

β-环糊精-壳聚糖修饰的白藜芦醇纳米囊泡的制备及体内外评价

宋赛赛¹, 王壹帆¹, 高赞研¹, 甄好¹, 姜鑫¹, 田书召², 刘睿^{1*}

1. 天津中医药大学中药制药工程学院, 天津 301617

2. 天津中医药大学公共卫生与健康科学学院, 天津 301617

摘要: 目的 制备一种包载白藜芦醇(resveratrol)的新型纳米囊泡(spanlastics, SPs),旨在提高药物在角膜前的滞留时间,用于治疗青光眼的眼部药物递送。方法 采用乙醇注入法,制备β-环糊精-壳聚糖修饰的白藜芦醇纳米囊泡(β-CD-CS-Res-SPs)。建立HPLC法测量其包封率和载药量,使用粒径仪、红外光谱仪和差示扫描量热仪对其进行制剂学表征。通过体外释放、刺激性、细胞摄取和体内药动学等对其有效性和安全性进行全面评估。结果 β-CD-CS-Res-SPs形态圆整,平均粒径为(301.40±2.57)nm, PDI为0.265±0.010、ζ电位为(33.50±0.72)mV,包封率和载药量分别为(92.78±2.81)%和(2.37±0.12)%。体外释放结果表明,与白藜芦醇溶液相比,β-CD-CS-Res-SPs中白藜芦醇的释放更为缓慢,说明其具有一定缓释效果;刺激性和细胞生物学研究表明,其安全无刺激,细胞无毒性且能够进入细胞核发挥作用;药动学研究表明,β-CD-CS-Res-SPs能够延长眼部滞留而提高生物利用度,较白藜芦醇溶液相比,生物利用度提高2.71倍。结论 制备的β-CD-CS-Res-SPs包封率高、粒径和ζ电位适宜,是一种安全、无刺激性、具有缓释作用的纳米给药系统,可延长药物在角膜前的滞留时间,从而提高生物利用度。

关键词: β-环糊精; 壳聚糖; 表面改性; 纳米囊泡; 白藜芦醇; 青光眼; 体外释放; 刺激性; 细胞摄取; 药动学; 缓释作用
中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)19-6958-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.19.008

Preparation, *in vitro* and *in vivo* evaluation of resveratrol spanlastics modified with β-cyclodextrin-chitosan

SONG Saisai¹, WANG Yifan¹, GAO Zanyan¹, ZHEN Hao¹, JIANG Xin¹, TIAN Shuzhao², LIU Rui¹

1. School of Pharmaceutical Engineering of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

2. School of Public Health and Health Sciences, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

Abstract: Objective To prepare a novel type of spanlastics encapsulated with resveratrol, aiming to increase the retention time of the drug in front of the cornea for ocular drug delivery in the treatment of glaucoma. **Methods** β-Cyclodextrin-chitosan-modified resveratrol spanlastics (β-CD-CS-Res-SPs) were prepared by ethanol injection. The encapsulation efficiency and drug loading were measured by HPLC, and the formulation characterization was carried out using particle size analysis, infrared spectra analysis and differential scanning calorimetry. Its efficacy and safety were comprehensively evaluated through *in vitro* release, irritation, cellular uptake and *in vivo* pharmacokinetics. **Results** The results showed that the morphology of β-CD-CS-Res-SPs was round, the average particle size was (301.40±2.57) nm, the PDI was 0.265±0.010, the ζ potential was (33.50±0.72) mV, and the encapsulation efficiency and drug loading were respectively (92.78±2.81)% and (2.37±0.12)%. The *in vitro* release results indicated that β-CD-CS-Res-SPs released more slowly than the resveratrol solution and had a certain sustained-release effect. Irritation and cell biology studies have shown that it is safe and non-irritating, non-toxic to cells and capable of entering the cell nucleus to function. Pharmacokinetic studies have shown that β-CD-CS-Res-SPs can prolong ocular retention and improve bioavailability. Compared with the resveratrol solution, the bioavailability is increased by 2.71 times. **Conclusion** The prepared β-CD-CS-Res-SPs have a high encapsulation efficiency,

收稿日期: 2025-05-25

基金项目: 天津市科技计划项目: 芪参益气滴丸的新质生产力培育(24ZXZKSY00030); 企事业单位委托科技项目: 六味地黄丸(异型小蜜丸)体外释放及药代动力学研究(HX2024-136)

作者简介: 宋赛赛(2002—),女,硕士研究生,研究方向为中药新剂型。E-mail: 18236567286@163.com

*通信作者: 刘睿(1980—),女,教授,硕士生导师,主要从事中药新剂型研究。Tel: (022)59791812 E-mail: liurui@tjutcm.edu.cn

appropriate particle size and ζ potential. It is a safe, non-irritating and sustained-release nano-drug delivery system, which can prolong the retention time of drugs in front of the cornea and thus improve bioavailability.

Key words: β -cyclodextrin; chitosan; surface modification; spanlastics; resveratrol; glaucoma; *in vitro* release; irritant; cell uptake; pharmacokinetics; sustained release

青光眼是一种普遍存在的不可逆神经退行性疾病,其特征是进行性视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cell, RGC) 丧失,导致视神经头损伤和视野缺损^[1-2]。随着全球人口老龄化,预计到2040年,青光眼患者人数将达到1.118亿^[3]。RGC的丧失在一定程度上与高眼压有关。目前,治疗青光眼的主要方法是降低眼压。然而,在相当多的患者中,即使眼压降至正常或较低水平,也无法阻止视网膜神经节细胞和视神经损伤的进程。近年来,研究发现内质网应激引起的视网膜各层细胞受损、死亡,以及线粒体分裂异常介导的视网膜神经节细胞泛凋亡在青光眼发病机制中扮演重要角色,可作为青光眼的潜在治疗靶点^[4-5]。此外,青光眼主要通过局部滴入的方式给药,然而传统的滴眼液由于眼部的诸多屏障使其生物利用度不足5%^[6]。因此,对于青光眼非眼压依赖的神经退行性机制和传统滴眼液的不足,探索具有抗氧化应激的天然活性成分和开发新型纳米制剂有望成为新的治疗手段。

白藜芦醇 (resveratrol) 是一种天然酚类物质,具有抗氧化、抗凋亡、抗炎、抗血管生成和舒张血管的特性。它可以预防老年黄斑变性、糖尿病视网膜病变、青光眼等眼部疾病^[7]。在治疗青光眼方面,白藜芦醇通过抗氧化应激保护小梁网细胞,从而维持小梁网正常的房水引流,降低眼压^[8]。白藜芦醇能改善RGC的能量代谢,稳定线粒体膜电位,抑制RGC-5细胞凋亡^[9]。在视神经损伤的小鼠模型中,长期服用白藜芦醇可以保护受损视网膜神经节细胞的树突^[10]。总之,白藜芦醇在保护视网膜小梁网的正常功能、维持正常眼压、改善RGC的新陈代谢、减少RGC的死亡和保护视神经功能等方面具有一定的作用。然而,由于其水溶性低、生物利用度差,白藜芦醇的生物活性和临床应用受到限制。

