

• 药剂与工艺 •

银杏内酯 K 的 PLGA-PEG 纳米粒制备、表征和神经保护活性评价

马舒伟¹, 刘兴艳², 辛 杨³, 殷华峰⁴

1. 浙江医药高等专科学校, 浙江 宁波 315100

2. 宁波职业技术学院 乙烯工程副产物高质化利用浙江省应用技术协同创新中心, 浙江 宁波 315800

3. 齐齐哈尔大学化学与化学工程学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006

4. 中国药科大学 中药制药系, 江苏 南京 210009

摘要: 目的 制备及表征银杏内酯 K (GK) 聚乙二醇-聚乳酸-羟基乙酸共聚物纳米粒 (GK-mPEG-PLGA-NPs), 并评价其神经保护活性。方法 采用聚乙二醇-聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (PEG-PLGA-COOH) 作为载体, 复乳溶剂挥发法制备隐形纳米粒; HPLC 法测定 GK-mPEG-PLGA-NPs 的包封率及载药量; 动态光散射粒径仪和透射电镜测定 GK-mPEG-PLGA-NPs 的粒径分布、Zeta 电位及表面形态; 以 pH 7.4 磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 作为释放介质, 考察 GK-mPEG-PLGA-NPs 的体外释放行为; 采用体外细胞实验, 考察 GK-mPEG-PLGA-NPs 对 H₂O₂ 诱导肾上腺嗜铬细胞瘤 PC12 细胞损伤的保护作用。结果 GK-mPEG-PLGA-NPs 包封率和载药量分别为 (83.40±2.85)% 和 (3.26±0.24) mg/g; GK-mPEG-PLGA-NPs 平均粒径为 (93.19±2.77) nm; Zeta 电位为 (-11.93±1.71) mV; 60 h 内 GK-mPEG-PLGA-NPs 累积释药量为 (90.5±4.0)%。GK-mPEG-PLGA-NPs 对 H₂O₂ 诱导的 PC12 细胞存活率降低有明显的改善作用, 对乳酸脱氢酶 (LDH) 释放具有抑制作用, 但其保护作用明显弱于 GK 对 PC12 细胞作用。结论 GK-mPEG-PLGA-NPs 体外释放具有缓释性行为, 对 H₂O₂ 诱导 PC12 细胞具有神经保护作用, 表明 GK-mPEG-PLGA-NPs 具有应用前景, 值得进一步研究。

关键词: 银杏内酯 K; 聚乙二醇-聚乳酸-羟基乙酸共聚物纳米粒; 体外释放; 体外神经保护; 复乳溶剂挥发法; HPLC

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)07-1562-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.07.011

Preparation and characterization of ginkgolide K-loaded PLGA-PEG nanoparticles and its neuroprotective activity *in vitro*

MA Shu-wei¹, LIU Xing-yan², XIN Yang³, YIN Hua-feng⁴

1. Traditional Chinese Medicine Institute, Zhejiang pharmaceutical college, Ningbo 315100, China

2. Zhejiang Collaborative Innovation Center for High Value Utilization of byproducts from Ethylene, Ningbo Polytechnic, Ningbo 315800, China

3. Institute of Chemistry and Chemical Engineering, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China

4. School of Chinese Materia Medica Process, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract: Objective To prepare and characterize ginkgolide K-loaded mPEG-PLGA [poly (*D,L*-lactide-co-glycolide)-block-poly (ethylene glycol)] polymer nanoparticles (GK-mPEG-PLGA-NPs) and to evaluate its neuroprotective effect on the H₂O₂-induced PC12 cells injury *in vitro*. **Methods** The PLGA-PEG-COOH polymer was selected as carrier and double emulsion solvent evaporation technique was employed to prepare the stealth nanoparticles. The encapsulation efficiency (EE) and drug load (DL) of GK-mPEG-PLGA-NPs were investigated by HPLC. The size distribution, zeta potential, and surface morphology of GK-mPEG-PLGA-NPs were characterized by dynamic light scattering (DLS) and transmission electron microscopy (TEM), respectively. The *in vitro* release of GK-mPEG-PLGA-NPs was examined using phosphate buffer solution (pH 7.4) as the releasing

收稿日期: 2018-12-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81403067); 浙江省中医管理局项目 (2015ZB105); 浙江医药高等专科学校校级项目 (ZPCSR2015008); 黑龙江省省属高等学校基本科研业务费科研项目 (UNPYSCT-2017160.YSTSXK201849)

