

载药蒙脱石壳聚糖纳米粒的制备及其生物学性能评价

田双艳, 侯冬枝*, 桂茹艺, 黄焱, 胡晟, 李娟, 陈燕忠, 吕竹芬
(广东药科大学药科学院, 广东省药物新剂型重点实验室, 广州 510006)

[摘要] **目的:**选择盐酸倍他洛尔为模型药物,制备新型镶嵌蒙脱石载体的离子交换给药系统载药蒙脱石壳聚糖纳米粒(Mt-BH/CS NPs),为新型的眼部混悬剂开发提供参考。**方法:**采用离子凝胶法制备 Mt-BH/CS NPs,利用正交试验优化处方,选取壳聚糖质量浓度,多聚磷酸钠(TPP)浓度、壳聚糖与 TPP 质量比及盐酸倍他洛尔质量浓度为考察因素,考察 Mt-BH/CS NPs 的包封率、载药量及体外释放,通过黏附性试验和人永生角膜上皮细胞的细胞毒性试验考察 Mt-BH/CS NPs 的生物学性质。**结果:**最佳处方工艺为壳聚糖质量浓度 $1.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, TPP 质量浓度 $1.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,壳聚糖-TPP(10:1),盐酸倍他洛尔质量浓度 $2.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$;Mt-BH/CS NPs 平均包封率 36.13%,平均载药量 14.50%,10 h 累积释放率达 82.23%。Mt-BH/CS NPs 相对于盐酸倍他洛尔水溶液的人永生角膜上皮细胞毒性较小;Mt-BH/CS NPs 与黏膜混合后 Zeta 电位下降,表明其对黏膜有一定的黏附性。**结论:**Mt-BH/CS NPs 载药量较高、体外释放缓慢、细胞毒性小、生物黏附性大,可望用于眼部疾病的治疗,以期改善新型给药系统的释放性能并增强与眼部的相互作用,从而提高药物的眼部生物利用度并减少不良反应。

[关键词] 蒙脱石;盐酸倍他洛尔;壳聚糖;纳米粒;人永生角膜上皮细胞;多聚磷酸钠

[中图分类号] R283.6;R945;R284.1;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)05-0012-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017050012

Preparation of Betaxolol Hydrochloride Loading Montmorillonite-chitosan Nanoparticles and Evaluation of Its Biological Properties

TIAN Shuang-yan, HOU Dong-zhi*, GUI Ru-yi, HUANG Yi, HU Sheng,
LI Juan, CHEN Yan-zhong, LYU Zhu-fen
(Guangdong Provincial Key Laboratory of Advanced Drug Delivery, School of Pharmacy,
Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** Taking betaxolol hydrochloride as model drug, to prepare drug loading montmorillonite-chitosan nanoparticles by ionic gelation of chitosan with sodium polyphosphate (TPP), which is known simply as Mt-BH/CS NPs. **Method:** Mt-BH/CS NPs was prepared by ionic gelation, orthogonal test was adopted to optimize its formulation process by taking encapsulation efficiency and drug loading as indexes. Encapsulation efficiency, drug loading and *in vitro* release properties of Mt-BH/CS NPs were examined by UV method and its biological properties of nanoparticles suspension were investigated by mucoadhesive test and *in vitro* cytotoxicity test. **Result:** The best formulation process was as following: chitosan concentration of $1.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, TPP concentration of $1.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, chitosan-TPP (10:1), betaxolol hydrochloride concentration of $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. The average encapsulation efficiency of five batches of Mt-BH/CS NPs was 36.13% and its average drug loading was 14.50% with RSD < 1.0% by dialysis method. The cumulative release rate of Mt-BH/CS NPs was 82.23% in 10 h. In the mucoadhesive test, after mixing with mucous membrane, the reduction of Zeta potential value of Mt-BH/CS NPs indicated that there was mucoadhesive property of Mt-BH/CS NPs. The cell viability of human

[收稿日期] 20160801(015)

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(51102052);广东省医学科学技术研究基金项目(A2016275)

[第一作者] 田双艳,在读硕士,从事药物新剂型和新制剂研究,Tel:13424036763,E-mail:646884873@qq.com

[通讯作者] *侯冬枝,博士,副教授,从事药物新剂型与新制剂研究,Tel:15915727835,E-mail:houdongzhi@163.com

immortalized corneal epithelial cells after being exposed to betaxolol hydrochloride solution and Mt-BH/CS NPs showed that cytotoxicity of betaxolol hydrochloride solution was higher than that of Mt-BH/CS NPs suspension.

