

• 药剂与工艺 •

载葛根素的 PEG 修饰介孔硅纳米粒的制备及其对急性心肌缺血大鼠的保护作用

万小敏¹, 丁宇翔¹, 赵兵杰², 胡雄彬¹, 刘新义^{1*}

1. 中南大学湘雅二医院 药学部, 湖南 长沙 410011

2. 中南大学湘雅药学院, 湖南 长沙 410013

摘要: **目的** 制备载葛根素的 PEG 修饰介孔硅纳米粒 (PUE@PEG-MSNs), 评价其对急性心肌缺血的保护作用。 **方法** 通过缩合反应制备 PEG-MSNs, 再负载葛根素 (PUE), 并通过粒径、Zeta 电位、透射电子显微镜 (TEM) 和傅里叶变换红外光谱 (FTIR) 等检测表征 PUE@PEG-MSNs, 采用 HPLC 测定其载药量和包封率; 采用结扎冠状动脉制备 60 只急性心肌缺血模型大鼠, 随机分成 6 组, 每组 10 只, 分别为假手术组、模型组、PUE 注射液组和 PUE@PEG-MSNs 高、中、低剂量组, 在结扎后 5 min 各给药组尾 iv 给药。监测心电图 ST 段变化, 测定血清肌酸激酶 (CK)、乳酸脱氢酶 (LDH)、天冬氨酸转氨酶 (AST) 和丙二醛 (MDA) 水平, 并测量心肌梗死面积。 **结果** PUE@PEG-MSNs 呈规则圆球形, 大小均一, 粒径约 300 nm, 电势约 -30 mV, 且可以负载 PUE, 载药量和包封率分别为 14.7% 和 67.8%。PUE 注射液和 PUE@PEG-MSNs 均能降低升高的 ST 段, 降低血清中 CK、LDH、AST 和 MDA 水平, 减少心肌梗死面积; 其中 PUE@PEG-MSNs 中、高剂量组的药效明显强于 PUE 注射液组。 **结论** PUE@PEG-MSNs 制备成功, 对急性心肌缺血大鼠具有良好的保护作用。

关键词: PEG 修饰介孔硅纳米粒; 葛根素; 急性心肌缺血; 梗死面积; 缩合反应; 载药量; 包封率; 血清肌酸激酶; 乳酸脱氢酶; 天冬氨酸转氨酶; 丙二醛

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)08-1789-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.08.008

Preparation of puerarin-loaded PEGylated mesoporous silica nanoparticles and its protection on the acute myocardial ischemic rats

WAN Xiao-min¹, DING Yu-xiang¹, ZHAO Bing-jie², HU Xiong-bin¹, LIU Xin-yi¹

1. Department of Pharmacy, The Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, China

2. Xiangya School of Pharmaceutical Sciences, Central South University, Changsha 410013, China

Abstract: Objective To prepare the puerarin-loaded PEGylated mesoporous silica nanoparticles (PUE@PEG-MSNs) and evaluate its protection on the acute myocardial ischemic rats. **Methods** PEG-MSNs functionalized mesoporous silica nanoparticles were achieved by the condensation method, and then they were loaded by PUE. The morphology of PUE@PEG-MSNs was examined by detection methods of particle diameter, Zeta potential, transmission electron microscope (TEM), and Fourier transform infrared spectra (FTIR). Moreover, the drug loading and encapsulation rate were measured by HPLC. Sixty acute ischemic myocardial model rats were prepared by coronary artery ligation, and then they were randomly divided into six groups: Sham, MIRI model, puerarin injection, low-, mid-, and high-dose PUE@PEG-MSNs groups. Different doses of PUE@PEG-MSNs and puerarin injection were given 5 min after the ligation. Monitoring the changes of ST, the blood was collected at the end of reperfusion for detecting the changes of serum creatine kinase (CK), lactic dehydrogenase (LDH), aspartate aminotransferase (AST), and malondialdehyde (MDA). The myocardial infarct size was also determined. **Results** PUE@PEG-MSNs presented uniform spherical morphology and particle size distribution. The

收稿日期: 2017-11-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81673614); 湖南省中医药科技计划 (201579); 湖南省卫计委科技项目 (C20180059); 湖南省自然科学基金资助项目 (14JJ3038)

作者简介: 万小敏 (1982—), 男, 主管药师, 博士, 研究方向为药剂学。E-mail: wanxiaomin@csu.edu.cn

*通信作者 刘新义, 博士, 主要研究方向为高分子载药系统。Tel: (0731)85292093 E-mail: liuxinyi128@csu.edu.cn

particle size and Zeta potential was 300 nm and -30 mV respectively. The drug loading and entrapment efficiency was 14.7% and 67.8% respectively. Both puerarin injection and PUE@PEG-MSNs could reduce the ST-elevation of electrocardiogram, decrease the contents of CK, LDH, AST, and MDA, and reduce the myocardial infarct size. The efficacy of mid- and high-dose PUE@PEG-MSNs groups was better than that of puerarin injection group. **Conclusion** PUE@PEG-MSNs were successfully prepared and exerted the protective effects on the acute myocardial ischemic rats.