脂质体及其衍生的各种囊泡结构给药系统作为一种提高给药后药物生物利用度的方法,受到了广泛关注^[11-12]。在脂质体的双层膜上添加不同的添加剂对脂质体的性质和功能有很大影响。Spanlastics (SPs) 是一种新型表面活性剂弹性纳米囊泡,由非离子表面活性剂或边缘活化剂自组装而成^[13]。局部给药可增强药物渗透性,包裹亲水性或

亲脂性药物并具有缓释作用,从而达到提高药物疗效、改善患者依从性和减少不良反应的目的^[14]。特别是在青光眼的治疗方面,SPs展现出独特优势:SPs的弹性纳米囊泡结构能够更好地穿透角膜屏障,减少药物流失;缓释特性可减少给药频率,改善患者依从性;同时通过表面修饰可进一步提高SPs的黏附性、渗透性或靶向性,为青光眼地长期治疗提供更优选择。

近年来,带正电荷的纳米载体眼内给药系统得到了广泛的发展,它可以延长药物在眼表面的滞留时间,并通过静电作用改善药物的渗透性^[15]。据报道,壳聚糖 (chitosan, CS) 容易与其他药物载体结合,其黏膜黏附性可延长药物与眼睛的接触时间^[16]。此外,它还能松弛细胞间的紧密连接,通过细胞旁和细胞内途径提高药物的渗透性^[17]。然而,由于CS在泪液中的溶解度较低,其广泛应用受到了限制。 β -环糊精 (β -cyclodextrin, β -CD) 具有亲水性的外表面和亲油性的中心腔体。由于疏水相互作用,可容纳多种亲脂性药物,从而提高药物的溶解度和稳定性^[18-19]。在壳聚糖大分子链中引入 β -CD单元(即 β -CD-CS)不仅能提高药物的载药量,还能降低纳米制剂的毒性和副作用,改善其生物相容性^[20]。同时,凭借壳聚糖的黏膜黏附性,还能提高药物的生物利用度^[21]。因此,本研究开发一种由 β -CD-CS修饰的新型白藜芦醇纳米囊泡 (β -CD-CS-Res-SPs),以提高白藜芦醇的生物利用度。 β -CD-CS-Res-SPs通过形态、粒径、多分散指数 (polydispersity index, PDI)、 ζ 电位等进行表征。进行了体外释放、细胞毒性和细胞摄取、组织切片、药动学等体内外研究全面评估其安全性和有效性,为开发新型眼部纳米药物递送体系提供理论依据与实践支撑。

1 仪器与材料

1.1 仪器

MS-H280-Pro LED型数显加热型磁力搅拌器,上海沪毅龙实验设备有限公司; Waters e2695型高效液相色谱仪,沃特世科技(上海)有限公司; SB-5200DTD型超声波清洗器,宁波新芝生物科技股份有限公司; Zetasizer Nano-Zs型激光粒径测定仪,英国马尔文仪器有限公司; JEM1200-EX型透射电

子显微镜 (TEM), 日本电子株式会社; 3500 Sirius 型差示扫描量热仪, 德国 Netzsch 公司; IRTraler-100 型傅里叶变换红外光谱仪, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; FDU-2110 型冷冻干燥机, 日本东京理化器械株式会社; SW-CJ-2FD-II 型超净台, 苏州安泰空气技术有限公司; Eclipse Ts2 型荧光倒置显微镜, 尼康株式会社; IX70 型倒置生物显微镜, 奥林巴斯公司; Spark 型多功能酶标仪, 德国 Tecan Austria GmbH 公司; Thermo 型二氧化碳培养箱, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; LC-LX-L50C 型台式低速冷冻离心机, 上海力辰邦西仪器科技有限公司。

1.2 材料与试剂

白藜芦醇, 分析对照品, 批号 M17HB178543, 经 HPLC 测定质量分数 $\geq 98.0\%$, 上海源叶生物科技有限公司; 无水乙醇, 分析纯, 朝阳赫成化学试剂有限公司; 白藜芦醇原料药, 质量分数 99.0% , 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; Span 60、聚山梨酯 80, 上海麦克林生化科技股份有限公司; β -CD-CS, 西安瑞禧生物科技有限公司; 甲醇(色谱纯)、甲酸(色谱级)、香豆素-6、DMEM 培养基、胎牛血清, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 二甲基亚砜 (DMSO), 北京索莱宝科技有限公司; 罗丹明 B (RhB) 溶液, 10 mmol/L (以 DMSO 为溶剂), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 人视网膜色素上皮细胞系 (ARPE-19), 武汉普诺赛生命科技有限公司; 泪液检测滤纸条 (Schirmer's 条), 天津市晶明新技术开发有限公司。

1.3 动物

新西兰大白兔, 共 12 只, 雄性, 3~6 月龄, 体质量 $2.5\sim 3.0 \text{ kg}$, 由天津裕达实验动物养殖有限公司提供, 许可证编号: SCXK (津) 2021-0001, 饲养于天津中医药大学实验动物中心。实验前 24 h 允许自由饮食并进行眼部检查, 以确保它们没有任何眼部疾病。

所有动物实验均经天津中医药大学动物伦理委员会审查批准, 批准号 TCM-LAEC2020062。

2 方法与结果

2.1 β -CD-CS-Res-SPs 的制备

采用乙醇注入法制备。取适量 Span 60 和 3.55 mg 白藜芦醇完全溶解于适量的无水乙醇中, 为有机相。取适量聚山梨酯 80 溶于水中, 为水相。其中, Span 60-聚山梨酯 80 比例为 $8:2$, 总非离子表

面活性剂总量为 120 mg , 有机相-水相比比例为 $1:8$ 。将水相置于温度为 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 、转速为 800 r/min 的磁力搅拌器中, 用注射器以 1 mL/min 的体积流量缓慢注入有机相, 搅拌至有机溶剂完全挥发。然后进行水浴超声, 即得到白藜芦醇纳米囊泡 (Res-SPs)。按照上述步骤, 不加白藜芦醇制备空白纳米囊泡, 即空白 SPs。再将制备好的 Res-SPs 逐滴加入 β -CD-CS 溶液 (β -CD-CS 为处方量的 0.1%) 中, 孵育 1 h , 即得到 β -CD-CS-Res-SPs。

