

细胞穿膜肽修饰的缩宫素脂质体的制备及经鼻入脑的靶向性研究

吕风梅, 梁会敏, 随力, 刘哲鹏*

(上海理工大学, 上海 200093)

摘要: 以逆向蒸发法制备脂质体 (liposomes, LPs) 负载水溶性多肽药物缩宫素 (oxytocin, OT) 以制备缩宫素脂质体 (OT@LPs), 并以阳离子型细胞膜穿透性寡肽—八聚精氨酸 (arginine octamer, R8) 进行表面修饰得细胞穿膜肽 R8 修饰的缩宫素脂质体 (OT@LPs-R8) 以赋予脂质体黏膜黏附性, 并初步评价其鼻腔给药后脑内递药特性。结果表明, OT@LPs-R8 形态圆整, 粒径分布在 110.2 ± 7.3 nm, 表面电位高达 +18 mV, 载药量为 (62.17 ± 1.88) %, 包封率为 (5.85 ± 0.72) %, 在鼻黏液中稳定, 且对鼻黏膜无刺激性, 鼻腔给药后可显著延长滞留性, 增强脑内分布。动物实验符合复旦大学实验动物科学部关于动物实验伦理的规定, 并在通过复旦大学动物伦理委员会审查后进行。本研究表明, 鼻腔给予 OT@LPs-R8 能够促进缩宫素由鼻直接入脑, 有望成为向脑内递送缩宫素的新型载体。

关键词: 缩宫素; 细胞穿膜肽; 八聚精氨酸; 脂质体; 黏膜黏附性; 经鼻入脑

中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)02-0500-07

Preparation of oxytocin liposomes modified by cell penetrating peptides and evaluation on brain targeting efficiency *via* intranasal delivery

LÜ Feng-mei, LIANG Hui-min, SUI Li, LIU Zhe-peng*

(University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

Abstract: The water-soluble polypeptide drug oxytocin was encapsulated in liposomes by reverse-phase evaporation vesicle method to obtain oxytocin loaded liposomes (OT@LPs) which was further modified with cationic cell penetrating peptide—arginine octamer (R8) to get R8 modified oxytocin loaded liposomes (OT@LPs-R8) which showed enhanced mucoadhesive. The brain targeting efficiency was evaluated preliminarily after nasal administration. OT@LPs-R8 showed a round shape with a particle size distribution of 110.2 ± 7.3 nm, a surface potential as high as +18 mV, a drug loading (62.17 ± 1.88) %, an encapsulation rate (5.85 ± 0.72) %, and stood stable in nasal mucus. After nasal administration, it could significantly prolong the retention and enhance the distribution in the brain with no irritation to the nasal mucosa. The animal experiment in line with the regulations of the Department of Laboratory Animal Science of Fudan University on the ethics of animal experiments had been carried out after passing the review of the Animal Ethics Committee of Fudan University. The results showed nasal administration of OT@LPs-R8 could promote oxytocin directly into the brain from the nose which expected to become a new carrier for delivery of oxytocin to the brain.

Key words: oxytocin; cell-penetrating peptide; arginine octamer; liposome; mucoadhesive; nose-to-brain delivery

世界卫生组织调查数据显示, 全球约有 4.5 亿精神健康障碍患者, 截止到 2015 年, 全世界患有抑郁症的

人数已经远远超过 3 亿^[1]。精神障碍是严重慢性精神疾病且复发率高。缩宫素 (oxytocin, OT) 是一种环状的九肽分子, 近年来, 国内外临床研究表明 OT 在精神疾病方面具有治疗效果^[2-5]。国内市售的 OT 鼻喷雾剂 (oxytocin nasal spray)——奥赛托星®经鼻给药后可经

收稿日期: 2021-06-10; 修回日期: 2021-07-17.

*通讯作者 Tel: 13917505026, E-mail: zhepengliu@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0856

鼻黏膜迅速吸收而进入血液循环系统,但在脑内摄取率低。为发挥OT在精神疾病治疗方面潜力,应提高其在脑内的蓄积。对于脑部递送药物,血脑屏障(blood brain barrier, BBB)会限制大分子多肽蛋白类药物进入脑内发挥治疗作用,而经鼻给药能够绕过BBB,将药物直接递送至大脑^[6]。但多肽类极性药物的黏膜渗透能力差、因鼻黏液的更新而被清除^[7]或在鼻腔中易被酶降解,因此,经鼻入脑的药量仍然很低^[8]。幸运的是,纳米递药系统能够有效保护多肽蛋白类药物避免酶降解,Zaman等^[9]制备了负载OT的PLGA纳米粒,旨在经鼻入脑递送。但若显著提高治疗效果,仍需克服鼻黏膜屏障对纳米粒的阻碍^[10]。

