

ESR和 CLSM技术用于促渗剂作用机制及亲水性大分子跨鼻黏膜转运途径的研究

张玉杰^{1*}, 张强², 杨洁¹, 孙明杰³, 王筱亮¹, 陈明霞¹, 汪祺¹, 姜昊¹

(1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 100102; 2. 北京大学 药学院, 北京 100083;
3. 中国中医科学院 基础理论研究所, 北京 100700)

摘要: 采用电子自旋共振 (ESR) 和共聚焦激光扫描显微镜 (CLSM) 技术研究促渗剂作用机制及促渗剂对亲水性大分子跨鼻黏膜转运途径的影响。比较重组水蛭素-2 (rHV2) 与促渗剂联合鼻腔用药前后大鼠的生物利用度; 采用以 5-噁唑烷氮氧自由基硬脂酸、16-噁唑烷氮氧自由基硬脂酸和马来酰亚胺作为自旋标记物的电子自旋共振技术, 考察促渗剂对家兔鼻黏膜脂质和蛋白的影响; 采用共聚焦显微镜光学切片结合荧光探针标记技术探讨促渗剂对大鼠鼻黏膜上皮细胞骨架肌动蛋白的作用, 同时观察在各种促渗剂作用下 rHV2 的转运途径。壳聚糖 (chitosan, CS), 羟丙基- β -环糊精 (hydroxyl-propyl-beta-cyclodextrin, HP- β -CD), 甘草酸单胺盐 (ammonium glycyrrhizinate, AMGZ) 均能显著改善 rHV2 的鼻黏膜吸收; CS 主要通过细胞旁路途径增加 rHV2 鼻黏膜转运, 这一结果可能与其对细胞骨架肌动蛋白微丝的影响从而打开细胞间紧密连接有关; HP- β -CD 可同时增加跨细胞和经细胞旁路两种途径的转运, 可能与其既能改变膜质流动性又能影响膜蛋白构象的特性有关; AMGZ 主要增加亲水性大分子跨细胞途径的转运, 实验观察到其对膜蛋白有作用, 但未观察到其对膜质的作用, 确切的机制尚有待研究。本实验可为促渗剂及亲水大分子跨细胞膜转运途径的研究提供借鉴。

关键词: 促渗剂; 亲水性大分子; 电子自旋共振; 共聚焦激光扫描显微镜; 促渗机制; 鼻黏膜; 转运途径

中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2007)11 - 1195 - 06

Promoting mechanism of enhancers and transport pathway of large hydrophilic molecular across nasal epithelium studied by ESR and CLSM technologies

ZHANG Yu-jie^{1*}, ZHANG Qiang², YANG Jie¹, SUN Ming-jie³, WANG Xiao-liang¹,
CHEN Ming-xia¹, WANG Qi¹, JIANG Hao¹

(1. School of Chinese Material Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;

2. School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100083, China;

3. Institute of Basic Chinese Medical Theory, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

Abstract: The aim of this study is to investigate absorption-promoting mechanism of enhancers and the transport pathway of large hydrophilous molecular across rat nasal epithelium by electron spin resonance (ESR) and confocal laser scanning microscopy (CLSM) technologies. In the experiment, recombinant hirudin-2 (rHV2) was chosen as a large hydrophilic molecular model drug. After nasal administration in rats the bioavailability of rHV2 with or without various enhancers was compared. The effects of enhancers on membrane lipid fluidity and protein conformation were measured with 5-deoxyl-stearic acid (5-DSEA), 16-deoxyl-stearic acid (16-DSEA) and 3-maleidoproxyl (MSL) labeling ESR. The effects of enhancers on cytoskeletal F-actin of rat nasal epithelium and FITC-rHV2 transport pathway across rat nasal epithelium

收稿日期: 2007-05-14.

