

鼻腔给药人体吸收的细胞模型方法学研究进展

谭立伟, 张宾, 孙歆, 王震宇* (四川普锐特药业有限公司, 成都 610041)

摘要: 经鼻给药具备起效快, 生物利用度高, 入脑效率高及非侵入性等优点。但复杂的鼻腔微环境, 如黏膜屏障、纤毛运动、低 pH 值的黏液层及酶降解等因素, 为鼻腔药物研发带来了诸多挑战。尽管大量动物试验方法已经为鼻腔药物的研发提供了研究手段, 但物种间的差异、高额的费用及较长的周期等因素限制了这些方法在研发中的应用, 特别是在新药临床前的化合物及处方早期筛选阶段。因此, 选择一种具备良好体内外相关性的鼻腔细胞模型用于指导药物的临床前研发成为了关键。基于鼻腔给药途径, 无论经鼻入脑或是经鼻入血, 上皮细胞的屏障作用均直接决定药物的生物利用度与药效。此外, 鼻腔药物黏膜刺激性等毒理评价也是研发成功的关键因素。因此, 本文归纳了现阶段基于鼻腔上皮细胞构建的体外鼻腔模型在鼻用制剂研发中的应用现状。

关键词: 经鼻给药; 鼻腔上皮; 体外细胞模型; 药物研发

中图分类号: R943 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2023)20-2851-09

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20231876

引用本文: 谭立伟, 张宾, 孙歆, 等. 鼻腔给药人体吸收的细胞模型方法学综述[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(20): 2851-2859.

Advance of Cell Model Methodology for Human Absorption Evaluation of Nasal Administration

TAN Liwei, ZHANG Bin, SUN Xin, WANG Zhenyu* (Shichuan Purity Pharmaceutical Co., Ltd., Chengdu 610041, China)

ABSTRACT: Intranasal administration has the advantages of quick onset, high bioavailability, potential delivery into brain, and non-invasive. However, the limitations of the complex nasal microenvironment, such as the mucosal barrier, ciliary movement, low pH mucous layer, and enzyme degradation, appear to be key challenges in nasal drug development. Although a large number of animal trials provide reference data for the development of nasal drugs, the species differences, high cost and long cycle make this approach more difficult to develop, especially in the high-throughput preclinical screening stage of new drugs. Therefore, it is critical to select a nasal model with good *in vitro* and *in vivo* correlation for preclinical drug research. Whether the targeting through the nasal into the brain or blood, the epithelial cell barrier directly determines the bioavailability and efficacy during the intranasal administration. Moreover, mucosal irritation is also one of the critical evaluations of the safety aspects during nasal drugs development, where cell model can be quite useful. Therefore, this review summarized the application of the *in vitro* nasal model based on nasal epithelial cells in the nasal drug development.

KEYWORDS: intranasal administration; nasal epithelium; *in vitro* cell model; drug developments

起效快, 无创, 顺应性高及避免肝脏和肠道首过代谢等优势促使鼻内给药途径作为一种非侵入性给药途径引起了人们的极大兴趣^[1-2]。目前已有包括小分子化合物、多肽、蛋白质及核酸药物等多种类型的药物经鼻腔途径进行局部或全身给药途径的研发^[3-6]。然而, 极小的鼻腔体积、黏膜纤毛清除作用, 以及黏液层的物理化学特性(低 pH、酶降解)等因素限制了该递送途径药物的广泛应用^[7]。因此, 在鼻腔途径药物研发过程中, 尤其在前期非临床研究中, 可靠的体外和体内模型必不可少。

与其他给药途径的药物研发类似, 大鼠, 兔、狗及猴等试验动物及其离体组织常被用于评价鼻

腔制剂的体内外分布、药效及毒性研究。鼻腔黏膜覆盖于整个鼻腔的骨性结构上, 但由于种属不同, 鼻腔结构差异较大, 体内给药的试验结果也受诸多因素影响。例如, 大鼠鼻腔狭窄且鼻腔容量有限, 滴鼻给药时, 无法充分模拟临床给药方式(鼻喷)的递送部位; 试验过程中动物挣扎或给药量不当, 存在药物流出或咽入胃肠道风险, 无法保证给药量精确; 动物体位不同也可能造成药物分布的差异, 大鼠仰卧位给药, 药物进入脑脊液的量可达水平位给药的 1 倍以上。另一方面, 不同种属的鼻腔黏膜细胞组成相似, 但鼻腔黏膜的结构厚薄、细胞种类、超微结构密度等随着位

作者简介: 谭立伟, 男, 博士, 高级工程师
zhenyu2.wang@scpurity.com

E-mail: rafael0927@163.com

*通信作者: 王震宇, 男, 博士

E-mail:

置有所不同。例如，鼻腔上部纤毛稀疏、腺体数量少，而靠近下部和后部的纤毛增多，腺体相对较少。因此，对于不同种属的离体组织，在使用上具有一定的差异。蟾蜍和青蛙上颌的纤毛与哺乳动物的鼻腔黏膜纤毛相似，故常用其在体和离体上颌法考察药物对纤毛的毒性，以及纤毛对药物的清除率。猪的鼻黏膜表面积较大，常用猪的离体鼻黏膜测定制剂与黏膜的黏附力。羊的鼻孔大，可剥离其鼻黏膜考察药物对鼻腔黏膜的透过性^[8]。尽管基于动物模型的非临床数据为后期的临床试验提供了指导性的支持，但解剖结构上的物种差异，与人体的数据未表现出绝对良好的相关性，这也是导致多数药物研发在临床期间未能达到主要终点的重要原因之一^[9-11]。不仅如此，动物实验的相关研究同样存在高额的费用及伦理的问题。药物研发通常有投资高、周期长、风险高等特点，为提高临床研发成功率，在新药的前期研究中，包括药物活性成分筛选及处方优化等阶段，对拟开发制剂的吸收、代谢及毒性的预测研究显得尤为重要，选择高效、直观、经济的评价模型则至为关键。对于鼻腔给药途径，无论经鼻入脑抑或是经鼻入血，鼻腔上皮细胞的屏障作用均直接影响药物的生物利用度与药效。因而，具有高体内外相关性的鼻腔黏膜模型有助于提高鼻腔药物的研发效率。鼻腔黏膜上皮细胞模型可一定程度模拟鼻腔生理环境而被用于药物研发中的吸收、代谢及毒性研究，并能够从细胞水平揭示拟研发目标与机体的作用机制。相较于试验动物及其离体组织，鼻黏膜上皮细胞模型具备以下几个优点：①细胞来源于人或动物的鼻腔组织，经条件孵育后可一定程度上模拟体内条件，且相对于离体组织在使用时间规划要求限制更低；②细胞模型的实验条件可控，标准化程度更高，重复性更佳；③更适合于药物转运途径、吸收代谢机制的研究；④来源限制更少，操作更为简单，经济成本较低，利于前期非临床研究对于目标分子、处方的快速筛选。基于以上背景，本文将介绍现阶段常用的基于细胞构建的体外鼻腔黏膜模型在鼻制剂非临床研究中的应用，用以预测/指导拟研发制剂的体内行为，评价制剂及处方的成药性。