细胞穿膜肽(cell-penetrating peptides, CPP)是一类可介导生物大分子或药物载体进入细胞的短肽, CPP修饰策略可以有效提高药物的胞内递送效率^[11]。研究表明, CPP在经鼻入脑给药中可显著增加纳米载体在嗅上皮的渗透能力^[12]。转录激活因子穿膜肽(trans-activator of transcription, TAT)修饰胶束经鼻递送喜树碱入脑治疗脑胶质瘤,显著提高脑内浓度,有效延长荷瘤小鼠的中位生存期^[13]。可见, CPP在促进大分子经鼻入脑递送方面非常有潜力。脂质体(liposomes)在经鼻入脑给药具有良好的应用前景,可较好地透过血脑屏障^[14,15],且经CPP修饰后可有效提高脑部分布^[6]。

本文以脂质体包载水溶性多肽药物OT(OT@LPs),并以阳离子型细胞膜穿透性寡肽——八聚精氨酸(arginine octamer, R8)进行表面修饰显著提高脂质体表面电位,以增强的静电吸引力与表面荷负电的鼻黏液相互作用提高其生物黏附性^[17]以延长其鼻腔滞留时间。由此构建新型经鼻入脑递释系统(OT@LPs-R8),对其理化性质进行表征,并初步评价其经鼻入脑的能力。

材料与方 法

药品与试剂 OT(上海苏毫亿明制药有限公司);胆固醇、蛋黄卵磷脂(大连美仑生物技术有限公司);水溶性近红外染料胺活性琥珀酰亚胺酯(cyanine 7 NHS ester, Cy7-NHS, 纯度 > 95%, 西安瑞禧生物科技有限公司);二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000(1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-[methoxy(polyethylene glycol)-2000], DSPE-PEG2000)、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000-马来酰亚胺(1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-[methoxy(polyethylene glycol)-2000]-maleimide, DSPE-PEG2000-Mal)(上海艾韦特医药科技有限公司);半胱氨酸-八聚精氨酸(cysteine-arginine octamer, Cys-R8, 纯度 > 98%, 吉尔生化有限公司);葡聚糖凝胶G50(南京

森贝伽生物科技有限公司);其他试剂均为分析纯。

仪器 核磁共振仪(Varian 400 MHz, 美国 Palo Alto 公司); Zetasizer 激光粒度仪(英国马尔文公司);岛津高效液相色谱仪(LC-20AT, 日本岛津有限公司); ZORBAX SB-C18 色谱柱 [250 mm × 4.6 mm, 5 μm, 安捷伦科技(中国)有限公司];透射电镜(FEI Tecnai G2 F20 S-TWIN, 美国 FEI 公司);活体光学成像系统[IVIS Lumina S5, 铂金艾尔墨(上海)有限公司]。

实验动物 实验小鼠(ICR小鼠)购于上海斯莱克实验动物有限责任公司,合格证号SCXK(沪)2017-0005,小鼠饲养于复旦大学药学院SPF级动物中心,动物实验符合复旦大学实验动物科学部关于动物实验伦理的规定,并在通过复旦大学动物伦理委员会审查后进行。

DSPE-PEG2000-R8 材料的合成与表征 通过DSPE-PEG2000-Mal的马来酰亚胺与Cys-R8末端半胱氨酸的巯基共价连接合成DSPE-PEG2000-R8。具体方法:精密称取DSPE-PEG2000-Mal 50 mg和Cys-R8 35 mg,以10 mL去离子水溶解,室温下以磁力搅拌器温和搅拌6 h。将反应液以去离子水透析3天(透析袋截留分子量1 500 Da)以除去反应液中过量的Cys-R8,冷冻干燥即得DSPE-PEG2000-R8。将DSPE-PEG2000-Mal和合成产物DSPE-PEG2000-R8分别溶解在氘代氯仿中,以核磁共振仪扫描检测验证产物。

R8 修饰的缩宫素脂质体(OT@LPs-R8)的制备 以逆向蒸发法制备包封水溶性多肽OT的脂质体^[18],精密称取胆固醇75 mg、蛋黄卵磷脂270 mg和DSPE-PEG2000 30 mg,以10 mL氯仿溶解得有机相;精密称取OT 30 mg以2 mL的低渗的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS, pH 5.6)溶解得到水相;将水相注入有机相中,以50 W探头超声5 min得到稳定不分层的油包水(W/O)型乳液;于40 °C水浴中负压旋转蒸发除去有机溶剂,补充低渗PBS(pH 5.6)溶液8 mL于60 °C水合40 min;以100 W探头超声5 min进行整粒;过葡聚糖G50凝胶柱层析法^[19]以除去游离药物,得到缩宫素脂质体(OT@LPs)。

将磷脂膜材更换为蛋黄卵磷脂270 mg、DSPE-PEG2000 24 mg和DSPE-PEG2000-R8 6 mg,其他处方和工艺步骤同上,最终制得R8修饰的缩宫素脂质体(OT@LPs-R8)。

OT@LPs-R8的理化性质表征

粒径分布及表面电位 取一定体积的OT@LPs和OT@LPs-R8溶液,以去离子水稀释至适宜浓度分别置于粒径池和电位池中,于25 °C下以激光粒度仪测定其粒径和zeta电位。