* 通讯作者 Tel: 86 - 10 - 84738618, Fax: 86 - 10 - 84738611, E-mail: zhyj227@126.com

were performed by CLSM combined with fluorescence labeling. 0.5% Chitosan (CS), 5% hydroxyl-propyl-beta-cyclodextrin (HP- β -CD) and 1% ammonium glycyrrhizinate (AMGZ) were all able to significantly increase the nasal absorption of rHV2. CS could result in the paracellular pathway transport of FITC-rHV2 which seemed related to a transient effect on tight junctions. HP- β -CD could cause paracellular and transcellular route transport of FITC-rHV2 by influencing upon membrane protein as well as lipid fluidity. AMGZ seemed to enhance the transcellular route transport of FITC-rHV2, and could exert some influence on membrane protein but not on lipid fluidity. So how it brought out this result needs further research. Present experiment may become a useful reference for promoting mechanism of enhancers and the transport pathway of large hydrophilic molecular across nasal epithelium research.

Key words: absorption enhancer; large hydrophilic molecular; electron spin resonance; confocal laser scanning microscopy; absorption-promoting mechanism; nasal epithelium; transport pathway

为了改善多肽和蛋白类药物的鼻腔吸收,使用促渗剂是最常用和最有效的手段之一^[1]。现有的促渗剂种类很多,但促渗效果往往与其毒性密切相关。对促渗剂机制的研究有助于更多地了解黏膜的生理特性、促渗剂的作用特点,从而为有针对性的设计和寻找高效低毒的促进剂提供科学依据。尽管国内外在此方面的研究十分活跃,研究手段也呈现多样化,但对于大多数促渗剂作用机制尚不十分清楚。

水蛭素是近年来开发的新型高效抗凝血药物,它是一个由 65 ~ 66 个氨基酸组成的多肽 (M_r 7 kDa),临床上主要用于肝素诱导的血小板减少症、急性冠脉综合征、动静脉血栓等,是迄今发现的最强的凝血酶特异性抑制剂^[2]。作者^[3,4]曾研究以壳聚糖凝胶剂作为水蛭素-2 (recombinant hirudin-2, rHV2)鼻腔给药系统,并对多种处方的促渗作用以及纤毛毒性进行了考察。现针对几种纤毛毒性相对较小的促渗剂,采用电子自旋共振 (electron spin resonance, ESR)及共聚焦激光扫描显微镜 (confocal laser scanning microscopy, CLSM)等技术探讨其对鼻黏膜作用的机制,为这些促渗剂在亲水性大分子鼻腔给药方面的研究应用提供依据。

材料与方 法

仪器与试剂 U-2000型可见紫外分光光度计 (日本 Hitachi公司); ESP 300电子自旋共振仪 (德国 Bruker); TCS NT型激光共聚焦荧光显微镜 (Leica,德国); rHV2(抗凝活性 6 800 ATU·mg⁻¹,北京大学生命科学院提供); 5-噁唑烷氮氧自由基硬脂酸 (5-deoxyl-stearic acid, 5-DSA), 16-噁唑烷氮氧自由基硬脂酸 (16-deoxyl-stearic acid, 16-DSA), 马来酰亚胺 (3-maleidoproyl, MSL), 凝血酶, Triton X-100, TRITC-phalloidin和 FITC (Sigma公司); 羟

丙基- β 环糊精 (hydroxyl-propyl-beta-cyclodextrin, HP- β -CD,美国 Sigma-Aldrich公司); 呈色肽 (美国 Roche公司); 壳聚糖 (chitosan, CS, M_r 250 kDa, 脱乙酰度 >85%, 浙江玉环海洋生物化学有限公司); 甘草酸单胺盐 (ammonium glycyrrhizinate, AMGZ, 新疆天山制药有限公司); 其他试剂均为分析纯。

实验动物 Sprague-Dawley 雄性大鼠, 体重 (300 ± 20) g, 合格证号: SCXK(京)2002.003, 北京维通利华实验动物中心; 日本大耳白兔, 体重 (1.5 ± 0.5) kg, 合格证号: 第 024号, 中国医学科学院实验动物繁育场。

大鼠药代动力学实验 将 rHV2及各种促渗剂分别溶于生理盐水溶液中,再将 rHV2与各促渗剂溶液等体积混合,使得 rHV2的终浓度为 3.6% (w/v), CS、HP- β -CD和 AMGZ分别为 0.5% (pH 4.5)、5%和 1%。对照组为 rHV2溶于生理盐水制成相同浓度的溶液。