2.2 β -CD-CS-Res-SPs 包封率和载药量测定方法的建立

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Diamonsil C_{18} (2) ($250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$); 流动相为甲醇- 0.2% 甲酸水溶液 ($45:55$); 检测波长为 325 nm ; 体积流量为 1 mL/min ; 柱温为 $30 \text{ }^\circ\text{C}$; 进样量为 $10 \mu\text{L}$ 。

2.2.2 对照品溶液制备 将精密称量的 1.01 mg 的白藜芦醇对照品加入到含有适量甲醇的 10 mL 量瓶中, 超声使其溶解, 冷却后定容, 得到白藜芦醇对照品溶液, 冷藏备用。

2.2.3 线性关系考察 精密吸取对照品溶液, 用甲醇稀释成不同质量浓度梯度 (203.00 、 101.50 、 50.75 、 25.38 、 12.69 、 6.34 、 $3.17 \mu\text{g/mL}$) 的白藜芦醇溶液, 通过“2.2.1”项下色谱条件进行测定, 建立其标准曲线。以对照品质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 进行线性回归拟合, 得白藜芦醇标准曲线回归方程为 $Y=67.225X+95.430$, $R^2=0.9998$, 结果表明白藜芦醇在质量浓度 $3.17\sim 203.00 \mu\text{g/mL}$ 线性关系良好, 均符合定量分析要求。

2.2.4 包封率和载药量的测定 吸取 1.0 mL β -CD-CS-Res-SPs 溶液和适量的甲醇添加到 10 mL 的量瓶中, 超声破乳 30 min 并冷却和定容, 用 $0.22 \mu\text{m}$ 的微孔滤膜滤过后进行测定, 计算药物的总含量。另外, 将 β -CD-CS-Res-SPs 溶液放于超滤管内, 将转速设置为 10000 r/min , 离心半径为 10 cm , 离心 10 min , 测定滤出液中的药物的含量, 根据公式 (1) 和 (2), 计算包封率和载药量。

$$\text{包封率} = (\text{总药物质量} - \text{游离药物量}) / \text{总药物质量} \quad (1)$$

$$\text{载药量} = \text{包载药物质量} / (\text{包载药物质量} + \text{辅料总质量}) \quad (2)$$

2.3 β -CD-CS-Res-SPs 的表征

2.3.1 包封率和载药量的测定 根据“2.2”项下方法测定 β -CD-CS-Res-SPs 的包封率和载药量分别为

(92.78±2.81)%和(2.37±0.12)% (n=3)。

2.3.2 TEM 观察 将 β-CD-CS-Res-SPs 用超纯水稀释, 取适量滴到含碳膜的铜网上, 待样品风干后, 采用 TEM 观察纳米囊泡的形貌并拍照。结果如图 1 所示, β-CD-CS-Res-SPs 为较为圆整的囊泡状。

2.3.3 粒径和 ζ 电位的测定 将 β-CD-CS-Res-SPs 用超纯水稀释后, 通过粒径测定仪进行测定。结果如图 2 所示, 其粒径为 (301.40±2.57) nm, PDI 为 0.265±0.010 和 ζ 电位为 (33.50±0.72) mV。

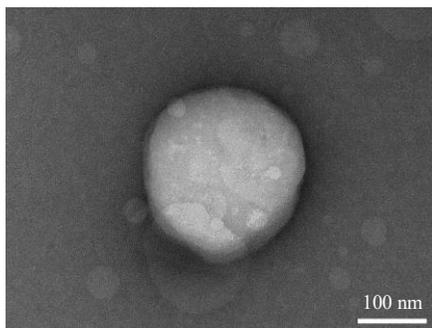


图 1 β-CD-CS-Res-SPs 的 TEM 图
Fig. 1 TEM image of β-CD-CS-Res-SPs

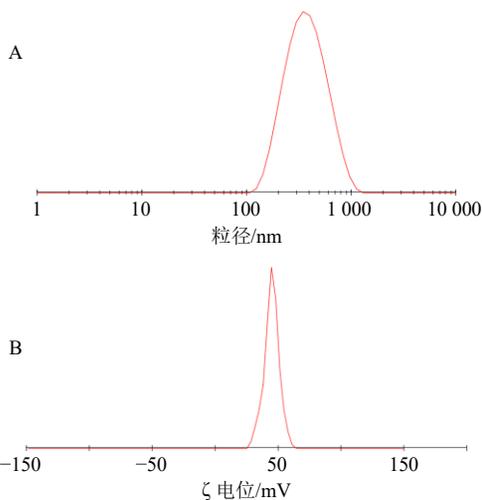
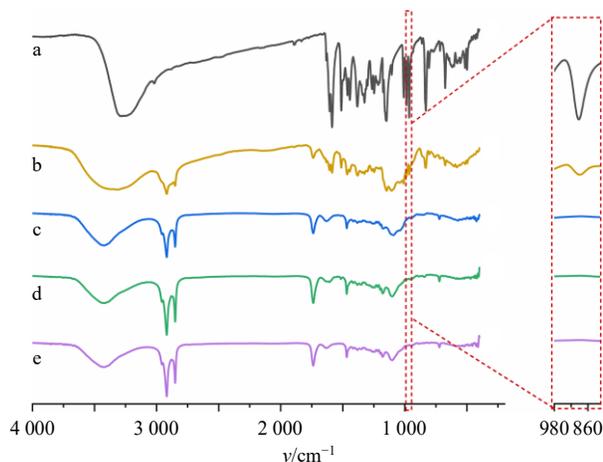


图 2 β-CD-CS-Res-SPs 的粒径 (A) 和 ζ 电位 (B) 分布图
Fig. 2 Particle size (A) and ζ potential (B) distribution of β-CD-CS-Res-SPs

2.3.4 傅里叶变换红外光谱 (Fourier transform infrared spectrum, FT-IR) 分析 按 Res-SPs 的处方比例, 精确称取白藜芦醇与辅料, 于研钵中充分研磨混合, 制得其物理混合物。按“2.1”方法制备空白 SPs、Res-SPs 和 β-CD-CS-Res-SPs, 并用冷冻干燥机将其制成冻干粉。分别称量白藜芦醇原料药、白藜芦醇与辅料的物理混合物、空白 SPs 冻干物、Res-SPs 冻干物、β-CD-CS-Res-SPs 冻干物, 与完全干燥的溴化钾粉末进行压片处理 (样品-溴化钾 1:

150), 通过 FT-IR 检测试样的红外吸收光谱, 波数为 4 000~400 cm⁻¹。研究结果如图 3 所示。通过对对比 5 种红外光谱图, 发现白藜芦醇分子结构上的反式双键在 975 cm⁻¹ 处有 1 个尖锐的特征吸收峰, 而在药物与辅料的物理混合物中, 此特征吸收峰依然存在, 说明药物与各辅料的物理混合物只是简单的叠加, 还保有药物的特性。而空白 SPs、Res-SPs、β-CD-CS-Res-SPs 在 975 cm⁻¹ 处并无特征吸收峰, 且红外吸收光谱基本相同, 说明药物已被包载于纳米囊泡中。



a-白藜芦醇原料药; b-白藜芦醇原料药与辅料的物理混合物; c-空白 SPs; d-Res-SPs; e-β-CD-CS-Res-SPs; 图 4 同。
a-resveratrol bulk drug; b-physical mixture of resveratrol bulk drug and excipients; c-blank SPs; d-Res-SPs; e-β-CD-CS-Res-SPs; same as figure 4.

