

# 丹参酮 II<sub>A</sub> 聚乙二醇-聚己内酯纳米胶束的制备、细胞内分布及减少心肌缺血再灌注损伤的研究

王 松<sup>1</sup>, 汪茂胜<sup>2</sup>, 周定荣<sup>3\*</sup>, 房 芳<sup>1</sup>, 窦润鹏<sup>1</sup>

1. 南阳市中心医院 内分泌科, 河南 南阳 473009

2. 南阳医学高等专科学校 临床医学系, 河南 南阳 473009

3. 中南大学湘雅二医院 中心实验室, 湖南 长沙 410011

**摘 要:** **目的** 采用薄膜水化法制备丹参酮 II<sub>A</sub> 聚乙二醇-聚己内酯 (PEG-PCL) 纳米胶束, 并研究该胶束的细胞内分布及抗心肌缺血再灌注损伤的作用。 **方法** 采用正交试验优选丹参酮 II<sub>A</sub> PEG-PCL 纳米胶束的制备工艺条件, 优选后的丹参酮 II<sub>A</sub> PEG-PCL 纳米胶束进行粒径、Zeta 电位和透射电镜检测表征, 并进行稳定性评价, 以香豆素-6 作为荧光探针, 评价 PEG-PCL 纳米胶束在细胞内的摄取及分布, 再进行细胞外存留药物实验, 验证 PEG-PCL 纳米胶束促进药物的细胞摄取性能; 采用结扎冠状动脉方法构建心肌缺血再灌注损伤大鼠模型, 评价丹参酮 II<sub>A</sub> PEG-PCL 纳米胶束的药效作用。 **结果** 丹参酮 II<sub>A</sub> PEG-PCL 纳米胶束的优选工艺条件: 丹参酮 II<sub>A</sub> 与 PEG-PCL 投料比为 1.2:10, 转速为 100 r/min, 水化温度为 37 ℃, 采用旋蒸方式形成薄膜, 然后冷冻干燥除尽有机溶剂, 在水化超声形成纳米胶束; 优选工艺后的丹参酮 II<sub>A</sub> PEG-PCL 纳米胶束粒径为 (16.8±0.4) nm, Zeta 电位为 (-29.8±4.9) mV, 载药量为 (7.8±0.6) %, 包封率为 (86.4±5.2) %, 稳定性良好; 荧光实验表明, PEG-PCL 纳米胶束可以促进药物的细胞摄取, 进入细胞后, 还可将药物聚集在线粒体周围, 重合性良好; 药效实验结果表明, 丹参酮 II<sub>A</sub> PEG-PCL 可以明显降低模型动物血清肌酸激酶 (CK)、乳酸脱氢酶 (LDH)、心肌肌钙蛋白 (cTnI) 水平, 升高超氧化物歧化酶 (SOD) 水平, 减少心肌梗死面积, 改善心肌病理变化, 这些药效结果均明显优于丹参酮 II<sub>A</sub>。 **结论** 丹参酮 II<sub>A</sub> PEG-PCL 纳米胶束可以很大程度上提高丹参酮 II<sub>A</sub> 的心肌细胞摄取量, 并聚集在线粒体周围, 增强药物减轻心肌缺血再灌注损伤的作用。

**关键词:** 丹参酮 II<sub>A</sub>; 聚乙二醇-聚己内酯; 纳米胶束; 薄膜水化法; 线粒体; 细胞摄取; 细胞内分布; 心肌缺血再灌注损伤; 正交试验; 稳定性评价

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)08-2141-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.08.022

## Preparation, intracellular distribution and reduction of myocardial ischemia-reperfusion injury of tanshinone II<sub>A</sub> PEG-PCL micelles

WANG Song<sup>1</sup>, WANG Mao-sheng<sup>2</sup>, ZHOU Ding-rong<sup>3</sup>, FANG Fang<sup>1</sup>, DOU Run-peng<sup>1</sup>

1. Department of Endocrinology, Nanyang Central Hospital, Nanyang 473009, China

2. Department of Clinical Medicine, Nanyang Medical College, Nanyang 473009, China

3. Central Laboratory, Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, China

**Abstract: Objective** To prepare tanshinone II<sub>A</sub> PEG-PCL micelles by membrane hydration method, and study the intracellular distribution of the micelles and the pharmacological effects of anti-myocardial ischemia-reperfusion injury. **Methods** Orthogonal test was used to optimize the preparation conditions of tanshinone II<sub>A</sub> PEG-PCL micelles. The optimized tanshinone II<sub>A</sub> PEG-PCL micelles were characterized by particle size, Zeta potential, and TEM electron microscopy. The stability of tanshinone II<sub>A</sub> PEG-PCL micelles was evaluated. Coumarin-6 was used as a fluorescent probe to evaluate the intracellular uptake and intracellular distribution of PEG-PCL micelles, and then the extracellular drug retention test was performed to verify that PEG-PCL micelles promoted the cell uptake of the drug; The rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury was constructed by ligation of coronary artery to evaluate

收稿日期: 2019-11-27

基金项目: 湖南省卫计委项目 (C201800141)

作者简介: 王 松, 副主任医师, 博士, 研究方向为心血管药物的靶向治疗。E-mail: 779229498@qq.com

\*通信作者 周定荣, 副主任医师, 博士, 中南大学湘雅二医院中心实验室, 研究方向为心血管药物的靶向治疗。E-mail: 2309773833@qq.com

the pharmacodynamic effect of tanshinone II<sub>A</sub> PEG-PCL micelles. **Results** The optimal conditions for tanshinone II<sub>A</sub> PEG-PCL micelles: the ratio of tanshinone II<sub>A</sub> to PEG-PCL was 1.2:10, the rotation speed was 100 r/min, and the hydration temperature was 37 °C. A thin film was formed by rotary evaporation, and then the organic solvent was lyophilized to form nano-micelles under hydration and ultrasound. The particle size of the optimized tanshinone II<sub>A</sub> was (16.8 ± 0.4) nm, the Zeta potential was -(29.8 ± 4.9) mV, the drug loading was (7.8 ± 0.6)%, the encapsulation efficiency was (86.4 ± 5.2)%, and its stability was also good. Fluorescence test showed that PEG-PCL micelles can promote the cell uptake of the drug. After entering the cell, the drug can be aggregated around the mitochondria, and the coincidence was good. The results of the drug efficacy test showed that the tanshinone II<sub>A</sub> PEG-PCL can significantly reduce the model animal serum CK, LDH and cTnI levels, elevated SOD levels, reduced myocardial infarct size, and improved myocardial pathological changes. These results were significantly better than tanshinone II<sub>A</sub>. **Conclusion** Tanshinone II<sub>A</sub> PEG-PCL micelles can greatly increase the myocardial cell uptake of tanshinone II<sub>A</sub>, aggregate around the mitochondria, and enhance the pharmacological effects of drugs to reduce myocardial ischemia-reperfusion injury.

