

# 环孢霉素 A 壳聚糖纳米微粒在兔眼玻璃体腔内药代动力学研究

石春和, 兰小川

作者单位:(212000)中国江苏省镇江市第一人民医院眼科  
作者简介:石春和,主任医师,研究方向:玻璃体视网膜病。  
通讯作者:兰小川,男,主治医师,研究方向:眼视光、玻璃体视网膜病。oculistlan@qq.com  
收稿日期:2012-02-20 修回日期:2012-05-07

## Pharmacokinetics of CyA-loaded CS nanoparticles in vitreous of rabbit

Chun-He Shi, Xiao-Chuan Lan

Department of Ophthalmology, Zhenjiang First People's Hospital, Zhenjiang 212000, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Xiao-Chuan Lan, Department of Ophthalmology, Zhenjiang First People's Hospital, Zhenjiang 212000, Jiangsu Province, China. oculistlan@qq.com

Received: 2012-02-20 Accepted: 2012-05-07

### Abstract

• AIM: To evaluate the pharmacokinetics of cyclosporine A (CyA)-loaded chitosan (CS) nanoparticles in rabbits after intravitreal injection.

• METHODS: Experimental study on pharmacokinetics of sustained release drug in vitreous. Twenty rabbits were intravitreally injected CyA-loaded CS nanoparticles. Liquid vitreous was aspirated at the time of 1 day, 2, 3, 5, 7, 9, 11, 14, 21, 28 days postoperatively for determination of CyA concentration by high-performance liquid chromatography.

• RESULTS: 81% of CyA was released *in vitro* from CyA-loaded CS nanoparticles after 14 days. The level of CyA ranged from 448.5 ng/mL to 1237.7 ng/mL during 28 days in vitreous cavities.

• CONCLUSION: Intravitreal injection of CyA-loaded CS nanoparticles leads to a sustained release of CyA with a high bioavailability. CS nanoparticles is a potentially promising delivery system for the posterior segment diseases.

• KEYWORDS: chitosan; nanoparticles; cyclosporine A; intravitreal injection; pharmacokinetics

Shi CH, Lan XC. Pharmacokinetics of CyA-loaded CS nanoparticles in vitreous of rabbit. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(6): 1038-1040

### 摘要

目的:评价环孢霉素 A (CyA)壳聚糖纳米微粒在兔眼玻璃体腔内的药物代谢动力学。

方法:取实验兔 20 只分别在植入药后 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11, 14, 21, 28d, 各取 2 只兔(含 4 眼),抽取玻璃体用高效液相

色谱法检测 CyA 的药物浓度。

结果: CyA 壳聚糖纳米微粒在体外 14d 内药物累积释放比率为 81%。在注入玻璃体腔内 28d 均可检测到 CyA, 11d 时为最高浓度 1237.7 ng/mL, 最小浓度在第 28d 测为 448.5 ng/mL。

结论: CyA 壳聚糖纳米微粒在玻璃体腔能缓慢释放 CyA, 有很高的生物利用度。壳聚糖纳米微粒有望成为一种新型的载体, 用于治疗眼后节疾病。

关键词: 壳聚糖; 纳米微粒; 环孢霉素 A; 玻璃体腔注射; 药代动力学

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2012.06.07

石春和, 兰小川. 环孢霉素 A 壳聚糖纳米微粒在兔眼玻璃体腔内药代动力学研究. 国际眼科杂志 2012;12(6): 1038-1040

### 0 引言

环孢霉素 A (CyA) 是一种防治增生性玻璃体视网膜病变的药物, 口服或注射给药, 该药的全身毒副作用会比较明显, 而且在视网膜表面的微环境中难以达到治疗水平。玻璃体腔内注射给药, 其生物半衰期较短, 眼内清除快, 所以需要缓释制剂。本实验采用自行制备的壳聚糖纳米微粒包载 CyA, 在不同时间点测定其在体外和兔眼玻璃体腔内药物浓度, 计算药代动力学参数, 以便为临床应用环孢霉素 A 防治增生性玻璃体视网膜病变提供实验依据。