Conclusion: Mt-BH/CS NPs has a high drug loading, slow *in vitro* release, low toxicity and great mucoadhesive property, which may hold promise to be an attractive novel nanosystem for the treatment of ocular diseases. The new drug delivery system can improve the capability of release properties and enhance the interaction with the eye, so as to improve the ocular bioavailability of drugs and reduce their adverse reactions.

[Key words] montmorillonite; betaxolol hydrochloride; chitosan; nanoparticles; human immortalized corneal epithelial cells; sodium polyphosphate

青光眼是一种威胁视神经功能的眼部疾病, 主要与眼内压升高有关, 是位于全球第二的不可逆致盲性眼部疾病, 其致盲率高达 10%^[1]。盐酸倍他洛尔作为一种 β_1 受体阻滞药, 能抑制房水的生成和加速泪液的外排, 产生降眼压作用, 临床上常用于治疗青光眼。但由于眼部特殊的生理屏障及角膜的渗透性差, 使得药物角膜前滞留时间短, 从而导致药物在眼部的生物利用度很低, 临床疗效差, 同时亦会引起诸多不良反应。因此, 研究可增加角膜前滞留时间从而改善生物利用度的新型眼部给药系统变得越来趋势在必行。

壳聚糖是一种阳离子多聚糖, 具有几乎无毒性及生物相容性、生物降解性和黏膜黏附性良好等特性, 已被广泛作为药物载体应用^[2]。壳聚糖修饰的纳米粒能够改善药物的局部透过性能、增加药物与组织的接触时间, 是眼部给药中能够用于延长角膜前滞留时间的潜在系统之一^[3]。蒙脱石是膨润土的主要成分, 是一种层状结构的硅酸盐粘土矿, 其中硅氧四面体亚层和铝氧八面体亚层均可发生类质同象置换, 使蒙脱石结构层间带一定量的负电荷, 从而可以在结构层间域形成一些可交换的阳离子和水分子。这样的典型结构使蒙脱石具有与外来分子(比如阳离子药物)进行离子交换的特性^[4-5]。本实验以盐酸倍他洛尔为模型药物, 通过与蒙脱石发生离子交换作用而被载于蒙脱石内, 从而制备成载药蒙脱石(Mt-BH), 接着将 Mt-BH 镶嵌于壳聚糖纳米内, 制备蒙脱石离子交换壳聚糖纳米粒, 考察该纳米粒给药系统的包封率、载药量、体外释放性能、黏附性能及其对人永生化角膜上皮细胞的细胞毒性, 以期能研制出可明显延长角膜前滞留时间并减少不良反应的新型给药系统, 为眼用纳米制剂的设计提供新思路。

1 材料

UV1800 型紫外分光光度计(上海美谱达仪器有限公司), PHS-3C 型 pH 计(上海仪电科学仪器

有限公司), 1200 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司), Classica E103G 型光学显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司)。盐酸倍他洛尔原料药(济南浩化实业有限公司), 壳聚糖(脱乙酰度 > 95%, 济南海德贝生物有限公司), 钠型蒙脱石(浙江三鼎有限公司), 永生生化角膜上皮细胞(ATCC CRL-11135, 山东省眼科研究所), 液体培养基(DMEM/F-12)和青霉素-链霉素溶液(HyClone 公司), 胎牛血清(美国 Gibco 公司), 噻唑蓝(MTT, 美国 Sigma 公司), 水为去离子水, 甲醇、乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

SPF 级健康小鼠由广州中医药大学实验动物中心提供, 体重 20 ~ 40 g, 雌雄各半, 合格证号 SCXK(粤)2012-0015。经广东药科大学实验动物福利伦理审查和实验动物伦理委员会批准, 批准号 gdpulac2016089。

