

文章编号 1006-8147(2018)04-0298-04

论 著

# 巯基化羧甲基壳聚糖载醋甲唑胺纳米球滴眼剂的生物安全性评价

李光远<sup>1,2</sup>, 姜建石<sup>1</sup>, 陈 斌<sup>2</sup>, 李 楠<sup>2</sup>, 王晓辉<sup>2</sup>, 刘佩莉<sup>2</sup>, 祝君梅<sup>2</sup>

(1. 天津医科大学药理学系, 天津 300070; 2. 天津市医药科学研究所医用生物材料监测研究中心, 天津 300020)

**摘要** 目的:研究巯基化羧甲基壳聚糖载醋甲唑胺纳米球滴眼剂的生物相容性。方法:以巯基化羧甲基壳聚糖为载体,包裹醋甲唑胺得到载药纳米球,制备成滴眼剂。采用迟发超敏试验、细胞毒性试验(MTT法和LDH法),对该滴眼剂进行生物安全性评价。结果:醋甲唑胺纳米球滴眼剂对豚鼠皮肤未出现红斑水肿现象,无致敏性,细胞毒性反应为2级,LDH释放率为37.09%,MTT试验和LDH试验IC50结果为0.24 g/mL和0.54 g/mL。结论:醋甲唑胺纳米球滴眼剂具有良好的生物相容性。

**关键词** 纳米球;醋甲唑胺;巯基化羧甲基壳聚糖;生物相容性

中图分类号 R9

文献标志码 A

## Biological safety evaluation on thiolated carboxymethyl chitosan-carried methazolamide nanoparticle eye drop

LI Guang-yuan<sup>1,2</sup>, LOU Jian-shi<sup>1</sup>, CHEN Bin<sup>2</sup>, LI Nan<sup>2</sup>, WANG Xiao-hui<sup>2</sup>, LIU Pei-li<sup>2</sup>, ZHU Jun-mei<sup>2</sup>

(1. Department of Pharmacology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Medical Biological Material Supervision and Research Center, Tianjin Institute of Medical and Pharmaceutical Sciences, Tianjin 300020, China)

**Abstract Objective:** To test the biological of thiolatedcarboxymethyl chitosan (tCMCS)-carried methazolamide (MTZ). **Methods:** This study used tCMCS as a drug carrier to prepare thiolatedcarboxymethyl chitosan-carried methazolamide nanoparticle eye drop (tCMCS-MTZ-NED). To measure the delayed-type hypersensitivity response, cytotoxicity test (MTT and LDH) of the tCMCS-MTZ-NED was performed. **Results:** tCMCS-MTZ-NED is not the sensitizer for guinea pig (both integration and ratio of skin reaction are 0), cytotoxicity was grade 2, the release rate of LDH was 37.09%, the IC50 tested by refined MTT assay and LDH assay were 0.24 g/mL and 0.54 g/mL. **Conclusion:** tCMCS-MTZ-NED has good biocompatibility.

**Key words** nanoparticles; methazolamide; thiolatedcarboxymethyl chitosan; biological safety evaluation

醋甲唑胺(methazolamide, MTZ)是一种新型的碳酸酐酶抑制剂<sup>[1]</sup>,通过抑制睫状体中的碳酸酐酶,使房水生成减少,降低眼内压。其作为眼科治疗开角型青光眼、继发性青光眼的常用药物,在临床上得到广泛应用<sup>[2-3]</sup>。本实验采用乳化-蒸发-交联法,以巯基化羧甲基壳聚糖(thiolatedcarboxymethyl chitosan, tCMCS)为载体<sup>[4-5]</sup>,包裹 MTZ 形成纳米球(thiolatedcarboxymethyl chitosan-carried methazolamide nanoparticles, tCMCS-MTZ-Ns),将其制备成滴眼剂(thiolatedcarboxymethyl chitosan-carried methazolamide nanoparticles eye drop, tCMCS-MTZ-NED)<sup>[6]</sup>。对该滴眼剂进行眼刺激试验、迟发超敏试验、细胞毒性试验(MTT法和LDH法),为该滴眼剂的应用提供实验依据。

基金项目 天津市卫生局科技基金(青年)(2012KY34)

