

论著·基础研究

细胞穿透肽 Penetratin 修饰的眼用脂质体的构建与体外评价

徐楠, 张姝月, 丁雪鹰

上海交通大学附属第一人民医院临床药学科, 上海 200080

[摘要] **目的**·构建一种细胞穿透肽 Penetratin 修饰的眼用脂质体 (Penetratin-modified liposome, Pen-Lip), 并初步评价其通过滴眼给药治疗眼底新生血管疾病的适用性。**方法**·通过二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-N-马来酰亚胺-聚乙二醇 2000 (DSPE-PEG₂₀₀₀-Mal) 和 Penetratin 的加成反应合成共聚物 DSPE-PEG₂₀₀₀-Pen, 再通过薄膜分散法制备 Pen-Lip。利用细胞摄取实验确定修饰脂质体的最佳 Penetratin 比例。用纳米粒度电位仪测定 Pen-Lip 的平均粒径、Zeta 电位和分散系数 (polydispersity index, PDI), 用透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 观察 Pen-Lip 的形态。采用离心法测定 Pen-Lip 装载康柏西普的包封率和载药量。将 Pen-Lip 在 PBS 或含 50% 胎牛血清 PBS 中静置 48 h, 通过粒径变化和 TEM 下形态考察 Pen-Lip 的稳定性。采用 CCK-8 法检测 Pen-Lip 对人眼角膜上皮细胞 (human corneal epithelial cell, HCEC) 和人视网膜色素上皮细胞 (human retinal pigment epithelium, ARPE-19) 的细胞毒性, 利用激光共聚焦显微镜观察 ARPE-19 对 Pen-Lip 的摄取情况。使用扩散池装置评估 Pen-Lip 对离体兔角膜的渗透能力, 计算表观渗透系数 P_{app} , 通过角膜水合值评价载有康柏西普的 Pen-Lip 对角膜组织的毒性。**结果**·修饰脂质体的最佳 Penetratin 比例为 3%。Pen-Lip 的平均粒径为 (148.07±3.51) nm, Zeta 电位为 (5.66±0.91) mV, PDI 为 0.227±0.045。TEM 结果显示其呈外表光滑的球形结构。Pen-Lip 的包封率为 (44.06±3.70)%, 载药量为 (2.84±0.24)%。Pen-Lip 在 PBS 和含 50% 胎牛血清 PBS 中静置 48 h 后粒径无明显变化, TEM 显示分散均匀, 表明其稳定性较好。在 15~500 µg/mL 范围内时, Pen-Lip 对 HCEC、ARPE-19 无明显细胞毒性。与未修饰脂质体相比, ARPE-19 对 Pen-Lip 的摄取能力显著提高 ($P=0.000$)。离体兔角膜渗透实验中, Pen-Lip 的 P_{app} 显著大于未修饰脂质体 ($P=0.000$); 载药 Pen-Lip 处理后的离体兔角膜的水合值与未处理组相比差异无统计学意义 ($P>0.05$)。**结论**·Pen-Lip 在体外具有良好的稳定性、生物相容性、角膜透过能力, 且能够被视网膜细胞摄取, 是一种潜在的能够通过滴眼给药治疗眼底新生血管疾病的药物递送系统。

[关键词] 细胞穿透肽; 脂质体; 康柏西普; 眼底新生血管疾病; 滴眼给药

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2021.05.006 **[中图分类号]** R944 **[文献标志码]** A

Cell-penetrating peptide Penetratin-modified liposomes for ophthalmic application: construction and *in vitro* evaluation

XU Nan, ZHANG Shu-yue, DING Xue-ying

Department of Clinical Pharmacy, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200080, China

[Abstract] **Objective**·To prepare the cell-penetrating peptide Penetratin-modified liposome (Pen-Lip) for ophthalmic application and evaluate its applicability to treat fundus neovascularization diseases through topical instillation. **Methods**·The copolymer DSPE-PEG₂₀₀₀-Pen was synthesized by the addition reaction of DSPE-PEG₂₀₀₀-Mal and Penetratin, and Pen-Lip was then prepared by the thin film dispersion method. The cellular uptake experiment was used to determine the optimal ratio of Penetratin to modify liposomes. The average particle size, Zeta potential and polydispersity index (PDI) of Pen-Lip were characterized by the nano particle size potentiometer, and the morphology of Pen-Lip was observed by using transmission electron microscope (TEM). The encapsulation efficiency and the drug loading of Pen-Lip with conbercept were determined by centrifugation. Pen-lip was incubated in the PBS or the PBS containing 50% fetal bovine serum for 48 h and the stability of Pen-Lip was investigated by the change of particle size and the morphology under TEM. The CCK-8 assay was conducted to detect the cytotoxicity of Pen-Lip to human corneal epithelial cell (HCEC) and human retinal pigment epithelium (ARPE-19), and the uptake of Pen-Lip by ARPE-19 was observed by using laser confocal microscope. The diffusion cell device was used to detect the permeability of Pen-Lip through the isolated rabbit cornea, and the apparent permeability coefficient (P_{app}) was calculated. The toxicity of Pen-Lip with conbercept to the corneal tissue was evaluated by the hydration value. **Results**·The optimal ratio of Penetratin to modify liposomes was 3%. The average particle size of Pen-Lip was (148.07±3.51) nm, the Zeta potential was (5.66±0.91) mV, and the PDI was 0.227±0.045. TEM results showed that Pen-Lip had a smooth spherical structure. The encapsulation efficiency of Pen-Lip was (44.06±3.70)%, and the drug loading was (2.84±0.24)%. The particle size of Pen-Lip did not change significantly and TEM showed uniform dispersion after dispersing in the PBS or the PBS containing 50% fetal bovine serum for 48 h, exhibiting the good stability of Pen-Lip. When Pen-Lip was at the concentration of 15~500 µg/mL, Pen-Lip had no cytotoxicity to HCEC and ARPE-19. Compared with unmodified liposomes, ARPE-19 cells had significantly higher uptake of Pen-Lip ($P=0.000$).

[基金项目] 松江区科技攻关项目 (18sjkjjg); 嘉兴市肿瘤光动力靶向药物研究重点实验室。

[作者简介] 徐楠 (1995—), 女, 硕士生; 电子信箱: nan_xu1105@163.com。

[通信作者] 丁雪鹰, 电子信箱: dingxueying@126.com。

[Funding Information] Key Science and Technology Program of Songjiang District (18sjkjjg); Jiaxing Key Laboratory of Oncological Photodynamic Therapy and Targeted Drug Research.