2 方法与结果

2.1 载药蒙脱石壳聚糖纳米粒的制备^[6] 精密称取适量壳聚糖溶于 2% 乙酸水溶液(pH 4.8, 下同)中, 使其溶解。精密称取适量蒙脱石和盐酸倍他洛尔原料药, 置于 2% 乙酸水溶液中, 于 60 °C 水浴 6 h 进行载药, 得载药蒙脱石(Mt-BH)。超声 5 min, 加入到上述壳聚糖溶液内, 磁力搅拌 1.5 h, 滴加适宜浓度的多聚磷酸钠 2.7 mL, 超声 5 s 并继续磁力搅拌 1 h, 得镶嵌了 BH-Mt 的壳聚糖纳米粒(Mt-BH/CS NPs)混悬液, 冷冻干燥后备用。

2.2 Mt-BH/CS NPs 混悬液的调制 由于新鲜制备的 Mt-BH/CS NPs 混悬液 pH 偏低(pH 4.9), 测定新制备的纳米粒溶液 pH 并用 0.1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液调节 pH 6 ~ 7, 使人眼可耐受且没有不适感。测定纳米粒溶液的渗透压, 以甘露醇为渗透压调节剂, 使新型纳米粒溶液渗透压达 290 mOsm·L⁻¹, 符合眼用规定^[7]。

2.3 制备工艺的优选 在单因素试验基础上, 选取壳聚糖质量浓度, 多聚磷酸钠(TPP)浓度、壳聚糖与

TPP 质量比及药物质量浓度为考察因素,每个因素选择 3 个水平,以包封率和载药量的综合评分为指标,综合评分 = $0.5 \times (\text{包封率}/\text{包封率最大值}) + 0.5 \times (\text{载药量}/\text{载药量最大值})$ 。按 $L_9(3^4)$ 正交表设计试验,试验安排及结果见表 1。由直观分析可知,4 个因素影响程度排序为 $D > C > B > A$,得最佳工艺为 $A_2B_3C_1D_3$,即壳聚糖质量浓度 $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, TPP 质量浓度 $1.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,壳聚糖-TPP(10:1),盐酸倍他洛尔质量浓度 $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

表 1 载药蒙脱石壳聚糖纳米粒制备工艺的正交试验分析

Table 1 Orthogonal test analysis for optimization of preparation process of Mt-BH/CS NPs

No.	壳聚糖质量浓度 / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	TPP 质量浓度 / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	壳聚糖-TPP	盐酸倍他洛尔质量浓度 / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	包封率 / %	载药量 / %	综合评分
1	1.0	0.8	10:1	0.75	13.10	5.26	36.26
2	1.0	1.0	20:3	1.25	15.17	8.20	49.09
3	1.0	1.2	10:3	2.00	18.00	11.49	64.18
4	1.5	0.8	20:3	2.00	19.53	10.56	63.21
5	1.5	1.0	10:3	0.75	12.27	3.49	29.13
6	1.5	1.2	10:1	1.25	35.31	14.85	100.00
7	2.0	0.8	10:3	1.25	0.66	0.22	1.68
8	2.0	1.0	10:1	2.00	13.40	6.33	40.29
9	2.0	1.2	20:3	0.75	0.77	0.37	2.34

2.4 包封率和载药量的测定 取盐酸倍他洛尔 10.00 mg 于 10 mL 量瓶中,加甲醇定容,得 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 储备液。精密量取该储备液 0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释,得质量浓度为 0.02, 0.04, 0.08, 0.12, 0.16 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的系列待测液。以溶剂作为空白对照,在 274.5 nm 处测定吸光度 A ,以 A 为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程 $Y = 4.1803X + 0.0253 (R^2 = 0.9999)$,线性范围 0.02 ~ 0.16 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

使用移液管精密移取调制的 Mt-BH/CS NPs 混悬液 2 mL,置于透析袋中并扎紧两端。将该透析袋置于含有介质 35 mL 的带塞广口瓶中,于 34 $^{\circ}\text{C}$, 120 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 恒温振荡器内。透析 25 min 后达到平衡,取透析介质过滤,于 274.5 nm 处测定 A ;另精密量取调制的 Mt-BH/CS NPs 混悬液 2 mL,加入一定量的磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4, 下同)以破坏纳米粒,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,于 274.5 nm 处测定 A ,计算包封率和载药量。结果 Mt-BH/CS NPs 的平均载药量和包封率分别为 14.50% 和 36.13% (RSD 均 < 1.0%, $n = 5$),表明优选的工艺