### 1 材料和方法

1.1 材料 CyA 壳聚糖纳米微粒(自行制备), 环孢霉素(中国药品生物制品检定所, 含量 98.8%), 甲醇(德国 MERCK, 色谱纯), 乙腈(中国医药集团上海试剂公司, 分析纯), 透析袋(上海绿鸟科技发展有限公司, 25mm, MWCO14 000); 高速离心机(美国, Beckman Coulter 公司, Avanti J-25I), 高效液相色谱仪(美国, Agilent 1100 Series, 四元泵, 在线脱气), 恒温振荡箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂, SPX-100B-D 型), 真空干燥箱(郑州长城科工贸有限公司, SHB-III A)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 体外药物释放实验

1.2.1.1 透析过程 用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)作为释药介质, 取 CyA 壳聚糖纳米微粒 5 份, 每份均用 10mL PBS 溶散后, 定量转移至经处理过的透析袋中并紧密封口, 然后悬置于盛有 50mL 磷酸缓冲液(pH=7.4)的 100mL 锥形瓶中, 塞紧, 将锥形瓶放置于 37℃ 恒温振荡器上, 以 60r/min 恒温恒速振荡。

1.2.1.2 CyA 浓度测定 在实验后第 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 12.0h; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14d 吸取释药介质 5mL, 同时补加等量 5mL PBS。用高效液相色谱法测定 CyA 含量。

1.2.2 兔眼玻璃体腔药物释放实验

1.2.2.1 玻璃体腔注药 在兔眼颞上方角膜缘后 2mm 用 1mL 一次性注射器向玻璃体中央刺入,在直接眼底镜直视下注入 0.1mL CyA 壳聚糖纳米粒(含 CyA 1mg)。眼底镜检查有无玻璃体出血等并发症。术后双眼结膜囊内涂 5g/L 金霉素眼膏。

1.2.2.2 玻璃体样品的处理 在植入药后 1,2,3,5,7,9,11,14,21,28d,各取 2 只兔(含 4 眼),处死后随即取出眼球低温(-40℃)冻存 24h 后分离出固状玻璃体,置入刻度试管,解冻后记录玻璃体体积,然后加入 500/L 甲醇 0.5mL 匀浆,高速离心(15000r/min) 20min,取上清液冻存待测。

1.2.2.3 玻璃体腔 CyA 药物浓度的高效液相检测 (1) 色谱条件:色谱柱(瑞士 Spherigel C18):5μm,150mm×4.6mm;流动相:甲醇/水=80/20;流速:1mL/min;检测波长:210nm;柱温:70℃;进样量:20μL。(2)标准曲线的绘制:取空白玻璃体溶液加入 CyA 标准溶液,配制成相当于 CyA 浓度分别为:100,200,400,600,800,1200,1600,2000ng/mL 的样品,按样品处理项下操作,进样测定,以 CyA 峰高(H)对浓度比值(C)进行线性回归。(3)回收率实验:取空白玻璃体分别加入 CyA 标准溶液,使其浓度分别为 50,200,600ng/mL。按样品处理项下操作,重复测定 5 个标本,连续测定 3d,计算回收率。(4)精密度的实验:取空白玻璃体分别加入 CyA 标准溶液,使其浓度分别为 50,200,600ng/mL 按样品处理项下操作,重复测定 5 个标本,连续测定 3d,测定后计算日内及日间精密度。(5)药时曲线分析:根据标准曲线方程,算出相应药物浓度再根据玻璃体体积,换算成原玻璃体液(稀释前)药物浓度,最后取药物浓度平均值,作药时曲线分析。

统计学分析:数据处理采用 STATA 7.0 统计软件包进行线性回归分析,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 体外药物释放实验 CyA 壳聚糖纳米微粒呈现缓慢释放,14d 内药物累积释放比率为 81%。各时间点所取样品的药物浓度见表 1,并由此描绘出体外缓释曲线(图 1)。