[Corresponding Author] DING Xue-ying, E-mail: dingxueying@126.com.

[网络首发] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2045.R.20210429.1854.019.html> (2021-04-30 14:18:58)。

In the experiment of rabbit cornea penetration *in vitro*, the P_{app} of Pen-Lip was significantly higher than that of unmodified liposomes ($P=0.000$). There was no statistically significant difference in the hydration value of the rabbit cornea treated with drug-loaded Pen-Lip compared to the untreated group ($P>0.05$). **Conclusion** Pen-Lip has good stability, biocompatibility and corneal permeability *in vitro* and can be taken up by retinal cells, which is a potential ocular drug delivery system to treat fundus neovascularization diseases through topical instillation.

[Key words] cell-penetrating peptide (CPP); liposome; conbercept; fundus neovascularization disease; topical instillation

眼内新生血管性疾病主要位于眼后段, 如年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD) 和糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR), 被认为是导致不可逆视力丧失和失明的主要原因^[1]。临床治疗眼底新生血管的主要方式是玻璃体腔注射生物药物, 如血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 受体融合蛋白康柏西普 (conbercept, Conb)^[2]、阿柏西普^[3]等, 推荐疗程为初始3个月每月给药1次, 之后每3个月给药1次。玻璃体腔注射是一种侵入性较强的给药方式, 反复注射导致患者依从性差, 且容易引发一些眼部并发症, 如白内障形成、高眼压、视网膜脱离^[4]、玻璃体出血和组织损伤等^[5]。因此临床亟需一种安全有效、使用方便、患者依从性高的给药方案治疗眼底新生血管疾病。

现有相关文献^[6-8]报道, 滴眼给药可作为玻璃体腔注射治疗眼底疾病的替代方案。与小分子药物相比, 生物药物分子量大, 亲水性强, 角膜上皮和泪膜等生物屏障阻碍了药物渗透, 导致到达眼底的药物浓度很低。改善滴眼所给药物对眼部屏障的透过性是目前亟需攻克的问题。细胞穿透肽 (cell-penetrating peptide, CPP) 是由几个或十几个氨基酸残基组成的多肽, 具有将多种大分子物质递送入细胞的能力, 如树枝状聚合物^[9]、脂质体 (liposome)^[10]、胶束^[11]和蛋白质^[12]等。Penetratin是一种源于果蝇触角基因同源结构域的CPP, 可通过滴眼给药到达眼后部视网膜, 其角膜穿透能力是对照肽的87.5倍, 是其他CPP的16~31倍^[13], 在眼部渗透性和生物相容性方面表现出优异的性能。

脂质体由包裹在水相周围的磷脂双分子层组成, 参与细胞膜相似, 可增强药物的角膜渗透能力。Cheng等^[14]研究发现壳聚糖包衣脂质体滴眼液可有效穿透角膜治疗视网膜黄斑水肿, Lai等^[15]发现脂质体滴眼给药后可有效改善大鼠光氧化性视网膜损伤。脂质体载药性能优良、生物相容性高、易于表面修饰、临床转化性强, 是一种很有前景的眼部药物载体。目前尚未见Penetratin修饰的脂质体 (Penetratin-modified liposome, Pen-Lip) 滴眼给药治疗眼后部疾病的报道。本研究构建了一种眼用Pen-Lip, 并对其理化性质和体外行为进行了表征及评价, 以期实现非侵入性治疗眼底新生血管疾病。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与仪器

Penetratin [(HS-) CRQIKIWFQNRRMKWKK] 购自上海强耀生物科技有限公司, 蛋黄卵磷脂 (egg phosphatidylcholine, ePC)、胆固醇 (cholesterol, chol)、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-N-马来酰亚胺-聚乙二醇2000 (DSPE-PEG₂₀₀₀-Mal)、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000 (DSPE-PEG₂₀₀₀) 购自上海艾伟特医药科技有限公司, Conb眼用注射液购自成都康弘药业集团股份有限公司, DMEM/F12培养基、MEM培养基、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、青霉素-链霉素溶液 (双抗)、非必需氨基酸 (non-essential amino acid solution, NEAA) 购自美国Gibco公司, 人IgG ELISA试剂盒购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司, CCK-8试剂盒购自上海翊圣生物科技有限公司。绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP)、尼罗红 (Nile red, Nr) 染料购自北京索莱宝科技有限公司。其他试剂均为分析纯。

旋转蒸发仪购自上海大研仪器有限公司, Zetasizer ZS90型纳米粒度电位仪购自英国Malvern公司, JEM-2010型透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 购自日本JEOL公司, 低温高速冷冻离心机购自德国Eppendorf公司, DMIL荧光显微镜购自德国Leica公司, 激光扫描共聚焦显微镜购自日本Olympus公司, 超净工作台购自淀山湖净化设备仪器厂, MS-H-PRO磁力搅拌器购自大龙兴创实验仪器有限公司, MULTISKANMK3酶标仪购自美国Thermo公司。

1.2 细胞株与细胞培养

人源角膜上皮细胞 (human corneal epithelial cell, HCEC) 购自北京北纳创联生物技术研究院, 人视网膜色素上皮细胞 (human retinal pigment epithelium, ARPE-19) 由上海市第一人民医院孙晓东课题组馈赠。

HCEC在含有15%FBS、1%双抗、1%NEAA的MEM培养基中培养, ARPE-19在含有10%FBS、1%双抗的DMEM/F12培养基中培养, 均置于条件为37℃, 5% CO₂的培养箱中。定期在显微镜下观察细胞生长情况。待细胞生长融合度达80%时进行传代, 传至第3~8代时进行

细胞实验。

1.3 DSPE-PEG₂₀₀₀-Pen 共聚物的合成

DSPE-PEG₂₀₀₀-Pen 由 DSPE-PEG₂₀₀₀-Mal 的马来酰亚胺基团和 Penetratin 半胱氨酸残基上的巯基通过 1,4 加成反应所得^[16]。将 DSPE-PEG₂₀₀₀-Mal 和 Penetratin 溶解于氯仿中,滴加三乙胺作为催化剂,轻轻振摇。该混合溶液在