条件重复性较好。

2.5 体外释放性能考察 精密吸取调制的 Mt-BH/CS NPs 混悬液 2 mL 置于透析袋中并扎紧两端,置于 35 mL 的人工泪液介质中,于 34 $^{\circ}\text{C}$, 120 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 恒温振荡器内^[8],分别于 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 5, 6, 7, 8, 10 h 取释放介质 5 mL 并补充新鲜介质 5 mL,测定样品中药物的含量,以时间为横坐标,累积释放率为纵坐标,绘制盐酸倍他洛尔和 Mt-BH/CS NPs 的体外释放曲线,见图 1。结果显示盐酸倍他洛尔溶液释放迅速,可在 2 h 内完全释放;而 Mt-BH/CS NPs 中药物在 2 h 内约释放了 30%,接着是较为缓慢的释放,在 6 h 处释放率约 60%,在 10 h 处释放率 82.23%。表明 Mt-BH/CS NPs 能够明显降低其所含盐酸倍他洛尔的释放速度,远低于盐酸倍他洛尔水溶液的释放速度,可以缓慢释放出所包载的药物,延长释放时间长达 10 h 以上,从而大大改善了水溶性药物的释放性能。

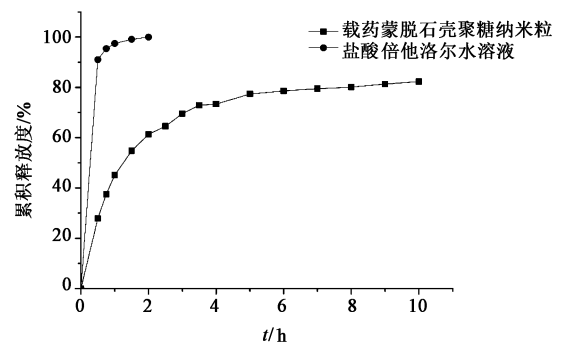


图 1 盐酸倍他洛尔和载药蒙脱石壳聚糖纳米粒的体外释放曲线
Fig. 1 In vitro release curves of betaxolol hydrochloride and Mt-BH/CS NPs

2.6 黏膜黏附性能的考察 断颈法处死小鼠,取出小肠,剪去小肠周围的脂肪组织,使用注射器吸取 PBS 冲洗小肠,以 5 $\text{min} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的速率冲洗 1 h,以便彻底清除小肠内容物,刮取肠黏膜。称取等量小肠黏膜液分别与载药壳聚糖纳米粒和 Mt-BH/CS NPs 新鲜混悬液混合并涡旋 1 min,测定 Zeta 电位,判断纳米粒的黏附性能。结果发现黏膜带负电荷,Zeta 电位 -40.59 mV。由于壳聚糖纳米粒具有带正电荷的基团,故 Mt-BH/CS NPs 和载药壳聚糖纳米粒(BH/CS NPs)与黏膜混合前的 Zeta 电位为正值,分别为 29.18, 34.32 mV;但与黏膜均匀混合后,二者的 Zeta 电位分别为 25.88, 20.71 mV,说明纳米粒上面带正电荷的基团可以与黏膜中带负电荷的基团发生静电作用,从而使纳米粒的 Zeta 电位下降。此结果与 Bhatta 等^[9]和 Mahmoud 等^[10]研究的壳聚糖纳

米粒黏附性相似,即纳米粒与黏膜混悬后导致 Zeta 电位下降。除此之外,相比 BH/CS NPs, Mt-BH/CS NPs 电荷降低的幅度较小,可能是由于 BH/CS NPs 的 Zeta 电位绝对值更高,与黏膜的作用更强烈而导致的;也可能与 Mt-BH/CS NPs 中引入了蒙脱石后形成了较为特殊的纳米粒表面结构所致。

2.7 细胞毒性试验 人永生角膜上皮细胞系由合作单位青岛眼科所赠送,开展细胞复融,反复摸索培养条件,最终培养出了健康的人永生角膜上皮细胞。以噻唑蓝(MTT)法^[11]评价盐酸倍他洛尔水溶液、空白壳聚糖纳米粒和 Mt-BH/CS NPs 的细胞毒性。待人永生角膜上皮细胞培养到 70% ~ 80% 融合后,于 96 孔板中接种细胞,每孔细胞数 1×10^4 个,培养 16 h 待贴壁后,弃废液,加入相应样品,使样品暴露于细胞表面一段时间后,换上新鲜培养液继续培养 24 h,再弃废液,加入含 MTT 的不完全培养基继续培养 4 h,移去含 MTT 的培养液,加二甲亚砜 150 μL 萃取,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温震荡 20 min,于 490 nm 处测定 A,按 $A_{\text{实验组}}/A_{\text{对照组}} \times 100\%$ 计算细胞存活率。