**Key words:** tanshinone II<sub>A</sub>; PEG-PCL; micelles; thin film hydration; mitochondria; cellular uptake; intracellular distribution; myocardial ischemia-reperfusion injury; orthogonal test; evaluation of stability

丹参酮 II<sub>A</sub> (tanshinone II<sub>A</sub>) 是从唇形科鼠尾草属植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 中分离得到的脂溶性成分, 目前大量的文献报道丹参酮 II<sub>A</sub> 主要集中在心血管药物方面, 主要有抗心律失常、抗心肌缺血、改善心室功能和能量代谢, 减少心肌梗死面积等多种药理活性<sup>[1-7]</sup>。心肌缺血再灌注后, 线粒体自由基大量生成, 攻击线粒体, 导致线粒体结构和功能失调, 尤其是呼吸功能出现严重障碍, 目前文献表明, 丹参酮 II<sub>A</sub> 能显著抑制线粒体通透性转换孔 (mitochondrial permeability transition pore, mPTP) 开放, 降低心肌缺血再灌注引起的活性氧 (ROS) 水平, 减少心肌细胞凋亡, 达到保护缺血心肌的作用<sup>[8-9]</sup>。尽管如此, 丹参酮 II<sub>A</sub> 属于脂溶性成分, 体内容易代谢, 到达缺血心肌部位的浓度不高, 能到达细胞内线粒体的药物量更少。因此, 如果能开发一种新型递药系统, 将丹参酮 II<sub>A</sub> 递送到心肌细胞线粒体, 预期能提高药物的治疗效果。

聚乙二醇-聚己内酯 (PEG-PCL) 是目前常用的两亲性嵌段聚合物, 由 PEG 亲水端和 PCL 亲脂端聚合而成, 在水中可自组装形成纳米胶束, 不仅能解决药物水溶性差和稳定性差的问题, 还可促进药物的跨膜转运、高效递送药物<sup>[10-12]</sup>。因此, 拟采用 PEG-PCL 纳米胶束承载丹参酮 II<sub>A</sub>, 预期促进丹参酮 II<sub>A</sub> 在细胞内的转运, 尽量聚集在缺血心肌的线粒体部位, 从而很大程度增强药物减少心肌缺血再灌注损伤的药理作用。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

Leica TCS SP8 激光扫描共聚焦显微镜, 德国徕卡电镜制备有限公司; JEM-2100 透射电镜, 日本电子株式会社; Zetasizer Nano ZSP 纳米粒度电势仪,

英国马尔文公司; FA1004B-2204B 电子分析天平, 山东达普精密仪器有限公司; TG16 台式高速离心机, 上海卢湘仪离心机仪器有限公司。

### 1.2 药品与试剂

丹参酮 II<sub>A</sub> 购自陕西三原龙生物科技有限公司, 批号 20180923, 质量分数 ≥ 98%; PEG-PCL 购自上海甄准生物科技有限公司, PEG 相对分子质量约 2 000, PCL 相对分子质量约 1 000, 批号 190624, 质量分数 ≥ 90%, 相对分子质量分散指数 (PDI) 0.3; 香豆素-6 (coumarin-6, C6) 购自上海紫一试剂厂, 批号 20180916, 质量分数 ≥ 98%; 异丙肾上腺素 (ISO) 购自百灵威科技有限公司; 线粒体红色荧光探针 (MitoTracker™ Red)、细胞核染料 (Hoechst 33342) 购自 Thermo Fisher scientific 公司; 肌酸激酶 (CK)、乳酸脱氢酶 (LDH)、心肌肌钙蛋白 I (cTnI)、超氧化物歧化酶 (SOD) 试剂盒购自南京建成生物工程研究所; 氯化三苯四氮唑 (TTC) 购自成都贝斯特试剂有限公司; 甲醇、乙腈, 色谱纯, 美国 ACS 化学试剂公司; 其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 丹参酮 II<sub>A</sub> PEG-PCL 纳米胶束的制备

**2.1.1 制备方法** 精密称取适当比例的丹参酮 II<sub>A</sub> 和 PEG-PCL, 两者共同置于梨型瓶中, 添加一定体积的色谱甲醇, 轻微摇晃, 促使两者溶解, 调节适当的转速, 减压浓缩, 促使纳米胶束均匀附着在梨型瓶内壁, 随着时间的延长, 逐渐可见一层淡乳白色的薄膜, 取下梨型瓶置于冰水浴中, 低温真空冷冻干燥 8 h 以上, 除尽梨型瓶中残留的甲醇, 加入一定体积的蒸馏水, 轻微摇晃使薄膜水化, 于设定的温度和时间进行水化, 最后将水化后的样品超声处理大约 5 min, 室温下放置, 采用 0.22 μm 微孔滤

膜进行滤过, 即得丹参酮 II<sub>A</sub> PEG-PCL 纳米胶束。

**2.1.2 正交试验优选制备工艺** 按照表 1 设定的因素和水平实验, 考察纳米胶束制备过程中药物与 PEG-PCL 投料比例 (投料比, A)、转速 (B)、水化温度 (C) 对丹参酮 II<sub>A</sub> PEG-PCL 纳米胶束制备工艺的影响, 最终测定各试验样品纳米胶束的粒径、包封率和载药量, 参照文献将这些结果进行综合评分<sup>[13]</sup>, 满分为 100 分, 粒径占 50%, 以粒径最小者

为满分 50 分, 包封率和载药量各占 25%, 以包封率和载药量最高者为满分 25 分, 则综合评分=粒径×50/最小粒径+载药量×25/最大载药量+包封率×25/最大包封率。优选丹参酮 II<sub>A</sub> PEG-PCL 纳米胶束的制备工艺条件, 结果见表 1, 结合表 2 的方差分析结果, 最终优选的条件为 A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>2</sub>, 即丹参酮 II<sub>A</sub> 与 PEG-PCL 投料比为 1.2:10, 转速为 100 r/min, 水化温度为 37 ℃, 按照优选工艺制备条件进行 3