大鼠按文献^[5]报道方法处理,正常大鼠实验前禁食 12 h,腹腔注射戊巴比妥钠生理盐水溶液 (40 mg·kg⁻¹)麻醉。将大鼠仰位固定在手术板上,切开颈部,分离气管、食管及颈动脉。在气管上插入软管以供呼吸,结扎食管,另在左颈动脉处插管,供采血。用前端带有软管的微量进样器单侧鼻腔给予 rHV2制剂,插入鼻孔深度为 0.5 cm,给药剂量为 6 mg·kg⁻¹。分别于给药后 0, 20, 40, 60, 90, 120, 180和 240 min取血 0.4 mL,用 3.8%柠檬酸钠抗凝,血液和柠檬酸钠的比例为 (8.25 : 1.75, v/v),于 4 000 × g离心 5 min,取血浆 100 μ L,按呈色肽法测定 rHV2血药浓度水平^[6]。另一组大鼠鼻腔给予 rHV2生理盐水溶液 (6 mg·kg⁻¹),同法取血,测定不同时间 rHV2血药浓度水平,每组实验动物数为 5、6只。以大鼠皮下注射 1 mg·kg⁻¹ rHV2生理盐

水作为对照计算相对生物利用度 (F_r)。

实验数据的处理 C_{max} , T_{max} 和 AUC 等药代动力学参数采用 DAS 1.0 计算机程序 (安徽药物临床评价中心) 计算, 利用皮下注射 AUC 计算 rHV2 鼻腔给药后的 F_r 。实验结果采用 t 检验法, $P < 0.05$ 为显著性差异; $P < 0.01$ 为极显著性差异。

ESR测定^[7]

家兔鼻黏膜上皮细胞膜的制备 家兔禁食过夜, 静脉注射戊巴比妥钠 ($120 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 麻醉致死, 取兔头剥离周围皮肤, 除去鼻腔侧壁, 暴露鼻中隔, 小心剪下, 放入 PBS (pH 7.4) 溶液中, 剥离鼻中隔黏膜, 用 Ringer's 液洗净黏膜表面黏液及血块, 剪碎黏膜, 用超声细胞粉碎仪超声 2 min, 使黏膜破碎成悬液。12 000 × g 离心 20 min, 得到细胞膜沉淀。称重 (湿重), 加 PBS 重新分散。

细胞膜的标记 细胞膜的氮氧自由基标记: 将 5-DSA, 16-DSA, MSL 先用少量无水乙醇溶解, 然后加入 PBS (pH 7.4) 使其浓度为 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 其中乙醇浓度不超过 0.5% (v/v)。将标记物各自混匀后分别加入到鼻黏膜细胞膜悬液中。膜的最终浓度为 $50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 标记物的最终浓度为 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。振荡混匀后, 加入 5-DSA, 16-DSA 的膜悬液在 37 °C 放置 30 min; 加入 MSL 的膜悬液在 4 °C 过夜, 标记结束后, 12 000 × g 离心 20 min, 加入 PBS 洗 2~3 次。直到上清液中检测不出游离的自旋标记信号。12 000 × g 离心 20 min, 得沉淀物。

促渗剂对细胞膜的处理 将得到的沉淀物加入不同的促渗剂重新分散。使膜的终质量浓度为 $50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 促渗剂 HP- β -CD 的浓度 (m/v) 为 5%, CS 为 0.5%, AMGZ 为 1%。混匀后于 37 °C 放置 1 h, 12 000 × g 离心, 沉淀物用滤纸吸干残存的水分, 待测。

ESR波谱测试 将沉淀样品于无干扰信号、内径为 0.5 cm 玻璃毛细管封装, 外套石英毛细管, 插入 ESR 波谱仪的样品腔中, 室温下检测。ESR 测定条件和参数为: 扫描宽度 100 G; 接收增益 1×10^4 ; 时间常数 660 ms; 微波功率 20 mW; 扫描时间 60 s; 调制频率 100 Kz; 调制幅度 2 G。

ESR 谱数据处理 根据波谱图计算得到序参数 S , 中场峰与低场峰高的比值 (C/A)、弱固定化的成分 (h_w) 和强固定化成分 (h_s) 的比值 (h_s/h_w)。