作者简介: 马舒伟 (1977—), 男, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为新药研究与开发。Tel: (0574)88222790 E-mail: address: mashuwei_2004@163.com

medium for 24 h. The H_2O_2 -induced PC12 cells injury models was established for the investigation of the protective effect of GK-mPEG-PLGA-NPs on nerve cells *in vitro*. **Results** EE and DL of GK-mPEG-PLGA-NPs was $(83.40 \pm 2.85)\%$ and (3.26 ± 0.24) mg/g, respectively. The average diameter of GK-mPEG-PLGA-NPs was (93.19 ± 2.77) nm and zeta potential was (-11.93 ± 1.71) mV. The cumulative rate of drug release was $(90.5 \pm 4.0)\%$ after 60 h in phosphate buffer solution. GK-mPEG-PLGA-NPs significantly inhibited the apoptosis of PC12 cells and the release of lactic dehydrogenase induced by H_2O_2 . However, the protective action of GK-mPEG-PLGA-NPs on the H_2O_2 -induced PC12 cells injury was significantly weaker than that of GK. **Conclusion** Our results proved that GK-mPEG-PLGA-NPs had a sustained release behavior *in vitro* and the neuroprotective effect of GK-mPEG-PLGA-NPs on H_2O_2 -induced PC12 cells, which indicates that GK-mPEG-PLGA-NPs has the prospect of application and deserves further research.

Key words: ginkgolide K; mPEG-PLGA; *in vitro* release; *in vitro* neuroprotection; double emulsion solvent evaporation technique; HPLC

银杏内酯 K (GK) 属于二萜内酯类化合物^[1]。体内研究表明, GK 可以改善大鼠脑中动脉缺血 (MCAO) 的神经损伤, 抑制脑缺血后神经元细胞钙离子浓度升高, 捕获自由基和抗脂质过氧化损伤作用^[2]; GK 能剂量依赖性地延长小鼠缺氧缺血的存活时间, 延长喘气时间, 减少乳酸含量, 降低碱性磷酸酶活性, 减小脑指数和脑组织含水量, 改善神经细胞的损伤, 减少组织坏死^[3]。体外研究表明, GK 可以减轻双氧水 (H_2O_2) 诱导的肾上腺嗜铬细胞瘤 PC12 细胞凋亡, 抑制活性氧 (ROS) 的生成, 提高细胞存活率^[4]; GK 调节谷氨酸诱导 PC12 细胞中 Bcl-2 以及 Bax 的表达^[5]; GK 能够通过调节 p38 和 JNK 蛋白表达抑制缺氧和葡萄糖诱导的人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞凋亡^[6]。总而言之 GK 逐渐成为治疗脑缺血热点药物之一, 然而, GK 体内代谢半衰期约为 3 h^[7], 而临床上脑缺血最佳治疗时间在 3~6 h, 说明 GK 体内代谢时间较短, 为了提高临床应用的治疗效果, 需要提高体内循环时间。

聚合物纳米粒 (NPs) 是一个广泛而复杂的研究领域, 以聚合物 NPs 为基础的给药系统被设计用来改善药物的生物利用度、释放度和其他药动学^[8-11]。一般来说, 聚合物 NPs 比脂类 NPs 更有优势, 因为它们可以被设计成即使在稀释浓度下结构还很稳定的 NPs^[12]。其中, 聚乙二醇单甲醚-聚乳酸-乙醇酸共聚物 (mPEG-PLGA) 共聚物材料常被广泛用来制备纳米粒, 聚乙二醇 (PEG) 可以改善载药微粒在体内的停留时间以及稳定性^[13-15]。PEG 接枝可以遮盖部分多肽的抗原决定簇, 因此可以降低网状内皮组织的清除率和被免疫系统识别的可能性, 同时也可以减低被蛋白酶降解的可能性。另一方面 PEG 化可以提高粒子的粒径, 从而降低被肾脏过滤的可能性以及改变在体内的分布^[16]。因此, 本

实验在此基础上, 采用 PEG-PLGA 嵌段共聚物包裹 GK 来制备纳米粒 (GK-mPEG-PLGA-NPs), 并对体外释放行为和体外活性进行评价, 以延缓 GK 体外释放和保持结构稳定和生物活性。

1 仪器与材料

1.1 仪器

超声乳化仪, 美国 Branson 公司; RZR2021 电子恒速搅拌机, 德国 Heidolph 公司; 5418 型高速离心机, 德国 Eppendorf 公司; VTX-3000L 型 UZUSIO 涡旋混合器, 日本 LMS 公司; VD53 真空干燥箱, 德国 Binder 公司; Zen3600HS 激光粒度分析仪, 英国 Malvern 公司; Agilent1100 系列高效液相色谱仪, 安捷伦科技有限公司; JEM-2010 透射电镜, 日本 JEOL 公司; R-210 型旋转蒸发仪, 瑞士 Buchi 公司; LGJ-18S 冷冻干燥机, 北京松源华兴科技发展有限公司; SW-CJ-1f 超净工作台, 苏净集团安泰公司; MCO-175 培养箱, 日本 Sanyo 公司; Ckx41 倒置显微镜, 日本 Olympus 公司; ELX-800UV 酶标仪, Bio-Tek 公司; XS 电子天平, Mettler Toledo 公司; 透析袋, 美国 Viskae 公司, 截留相对分子质量 1 000。