作者简介 李光远(1985-),男,助理研究员,硕士在读,研究方向:组织工程;通信作者:姜建石, E-mail: jianshilou@163.com。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 实验试剂醋甲唑胺原料药(武汉大华伟业医药化工有限公司。批号:20160912,纯度为99.2%),羧甲基壳聚糖(CMC,浙江澳兴生物科技有限公司,分子量30万,羧化度80%),三聚磷酸钠(TPP,分析纯,天津市光复科技发展有限公司),甲醛(天津市化学试剂批发公司,分析纯,150215),生理盐水(中国大冢制药有限公司,5K72G2),2,4-二硝基氯苯(天津光复精细化工研究所,化学纯,批号:2015年7月11日),弗氏完全佐剂(Sigma,批号:SLBF9338V),二甲基亚砷(天津瑞金特化学品有限公司,批号:2014/05),四唑盐(MTT, BIOSHARP),1640培养液(Hyclone,批号:NZL1265),胰酶细胞消化液(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司,批号:312ML0110),乳酸脱氢酶(LDH)测定试剂盒(货号:A020-2,微量酶标法),聚山梨酯-80(Tween-80,分

析纯,天津市光复科技发展有限公司),乙酸乙酯(分析纯,天津市光复科技发展有限公司),乙醇(分析纯,天津市光复科技发展有限公司),乙醚(分析纯,天津市光复科技发展有限公司)。

细胞株:NCTC clone 929(小鼠成纤维细胞 L-929,来源:中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心)。

1.1.2 实验动物 日本大耳白兔,雄性,2.0~2.5 kg(北京隆安实验动物养殖中心,许可证编号:SCXK(京)2014-0003)实验前适应性饲养1周。白化豚鼠,雄性,300~400 g(北京隆安实验动物养殖中心,许可证编号:SCXK(京)2014-0003),实验前适应性饲养3d。

1.1.3 仪器 酶标仪(芬兰雷勃公司,MK3),CO<sub>2</sub>培养箱(赛默飞世尔科技公司,HERAcell 150i),全温振荡培养箱(上海精宏实验设备有限公司,HZP-150),LYL-II 裂隙灯显微镜(凤凰光学仪器集团有限公司)。

## 1.2 方法

1.2.1 tCMCS-MTZ-NED 制备 将 MTZ 原料药溶于乙酸乙酯,加入混合乳化剂(Tween-80 和无水乙醇),在常温下超声,滴入 0.5% HCl,继续超声,滴入 tCMC 溶液,待乳液变清时,再滴入 TPP 溶液,继续超声,即得到载药纳米球混悬液。6 000 r/min 离心 20 min,所得沉淀用乙醚冲洗,-80℃低温冰箱中保存,经冷冻干燥机制成冻干品。

### 1.2.2 浸提液制备

1.2.2.1 迟发超敏试验浸提液制备:tCMCS-MTZ-NED 按照 0.2 g/mL 的比例使用生理盐水和芝麻油在 37℃下浸提 72 h。

1.2.2.2 细胞毒性试验浸提液制备:tCMCS-MTZ-NED 按照 0.2 g/mL 的比例使用含胎牛血清的 DMEM 培养液在 37℃下浸提 72 h。

1.2.3 迟发型超敏反应试验 选用体质量 300~400 g 皮肤完好的健康白化豚鼠 50 只,将 50 只豚鼠按体重分层随机分为 5 组,样品生理盐水浸提液组 10 只,芝麻油浸提液组 10 只,阴性对照生理盐水和芝麻油浸提介质组各 10 只,阳性对照组 0.5% 2,4-二硝基氯苯 10 只。试验前 24h 剪剃背部区域被毛。

皮内诱导:试验时用 75%酒精消毒试验区域后在脊柱两侧从头向尾成对的进行 3 对(6 个点)皮内注射,每点注射 0.1 mL。第一对 A 液,为弗氏完全佐剂与生理盐水或芝麻油等体积混合。第二对 B 液,为试验样品浸提液,对照组为阴性或阳性对照液。第三对 C 液,为 A 液与 B 液等体积混合。