CLSM扫描观察

供试液的制备 取 CS, HP- β -CD, AMGZ 加 PBS (pH 7.4) 分别配成浓度为 0.5%, 5.0% 和 1.0% 的

溶液, 必要时先用丙二醇溶解, 将 FITC 标记的 rHV2 (制备方法见文献 [4]) 分别溶解于上述溶液中使其浓度为 36%, 对照组为 PBS 溶液。

TRITC-phalloidin 储备液的配制 将 TRITC-phalloidin 溶解到甲醇中, 使其终质量浓度为 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 于 -20 °C 避光保存。

大鼠在体转运试验^[8] 大鼠手术及给药方法同前, FITC-rHV2 给药剂量为 $6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。给药后 1 h, 注射过量的 20% 乌拉坦生理盐水溶液处死大鼠, 立即剪取头部, 剥离皮肤, 小心打开鼻腔, 剪取鼻中隔。用冰冷的 PBS 清洗后, 鼻中隔于 3.7% 中性福尔马林溶液中固定 30 min, 取出, 用 PBS 清洗 3、4 次, 0.2% Triton-X100 溶液渗透 10 min, 再用 PBS 清洗 3、4 次, 用 TRITC-phalloidin 在 4 °C 避光的条件下染色 20 min, 取出, PBS 再清洗 3、4 次, 将染色后的鼻黏膜小心从鼻中隔软骨分离下来, 浸在 1:1 的 PBS 和甘油溶液中封片, 在激光共聚焦荧光显微镜下进行观察。

鼻黏膜 CLSM 扫描 将制备好的各组鼻黏膜依次置于激光共聚焦成像仪的载物台上, 放大 40 倍, 用油镜观察, 扫描后将图像存盘。TRITC 激发光波长为 355 nm, 发射光波长为 543 nm; FITC 激发光波长为 488 nm, 发射光为 515 nm。

结果

1 促渗剂对 rHV2 鼻腔吸收的促进作用

rHV2 的生理盐水溶液鼻腔给药 F_r 仅为 2.14%, 而与 CS, HP- β -CD, AMGZ 合用后 F_r 明显提高, 分别为 7.66%, 10.87% 和 7.53% ($P < 0.05$)。各给药组的血药浓度-时间曲线图见图 1, 药代动力学参数见表 1。

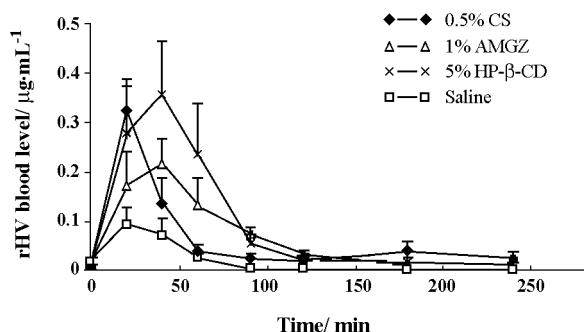


Figure 1 Plasma concentration profiles after intranasal administration of rHV2 solution alone or with various enhancers to rats. $n = 5$, $\bar{x} \pm s$

Table 1 Pharmacokinetic parameters after nasal administration of rHV2 solution alone or with some enhancers to rats ($n = 5$ or 6 , $\bar{x} \pm s$)

Formulation	Dose /mg• kg ⁻¹	C _{max} /ng• mL ⁻¹	T _{max} /min	AUC _{0-240 min} /μg• min• mL ⁻¹	F _r /%
CS(0.5%)	6.0	322.80 ±132.3 ^{**}	20 ±8.4 ^{ΔΔ}	16.14 ±6.40 ^{**}	7.66
HP-β-CD(5%)	6.0	359.65 ±134.9 ^{**}	40 ±24 ^{ΔΔ}	22.90 ±10.21 ^{**}	10.87
AMGZ(1%)	6.0	215.40 ±91.5 [*]	40 ±23 ^{ΔΔ}	15.87 ±5.83 ^{**}	7.53
Saline	6.0	94.15 ±42.4	20 ±8 ^{ΔΔ}	4.50 ±1.75	2.14
sc	1.0	453.90 ±95.3	93 ±16	35.10 ±9.74	100.00

sc: Subcutaneous administration, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control (saline) group; ΔΔ $P < 0.01$ vs sc group