1.2 药品与试剂

GK, 质量分数大于 95%, 广东省中药研究所提供; NH_2 -PEG-COOH, 上海芃硕科技有限公司; 聚乳酸-羟基乙酸 (PLGA-COOH), 乳酸 (LA) - 羟基乙酸 (GA) 50:50, 特性黏度为 40 L/kg, 上海舜纳科技有限公司; *N*-羟基琥珀酰亚胺 (NHS), 上海源叶生物科技有限公司; *N,N*-二异丙基乙胺、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC·HCl), 上海海曲化工有限公司; 聚乙烯醇 (PVA), 上海美梦佳化工科技有限公司; 色谱甲醇, 德国默克公司; 乳酸脱氢酶 (LDH) 试剂盒, 南京建成生物工程研究所; DMEM、MTT、Trypsin、

H₂O₂, Sigma 公司; 胎牛血清, 江苏晶美生物科技有限公司; 大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤 PC12 细胞克隆株, 丰晖生物科技有限公司; RPMI 1640 培养液 (10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素, pH 7.2), 杭州四季青生物工程材料有限公司; 其余试剂为分析纯, 水为去离子水。

2 方法与结果

2.1 纳米粒制备

2.1.1 空白纳米粒制备 精密称取 PLGA-COOH 10.0 g 置于 20 mL 二氯甲烷中, 涡旋至完全溶解, 向此溶液中分别加入 NHS 260 mg、EDC·HCl 450 mg 充分反应后 PLGA-COOH 转换成 PLGA-NHS, 将其在乙醚中沉淀, 洗涤提纯后真空干燥。精密称取 2.00 g PLGA-NHS 溶于 6 mL 氯仿, 继而加入 NH₂-PEG-COOH 500 mg 和 *N,N*-二异丙基乙胺 60 mg, 充分反应后在甲醇中沉淀, 将沉淀物真空干燥, 得空白纳米粒。

2.1.2 载药纳米粒制备 精密称取 40 mg mPEG-PLGA 置于 1 mL 醋酸乙酯中充分涡旋溶解作为油相, 向此溶液中加入质量浓度为 1.35 mg/mL 的 GK 溶液 100 μ L, 冰浴超声 (150 W, 60 s) 60 s 乳化形成 W/O 型初乳溶液。用 6% PVA 溶液 5 mL 作为外水相, 加至初乳溶液中, 冰浴超声 (150 W, 90 s) 形成 W/O/W 复乳, 将此复乳搅拌 (200 r/min) 1 h, 离心 (5 000 $\times g$) 60 min, 收集纳米粒, 以去离子水重悬洗涤 3 次后冷冻干燥 24 h, 即得载药固态纳米粒^[17]。

2.2 含量测定方法

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 EclipseSB-C₁₈ 柱 (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相为甲醇-四氢呋喃-水 (40:10:50); 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 225 nm; 柱温 35 $^{\circ}$ C; 进样体积 10 μ L。理论塔板数以 GK 色谱峰计算不低于 12 000。结果显示, GK 在约 18 min 处出峰, 峰形良好, 无杂质干扰, 理论塔板数和分离度均符合测定要求。专属性实验表明, mPEG-PLGA 不干扰 GK 的测定, 色谱图见图 1。

2.2.2 标准曲线的建立 精密称定 GK 对照品约 5 mg 置于 5 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 作为储备液。分别精密量取储备液 0.1、0.5、1.0、1.5、2.0 mL 于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 配制系列溶液, 质量浓度分别为 0.01、0.05、0.10、0.15、0.20 mg/mL。精密移取上述系列质量浓度溶液 10 μ L, 注入液相色谱仪, 记录色谱图。峰

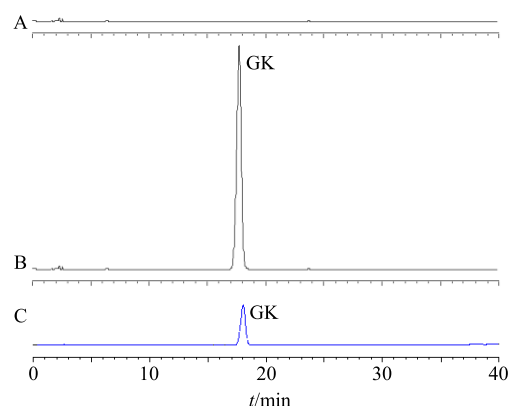


图1 mPEG-PLGA (A)、GK (B) 和 GK-mPEG-PLGA-NPs (C)溶液的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC diagram of mPEG-PLGA (A), GK (B) solution, and GK-mPEG-PLGA-NPs (C)