形态学考察 取OT@LPs和OT@LPs-R8溶液各

100 μL , 分别以去离子水稀释 10 倍后, 吸取 10 μL 稀释后的样品置于铜网上, 静置 10 min 后用滤纸吸去铜网上多余的样品, 室温下干燥, 在透射电子显微镜下观察其形态并拍照。

载药量和包封率 将 OT@LPs 和 OT@LPs-R8 冻干后, 精密称取一定量的冻干粉末, 乙腈溶解后过 0.22 μm 有机膜过滤, 以高效液相色谱法测定样品中 OT 的含量。检测波长为 220 nm, 流动相: A 相为 0.13 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaH_2PO_4 , B 相为体积分数 50% 的乙腈溶液, 流速: 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, OT 的保留时间为 9.58 min。按照表 1 的梯度设定流动相体积。按公式 (1) 和 (2) 分别计算脂质体的载药量 (drug loading, DL) 和包封率 (encapsulation efficiency, EE):

$$\text{DL}\% = \frac{W_1}{W_0} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{EE}\% = \frac{W_1}{W_2} \times 100 \quad (2)$$

其中, W_0 为脂质体总质量; W_1 为脂质体中 OT 质量; W_2 为处方中 OT 的投料量。

Table 1 Gradient of mobile phase for the analysis of oxytocin (OT). A: 0.13 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaH_2PO_4 ; B: 50% Acetonitrile

Time/min	A/%	B/%
0	70	30
25	15	85
35	70	30
40	70	30

稳定性 据文献^[20]报道鼻腔内的温度为 28~34 $^{\circ}\text{C}$, 一般采用 30 $^{\circ}\text{C}$ 模拟鼻腔温度, 鼻腔环境 pH 6.3~6.7, 一般采用 pH 6.6 模拟鼻腔环境 pH^[20]。将脂质体与等体积 pH 6.6 的 PBS 混合, 于 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴 8 h, 于 0.2、4.6 和 8 h 取样检测其粒径、多分散系数 (polydispersity index, PDI) 及包封率。

体外释放特性

OT 体外释放特性 以透析袋法考察其体外释放特性。将 OT 直接溶解在去离子水中以制备 OT 游离药 (OT-S); 分别取 OT@LPs、OT@LPs-R8 及等量的 OT-S 各 2 mL, 平行 3 份, 放置于预先处理好的透析袋 (截留分子量 3 500 Da) 内, 释放介质为 pH 6.6 PBS 50 mL, 于 30 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中 100 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 温和振荡, 在预定的时间点 0.5、1、2、4、6、8 和 10 h 各取样 1 mL, 同时补充等体积预热 PBS 以保持体积固定。取出的样品以表 1 所述的液相条件进样, 检测 OT 浓度, 计算并绘制其药物累积释放曲线。

Cy7 体外释放特性 将 50 μg 水溶性荧光探针 Cy7-NHS 与 30 mg OT 一同溶解于 2 mL 低渗 PBS 中得到水相, 按照前述的制备工艺, 制备 Cy7 标记的 OT 脂

质体 (Cy7-OT@LPs 和 Cy7-OT@LPs-R8)。

以透析袋法考察 Cy7 从脂质体内释放特性以证明 Cy7 标记的脂质体施用到小鼠体内时, 其荧光信号的强弱及位置可代表 OT。将 OT 和 Cy7-NHS 直接溶解在去离子水中以制备 OT 游离药 (Cy7-OT-S); 分别取 Cy7-OT@LPs、Cy7-OT@LPs-R8 及等量的 OT-S 各 2 mL, 平行 3 份, 放置于预先处理好的透析袋 (截留分子量 3 500 Da) 内, 释放介质为 pH 6.6 PBS 50 mL, 于 30 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中避光条件下 100 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 温和振荡, 在预定的时间点 0.5、1、2、4、6、8 和 10 h 各取样 1 mL, 同时补充等体积预热 PBS 以保持体积固定。以荧光分光光度计于激发波长 750 nm, 发射波长 773 nm 下测定各样品中 Cy7 的荧光信号强度, 并绘制 Cy7 释放曲线。

以 GraphPad Prism 软件分析 OT 和 Cy7 从不同制剂中的释放特性的相关性。

OT@LPs-R8 的脑靶向性初步评价

鼻黏膜刺激性 将雄性 ICR 小鼠随机分为 5 组, 每组 3 只。第 1 组小鼠鼻腔给予生理盐水; 第 2 组大鼠鼻腔给予 1% 十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS) 溶液; 其余 3 组小鼠分别给予 OT-S、OT@LPs 和 OT@LPs-R8。每日均给药 2 次, 每个鼻孔 10 μL , 连续 7 天。最后一次给药 24 h 后处死小鼠, 将带上皮细胞膜的鼻中隔与骨小心分离。分离出的组织样本以 4% 多聚甲醛固定, 切片机切片, 苏木精-伊红 (HE) 染色, 光学显微镜下观察形态。