Key words: PEGylated mesoporous silica nanoparticles; puerarin; acute myocardial ischemic; infarct size; condensation reaction; drug loading; encapsulation rate; serum creatine kinase; lactate dehydrogenase; aspartate aminotransferase; malonaldehyde

葛根素(PUE)是从野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 中提取的有效成分, 具有降糖^[1-2]及抗心律失常、抗心肌缺血和保护缺血心肌组织等药理作用, 临床上常用 PUE 注射液治疗冠心病、心绞痛、心律失常等疾病^[3-5]。尽管如此, PUE 存在体内半衰期短、急性血管内溶血等问题^[6]。目前有大量报道^[7-9]利用类脂、聚合物等生物相容性材料包载 PUE, 制成纳米尺寸的纳米球、纳米囊及微乳等, 可以显著提高 PUE 的口服生物利用度, 在注射剂方面报道相对较少^[10]。

介孔硅纳米粒(mesoporous silica nanoparticles, MSNs)具有有序介孔结构、比表面积大、缓慢释药、生物相容性好及表面易于修饰等特点, 在生物医药等领域显示出极大的应用前景^[11-12]。针对 PUE 的上述问题, 本课题组采用 MSNs 包载 PUE 药物, 结果发现该纳米药物载体可以延长 PUE 的体内半衰期达 2.3 倍, 生物利用度提高 1.47 倍, 且很大程度上降低了红细胞溶血率^[13]。聚乙二醇(PEG)修饰 MSNs (PEG-MSNs)在体内可作为一种优良的缓释药物载体。在前期研究的基础上, 本实验对载 PUE 的 PEG-MSNs (PUE@PEG-MSNs)进行药效学评价, 为进一步开发现代新型纳米药物载体奠定研究基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Zetasizer Nano ZS 纳米粒度电势仪, 英国马尔文仪器有限公司; SIGMA3-15 台式离心机, 德国 SIGMA 公司; FA1004 电子分析天平, 上海光学仪器一厂; JEM-2100 透射电子显微镜(TEM), 日本电子株式会社; SPECTRAMAX PLUS384 酶标仪, 美国 Molecular Devices 公司; LC-20AT 高效液相色谱仪, 日本岛津公司。

1.2 药品与试剂

PUE 原料药, 西安通泽生物科技有限公司, 批号 150624, 质量分数 98%; PUE 对照品, 批号 110752-201514, 供定量测定用, 质量分数≥98%,

中国食品药物检定研究院; PUE 注射液, 山东方明药业集团股份有限公司, 批号 20130707; 甲氧基-聚乙二醇-羧基(mPEG-COOH), 北京凯正生物科技有限公司, 相对分子质量约 2 000; 1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl)和 4-二甲氨基吡啶(DMAP)购自上海共价化学科技有限公司; 肌酸激酶(CK)、乳酸脱氢酶(LDH)、天冬氨酸转氨酶(AST)、丙二醛(MDA)试剂盒购自中生北控生物科技股份有限公司; 氯化硝基四氮唑蓝(NBT)染液购自上海工硕生物技术有限公司; 正硅酸乙酯(TEOS)、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)和氢氧化钠等均购自国药化学试剂有限公司; 色谱甲醇、乙腈购自美国 Tedia 试剂公司。

1.3 动物

雄性 SD 大鼠, 购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 许可证号 SYXK(湘)2014-0006。

2 方法与结果

2.1 MSNs 的制备

制备 2 mol/L 的 NaOH 溶液备用, 将 1.0 g CTAB 溶解于 480 mL 蒸馏水中, 用移液管移取 3.5 mL NaOH 溶液加入上述液体中, 保持温度 80 ℃, 溶液用磁力搅拌器搅拌 1 h, 随后移液管移取 TEOS 5 mL, 以约 3 s/滴的速度缓慢滴入上述溶液, 搅拌 24 h。搅拌结束后, 自然冷却, 并抽滤至干, 将滤纸上白色物质转移至烧杯中, 加入 500 mL 乙醇和 5 mL 37%浓盐酸, 于 78 ℃回流提取 12 h, 除去 CTAB, 再次抽滤, 得到白色粉末状物质, 先后用蒸馏水及甲醇各洗涤 3 次, 冷冻干燥, 即得 MSNs。

2.2 PEG-MSNs 的制备^[13]

分别称取 EDC·HCl 46 mg, DMAP 8 mg, mPEG-COOH 400 mg 于 50 mL 的烧瓶中, 再加入 DMF 20 mL 超声溶解反应物, 在常温下搅拌 1 h。随后加入 MSNs 400 mg, 继续搅拌 48 h。反应结束后, 离心, 弃去上清液, 所得沉淀用甲醇洗涤, 挥干甲醇, 冷冻干燥, 即得 PEG-MSNs, 待用。