利用 MTT 试验进行细胞毒性试验,分为盐酸倍他洛尔水溶液组, Mt-BH/CS NPs 组和空白壳聚糖溶液组,每个试验组各加入样品 20, 50, 80 μL 与细胞接触 240 min。结果表明盐酸倍他洛尔水溶液组的存活率分别为 38.64%, 23.68%, 16.69%; Mt-BH/CS NPs 组的细胞存活率分别为 63.17%, 27.27%, 19.65%; 空白壳聚糖纳米粒组的细胞存活率分别为 100%, 50.42%, 33.31%。说明 3 个样品组对人永生角膜上皮细胞的毒性均呈现随样品加入量的增大而增大。在低剂量时,样品对人永生角膜上皮细胞的毒性的顺序为盐酸倍他洛尔水溶液 > Mt-BH/CS NPs > 空白壳聚糖纳米粒,说明盐酸倍他洛尔水溶液对人永生角膜上皮细胞显示出较大的毒性,其表现出来的细胞毒性甚至比 Mt-BH/CS NPs 的毒性还要大。空白壳聚糖纳米粒的人永生角膜上皮细胞的毒性最小,说明壳聚糖在眼部给药应用中安全性和刺激性相对较好。将 Mt-BH/CS NPs 20 μL 暴露于细胞表面 30, 120, 240 min 的细胞存活率分别为 82.27%, 77.79% 和 63.17%, 说明随着样品与细胞接触时间越长,细胞的存活率存在降低的趋势,不过即便接触时间延长至 4 h,人永生角膜上皮细胞的细胞存活率仍有 63% 左右,说明 Mt-BH/CS NPs 对人永生角膜上皮细胞无明显毒性。

3 讨论

体外释放试验表明 Mt-BH/CS NPs 缓慢释放出所包载的药物,延长释放时间长达 10 h 以上,从而大大改善了水溶性药物的释放性能。这应该归因于蒙脱石对盐酸倍他洛尔的特征吸附-解吸附与离子交换协同产生的缓释作用,同时 Mt-BH 镶嵌于壳聚糖内也可以延长药物分子在壳聚糖高分子内扩散所经历的路径,使 Mt-BH/CS NPs 相对于原料药具有明显的缓释性能。由于角膜前黏膜带负电荷,能与正电荷发生静电作用,因此选用具有氨基基团的壳聚糖,其在酸性条件下带正电荷,使其与带负电荷的眼部黏膜发生静电作用,从而延长药物在角膜前的滞留时间,改善药物在眼部的生物利用度^[12-13]。黏膜黏附性试验中也发现 Mt-BH/CS NPs 与黏膜混合后 Zeta 电位降低,说明该纳米粒与黏膜发生了静电相互作用,提高了药物的生物黏附性。

长期以来,眼用药物的毒性研究使用的都是整体动物或者动物离体角膜。为了获得眼部测定样本,研究中要处死大量动物,另一方面采用动物离体角膜进行体外药物研究也存在诸多问题,诸如角膜在离体之后活性降低、成本较高及伦理和动物保护方面的因素,且动物与人角膜存在种属差异^[14]。而培养永生角膜上皮细胞能够有效解决以上诸多问题。常用于表征角膜屏障功能并用于体外毒性研究的人角膜上皮细胞的培养模型主要有原代角膜上皮细胞培养模型和永生角膜上皮细胞培养模型。由于原代角膜上皮细胞培养模型的跨膜电阻值偏低、屏障特性较弱且寿命较短,使得永生角膜上皮细胞培养模型经过处理后延长了细胞的寿命,改善了细胞生长特征,使之更接近于在体环境的角膜上皮细胞^[15]。基于以上原因建立人永生角膜上皮细胞培养模型,并用该模型研究药物的角膜上皮细胞的毒性。采用该模型对 Mt-BH/CS NPs 进行细胞毒理学评价,可为蒙脱石与壳聚糖结合应用提供了细胞刺激方面的依据和参考。