面积 (A) 对质量浓度 (C) 进行线性回归, 得回归方程 $A=2\,491\,C-1.443\,4$, $r=0.999\,8$, 表明本品进样质量浓度在 0.01~0.20 mg/mL 呈良好线性关系。

2.2.3 载药量和包封率的测定 精密量取 GK-mPEG-PLA-NPs 混悬液于具塞离心管中, 40 000 r/min 离心 (40 $^{\circ}$ C) 60 min, 取上清液 1 mL, 置 10 mL 棕色量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 经 0.22 μ m 微孔滤膜滤过, 取续滤液按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 计算游离 GK 的量, 记作 W_1 ; 取离心后沉淀物, 蒸馏水洗涤 3 次, 真空冷冻干燥后精密称定总质量, 记作 W 。另精密量取 GK-mPEG-PLGA-NPs 混悬液 1 mL, 置 10 mL 棕色量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 超声, 经 0.22 μ m 微孔滤膜滤过, 取续滤液按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 计算纳米粒混悬液中总的药物量, 记作 W_0 , 按公式计算纳米粒的包封率和载药量。

$$\text{包封率}=(W_0-W_1)/W$$

$$\text{载药量}=(W_0-W_1)/W_0$$

2.3 纳米粒的物理表征

2.3.1 粒径和纳米粒分散性指数 (PDI) 的测定 取验证工艺获得的冻干纳米粒适量, 均分散于重蒸水中, 采用粒度分析仪 25 $^{\circ}$ C 测定平均粒径、Zeta 电位及 PDI。PDI 越小说明粒径越均一, 一般情况下认为 PDI<0.3, 纳米粒 PDI 值为 0.263 ± 0.03 , 表示纳米粒粒径较均一。粒径为 (93.19 ± 2.77) nm, 表明纳米粒粒径控制在 150 nm 以内。Zeta 电位为 (-11.93 ± 1.71) mV, 说明纳米粒表面带有负电荷, 有利于纳米粒分散体系的稳定^[18]。

2.3.2 纳米粒的表面形貌 取优化工艺下制得的

GK-mPEG-PLGA-NPs 样品粉末少许, 制备成悬浮液滴到已载有碳膜的铜网上, 用 1.0% 磷钨酸染色, 待其干燥后即得透射电镜样品, 结果见图 2。GK-mPEG-PLGA-NPs 分散较好, 粒径相对均一, 呈类圆形。

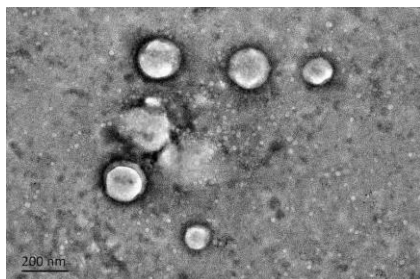


图 2 GK-mPEG-PLGA-NPs 的透射电镜图

Fig. 2 Transmission electron microscope photograph of GK-mPEG-PLGA-NPs

2.4 体外药物释放特性

分别精密称取 GK 原料药粉末和 GK-mPEG-PLGA-NPs 冻干粉适量(含药 1.5 mg), 分散于 2 mL 释放介质(即 pH 5.8 PBS 缓冲液, 含 1% 聚山梨酯 80), 装入预先处理好的透析袋, 密封后置于 200 mL 释放介质中, 于 $(37.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 恒温水浴振荡(75 r/min), 定时取样 1 mL, 并补充同温等量释放介质。样品用 $0.22\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 取续滤液按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 计算累积释放率, 绘制释药曲线, 见图 3。可知, GK 原料药在释放介质中释放较快, 在 4 h 内几乎完全释放, 累积释放率为 94.6%。而 GK-mPEG-PLGA-NPs 在 8 h 累积释放率为 54.17%, 在 24 h 累积释放率达到 75.93%, 具有明显的缓释特征。采用 OriginPro 8.0.6 软件, 分别用零级动力学方程、一级动力学方程、Higuchi 方程和 Weibull 方程对 GK-mPEG-PLGA-NPs 的体外释药进行拟合, 结果见表 1。证明其释药行为符合 Weibull 方程。