2.2 玻璃体腔 CyA 药物浓度的高效液相色谱检测

2.2.1 标准曲线 根据高效液相色谱(λ=210nm)结果(表 2),CyA 出峰时间在 7.8min 左右。以 CyA 浓度(C)对峰高(H)进行线性回归,得标准曲线方程:H=0.0654C-0.9785(r=0.9978,图 2)。

2.2.2 回收率实验 根据结果(表 3),回收率满足检测要求。

2.2.3 精密度实验 根据结果(表 4),精密度满足检测要求。

2.2.4 药时曲线分析 CyA 在 CyA 壳聚糖纳米微粒注入玻璃体 28d 均可检测到,其药时曲线见图 3。显示 11d 时为最高浓度 1237.7ng/mL,最小浓度在第 28d 测为 448.5ng/mL(表 5)。

3 讨论

3.1 壳聚糖 CyA 纳米微粒的体外释放 对于可降解的载药纳米微粒,药物的释放速率和以下几个因素有关:(1)药物和聚合物之间的相互作用力;(2)药物从聚合物中扩散的能力和速率;(3)纳米微粒的本体降解速率。因此可降解纳米微粒药物释放过程主要是由扩散和降解这两种过程共同控制。当微粒中药物扩散的速度大于其融蚀分解的速度时,释放方式主要是扩散;相反,当药物扩散速度

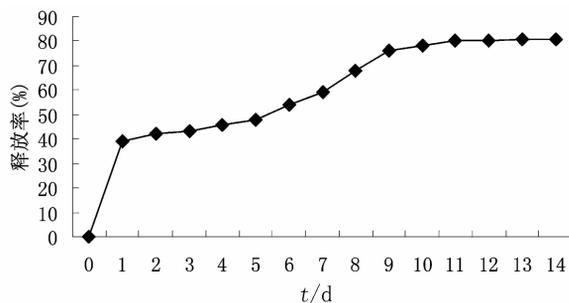


图 1 环孢霉素 A 壳聚糖纳米微粒体外缓释曲线。

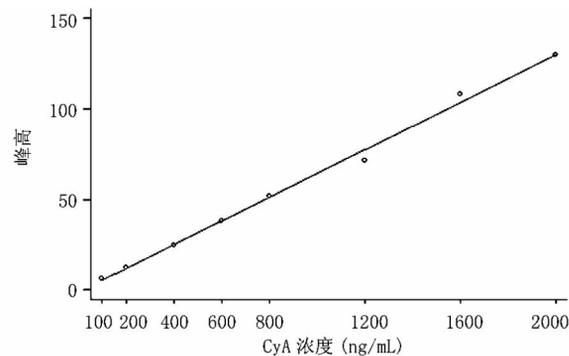


图 2 CyA 标准曲线图。

表 1 各时间点所取样品的药物浓度及释放率

时间(d)	浓度(μg/mL)	释放率(%)
1	2.54	39
2	2.74	42
3	2.80	43
4	3.00	46
5	3.13	48
6	3.52	54
7	3.85	59
8	4.43	68
9	4.96	76
10	5.09	78
11	5.22	80
12	5.22	80
13	5.22	80
14	5.28	81

表 2 标准曲线结果

CyA 浓度(ng/mL)	峰高
100	6.4
200	12.8
400	24.9
600	38.5
800	51.7
1200	71.4
1600	108.4
2000	129.6

表 3 回收率实验

CyA 浓度(ng/mL)	实测浓度(ng/mL)	回收率(%)
50	48.2±4.56	97
200	192.3±10.12	96
600	585.2±16.87	98