1 鼻腔黏膜结构概述

鼻黏膜的上皮结构可分为 4 种类型：鳞状上皮、呼吸上皮、移行上皮和嗅觉上皮。其中，呼吸上皮和嗅觉上皮是物质的主要摄取部位^[12-15]。

嗅黏膜作为经鼻入脑途径主要通路，面积约占鼻腔表面积的 10%，主要包括作为上皮支持细胞的结构支撑细胞，来自鲍曼腺的管状管细胞和基底细胞(祖细胞)^[16-17]，此外，嗅区的嗅觉感觉神经元细胞，则是经上皮层连接大脑嗅球，可作为药物经嗅区入脑的细胞内通路。

呼吸道黏膜的表面积大和血管分布丰富等特点使其成为全身给药应用的关注点。其约占人类鼻腔面积的 80%~90%，是人类过滤空气和去除过敏原和微生物等颗粒的第一道防御线。人体呼吸道黏膜由多种细胞和腺体组成，包括杯状细胞、纤毛细胞、中间细胞、基底细胞、浆液腺、浆液黏液腺和上皮内腺^[15]，见图 1。与嗅神经元细胞类似，三叉神经细胞也同样贯穿于呼吸黏膜中^[19]。呼吸黏膜和嗅觉黏膜均由浆液腺产生黏液所覆盖，主要起分解蛋白及抗菌的作用。基底细胞在呼吸道黏膜中起着祖细胞的作用。此外，呼吸道黏膜中的纤毛细胞的作用则是将黏液推进鼻咽部后进行吞咽及消化^[20]。

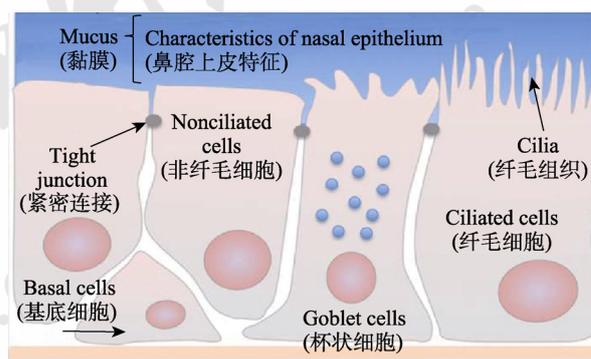


图 1 鼻腔上皮细胞的结构示意图^[18]

Fig. 1 Scheme of the nasal epithelial cells structure^[18]

现阶段研究表明，克服呼吸和嗅觉上皮屏障的吸收途径包括细胞内转运和细胞外途径。细胞内转运多为物质以内吞的方式进入细胞内，后外排至上皮层的另一端，例如经嗅神经元，沿其轴突转运到大脑；对于吸收入血则是药物通过胞吞作用穿过支撑细胞转运到下层的结缔组织(固有层)后进入血液循环^[21]。细胞外通路则是通过自由扩散的方式经细胞间隙从而跨过上皮层。因此，药物分子自身的亲脂性、相对分子质量以及制剂形成的颗粒大小则对于黏膜的透过效率尤为重要^[22]。

2 离体黏膜组织

目前，常用的离体黏膜组织可来源于人类及动

物。为保持离体组织活力,处死动物、组织获取及渗透测试之间的时间应尽可能短。研究报道表明最佳试验时间约为离体后的 0.5~4 h^[23-24]。但根据物种来源的不同,存在一定的差异。例如,来源于牛和兔的鼻黏膜,其具备用于渗透测试的时间分别为离体后的 3 h 和 10~12 h 内^[25-26]。此外,由于常温下离体黏膜即使在营养支持下其组织保持活性的时间也比较短,因此多数离体组织的保存方式为冷冻保存。但即使在-20 °C 条件下,存放时间也仅为 1 个月左右。有部分争议研究表明,在冷冻后的离体黏膜中的细胞已经死亡^[27],已不具备使用价值。而更多的研究者认为,该冷冻步骤不会改变该组织的屏障完整性,即使有部分细胞因存放工艺而失活,该组织仍可适用于渗透试验研究^[28]。

总的来说,基于离体组织的体外透过测试,不仅能够提供待测物的透过效率以预测其生物利用度等信息,还能够提供部分与待测物鼻腔安全性相关的信息。

3 细胞模型的构建与应用

现阶段对于离体鼻腔黏膜组织的使用为鼻腔制剂的研发提供了诸多方便,然而在实际使用中,离体的鼻腔组织仍具有一定的局限性,如动物黏膜存在组织厚度、代谢酶活性及种类的差异,而人源组织的来源不稳定与使用时限则大大限制了其应用的范围。此外,研究中的搅拌速率、试验温度、介质等实验参数不一致同样导致了试验结果的较大差异,从而无法对体内吸收行为进行准确的预测。基于以上考虑,使用更为标准、差异化更小的体外细胞模型似乎更为适用。相对于组织模型,细胞模型的评价标准更为单一化,获取途径更容易。目前,原代细胞和永生细胞均可用于构建体外鼻腔黏膜模型用于评价药物分子、

制剂的体外吸收。

3.1 模型构建的方法

基于 Transwell 小室的气-液界面法(air-liquid interface, ALI)和液-液培养法(liquid-covered culture, LCC)是现阶段体外鼻腔黏膜构建的主要方式,见表 1。