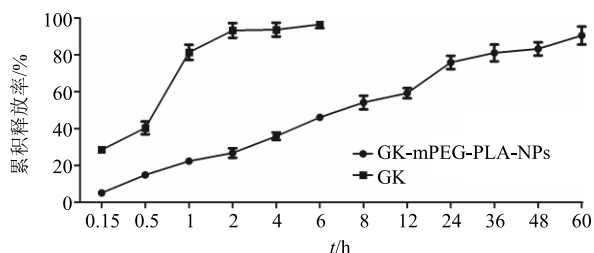


图 3 GK 与 GK-mPEG-PLGA-NPs 的体外累积释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 *In vitro* accumulate release curves of GK and GK-mPEG-PLGA-NPs ($\bar{x} \pm s, n=3$)

表 1 体外释放拟合方程分析

Table 1 *In vitro* accumulate release curves analysis

拟合方程	模型公式	r
零级动力学	$M_t = aT + b$	0.764 1
一级动力学	$M_t = a(1 - e^{-bt})$	0.932 3
Higuchi	$M_t = at^{1/2} + b$	0.949 8
Weibull	$M_t = a[1 - e^{-k(t-t_0)^d}]$	0.994 3

2.5 体外细胞毒性研究

2.5.1 细胞培养和处理 取对数生长期的 PC12 细胞用胰酶消化, 离心, 用 PBS 液洗 3 遍, 稀释细胞密度 1×10^5 个/mL。将细胞分为对照组(细胞在血清 DMEM 培养基中正常培养, 24 h 后换培养液)、 H_2O_2 组(将细胞培养 24 h 后与 0.3 mmol/L H_2O_2 共培养 24 h)、GK 组(将细胞用 0.02 mg/mL GK 培养 24 h 后, 加入 0.3 mmol/L H_2O_2 共培养 24 h)^[3]和 mPEG-PLGA-NPs 组(将细胞用 0.6 mg/mL 的 mPEG-PLGA-NPs 培养 24 h 后, 加入 0.3 mmol/L H_2O_2 共培养 24 h)和 GK-mPEG-PLGA-NPs 组(将细胞用 0.6 mg/mL 的 GK-mPEG-PLGA-NPs 培养 24 h 后, 加入 0.3 mmol/L 的 H_2O_2 共培养 24 h)。

2.5.2 细胞存活率 分组及药物处理后, 每孔中加入 20 μL 5 mg/mL MTT 的 PBS 缓冲液, 温育 4 h, 去掉培养基及 MTT, 每孔中加入 150 μL DMSO, 振荡 10 min, 使甲臢颗粒彻底溶解, 用酶标仪测定各孔在 570 nm 处的吸光度(A_{570})。当 PC12 细胞用 0.3 mmol/L H_2O_2 作用 24 h 后, 细胞存活率与对照组相比明显降低($P < 0.01$)。与 H_2O_2 组比较, 用 GK 对 PC12 细胞预处理 24 h, 并与 0.3 mmol/L H_2O_2 共同温育 24 h 后, 可提高 PC12 细胞的存活率($P < 0.01$)。mPEG-PLGA-NPs 对细胞存活率具有一定影响, 但是无统计学意义。GK-mPEG-PLGA-NPs 对细胞存活率具有显著性影响, 但与 GK 组比较发现, 对细胞存活率影响明显低于 GK 组($P < 0.01$, 表 2)。

2.5.3 LDH 活性的测定 收集 100 μL 培养液, 加入 1 mL 含 70% 乳酸钠的基质液和 0.2 mg 的辅酶 I 充分反应, 在碱性条件下用 2,4-二硝基苯肼显色, 测定 440 nm 处的吸光度(A_{440})。0.3 mmol/mL H_2O_2 作用于 PC12 细胞 24 h, 可以使细胞 LDH 的释放量(以各组与对照组的 LDH 的百分比表示)比对照组增加 1.57 倍。用 GK 对 PC12 细胞预处理 24 h, 则可明显抑制 LDH 释放(表 2)。mPEG-PLGA-NPs 对细胞 LDH 释放无明显的影响, GK-mPEG-PLGA-NPs 对细胞 LDH 释放具有显著抑制作用, 但与 GK

组比较发现,对细胞 LDH 释放抑制作用明显低于 GK 组。

2.5.4 细胞核 Hoechst 3334 染色 将细胞以密度为 1×10^6 个/mL 接种于 6 孔板,分组及药物处理后,用 PBS 洗涤 2 次,4%多聚甲醛室温固定 15 min。PBS 洗涤 3 次,加入 Hoechst33342 染色液避光染色 10 min,再用 PBS 清洗 2 次,抗荧光淬灭封片剂封片后荧光显微镜下观察。选取镜下正常 PC12 细胞染色阳性神经细胞计数。

