接枝共聚物壳聚糖-接枝-环糊精, 核磁共振波谱仪和傅里叶红外光谱分析表征聚合物的结构。以该聚合物作为载体材料, 制备 CsA 滴眼液, 高效液相色谱法-质谱联用系统测量滴眼液中药物含量, 渗透压测定仪和粘度计分别测定滴眼液的渗透压和黏度。取新西兰白兔 3 只, 左眼作为实验组, 右眼作为对照组, 进行角膜刺激性评分。取清洁级新西兰白兔 18 只, 按照随机数字表法分为完整角膜 CsA 组、去上皮 CsA 组和去上皮对照组, 以左眼为实验眼, 分别于点眼后 0.5 h 和 1 h 处死动物, 抽取房水, 剖取角膜组织, 高效液相色谱法-质谱联用系统测量角膜组织和房水中的药物含量。采用荧光素香豆素 6 作为模型药物, Cy5 标记聚合物载体, 采用双荧光标记方法研究体系在小鼠角膜中的实时透过行为。 **结果** 核磁共振图和红外光谱图显示, 成功合成了目标聚合物壳聚糖-接枝-环糊精。CsA 滴眼液载药量为 0.06%; 渗透压为 305 mOsmol/Kg; 黏度为 36.5 cP。该 CsA 载药体系具有可逆的温度敏感药物释放行为, 且突击点眼后 0.5、1、2、3、4 和 6 h 对新西兰兔眼无明显刺激性。给药后 1 h, 去上皮 CsA 组房水中药物质量浓度为 (149.19±3.93) ng/ml, 高于去上皮对照组的 (30.25±11.43) ng/ml, 角膜组织中药物质量分数为 (5.88±1.46) μg/g, 高于去上皮对照组的 (3.98±0.95) μg/g, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。完整角膜 CsA 组给药后 1 h 房水中的药物质量浓度为 (7.23±1.31) ng/ml, 显著低于去上皮 CsA 组和去上皮对照组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。双光子激光扫描共焦显微镜检测显示, 该给药体系均能促进药物透过角膜屏障, 到达房水。 **结论** 制备的接枝共聚物可以有效负载疏水性免疫制剂 CsA, 该新型给药体系可以有效促进药物透过角膜屏障, 增加药物的角膜通透性。

【关键词】 环孢素 A; 免疫抑制剂; 角膜屏障; 荧光双标记; 角膜组织分布

基金项目: 国家自然科学基金项目 (21504082、U1304811、81600775)

The facilitation of corneal permeability of cyclosporine A loaded on chitosan-graft-cyclodextrin copolymers vector Li Jingguo, Zhou Tianyang, Li Zhanrong, Liang Zhen, Xia Huiyun, He Jijun, Zhang Junjie

Henan Eye Institute, Henan Eye Hospital, Henan Province People's Hospital, Zhengzhou University People's Hospital, Zhengzhou 450003, China

Corresponding author: Zhang Junjie, Email: zhangjunjie@henu.edu.cn

【Abstract】 **Objective** To investigate the corneal permeability of cyclosporin A (CsA) loaded on polymeric vector after topical application. **Methods** The grafted copolymer chitosan-graft-cyclodextrin (CS-g-CD) was synthesized, and the physicochemical structures of the polymer were investigated using nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) and fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR). A novel CsA eye drop was prepared using the grafted copolymer as carrier material. The physicochemical properties of eye drop, including drug-loading content, osmotic pressure and viscosity were investigated by high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS), osmotic pressure gauge and viscometer, respectively. New Zealand albino rabbits were randomly divided into intact cornea CsA group, epithelium debrided CsA group and epithelium debrided control group. The corneal epithelia of the left eyes was debrided in the cornea epithelium debrided group. Cornea irritation test was performed on New Zealand albino rabbits. The aqueous humor was taken and the corneas were collected at 0.5 hour and 1 hour after instilled. The concentration of CsA was measured by HPLC-MS. Cy5 labeled vector loaded with Coumarin 6 served as