鼻腔滞留性 按照前述方法制备 Cy7 标记的各脂质体。ICR 小鼠随机分成 3 组, 分别给予含同等浓度 Cy7 的 Cy7-OT-S、Cy7-OT@LPs 和 Cy7-OT@LPs-R8, 每组 3 只, 腹腔注射 8% 水合氯醛麻醉, 每个鼻孔给药 10 μL 。分别在给药后 0、1、2、4、6 和 8 h 以近红外荧光活体成像仪于激发波长 750 nm, 发射波长 773 nm 采集荧光信号并进行半定量分析。

体内分布 ICR 小鼠随机分成 3 组, 分别给予含同等浓度 Cy7 的 Cy7-OT-S、Cy7-OT@LPs 和 Cy7-OT@LPs-R8, 每组 3 只, 给药 20 μL , 每个鼻孔 10 μL 。鼻腔给药 2 h 后, 处死小鼠, 收集心、肝、脾、肺、肾和脑等重要脏器组织, 收集的组织样品用以近红外荧光活体成像仪采集荧光信号并进行半定量分析。

统计学分析 实验数据以平均值 \pm 标准差表示, 以 GraphPad Prism8.0 软件采用 *t* 检验分析比较各组数据, $P < 0.05$ 时被认为具有统计学意义。

结果与讨论

1 DSPE-PEG2000-R8 材料的合成与表征

反应物 DSPE-PEG2000-Mal 和反应产物 DSPE-

PEG2000-R8 的 $^1\text{H-NMR}$ 图谱如图 1 所示。比较两种物质的氢谱图可见, DSPE-PEG2000-Mal 图谱中的马来酰亚胺基团的特征峰 (δ 7) 在 DSPE-PEG2000-R8 的图谱上不存在。结果表明, DSPE-PEG2000-Mal 上的马来酰亚胺基团和 Cys-R8 上的巯基反应完全, 成功得到了 R8 修饰的功能化材料 DSPE-PEG2000-R8。

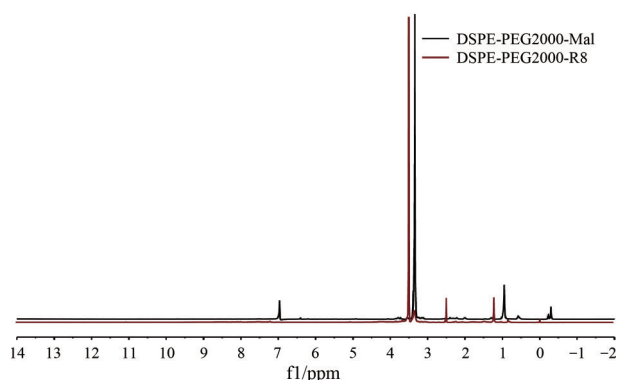


Figure 1 NMR spectrum of 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-[methoxy(polyethylene glycol)-2000]-maleimide (DSPE-PEG2000-Mal) and 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-[methoxy(polyethylene glycol)-2000]-maleimide-arginine octamer (DSPE-PEG2000-R8)

2 OT@LPs-R8 的理化性质

2.1 粒径分布及表面电位 以动态光散射法测定脂质体的粒径分布情况, 如图 2 和表 2 所示, OT@LPs 的粒径分布在 98 nm 左右, 表面呈电中性; OT@LPs-R8 的粒径分布在 110 nm 左右, 表面电位高达 +18.4 mV。经 R8 修饰后 OT 脂质体的粒径变化不大, 但电位显著提高, 表明 R8 成功修饰在脂质体表面。

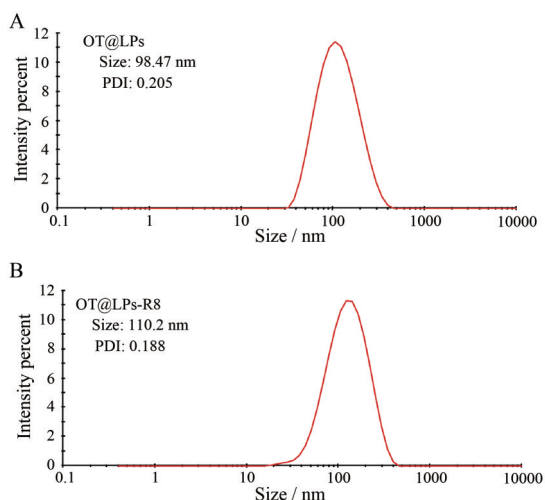


Figure 2 Particle size distribution of oxytocin loaded liposomes (OT@LPs, A) and arginine octamer (R8) modified oxytocin loaded liposomes (OT@LPs-R8, B). PDI: Polydispersity index

Table 2 Physicochemical properties of OT@LPs and OT@LPs-R8. $n = 3, \bar{x} \pm s$. EE: Encapsulation efficiency; DL: Drug loading