2.3 载 PUE 的 MSNs (PUE@MSNs) 及 PUE@PEG-MSNs 的制备^[13]

精密称取 PUE 原料药 50 mg 溶于 5 mL 甲醇中得 10 mg/mL 的 PUE 溶液, 配制 3 份。再精密称取 50 mg MSNs 或 PEG-MSNs 加入到上述 PUE 溶液中 (将搅拌子加入具塞锥形瓶中, 用封口膜密封), 称定质量, 使用超声仪将溶液超声 5 min 混合均匀, 置于磁力搅拌器上搅拌 48 h。载药后, 补足缺失的质量, 离心, 取下层沉淀, 用甲醇洗涤 MSNs 表面残留的 PUE, 真空干燥, 即得 PUE@MSNs, 采用同样的方法制备 PUE@PEG-MSNs, 待用。

2.4 包封率和载药量的测定

2.4.1 色谱条件^[14] Phenomenex Luna C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5.0 μm, 美国菲罗门公司), 流动相为水-甲醇 (70:30); 体积流量 1 mL/min; 柱温 35 °C; 检测波长 250 nm, 理论板数按 PUE 峰计算为 5 200。

2.4.2 标准曲线的建立 精密称取 PUE 对照品适量, 加入甲醇配制成 100 μg/mL PUE 对照品储备液, 再精密吸取 8.0、6.0、4.0、2.0、1.0、0.5 mL 储备液, 转移到 10 mL 量瓶中, 加入甲醇至刻度, 即得质量浓度为 80、60、40、20、10、5 μg/mL 对照品溶液, 采用上述色谱条件进样测定系列对照品溶液的峰面积, 将质量浓度与峰面积进行回归, 得到线性回归方程 $Y=0.169 X-0.085$, $r=0.999 9$, 结果表明 PUE 在 5~80 μg/mL 线性关系良好。

2.4.3 包封率和载药量的测定 分别采用上述色谱条件测定 MSNs 载药前的 PUE 总量 ($W_{总}$), 以及未载入 MSNs 或 PEG-MSNs 的游离 PUE 量 ($W_{游}$), 最终真空干燥后产物 PUE@MSNs 或 PUE@PEG-MSNs 的质量计为 M , 按照下列公式计算包封率和载药量。经 HPLC-UV 定量测定, PUE@PEG-MSNs 的载药量为 14.7%, 包封率为 67.8%。

$$\text{包封率} = (W_{总} - W_{游}) / W_{总}$$

$$\text{载药量} = (W_{总} - W_{游}) / M$$

2.5 粒径、电势测定及形态观察

取适量 PUE@MSNs 和 PUE@PEG-MSNs, 加入适量蒸馏水溶解, 搅拌成均一体系, 采用马尔文 Zetasizer Nano ZS90 测定粒径和电势; 取适量 PUE@MSNs 和 PUE@PEG-MSNs 样品溶液, 采用无水乙醇充分稀释并超声使其均匀分散, 随后将样品溶液滴加在 200 目铜网上, 烘干, TEM 加速电压调至 200 kV, 约 30 min, 调整视野观察范围, 观察

纳米粒的形态。

如图 1 所示, PUE@MSNs 和 PUE@PEG-MSNs 的平均粒径分别为 (285.0 ± 10.3) 、 (308.0 ± 9.8) nm, 表明随着 PEG 的修饰, 纳米粒子的粒径随之提高。PUE@MSNs 和 PUE@PEG-MSNs 的 Zeta 电位均为负电势, 且电势基本维持在 -30 eV 以上, 体内血细胞膜带负电荷, 可以减少血细胞与纳米粒的相互作用, 提高血液相容性。

由图 2 显示 PUE@MSNs 和 PUE@PEG-MSNs 为具有蠕虫状孔道的球形颗粒, 粒径分布均匀。PEG 修饰 MSNs 后, 可以清楚地观察到纳米粒子表面略呈云雾状聚合物层, 纳米粒子间产生了一定程度上的粘连, 由此推测 PEG 高分子链成功接枝到 MSNs 纳米粒子上。同时纳米粒子表面也还存在清晰的平行条带, 这表明 PEG 修饰 MSNs 后, 药物载体仍然能够有效地维持纳米粒子的介孔结构。