model copolymers system, the penetration capabilities of the double fluorescent labeling copolymers system were monitored *in vivo* using two-photon scanning fluorescence microscopy on murine corneas after topical application. The use and care of the animals complied with Regulations for the Administration of Affairs Concerning Experimental Animals by State Science and Technology Commission. **Results** The polymer of CS-g-CD was successfully synthesized and confirmed using NMR and FT-IR. The drug loading of CsA in eye drop solution was 0.06 %; the osmotic pressure was 305 mOsmol/kg and the viscosity was 36.5 cP. The CsA drug delivery system had a reversible temperature-sensitive drug release behavior and had no obvious irritation on the eyes of New Zealand rabbits. One hour after treatment, the concentration of CsA in the cornea and aqueous humor of epithelium debrided CsA group was $(5.88 \pm 1.46) \mu\text{g/g}$ and $(149.19 \pm 3.93) \text{ng/ml}$, respectively, which was significantly higher than $(3.98 \pm 0.95) \mu\text{g/g}$ and $(30.25 \pm 11.43) \text{ng/ml}$ in epithelium debrided control group (both at $P < 0.05$); the concentration of CsA in the aqueous humor of intact cornea CsA group was $(7.23 \pm 1.31) \text{ng/ml}$, which was significantly lower than that in epithelium debrided CsA group ($P < 0.05$). Polymer vectors were mainly retained in the corneal epithelium, and coumarin 6 gradually diffused into the deep corneal stroma with time. **Conclusions** The grafted copolymer can load CsA, and the eye drop can effectively overcome the corneal barrier and increase the corneal permeability of CsA.

[Key words] Cyclosporine A; Immunosuppressive agents; Corneal barrier; Fluorescent double labeling; Corneal tissue distribution

Fund program: National Natural Science Foundation of China (21504082, U1304811, 81600775)

环孢素 A (cyclosporin A, CsA) 是一种强效免疫抑制剂^[1], 可有效抑制免疫排斥反应并广泛用于多种自身免疫性疾病的防治。CsA 在抑制角膜移植排斥反应^[2-3]和治疗包括干眼^[4]和自身免疫性葡萄膜炎^[5]在内的多种免疫性眼病中发挥重要作用。局部点眼是治疗角膜移植排斥反应、干眼和春季角结膜炎等眼前节疾病的主要给药方式。CsA 是一个环状的十一肽化合物, 存在 4 个分子间氢键, 相对分子质量较大, 为 1 203 Da, 水溶解度较低, 25 °C 条件下的溶解度为 6.6 $\mu\text{g/ml}$, 生物学屏障的透过性差^[6]。CsA 一般通过溶解在植物油 (蓖麻油) 或含有表面活性剂 (Cremophor EL 或 Tween 80) 的溶剂中才能实现应用^[7]。目前, 只有一个商业可用的眼用 CsA 制剂 Restasis® (0.5 mg/ml CsA; Allergan Inc, Irvine, CA, USA), 这是一种水包油型滴眼液, 用蓖麻油和 Tween80 混合物实现增溶^[8]。然而, 这些溶媒的眼部耐受性差, 易导致眼痒、眼红、视物模糊和眼痛等症状, 从而使得药物的生物相对利用率变低^[9]。为了提高 CsA 的眼部应用性和耐受性, 许多研究者尝试各种药物剂型来改善这种状况, 包括胶体载药体系 (胶束、乳剂、脂质体、纳米颗粒) 以及水溶性潜药策略等^[10-11]。CsA 在眼科的应用仍然是一个挑战, 还有很大的提升空间。影响药物经角膜途径进入眼内的主要因素是角膜屏障, 角膜上皮是一种疏水性生物膜, 对于亲水性药物是一种屏障作用, 而基质层是由亲水性胶原组成, 亲水性药物更容易通过。因此, 对于相对分子质量较大且疏水性强的 CsA, 角膜屏障作用尤为突出, 导致其难以透过细胞紧密排列的角膜上

皮层, 且强的疏水性导致其难以透过亲水性的角膜基质层。因此开发合适的给药体系, 克服角膜两重屏障作用是解决问题的关键。本研究中通过合成合适的载体材料, 以期提高 CsA 在角膜中的透过性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级健康雄性新西兰白兔 39 只 (新乡华兰生物工程有限责任公司), 体质量 2.2 ~ 2.6 kg。SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 4 只 (郑州大学实验动物中心), 10 ~ 12 周龄, 体质量 27 ~ 28 g。饲养于 $(25 \pm 2) ^\circ\text{C}$, 12 h 暗/12 h 明循环光照环境中, 自由饮水和进食。实验前荧光素钠点眼后裂隙灯显微镜检查, 角膜结构无异常。实验动物的使用和喂养遵循国家科学技术委员会颁发的《实验动物管理条例》。