Physicochemical property	OT@LPs	OT@LPs-R8
Size/nm	98.47 ± 6.4	110.2 ± 7.3
PDI	0.205	0.188
Zeta-potential/mV	3.8 ± 1.3	18.4 ± 2.1
EE/%	61.23 ± 1.93	62.17 ± 1.88
DL/%	5.77 ± 0.57	5.85 ± 0.72

2.2 形态学 透射电镜图 (图 3) 显示, OT@LPs 和 OT@LPs-R8 呈球形或类球形, 边界清晰, 有良好的表面形态。脂质体粒径均在 90~120 nm, 大小均匀, 分散性良好。

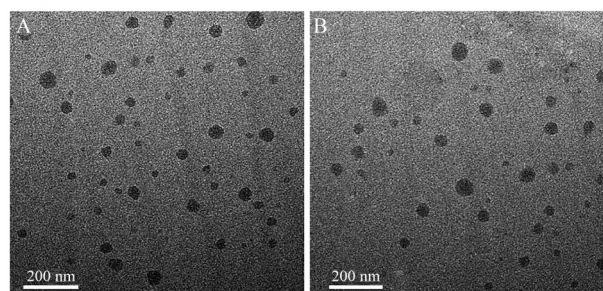


Figure 3 Transmission electron microscopic images of OT@LPs (A) and OT@LPs-R8 (B)

2.3 载药量和包封率 如表 2 所示, 经 R8 修饰后脂质体的载药量和包封率无明显变化, 二者的载药量均大于 5%, 包封率均大于 60%。

2.4 稳定性 由图 4 可见, 脂质体在模拟鼻腔环境中 8 h 后其粒径与包封率均无明显变化, 说明制备的脂质体在鼻腔环境下稳定, 无明显聚集和泄露情况, 为后续鼻腔给药奠定了稳定基础。

2.5 体外释放特性 以透析袋法考察 OT 脂质体的体外释放行为, 通过处理并分析数据, 得其释药曲线 (图 5A)。OT-S 有明显的突释行为, 1 h 后累积释药量将近 100%, 释药速度过快; 而脂质体组 OT@LPs 和 OT@LPs-R8 释放速度较慢, 累积释放 6 h 后释药量接近 100%。与游离溶液相比, 包裹在脂质体中的药物释放时间明显延长, 表明脂质体可能具有缓释效果, 为鼻黏液渗透争取了时间。此外, OT@LPs 和 OT@LPs-R8 的释药特性相似, 这有助于后期精确地比较 R8 修饰对促进药物经鼻入脑、体内分布的影响。

以透析袋法考察 Cy7 从脂质体内的释放特性, 结果如图 5B 所示。并以 OT 的累积释放量为横坐标, 以同时间点 Cy7 的累积释放量为纵坐标分析了两者的相关性, 如图 5C 所示, Cy7 的累积释放量与同时间点 OT 的累积释放量呈正相关, 且相关性系数均大于 0.9,