3.1.1 ALI 培育法 ALI 培养被认为是呼吸系统生理学高度相关的培养体系,能够克服 2D 培养存在的如组织特异性结构丢失,细胞分化缺失和屏障完整性受损等缺陷。细胞接种于 Transwell 小室后,首先淹没在培养基中培养到完全融合,再进行“air-lifted”处理,即让下部与基部表面的液体接触,顶端暴露在空气中,可以促使气道上皮细胞呈假复层形态、黏液纤毛分化和黏液分泌,并具有屏障功能等,从而很好地模拟上皮细胞的体内特性^[22]。

人鼻中隔鳞状癌细胞系(nasal septum squamous cell carcinoma, RPMI 2650)最早被用于 ALI 法构建鼻腔黏膜模型应用的永生系细胞。前期的研究中,研究人员认为 RPMI 2650 细胞系在常规 LCC 培养条件下未能以单层细胞分化生长,且同样未形成足够的紧密连接。因此有人提出,模仿呼吸道细胞的气-液界面,仅在 Transwell 小室的一侧添加培养介质,而另一侧暴露于空气中,从而有序地增强 RPMI2650 细胞分化,提高 RPMI2650 细胞孵化过程中的有序排列及紧密连接。近年来,包括人源上皮原代细胞、猪鼻腔上皮细胞均也逐渐采用 ALI 方式进行培养,并且在孵化的各阶段能够明显观察到纤毛的生长,见图 2。

3.1.2 LCC 培育法 相比于 ALI, LCC 培养法则是将细胞完全浸没于培养介质中,因此不会发生由于 LCC 到 ALI 转变而导致的如纤毛生长等组织学变

表 1 人原代鼻上皮细胞单层 LCC 与 ALI 培养条件的比较^[29]

Tab. 1 Comparison of LCC and ALI culture condition of primary human nasal epithelial cell monolayer for intranasal drug transport study^[29]

培养条件	LCC	ALI
细胞培养基	包含 10%FBS 的 DMEM 培养基	BEGM/DMEM-F12(50 : 50)培养基
培养方法	Transwell 上室和下室均充满细胞培养基,在定植细胞 24 h 后更换 1 次培养基,此后每 2 d 更换 1 次	在定植细胞 24 h 和 72 h 后更换 Transwell 上下室的培养基,随后将上室侧暴露在空气中,之后每 2 d 更换 1 次下室侧培养基
形态	扁平细胞(上皮厚度较低)	立方体或鹅卵石状外观(非常接近活体鼻组织)
纤毛和黏蛋白的相关基因表达	3 周内观察到纤毛细胞脱落、变平,微绒毛增多。黏蛋白基因表达相对较弱	3 周后,纤毛细胞数量明显增加,纤毛长而健康。与 LCC 相比,黏液蛋白基因表达增强
跨内皮电阻值 (transendothelial electrical resistance, TEER)	TEER 值在第 2 天出现最大值(约 2 000 Ω·cm ²),并迅速下降	最大 TEER 值(>3 000 Ω·cm ²)在第 5 天出现,较高的 TEER 值(>1 000 Ω·cm ²)持续>10 d

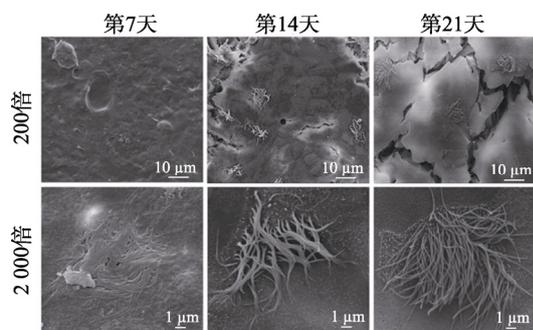


图2 原代猪气管上皮细胞在孵育第7, 14, 21天同一部位的电镜扫描图^[30]

Fig. 2 Scanning electron microscopy(SEM) analysis of primary porcine tracheal epithelial cells cultured under ALI conditions (on the 7th, 14th, 21st day)^[30]

化,但细胞间的紧密连接等基本结构仍然具备。不仅如此,LCC培养方式更为简单,重复性更强,更适用于规模化的高通量筛选。常用的细胞株包括人肺腺癌细胞(human lung adenocarcinoma cell line, Calu-3)、犬肾上皮细胞(madin-darbey canine kidney, MDCK)、人结直肠腺癌细胞(human colorectal adenocarcinoma cell, Caco-2)等,各种细胞的培养周期不同,但均以形成紧密连接,TEER电阻的显著升高,细胞模型中不同界面的4h液面差为模型构建成功与否的金标准。

3.2 常用原代细胞模型

原代细胞是直接从动物或人类供体中收集的细胞,后在体外细胞培养条件下孵育,进行模型构建。原代细胞选择原则需以试验需求为导向。比如对于用于鼻腔局部或经鼻入血的研究,则中鼻甲和下鼻甲中的黏膜细胞适用性较高。若用于鼻脑递送药物研究,则应提取嗅区的黏膜细胞用于培养建模。

对比不同来源的原代细胞模型,动物来源以大鼠为例,研究人员提出了体外构建嗅黏膜模型的标准,例如在0.9 cm²的Transwell小室中的细胞接种密度约为5×10⁵个细胞,孵育21 d后其TEER需>160 Ω·cm²,该模型的完整性需由该层的完整性通过羧化颗粒的非扩散得到证实(<0.001%),因此各组试验间具备较高的一致性^[31]。非人源的原代细胞来源更广,更易获得,能够一定程度上满足药物渗透性测试的需求,但由于种属差异,对于药效、毒理等方面的评价需求弱于人源细胞模型。

使用人类供体的主要局限性来源于伦理限制、低细胞分化效率、二次传代后细胞数量有限以及细胞源头的污染风险(例如真菌或细菌)。此

外,由于捐赠者的个体化差异,导致人源模型缺乏标准。然而,这些原代细胞具有分化为组织的优势,其异质性细胞组成在组织学上接近人鼻黏膜。此外,供体的特征(例如年龄、性别、健康状况等)可以是已知的,且可获得特定类型的细胞,从而构建例如具有患病状态的细胞药物研发模型。一些人类呼吸道和鼻腔上皮细胞培养体系,如已经商业化的EpiAirwayTM和MucilAirTM系统,已经被开发用于评估药物经鼻途径的吸收情况。这些体系一般由人体的气管/支气管(EpiAirwayTM)和支气管(MucilAirTM)的上皮细胞和杯状细胞组成,具有三维黏液纤毛组织模型。尽管如此,相对高的成本和使用时间的滞后仍然是此类体系广泛使用的限制因素。例如,EpiAirwayTM在4℃下储存的保质期(包括样品的交付时间)可能仅为3 d,且不建议超过该储存期限后使用^[32]。然而,不可否认的是,该类基于离体细胞的鼻黏膜模型,相对于纯粹的永生系细胞模型,更能够充分反映屏障、黏液纤毛反应、感染、毒性反应和疾病的体内表型。不仅如此,该类模型不仅可用于评价待测药物在人类鼻腔中的通透性,还可用于毒性和病毒感染研究等。