1.1.2 主要试剂及仪器 CsA (大连美仑生物技术有限公司); 壳聚糖 (chitosan, CS) (济南海得贝海洋生物工程有限公司); β -环糊精 (β -cyclodextrins, β -CD) (国药集团化学试剂有限公司); Cyanine5 (Cy5) (美国 Lumiprobe 公司); 香豆素 6 (贵州百灵威科技有限公司); 对甲苯磺酰氯 (tosyl chloride, Ts-Cl)、氢氧化钠、甘氨酸、三乙胺、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 [1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC · HCl]、N-羟基琥珀酰亚胺 (N-hydroxysuccinimide, NHS) (阿拉丁试剂公司); 戊巴比妥钠 (美国 Sigma-Aldrich 公司)。透析袋 (上海绿鸟生物科技有限公司); 核磁共振波谱仪 (nuclear magnetic

resonance spectroscopy, NMR) (瑞士 Bruker 公司); 傅立叶红外光谱分析仪 (Fourier transform infrared spectrometer, FT-IR) (美国 Nicolet 670 公司); 渗透压测定仪 (德国 Gonotec 公司); 黏度测定仪 (美国 Brookfield 公司); 高效液相色谱仪 (high performance liquid chromatography, HPLC)、Quattro PremierXE 四极杆液质联用系统 (美国 Waters 公司); MiniSpinPlus 小型高速离心机 (德国艾本德公司); LSM 780 NLO 型双光子激光扫描共焦显微镜 (德国 Carl Zeiss 公司)。

1.2 方法

1.2.1 接枝共聚物的制备及表征 (1) 单对甲苯磺酰-β-环糊精 (CD-OTs) 的合成^[12] 60.0 g β-CD 悬浮于 500 ml 的水中, 逐滴加入 10 mol/L 氢氧化钠溶液 20 ml, 此过程不少于 30 min, 体系逐渐变得澄清透明, 将 10.08 g TsCl 充分溶解在 30 ml 乙腈中, 逐渐滴加至上述溶液中, 此过程不少于 30 min, 大量白色沉淀析出; 体系于室温下继续反应 2 h, 于 4 °C 下静置过夜, 收集沉淀物, 得 CD-OTs。(2) 单羧基-β-环糊精 (CD-COOH) 的合成 CD-OTs 5.0 g、蒸馏水 40 ml、三乙胺 25 ml 和甘氨酸 1.0 g 加入反应瓶中, 70 °C 回流下反应 3 d; 过滤除去生成的三乙胺盐酸盐, 旋蒸除去三乙胺; 产物用甲醇洗涤, 于丙酮中沉淀, 得淡黄色粉末。(3) 壳聚糖-接枝-环糊精 (CS-g-CD) 的合成 1.0 g CD-COOH 溶于去离子水中, 用 NHS 活化羧基 2 h; 在 EDC·HCl 存在下, 将含 0.8 g CS 的质量分数为 2% CS 水溶液滴加到上述体系中, 室温下反应过夜; 4 000 r/min 离心 5 min, 取上清液装入透析袋 (截留相对分子量为 1 400 Da) 中, 透析 48 h, 得无色透明黏稠溶液, 冻干得白色固体。接枝共聚物合成路线见图 1。分别采用 ¹H NMR 和 FT-IR 检测接枝共聚物结构。

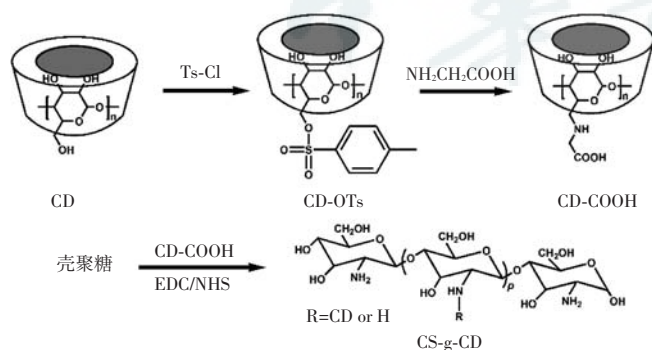


图 1 接枝共聚物的合成路线 CD: 环糊精; CD-OTs: 单对甲苯磺酰-β-环糊精; CD-COOH: 单羧基-β-环糊精; CS-g-CD: 壳聚糖-接枝-环糊精

1.2.2 CsA 滴眼液的制备及理化性质检测 CS-g-CD 20 mg 溶于 10 ml 生理盐水中, 在快速搅拌下, 用注射

器将 4 mg/ml 的 CsA 乙醇溶液 1 ml 加到上述体系; 混合均匀后, 将该体系密闭, 4 °C 下放置 48 h; 旋转蒸发器去除乙醇, 低温下超滤管洗涤浓缩溶液 3 次, 用生理盐水将终体积定容到 6 ml, 得载药体系 CS-g-CD/CsA。高效液相色谱法-质谱联用系统测量滴眼液的药物含量, 渗透压测定仪和黏度仪分别测定滴眼液的渗透压和黏度。20 g 水溶性 β-环糊精加入到 100 ml 注射用水中, 搅拌溶解后, 加入 60 mg CsA, 搅拌溶解, 0.45 μm 无菌滤头过滤, 即得对照药。