表 1 正交试验设计及结果

Table 1 Orthogonal test design and results

| 试验号            | A          | B/(r·min <sup>-1</sup> ) | C/℃    | D(空白) | 粒径/nm | 载药量/% | 包封率/% | 综合评分 |
|----------------|------------|--------------------------|--------|-------|-------|-------|-------|------|
| 1              | 0.6:10 (1) | 60 (1)                   | 25 (1) | (1)   | 26.8  | 5.2   | 60.1  | 65.8 |
| 2              | 0.6:10 (1) | 80 (2)                   | 37 (2) | (2)   | 20.5  | 6.3   | 85.1  | 86.4 |
| 3              | 0.6:10 (1) | 100 (3)                  | 50 (3) | (3)   | 22.7  | 6.4   | 79.0  | 80.9 |
| 4              | 1.2:10 (2) | 60 (1)                   | 37 (2) | (3)   | 17.4  | 7.4   | 66.5  | 91.7 |
| 5              | 1.2:10 (2) | 80 (2)                   | 50 (3) | (1)   | 17.9  | 7.9   | 71.5  | 93.4 |
| 6              | 1.2:10 (2) | 100 (3)                  | 25 (1) | (2)   | 16.9  | 6.8   | 81.9  | 95.8 |
| 7              | 1.8:10 (3) | 60 (1)                   | 50 (3) | (2)   | 23.6  | 7.4   | 29.3  | 67.9 |
| 8              | 1.8:10 (3) | 80 (2)                   | 25 (1) | (3)   | 25.4  | 6.1   | 78.0  | 75.7 |
| 9              | 1.8:10 (3) | 100 (3)                  | 37 (2) | (1)   | 18.4  | 6.6   | 70.4  | 87.7 |
| K <sub>1</sub> | 233.1      | 225.4                    | 237.3  | 246.9 |       |       |       |      |
| K <sub>2</sub> | 280.9      | 255.5                    | 265.8  | 250.1 |       |       |       |      |
| K <sub>3</sub> | 231.3      | 264.4                    | 242.2  | 248.3 |       |       |       |      |
| R              | 49.6       | 39.0                     | 28.5   | 3.2   |       |       |       |      |

表 2 方差分析结果

Table 2 Variance analysis results

| 误差来源  | 偏差平方和     | 自由度 | F 值       | 显著性    |
|-------|-----------|-----|-----------|--------|
| A     | 527.582 2 | 2   | 307.528 5 | P<0.01 |
| B     | 278.468 9 | 2   | 162.319 9 | P<0.01 |
| C     | 154.802 2 | 2   | 90.234 5  | P<0.05 |
| D(误差) | 1.715 6   | 2   |           |        |

$F_{0.05}(2, 2)=19.00$   $F_{0.01}(2, 2)=99.00$

批验证试验, 结果如图 1 显示, 丹参酮 II<sub>A</sub> PEG-PCL 纳米胶束的粒径为  $(16.8 \pm 0.4)$  nm, Zeta 电位为  $(-29.8 \pm 4.9)$  mV, 载药量为  $(7.8 \pm 0.6)$  %, 包封率为  $(86.4 \pm 5.2)$  %, 且重复性和稳定性良好, 电镜结果显示丹参酮 II<sub>A</sub> PEG-PCL 纳米胶束表现为形态规则的圆球形, 且分散性良好。

## 2.2 粒径分布、Zeta 电位测定和电镜分析

采用适量体积的蒸馏水将丹参酮 II<sub>A</sub> PEG-PCL

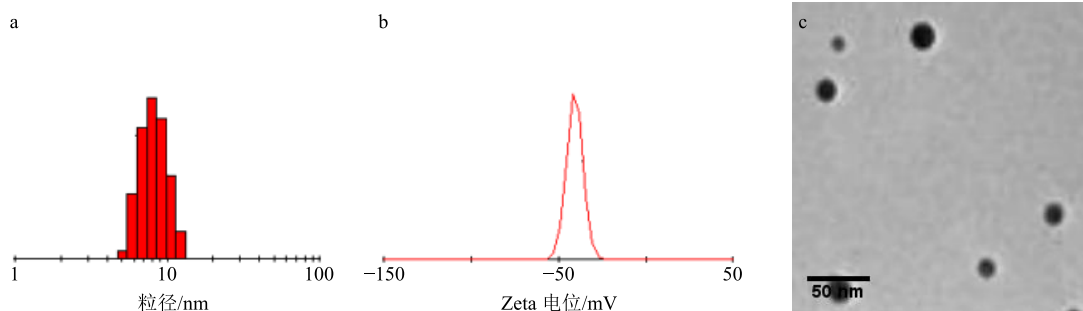


图 1 丹参酮 II<sub>A</sub> PEG-PCL 纳米胶束的粒径 (a)、Zeta 电位 (b) 和电镜图 (c)

Fig. 1 Distribution of particle size (a), Zeta potential (b) and TEM image of Tan-II<sub>A</sub> PEG-PCL micelles (c)

纳米胶束进行稀释,以 Zetasizer Nano ZS 纳米粒度电势仪检测该纳米胶束的粒径分布、Zeta 电位;吸取大约 20  $\mu\text{L}$  丹参酮 II<sub>A</sub> PEG-PCL 纳米胶束溶液,滴加在 200 目铜网上,于 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中烘干 30 min,再置透射电镜下观察纳米胶束的形态。

### 2.3 包封率及载药量

取超滤离心管(截留相对分子质量为 3 000),采用移液枪吸取 500  $\mu\text{L}$  丹参酮 II<sub>A</sub> PEG-PCL 纳米胶束溶液置于管中,以 10 000 r/min 高速离心 5 min,由于 PEG-PCL 属于高分子材料,相对分子尺寸较大,故可截留在超滤离心管内,加入 10 倍体积甲醇破坏纳米胶束结构,促使丹参酮 II<sub>A</sub> 从胶束结构中解离出来,用高效液相色谱即可测定胶束中包封的丹参酮 II<sub>A</sub> 质量浓度( $C_{\text{内}}$ );超滤膜外为未包裹的游离丹参酮 II<sub>A</sub>,采用同样的方法即可测定游离丹参酮 II<sub>A</sub> 质量浓度( $C_{\text{外}}$ ),计算纳米胶束的包封率;另外将离心管内丹参酮 II<sub>A</sub> PEG-PCL 纳米胶束溶液冷冻干燥,称定质量( $M$ ),计算丹参酮 II<sub>A</sub> PEG-PCL 纳米胶束载药量。

$$\text{包封率} = C_{\text{内}} / (C_{\text{外}} + C_{\text{内}})$$

$$\text{载药量} = C_{\text{内}} / M$$

### 2.4 稳定性

将丹参酮 II<sub>A</sub> PEG-PCL 纳米胶束冷藏于 0~4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中 8 周,分别于 0、7、14、21、28、35、42、49、56 d 取出,采用上述方法检测纳米胶束的粒径和 Zeta 电位。由图 2 结果可知,丹参酮 II<sub>A</sub> PEG-PCL 纳米胶束在 0~4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中冷藏 8 周的粒径和电势,与最初 0 d 的结果比较差异不明显,由此表明,丹参酮 II<sub>A</sub> PEG-PCL 纳米胶束在低温放置过程中,样品比较稳定。