局部诱导:皮内注射后 6 d,各注射部位用 10% 十二烷基硫酸钠按摩导入,24 h 后按组贴敷于 B 液中浸泡至饱和的滤纸片,固定并留置 48 h。

激发:局部诱导后 13 d,剪去豚鼠腹部毛发,用 75%酒精消毒试验区域后,按组贴敷于 C 液中浸泡至饱和的滤纸片,固定并留置 24 h。

除去敷贴物后 24 h 和 48 h,观察贴敷区皮肤的红斑、水肿等反应,按 Magnusson 和 Kligman 分级标准(表 1)对每一激发部位和每一观察时间皮肤红斑和水肿反应进行描述并分级。记录观察时间和激发部位红斑和水肿反应分级。

表 1 Magnusson 和 Kligman 分级

Tab 1 Grading of Magnusson and Kligman

敷贴试验反应	等级
无明显改变	0
散发性或斑点状红斑	1
中度融合性红斑	2
重度红斑和水肿	3

## 1.2.4 体外细胞毒性试验

1.2.4.1 MTT 法:在 96 孔培养板上接种 L-929 细胞,接种密度为  $1 \times 10^4$ /mL 的细胞悬液,每孔 100  $\mu$ L,细胞培养 24 h 后,弃去原培养液。空白组(BL)用细胞培养液交换,阴性对照组用浸提比例为 0.2 g/mL 高密度聚乙烯浸提液(PE)交换,阳性对照组用含 5% 二甲基亚砜(DMSO)的细胞培养液交换,试验样品组用载银纳米粒凝胶剂浸提液或纳米银浸提液进行交换。置 CO<sub>2</sub> 培养箱内 37℃培养 72 h。更换培养液后 72 h,每孔加入 20  $\mu$ L、5 g/L 四唑盐(MTT)溶液继续培养 4 h 后弃去孔内液体,加入 150  $\mu$ L 二甲基亚砜,置振荡器上振荡 10 min,在酶标仪 570 nm 和 630 nm 处测定各孔吸光度。计算相对增殖率(RGR)。细胞毒性反应分级见表 2。

表 2 细胞毒性反应分级

Tab 2 Cytotoxic reaction grading

级别	相对增殖率/%	级别	相对增殖率/%
0 级	$\geq 100$	3 级	30~49
1 级	80~99	4 级	0~29
2 级	50~79		

计算公式为  $RGR(\%) = (570 \text{ nm 材料组平均值} - 630 \text{ nm 材料组平均值} / 570 \text{ nm 阴性对照组平均值} - 630 \text{ nm 阴性对照组平均值}) \times 100\%$ 。

1.2.4.2 LDH 法:在 96 孔培养板上接种 L-929 细胞,接种密度为  $1 \times 10^4$ /mL 的细胞悬液,每孔 100  $\mu$ L,细胞培养 24 h 后,弃去原培养液。空白组用细胞培养液交换,阴性对照组用浸提比例为 0.2 g/mL 高密

度聚乙烯浸提液交换,阳性对照组用含 1 % Triton-X-100 的细胞培养液交换,试验样品组用浸提液进行交换。置 CO<sub>2</sub> 培养箱内 37 ℃培养 72 h。更换培养液后 72 h, 每孔按照说明依次加入试剂盒中试剂,混匀,室温静置 5 min,450 nm 波长处酶标仪测定吸光度值。计算 LDH 总释放率(T)。结果见表 5。

计算公式为  $T(\%) = (\text{试验样品组的平均吸光度值} - \text{溶剂对照组的平均吸光度值}) / (\text{Triton-X-100 对照组的平均吸光度值} - \text{溶剂对照组的平均吸光度值})$

1.3 统计分析 采用 SPSS17.0 进行统计学分析,计算 MTT 试验中 tCMCS-MTZ-NED 的半数生长抑制浓度(IC<sub>50</sub>)和 LDH 试验中 LDH 释放率达到 50% 时 tCMCS-MTZ-NED 的浓度。

2 结果

2.1 迟发型超敏反应试验 见表 3。试验结果表明,受试组和阴性对照组在去除贴敷 24 h 和 48 h 后未见红斑、水肿,阳性对照出现不同程度红斑反应,实验材料对豚鼠不致敏。