1.2.3 眼部刺激性研究 选取新西兰白兔 3 只, 左眼作为实验组, 右眼不做处理, 采用突击点眼方式, 即每 5 分组给药 1 次, 每次 50 μl, 共 5 次; 于点眼结束后的 0.5、1、2、3、4 和 6 h 进行眼表裂隙灯显微镜检查, 并按照 Draize 刺激性实验评分标准进行评分, 对角膜混浊程度、结膜充血情况、水肿及分泌物情况、虹膜充血或出血分别评分, 并按积分对刺激程度进行分级: 评分满分 16 分, 0~3 分为无刺激性, 4~8 分为轻度刺激性, 9~12 分为中度刺激性, 13~16 分为重度刺激性。

1.2.4 药物在兔眼中的药代动力学实验 新西兰白兔随机分为角膜上皮完整组 12 只和去角膜上皮组 24 只。每只动物均以左眼为实验眼, 右眼作为对照不作处理。去角膜上皮组实验兔在给药前 2 h 用体积分数 0.5% 盐酸丁卡因滴眼液点眼麻醉, 随后用经体积分数 50% 乙醇溶液浸泡的直径 13 mm 圆形滤纸片敷于兔眼角膜中央 60 s, 刮去变性的上皮。去角膜上皮实验兔再分为去角膜 CsA 组和去角膜对照组, 分别用 CsA 滴眼液和对照药点眼; 角膜完整组只用 CsA 滴眼液点眼。点眼方式采用突击给药方法, 即连续点眼 5 次, 每次 50 μl, 每次间隔 5 min, 分别于末次给药后 0.5 h 和 1 h 用生理盐水冲洗眼表, 注射过量戊巴比妥钠溶液处死实验兔, 抽取房水, 剖取角膜, 称质量, 置低温冰箱中保存备用。

角膜样品处理方法: 取低温保存的角膜放至室温, 置玻璃试管中, 剪碎至 2 mm 大小, 加入甲醇 0.5 ml, 4 °C 密封浸泡 24 h, 振荡 30 s, 取 100 μl 溶液, 3 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液采用液质联用系统进行定量分析。房水样品处理方法: 取固相萃取柱, 依次用 1 ml 甲醇洗脱 2 次和 1 ml 蒸馏水洗脱 2 次进行柱活化; 取房水 150 μl, 加入 450 μl 沉淀剂 [0.2 mol/L 硫酸锌-甲醇溶液 (体积比为 3:7)] 进行沉淀, 振荡 1 min, 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清液加入活化好的固相萃取柱中, 注射器以 2 ml/min 的速度抽去柱中溶剂; 随后依次向柱中加入用 1 ml 蒸馏水洗脱 4 次、1 ml 体积分数 65% 甲醇水溶液洗脱 2 次、1 ml 正

庚烷-丙酮溶液(体积比为 99:1)洗脱 1 次,洗脱速度为 2 ml/min;1 ml 正庚烷-异丙醇溶液(体积比为 1:1)洗脱;60 °C 下氮气吹干溶剂,加入 65% 甲醇水溶液 100 μ l 振荡复溶;3 500 r/min 离心 5 min,取上清溶液,采用液质联用系统进行定量分析。

1.2.5 双荧光标记法检测聚合物体系在小鼠角膜中的透过行为 以荧光素香豆素 6 作为模型药物,Cy5 标记聚合物载体。将 50 μ g 香豆素 6 和 50 μ g Cy5-NHS 酯加入到含 10 mg 接枝聚合物的水溶液中,室温下反应过夜;过滤除去不溶物,再通过超滤离心管洗涤浓缩 3 次以除去游离的 Cy5-PEG 活性酯,得双荧光标记的香豆素 6 聚合物溶液体系。C57BL/6 小鼠 2 只,按照 85 mg/kg 剂量腹腔内注射戊巴比妥钠溶液行麻醉,给药前 0.5 h 刮去左眼角膜上皮,右眼不作处理;将塑料眼杯罩在小鼠眼上,凡士林密封;将双荧光标记滴眼液滴入眼杯,静置 0.5 h,生理盐水冲洗角膜 3 次;将小鼠固定在塑料板上,双光子激光显微镜下于给药后 20、60 和 120 min 观察小鼠眼内的荧光信号。设置激发波长为 700 nm,香豆素 6 和 Cy5 的发射波长分别为 500 ~ 550 nm 和 640 ~ 710 nm。样品采用 2 μ m/层进行逐层 Z 轴扫描,收集从角膜内皮内侧到上皮外侧的数据。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计学软件进行统计分析。本研究中检测指标的计量数据资料经 W 检验证实呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,经 Levene 检验方差齐(均 $P > 0.05$)。各组间兔眼角膜和房水中的药物质量浓度差异比较采用独立样本 t 检验。采用双尾检验法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 接枝共聚物的表征