充氮条件下于室温避光反应 24 h, 然后进行过滤, 所得滤液通过旋转蒸发仪进行蒸发得到固体结晶。固体结晶用氯仿重新溶解后过滤, 再次通过旋转蒸发仪蒸发进行纯化操作。产物于 -20 °C 下储存直至使用。合成原理如图 1 所示, 碱催化剂夺取半胱氨酸巯基上的活泼氢, 硫负离子进攻 β 不饱和酮的 β 位, 经 1,4 共轭加成和酮式烯醇式互变异构过程, 定量地生成 C-S-C 偶联产物。

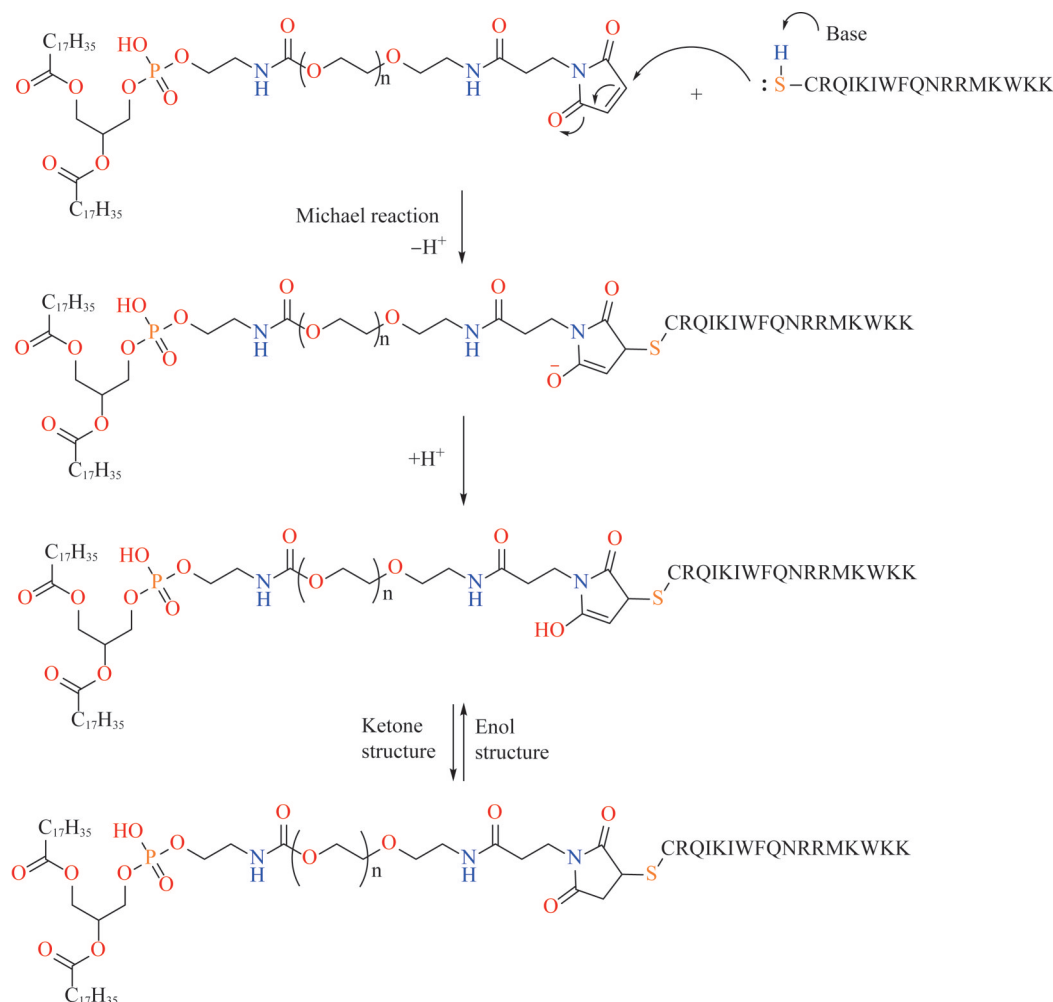


图1 DSPE-PEG₂₀₀₀-Pen 共聚物的合成示意图

Fig 1 Schematic diagram of synthesis of copolymer DSPE-PEG₂₀₀₀-Pen

1.4 脂质体的制备

空白脂质体 (Lip) 通过薄膜分散法制备^[17]。称取 10.0 mg ePC、2.5 mg Chol、3.0 mg DSPE-PEG₂₀₀₀ 溶解于装有二氯甲烷和甲醇 (体积比为 2 : 1) 混合溶液的试管里, 并转移至茄型瓶中; 使用旋转蒸发仪在 35 °C 条件下进行减压蒸发除去有机溶剂, 瓶壁上可形成一层均匀的脂质薄膜; 继续真空干燥 2 h 除去残余的有机溶剂。将 10 mL PBS 溶液 (0.1 mmol/L, pH 7.4) 加入茄型瓶中, 快速振荡, 使 PBS 溶液与脂质薄膜发生水合作用; 然后在冰上进行水浴超声使脂质薄膜从瓶壁上完全脱落, 继

续避光搅拌 1 h; 得到的乳白色液体先后通过 0.45 μ m、0.22 μ m 微孔滤膜进行过滤, 重复 3 次后获得粒径合适的 Lip, 4 °C 避光保存备用。

Pen-Lip 制备方法同上, 区别在于将 DSPE-PEG₂₀₀₀ 替换为 DSPE-PEG₂₀₀₀-Pen。Lip/GFP、Pen-Lip/GFP、Lip/Conb、Pen-Lip/Conb 的制备方法同上, 区别在于将水合介质 PBS 溶液替换为含 GFP 或 Conb 的 PBS 溶液。Nr 标记的脂质体制备方法同上, 在旋转蒸发之前加入适量 Nr 于有机试剂中, 重复后续步骤即得到 Lip/Nr、Pen-Lip/Nr。上述脂质体制备完成后均于 4 °C 避光保存备用。

1.5 Penetratin 修饰比例的确定

通过细胞摄取实验来确定修饰脂质体的最佳 Penetratin 修饰比例^[18]。将 HCEC 按 2×10^5 /孔的密度接种于 12 孔细胞培养板中, 在培养箱中培养 24 h 后用 PBS 润洗 2 遍, 将 1%、3%、5% Pen (DSPE-PEG₂₀₀₀-Pen 浓度分别 1%、3%、5%) 修饰的 Pen-Lip/Nr 溶液加入 12 孔板中。细胞与 Pen-Lip/Nr 孵育 4 h 后, 用含 1 000 IU/mL 肝素的 PBS 于冰上洗涤 3 次, 去除细胞外结合的 Pen-Lip/Nr, 将细胞浸泡在每孔 1 mL 的 PBS 中, 并立即使用倒置荧光显微镜系统观察细胞对于 Pen-Lip/Nr 的摄取情况。用 Image J 软件对平均荧光强度进行半定量分析。