图 3 各样品的 FT-IR 图

Fig. 3 FT-IR spectra of various samples

2.3.5 差示扫描量热法 (differential scanning calorimetry, DSC) 分析 取“2.3.4”项下各个样品, 用空白铝锅作为对照, 设置加热速率为 10 °C/min, 温度扫描范围为 30~350 °C, 记录数据进行分析。结果如图 4 所示, 白藜芦醇原料药的 DSC 谱图中, 可见其在 270.45 °C 处出现 1 个白藜芦醇的吸热峰; 空白 SPs 冻干粉中, 其吸热峰出现在 57.64 °C 处; 物理混合物中均存在上述单标的特征吸热峰; Res-SPs 冻干粉和 β-CD-CS-Res-SPs 中, 其图谱中只存在制剂特征吸热峰, 而无药物峰出现, 说明药物被包封于纳米囊泡中。

2.4 β-CD-CS-Res-SPs 的体外释放研究

正常人体泪液 pH 值为 6.5~7.6, 呈微酸性至中性, PBS (pH 6.8) 常作为眼用制剂的释放介质。此外, 为了增强白藜芦醇的溶解度, 在前期研究基础上, 于 PBS 溶液中加入 2% 聚山梨酯 80 以确保漏

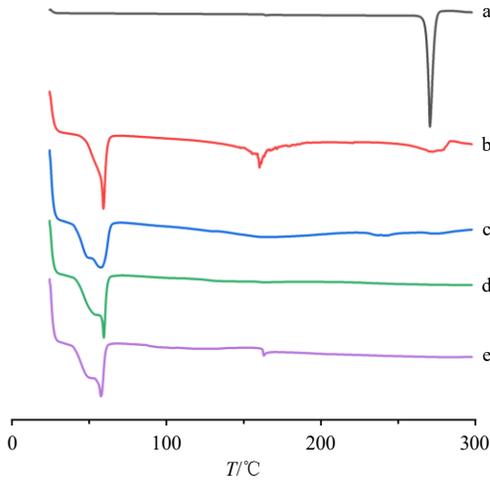


图 4 各样品的 DSC 分析图

Fig. 4 DSC analysis diagram of various samples

槽条件的建立。因此,选择 2%聚山梨酯 80-PBS(pH 6.8)溶液作为释放介质,通过动态透析法研究 β -CD-CS-Res-SPs 的体外释药特性。分别精密量取 4.0 mL 含相同浓度药物的白藜芦醇溶液、Res-SPs 溶液、 β -CD-CS-Res-SPs 溶液置于透析袋中,将两端用透析袋夹夹住,并置于含 50 mL 释放介质的烧杯中,置于温度为 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 的恒温振荡器上。分别于不同时间点取样 1 mL,同时补加等温同体积的释放介质。样品溶液过 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜,按照“2.2.1”项下色谱条件测定含量。按照公式(3)和(4)计算药物的累积释放量(Q_n)和累积释放率(F)。

$$Q_n = C_n V_0 + \sum_{i=1}^{n-1} C_i V_i \quad (3)$$

$$F = Q_n / C_0 \quad (4)$$

Q_n 是每个时间点的累积释放量, F 为各时间点的累积释放率, C_n 为第 n 个采样时间点的测量药物质量浓度, V_0 为溶出介质总体积, V_i 为每次取样体积, C_i 为第 i 个取样时间点

表 1 Res-SPs 和 β -CD-CS-Res-SPs 中白藜芦醇的体外释放模型

Table 1 *In vitro* release models of resveratrol from Res-SPs and β -CD-CS-Res-SP

模型	Res-SPs	β -CD-CS-Res-SPs
零阶	$Y = 0.0483t + 0.3564, R^2 = 0.7680$	$Y = 0.0471t + 0.3009, R^2 = 0.7836$
一阶	$Y = 0.7566(1 - e^{-0.7816t}), R^2 = 0.9759$	$Y = 0.6958(1 - e^{-0.7041t}), R^2 = 0.9783$
Weibull	$\ln \ln[1/(1-Y)] = 0.4527 \ln t - 0.5448, R^2 = 0.9958$	$\ln \ln[1/(1-Y)] = 0.4662 \ln t - 0.7569, R^2 = 0.9687$
Higuchi	$Y = 0.2123t^{1/2} + 0.1814, R^2 = 0.8871$	$Y = 0.2044t^{1/2} + 0.1353, R^2 = 0.9187$
Ritger-Peppas	$Y = 0.4518t^{0.2538}, R^2 = 0.9785$	$Y = 0.3851t^{0.2882}, R^2 = 0.9632$

2.5 细胞实验

2.5.1 细胞毒性 ARPE-19 细胞在添加 10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的 DMEM 培养基中于 37°C 、5% CO_2 下培养。采用 CCK-8 对 ARPE-19 细胞评价白藜芦醇溶液、Res-SPs 和 β -CD-CS-Res-

实测药物质量浓度, C_0 为总药物质量浓度

以采样时间作为横坐标(X), F 作为纵坐标(Y)绘制体外释放曲线,结果如图 5 所示,白藜芦醇溶液的扩散速度非常快,其 F 在 2 h 内为 $(75.40 \pm 3.27)\%$,在此期间白藜芦醇呈初始爆发性释放,8 h 后白藜芦醇从药物溶液中 F 为 $(97.31 \pm 0.24)\%$ 。推测是因为刚开始透析袋内外白藜芦醇浓度差异较大,白藜芦醇易扩散释放,而随着药物释放透析袋内外浓度差变小,白藜芦醇的释放速率变小。Res-SPs、 β -CD-CS-Res-SPs 中白藜芦醇的释放在前 2 h 内药物释放较快,约有 55% 的药物被释放,3 h 后持续缓慢释放。与白藜芦醇溶液相比, β -CD-CS-Res-SPs 的释放速率明显变缓,说明药物被纳米囊泡包裹后具有缓释作用。

体外释放模型结果见表 1,通过比较 R^2 值,Res-SPs 中白藜芦醇的释放符合 Weibull 模型。 β -CD-CS-Res-SPs 中白藜芦醇的释放符合 First-Order 模型。