^1H NMR 图显示 CD-OTs 化合物在 7.4 ppm 左右存在苯环特征峰,以其为原料合成的 CD 中间产物 7.4 ppm 左右苯环特征峰消失,2.1 ppm 出现了 $-\text{CH}_2-\text{NHCH}_2\text{COOH}$ 结构的化学位移峰,表明按照合成路线成功得到了目标产物 CD-COOH(图 2A)。出现在 2.7 ~ 2.9 ppm 的尖峰是 CS 的特征峰;出现在 4.9 ~ 5.0 ppm 的尖峰是 CD 的特征峰;合成的终产物中同时存在 CS 和 CD 的特征峰,表明成功合成了 CS-g-CD 聚合物(图 2B)。通过比较 CD 和 CS 特征峰面积可以计算 CD 的接枝率,通过改变投料比来调控 CD 的接枝率。FT-IR 图显示,CS 和 CD 的特征吸收峰分别在 2930 cm^{-1} 和 1740 cm^{-1} ,这 2 个特征峰同时存在于合成的终产物中,表明成功地合成了 CS-g-CD(图 2C)。

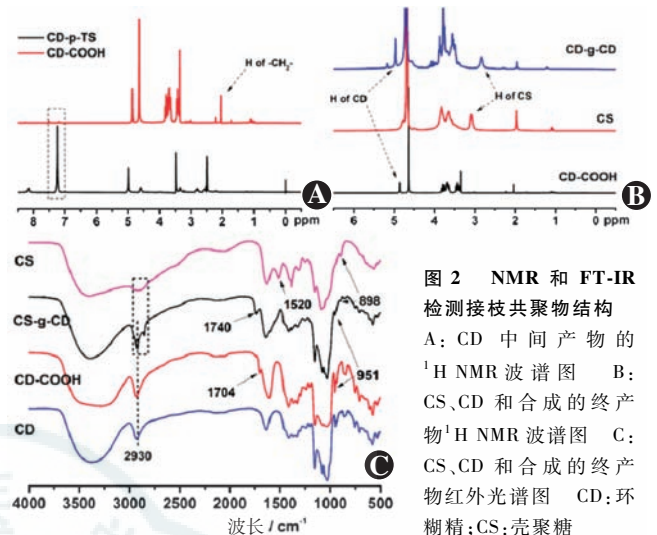


图 2 NMR 和 FT-IR 检测接枝共聚物结构 A: CD 中间产物的 ^1H NMR 波谱图 B: CS、CD 和合成的终产物 ^1H NMR 波谱图 C: CS、CD 和合成的终产物红外光谱图 CD: 环糊精;CS: 壳聚糖

2.2 新型 CsA 滴眼液的理化参数和眼表刺激性

CsA 滴眼液载药量为 0.06%; 渗透压为 305 mOsmol/kg; 黏度为 36.5 cP。该 CsA 载药体系在 4 °C 状态下溶解率高,为澄清溶液,在 25 °C 状态下溶解度低,溶液变混浊;该载药体系具有可逆的温度敏感药物释放行为(图 3)。刺激性实验结果显示,突击点眼后 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 和 6.0 h 刺激程度综合评分均低于 3,均属于无刺激性。

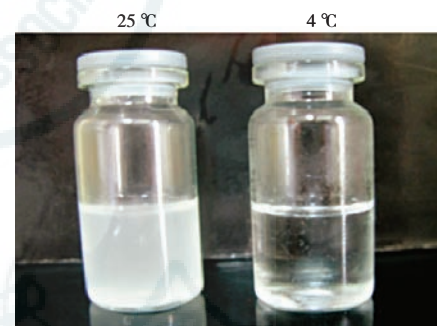


图 3 CS-g-CD 载药体系具有可逆的温度敏感药物释放行为

2.3 CsA 滴眼液在兔眼中药物代谢动力学特征

去上皮 CsA 组给药后 0.5 h 房水药物质量浓度和角膜中质量分数分别为 (35.65 ± 1.95) ng/ml 和 (6.15 ± 0.81) μ g/g,去上皮对照组给药后 0.5 h 房水和角膜中的质量分数分别为 (40.99 ± 10.48) ng/ml 和 (5.75 ± 1.03) μ g/g,2 个组比较差异均无统计学意义(均 $P < 0.05$)。去上皮 CsA 组给药后 1 h 角膜组织中药物质量浓度为 (5.88 ± 1.46) μ g/g,高于去上皮对照组的 (3.98 ± 0.95) μ g/g;去上皮 CsA 组给药后 1 h 房水中药物浓度为 (149.19 ± 3.93) ng/ml,高于去上皮对照组的 (30.25 ± 11.43) ng/ml,差异有统计学意义($P <$