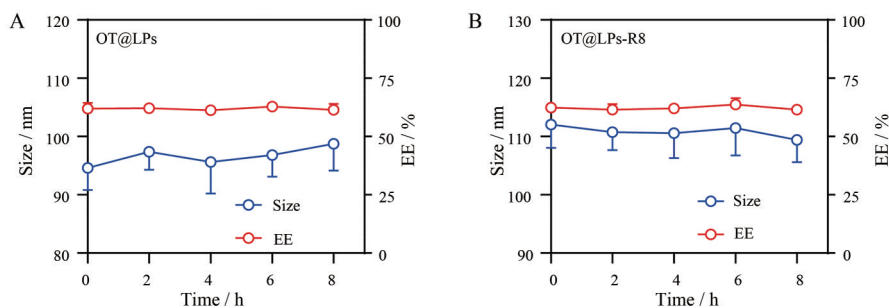


Figure 4 Stability of liposomes. A: OT@LPs; B: OT@LPs-R8. $n = 3, \bar{x} \pm s$

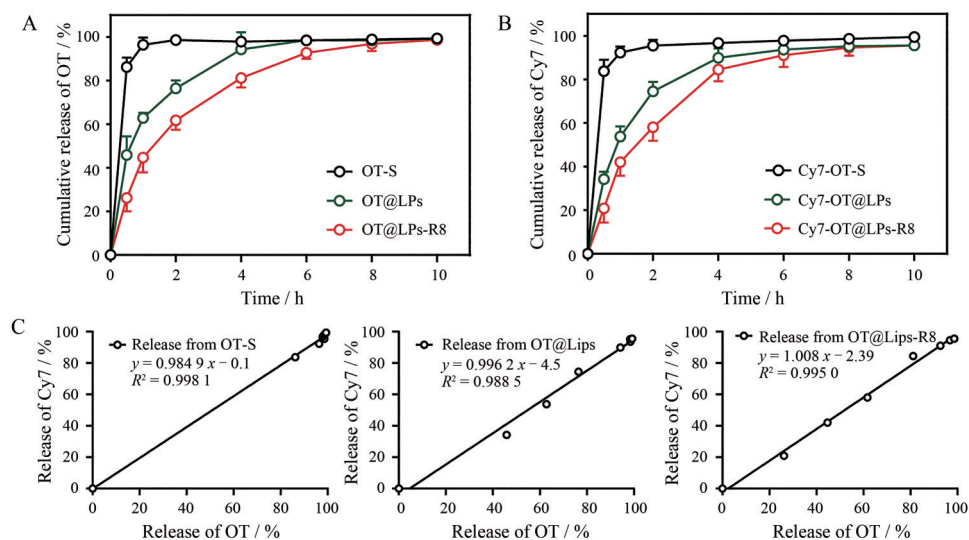


Figure 5 *In vitro* release behavior of liposomes. A: Cumulative release of OT; B: Cumulative release of Cy7; C: Correlation analysis between cumulative release of OT and cumulative release of Cy7 from various liposomes. $n = 3, \bar{x} \pm s$

表明以 Cy7 标记的脂质体施用于小鼠体内时, 其荧光信号的强弱及位置可以代表 OT 在小鼠体内的多少及位置。

3 OT@LPs-R8 的脑靶向性

3.1 鼻黏膜刺激性 鼻腔覆盖假复层纤毛柱状细胞, 这些细胞大部分被一层纤毛覆盖, 纤毛以协调一致的方式将黏液层推向咽部, 并有助于阻隔有害物质的入侵。

大鼠鼻腔黏膜的 HE 切片结果如图 6 所示, 图 6A 为生理盐水阴性对照组, 鼻腔给予生理盐水后, 鼻黏膜表面的纤毛排列整齐, 对鼻腔黏膜无明显损害。图 6B 为 1% SDS 阳性对照组^[16], 鼻腔黏膜完整性被破坏, 上皮细胞破坏较为严重, 发生皱缩, 细胞浸润生长。与阴性和阳性对照相比, OT-S (图 6C)、OT@LPs (图 6D) 和 OT@LPs-R8 (图 6E) 3 组的假复层纤毛柱状上皮几乎完整, 没有明显的损伤, 纤毛整齐排列于黏膜表面, 说明药物的游离溶液及脂质体相对安全, 对鼻黏膜无明显损伤, 可用于后续实验研究。

3.2 鼻腔内滞留性 图 7 显示鼻腔给药后不同时间 IVIS 成像测量的荧光强度。通过比较游离组 (OT-S) 与

脂质体组 (OT@LPs、OT@LPs-R8), 脂质体剂型在鼻腔中滞留的时间显著延长。OT-S 在鼻腔中 1 h 后荧光强度骤降, 给药 6 h 后已基本消失, 鼻腔内滞留量仅 5.43%, 这可能是游离药物被更快吸收与鼻黏膜纤毛清除的共同作用的结果; 与 OT@LPs 相比, 经 R8 修饰后的脂质体 OT@LPs-R8 在给药 8 h 后仍有较强的荧光, 鼻腔内脂质体滞留量高达 31.85%, 表明 OT@LPs-R8 在鼻腔中滞留的时间更长, 八聚精氨酸是阳离子型穿膜肽, 经 R8 修饰后显著提高了脂质体的表面电位, 增强了与鼻黏液间的静电作用^[17], 赋予脂质体的生物黏附性, 有效延长鼻腔内滞留时间。

3.3 体内分布 鼻腔给予 Cy7-OT-S、Cy7-OT@LPs 和 Cy7-OT@LPs-R8 2 h 后离体脏器的荧光分布结果如图 8 所示, 各组动物的肝、肾中均有荧光, 这很可能是因为药物于体内吸收后经肝脏代谢、肾脏排泄的缘故; 由鼻腔经呼吸道进入肺部故肺部可见明显荧光。游离组 (OT-S) 的荧光弱于脂质体组 (OT@LPs、OT@LPs-R8), 这可能是因为游离组经鼻给药后在体内吸收较快, 代谢的时间较短。与 OT@LPs 相比, OT@LPs-R8 在肺、肝

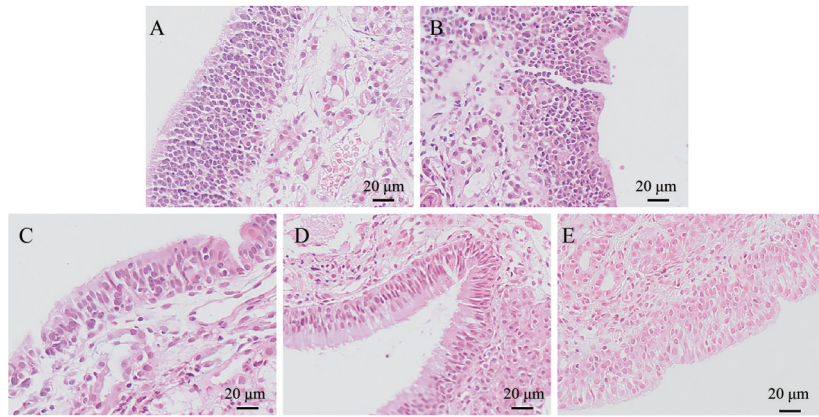


Figure 6 Evaluation of nasal mucosal irritation. HE stained histology section of nasal cavity mucosal. A: Normal saline; B: 1% Sodium dodecyl sulfate solution; C: Oxytocin solution (OT-S); D: OT@LPs; E: OT@LPs-R8