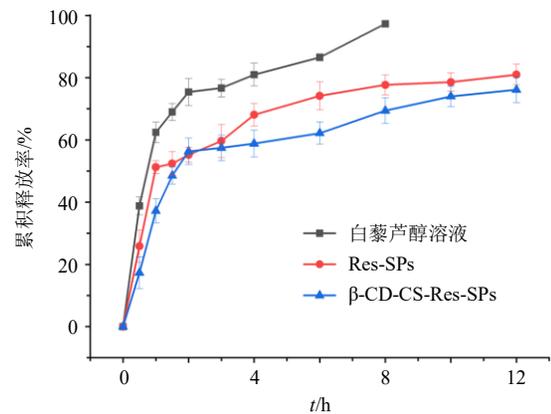


图 5 不同制剂中白藜芦醇的体外释放结果

Fig. 5 *In vitro* release results of resveratrol in different preparations

SPs 的体外细胞毒性。细胞接种于 96 孔板 (1×10^4 个/孔),孵育 24 h,然后加入不同质量浓度(0.5、1.0、5.0、10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的样品溶液,孵育 12 h。结果如表 2 所示,当白藜芦醇质量浓度达到 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,Res-SPs 和 β -CD-CS-Res-SPs 组的细胞

表 2 不同给药组对 ARPE-19 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of different administration groups on viability of ARPE-19 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	细胞存活率/%			
	0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	1.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	5.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	10.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
对照	100.00 \pm 2.62	100.00 \pm 2.62	100.00 \pm 2.62	100.00 \pm 2.62
白藜芦醇溶液	114.17 \pm 9.27	107.35 \pm 10.17	105.09 \pm 7.45	105.42 \pm 5.00
Res-SPs	103.35 \pm 2.27	105.83 \pm 1.59	98.07 \pm 3.08	72.50 \pm 1.68*
β -CD-CS-Res-SPs	99.38 \pm 3.30	103.00 \pm 4.52	111.30 \pm 2.23	85.57 \pm 1.77*

与对照组比较: * $P < 0.05$.

* $P < 0.05$ vs control group.

活力分别为 73%和 86%, 细胞活力下降。而当白藜芦醇质量浓度在 0.5~5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 各组细胞活力均在 98%以上, 对细胞活力无明显影响, 可用于细胞摄取实验。

2.5.2 细胞摄取 按照“2.1”项下制备方法, 用 RhB 染料取代白藜芦醇制备被标记的纳米囊泡, 即 RhB-SPs 和 RhB- β -CD-CS-SPs。将细胞与 RhB 溶液、RhB-SPs 和 RhB- β -CD-CS-SPs 孵育 2 h。用 PBS 洗涤细胞 3 次, 去除未吸收的纳米制剂。4%多聚甲醛固定细胞, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DAPI 染色。固定曝光时间后记录细胞形态。超声采集细胞, 检测其荧光强度。

为了验证纳米制剂的细胞摄取, 在荧光显微镜下观察细胞样品。从图 6 和表 3 可以看出, RhB-SPs

和 RhB- β -CD-CS-SPs 被细胞摄取, 说明药物可以通过细胞质进入细胞核发挥作用。RhB-SPs 和 RhB- β -CD-CS-SPs 的摄取分别是 RhB 溶液的 1.22 和 5.97 倍 ($P < 0.01$)。

2.6 眼部刺激性检查

分别在 3 只实验兔的右眼滴入 β -CD-CS-Res-SPs, 左眼滴入生理盐水作为阴性对照。每天给药 4 次, 每次间隔 4 h, 连续 5 d。在耳静脉注射空气杀死家兔后, 仔细去除角膜、虹膜、结膜和前房角, 将所有组织固定在 4%中性甲醛溶液中。对各组眼组织进行石蜡切片和苏木精-伊红 (HE) 染色, 光镜下观察有无炎症细胞浸润、出血和坏死。选取有代表性的领域并拍照。不同眼部组织病理切片如图 7