### 2.5 临界胶束浓度(critical micelle concentration, CMC)测定

将 PEG-PCL 纳米胶束采用适量 PBS 进行稀释,制备成 1~12  $\mu\text{g/mL}$  的胶束溶液,再与芘进行混合,室温搅拌 6 h 以上,采用荧光光度仪检测芘在 373、394 nm 的发射光谱  $I_{373}$ 、 $I_{394}$ ,根据 1~12  $\mu\text{g/mL}$  系列质量浓度下纳米胶束发出的荧光强度值,计算  $I_{394}/I_{373}$  值,结果如图 3 所示,胶束内核中的芘荧光强度  $I_{394}/I_{373}$  值随着 PEG-PCL 纳米胶束质量浓度增大而变化,曲线呈 S 型变化,曲线拐点处恰好 PEG-PCL 纳米胶束的 CMC,约为 6.6  $\mu\text{g/mL}$ ,该质量浓度很小,由此推测 PEG-PCL 可自组装成胶束。

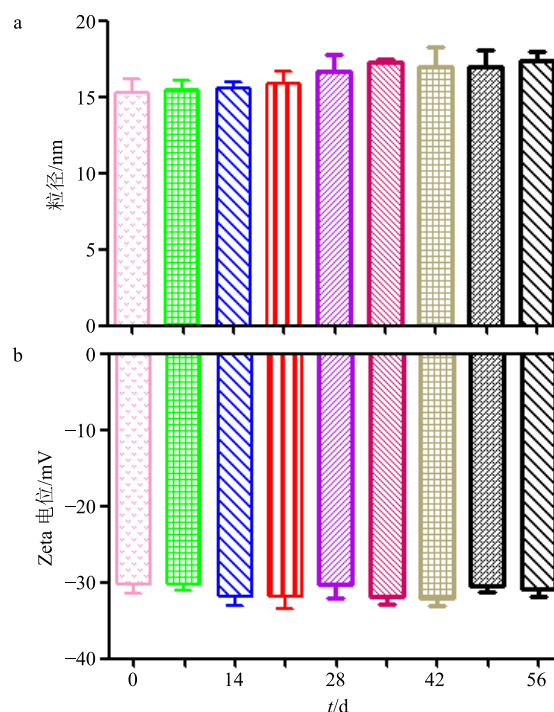


图 2 丹参酮 II<sub>A</sub> PEG-PCL 纳米胶束于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中冷藏 8 周的粒径 (a) 和 Zeta 电位变化 (b)

Fig. 2 Particle size (a) and Zeta potential (b) changes of Tan-II<sub>A</sub>@PEG-PCL micelles in a refrigerator at 4  $^{\circ}\text{C}$  for 8 weeks

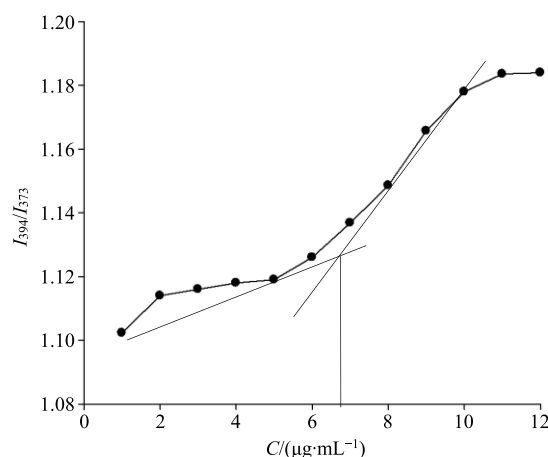


图 3 PEG-PCL 纳米胶束的 CMC

Fig. 3 CMC of PEG-PCL micelles

### 2.6 体外释放

取丹参酮 II<sub>A</sub> (1 mg) 和丹参酮 II<sub>A</sub> PEG-PCL 纳米胶束(含 1 mg 丹参酮 II<sub>A</sub>)置于美国进口的 Spectrumlabs 透析袋(截留相对分子质量 3 000)中,将其置于 100 mL pH 7.4 PBS 缓冲溶液中,调节水温为 37  $^{\circ}\text{C}$ ,于预定的时间点 0.5、1、1.5、2、4、6、8、12、16、20、24、36、48、60、72、96 h 进行取样,采用移动枪吸取 0.5 mL,采用 HPLC 检测含量,

计算丹参酮 II<sub>A</sub> PEG-PCL 纳米胶束体外累积释放率。结果见图 4, 丹参酮 II<sub>A</sub> 释放较快, 在 24 h 内释放量达到 96.4% 左右, 而丹参酮 II<sub>A</sub> PEG-PCL 纳米胶束释药相对比较缓慢, 最初释放速率快, 随后呈现为缓释状态, 在 96 h 内累积释放率为 61.4%, 由此表明, 丹参酮 II<sub>A</sub> PEG-PCL 纳米胶束在释药状态上表现为缓释特性。

## 2.7 细胞摄取

考虑到丹参酮 II<sub>A</sub> 无荧光性质, 本实验采用常

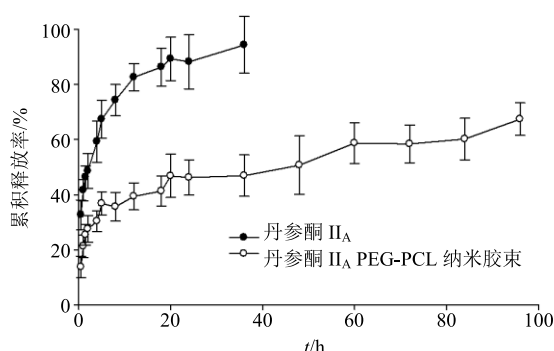


图 4 丹参酮 II<sub>A</sub> 和丹参酮 II<sub>A</sub> PEG-PCL 纳米胶束体外累积释放曲线

Fig. 4 *In vitro* release profile of tanshinone II<sub>A</sub> and tanshinone II<sub>A</sub>@PEG-PCL micelles