本实验室成功采用温和的离子凝胶法制备了 Mt-BH/CS NPs,并考察了 Mt-BH 的离子交换性能、缓释性能及结合壳聚糖的黏附性能,使离子交换 Mt-BH/CS NPs 既获得了延长药物释放的缓释作用,同时又提高了药物的生物黏附性能,以期减少药物的不良反应,从而获得该新型给药系统在眼部给药中的潜在应用价值。但实验中未对纳米粒与黏膜相互作用引起 Zeta 电位降低的机制进行详细研究,后续需深入研究证实。

[参考文献]

- [1] Osborne N N, Ugarte M, CHAO M, et al. Neuroprotection in relation to retinal ischemia and relevance to glaucoma [J]. *Surv Ophthalmol*, 1999, 43 (Suppl 1) : S102-S128.
- [2] Enríquez de Salamanca A, Diebold Y, Calonge M, et al. Chitosan nanoparticles as a potential drug delivery system for the ocular surface; toxicity, uptake mechanism and *in vivo* tolerance [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006, 47 (4) : 1416-1425.
- [3] Calvo P, Vila-Jato J L, Alonso M J. Evaluation of cationic polymer-coated nanocapsules as ocular drug carriers [J]. *Int J Pharm*, 1997, 53 (1) : 41-50.
- [4] Azhar F F, Olad A. A study on sustained release formulations for oral delivery of 5-fluorouracil based on alginate-chitosan/montmorillonite nanocomposite systems [J]. *Appl Clay Sci*, 2014, doi: org/10.1016/j.clay.2014.09.004.
- [5] 方颖颖, 郑高利. 蒙脱石作为药物载体的研究进展 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2011, 16 (8) : 956-960.
- [6] HOU D Z, GUI R Y, HU S, et al. Preparation and characterization of novel drug-inserted-montmorillonite chitosan carriers for ocular drug delivery [J]. *Adv Nanoparticles*, 2015, 4 (3) : 70-84.
- [7] 侯冬枝, 桂茹艺, 胡晟, 等. 一种壳聚糖包裹载药蒙脱石的新型给药系统的制备方法: 中国, 2014107133771 [P]. 2015-04-08.
- [8] 胡晟, 侯冬枝, 潘育方, 等. 盐酸倍他洛尔-蒙脱石离子交换微球混悬剂的制备及质量评价 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21 (19) : 14-18.
- [9] Bhatta R S, Chandasana H, Chhonker Y S, et al. Mucoadhesive nanoparticles for prolonged ocular delivery of natamycin: *In vitro* and pharmacokinetics studies [J]. *Int J Pharm*, 2012, 432 (1/2) : 105-112.
- [10] Mahmoud A A, El-Feky G S, Kamel R, et al. Chitosan/sulfobutylether- β -cyclodextrin nanoparticles as a potential approach for ocular drug delivery [J]. *Int J Pharm*, 2011, 413 (1/2) : 229-236.
- [11] Gokce E H, Sandri G, Bonferoni M C, et al. Cyclosporine A loaded SLNs: Evaluation of cellular uptake and corneal cytotoxicity [J]. *Int J Pharm*, 2008, 364 (1) : 76-86.
- [12] Yamaguchi M, Ueda K, Isowaki A S, et al. Mucoadhesive properties of chitosan-coated ophthalmic lipid emulsion containing indomethacin in tear fluid [J]. *Biol Pharm Bull*, 2009, 32 (7) : 1266-1271.
- [13] De Campos A M, Sánchez A, Alonso M J. Chitosan nanoparticles: a new vehicle for the improvement of the delivery of the drugs to the ocular surface. Application to cyclosporine A [J]. *Int J Pharm*, 2010, 224 (1/2) : 159-168.
- [14] Toropainen E, Ranta V P, Talvitie A, et al. Culture model of human corneal epithelium for prediction of ocular drug absorption [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001, 42 (12) : 2942-2948.
- [15] Kim C W, Go R E, Lee G A, et al. Immortalization of human corneal epithelial cells using simian virus 40 large T antigen and cell characterization [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2016, doi: 10.1016/j.vascn.2015.11.005.

[责任编辑 刘德文]