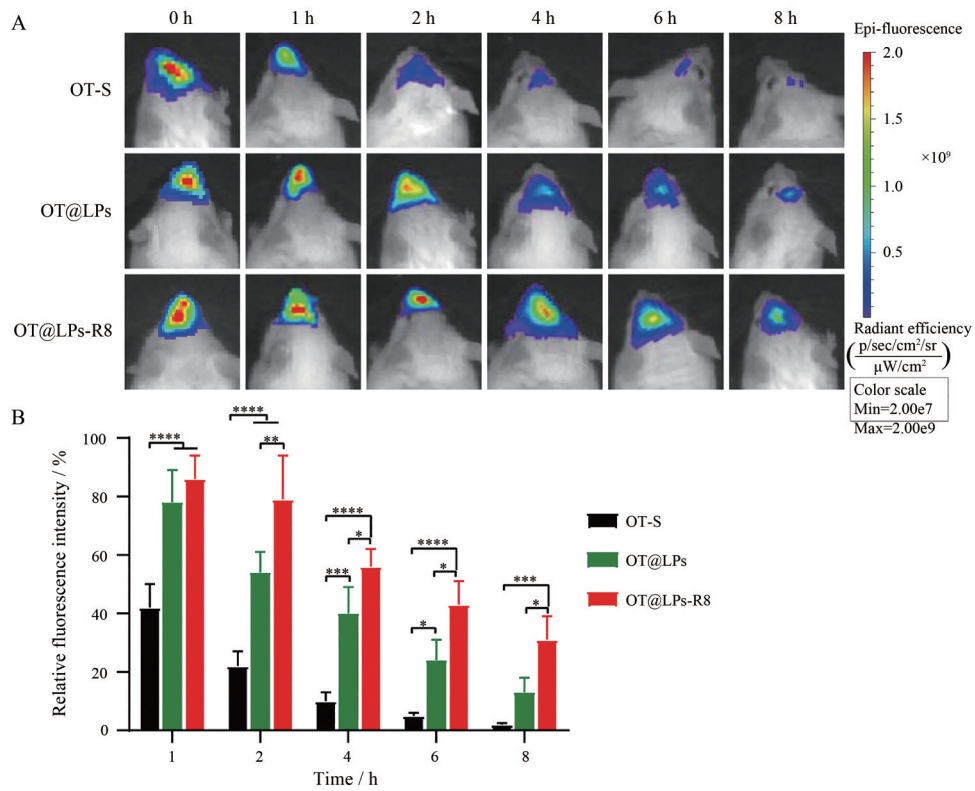


Figure 7 Retention of liposomes in nasal. A: Whole animal near-infrared fluorescence imaging after nasal administration; B: Semi-quantitative data of fluorescence intensity after nasal administration. $n = 3, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

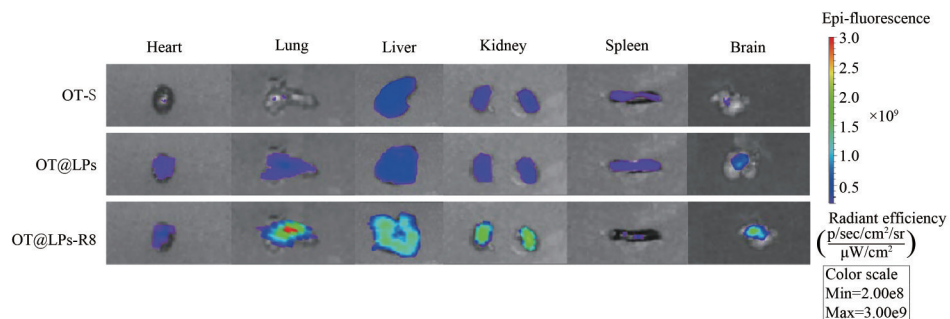


Figure 8 *In vivo* distribution of liposome: fluorescence imaging of isolated organs after 2 hours nasal administration

脏和肾脏的荧光信号更强,这可能是由于经细胞穿膜肽修饰后促进了鼻黏膜中脂质体的渗透吸收。分离出的各组脑组织以IVIS进行离体成像,脂质体组在脑内的荧光强度明显高于游离OT,其中,以OT@LPs-R8的荧光强度最高,且其脑内相对荧光强度是游离OT组的10倍(表3),说明细胞穿膜肽的修饰增加了药物在脑内的含量。

Table 3 Relative fluorescence intensity in brain after 2 hours nasal administration. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ vs OT-S group