再者,与来源于成体细胞不同,近年来通过培育干细胞构建的鼻腔黏膜类器官被认为具备关键功能、结构和生物复杂性^[33]。由于来源主要为成体干细胞、多功能诱导干细胞等,其相对应的“干性和功能性”以及培育流程的标准化,能够避免如离体组织、原代细胞因来源、遗传变异所导致的模型差异性。不仅如此,与传统的二维培养和动物模型相比,类器官培养在体外重现体内组织样结构和功能的同时,在模型中仍具有患者特异性。类器官培养相对于动物模型更易于操作和深入的生物学研究。基于对于鼻腔结构的理解^[34],近年来鼻腔类器官同样成为了药物在非临床研究中的应用热点。

总之,这些基于原代细胞构建的鼻腔黏膜模型仍然被认为是经鼻吸收药物研究的具有实用价值的工具。

3.2.1 EpiAirwayTM EpiAirwayTM是一种即用的3D黏液纤毛组织模型,来源于正常/病患的人源气管/支气管上皮细胞组成,或正常的人基质成纤维细胞(EpiAirwayTM)共培养系统。在ALI培养后,EpiAirwayTM可重现屏障、黏液纤毛反应、感染、

毒性反应和疾病的体内表型，见图 3A。EpiAirway™ 可用于广泛的高预测性体外应用的短期急性或长期慢性研究。EpiAirway™ 显示了人体相关的组织结构和细胞形态，具有高度的一致性和重复性，见图 3B。它的三维结构由有序表达角蛋白 5(Keratin 5)为特征的基底细胞、产生黏液蛋白(MUC5AC)的杯状细胞、紧密连接结构(以 E-cadherin 为特征)和波动纤毛(以 Vimentin 为特异性指标)组成。EpiAirway™ 将人类成纤维细胞纳入细胞外基质中，适合炎症和纤维化研究。

3.2.2 MucilAir™ 与 EpiAirway™ 类似， MucilAir™ 模型同样来源人类。不同在于，其可根据病理模型需要，可选择来源于健康人、COPD 患者、哮喘患者、多种突变的囊性纤维化患者，过敏性鼻炎患者及吸烟者的人体细胞。MucilAir™ 由基部、纤毛和杯状细胞 3 种细胞组成，并将其置于全球通用的 24 孔板中使用。MucilAir™ 系统的微观组成见图 4，可以清晰地观察到各类细胞、纤毛横切面、微管组织、细胞间的紧密连接以及初期状态的纤毛等结构，并能够进一步观察到纤毛的运动^[35]。因此，MucilAir™ 模型几乎复制了鼻腔的生理状况^[36]。

3.2.3 鼻腔类器官 类器官培养已被广泛应用于药物发现、个性化伴随诊断和细胞治疗等领域^[37]。

基于对于鼻腔结构的理解，近年来鼻腔类器官同样成为了药物在非临床研究中的应用热点。相比于其他原代细胞模型，类器官同样可生成具备如黏液产生、纤毛摆动等相对完整的鼻腔微环境。近年来有研究表明，鼻腔呼吸上皮基底细胞可能具有干细胞/始祖细胞的功能，具备向纤毛细胞、柱状纤毛细胞及杯状细胞分化的潜力。在一项研究中，汪珂等^[38]使用离体人鼻息肉及中鼻甲组织分离培养具有干性的人鼻腔纤毛上皮细胞，运用 Hans Clevers 培养基体系并基于 ALI 方法，构建了一种包含基底细胞(P63)、杯状细胞、纤毛细胞等细胞组分及有纤毛功能和分泌功能的鼻腔类器官。

目前，鼻腔类器官已经应用于活性成分筛选，呼吸系统发育机制探索及体外疾病模型构建等方面，但疾病方面目前仅限于具有相对简单遗传基础的罕见呼吸系统疾病(如囊性纤维化)及来源于患者的肿瘤疾病^[39]。尚未有用于经鼻药物吸收方面的研究。但随着如培养工艺的逐渐稳定与标准化，干细胞来源的伦理性及可靠性等现有类器官局限性突破，鼻腔类器官模型有望在未来作为经鼻给药制剂非临床评价的重要方式。

3.3 永生系细胞模型

永生系细胞模型相对于原代细胞模型更易于获取、存储、培养及标准化制定。到目前为止，

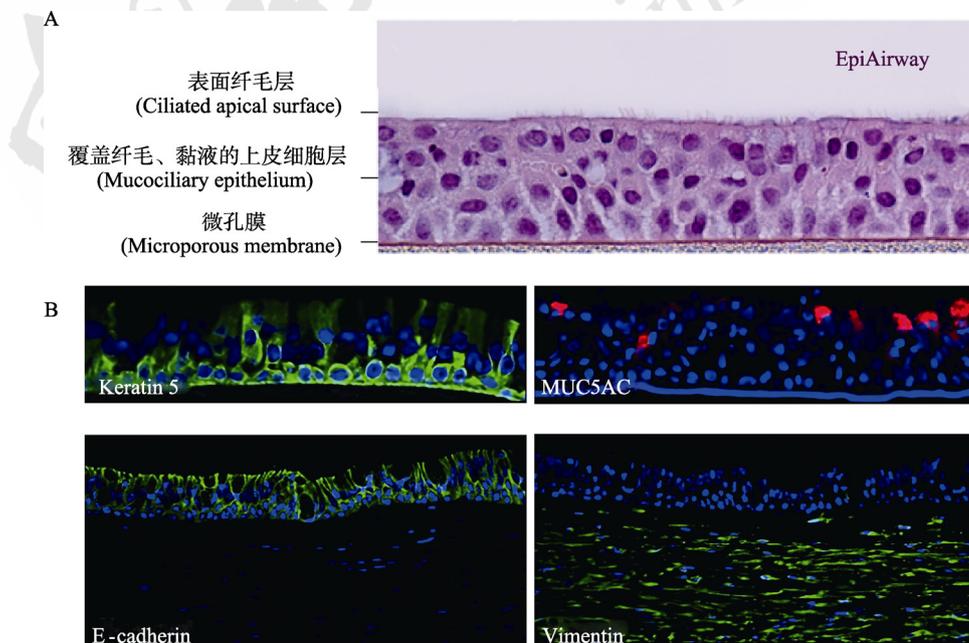


图 3 EpiAirway™ 结构示意图^[35]