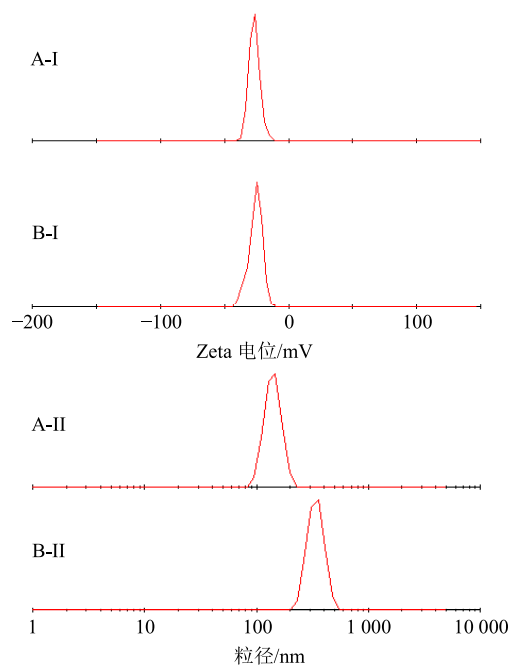


图 1 PUE@MSNs (A) 以及 PUE@PEG-MSNs (B) 的 Zeta 电位 (I) 和粒径分布 (II)

Fig. 1 Zeta potential (I) and particle diameter (II) of PUE@MSNs (A) and PUE@PEG-MSNs (B)

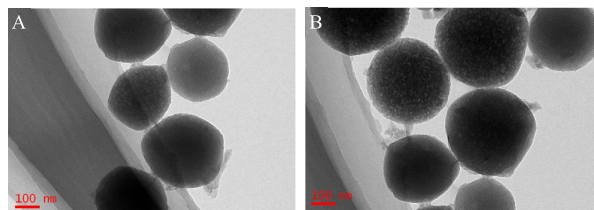


图 2 PUE@MSNs (A) 和 PUE@PEG-MSNs (B) 的 TEM 图

Fig. 2 TEM of PUE@MSNs (A) and PUE@PEG-MSNs (B)

2.6 红外图谱测定

通过傅里叶红外光谱 (FTIR) 对 PUE、MSNs、PEG-MSNs 和 PUE@PEG-MSNs 的化学性质进行表征, 扫描范围为 $4\ 000\sim 400\ \text{cm}^{-1}$, 所测样品采用 KBr 压片制样。由图 3 结果可知, PEG-MSNs 中的 $1\ 634.30\ \text{cm}^{-1}$ 峰推测为 PEG-COOH 的羧基与硅羟基结合的酯羰基, 其中 $1\ 099$ 、 $799\ \text{cm}^{-1}$ 的硅羟基峰强度明显弱于 MSNs 相对应的峰形, 可进一步证实 PEG-COOH 与硅羟基形成了酯键, 导致硅羟基数量相对偏少, 从而峰强变弱了。PUE@PEG-MSNs 未出现明显的 PUE 红外信息, 由此推测, PUE 基本

载入到 PEG-MSNs 的空隙中, 而不是简单地吸附在表面。

2.7 动物模型的制备

大鼠 ip 戊巴比妥钠 ($45\ \text{mg/kg}$) 麻醉后, 仰卧固定于手术台上, 进行气管插管, 连接小型动物呼吸机, 调节呼吸频率为 $80\sim 90\ \text{次/min}$, 沿胸骨左缘第 2~4 肋间隙开胸, 暴露心脏, 自制拉钩拉开肋骨, 在距冠状动脉左前降支根部 (LAD) $2\ \text{mm}$ 处穿线结扎 (Sham 组穿线不结扎), 迅速将心脏放回原位, 丝线缝合创口, 以心电图 II 导联 ST 段抬高作为模型制备成功的标志^[15]。