由图 4 和表 3 可见, H_2O_2 预处理细胞 24 h 后, PC12 细胞凋亡率增加。通过 GK 预处理 PC12 细胞能够明显降低细胞凋亡率。在同一质量浓度下, GK-mPEG-PLGA-NPs 对 PC12 细胞的凋亡率降低作用较 GK 作用弱。

3 讨论

PLGA 作为纳米粒制备材料,被美国 FDA 批准在药物中应用已有 30 多年历史,无论大分子和小分子、疏水分子和亲水性分子都可以用其制备纳米粒。

表 2 GK 和 GK-mPEG-PLGA-NPs 对 PC12 细胞存活率和 LDH 释放率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effects of survival ratio and LDH release of PC12 cells induced by H_2O_2 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量	细胞存活率/%	LDH 释放率/%
对照		98.67 ± 2.94	98.33 ± 2.73
H_2O_2	$0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	$49.50 \pm 4.23^{***}$	$252.37 \pm 12.46^{***}$
mPEG-PLGA-NPs + H_2O_2	$0.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1} + 0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	56.17 ± 3.19	241.50 ± 19.01
GK-mPEG-PLGA-NPs + H_2O_2	$0.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1} + 0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	$68.67 \pm 3.50^{##\$}$	$197.77 \pm 12.06^{##\$}$
GK + H_2O_2	$0.02 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1} + 0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	$73.83 \pm 3.60^{##}$	$183.43 \pm 7.79^{##}$

与对照组比较: $***P < 0.001$; 与 H_2O_2 组比较: $^{##}P < 0.01$; 与 GK + H_2O_2 组比较: $^{\$}P < 0.05$, 下同

$***P < 0.001$ vs control group; $^{##}P < 0.01$ vs H_2O_2 group; $^{\$}P < 0.05$ vs GK + H_2O_2 group, same as below

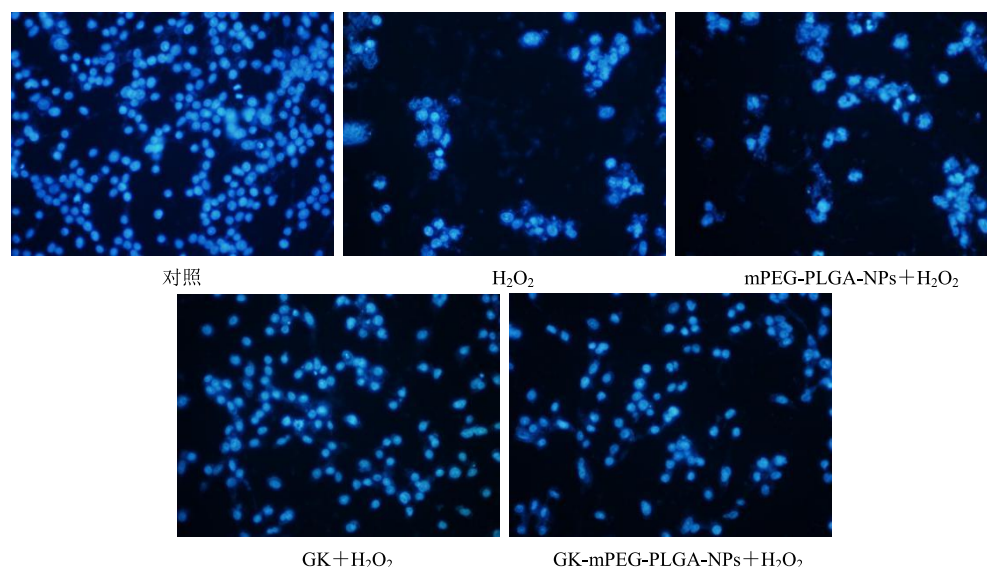


图 4 GK 和 GK-mPEG-PLGA-NPs 对 PC12 细胞凋亡的影响 (Hoechst 3334 染色)

Fig. 4 Effect of GK and GK-mPEG-PLGA-NPs on H_2O_2 -induced PC12 apoptosis (Hoechst 33342 staining)

表 3 Hoechst 33342 染色方法评价 GK 和 GK-mPEG-PLGA-NPs 对 PC12 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of different groups on H_2O_2 -induced PC12 apoptosis by Hoechst 33342 staining ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量	凋亡率/%
对照	—	6.38 ± 1.23
H_2O_2	$0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	$74.40 \pm 3.79^{***}$
mPEG-PLGA-NPs + H_2O_2	$0.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1} + 0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	45.27 ± 3.30
GK-mPEG-PLGA-NPs + H_2O_2	$0.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1} + 0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	$35.65 \pm 3.58^{##\$}$
GK + H_2O_2	$0.02 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1} + 0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	$13.03 \pm 2.23^{##}$