A-EpiAirway 的黏膜层；B-EpiAirway™ 的细胞间结构。

Fig. 3 Scheme of EpiAirway™ structure^[35]

A-mucosal layer of EpiAirway™; B-intercellular structure of EpiAirway™.

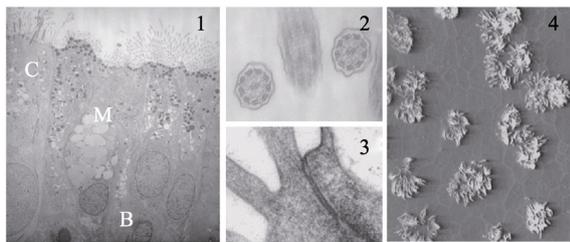


图4 MucilAir™的微观结构图^[36]

1-MucilAir™径向切片：C为纤毛细胞；M为黏液细胞；B为基底细胞；2-纤毛横切面，可见微管组织；3-MucilAir™ 2个细胞之间的紧密连接；4-纤毛开始生长图片。

Fig. 4 Microstructural diagram of MucilAir™^[36]

1-Radial cut of MucilAir™: C was ciliated cells; M was mucus cells; B was basal cells; 2-cross section of cilia, the microtubules' organization was visible; 3-tight junction between two cells of MucilAir™; 4-beginning of ciliogenesis.

常用的永生系细胞(包括人源鼻腔永生细胞)有鼻腔上皮细胞 RPMI 2650 细胞系、Calu-3 细胞系、MDCK 细胞系、Caco-2 细胞系等。

3.3.1 RPMI 2650 细胞 RPMI 2650 细胞从鼻中隔鳞状细胞癌中分离，它们与鼻黏膜的主要区别是没有睫状体运动和多层细胞生长，但尽管存在这些差异，RPMI 2650 细胞对亲水、亲脂和大分子量化合物的鼻黏膜通透性相似^[40]。该细胞模型最初用于代谢研究(例如降解试验)，后用于优化培养方案后(ALI)的药物的转运研究。RPMI 2650 模型的培养周期一般为2周，TEER 值 $>100 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ^[41]。对于 Transwell 隔膜材料选择，RPMI 2650 细胞的首选为聚对苯二甲酸乙二醇酯(polyethylene terephthalate, PETT)或聚酯(polyester, PE)，并根据细胞生长或黏附情况，可选择性的涂覆胶原蛋白^[42-43]。然而，越来越多的研究指出，相比于其他细胞，由于缺乏紧密连接形成和 TEER 值不足，限制了其在药物转运研究中的应用。因此，其多被应用于药物的黏膜毒性、纤毛清除效率等参数考察。

3.3.2 Calu-3 细胞 Calu-3 细胞源于人支气管黏膜下层腺癌中分离，并在纤毛细胞和黏液分泌细胞的混合表型中分化成具有紧密连接的细胞单层，且具备纤毛和黏液等呼吸道上皮特征。因此，Calu-3 单分子层与鼻组织在形态上有一些相似之处(如纤毛、黏液产生和紧密连接的存在)^[44]。此外，Calu-3 细胞模型构建的薄膜材料为包裹胶原蛋白的 PETT 或 PE，其在 LCC 条件下的 TEER 可达 $500 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 左右，而 ALI 条件下约为 $70 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 。培养周期为 9~10 d^[45-46]。相对于 LCC 培养，ALI 条件下的 Calu-3 细胞呈更明显的柱状上皮、黏液分泌及微绒毛的结构，适用于体外鼻腔黏膜毒性

相关评价^[47]。对于药物吸收相关评价，有研究表明，Calu-3 细胞相对于 RPMI 2650 细胞，其细胞间具备更完整的紧密连接，可避免不溶性颗粒通过细胞间隙引起较大的试验误差。但这一特点在测试低渗透性化合物的渗透性时，使用 Calu-3 细胞模型可能需要使用如 LC-MS/MS 等相对更为精密的分析方法，因为其在受体室中获得的分析物浓度相对 RPMI 2650 细胞明显较低^[48]，对于检测设备的要求更高。此外，尽管 MDCK 细胞系同样能够形成完整的紧密连接屏障，但 MDCK 存在易形成多层细胞黏膜结构的缺陷，而 Calu-3 细胞模型的单层细胞特征在测定药物渗透性的研究中提供了更好的重复一致性。不仅如此，多种转运体、代谢酶系的相关蛋白在 Calu-3 细胞中的表达，如 MRP3、BCRP、CYP1A，对于评价候选化合物的吸收、代谢途径具有显著的指导意义^[49]。综上所述，Calu-3 细胞模型具有可连续培育、紧密连接完整的单层膜结构及蛋白表达特点，且不会过度生长，易于培养与维护。

3.3.3 MDCK 细胞 MDCK 细胞来源于考克斯班尼犬肾脏，被广泛用作远曲小管或集合管的模型。其生长、增殖和分化迅速，一般接种 3 d 后即可形成紧密连接，可用于药物转运研究。目前作为模拟穿过血脑屏障转运的潜在替代模型，其细胞间高表达的 p-糖蛋白和紧密连接蛋白如 claudin-1、claudin-4 和 occludin，对于透过吸收模型需求十分契合。此外，尽管 MDCK 细胞源于非呼吸道组织，但有研究表明，相对于 Calu-3、Caco-2 及原代细胞产品 MucilAir™ 和 EpiAirway™，基于 MDCK 细胞构建的鼻腔黏膜体外模型所获得体内相关性更佳。另外，由于 MDCK 细胞具有构建周期短，转运体相关的表达效应高等特点，被越来越多的应用于包括鼻腔黏膜模型的构建，测定药物的透过系数及外排比等重要参数^[32]。