表 4 tCMCS-MTZ-NED MTT 试验结果

Tab 4 MTT test results for tCMCS-MTZ-NED

	BL	PE	tCMCS-MTZ-NED 浸提液					DMSO
			0.2 g/mL	0.1 g/mL	0.05 g/mL	0.025 g/mL	0.012 5 g/mL	
背景值	0.02	0.03	0.02	0.03	0.03	0.02	0.02	0.03
平均值	0.83	0.92	0.51	0.62	0.78	0.71	0.85	0.09
SD	0.10	0.12	0.06	0.06	0.07	0.09	0.15	0.02
RSD/%	12.56	13.04	12.49	9.44	8.85	12.15	17.60	22.22
相对增殖率/%		110.0	60.0	73.0	93.0	85.0	102.0	7.0

注:BL,空白对照组;PE,高密度聚乙烯阴性对照组;DMSO,5 %二甲亚砜阳性对照组

表 5 tCMCS-MTZ-NED LDH 试验结果

Tab 5 LDH test results for tCMCS-MTZ-NED

	PE	tCMCS-MTZ-NED 浸提液					Triton-X-100
		0.2 g/mL	0.1 g/mL	0.05 g/mL	0.025 g/mL	0.012 5 g/mL	
平均值	0.19	0.42	0.42	0.41	0.39	0.36	0.80
SD	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02
RSD/%	3.58	2.14	3.06	2.33	3.29	1.40	4.20
LDH 释放率/%		37.09	38.56	36.27	33.99	28.92	0.07

PE,高密度聚乙烯阴性对照组;Triton-X-100,1 % Triton-X-100 阳性对照组

2.2.3 统计学分析 结果采用 SPSS17.0 进行统计学分析,计算得出 MTT 试验中 tCMCS-MTZ-NED 的半数生长抑制浓度(IC<sub>50</sub>)为 0.24 g/mL,LDH 试验中 LDH 释放率达到 50%时 tCMCS-MTZ-NED 的浓度为 0.54 g/mL。

3 讨论

醋甲唑胺是一种碳酸酐酶抑制剂,碳酸酐酶(CA)是一种含锌金属酶,它在睫状上皮细胞中催化 CO<sub>2</sub> 和 H<sub>2</sub>O 最终生成 CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>,透过腔膜分泌于房水。

表 3 tCMCS-MTZ-NED 对豚鼠迟发型超敏反应试验结果(n=10)

Tab 3 Results of delayed type hypersensitivity of tCMCS-MTZ-NED in guinea pigs (n=10)

组别	观察时间/h	皮肤反应强度			
		0	1	2	3
受试组	24	10/10	0/10	0/10	0/10
(生理盐水)	48	10/10	0/10	0/10	0/10
受试组	24	10/10	0/10	0/10	0/10
(芝麻油)	48	10/10	0/10	0/10	0/10
阴性对照	24	10/10	0/10	0/10	0/10
(生理盐水)	48	10/10	0/10	0/10	0/10
阴性对照	24	10/10	0/10	0/10	0/10
(芝麻油)	48	10/10	0/10	0/10	0/10
阳性对照	24	0/10	4/10	3/10	3/10
(0.5% 2,4-二硝基氯苯)	48	0/10	4/10	4/10	2/10

2.2 体外细胞毒性试验

2.2.1 MTT 试验结果 见表 4。试验结果表明,试验样品的浸提液细胞毒性反应为 2 级。

2.2.2 LDH 试验结果 见表 5。试验结果表明,试验样品浸提比例为 0.2 g/mL 时,LDH 释放率为 37.09 %。

由于溶液要保持电中性,Na<sup>+</sup>向房水分泌增加,同时带动 Cl<sup>-</sup>向房水迁移,从而在房水形成高渗透压,促进 H<sub>2</sub>O 向房水方向运动,保持房水的离子平衡及其流量<sup>[7-8]</sup>,而青光眼患者由于房水回流不畅引起眼内压升高。碳酸酐酶抑制剂可抑制 CA 的活性,使 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>的生成减少,从而减少 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>、Na<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup>和 H<sub>2</sub>O 进入房水,使房水生成减少,起到降低眼内压作用,临床上用于治疗青光眼<sup>[9-10]</sup>。Calvo<sup>[11]</sup>等研究发现,纳米球给药系统使角膜渗透性提高了 4~5 倍。徐咏梅<sup>[12]</sup>