0.01)(表 1,2)。完整角膜 CsA 组给药后 1 h 角膜组织中药物质量浓度为 $(5.25 \pm 0.94) \mu\text{g/g}$, 与去上皮 CsA 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。完整角膜 CsA 组给药后 1 h 房水中的药物质量浓度为 $(7.23 \pm 1.31) \text{ng/ml}$, 显著低于去上皮 CsA 组和去上皮对照组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

组别	样本量	给药后各时间点药物浓度	
		0.5 h	1 h
去上皮 CsA 组	6	35.65 ± 1.95	149.19 ± 3.93
去上皮对照组	6	40.99 ± 10.48	30.25 ± 11.43 ^a
完整角膜 CsA 组	6	7.28 ± 2.65 ^a	7.23 ± 1.31 ^a

注: 与同一时间点去上皮 CsA 组比较, ^a $P < 0.05$ (独立样本 t 检验)
CsA: 环孢素 A

组别	样本量	给药后各时间点药物质量分数 ($\mu\text{g/g}$)	
		0.5 h	1 h
去上皮 CsA 组	6	6.15 ± 0.81	5.88 ± 1.46
去上皮对照组	6	5.75 ± 1.03	3.98 ± 0.95 ^a
完整角膜 CsA 组	6	4.50 ± 0.44	5.25 ± 0.94

注: 与同一时间点去上皮 CsA 组比较, ^a $P < 0.05$ (独立样本 t 检验)
CsA: 环孢素 A

2.4 滴眼液在小鼠角膜中的透过行为

双光子激光扫描共焦显微镜检测显示, 在完整角膜条件下, 聚合物载体 Cy5 主要滞留在角膜上皮层, 而荧光药物香豆素 6 随时间延长逐渐向角膜基质深层扩散 (图 4)。

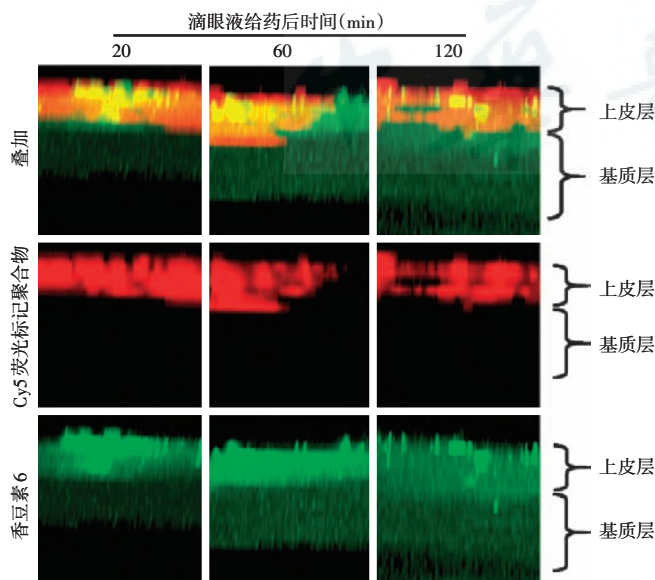


图 4 双光子激光共焦扫描显微镜检测载药体系在小鼠角膜中的透过行为

3 讨论

CsA 是一种脂溶性药物, 其在水溶液中的溶解度偏低; 鉴于眼球特殊的生理结构, 眼部给药存在泪膜屏障、角膜屏障和血-视网膜屏障, 点眼的方式导致 CsA 在眼部的生物利用度大大降低, 因此提高 CsA 的水溶解度和角膜通透性具有重要意义。

聚合物药物载体近年来发展起来的一种新型载药方式^[13]。聚合物药物载体可以高效负载和传输疏水性药物, 降低药物刺激性, 增加药物透过生物膜的屏障作用以及提高药物的生物利用率, 且其自身具有较长的体内循环时间、低毒性等优点^[14-16]。

CS 和 CD 都是已经被批准的药用辅料, 生物相容性好, CD 通过超分子配合作用可以降低药物的刺激性^[17-18]。本研究综合 2 种眼科常用药物载体 CS 和 CD 的优点, 利用化学方法合成高分子接枝共聚物 CS-g-CD, 该接枝聚合物可利用 CD 的疏水性空腔负载疏水性药物, 利用 CS 的正电荷和黏性提高疏水性药物在眼表的滞留时间和药物质量浓度。化学表征结果显示, 成功合成了接枝共聚物, 采用接枝度为 50% 的嵌段共聚物, 既保留了壳聚糖的部分正电荷, 又保证了较高的 CD 载药能力。接枝聚合物 CS-g-CD 负载疏水性药物 CsA, 使其表观溶解度从 $7.3 \mu\text{g/ml}$ 提高至 $630 \mu\text{g/ml}$ 。利用该体系制备出的滴眼液黏度和渗透压适中。该滴眼液体系表现出独特地可逆性温度敏感药物释放行为, 使得该体系同时兼顾了高的药物负载量和药物释放的可控性^[19]。本研究结果显示, 即使在突击给药的极端条件下, 该滴眼液体系也未表现出任何刺激性。