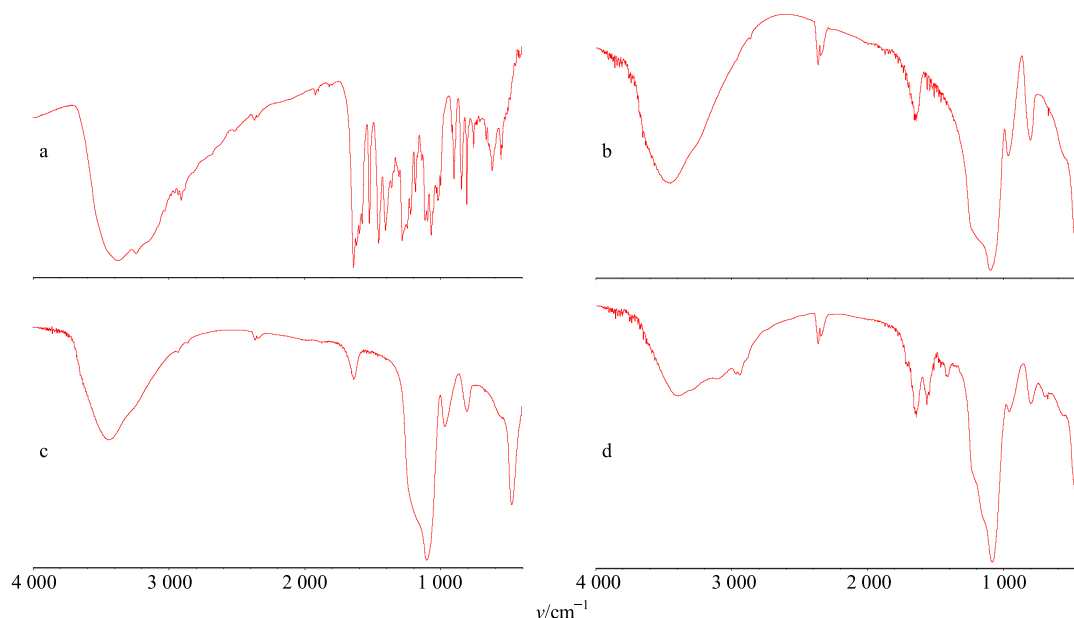


图 3 PUE (a)、MSNs (b)、PEG@MSNs (c) 和 PUE@PEG-MSNs (d) 的 FTIR 图谱

Fig. 3 FTIR of PUE (a), MSNs (b), PEG@MSNs (c), and PUE@PEG-MSNs (d)

2.8 分组给药

60 只大鼠按体质量随机分为 6 组 (每组 10 只): 假手术组大鼠在 LAD 下穿线但不结扎, 尾 iv 等量生理盐水; 模型组大鼠造模后尾 iv 等量生理盐水; PUE 注射液对照组大鼠在 LAD 结扎后 5 min 缓慢尾 iv PUE $20\ \text{mg/kg}$ (按临床人常用剂量换算); PUE@PEG-MSNs 各给药组大鼠在 LAD 结扎后 5 min, 缓慢尾 iv PUE@PEG-MSNs 68 、 136 、 $272\ \text{mg/kg}$ (PUE@PEG-MSNs 中 PUE 的量为 14.7% , 中剂量折算后与 PUE 注射液等剂量)。

2.9 指标测定

2.9.1 ST 段变化 采用 ECG 型小动物心电图机监测心电图, 记录给药后 30、60、90、120 min 的 ST 段变化情况。由表 1 数据分析可知, 心肌缺血 30 min 再灌注 30、60、90、120 min, 模型组大鼠心电图

ST 段明显抬高; 假手术组大鼠 ST 段几乎未改变; PUE 注射液和 PUE@PEG-MSNs 各剂量组大鼠 ST 段抬高程度明显降低, 随时间推移, PUE@PEG-MSNs 中、高剂量组大鼠 ST 段降低程度与 PUE 注射剂组相比差异显著 ($P<0.05$), 低剂量 ST 段降低程度基本与 PUE 注射液等同, 可能与 PEG-MSNs 纳米药物载体缓慢释放药物, 导致后期药物浓度高于 PUE 注射液有关。

2.9.2 生化指标 实验结束后, 打开大鼠腹腔, 采用注射器抽取腹主动脉血约 $5\ \text{mL}$, 静置 30 min 后, 离心分离血清, 按照试剂盒说明书测定大鼠血清中 CK、LDH、AST 和 MDA 含量。

由表 2 可知, 与模型组相比, PUE 注射液和 PUE@PEG-MSNs 各剂量组均显著降低急性心肌梗死大鼠血清 CK、LDH、AST 和 MDA 水平 ($P<0.05$ 、

表 1 PUE@PEG-MSNs 对急性心肌梗死大鼠心电图 ST 段变化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 1 Effects of PUE@PEG-MSNs on ST-elevation of electrocardiogram in acute myocardial ischemia rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	ST 段抬高幅度/mV			
		30 min	60 min	90 min	120 min
假手术	—	0	0	0	0
模型	—	0.31 ± 0.11	0.30 ± 0.08	0.28 ± 0.09	0.27 ± 0.07
PUE 注射液	20	0.22 ± 0.08 [▲]	0.20 ± 0.07 [▲]	0.21 ± 0.07 [▲]	0.22 ± 0.08 [▲]
PUE@PEG-MSNs	68	0.28 ± 0.07 [▲]	0.25 ± 0.07 [▲]	0.19 ± 0.08 ^{▲▲}	0.16 ± 0.06 ^{▲▲}
	136	0.24 ± 0.08 ^{▲▲}	0.19 ± 0.06 ^{▲▲*}	0.17 ± 0.07 ^{▲▲*}	0.12 ± 0.03 ^{▲▲*}
	272	0.22 ± 0.07 ^{▲▲}	0.14 ± 0.03 ^{▲▲*}	0.15 ± 0.05 ^{▲▲*}	0.08 ± 0.04 ^{▲▲*}