4 细胞模型在药物研发中的应用特征分析

近年来，各种培养细胞的黏膜模型已被用于药物的转运、代谢机制及安全性研究。且大多数的报道均宣称其使用的细胞模型具有良好的体内相关性，然而事实上在一定方面仍存在潜在的差异。

在一项比较 RPMI 2650 细胞和 Calu-3 细胞模型测定药物渗透效率的研究中，研究者对多种市售鼻制剂在 2 种细胞模型进行了透过系数的测定，

发现同一模型中,除了部分由于稀释显著改变了渗透压的药物,不同的稀释倍数对于同一药物的表观渗透系数(apparent permeation coefficient, P_{app})值影响不大,这表明细胞模型对于药物本身的透过性的评价不会因浓度的变化而变化。然而,对比同一药物不同的 2 种细胞结果,仍可明显观察到大多数药物在 RPMI 2650 细胞中所测得的 P_{app} 值明显高于在 Calu-3 细胞模型中获得的。这一现象可能是由于 RPMI 2650 细胞模型相对于其他细胞缺乏紧密连接形成,从而导致细胞间隙增加,提高了细胞旁路对药物的转运效率。因此,若基于 P_{app} 值推测药物的经鼻给药后的生物利用度,则应考虑选择同一种细胞进行对比测定。

此外,药物的理化性质对于细胞模型的选择同样重要。例如亲脂性药物对于细胞旁路的依赖明显弱于亲水性药物;而对于可能做为转运体底物的药物,则更应选择转运体表达相对较高的细胞系,如 Calu-3、MDCK-multidrug resistance gene 1 细胞^[48]。此外有研究者对比了现阶段 5 种常用的细胞模型,包括 Caco-2、Calu-3、MDCK、EpiAirway™ 和 MucilAir™ 模型,进行了体内外相关性的研究。研究表明,EpiAirway™ 测得的 TEER 值在 $180 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 左右,与 RPMI 2650 细胞模型类似,其细胞间隙较大无法形成致密的紧密连接结构,从而对于经细胞旁路透过的药物 P_{app} 值偏高。而 MDCK 细胞模型则相反,其 TEER $>900 \Omega \cdot \text{cm}^2$,能够形成致密的紧密连接结构,对于细胞旁路类药物的 P_{app} 值则相对偏低,然而二者对于以亲脂性为主要透过原理的药物则具有相类似的测定结果。此外,Caco-2、Calu-3 和 MucilAir™ 模型的 TEER 值在 $300\sim 500 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 左右,被认为是最接近鼻腔黏膜真实通透性。体内测定结果的差异性表明,MDCK 细胞模型所获取的 P_{app} 值与化合物在大鼠体内的生物利用度关联性最佳,分析原因可能为在体内环境中,纤毛运动、吞咽等额外问题导致了部分药物被清除,使实际的生物利用度偏低,从而与 MDCK 细胞模型获取的数据关联度增高。此外,在实际应用中,细胞模型的构建周期与使用时限同样值得关注^[32]。

综上所述,各细胞模型均具有各自的特点和局限,需对应待测药物、制剂的理化特征、试验计划周期及所寻求的信息选择适合的模型。基于药物研发的复杂性和递送沉积部位的多样性,选

择使用不同的细胞模型共同探索药物的吸收特征,将能够更加全面地预测药物在人体的 PK-PD 行为。

5 基于鼻上皮细胞模型的毒性评价

鼻黏膜上皮细胞模型可在一定程度上模拟人鼻腔生理状态,被广泛应用于鼻腔给药系统的毒理学评价,如常用于评价鼻腔药物或辅料的纤毛毒性,在鼻腔给药制剂的早期毒性筛选中发挥着重要作用。

制剂中的药物和辅料不会导致鼻腔功能的异常是鼻腔制剂研发的先决条件。其中鼻黏膜纤毛系统作为鼻腔防御机制的主要部分,药物的纤毛毒性则是鼻制剂毒理关键参数。纤毛毒性评价主要通过比较药物处理前后纤毛摆动情况,以纤毛摆动频率(ciliary beat frequency, CBF)、摆动协调性及变化可逆性等作为指标进行评价^[50-51]。

在一项研究常用鼻腔药物增溶剂的纤毛毒性试验中^[52],使用人鼻黏膜上皮细胞测定增溶剂对 CBF 的浓度依赖性影响。将切除的人鼻黏膜上皮细胞分别与不同增溶剂孵育 60 min 后,使用高速数字成像法测量各增溶剂对 CBF 的半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC_{50}),并在移除增溶剂后考察 CBF 的可逆程度。同时,通过测定各增溶剂 IC_{50} 浓度下对人鼻黏膜上皮细胞的乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)释放量的影响,评估增溶剂诱导的细胞毒性。增溶剂的 IC_{50} 值排序如下:甘油 $>$ 丙二醇 $>$ 聚乙二醇 300 $>$ *N,N*-二甲基乙酰胺 $>$ 聚乙二醇 400 $>$ 乙醇 $>$ 乙二胺盐酸盐 $>$ 聚乙烯吡啶酮 25 $>$ 聚乙烯吡啶酮 90。其中,丙二醇和聚乙二醇 300 在浓度为 30% 时显示出约 75% 的最高可逆性。LDH 试验结果表明,*N,N*-二甲基乙酰胺在浓度为 14.5% 时表现出最高的细胞毒性,为 5.2%。结果提示,几种增溶剂均可以改变 CBF 频率,从而对鼻黏膜产生影响。

由于防腐剂可能会损害黏液纤毛清除,Mallants 等^[50]研究了防腐剂对人鼻腔上皮细胞 CBF 的时间依赖性影响。使用苯扎氯铵、苯乙醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯和氯丁醇等 5 种防腐剂,在单次和重复暴露后,使用高速数字成像方法测定对 CBF 的影响。结果显示,短期或长期暴露期后,对羟基苯甲酸甲酯(0.003 3%)、对羟基苯甲酸丙酯(0.001 7%)和氯丁醇(0.005%)不会损害 CBF。长期暴露于苯扎氯铵(0.001%)、苯乙醇