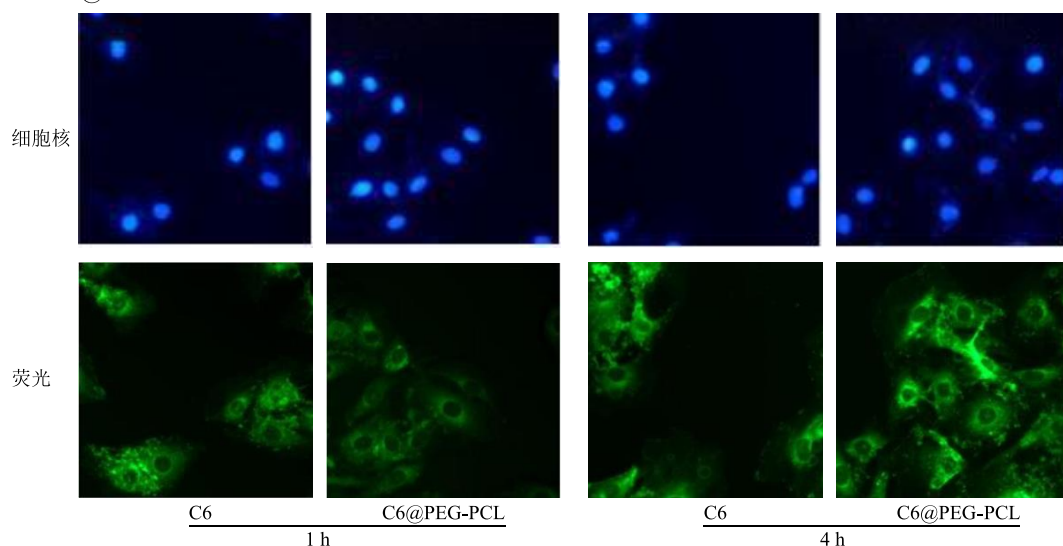


图 5 C6 和 C6@PEG-PCL 纳米胶束的细胞摄取

Fig. 5 Cellular uptake of C6 and C6@PEG-PCL micelles

表 3 丹参酮 II<sub>A</sub> 和丹参酮 II<sub>A</sub> PEG-PCL 对 H9c2 心肌细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Effects of tanshinone II<sub>A</sub> and tanshinone II<sub>A</sub>@PEG-PC on viability of H9c2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

| 样品                          | 细胞存活率/%                                 |                                       |                                        |                                        |                                        |                                        |
|-----------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|
|                             | 0.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ | 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ | 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ | 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ | 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ | 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ |
| 丹参酮 II <sub>A</sub>         | 92.4 $\pm$ 3.2                          | 90.3 $\pm$ 4.8                        | 86.5 $\pm$ 5.3                         | 76.5 $\pm$ 7.6                         | 60.8 $\pm$ 5.6                         | 50.3 $\pm$ 4.9                         |
| 丹参酮 II <sub>A</sub> PEG-PCL | 91.3 $\pm$ 5.3                          | 85.5 $\pm$ 3.5                        | 83.4 $\pm$ 6.5                         | 74.3 $\pm$ 5.7                         | 57.3 $\pm$ 4.9                         | 41.5 $\pm$ 6.7                         |

采用绿色荧光的脂溶性物质 C6 替代丹参酮 II<sub>A</sub>, 按照上述纳米胶束的制备方法, 得到了载 C6 的 PEG-PCL 纳米胶束 (C6@PEG-PCL), 首先将 H9c2 心肌细胞培养 24 h, 再将 C6 和 C6@PEG-PCL 纳米胶束 (最终细胞液中 C6 质量浓度为 0.1 mg/mL) 共同孵育, 于孵育 1、4 h 后, 取出细胞, 采用 DAPI 染色的方法将细胞核染色, 然后再在电子荧光显微镜下观察 C6 在细胞内的摄取情况。结果如图 5 显示, 随着时间的延长, C6@PEG-PCL 进入细胞内的药物量明显要高于游离的 C6, 该结果提示纳米胶束能够促进药物的细胞摄取。

## 2.8 细胞毒性

取对数生长期 H9c2 心肌细胞, 接种于 96 孔中培养 24 h, 待细胞完全贴壁后, 添加丹参酮 II<sub>A</sub> 和丹参酮 II<sub>A</sub> PEG-PCL 纳米胶束样品, 经微孔滤膜除菌, 各吸取适量加入孔中, 使丹参酮 II<sub>A</sub> 浓度为 0.5、1、10、20、30、40  $\mu\text{mol/L}$ , 每个浓度平行 3 份, 共同孵化 24 h 后弃去供试药液, 每孔加入 40  $\mu\text{L}$  含 5.0 mg/mL MTT 的 PBS 溶液, 于 37  $^{\circ}\text{C}$  避光 5 h, 采用酶标仪, 设置波长为 490 nm 检测各孔的吸光度 ( $A$ ), 计算细胞存活率。结果见表 3, 丹参酮 II<sub>A</sub> PEG-PCL 在低浓度条件下对 H9c2 心肌细胞影响较

小,在高浓度下毒性增加,由此表明,PEG-PCL 在低浓度条件下是比较安全的。

## 2.9 细胞内分布

采用同细胞摄取实验方法进行细胞的前期处理,于孵育 1、4 h 后,取出细胞,细胞核采用 5 mg/mL 的 Hoechst 33342 染色 5 min (蓝色),线粒体采用 50 nmol/L 的 MitoTracker™ Red 染色 5 min (红色),最后采用 Leica TCS SP8 激光扫描共聚焦显微镜拍摄 C6 在细胞内的分布情况,图片采用 Image J 软件进行处理,计算绿色的荧光物质 (C6) 与红色的线粒体 (MitoTracker™ Red) 重合系数,结果如图 6、7 所示,带绿色荧光的 C6@PEG-PCL 纳米胶束进入心肌细胞后,迅速聚集在显红色的线粒体周围,两者重合后呈现很明显的黄色,与游离的 C6 组比较,

随着时间的延长,C6@PEG-PCL 纳米胶束组黄色越来越深,Image J 软件计算的泊桑分布数值体现重合系数,在 1、4 h C6@PEG-PCL 纳米胶束的泊桑分布平均数值分别为 0.49、0.61,明显高于游离 C6 组 0.28、0.41,由此分析可知,PEG-PCL 纳米胶束能促进药物递送到线粒体的效应部位。