与模型组比较: [▲] $P < 0.05$ ^{▲▲} $P < 0.01$; 与 PUE 注射液组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$, 下表同[▲] $P < 0.05$ ^{▲▲} $P < 0.01$ vs model group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs puerarin injection group, same as below表 2 PUE@PEG-MSNs 对急性心肌梗死大鼠血清 CK、LDH、AST 和 MDA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 2 Effects of PUE@PEG-MSNs on levels of CK, LDH, AST, and MDA in AMI rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	CK/(U·L ⁻¹)	LDH/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)	MDA/(U·L ⁻¹)
假手术	—	3 042.8 ± 1 039.4	1 915.3 ± 306.5	458.7 ± 104.5	7.2 ± 1.9
模型	—	5 537.2 ± 1 135.7	4 325.1 ± 975.2	1 206.8 ± 218.7	12.1 ± 3.7
PUE 注射液	20	3 852.7 ± 1 028.5 [▲]	3 011.5 ± 618.7 [▲]	706.8 ± 128.6 ^{▲▲}	8.6 ± 1.3 ^{▲▲}
PUE@PEG-MSNs	68	3 921.5 ± 987.2 [▲]	2 975.4 ± 765.2 [▲]	802.4 ± 109.5 ^{▲▲}	8.2 ± 1.7 ^{▲▲}
	136	3 628.1 ± 821.4 ^{▲▲*}	2 674.1 ± 687.3 ^{▲▲*}	602.2 ± 136.8 ^{▲▲*}	7.6 ± 1.1 ^{▲▲*}
	272	3 415.7 ± 874.3 ^{▲▲*}	2 435.7 ± 587.1 ^{▲▲*}	521.5 ± 98.7 ^{▲▲*}	6.8 ± 0.7 ^{▲▲*}

0.01), 其中 PUE@PEG-MSNs 中、高剂量组与 PUE 注射剂组相比差异显著 ($P < 0.05$ 、0.01)。

2.9.3 心肌梗死面积 抽取腹主动脉血液后, 迅速剪开胸腔, 取心脏, 采用 PBS 冲洗干净, 再用滤纸吸尽心脏水分后沿冠状沟切除右心室, 留取左心室, 沿心尖到心基部方向平行在结扎线以下将心室切成 4~5 片, 每片厚约 0.1 cm, 置 0.1% NBT 染液中, 37 °C 孵育 10 min, 取出, 滤纸吸尽水分, 非梗死心肌为蓝色, 梗死心肌呈白色, 通过 Image ProPlus 6.0 图像分析软件计算梗死区面积和左心室面积, 计算梗死范围。

心肌梗死面积比 = 梗死区面积/左心室面积

由表 3 数据分析可知, 与模型组相比, PUE 注射液组和 PUE@PEG-MSNs 各剂量组可显著减少急性心肌梗死大鼠的心肌梗死面积 ($P < 0.05$ 、0.01), 其中 PUE@PEG-MSNs 中、高剂量组与 PUE 注射液组相比存在统计学差异 ($P < 0.05$)。

3 讨论

MSNs 是近年来新兴的一种功能性药物载体, 由于其高度有序、精确可调的孔道结构, 极高的比表面积, 较大的孔容和良好的化学性能而成为研究最为广泛的纳米药物载体, 并且取得了重要的研究进展^[16-17]。其具有以下特点: ①介孔硅药物载体尺寸为 2~50 nm, 在血液循环系统中可以自由流动,

表 3 PUE@PEG-MSNs 对急性心肌梗死大鼠心肌梗死面积的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 3 Effects of PUE@PEG-MSNs on myocardial infarct area in AMI rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	正常心肌面积/cm ²	心肌梗死面积/cm ²	心肌梗死面积比/%
假手术	—	3.68 ± 0.29	0	0
模型	—	2.58 ± 0.41	1.23 ± 0.29	32.3 ± 0.4
PUE 注射液	20	2.76 ± 0.43	0.74 ± 0.22 [▲]	21.1 ± 0.3 ^{▲▲}
PUE@PEG-MSNs	68	2.67 ± 0.39	0.76 ± 0.18 [▲]	22.3 ± 0.2 ^{▲▲}
	136	2.81 ± 0.52	0.67 ± 0.27 ^{▲▲}	19.7 ± 0.3 ^{▲▲*}
	272	3.06 ± 0.49	0.63 ± 0.24 ^{▲▲*}	17.7 ± 0.4 ^{▲▲*}