(0.125%)以及羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸丙酯的组合(0.003 3%和 0.001 7%)可显著降低 CBF。苯扎氯铵 CBF 不可逆地降低, 苯乙醇对 CBF 有浓度依赖性影响。因此, 鼻黏膜上皮细胞模型对于设计安全的鼻腔药物, 提供了有效的局部毒性风险信息。

6 总结与展望

体外鼻腔模型的建立与发展为鼻腔制剂在研发过程中阐明药物的转运机制、预期生物利用度以及相关安全性数据提供帮助, 具备高效、直观、经济的特点。在过去数十年中, 无论是永生系的细胞模型, 亦或是来源于人体组织的原代细胞模型, 均能够为经鼻给药制剂的体内行为提供相关的预测数据, 以指导其开发。然而, 如 MDCK、RPMI 2650 永生系细胞仍存在来源不当、缺乏融合细胞单层等固有缺陷; 人原代鼻细胞系统也存在包括难以获取、传代数限制、病原体污染以及供者个体差异大等限制。此外, 以仿生膜为核心的扩散系统则多用于评价药物的扩散行为, 而无法评估是否由于生物信息改变而导致的药物生物利用度的变化。可喜的是, 近年来, 通过培育干细胞构建的鼻腔黏膜类器官被认为具备关键功能、结构和生物复杂性, 其相对应的“干性和功能性”以及培育流程的标准化, 能够避免如离体组织、原代细胞因来源、遗传变异所导致的模型差异性以及使用的时限性。不仅如此, 细胞重编程技术的应用可保障干细胞来源的稳定。因此, 以成体干细胞、多功能诱导干细胞为基础构建的鼻腔黏膜类器官未来有望成为体外鼻腔模型的应用热点。综上所述, 在药物研发过程中, 应当基于药物、处方的设计和作用机制选择相应的评价模型, 进行综合性的评价与使用。

REFERENCES

[1] TÜRKER S, ONUR E, OZER Y. Nasal route and drug delivery systems[J]. *Pharm World Sci*, 2004, 26(3): 137-142.

[2] ILLUM L. Is nose-to-brain transport of drugs in man a reality?[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2004, 56(1): 3-17.

[3] STOKER D G, REBER K R, WALTZMAN L S, et al. Analgesic efficacy and safety of morphine-chitosan nasal solution in patients with moderate to severe pain following orthopedic surgery[J]. *Pain Med*, 2008, 9(1): 3-12.

[4] CSABA N, GARCIA-FUENTES M, ALONSO M J. Nanoparticles for nasal vaccination[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61(2): 140-157.

[5] TAKEUCHI H, YAMAMOTO H, NIWA T, et al. Enteral

absorption of insulin in rats from mucoadhesive chitosan-coated liposomes[J]. *Pharm Res*, 1996, 13(6): 896-901.

- [6] XU Q, ZHANG H Q, ZHOU J P, et al. Advances in intranasal nanoscale drug delivery systems for central nervous system disease therapy[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2022, 39(8): 1099-1104.
- [7] ROHRER J, LUPO N, BERNKOP-SCHNÜRCH A. Advanced formulations for intranasal delivery of biologics[J]. *Int J Pharm*, 2018, 553(1/2): 8-20.
- [8] 赵应征. 鼻腔药物制剂: 基础与应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2016.
- [9] HOSOYA K, KUBO H, NATSUME H, et al. Evaluation of enhancers to increase nasal absorption using Ussing chamber technique[J]. *Biol Pharm Bull*, 1994, 17(2): 316-322.
- [10] LANG S, LANGGUTH P, OSCHMANN R, et al. Transport and metabolic pathway of thymocartin (TP4) in excised bovine nasal mucosa[J]. *J Pharm Pharmacol*, 1996, 48(11): 1190-1196.
- [11] WADELL C, BJÖRK E, CAMBER O. Permeability of porcine nasal mucosa correlated with human nasal absorption[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2003, 18(1): 47-53.
- [12] AWAAD Y, RIZK T, SIDDIQUI I, et al. Complications of intrathecal baclofen pump: Prevention and cure[J]. *ISRN Neurol*, 2012, 2012: 575168.
- [13] LOCHHEAD J J, KUMAR N N, NEHRA G, et al. Intranasal drug delivery to the brain[M]//*Drug Delivery to the Brain: Physiological Concepts, Methodologies and Approaches*. Cham: Springer International Publishing, 2022: 461-500.
- [14] CROWE T P, GREENLEE M W, KANTHASAMY A G, et al. Mechanism of intranasal drug delivery directly to the brain[J]. *Life Sci*, 2018(195): 44-52.
- [15] STÜTZLE M, FLAMM J, CARLE S, et al. Nose-to-brain delivery of insulin for Alzheimer's disease[J]. *ADMET DMPK*, 2015, 3(3): 190-202.
- [16] HENKIN R I. Intranasal insulin: From nose to brain[J]. *Nutrition*, 2010, 26(6): 624-633.
- [17] TANAKA A, FURUBAYASHI T, ARAI M, et al. Delivery of oxytocin to the brain for the treatment of autism spectrum disorder by nasal application[J]. *Mol Pharm*, 2018, 15(3): 1105-1111.
- [18] ONG H X, JACKSON C L, COLE J L, et al. Primary air-liquid interface culture of nasal epithelium for nasal drug delivery[J]. *Mol Pharm*, 2016, 13(7): 2242-2252.
- [19] LOCHHEAD J J, THORNE R G. Intranasal delivery of biologics to the central nervous system[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2012, 64(7): 614-628.
- [20] TANG X C, MA W P, ZHAN W R, et al. Internal biliary drainage superior to external biliary drainage in improving gut mucosa barrier because of goblet cells and mucin-2 up-regulation[J]. *Biosci Rep*, 2018, 38(3): BSR20171241.
- [21] DALPIAZ A, PAVAN B. Nose-to-brain delivery of antiviral drugs: A way to overcome their active efflux?[J]. *Pharmaceutics*, 2018, 10(2): 39.
- [22] SZEFLER S J. Pharmacokinetics of intranasal corticosteroids[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2001, 108(1 Suppl):