## 2.10 细胞外药物存留量

采用同细胞摄取实验方法进行细胞的前期处理,然后将丹参酮 II<sub>A</sub> 和丹参酮 II<sub>A</sub> PEG-PCL 纳米胶束 (初始浓度 10 μmol/L) 与 H9c2 心肌细胞共同孵育,于孵育 1、4 h 后,采用移液枪吸取 300 μL 培养基,以 12 000 r/min 高速离心 10 min,轻轻地吸取上层培养液,并进行前期的样品纯化处理,以 HPLC 仪测定细胞外药物存留量。结果如图 8 所示,

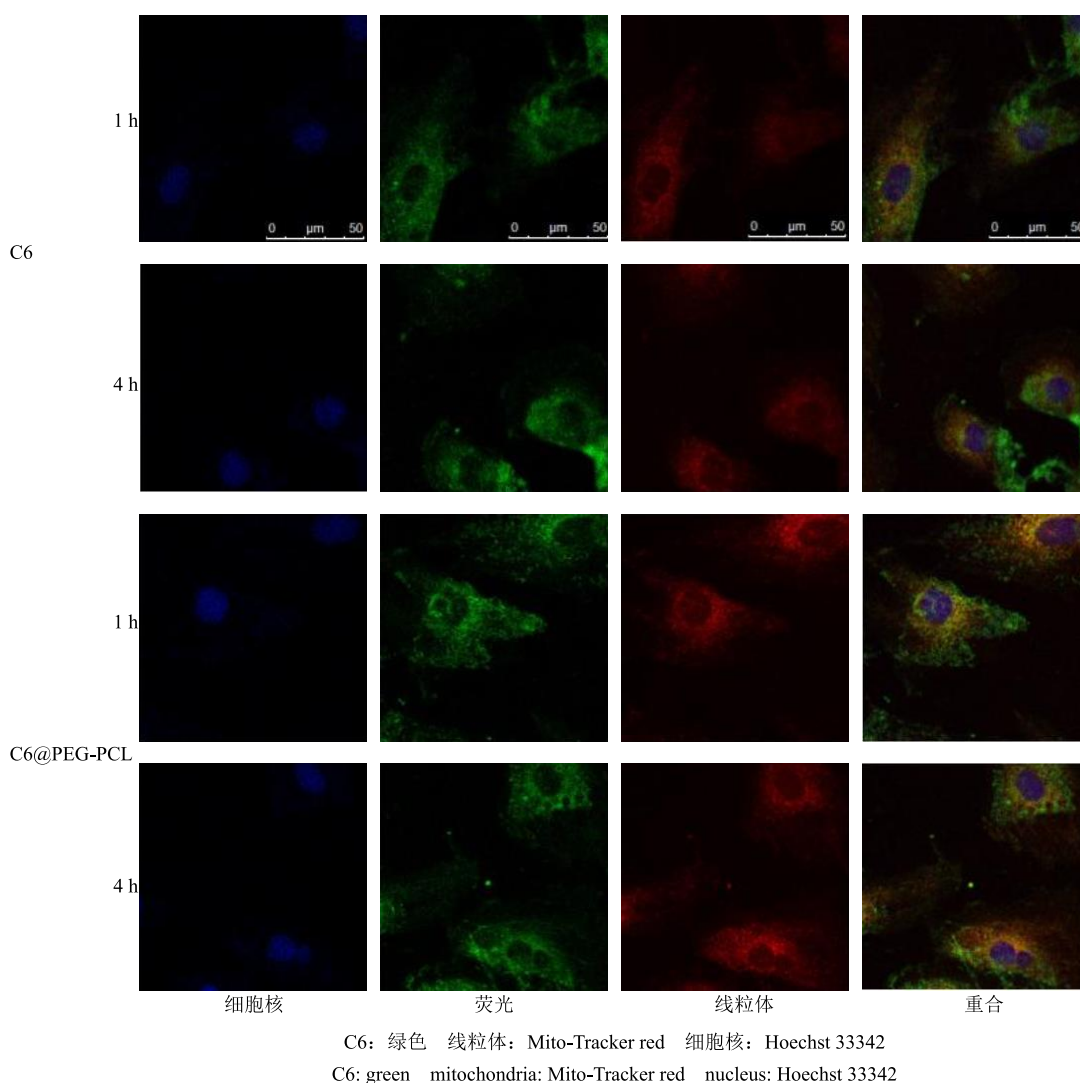


图 6 C6、C6@PEG-PCL 纳米胶束与 H9c2 心肌细胞共同孵育时细胞内分布的激光共聚焦图像

Fig. 6 Confocal microscopy images of intracellular distribution of H9c2 myocardial cells treated with C6 and C6@PEG-PLGA micelles

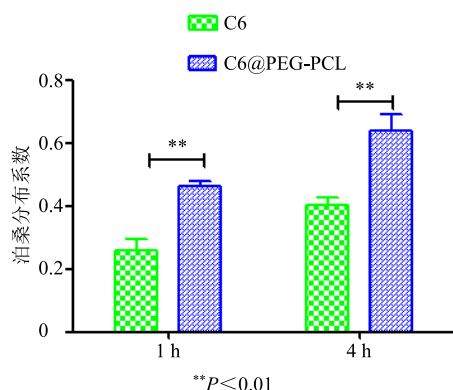


图 7 纳米胶束与线粒体的定量泊桑分布系数

Fig. 7 Quantitative Pearson's correlation of micelles with mitochondria

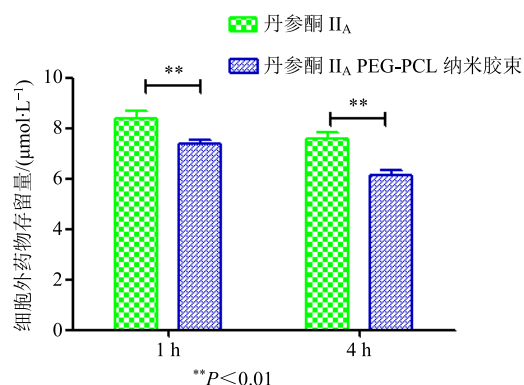


图 8 细胞外丹参酮 II<sub>A</sub> 存留量

Fig. 8 Extracellular concentration of tanshinone II<sub>A</sub>

随着时间的延长, 丹参酮 II<sub>A</sub> PEG-PCL 纳米胶束细胞外存留量明显小于丹参酮 II<sub>A</sub> 组, 两者存在显著性差异, 由此推测, 丹参酮 II<sub>A</sub> PEG-PCL 纳米胶束进入细胞内的药物量也相应增多, 该结果提示, PEG-PCL 纳米胶束能够促进药物的细胞摄取, 有助于增加细胞内药物浓度。