1.6 脂质体的表征检测

取 100 μ L 新鲜制备的 Lip、Pen-Lip 溶液, 稀释 10 倍后放入测量池中, 用动态光散射粒径分析仪分析测定平均粒径、Zeta 电位和分散系数 (polydispersity index, PDI)。

用 TEM 观察 Pen-Lip 的形态。镊子小心夹着覆有碳支持膜的铜网, 用吸管吸取新鲜制备的 Pen-Lip 溶液, 滴 1 滴样品至铜网上; 滴液后静置数分钟, 无残留液体时滴加负染色液进行染色; 吸去多余染料, 待铜网自然干燥后即可置入电镜中观察, 设加速电压为 75 kV, 观察并拍照。

采用离心法^[17]间接测定包封率和载药量。将新鲜制备的 Lip/Conb、Pen-Lip/Conb 进行离心 (4 $^{\circ}$ C, 11 250 \times g, 20 min), 上清液用 0.45 μ m 微孔滤膜过滤, 通过 ELISA 试剂盒来测定上清液中 Conb 的浓度。根据以下公式计算包封率和载药量:

$$\text{包封率} = \frac{\text{投入的药物总质量} - \text{上清液中药物的质量}}{\text{投入的药物总质量}} \times 100\%,$$

$$\text{载药量} = \frac{\text{投入的药物总质量} - \text{上清液中药物的质量}}{\text{载药脂质体的总质量}} \times 100\%。$$

1.7 稳定性研究

为了考察脂质体在常规条件和生理条件下的稳定性, 分别以 PBS、含 50%FBS 的 PBS 为介质并测定不同时间点 Lip、Pen-Lip 的粒径大小。将新鲜制备的 Lip、Pen-Lip 分散在 PBS 溶液或含 50%FBS 的 PBS 溶液中, 在预定的时间点 (0 h、1 h、2 h、4 h、8 h、24 h、48 h) 取样测定脂质体的平均粒径, 并在 48 h 后取样拍摄电镜图。

1.8 细胞毒性考察

采用 CCK-8 法对 Lip、Pen-Lip 的细胞毒性进行考察。将 HCEC、ARPE-19 细胞按 5×10^3 /孔的密度接种于 96 孔细胞培养板中, 在培养箱中培养 24 h 后将 Lip、Pen-Lip 用无血清培养基稀释成浓度为 15、30、60、120、250、

500 μ g/mL 的溶液加入 96 孔板中。孵育 24 h 后用 PBS 洗涤 3 次, 加入 100 μ L 含 10% CCK-8 试剂的培养基, 放入培养箱中孵育 1 h。用酶标仪测定各孔在 450 nm 处的吸光度值并计算各浓度处理下的细胞存活率。

1.9 细胞对脂质体摄取情况的检测

在 24 孔板中预先铺上无菌的圆形盖玻片, 将 ARPE-19 细胞按 5×10^4 /孔的密度接种在盖玻片上, 在培养箱中培养 24 h 后, 换无血清培养液培养过夜。用 PBS 润洗 2 遍后, 将含有 Nr 染料、Lip/Nr 或 Pen-Lip/Nr 的无血清培养基加入 24 孔板中。37 $^{\circ}$ C 孵育 3 h 后, 用含 1 000 IU/mL 肝素的 PBS 于冰上洗涤 3 次, 去除细胞外结合的 Nr 染料、Lip/Nr 或 Pen-Lip/Nr。用预冷的 4% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 洗涤 3 次。吸取 10 μ L 含 DNA 结合染料 DAPI 的抗荧光淬灭封片液滴在载玻片上, 小心取出盖玻片, 将有细胞的一面贴在滴有封片液的载玻片上, 避光放置 30 min。使用激光扫描共聚焦显微镜观察细胞对于脂质体的摄取情况。

1.10 离体渗透性和组织毒性检测

使用扩散池装置测定 Pen-Lip/GFP 通过离体兔角膜的渗透性。扩散孔的内径为 10 mm, 扩散面积为 0.785 cm²。通过耳缘静脉注射致死剂量的戊巴比妥钠处死家兔, 摘除眼球, 小心地将角膜 (连同周围约 2 mm 宽度的巩膜) 从眼球中取出, 用 PBS 轻轻冲洗。将角膜水平放置在供体室与受体室之间, 使角膜上皮表面面向供体溶液, 用夹子固定。扩散池中的溶液通过循环加热系统预热并保持在 34 $^{\circ}$ C, 磁力搅拌速度为 100 r/min。供体液分别为 3 mL GFP、Lip/GFP、Pen-Lip/GFP (GFP 浓度为 5 mg/mL), 受体液为等体积 PBS 溶液, 排尽气泡使角膜组织与受体液充分接触。在 4 h 内, 每隔 0.5 h 从受体室中吸取 100 μ L 样品, 然后立即补充等量的 PBS。使用酶标仪检测提取样品中 GFP 的浓度, 并使用如下公式计算相应的表观渗透系数 P_{app} (cm/s):

$$P_{\text{app}} = \frac{\Delta Q}{\Delta t \cdot c_0 \cdot A \cdot 3600}。$$

其中 $\Delta Q/\Delta t$ 是 GFP 浓度随时间的变化, 由渗透曲线线性部分的斜率表示; c_0 表示 GFP 的初始浓度; A 表示扩散装置的扩散面积; 3 600 为换算因子。

使用相同装置和方法检测 Pen-Lip/Conb 对离体角膜的渗透性, 供体液分别为 3 mL Conb、Lip/Conb、Pen-Lip/Conb (Conb 浓度均为 1 mg/mL), 受体液为等体积 PBS 溶液, 用 ELISA 试剂盒检测提取样品中 Conb 的浓度。在渗