穿越细胞间隙,被组织细胞以内吞的方式摄取,很大程度上提高药物的生物利用度,增强药效;②介孔材料具有较高的比表面积,可以吸附装载大量药物,通过可控的表面孔道缓慢释放药物,将药物在预定时间,按某一速度释放于作用器官或特定靶组织,并可使药物浓度较长时间维持在有效浓度范围内,提高药物的治疗效果,从而减少用药剂量;③孔道大小可达纳米级,药物分子可以被装载其中,难以缔结再次形成晶体,从而维持在无定形态,故可增强难溶性药物的水溶性;④无定形的介孔硅材料本身无毒,化学结构稳定,且可以降解成 $\text{Si}(\text{OH})_4$ 通过肾脏排出体外^[18-19]。PEG 是环氧乙烷与水加成聚合得到的聚合物,相对分子质量在 200~25 000,PEG 具有高度的亲水性和良好的生物相容性,并且无毒、无免疫原性和无抗原性。鉴于这 2 种药物载体各自的优点,本研究采用 PEG 修饰 MSNs 负载 PUE,一方面,PEG 修饰改善 MSNs 的生物相容性,增强水溶性;另一方面,MSNs 可以很大程度上延长药物的半衰期,提高药效,两者优势互补。这样一来,PEG 修饰 MSNs 可以降低免疫原性(减少过敏反应),缓慢释放药物,提高生物利用度,增强药效^[20]。本研究 TEM 结果显示,PEG-MSNs 呈现条纹状的圆球形纳米粒,周边云雾状的条带可能是周围长链状舒展的 PEG 高分子;从红外测试结果分析,PEG-MSNs 粒子中硅羟基峰强变弱,且出现了 $1\,634.30\text{ cm}^{-1}$ 酯羰基,更进一步证实 PEG 修饰 MSNs。粒度分析结果显示,PEG 修饰的 MSNs 粒径保持在 300 nm 左右,电势为-30 eV 以上,有效的粒径控制和 PEG 的引入,使 MSNs 在水中具有良好的水分散性和稳定性。

急性心肌缺血是由于冠状动脉痉挛、心肌供血供氧不足致心肌代谢异常而导致的一种病理状态,可引起心绞痛、心肌梗死等严重心脏疾病。近年来,对急性心肌缺血损伤机制进行了深入研究,发现心肌缺血过程中磷脂酶激活,产生具有膜活性的游离脂肪酸,破坏细胞膜;并有大量儿茶酚胺释放、游离脂肪酸产生以及白细胞释放的自由基,它们均能导致细胞质膜损伤和通透性增加,使 CK、LDH、AST 释放入血,临床上常以血清心肌酶(CK、LDH、AST)含量作为心肌缺血损伤程度的诊断标准^[21-22];另外,MDA 是自由基与生物膜多聚不饱和脂肪酸发生脂质过氧化的产物,其产量与自由基的量相平行,测定心肌组织 MDA 含量可反映自由基的水平^[23]。

本研究结果发现,载 PUE 的 PEG 修饰 MSNs 可以显著降低 AMI 模型大鼠血清中 CK、LDH、AST 和 MDA 水平,减少心肌梗死面积,具有良好的心肌保护作用,且呈现剂量依赖性,尤以中、高剂量的作用明显强于 PUE 注射液。该结果表明,PEG 修饰 MSNs 可以显著增强 PUE 的药效,从 ST 段变化趋势分析,随着时间的推移,PUE 注射液降低 ST 段明显小于 PUE@PEG-MSNs 组,可能的原因是 PUE 药物本身在体内半衰期短,代谢较快,后期药量相对不足。而 PEG-MSNs 外围的 PEG 外壳具有良好的生物相容性和安全性,常用来作为外源性物质“伪装”的保护伞,可以逃避肝脾网状内皮系统的特异性识别,加之 PEG 高分子的化学结构,不易被肾小球所滤过,还可以借助于 MSNs 介孔缓慢释放药物,故在体内可以长循环,在很大程度上减少 PUE 的体内酶解,从而在体内保留大量 PUE,能较久维持其血药浓度。另外,PEG 高分子在缺血心肌部位具有较好的高通透性和滞留效应(enhanced permeability and retention effect, EPR)^[24-25]。正常组织血管壁细胞排列紧密,且结构完整,故 PEG 高分子载药系统随血液循环过程中几乎不会渗出,但在心肌缺血区域能透过通透性增加的血管内膜,汇集于梗死早期心肌组织。前期本课题组研究表明 PEG 化 PUE 在急性心肌缺血模型大鼠心肌组织中的 AUC 为正常大鼠的 1.7 倍,具有明显的缺血心肌靶向性^[26]。由此推测,PUE@PEG-MSNs 可能在急性心肌缺血模型大鼠部位具有靶向聚集作用,因此药效明显强于 PUE。

综合文献报道关于载 PUE 的脂质纳米粒、微乳与自微乳、纳米结晶、胶束与树突体等载药系统,可以很大程度上增强 PUE 的水溶性、提高口服生物利用度,但有些纳米粒之间存在容易聚集、粒径不均一、稳定性不佳等问题,且在注射用材料方面报道较少^[10]。本研究制备的 PUE@PEG-MSNs 具有粒径均一、载药量高的优点,在缺血心肌部位可能具有靶向聚集的优势,能有效增强药物的疗效,作为一种新型的注射用载药体系值得在药剂学上大力推广。

参考文献

- [1] 朱水兰,黎 宇,严奉东,等. 油酸诱导胰岛素抵抗 HepG2 细胞模型优化及小檗碱、黄芩苷、葛根素和甘草苷的体外降糖作用研究 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(10): 1402-1407.