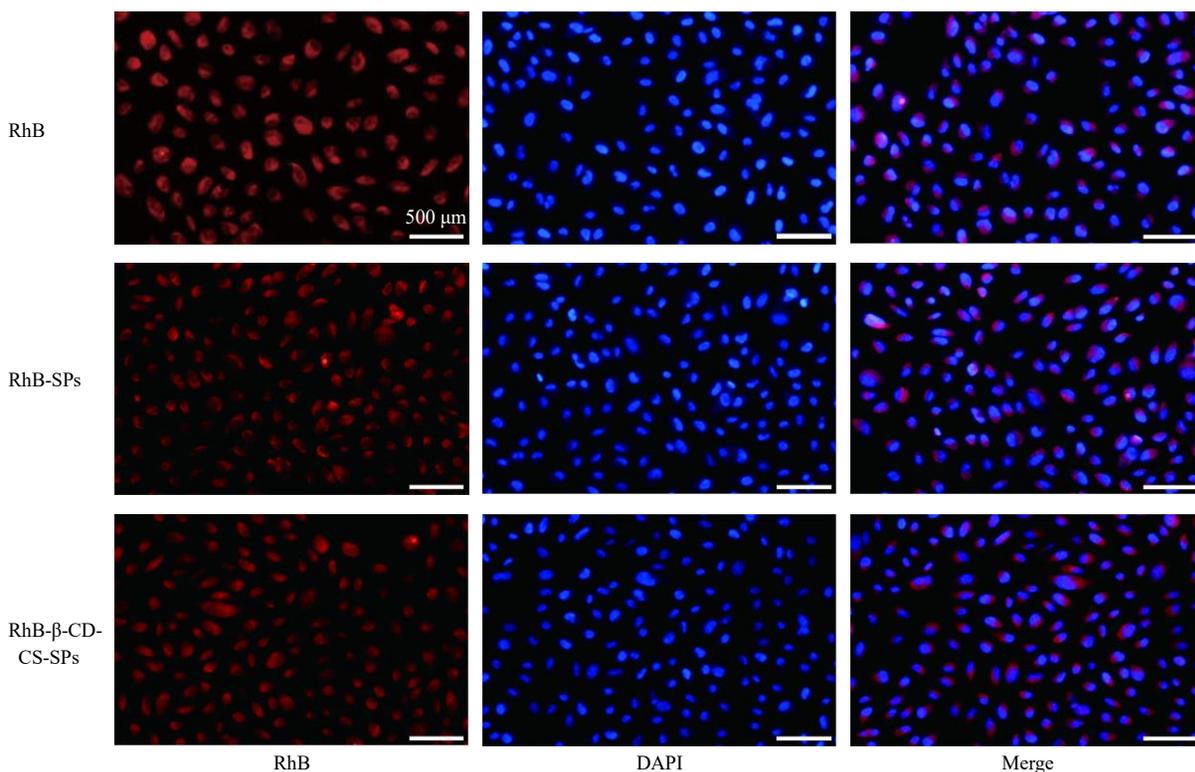


图 6 ARPE-19 细胞对 Res-SPs 和 β -CD-CS-Res-SPs 的摄取情况

Fig. 6 Uptake of Res-SPs and β -CD-CS-Res-SPs by ARPE-19 cells

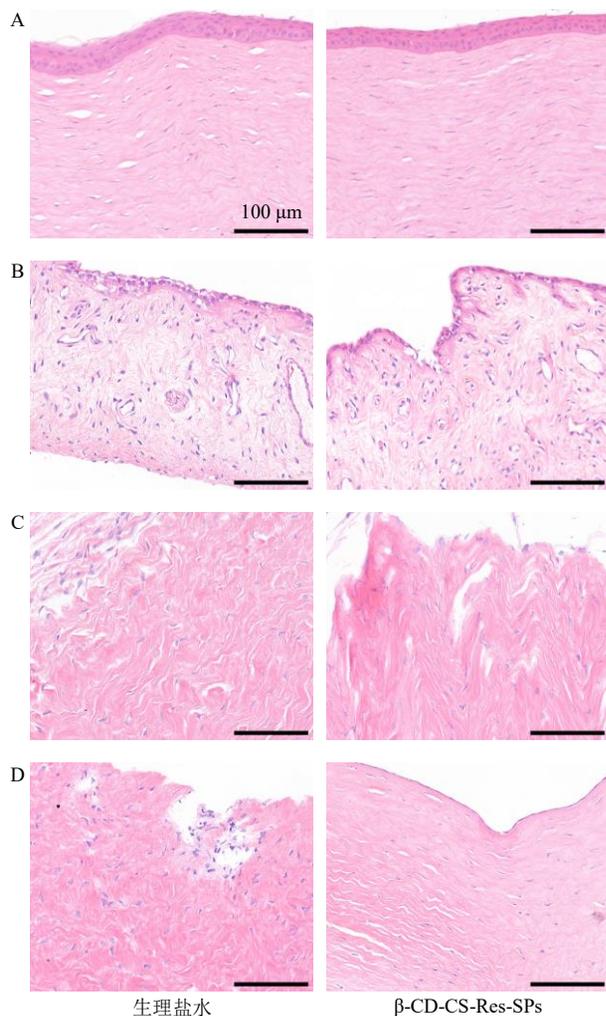
表 3 RhB、RhB-SPs 和 RhB-β-CD-CS-SPs 组的荧光强度
($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 3 Fluorescence intensities of RhB, RhB-SPs and RhB-β-CD-CS-SPs groups ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	荧光强度
RhB	7 441 ± 532
RhB-SPs	9 064 ± 218
RhB-β-CD-CS-SPs	44 394 ± 2 674**

与 RhB 组比较: ** $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs RhB group.



A-角膜; B-虹膜; C-结膜; D-前房角。

A-cornea; B-iris; C-conjunctiva; D-anterior chamber angle.

图 7 眼组织病理切片

Fig. 7 Pathological sections of ocular tissues

所示。β-CD-CS-Res-SPs 组与对照组比较无明显炎症反应,角膜上皮层完整,未见明显水肿或炎性细胞聚集;虹膜组织无充血肿胀;结膜下组织血管正常,无纤维蛋白渗出;前房角结构清晰,无病变。结果表明,该制剂无眼部刺激性,进一步证实了 β-CD-CS-Res-SPs 的安全性。

2.7 泪液消除动力学研究

2.7.1 线性关系考察 按照“2.2.1”项下色谱条件,建立白藜芦醇在泪液中的标准曲线。用甲醇精密配置 1 μg/mL 的白藜芦醇母液。分别依次配制不同质量浓度梯度的白藜芦醇对照品溶液,然后用 Schirmer’s 滤纸条吸取家兔的空白泪液后,立即放入 1.5 mL 离心管中,依次向各个含有空白泪液的离心管加入白藜芦醇对照品溶液,氮气吹干,加入甲醇复溶,稀释成 0.1~10.0 μg/mL 的一系列质量浓度的白藜芦醇对照品溶液。涡旋 5 min,超声萃取 30 min,15 000 r/min 离心(离心半径 10 cm)20 min,HPLC 法测定,得到含有家兔泪液的白藜芦醇标准曲线,计算得其线性回归方程为 $Y = 64.976 X - 1.361 4, r = 0.999 3$,可见白藜芦醇在 0.1~10.0 μg/mL 线性关系良好。

2.7.2 Schirmer’s 试纸法 将实验兔分为 3 组,每组 3 只,将含有相同质量浓度药物的白藜芦醇对照品溶液、Res-SPs 溶液和 β-CD-CS-Res-SPs 溶液滴入兔眼结膜囊,手动闭眼 20 s。在滴注后的不同时间段将干燥的 Schirmer’s 条放入下眼睑,采集泪液样本。记录取样前后泪液条的增重情况,并计算泪液收集量。将取样后的 Schirmer’s 条放入离心管中,加入甲醇提取药物。离心后,用 HPLC 测定上清液中的药物含量,按照公式(5)计算泪液中的药物质量浓度。

$$C_0 = C \times V_0 \times \rho / \Delta m \quad (5)$$

C_0 为泪液中药物的初始质量浓度, C 为甲醇稀释后的药物质量浓度, V_0 为加入甲醇的体积, ρ 为泪液密度 (1 g/mL), Δm 为采集泪液前后 Schirmer’s 条的质量变化 ($m_2 - m_1$)

通过绘制泪液中药物质量浓度与采样时间点的关系,得到泪液的药动学曲线如图 8 所示。在 15 min 时,白藜芦醇溶液组中白藜芦醇的质量浓度为 6.00 μg/mL, Res-SPs 组和 β-CD-CS-Res-SPs 组中白藜芦醇质量浓度分别为 11.73、14.14 μg/mL,均高于白藜芦醇溶液组。在 4 h 时,β-CD-CS-Res-SPs 组仍能维持一定的药物质量浓度,而白藜芦醇溶液组几乎检测不到药物质量浓度。

泪液药动学参数见表 4。β-CD-CS-Res-SPs 中白藜芦醇的 $t_{1/2}$ 为白藜芦醇溶液组的 4.12 倍 ($P < 0.05$), $AUC_{0-\infty}$ 值是白藜芦醇溶液组的 2.71 倍 ($P < 0.01$), $MRT_{0-\infty}$ 值是白藜芦醇溶液组的 4.44 倍 ($P < 0.01$); Res-SPs 组中白藜芦醇的 $AUC_{0-\infty}$ 值是白藜芦醇溶液组的 1.71 倍 ($P < 0.05$)。由此可见,β-CD-