透性实验后通过角膜水合值 (hydration value, ΔH) 初步评价脂质体对角膜组织的毒性。从扩散装置中取出角膜, 将周围的巩膜组织去除, 精确称量每个角膜组织, 质量记为 m_0 , 在 65 °C 下烘干 48 h 后再次称量, 质量记为 m_1 , 并按照如下公式计算水合值:

$$\Delta H = \frac{m_0 - m_1}{m_0} \times 100\%.$$

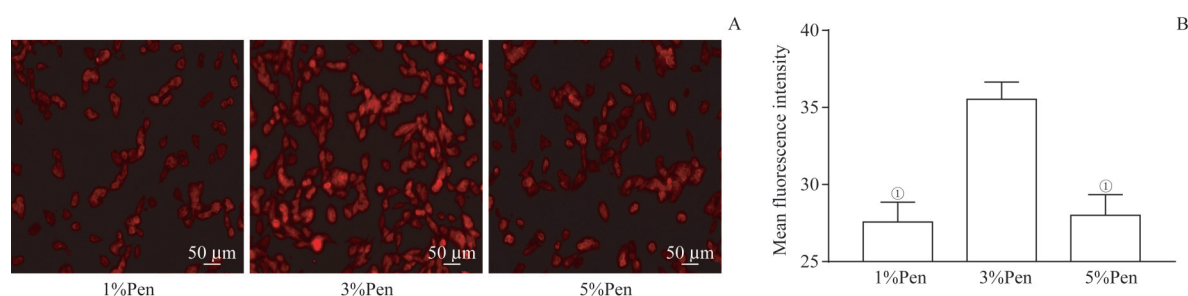
1.11 统计学分析

使用 GraphPad Prism 7 进行统计学分析。定量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Penetratin 修饰的最佳比例

为了确定脂质体修饰所需的最佳 Penetratin 比例, 通过细胞摄取实验评估了不同比例 Penetratin 修饰的脂质体被细胞摄取效率, 用平均荧光强度大小来表示摄取效率高低。如图 2 所示, 3 组的平均荧光强度分别为 27.57 ± 1.28 、 35.53 ± 1.12 、 27.34 ± 0.77 , 当用 3%Pen 修饰脂质体时, 平均荧光强度最高, 与 1%Pen、5%Pen 修饰组差异有统计学意义 (均 $P=0.000$), 表明该比例修饰组被细胞摄取效率最高。后续制备时均使用 3%Pen 修饰脂质体。



Note: A. Fluorescence microscope images of Pen-Lip taken by cells. B. Mean fluorescence intensity. ^① $P=0.000$, compared with the 3%Pen group.

图2 不同比例 Penetratin 修饰脂质体被细胞摄取情况的比较

Fig 2 Comparison of cellular uptake of different proportions of Penetratin modified liposomes

2.2 脂质体的表征

Lip 的平均粒径为 (143.87 ± 2.49) nm, PDI 为 0.241 ± 0.021 ; Pen-Lip 的平均粒径为 (148.07 ± 3.51) nm, PDI 为 0.227 ± 0.045 , 呈正态均匀分布 (图 3A)。表明 Lip 表面修饰 Penetratin 对粒径大小没有显著影响, 脂质体颗粒分散性良好。Lip 和 Pen-Lip 的 Zeta 电位分别为 $-(3.17 \pm 0.55)$ mV 和 (5.66 ± 0.91) mV。未修饰时 Lip 的 Zeta 电位为负值,

对 Lip 进行表面修饰后, 由于 Penetratin 带正电荷, Pen-Lip 的 Zeta 电位变为正值。TEM 拍摄结果如图 3B 所示, 可以看出 Pen-Lip 呈外表光滑的球形结构。通过 ELISA 检测得到 Lip 的包封率为 $(40.47 \pm 3.46)\%$, 载药量为 $(2.61 \pm 0.22)\%$; Pen-Lip 的包封率为 $(44.06 \pm 3.70)\%$, 载药量为 $(2.84 \pm 0.24)\%$, 修饰前后包封率和载药量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

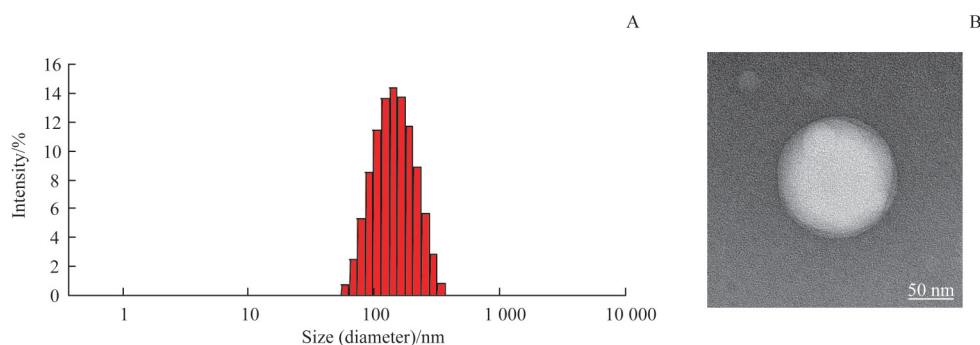


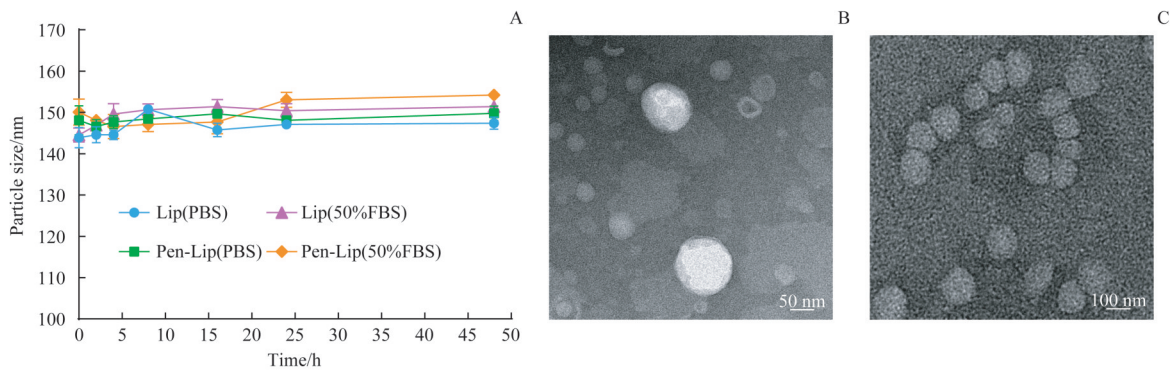
图3 Pen-Lip 的粒径分布图(A)和 TEM 图像(B)

Fig 3 Particle size distribution (A) and TEM image of Pen-Lip (B)

2.3 脂质体的稳定性

图 4A 是不同时间点的脂质体粒径大小, 可以看出 Lip 和 Pen-Lip 在 PBS 和含 50%FBS 的 PBS 溶液中静置 48 h

后, 平均粒径变化不大, 基本维持其原本粒径大小, TEM 结果 (图 4B, C) 显示 Lip、Pen-Lip 静置 48 h 后分散均匀, 没有发生聚集, 稳定性较好。



Note: A. The particle size change diagram of Lip and Pen-Lip in PBS with or without 50%FBS. B. TEM image of Lip in PBS. C. TEM image of Pen-Lip in PBS.