## 2.11 心肌缺血再灌注损伤实验

**2.11.1 大鼠心肌缺血再灌注损伤模型的制备** 大鼠称定质量后, 采用 ip 3%戊巴比妥钠进行麻醉, 连接小型动物呼吸机进行辅助呼吸; 沿胸骨左缘第

2~4 肋间隙开胸, 逐层分离胸膜、暴露心脏, 小心剪开心包膜, 采用无创缝合丝线结扎冠状动脉左前 (LAD) 降支 (假手术组穿线不结扎), 以心电图 II 导联 ST 段抬高作为缺血的标志, 即表明大鼠心肌缺血模型制备成功, 最后缝合胸腔。结扎 30 min 后, 解开丝线恢复再灌 180 min, 以结扎线下心肌颜色变红、心电图 ST 段下降二分之一为再灌成功。

**2.11.2 分组给药** 80 只 SD 大鼠按体质量随机分成 4 组, 每组 20 只, 分别为假手术组: 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; 丹参酮 II<sub>A</sub> 磺酸钠组: 大鼠在结扎前 5 min, 以 5 mg/kg (以丹参酮 II<sub>A</sub> 计) 的剂量尾 iv, 然后继续进行缺血再灌注造模, 造模后每天在相同的时间点注射给药, 连续 5 d, 第 5 天再取大鼠血液, 并处死动物, 检测心肌梗死面积和心肌细胞凋亡情况; 丹参酮 II<sub>A</sub> PEG-PCL 纳米胶束组: 大鼠处理方法同丹参酮 II<sub>A</sub> 磺酸钠组, 给药剂量与丹参酮 II<sub>A</sub> 组磺酸钠等剂量。

**2.11.3 心肌损伤标记物、氧化应激指标检测** 解剖大鼠, 打开腹腔, 采用无菌注射器抽取腹主动脉血约 5 mL, 于 4 °C 自然凝固 30 min 后, 以 3 000 r/min 离心 10 min 分离血清, 再将分离后的血清分装并保存 -70 °C, 按照试剂盒说明书测定大鼠血清中 CK、LDH、cTnI 和 SOD 水平。结果见表 4, 与模型组比较, 丹参酮 II<sub>A</sub> 磺酸钠和丹参酮 II<sub>A</sub> PEG-PCL 纳米胶束均显著降低血清 CK、LDH、cTnI 水平, 升高 SOD 水平 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ); 丹参酮 II<sub>A</sub> PEG-PCL 纳米胶束对改善这些心肌损伤标记物、氧化应激指标明显优于丹参酮 II<sub>A</sub> 磺酸钠 ( $P < 0.05$ ), 由此表明, 丹参酮 II<sub>A</sub> PEG-PCL 纳米胶束可以明显提高药物的疗效。

**2.11.4 心肌梗死面积** 抽取腹主动脉血液后, 迅速剪开胸腔, 从各组中摘取 10 只大鼠的心脏, 采用 PBS 冲洗心脏除尽血迹, 沿冠状沟切除右心室, 留

表 4 丹参酮 II<sub>A</sub> PEG-PCL 纳米胶束对心肌缺血再灌注损伤大鼠血清 CK、LDH、cTnI 和 SOD 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

Table 4 Effects of Tan-IIA@PEG-PLGA micelles on levels of CK, LDH, cTnI and SOD in MIRI rats ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

| 组别                          | 剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | CK/(U·L <sup>-1</sup> )          | LDH/(U·L <sup>-1</sup> )       | cTnI/(μg·L <sup>-1</sup> ) | SOD/(U·L <sup>-1</sup> )  |
|-----------------------------|---------------------------|----------------------------------|--------------------------------|----------------------------|---------------------------|
| 假手术                         | —                         | 2 641.5 ± 987.7                  | 1 715.3 ± 375.3                | 8.6 ± 1.8                  | 61.6 ± 5.6                |
| 模型                          | —                         | 4 987.5 ± 1 021.2 <sup>###</sup> | 4 357.2 ± 976.8 <sup>###</sup> | 30.6 ± 2.5 <sup>###</sup>  | 27.5 ± 3.1 <sup>###</sup> |
| 丹参酮 II <sub>A</sub> 磺酸钠     | 5                         | 3 754.7 ± 1 065.3 <sup>▲</sup>   | 3 125.5 ± 716.7 <sup>▲</sup>   | 22.5 ± 1.9 <sup>▲▲</sup>   | 36.4 ± 4.9 <sup>▲▲</sup>  |
| 丹参酮 II <sub>A</sub> PEG-PCL | 5                         | 3 025.4 ± 876.6 <sup>▲▲*</sup>   | 2 217.8 ± 817.4 <sup>▲▲*</sup> | 17.4 ± 2.5 <sup>▲▲*</sup>  | 49.2 ± 8.2 <sup>▲▲*</sup> |

与假手术组比较: <sup>###</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较: <sup>▲</sup> $P < 0.05$  <sup>▲▲</sup> $P < 0.01$ ; 与丹参酮 II<sub>A</sub> 磺酸钠组比较: <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , 下表同

<sup>###</sup> $P < 0.01$  vs sham operation group; <sup>▲</sup> $P < 0.05$  <sup>▲▲</sup> $P < 0.01$  vs model group; <sup>\*</sup> $P < 0.05$  vs tanshinone II<sub>A</sub> sodium sulfonate group, same as below

取左心室,放入切片机,沿心尖到心基部方向平行在结扎线以下将心室约 2 mm 的薄片,4~5 片,再将心肌片置 1% TTC 磷酸缓冲液中,37 °C 孵育 30 min 后取出,采用滤纸吸干水分,非梗死心肌为浅红色,梗死心肌呈灰白色,采用高清数码相机拍照,照片导入 Image J 图像分析处理软件,计算梗死区面积和左心室面积,计算梗死范围。结果见表 5,与模型组比较,丹参酮 II<sub>A</sub> 磺酸钠和丹参酮 II<sub>A</sub> PEG-PCL 纳米胶束均显著减小心肌梗死面积 ( $P < 0.05$ );丹参酮 II<sub>A</sub> PEG-PCL 纳米胶束组心肌梗死面积明显小于丹参酮 II<sub>A</sub> 磺酸钠组 ( $P < 0.05$ )。