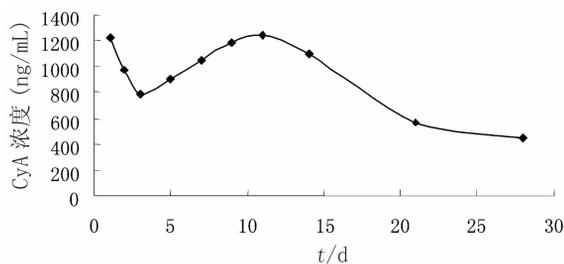


图3 CyA 玻璃体腔药时曲线。

表4 精密度实验

CyA 浓度 (ng/mL)	日内精密度 (n=5)		日间精密度 (n=15)	
	测定浓度 (ng/mL)	相对标准差	测定浓度 (ng/mL)	相对标准差
50	46.1±5.52	12.0	47.3±6.36	13.4
200	200.2±13.93	7.0	197.5±16.97	8.6
600	506.5±21.6	4.3	504.2±27.1	5.4

表5 各时间点玻璃体腔的平均药物浓度 (ng/mL, n=40)

1d	2d	3d	5d	7d	9d	11d	14d	21d	28d
1215.6	972.8	783.2	895.3	1046.8	1178.4	1237.7	1094.8	564.3	448.5

小于微粒融蚀分解速度时,释放方式主要为分解。释放过程中经常出现初期的大剂量释放,称为“突释现象”。其原因主要是吸附在微球表面或通过比较弱的键与微球连接的药物在较短的时间内脱落而造成的,而不是微球中包载的药物。在突释现象过后,随着药物的逐步释放,一般会有一个指数级的延迟,接下来的纳米微粒中药物释放一般遵循一级动力学<sup>[1]</sup>。

根据我们的实验结果,释放曲线可以分为三个阶段:突释、扩散、降解。在前面一部分曲线陡直释药迅速,第1d 累计释药量达39%,突释效应显著,后部分曲线平缓,释放缓慢。第一阶段为突释,时间为1d内,其原因可能是载药纳米微粒表面结合的药物分子和介质存在着较强的相互作用,从表面脱落,不需要溶解而直接释放出来。第二阶段为扩散。第1~9d内由于聚合物溶蚀,药物从聚合物的网状结构中以扩散的方式释放。第三阶段为降解。第9d后,药物因聚合物降解而释放,致使微粒水溶性孔道增多,微粒疏松。在该阶段药物释放受降解和扩散同时控制,药物体外释放曲线平缓。14d后,药物释放基本完全,药物释放率维持在81%。实验结果表明 CyA 壳聚糖纳米微粒具有明显的缓释作用。

**3.2 CyA 壳聚糖纳米微粒的玻璃体腔药代动力学** 国内外学者对 CyA 眼组织药代动力学研究由于动物模型、检测方法、给药方式和药物剂型不同,加之眼组织结构的复杂性,获得的结果各有不同。

Rodriguez 等对家兔玻璃体内注射 CyA 纳米微粒进行了研究<sup>[2]</sup>,纳米微粒的共聚物为 PLGA,含有9mg CyA。结果玻璃体内的 CyA 浓度在5d 时为44.2ng/mL,10d 时为31ng/mL,血中未检测出 CyA,未发现眼部毒性。CyA 纳米微粒玻璃体内注射给药可使 CyA 在玻璃体内缓慢释放,避免了毒性峰值,并延长了持续时间。

Enyedi 等<sup>[3]</sup>在兔玻璃体腔植入非生物降解聚乙烯醇(PVA)和乙烯醋酸乙烯酯(EVA)为载体的0.1mg CyA 缓释制剂,玻璃体药物浓度为60ng/mL。晶状体、巩膜、角膜、虹膜、房水浓度分别为0.16~0.39,0.02~0.05,0.05~0.10,0.05~0.12,0.01~0.02μg/mL,并持续10wk。

Pearson 等<sup>[4]</sup>研究5mg CyA 缓释制剂(PVA 和 EVA 为

载体)玻璃体腔植入,可以持续释放6mo,玻璃体维持了500ng/mL的局部药物浓度。晶状体、巩膜、角膜、虹膜浓度分别为3~4,0.5~1.5,0.5~1.5,0.5~1μg/mL。