图4 Lip和Pen-Lip的稳定性

Fig 4 Stability of Lip and Pen-Lip

2.4 脂质体的细胞毒性

使用角膜上皮细胞 HCEC 和人视网膜色素上皮细胞 ARPE-19 考察了 Lip、Pen-Lip 对细胞的毒性作用。图 5A 表示的是不同浓度的 Lip、Pen-Lip 处理之后的 HCEC 的存活率；图 5B 表示的是不同浓度的 Lip、Pen-Lip 处理之后

的 ARPE-19 细胞的存活率。Lip、Pen-Lip 浓度在 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内时，角膜细胞和视网膜细胞均有 90% 以上的细胞存活率，2 种细胞的生长未受明显影响；表明 Lip、Pen-Lip 对角膜细胞和视网膜细胞的毒性均较低，生物相容性较高。

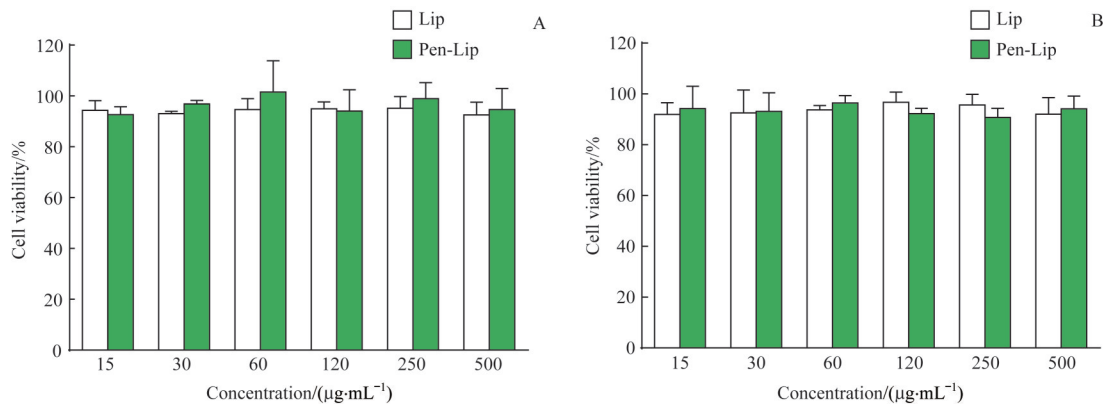


图5 不同浓度的 Lip、Pen-Lip 对 HCEC(A)和 ARPE-19(B)的细胞毒性检测

Fig 5 Cytotoxicity study of different concentrations of Lip and Pen-Lip on HCEC (A) and ARPE-19 (B)

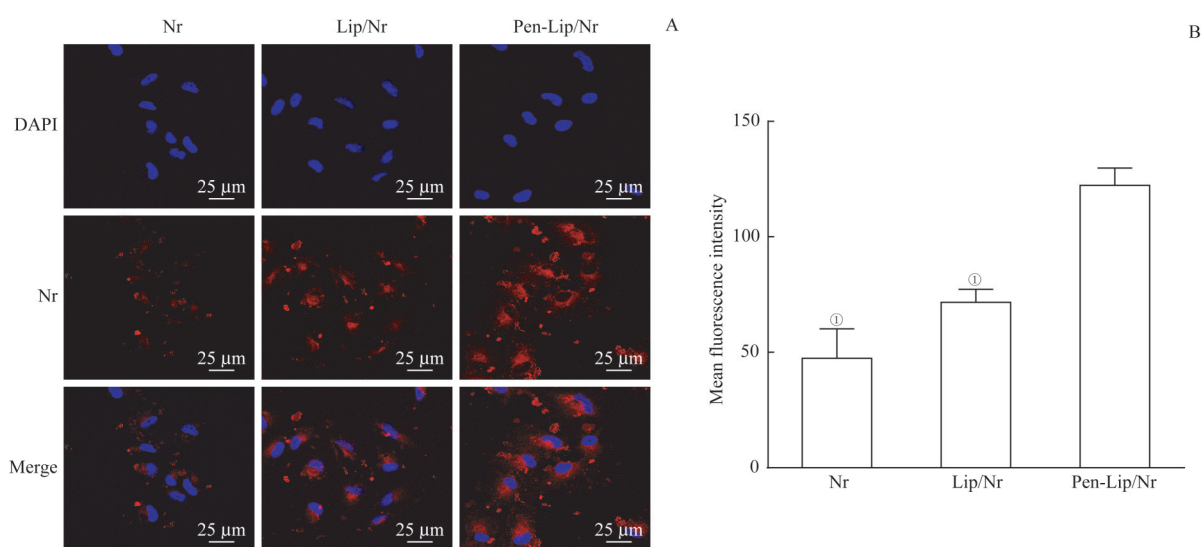
2.5 细胞对脂质体的摄取情况

在 ARPE-19 细胞分别与 Nr 染料、Lip/Nr 和 Pen-Lip/Nr 共孵育 3 h 后，利用激光扫描共聚焦显微镜观察细胞对于脂质体的摄取情况。如图 6A 所示，各组在 ARPE-19 细胞中均有荧光分布，Nr 染料组仅有微弱的红色荧光，Lip/Nr 组有少量的红色荧光，Pen-Lip/Nr 组荧光强度最强。用 Image J 对荧光强度进行半定量分析（图 6B），Pen-Lip/Nr 组的平均荧光强度分别是 Lip/Nr 组、Nr 染料组的 1.7 倍和 2.6 倍，差异均有统计学意义（均 $P=0.000$ ），表明 ARPE-19 细胞对 Pen-Lip 的摄取能力最强。