- [2] 史永恒, 邓颖颖, 刘继平, 等. 葛根素抑制钠-葡萄糖协同转运蛋白 2 活性发挥促尿糖作用研究 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(10): 1408-1413.
- [3] 张环宇, 李大伟, 史彩虹. 葛根素的临床应用研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2012, 27(1): 75-78.
- [4] 张劲松. 葛根素注射液辅助治疗不稳定型心绞痛的临床研究及其代谢组学作用机制 [J]. 现代药物与临床, 2017, 32(8): 1454-1460.
- [5] 范群雄, 陈 昆. 葛根素注射液联合阿替洛尔治疗急性心肌梗死的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2017, 32(12): 2354-2357.
- [6] Liu X Y, Zhi H Y, Du F, *et al.* A HPLC-UV method for the determination of puerarin in rat plasma after intravenous administration of PEGylated puerarin conjugate [J]. *J Chromatogr B*, 2010, 878(31): 3297-3302.
- [7] 赵 庭, 贾运涛, 张良珂. 载葛根素聚乙烯亚胺/海藻酸钠自组装纳米粒的制备及性能研究 [J]. 中草药, 2017, 48(17): 3523-3528.
- [8] 刘伟星, 李 宁, 高崇凯. 葛根素自微乳化渗透泵控释胶囊的制备 [J]. 中草药, 2013, 44(12): 1568-1573.
- [9] 张 焦, 王 帆, 王计瑞, 等. 葛根素纳米晶自稳定 Pickering 乳液的制备可行性研究 [J]. 中草药, 2017, 48(1): 75-84.
- [10] 翟羽佳, 李凌冰. 葛根素纳米制剂的研究进展 [J]. 药学研究, 2016, 35(2): 97-99.
- [11] 李 楠, 刘 岩, 郭 盼, 等. 介孔二氧化硅纳米粒作为中药控释和靶向载体在肿瘤治疗中的应用进展 [J]. 天津中医药大学学报, 2017, 36(3): 161-166.
- [12] 袁宁宁, 谢鹏波, 侯慧玉, 等. PEG 修饰介孔硅纳米粒子负载丹参素的体外控制释放研究 [J]. 中草药, 2016, 47(14): 2441-2446.
- [13] Liu X Y, Ding Y X, Zhao B J, *et al.* *In vitro* and *in vivo* evaluation of puerarin-loaded PEGylated mesoporous silica nanoparticles [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2016, 42(12): 2031-2037.
- [14] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [15] 刘新义, 李健和, 向大雄, 等. 聚乙二醇化葛根素对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 中草药, 2013, 44(3): 327-330.
- [16] Mamaeva V, Rosenholm J M, Bate-Eya L T, *et al.* Mesoporous silica nanoparticles as drug delivery systems for targeted inhibition of notch signaling in cancer [J]. *Mol Ther*, 2011, 19(8): 1538-1546.
- [17] Chen C S, Zheng H Y, Xu J J, *et al.* Sustained-release study on exenatide loaded into mesoporous silica nanoparticles: *In vitro* characterization and *in vivo* evaluation [J]. *DARU*, 2017, 25(1): 20-28.
- [18] Liu R, Liao P, Liu J, *et al.* Responsive polymer-coated mesoporous silica as a pH-sensitive nanocarrier for controlled release [J]. *Langmuir*, 2011, 27(6): 3095-3099.
- [19] Zhao Y L, Li Z, Kabehie S, *et al.* pH-operated nanopistons on the surfaces of mesoporous silica nanoparticles [J]. *J Am Chem Soc*, 2010, 132(37): 13016-13025.
- [20] Yu E, Lo A, Jiang L, *et al.* Improved controlled release of protein from expanded-pore mesoporous silica nanoparticles modified with co-functionalized poly(*n*-isopropylacrylamide) and poly (ethylene glycol) (PNIPAM-PEG) [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2017, 7(49): 297-300.
- [21] 杨宇杰, 程晓亮, 吕英超, 等. 双氢丹酚酸 B 对大鼠急性心肌缺血的治疗作用 [J]. 中草药, 2010, 41(3): 447-449.
- [22] 宋旺弟, 袁长胜, 崔婷婷, 等. 玫瑰花挥发油对小鼠急性心肌缺血损伤的保护作用研究 [J]. 中草药, 2017, 48(22): 4701-4706.
- [23] 路 航, 王烁璿, 王秋静. 人参三醇皂苷对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 中草药, 2016, 47(2): 275-280.
- [24] Formiga F R, Garbayo E, Díaz-Herráez P, *et al.* Biodegradation and heart retention of polymeric microparticles in a rat model of myocardial ischemia [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2013, 85(3 Pt A): 665-672.
- [25] Scott R C, Crabbe D, Krynska B, *et al.* Aiming for the heart: Targeted delivery of drugs to diseased cardiac tissue [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2008, 5(4): 459-470.
- [26] Xia C F, Ye Z G, Zhou X N, *et al.* Tissue distribution of PEGylated puerarin in acute myocardial ischemia mode rats [J]. *Acta Pharm Sin*, 2014, 49(10): 1413-1417.