Jaffe 等<sup>[5]</sup>在兔葡萄膜炎动物模型眼玻璃体腔植入 PVA 为载体的5mg CyA 缓释制剂,结果 CyA 可以在玻璃体内持续释放6mo,并维持228~1258ng/mL的治疗浓度,而外周血的大多未检出 CyA,极少数血液标本可测药物浓度均小于26ng/mL。

Pearson 等(1996)研究了玻璃体给药的清除速度,CyA 10μg 和1μg 兔眼玻璃体腔注射给药后药物在玻璃体内的浓度经时过程符合一级动力学过程,动力学方程分别为  $y=1.750-0.58x$ ,  $y=-1.17-0.15x$ ,拟合度均大于0.99;半衰期分别为10.8h 和4.2h,而分布容积分别为1.7mL 和3.2mL。分析结果认为晶状体组织药物浓度的饱和使得高剂量组半衰期的延长与分布容积的减小,并使组织与玻璃体药量之比由0.11 增至0.69。

在本实验研究中,注药后28d 内玻璃体腔均可检测到 CyA。根据所检测的玻璃体腔药物浓度描绘的药物浓度-时间曲线(图3),可以看出 CyA 壳聚糖纳米微粒注入第1d 起即获得初始药物浓度1215.6ng/mL,然后持续3d 下降至783.2ng/mL。3d 后药物浓度开始上升,在第11d 达到最高药物浓度1587.4ng/mL,之后逐渐下降,第28d 浓度为448.5ng/mL。

从药物浓度的变化趋势可以看出,CyA 壳聚糖纳米微粒在眼玻璃体腔内前后经历了两种释放过程。最初3d 内药物浓度缓慢下降,可能是由于 CyA 壳聚糖纳米微粒表面药物的溶解释放;3d 后药物浓度突然升高,这一过程归因于 CyA 壳聚糖纳米微粒内部药物的崩解释放。说明可生物降解辅料为载体的植入型缓释剂在体内确实有一个溶蚀崩解的过程,开始溶蚀崩解的时间有赖于局部微环境的生化特征,同样的 CyA 壳聚糖纳米微粒在不同的生理部位很有可能得到相差悬殊的释放效果。

CyA 治疗增生性玻璃体视网膜病变的眼内有效药物浓度尚无定论。实验证明 CyA 对体外培养的人视网膜色素上皮细胞增殖有直接的抑制作用,且在0.25~4μg/mL 之间呈剂量依赖性。已有研究证明 T 淋巴细胞在增生性玻璃体视网膜病变的发生过程中起作用。当 CyA 浓度在10~100ng/mL 时可抑制活化的 T 淋巴细胞释放淋巴因子,当其浓度在100~1000ng/mL 时可抑制 T 细胞的活化。因此可以猜测在本实验中 CyA 壳聚糖纳米微粒缓慢释放 CyA,并保持了较长时间的有效药物浓度。

CyA 壳聚糖纳米微粒在体外和玻璃体腔均能缓慢释放 CyA,壳聚糖纳米微粒有望成为一种新型的药物载体,用于防治增生性玻璃体视网膜病变。

**参考文献**

- Spimath KS, Aminabhavi TM. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug deliver devices. *J Controlled Release* 2001;70(1-2):1-20
- Khawly JA, Saloups P, Hatchell DL, et al. Daunorubicin treatment in a refined experimental model of proliferative vitreoretinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1991;229(5):464-467
- Enyedi LB, Pearson PA, Ashton P, et al. An intravitreal device providing sustained release of cyclosporine and dexamethasone. *Curr Eye Res* 1996;15(5):549
- Pearson PA, Jaffe GJ, Martin DF, et al. Evaluation of a delivery system providing long-term release of cyclosporine. *Arch Ophthalmol* 1996;114(3):311
- Jaffe GJ, Yang CS, Wang XC, et al. Intravitreal sustained-release cyclosporine in the treatment of experimental uveitis. *Ophthalmology* 1998;105(1):46