2 促渗剂作用机制及水蛭素跨鼻黏膜转运途径

经 0.5% CS 和 1% AMGZ 处理鼻黏膜的 h_s/h_w 与对照组比较都发生了显著的改变,而序参数 S 和 C/A 均未见明显的改变,二者可能是通过改变膜蛋白构象达到促渗的作用;鼻黏膜经 5% HP-β-CD 处理后, C/A 和 h_s/h_w 均发生了较明显改变,说明其对膜脂质深层流动性及膜蛋白产生较为明显的作用。将以上 3 种标记物的 ESR 波谱综合分析,可以说明不同促渗剂的作用机制,见表 2。

Table 2 ESR parameters of 5-DSA, 16-DSA and MSL labeled rabbit nasal mucosa membrane treated with different absorption enhancers ($n = 3$, $\bar{x} \pm s$)

Enhancer	5-DSA (S)	16-DSA (C/A)	MSL (h_s/h_w)
Untreated	0.699 ±0.073	2.928 ±0.334	0.348 ±0.040
CS(0.5%)	0.566 ±0.113	2.780 ±0.322	1.057 ±0.076 ^{**}
HP-β-CD(5%)	0.570 ±0.059	2.133 ±0.156 [*]	0.732 ±0.079 [*]
AMGZ(1%)	0.599 ±0.072	2.988 ±0.338	1.320 ±0.201 ^{**}

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs untreated group

鼻黏膜 CLSM 扫描实验结果表明: PBS 组染色后的 F 肌动蛋白丝主要分布在细胞间紧密连接周围,红色的 F 肌动蛋白环清晰而连续,呈现正常的形态分布,不见解聚现象,看不到明显的 FITC-rHV2 绿色荧光,说明在没有促渗剂的作用情况下 FITC-rHV2 通过鼻黏膜的吸收量十分有限。在 0.5% CS 处理后的扫描图中可以看到染色后的 F 肌动蛋白明显的增粗并有不连续的表现,荧光强度变暗, FITC-rHV2 颗粒主要分布在细胞间隙,说明 CS 具有增加 FITC-rHV2 经细胞旁路进行转运的能力。HP-β-CD 组的 F 肌动蛋白环也出现了明显的断裂和增粗,荧光强度也较对照组明显变暗,在胞浆和细胞间隙中均可看到 FITC-rHV2 的分布,说明 5% HP-β-CD 似乎可以同时增加 FITC-rHV2 的经细胞旁路和穿细

胞转运。1% AMGZ 组与对照组相比, F 肌动蛋白比较清晰完整,荧光强度也没有发生明显改变, FITC-rHV2 主要分布在胞浆中,说明 1% AMGZ 主要依赖增加 FITC-rHV2 穿细胞转运来实现吸收促进作用(图 2)。

讨论

CS, HP-β-CD 和 AMGZ 作为促渗剂均可以使亲水性多肽药物 rHV2 的鼻腔吸获得明显改善 ($P < 0.01$)。

自旋标记物 5-DSA 和 16-DSA 为含有不成对电子的顺磁体,能分别标记于生物膜脂双层的表层和核心,检测其波谱参数的变化,可研究脂双层不同深度的运动状态; MSL 自旋标记物与膜蛋白上巯基共价结合,其 ESR 信号能反映膜蛋白巯基结合位点的构象及周围微观环境的变化。 h_s/h_w 值就是膜蛋白构象发生折叠或伸展、聚合或解聚的敏感指标。 h_s/h_w 值升高表明膜结构发生了改变,膜蛋白的三级结构趋于松散^[7]。

CLSM 是研究促渗剂的一种有效手段,它还对促渗剂与细胞膜的作用作出直观的判断,此外还可以通过荧光标记观察到目标分子跨细胞膜的转运途径。作者在文献^[9,10]研究的基础上对 CLSM 实验方法进行了一定改进,即在进行 FITC-rHV2 跨膜转运后,用 TRITC-phalloidin 对细胞骨架肌动蛋白进行染色,可以在观察 FITC-rHV2 跨膜转运途径的同时了解促渗剂作用于细胞间紧密连接(tight junction)的情况。FITC-rHV2 作为亲水性大分子,实验表明其在没有促渗剂存在的条件下,很难通过鼻黏膜吸收,当 FITC-rHV2 与各种促渗剂同时使用时,在鼻黏膜上皮中可见到显著的 FITC-rHV2 绿色荧光,说明所选的促渗剂均具有提高 FITC-rHV2 鼻黏膜吸收的作用。