Formulation	Relative fluorescence intensity	Multiple
OT-S	$9.53 \times 10^8 \pm 5.44 \times 10^7$	Set as 1
OT@LPs	$7.62 \times 10^9 \pm 4.95 \times 10^8$	8.00-fold***
OT@LPs-R8	$9.79 \times 10^9 \pm 7.76 \times 10^8$	10.27-fold***

结论

本文构建R8修饰的缩宫素脂质体(OT@LPs-R8)鼻腔给药后,显著延长鼻腔内的滞留时间,且给药2h后在脑内的分布明显高于其他游离OT和OT@LPs,显示出更佳的经鼻入脑靶向能力,对于难以透过血脑屏障的中枢活性多肽药物,LPs-R8是一个有潜力的载体系统。

致谢: 感谢复旦大学药学院提供实验仪器及科研平台。

作者贡献: 吕风梅和梁会敏负责实施实验;吕风梅负责数据处理;随力和刘哲鹏提出研究思路;吕风梅设计实验方案并撰写和修改论文。

利益冲突: 所有作者声明不存在任何利益冲突。

References

- [1] Robson SE, Repetto L, Gountouna VE, et al. A review of neuroeconomic gameplay in psychiatric disorders [J]. *Mol Psychiatry*, 2020, 25: 67-81.
- [2] Keech B, Crowe S, Hocking DR. Intranasal oxytocin, social cognition and neurodevelopmental disorders: a meta-analysis [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2018, 87: 9-19.
- [3] Guastella AJ, Hickie IB, McGuinness MM, et al. Recommendations for the standardisation of oxytocin nasal administration and guidelines for its reporting in human research [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2013, 38: 612-625.
- [4] Erdman SE, Poutahidis T. Microbes and oxytocin: benefits for host physiology and behavior [J]. *Int Rev Neurobiol*, 2016, 131: 91-126.
- [5] Li YG, Lin GY, Chen SS. New advances in oxytocin therapy for autism spectrum disorders [J]. *J Biol Edu (教育生物学杂志)*, 2018, 6: 38-41.
- [6] Illum L. Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2000, 11: 1-18.
- [7] Martin E, Schipper N, Verhoef JC, et al. Nasal mucociliary clearance as a factor in nasal drug delivery [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 1998, 29: 13-38.
- [8] Illum L. Nasal drug delivery--possibilities, problems and solutions [J]. *J Control Release*, 2003, 87: 187-198.
- [9] Zaman RU, Mulla NS, Keegan BG, et al. Nanoparticle formulations that allow for sustained delivery and brain targeting of the neuropeptide oxytocin [J]. *Int J Pharm*, 2018, 548: 698-706.
- [10] Kashyap K, Shukla R. Drug delivery and targeting to the brain through nasal route: mechanisms, applications and challenges [J]. *Curr Drug Deliv*, 2019, 16: 887-901.
- [11] Tashima T. Intelligent substance delivery into cells using cell-penetrating peptides [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2017, 27: 121-130.
- [12] Lu Y, Wang H, Jiang Y, et al. Cell-penetrating peptide-modified PLGA nanoparticles for enhanced nose-to-brain macromolecular delivery [J]. *Macromol Res*, 2013, 21: 435-441.
- [13] Tka B, Ht B, Ho B. Nose-to-brain drug delivery system with ligand/cell-penetrating peptide-modified polymeric nano-micelles for intracerebral gliomas [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2020, 152: 85-94.
- [14] Samaridou E, Alonso MJ, et al. Nose-to-brain peptide delivery-the potential of nanotechnology [J]. *Bioorg Med Chem*, 2018, 26: 2888-2905.
- [15] Costa C, Moreira JN, Amaral MH, et al. Nose-to-brain delivery of lipid-based nanosystems for epileptic seizures and anxiety crisis [J]. *J Control Release*, 2019, 295: 187-200.
- [16] Yang ZZ, Zhang YQ, Wang ZZ, et al. Enhanced brain distribution and pharmacodynamics of rivastigmine by liposomes following intranasal administration [J]. *Int J Pharm*, 2013, 452: 344-354.
- [17] Ci LQ, Huang ZG, Lv FM, et al. Enhanced delivery of imatinib into vaginal mucosa via a new positively charged nanocrystal-loaded *in situ* hydrogel formulation for treatment of cervical cancer [J]. *Pharmaceutics*, 2019, 11: 15-30.
- [18] Yu Y, Zheng Z, Yi C, et al. Preparation and *in vitro* evaluation of artemisinin loaded long-circulating liposomes [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2018, 53: 1002-1008.
- [19] Ding T, Guan J, Wang M, et al. Natural IgM dominates *in vivo* performance of liposomes [J]. *J Control Release*, 2020, 319: 371-381.
- [20] Sosnik A, Neves JD, Sarmiento B. Mucoadhesive polymers in the design of nano-drug delivery systems for administration by non-parenteral routes: a review [J]. *Prog Polym Sci*, 2014, 39: 2030-2075.