2.6 对离体角膜的渗透性和组织毒性

如图 7A 所示，随着渗透时间的增加，Pen-Lip/GFP

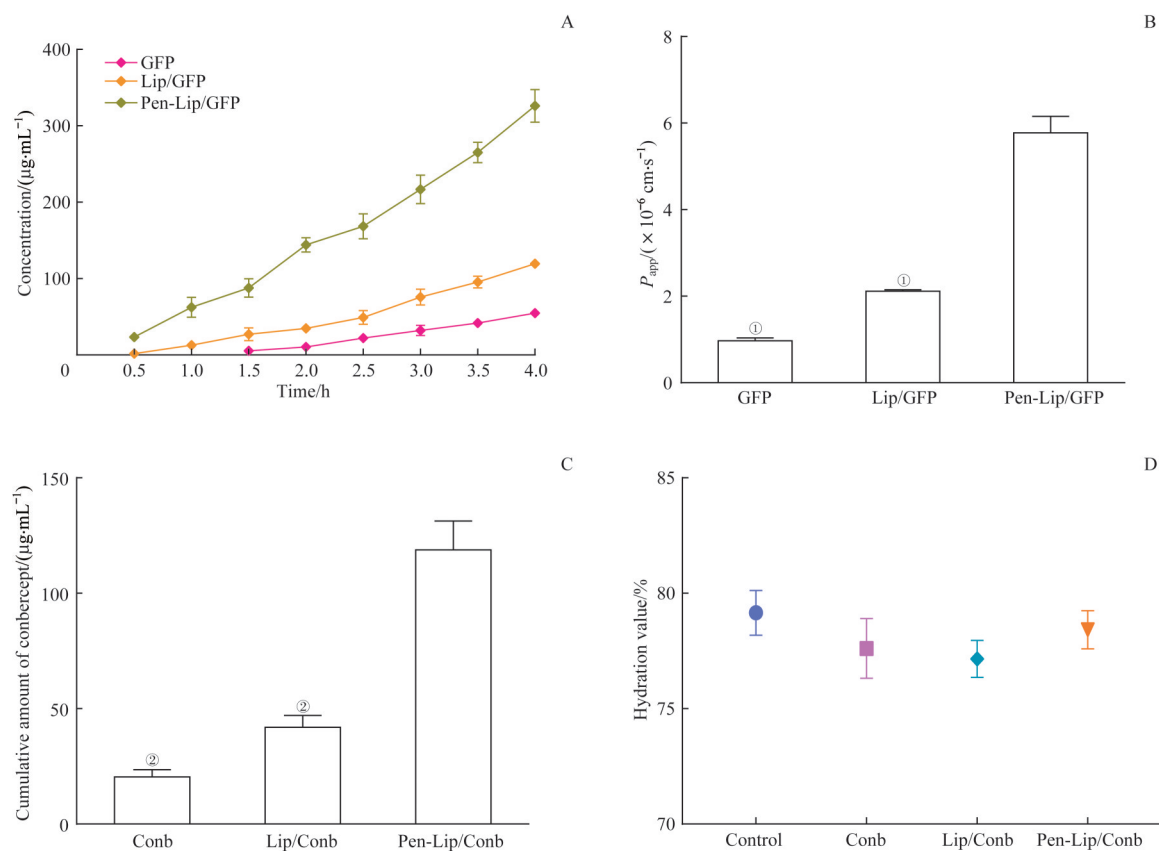
穿透兔角膜进入下室的荧光强度越强，呈时间依赖性。Pen-Lip/GFP 组、Lip/GFP 组的表观渗透系数分别是 GFP 组的 5.95 和 2.19 倍（图 7B），表明脂质体由于其类似于细胞膜的磷脂双分子层结构，可以改善药物的角膜穿透能力。如图 7C 所示，Conb、Lip/Conb、Pen-Lip/Conb 透过兔角膜 4 h 后，ELISA 检测到下室中 Conb 累积量分别为 (20.4 ± 3.1) 、 (42.0 ± 5.0) 、 (118.9 ± 12.5) $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，Pen-Lip/Conb 组的药物累积量分别是 Conb 组、Lip/Conb 组的 5.83 倍和 2.83 倍（均 $P=0.000$ ），表明 Penetratin 的修饰可以显著提高药物的角膜透过能力。经 Conb、Lip/Conb、Pen-Lip/Conb 处理的兔角膜的水合值与未处理对照组差异均无统计学意义，表明在本研究使用的浓度范围内未观察到脂质体的体外组织毒性（图 7D）。



Note: A. Laser scanning confocal images. B. Mean fluorescence intensity. ① $P=0.000$, compared with the Pen-Lip/Nr group.

图6 ARPE-19细胞对Nr染料、Lip/Nr和Pen-Lip/Nr的摄取情况比较

Fig 6 Comparison of uptake of Nr, Lip/Nr and Pen-Lip/Nr by ARPE-19 cells



Note: A. Permeation curves. B. Apparent permeability coefficients. C. Cumulative amounts of conbercept after 4 h. D. Hydration values after 4 h. ① $P=0.000$, compared with the Pen-Lip/GFP group; ② $P=0.000$, compared with the Pen-Lip/Conb group.

图7 载药Lip和Pen-Lip对离体兔角膜的渗透性和组织毒性检测

Fig 7 Detection of permeability and tissue toxicity of drug-loaded Lip and Pen-Lip on rabbit corneas *in vitro*

3 讨论

Conb是临床上常用的治疗眼底新生血管疾病的生物药物，是一种大分子蛋白类药物，容易受到酸碱度、温

度以及有机溶剂的影响而失活。本研究选用较温和的薄膜分散法制备载药脂质体，在冰上进行水浴超声减小粒径，减小超声时温度升高对药物活性的影响。用聚乙二醇对脂质体表面进行修饰是一项在肿瘤纳米给药系统广

泛使用的技术,可以延长脂质体的循环时间,但在眼部给药方面对该技术的研究较少。当DSPE-PEG₂₀₀₀占总脂质材料的摩尔比为5%~7%时,脂质体表面的聚乙二醇呈刷子状^[19],可在空间上减少脂质体与玻璃体成分之间的静电相互作用,提高脂质体的稳定性,增加脂质体在玻璃体腔的迁移率,使其能够到达视网膜区域^[20]。因此本研究在制备脂质体的过程中加入了5%摩尔比的DSPE-PEG₂₀₀₀,稳定性检测结果表明脂质体在48 h内粒径变化很小,没有发生明显聚集,稳定性较好。