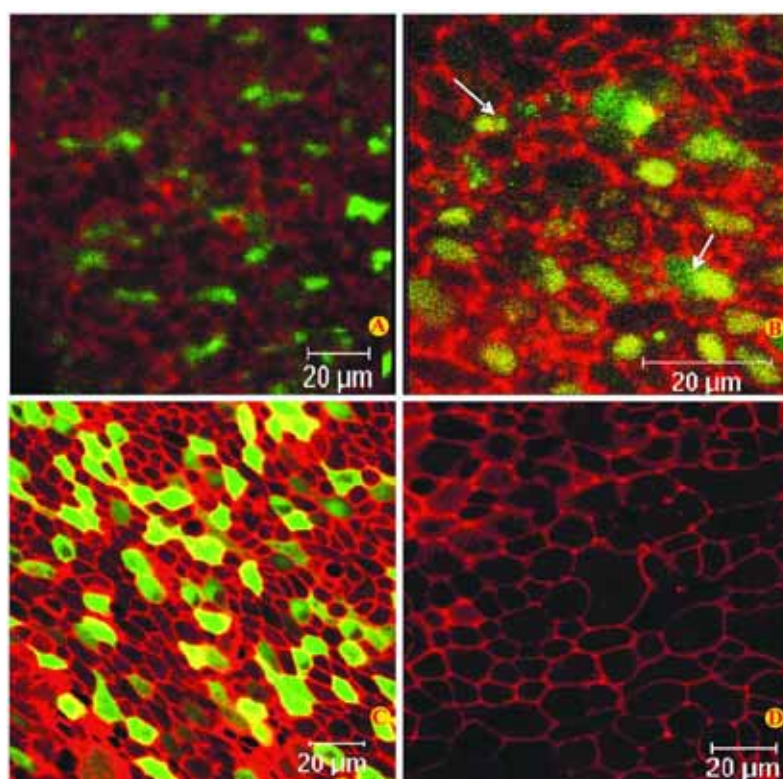


Figure 2 Horizontal section of FITC-rhV2 transport pathway across rat nasal epithelium and the fluorescence distribution of F-actin staining with TRITC-labeled phalloidin after treatment with 0.5% CS (A), 5% HP- β -CD (B), 1% AMGZ (C) and untreated control (D). Images were obtained by CLSM

CS为一种具有氨基的多聚阳离子多糖,它具有生物黏附性,可以降低药物在鼻腔中的清除速度,延长药物与鼻黏膜的接触时间,另外还可以影响细胞骨架肌动蛋白微丝,进而暂时打开细胞间的紧密连接,促进大分子亲水性药物通过细胞旁路的透膜转运^[11]。本实验的 ESR和 CLSM结果表明,CS主要作用于细胞骨架肌动蛋白微丝,继而打开细胞间紧密连接,其主要引起 FITC-rhV2经细胞旁路转运,这与文献报道的结果一致。

有关环糊精的促渗机制,尽管已有大量的研究探讨,但尚存在争议,其产生促渗作用的原因可能包括:促使蛋白解聚成为更容易渗透的低聚体;与细胞膜上的脂质或二价阳离子产生相互作用;酶抑制作用或直接作用于紧密连接上^[12,13];但更多的时候环糊精只是作为增溶剂起作用。本实验发现 HP- β -CD对细胞膜质和蛋白均可产生作用并造成 F-肌动蛋白发生断裂和增粗。HP- β -CD似乎可以同时增加 FITC-rhV2的经细胞旁路和穿细胞两种途径的转运,表明其可能对膜脂质流动性及膜蛋白均有影响。