等研究发现巯基化羧甲基壳聚糖生物黏附性更高。本实验首次使用巯基化改性的羧甲基壳聚糖衍生物用于局部眼科给药的载体材料,除改善亲水性,还可与角膜外黏液层中的糖蛋白黏附,使纳米球能更好地集聚在角膜表面,缓释的 MTZ 不断通过角膜屏障进入房水并维持有效浓度,达到提高 MTZ 生物利用度的目的。

在此之前,已对本实验材料进行了眼刺激试验,试验结果表明动物双眼对光反射良好,角膜区透明,虹膜、结膜正常,均未见充血,眼睑无水肿,无分泌物生成<sup>[13]</sup>。本研究依据 GB/T16886《医疗器械生物学评价》的评价方法<sup>[14]</sup>,对产品进行了迟发超敏试验和体外细胞毒试验,迟发超敏试验结果表明本材料对豚鼠皮肤无致敏性,在体外细胞毒性试验中,试验样品浓度为 0.2 g/mL 和 0.1 g/mL 的浸提液细胞毒性反应为 2 级,其原因可能是由于纳米球可以透过细胞膜进入细胞内或进入细胞器,并和生物大分子发生反应,使生物膜发生结构改变,从而产生细胞毒性。本试验通过两种方法测定了给药系统的细胞毒性。MTT 试验主要检测细胞线粒体功能障碍,即琥珀酸脱氢酶活性的抑制,从而考察细胞活性和生长状态;而 LDH 试验是检测受试物对细胞膜的破坏。试验结果提示实验材料引起细胞毒性的机理主要是通过影响细胞器的功能,但 LDH 试验结果显示实验材料也引起了一定程度细胞膜的破坏,为毒性机制的分析提供依据。IC<sub>50</sub> 是细胞半数致死时所需要的药物浓度,该指标能够定量地反映 tCMCS-MTZ-NED 浓度对细胞毒性的影响,为 tCMCS-MTZ-NED 的生物安全性评价提供更加全

面的数据支持。

#### 参考文献:

- [1] 黄小华.醋甲唑胺在眼科的应用护理探讨[J].北方药学,2015,12(7):193
- [2] 余成清,杨佳艳,孙云.眼部给药新剂型的研究进展[J].海峡药学,2016,28(6):23
- [3] 王婵.醋甲唑胺片联合手术治疗新生血管性青光眼患者的临床疗效[J].中国药物经济学,2016,11(3):57
- [4] 李海浪.壳聚糖衍生物的制备及其在药物载体中的应用研究[D].中国科学院研究生院(上海应用物理研究所),2014.
- [5] Fossati S, Giannoni P, Solesio M E. The carbonic anhydrase inhibitor methazolamide prevents amyloid beta -induced mitochondrial dysfunction and caspase activation protecting neuronal and glial cells in vitro and in the mouse brain[J]. Neurobiol Dis, 2016, 86:29
- [6] 张桂贤,陈斌,王晓辉,等.正交试验优选羧甲基壳聚糖-醋甲唑胺纳米微球的制备方案[J].天津药学,2014,26(02):10
- [7] 朱世真,王丽芳,王尊文.常用滴眼剂抑菌效力的考察[J].中国药品标准,2016,17(2):95
- [8] 赵淑云.醋甲唑胺片联合手术治疗新生血管性青光眼的临床疗效[J].中国药物经济学,2015,10(S2):98
- [9] 刘雪霞,汪东生.青光眼白内障联合术后黄斑水肿一例[J].中华眼科医学杂志(电子版),2013,3(3):158
- [10] 陈威.选择性激光小梁成形术作为初始疗法治疗原发性开角型青光眼的疗效评价[J].中国农村卫生,2015(6):76
- [11] Calvo P, Vila-Jato JL, Alonso MJ. Comparative in vitro evaluation of several colloidal system, nanoparticles and nanoemulsion, as ocular drug carriers[J]. J Pharm Sci, 1996, 5(85): 530.
- [12] 徐咏梅,周伟,殷磊,等.巯基化羧甲基壳聚糖微凝胶的制备及其生物黏附性能[J].中国组织工程研究与临床康复,2009,13(29):5645
- [13] 李光远,娄建石,陈斌.醋甲唑胺纳米球滴眼剂对家兔的降眼压作用及体外释放评价[J].中国新药杂志,2015,24(21):2502
- [14] GB/T16886-2003.医疗器械生物学评价[s].2003:83

(2018-01-09 收稿)