- S26-S31.
- [23] PUND S, RASVE G, BORADE G. *Ex vivo* permeation characteristics of venlafaxine through sheep nasal mucosa[J]. Eur J Pharm Sci, 2013, 48(1/2): 195-201.
- [24] NAIK A, NAIR H. Formulation and evaluation of thermosensitive biogels for nose to brain delivery of doxepin[J]. Biomed Res Int, 2014(2014): 847547.
- [25] BECHGAARD E, GIZURARSON S, JØRGENSEN L, et al. The viability of isolated rabbit nasal mucosa in the Ussing chamber, and the permeability of insulin across the membrane[J]. Int J Pharm, 1992, 87(1/2/3): 125-132.
- [26] SCHMIDT M C, SIMMEN D, HILBE M, et al. Validation of excised bovine nasal mucosa as *in vitro* model to study drug transport and metabolic pathways in nasal epithelium[J]. J Pharm Sci, 2000, 89(3): 396-407.
- [27] NICOLAZZO J A, REED B L, FINNIN B C. The effect of various *in vitro* conditions on the permeability characteristics of the buccal mucosa[J]. J Pharm Sci, 2003, 92(12): 2399-2410.
- [28] BORCHARDT R, SMITH P L, WILSON G. Models for Assessing Drug Absorption and Metabolism[M]. Vol. 8. Springer Science & Business Media, 1996.
- [29] CHO H J, TERMSARASAB U, KIM J S, et al. *In vitro* nasal cell culture systems for drug transport studies[J]. J Pharm Investig, 2010(40): 321-332.
- [30] WANG H Y, HE L N, LIU B B, et al. Establishment and comparison of air-liquid interface culture systems for primary and immortalized swine tracheal epithelial cells[J]. BMC Cell Biol, 2018, 19(1): 10.
- [31] GARTZIANDIA O, EGUSQUIAGUIRRE S P, BIANCO J, et al. Nanoparticle transport across *in vitro* olfactory cell monolayers[J]. Int J Pharm, 2016, 499(1/2): 81-89.
- [32] FURUBAYASHI T, INOUE D, NISHIYAMA N, et al. Comparison of various cell lines and three-dimensional mucociliary tissue model systems to estimate drug permeability using an *in vitro* transport study to predict nasal drug absorption in rats[J]. Pharmaceutics, 2020, 12(1): 79.
- [33] REIS R L. 2nd Consensus conference on definitions on biomaterials science[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2020, 14(4): 561-562.
- [34] CLEVERS H. Modeling development and disease with organoids[J]. Cell, 2016, 165(7): 1586-1597.
- [35] MatTek Corporation. EpiAirway 3D *in vitro* microtissues [Z/OL]. <https://www.mattek.com/mattekproduct/epi-airway/>.
- [36] Epithelix. Morphology and histology of MucilAir™[Z/OL]. <https://www.epithelix.com/products/mucilair>.
- [37] ZHAO Z X, CHEN X Y, DOWBAJ A M, et al. Organoids[J]. Nat Rev Meth Primers, 2022(2): 94.
- [38] WANG K, YU Y, HAN R, et al. Establishment of a culture system for human nasal mucosa organoids with controllable differentiation[J]. J South Med Univ(南方医科大学学报), 2022, 42(6): 868-877.
- [39] KIM D H, KIM S W. Clinical applications of human nasal organoids[J]. Clin Exp Otorhinolaryngol, 2022, 15(3): 201-202.
- [40] REICHL S, BECKER K. Cultivation of RPMI 2650 cells as an *in-vitro* model for human transmucosal nasal drug absorption studies: Optimization of selected culture conditions[J]. J Pharm Pharmacol, 2012, 64(11): 1621-1630.
- [41] KIM D, KIM Y H, KWON S. Enhanced nasal drug delivery efficiency by increasing mechanical loading using hypergravity[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 168.
- [42] LUNGARE S, BOWEN J, BADHAN R. Development and evaluation of a novel intranasal spray for the delivery of amantadine[J]. J Pharm Sci, 2016, 105(3): 1209-1220.
- [43] GONÇALVES V S S, MATIAS A A, POEJO J, et al. Application of RPMI 2650 as a cell model to evaluate solid formulations for intranasal delivery of drugs[J]. Int J Pharm, 2016, 515(1/2): 1-10.
- [44] WITSCHI C, MRSNY R J. *In vitro* evaluation of microparticles and polymer gels for use as nasal platforms for protein delivery[J]. Pharm Res, 1999, 16(3): 382-390.
- [45] WAN H, WINTON H L, SOELLER C, et al. Tight junction properties of the immortalized human bronchial epithelial cell lines Calu-3 and 16HBE14o-[J]. Eur Respir J, 2000, 15(6): 1058-1068.
- [46] MATHIA N R, TIMOSZYK J, STETSKO P I, et al. Permeability characteristics of calu-3 human bronchial epithelial cells: In vitro-in vivo correlation to predict lung absorption in rats[J]. J Drug Target, 2002, 10(1): 31-40.
- [47] JI X L, SHENG Y H, GUAN Y, et al. Evaluation of Calu-3 cell lines as an *in vitro* model to study the inhalation toxicity of flavoring extracts[J]. Toxicol Mech Methods, 2022, 32(3): 171-179.
- [48] SIBINOVSKA N, ŽAKELJ S, TRONTELJ J, et al. Applicability of RPMI 2650 and calu-3 cell models for evaluation of nasal formulations[J]. Pharmaceutics, 2022, 14(2): 369.
- [49] ONG H X, TRAINI D, YOUNG P M. Pharmaceutical applications of the Calu-3 lung epithelia cell line[J]. Expert Opin Drug Deliv, 2013, 10(9): 1287-1302.
- [50] MALLANTS R, JORISSEN M, AUGUSTIJS P. Effect of preservatives on ciliary beat frequency in human nasal epithelial cell culture: Single versus multiple exposure[J]. Int J Pharm, 2007, 338(1/2): 64-69.
- [51] XIE Y L, ZHANG B K. Human nasal epithelial cell culture models and their applications in the assessment of nasal drug delivery system[J]. Pharm Biotechnol(药物生物技术), 2009, 16(6): 582-586.
- [52] VETTER A, AUGUSTIJS P, BERKOP-SCHNÜRCH A. Solubilizing agents in nasal formulations and their effect on ciliary beat frequency[J]. Toxicol In Vitro, 2012, 26(1): 150-156.

收稿日期: 2023-07-05
 (本文责编: 曹粤锋)