药代动力学结果显示, 在角膜上皮缺失情况下, CsA 滴眼液点眼后 1 h 角膜和房水的药物含量分别是对照药的 1.5 倍和 4.9 倍, 提示 CsA 滴眼液的角膜透过性显著提高。其可能原因是 CsA 本身是疏水性药物, 经过接枝共聚物负载后具有较好的黏附性和表面正电荷, 增加了药物在角膜基质层表面的滞留时间, 提高了药物在亲水性角膜基质层的透过性。在角膜完整的情况下, 该滴眼液体系没有大幅度提高角膜和房水中 CsA 的含量, 其原因可能与 CD 大分子、聚合物载体以及大分子 CsA 难以通过细胞致密排列的上皮层有关^[20]。本研究还表明, 与完整角膜完整相比, CsA 滴眼液角膜上皮缺失的情况下, 房水中 CsA 药物质量浓度提高了 21 倍。房水中药物质量浓度的显著提高不仅与滴眼液体系在眼表滞留时间延长有关, 还可能与水溶性的载药体系更易于透过亲水性的基质层有关。

在角膜炎症情况下,也可能存在上皮不完整,此种情况下负载 CsA 的给药体系能顺利通过角膜屏障并到达房水,显示了该给药体系在治疗自身免疫性葡萄膜炎方面应用的潜力。

香豆素 6 是一种强疏水性荧光物质,在生物体内用作探针实验。本实验中用香豆素 6 作为模拟药物代替环孢素 A 研究载药体系在小鼠角膜中的透过行为。体内双光子荧光成像的结果也证实了上述现象。以上结果表明本滴眼液给药系统具有很好的角膜透性。

综上所述,本研究中利用化学方法制备了一种嵌段共聚物,该共聚物可以有效负载疏水性免疫制剂 CsA,并提高了其对亲水性角膜基质层的透过性,但对于角膜上皮层的透过性增加不明显。制备的滴眼液体系可以有效透过角膜屏障,增加药物的角膜透性。该研究为眼科药物剂型进行了新的探索,对眼科用药研究具有重要意义,有望成为新的研究方向之一。