药物释放的数量和速度都能按照设计来控制^[19]；PEG 作为常用的生物材料，对纳米粒表面进行修饰，可以增加纳米粒的半径，减少调理素吸附作用，减少网状内皮系统的吸收，增加循环半衰期，延长药物在血液中滞留时间，提高药物在脑中的含量，从而提高生物利用度^[20-21]。纳米颗粒分散的物理稳定性取决于粒径电荷、粒径及其分布状态，因此，粒径和表面电荷作为重要参数。采用 TEM 分析纳米粒的尺寸、形状和物理稳定性特征，发现纳米粒呈典型的球形，说明纳米具有较好的分散稳定性^[22]。药物通过静脉给药时粒径大小将直接影响到制剂分布取向，直径为 150 nm 左右的粒子，可以通过肝脏而进入脾脏、骨髓，被单核-巨噬细胞系统（mono-nuclear phagocyte system, MPS）的巨噬细胞（尤其是肝脏的 Kupffe 细胞）摄取，形成被动靶向^[23]。因此，设计纳米粒直径应控制在 100 nm 以内，达到预期的靶向隐形效果。另外，PEG 修饰纳米粒后减少表面负电荷，这可能是由于粒子表面存在 mPEG 链缘故^[24]。此外，纳米粒表面较高的 PEG 链密度会降低 PEG 链的迁移率，从而降低 PEG 层的位阻特性^[25]。另一方面，如果 PEG 浓度过低，调理素会附着在表面，隐身效果会降低^[26]。所以 PEG 化纳米粒减低表面电荷，有利于分散体系稳定性。

体外释放实验中，mPEG-PLGA 纳米粒能够保持药物释放时间长达数小时。药物释放由 2 个部分组成：一个快速的初始（爆发），然后是一个缓慢的指数阶段。最初的快速释放可能是由于吸附在纳米粒表面或靠近纳米粒表面的药物。在释放介质中加入纳米粒后，药物组分迅速扩散到周围的液体中，构成了释放剖面的快速初始部分。快速释放期间药物释放量受纳米粒组成的影响，随着纳米粒 mPEG 含量的增加，药物释放量增加^[27]。实验中发现药物释放为存在快速释放药物过程，表明制备纳米粒中 mPEG 含量较高。

纳米粒对 PC12 细胞影响的研究发现，空纳米粒对细胞基本无保护作用，也无损伤作用，说明纳米粒是很好的生物相容性材料，与文献报道基本一致^[28]。通过比较发现，GK-mPEG-PLGA-NPs 对细胞保护作用明显弱于 GK，说明纳米粒中 GK 在体外存在缓慢释放的过程，与体外释放实验数据基本一致，细胞接触药物浓度明显较低，从而对细胞保护作用较弱，而 GK 组细胞直接接触药物，能够最大限度发挥作用。所以，为了提高药物生物利用度，

应提高药物载药量，以增加药物在血液中滞留时间和保证药物有效浓度。

参考文献

- [1] 汪素娟, 康 安, 狄留庆, 等. 银杏叶提取物主要活性成分药动学研究进展 [J]. 中草药, 2013, 44(5): 626-631.
- [2] Ma S, Yin H, Chen L, *et al.* Neuroprotective effect of ginkgolide K against acute ischemic stroke on middle cerebral ischemia occlusion in rats [J]. *J Nat Med*, 2012, 66(1): 25-31.
- [3] 马舒伟, 陈旅翼, 何盛江, 等. 银杏内酯 K 对脑缺血的保护作用 [J]. 中国现代应用药学, 2011, 28(10): 877-880.
- [4] Ma S, Liu X, Xun Q, *et al.* Neuroprotective effect of ginkgolide K against H₂O₂-induced PC12 cell cytotoxicity by ameliorating mitochondrial dysfunction and oxidative stress [J]. *Biol Pharm Bull*, 2014, 37(2): 217-225.
- [5] Ma S, Liu H, Jiao H, *et al.* Neuroprotective effect of ginkgolide K on glutamate-induced cytotoxicity in PC12 cells via inhibition of ROS generation and Ca(2+) influx [J]. *Neurotoxicology*, 2012, 33(1): 59-69.
- [6] Liu Q, Li X, Li L, *et al.* Ginkgolide K protects SH-SY5Y cells against oxygen-glucose deprivation-induced injury by inhibiting the p38 and JNK signaling pathways [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(3): 3185-3192.
- [7] Fan Z Y, Liu X G, Guo R Z, *et al.* Pharmacokinetic studies of ginkgolide K in rat plasma and tissues after intravenous administration using ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2015, 988: 1-7.
- [8] Yildiz T, Gu R, Zauscher S, *et al.* Doxorubicin-loaded protease-activated near-infrared fluorescent polymeric nanoparticles for imaging and therapy of cancer [J]. *Int J Nanomed*, 2018, 13: 6961-6986.
- [9] 邱瀚弘, 朱志军, 张雪洁, 等. 药载比对和厚朴酚-分枝状聚乙二醇聚合物 G2 纳米粒形态及体外抗肿瘤活性的影响 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(11): 1951-1957.
- [10] 朱文静, 张良珂. 载和厚朴酚介孔二氧化硅包覆聚吡咯纳米粒的制备研究 [J]. 中草药, 2018, 49(9): 2057-2062.
- [11] Soni N, Dhiman R C. Phytochemical, anti-oxidant, larvicidal, and antimicrobial activities of castor (*Ricinus communis*) synthesized silver nanoparticles [J]. *Chin Herb Med*, 2017, 9(3): 289-294.
- [12] Wang Y, Rapakousiou A, Ruiz J, *et al.* Metalation of