AMGZ为一酸性皂苷元的胺盐。CLSM扫描图像显示其对 F-肌动蛋白无明显影响, FITC-rhV2在 AMGZ作用下以穿细胞转运为主,说明 AMGZ很可能是通过增加细胞膜脂质流动性而产生促渗作用的;但 ESR研究却发现,其对膜脂作用并不明显,而对膜蛋白构象却有一定作用,因此从目前的实验结果尚不能判断 AMGZ的具体作用环节,有待其他实验进一步验证。

促渗剂大多具有黏膜毒性,促渗能力大小往往与毒性之间存在密切的联系。多数促渗剂往往作用于细胞膜的脂质,增加细胞膜脂的流动性,降低膜的黏度,从而增加药物穿细胞的转运。而比较理想的方式应是通过干扰细胞间紧密连接而增加药物经细胞旁路的转运,因为这种作用方式不仅可以避免对细胞膜的损伤同时可有效的防止药物经穿细胞转运所带来的降解^[1]。CS、HP- β -CD和 AMGZ三者虽然作用机制不同,但均属毒性较小的促渗剂,因此它们的促渗作用比较温和,对 rhV2生物利用度的提高程度的差别不大,但从它们的作用特点和长期应用考虑,应以 CS为好。

致谢: 北京大学生命科学院朱圣庚教授提供重组水蛭素-2样品。

References

- [1] Davis SS, Illum L. Absorption enhancers for nasal drug delivery [J]. Clin Pharmacokinet, 2003, 42: 1107 - 1128.
- [2] Talley JD. Cardiology commentary and update: hirudin [J]. J Arkansas Med Soc, 1995, 91: 445 - 446.
- [3] Zhang YJ, Zhang Q, Hou JL, et al. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant hirudin-2 nasal spray [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2006, 41: 268 - 271.
- [4] Zhang YJ, Ma CH, Lu WL, et al. Permeation-enhancing effects of chitosan formulations on recombinant hirudin-2 by nasal delivery *in vitro* and *in vivo* [J]. Acta Pharmacol Sin, 2005, 26: 1402 - 1408.
- [5] Chandler SG, Illum L, Tomas NM. Nasal absorption in rats. II Effect of enhancers on insulin absorption and nasal histology [J]. Int J Pharm, 1991, 76: 61 - 70.
- [6] Griessbach U, Sturzebecher J, Markward TF. Assay of hirudin in plasma using a chromogenic thrombin substrate [J]. Thromb Res, 1985, 37: 347 - 350.
- [7] Tang HT, Chen YL, Shen HX, et al. Early cardiac myocyte membrane changes in severely burned rats: a spin labbing-esr study [J]. Chin J Plast Surg Burns (中华整形烧伤外科杂志), 1999, 15: 224 - 227.
- [8] Hopkins AM, Walsh SV, Verkade P, et al. Constitutive activation of Rho proteins by CNF-1 influences tight junction structure and epithelial barrier function [J]. J Cell Sci, 2003, 15: 725 - 742.
- [9] Martine, Verhoef JC, Spies F, et al. The effect of methylated β -cyclodextrins on the tight junctions of the rat nasal respiratory epithelium: electron microscopic and confocal laser scanning microscopic visualization studies [J]. J Control Release, 1999, 57: 205 - 213.
- [10] Humi MA, Noach ABJ, Blom-roosemalen MCM, et al. Permeability enhancement in Caco-2 cell monolayers by sodium salicylate and sodium taurodihydrofusidate: assessment of effect-reversibility and imaging of transepithelial transport route by confocal laser scanning microscopy [J]. J Pharm Exp Ther, 1993, 267: 942 - 950.
- [11] Schipper NG, Olsson S, Hoogstraate JA, et al. Chitosan as absorption enhancers for poorly absorbable drugs 2: mechanism of absorption enhancement [J]. Pharm Res, 1997, 14: 923 - 929.
- [12] Martin E, Verhoef JC, Cullander C, et al. Confocal laser scanning microscopic visualization of the transport of dextrans after nasal administration to rats: effects of absorption enhancer [J]. Pharm Res, 1997, 14: 631 - 637.
- [13] Yang T, Hussain A, Paulson J, et al. Cyclodextrins in nasal delivery of low-molecular-weight heparins: *in vivo* and *in vitro* studies [J]. Pharm Res, 2004, 21: 1127 - 1136.