参考文献

- [1] Guada M, Sebastián V, Irusta S, et al. Lipid nanoparticles for cyclosporine A administration: development, characterization, and *in vitro* evaluation of their immunosuppression activity [J]. *Int J Nanomedicine*, 2015, 10: 6541–6553. DOI: 10. 2147/IJN. S90849.
- [2] 张文华,潘志强,翟长斌,等. 国产环孢素 A 眼液治疗大鼠角膜移植术后免疫排斥反应的研究[J]. *中华眼科杂志*, 2001, 37(2): 140–143.
Zhang WH, Pan ZQ, Zhai CB, et al. Efficacy of topical cyclosporine A on keratoplasty rejection in rats [J]. *Chin J Ophthalmol*, 2001, 37(2): 140–143.
- [3] 谢立信,史伟云,王治宇,等. 前房植入环孢素 A 缓释系统抑制鼠高角角膜移植术后的免疫排斥反应[J]. *中华眼科杂志*, 2002, 38(7): 422–425.
Xie LX, Shi WY, Wang ZY, et al. Experimental study on the effect of cyclosporine A drug delivery system implanted in anterior chamber on high-risk corneal graft rejection [J]. *Chin J Ophthalmol*, 2002, 38(7): 422–425.
- [4] Kang H, Cha KH, Cho W, et al. Cyclosporine Amicellar delivery system for dry eyes [J]. *Int J Nanomedicine*, 2016, 11: 2921–2933. DOI: 10. 2147/IJN. S107569.
- [5] 董晓光,徐玉梅,原公强,等. 环孢素 A 缓释系统眼内植入治疗葡萄膜炎的实验研究[J]. *中华眼科杂志*, 2005, 41(7): 636–641.
Dong XG, Xu YM, Yuan GQ, et al. Intraocular implantation of cyclosporine A drug delivery system in the treatment of experimental uveitis [J]. *Chin J Ophthalmol*, 2005, 41(7): 636–641.
- [6] Lee EJ, Lee SW, Choi HG, et al. Bioavailability of cyclosporin A dispersed in sodium lauryl sulfate-dextrin based solid microspheres [J]. *Int J Pharm*, 2001, 218(1–2): 125–131.
- [7] Gelderblom H, Verweij J, Nooter K, et al. Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation [J]. *Eur J Cancer*, 2001, 37(13): 1590–1598.
- [8] Malaekheh-Nikouei B, Nassirli H, Davies N, Enhancement of cyclosporine aqueous solubility using α - and hydroxypropyl β -cyclodextrin mixtures [J]. *J Incl Phenom Macrocycl Chem*, 2007, 59(3–4): 245–250. DOI: org/10. 1007/s10847-007-9321-4.
- [9] Lallemand F, Felt-Baeyens O, Besseghir K, et al. Cyclosporine A delivery to the eye: a pharmaceutical challenge [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2003, 56(3): 307–318.
- [10] Prospero-Porta G, Kedzior S, Muirhead B, et al. Phenylboronic-acid-based polymeric micelles for mucoadhesive anterior segment ocular drug delivery [J]. *Biomacromolecules*, 2016, 17(4): 1449–1457. DOI: 10. 1021/acs. biomac. 6b00054.
- [11] Guo C, Zhang Y, Yang Z, et al. Nanomicelle formulation for topical delivery of cyclosporine A into the cornea: *in vitro* mechanism and *in vivo* permeation evaluation [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 12968. DOI: 10. 1038/srep12968.
- [12] Petter R C, Salek J S, Sikorski C T, et al. Cooperative binding by aggregated mono-6-(alkylamino)- β -cyclodextrins [J]. *J Am Chem Soc*, 1990, 112(10): 3860–3868. DOI: 10. 1021/ja00166a021.
- [13] Li J, Zhang L, Lin Y, et al. A pH-sensitive prodrug micelle self-assembled from multi-doxorubicin-tailed polyethylene glycol for cancer therapy [J]. *RSC Adv*, 2016, 6(11): 9160–9163. DOI: 10. 1039/C5RA27293A.
- [14] Li J, Yu X, Wang Y, et al. A reduction and pH dual-sensitive polymeric vector for long-circulating and tumor-targeted siRNA delivery [J]. *Adv Mater*, 2014, 26(48): 8217–8224. DOI: 10. 1002/adma. 201403877.
- [15] Li J, Cheng D, Yin T, et al. Copolymer of poly(ethylene glycol) and poly(L-lysine) grafting polyethylenimine through a reducible disulfide linkage for siRNA delivery [J]. *Nanoscale*, 2014, 6(3): 1732–1740. DOI: 10. 1039/c3nr05024f.
- [16] Li J, Li Z, Zhou T, et al. Positively charged micelles based on a triblock copolymer demonstrate enhanced corneal penetration [J]. *Int J Nanomedicine*, 2015, 10: 6027–6037. DOI: 10. 2147/IJN. S90347.
- [17] 喻建锋,管怀进. 环孢素 A 壳聚糖纳米粒修饰人工晶状体表面的实验研究[J]. *中华实验眼科杂志*, 2013, 31(10): 935–939. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2013. 10. 007.
Yu JF, Guan HJ. Experimental study on surface modification of intraocular lens by cyclosporine A-loaded chitosan nanoparticle [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2013, 31(10): 935–939. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2013. 10. 007.
- [18] 兰小川,陈辉,顾海鹰,等. 环孢素 A 壳聚糖纳米微粒防治增生性玻璃体视网膜病变[J]. *眼科研究*, 2007, 25(12): 946–949.
Lan XC, Chen H, Gu HY, et al. Antiproliferative effect of CyA-loaded chitosan nanoparticles on experimental proliferative vitreoretinopathy [J]. *Chin Ophthal Res*, 2007, 25(12): 946–949.
- [19] 席蕾,赵峰,王涛,等. MMC 的 PTMC-F127-PTMC 温敏型水凝胶缓释剂对兔小梁切除术术后滤过泡瘢痕化的调控作用[J]. *中华实验眼科杂志*, 2014, 32(6): 506–511. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2014. 06. 006.
Xi L, Zhao F, Wang T, et al. PTMC-F127-PTMC thermosensitive hydrogel as mitomycin C delivery implant for rabbit trabeculotomy surgery [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2014, 32(6): 506–511. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2014. 06. 006.
- [20] Loftsson T, Stefánsson E. Cyclodextrins in eye drop formulations: enhanced topical delivery of corticosteroids to the eye [J]. *Acta Ophthalmol Scand*, 2002, 80(2): 144–150.
- [21] Lallemand F, Felt-Baeyens O, Besseghir K, et al. Cyclosporine A delivery to the eye: a pharmaceutical challenge [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2003, 56(3): 307–318.

(收稿日期:2017-12-11 修回日期:2018-10-30)

(本文编辑:张宇)