- polyaminedendrimers with ethynyl cobalticenium for the construction of mono- and heterobimetallic polycationicmetal lodendrimers [J]. *Chemistry*, 2014, 20(35): 11176-11186.
- [13] 徐骏军, 陈丹飞, 宋倩倩, 等. pH 值响应释药 As_2O_3 聚乙二醇-聚己内酯-聚乙烯亚胺纳米粒的制备及体外评价 [J]. *中草药*, 2018, 49(23): 5532-5540.
- [14] 刘洋, 谢栓栓, 曾洁, 等. 表面修饰适配体 S6 的聚乳酸-羟基乙酸/聚乙二醇共聚物纳米粒制备及其运载小干扰 RNA 的应用研究 [J]. *有机化学*, 2018, 38(10): 2706-2712.
- [15] 童晓东, 范永春, 严玮. 姜黄素维生素 E 聚乙二醇琥珀酸酯-聚乙二醇硬脂酸酯 15 胶束对姜黄素溶解度和口服生物利用度的影响 [J]. *中草药*, 2017, 48(5): 902-906.
- [16] Veronese F M, Pasut G. PEGylation, successful approach to drug delivery [J]. *Drug Discov Today*, 2005, 10(21): 1451-1458.
- [17] Fernandes C, Martins C, Fonseca A, *et al.* PEGylated PLGA nanoparticles as a smart carrier to increase the cellular uptake of a coumarin-based monoamine oxidase B inhibitor [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10(46): 39557-39569.
- [18] 刘朝勇, 肖云芝, 李瑞生, 等. 小菜蛾抗菌肽聚乳酸-羟基乙酸共聚物纳米粒的制备及体外评价 [J]. *中草药*, 2015, 46(3): 348-352.
- [19] Fahmy T M, Samstein R M, Harness C C, *et al.* Surface modification of biodegradable polyesters with fatty acid conjugates for improved drug targeting [J]. *Biomaterials*, 2005, 26(28): 5727-5736.
- [20] Sonkusare S K, Kaul C L, Ramarao P. Dementia of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders-memantine, a new hope [J]. *Pharm Res*, 2005, 51(1): 1-17.
- [21] Cano A, Ettcheto M, Espina M, *et al.* Epigallocatechin-3-gallate loaded PEGylated-PLGA nanoparticles: A new anti-seizure strategy for temporal lobe epilepsy [J]. *Nanomedicine*, 2018, 14(4): 1073-1085.
- [22] Kakkar V, Muppu S K, Chopra K, *et al.* Curcumin loaded solid lipid nanoparticles: An efficient formulation approach for cerebral ischemic reperfusion injury in rats [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2013, 85(3 Pt A): 339-345.
- [23] 孙敏捷, 张乐洋, 平其能. 长春碱 PCL-PEG-PCL 纳米粒的制备及质量评价 [J]. *中国药科大学学报*, 2010, 41(1): 29-34.
- [24] Essa S, Rabanel J M, Hildgen P. Effect of polyethylene glycol (PEG) chain organization on the physicochemical properties of poly (*D,L*-lactide) (PLA) based nanoparticles [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2010, 75(2): 96-106.
- [25] Owens III D E, Peppas N A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles [J]. *Int J Pharm*, 2006, 307(1): 93-102.
- [26] 高红军. 功能协同的复合胶束作为抗肿瘤纳米药物载体的研究 [D]. 天津: 南开大学, 2014.
- [27] 王岩. 不同分子量的 MPEG-PLGA 纳米药物载体的体外降解和药物释放行为研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2014.
- [28] Thauvin C, Schwarz B, Delie F, *et al.* Functionalized PLA polymers to control loading and/or release properties of drug-loaded nanoparticles [J]. *Int J Pharm*, 2018, 548(2): 71-77.