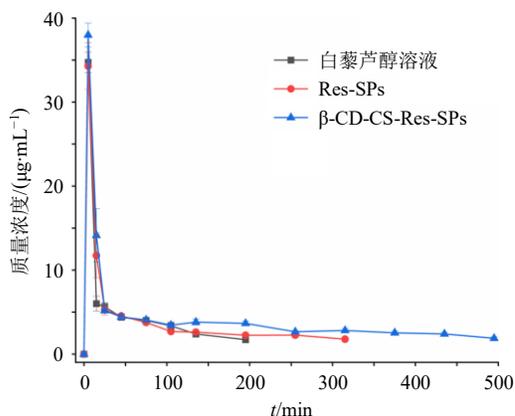


图 8 滴眼给药后白藜芦醇的泪液药动力学结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Tear pharmacokinetic results of resveratrol after ocular instillation ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表 4 滴眼给药后白藜芦醇的泪液药动力学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Tear pharmacokinetic parameters of resveratrol after ocular instillation ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

参数	单位	白藜芦醇溶液	Res-SPs	β -CD-CS-Res-SPs
C_{max}	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	34.73 ± 1.21	34.29 ± 3.41	38.64 ± 1.42
t_{max}	min	5.00 ± 0.00	5.00 ± 0.00	5.00 ± 0.00
$t_{1/2}$	min	110.29 ± 12.49	317.40 ± 54.00	$453.91 \pm 196.30^*$
$MRT_{0\sim t}$	min	59.65 ± 0.66	$100.20 \pm 2.66^{**}$	$176.51 \pm 4.21^{**}$
$MRT_{0\sim\infty}$	min	128.80 ± 17.27	376.63 ± 69.33	$571.25 \pm 214.76^{**}$
$AUC_{0\sim t}$	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}$	894.95 ± 30.84	$1\ 201.17 \pm 69.22^{**}$	$1\ 904.95 \pm 27.24^{**}$
$AUC_{0\sim\infty}$	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}$	$1\ 170.75 \pm 87.71$	$1\ 998.04 \pm 138.45^*$	$3\ 172.70 \pm 643.17^{**}$

与白藜芦醇溶液比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs resveratrol solution.

生物利用度、细胞摄取等的关键参数。粒径过小可能导致被快速清除，而过大则会增加刺激风险，研究表明 50~400 nm 的粒径适用于眼部给药^[24]。PDI 是衡量粒径均一的重要参数，PDI 越小说明纳米囊泡大小越均匀，一般纳米制剂的 $PDI < 0.3$ ^[25]。 ζ 电位直接影响制剂的物理稳定性，绝对值较高，颗粒间静电排斥力较强，可以防止颗粒聚集，提高储存稳定性，且带正电荷的纳米制剂能够与带负电的细胞膜结合，从而延长滞留时间^[26]。本研究制备的 β -CD-CS-Res-SPs 粒径大小合适、分布均匀，表面带正电荷，能增加与角膜的黏附时间。

体外释放介质的正确选择可显著提高体外释放数据对体内行为的预测价值。为了满足“漏槽条件”，本研究以 2% 聚山梨酯 80-PBS 溶液 (pH 6.8) 作为释放介质。根据体外释放结果，制剂组比药物溶液组相比释放缓慢，说明纳米囊泡的包封作用使其具有一定的缓释作用。此外，体外释放曲线拟合结果显示，Res-SPs 和 β -CD-CS-Res-SPs 的拟合结果不一致，推测 β -CD-CS 的修饰作用影响 Res-SPs

CS 的修饰可显著延长药物在泪液中的滞留时间，从而提高其生物利用度。

3 讨论

眼部疾病的治疗一直是一个巨大的挑战，因为眼部存在多种动态和静态屏障，使得药物难以被输送到治疗部位^[22]。局部给药是目前眼部给药的主要方式之一，具有使用方便、无创、成本低等优点。但局部给药时，药物停留时间短，角膜渗透性差。有文献报道，普通滴眼液只有不到 5% 的药物能穿透角膜进入房水^[23]，生物利用度较低。Sps 是一种弹性纳米囊泡，因其独特的柔韧性和穿透性，在眼科给药领域展现出显著优势。

纳米制剂的粒径和电位是决定其物理稳定性、

的释放，使二者呈现异步释放。Res-SPs 中白藜芦醇的释放符合 Weibull 模型，说明其释药过程分为快速、缓慢释药 2 个阶段，符合双相动力学特征^[27]。而 β -CD-CS-Res-SPs 中白藜芦醇的释放符合一级动力学模型，药物的释放速率随时间递减，有助于设计温和且持久的药物释放系统^[28]。

通过药动力学研究 β -CD-CS-Res-SPs 在泪液中滞留时间的延长，可以预测药物从制剂中释放并通过角膜渗入体内的可能性。药动力学结果显示，不同组 $MRT_{0\sim\infty}$ 和 $AUC_{0\sim\infty}$ 值相比， β -CD-CS-Res-SPs $>$ Res-SPs $>$ 白藜芦醇溶液，说明纳米制剂能够延长药物在角膜前的滞留时间，从而提高眼内生物利用度。Res-SPs 和 β -CD-CS-Res-SPs 生物利用度的差异也可以看出 β -CD-CS 修饰的纳米制剂在角膜前的滞留时间更长，推测其原因可能有以下几点： β -CD-CS 属于阳离子材料，使纳米囊泡带有正电荷，能够与角膜表面的负电荷相结合，从而延长眼表滞留时间；壳聚糖具有黏性，可以黏附在角膜表面而减少流失增加滞留时间；纳米囊泡本身的掩蔽性使其具

有缓释作用，且合适的粒径更容易渗透入眼内发挥作用^[29-30]。

综上所述，在本研究开发的 β -CD-CS-Res-SPs 作为眼用递药系统，其科学价值主要体现在以下 2 方面：一是纳米囊泡突破眼部生理屏障的优势。眼部存在复杂的生理屏障（如角膜的紧密相连、结膜的血管吸收、泪液冲刷和眨眼反射等）严重限制了药物向眼内的递送，导致传统眼用制剂滞留时间短、生物利用度低。而 SPs 自身的纳米级弹性结构能够有效穿透眼部屏障，提升药物的递送效率。同时，SPs 对药物的包蔽作用也使其具有缓释效果，减少给药频率。二是 β -CD-CS 的修饰优化了药物释放和滞留性能。通过在 SPs 的表面修饰阳离子材料 β -CD-CS，可借助静电作用增强其与带负电的角膜粘蛋白结合，大幅提升 SPs 的眼表黏附性。体外释放研究及体内药动学研究结果表明 β -CD-CS 的修饰优化了药物释放动力学，使其从双相释放转变为更持久的缓释模式，而且还能延长药物在眼表的滞留时间，提高药物生物利用度。