眼表局部给药时,角膜是药物吸收进入眼内的主要屏障,脂质体具有亲脂亲水性,能增强药物的角膜穿透能力,可作为滴眼给药治疗眼后段疾病的载体。有研究^[7]利用多糖的生物黏附性将壳聚糖涂覆在脂质体表面,延长脂质体在眼表的滞留时间并提高药物向眼后段的渗透性,但脂质体覆盖壳聚糖涂层之后进入眼后段的荧光蛋白仅约为未修饰脂质体的1.5倍。膜联蛋白A5是一种钙依赖性磷脂结合蛋白,Davis等^[21]将其连接在脂

质体表面,增强脂质体穿透角膜上皮屏障的能力,然而膜联蛋白A5修饰的脂质体仅比未修饰脂质体提升了不到2倍的穿透效果。本研究结果显示Penetratin修饰脂质体后,角膜穿透能力与Lip相比提升了近3倍,较壳聚糖、膜联蛋白A5等眼部促渗剂具有更好的促进角膜穿透作用。

Penetratin是一种多肽。与一些通过损害角膜完整性而起作用的化学渗透促进剂相比,多肽生物相容性高,适用于眼部给药。本研究采用Penetratin修饰脂质体,结果显示Pen-Lip生物相容性好,组织毒性低,是一种安全的眼部药物载体。

本研究构建了Pen-Lip用于眼部给药,初步结果显示Pen-Lip可被视网膜色素上皮细胞摄取,具有有效的离体兔角膜穿透能力,有望作为一种安全、有效的能透过角膜屏障作用于眼底的给药系统,实现通过局部滴眼给药治疗眼底新生血管疾病。在后续的工作中,我们将进一步研究Pen-Lip抗眼底新生血管疾病的作用效果。

参·考·文·献

- [1] Campochiaro PA. Ocular neovascularization[J]. J Mol Med (Berl), 2013, 91(3): 311-321.
- [2] Li X, Xu G, Wang Y, et al. Safety and efficacy of conbercept in neovascular age-related macular degeneration. Results from a 12-month randomized phase 2 study: AURORA study[J]. Ophthalmology, 2014, 121(9): 1740-1747.
- [3] Sivaprasad S, Prevost AT, Vasconcelos JC, et al. Clinical efficacy of intravitreal aflibercept versus panretinal photocoagulation for best corrected visual acuity in patients with proliferative diabetic retinopathy at 52 weeks (CLARITY): a multicentre, single-blinded, randomised, controlled, phase 2b, non-inferiority trial[J]. Lancet, 2017, 389(10085): 2193-2203.
- [4] Sisk RA, Patel YP, Foster RE, et al. Erosive retinopathy and retinal detachment from depot intravitreal triamcinolone acetonide injection at the end of pars plana vitrectomy[J]. Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retin, 2019, 50(10): 613-619.
- [5] Gross JG, Glassman AR, Jampol LM, et al. Panretinal photocoagulation vs intravitreal ranibizumab for proliferative diabetic retinopathy: a randomized clinical trial[J]. JAMA, 2015, 314(20): 2137-2146.
- [6] Chen C, Liu K, Xu Y, et al. Anti-angiogenesis through noninvasive to minimally invasive intraocular delivery of the peptide CC12 identified by *in vivo*-directed evolution[J]. Biomaterials, 2017, 112: 218-233.
- [7] Li J, Cheng T, Tian Q, et al. A more efficient ocular delivery system of triamcinolone acetonide as eye drop to the posterior segment of the eye[J]. Drug Deliv, 2019, 26(1): 188-198.
- [8] Jiang K, Hu Y, Gao X, et al. Octopus-like flexible vector for noninvasive intraocular delivery of short interfering nucleic acids[J]. Nano Lett, 2019, 19(9): 6410-6417.
- [9] Yang X, Wang L, Li L, et al. A novel dendrimer-based complex co-modified with cyclic RGD hexapeptide and penetratin for noninvasive targeting and penetration of the ocular posterior segment[J]. Drug Deliv, 2019, 26(1): 989-1001.
- [10] Dos Santos Rodrigues B, Kanekiyo T, Singh J. ApoE-2 brain-targeted gene therapy through transferrin and penetratin tagged liposomal nanoparticles[J]. Pharm Res, 2019, 36(11): 161.
- [11] Shuai Q, Cai Y, Zhao G, et al. Cell-penetrating peptide modified PEG-PLA micelles for efficient PTX delivery[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(5): 1856.
- [12] de Cogan F, Hill LJ, Lynch A, et al. Topical delivery of anti-VEGF drugs to the ocular posterior segment using cell-penetrating peptides[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2017, 58(5): 2578-2590.
- [13] Liu C, Tai LY, Zhang WJ, et al. Penetratin, a potentially powerful absorption enhancer for noninvasive intraocular drug delivery[J]. Mol Pharm, 2014, 11(4): 1218-1227.
- [14] Cheng T, Li J, Cheng Y, et al. Triamcinolone acetonide-chitosan coated liposomes efficiently treated retinal edema as eye drops[J]. Exp Eye Res, 2019, 188: 107805.
- [15] Lai S, Wei Y, Wu Q, et al. Liposomes for effective drug delivery to the ocular posterior chamber[J]. J Nanobiotechnology, 2019, 17(1): 64.
- [16] Zhang Q, Tang J, Fu L, et al. A pH-responsive α -helical cell penetrating peptide-mediated liposomal delivery system[J]. Biomaterials, 2013, 34(32): 7980-7993.
- [17] Liu Y, Lu Z, Mei L, et al. Tandem peptide based on structural modification of poly-arginine for enhancing tumor targeting efficiency and therapeutic effect[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2017, 9(3): 2083-2092.
- [18] Tai LY, Liu C, Jiang K, et al. A novel penetratin-modified complex for noninvasive intraocular delivery of antisense oligonucleotides[J]. Int J Pharm, 2017, 529(1/2): 347-356.
- [19] Eriksen AZ, Brewer J, Andresen TL, et al. The diffusion dynamics of PEGylated liposomes in the intact vitreous of the *ex vivo* porcine eye: a fluorescence correlation spectroscopy and biodistribution study[J]. Int J Pharm, 2017, 522(1-2): 90-97.
- [20] Garbuzenko O, Barenholz Y, Priev A. Effect of grafted PEG on liposome size and on compressibility and packing of lipid bilayer[J]. Chem Phys Lipids, 2005, 135(2): 117-129.
- [21] Davis BM, Normando EM, Guo L, et al. Topical delivery of avastin to the posterior segment of the eye *in vivo* using annexin A5-associated liposomes[J]. Small, 2014, 10(8): 1575-1584.

[收稿日期] 2020-08-24

[本文编辑] 瞿麟平