因此， β -CD-CS 作为一种安全无刺激的黏附性材料，特别适用于眼用纳米制剂的表面修饰，制备的 β -CD-CS-Res-SPs 能够有效提高白藜芦醇的生物利用度，为开发高效、长效的眼部递药系统奠定了理论基础，也为青光眼的治疗提供了一些思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Beykin G, Norcia A M, Srinivasan V J, *et al.* Discovery and clinical translation of novel glaucoma biomarkers [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2021, 80: 100875.
- [2] Almasieh M, Wilson A M, Morquette B, *et al.* The molecular basis of retinal ganglion cell death in glaucoma [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2012, 31(2): 152-181.
- [3] Tham Y C, Li X, Wong T Y, *et al.* Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: A systematic review and meta-analysis [J]. *Ophthalmology*, 2014, 121(11): 2081-2090.
- [4] Chen X Y, Shi C R, He M H, *et al.* Endoplasmic reticulum stress: Molecular mechanism and therapeutic targets [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 352.
- [5] Zeng Z, You M L, Fan C, *et al.* Pathologically high intraocular pressure induces mitochondrial dysfunction through Drp1 and leads to retinal ganglion cell PANoptosis in glaucoma [J]. *Redox Biol*, 2023, 62: 102687.
- [6] Wang Y R, Wang C H. Novel eye drop delivery systems: Advance on formulation design strategies targeting anterior and posterior segments of the eye [J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14(6): 1150.
- [7] Bola C, Bartlett H, Eperjesi F. Resveratrol and the eye: Activity and molecular mechanisms [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2014, 252(5): 699-713.
- [8] Luna C, Li G R, Liton P B, *et al.* Resveratrol prevents the expression of glaucoma markers induced by chronic oxidative stress in trabecular meshwork cells [J]. *Food Chem Toxicol*, 2009, 47(1): 198-204.
- [9] Chen S D, Fan Q, Li A, *et al.* Dynamic mobilization of PGC-1 α mediates mitochondrial biogenesis for the protection of RGC-5 cells by resveratrol during serum deprivation [J]. *Apoptosis*, 2013, 18(7): 786-799.
- [10] Lindsey J D, Duong-Polk K X, Hammond D, *et al.* Protection of injured retinal ganglion cell dendrites and unfolded protein response resolution after long-term dietary resveratrol [J]. *Neurobiol Aging*, 2015, 36(5): 1969-1981.
- [11] 2019 Blindness and Vision Impairment Collaborators G B D, Vision Loss Expert Group of the Global Burden of Disease Study. Trends in prevalence of blindness and distance and near vision impairment over 30 years: An analysis for the global burden of disease study [J]. *Lancet Glob Health*, 2021, 9(2): e130-e143.
- [12] Chen S, Hanning S, Falconer J, *et al.* Recent advances in non-ionic surfactant vesicles (niosomes): Fabrication, characterization, pharmaceutical and cosmetic applications [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2019, 144: 18-39.
- [13] Kakkar S, Kaur I P. Spanlastics: A novel nanovesicular carrier system for ocular delivery [J]. *Int J Pharm*, 2011, 413(1/2): 202-210.
- [14] Farghaly D A, Aboelwafa A A, Hamza M Y, *et al.* Topical delivery of fenoprofen calcium via elastic nano-vesicular spanlastics: Optimization using experimental design and *in vivo* evaluation [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2017, 18(8): 2898-2909.
- [15] Dubey V, Mohan P, Dangi J S, *et al.* Brinzolamide loaded chitosan-pectin mucoadhesive nanocapsules for management of glaucoma: Formulation, characterization and pharmacodynamic study [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 152: 1224-1232.
- [16] Pontillo A R N, Detsi A. Nanoparticles for ocular drug delivery: Modified and non-modified chitosan as a promising biocompatible carrier [J]. *Nanomedicine*, 2019, 14(14): 1889-1909.
- [17] Dave R S, Goostrey T C, Ziolkowska M, *et al.* Ocular drug delivery to the anterior segment using nanocarriers: A mucoadhesive/mucopenetrative perspective [J]. *J Control*

- Release*, 2021, 336: 71-88.
- [18] Koester L S, Guterres S S, Le Roch M, *et al.* Ofloxacin/beta-cyclodextrin complexation [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2001, 27(6): 533-540.
- [19] Varan G, Varan C, Erdoğan N, *et al.* Amphiphilic cyclodextrin nanoparticles [J]. *Int J Pharm*, 2017, 531(2): 457-469.
- [20] Chen Y Z, Huang Y K, Chen Y, *et al.* Novel nanoparticles composed of chitosan and β -cyclodextrin derivatives as potential insoluble drug carrier [J]. *Chin Chemical Lett*, 2015, 26(7): 909-913.
- [21] Yuan Z T, Ye Y J, Gao F, *et al.* Chitosan-graft- β -cyclodextrin nanoparticles as a carrier for controlled drug release [J]. *Int J Pharm*, 2013, 446(1/2): 191-198.
- [22] Gote V, Ansong M, Pal D. Prodrugs and nanomicelles to overcome ocular barriers for drug penetration [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2020, 16(10): 885-906.
- [23] Lanier O L, Manfre M G, Bailey C, *et al.* Review of approaches for increasing ophthalmic bioavailability for eye drop formulations [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2021, 22(3): 107.
- [24] Cimino C, Sánchez López E, Bonaccorso A, *et al.* *In vitro* and *in vivo* studies of ocular topically administered NLC for the treatment of uveal melanoma [J]. *Int J Pharm*, 2024, 660: 124300.
- [25] Badran M M, Mady M M, Ghannam M M, *et al.* Preparation and characterization of polymeric nanoparticles surface modified with chitosan for target treatment of colorectal cancer [J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 95: 643-649.
- [26] Yu F, Zheng M, Zhang A Y, *et al.* A cerium oxide loaded glycol chitosan nano-system for the treatment of dry eye disease [J]. *J Control Release*, 2019, 315: 40-54.
- [27] 陈永顺, 杨斌. 马来酰亚胺修饰的柠檬苦素纳米粒的制备、表征及其口服药动学研究 [J]. *中草药*, 2025, 56(2): 487-498.
- [28] 丘炜桢, 卢光照, 俞千雪, 等. 小白菊内酯脂质体的制备工艺优化及体外评价 [J]. *中草药*, 2025, 56(8): 2799-2810.
- [29] Zhang T T, Jiao X Y, Peng X R, *et al.* Non-invasive drug delivery systems mediated by nanocarriers and molecular dynamics simulation for posterior eye disease therapeutics: Virtual screening, construction and comparison [J]. *J Mol Liq*, 2022, 363: 119805.
- [30] Vedadghavami A, Zhang C Z, Bajpayee A G. Overcoming negatively charged tissue barriers: Drug delivery using cationic peptides and proteins [J]. *Nano Today*, 2020, 34: 100898.

[责任编辑 郑礼胜]