**2.11.5 心肌病理损伤** 抽取腹主动脉血液后,从各组中摘取 10 只大鼠的心脏,用预冷 PBS 反复洗涤,

除去残留的血渍和多余的组织块,以 4%多聚甲醛固定,石蜡包埋、放入切片机,切成大约 4 μm 厚度的切片。然后再对切片进行 HE 染色,镜下观察各组心肌病理变化。结果如图 9 所示,HE 染色镜下观察,假手术组大鼠心肌组织没有发现很明显病理改变,心肌缺血再灌注模型组大鼠心肌组织明显的排列紊乱,心肌组织周围明显炎性浸润和心肌纤维断裂等严重的病理损伤,由此说明造模成功;丹参酮 II<sub>A</sub> 磺酸钠和丹参酮 II<sub>A</sub> PEG-PCL 纳米胶束给药后,均可以明显减少模型大鼠心肌的病理损伤,心肌组织排列趋向于整齐,其中丹参酮 II<sub>A</sub> PEG-PCL 纳米胶束对缺血心肌的改善程度明显优于丹参酮 II<sub>A</sub> 磺酸钠。

表 5 丹参酮 II<sub>A</sub> PEG-PCL 纳米胶束对心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌梗死面积的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 5 Effects of Tan-II<sub>A</sub>@PEG-PLGA micelles on myocardial infarct area in MIRI rats ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

| 组别                          | 剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | 正常心肌面积/cm <sup>2</sup> | 心肌梗死面积/cm <sup>2</sup>  | 心肌梗死面积比/%               |
|-----------------------------|---------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 假手术                         | —                         | 3.58±0.31              | 0                       | 0                       |
| 模型                          | —                         | 2.57±0.43              | 1.31±0.22               | 34.9±0.4                |
| 丹参酮 II <sub>A</sub> 磺酸钠     | 5                         | 2.62±0.53              | 0.81±0.24 <sup>▲</sup>  | 23.7±0.1 <sup>▲▲</sup>  |
| 丹参酮 II <sub>A</sub> PEG-PCL | 5                         | 2.91±0.63              | 0.52±0.28 <sup>▲▲</sup> | 15.3±0.2 <sup>▲▲*</sup> |

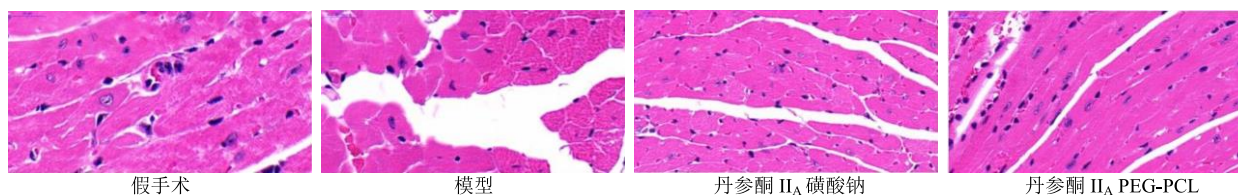


图 9 丹参酮 II<sub>A</sub> PEG-PCL 纳米胶束对心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌病理的影响 (HE 染色,  $n = 10$ )

Fig.9 Effects of Tan-II<sub>A</sub>@PEG-PLGA micelles on myocardial pathology in MIRI rats (HE staining,  $n = 10$ )

### 3 讨论

心肌缺血是临床上常见的一种心血管疾病,目前已发展成为发病率和死亡率很高的健康杀手,不仅多发于中老年人,随着社会竞争日趋激烈,年轻人承受的压力也随着增大,作息时无规律,也很容易患上凶险的心肌缺血性疾病<sup>[14]</sup>。心肌缺血可导致心肌供氧不足,诱发代谢产物如乳酸、无机磷酸盐与腺苷等大量堆积,严重影响心肌能量代谢,氧自由基大量生成,损伤心肌细胞以及引起心肌细胞内钙离子超载,结果导致心肌收缩性能减弱、心功能下降、恶化<sup>[15-16]</sup>。丹参酮 II<sub>A</sub> 是丹参根茎的脂溶性成分,具有扩张冠动脉,改善心肌局部供血,减少氧自由基的产生,缓解心肌缺血状况等多种药理作用,目前丹参酮 II<sub>A</sub> 磺酸钠注射液不仅用于治疗冠心病、心绞痛、心肌梗死等心血管疾病,预处理

还能够发挥心肌保护作用。但是该药物自临床使用以来,存在较多的配伍禁忌,涉及到的器官系统较多,其中主要为全身过敏性休克、皮疹、严重胃肠道疾病等诸多不良反应<sup>[17-18]</sup>,可能与该药物注射进入体内后,由于缺乏靶向性,导致该药物在其他部位聚集有关。因此,需构建一种新型的给药系统,不仅解决丹参酮 II<sub>A</sub> 的水溶性问题,还能增强该药的靶向治疗,减少不良反应的发生。

PEG-PCL 纳米胶束外周的 PEG 具有很好的水溶性,PCL 内核具有很好的脂溶性,故脂溶性有效成分能很好的与 PCL 融合在一起,因此,PEG-PCL 纳米胶束可以显著提高脂溶性成分的水溶性。不仅如此,PEG-PCL 纳米胶束的粒径很小,很容易被细胞摄取,可以携带活性小分子药物跨膜转运进入细胞,显著增强药物的药理作用。本研究采用 PEG-

PCL 纳米胶束承载丹参酮 II<sub>A</sub>, 实验结果显示, 丹参酮 II<sub>A</sub> PEG-PCL 纳米胶束稳定性良好、粒径较小, 大约 (16.8±0.4) nm, 可以通过网格蛋白和小窝蛋白的介导跨越细胞膜, 加之 PEG 高分子呈丝状、长链状, 可以诱导细胞膜形成临时性孔道, 这样一来, 纳米胶束可从这些孔道跨膜进入细胞内部, 促进药物的细胞内转运<sup>[19]</sup>。进入细胞后, 细胞内存在大量的溶酶体, 在细胞内相当于免疫性细胞器, 对于外源性成分具有吞噬、降解和清除作用, 由于 PEG-PCL 纳米胶束外周的 PEG 具有很好的生物相容性和无免疫原性, 故能逃逸溶酶体的识别和吞噬, 因此, 丹参酮 II<sub>A</sub> 被 PEG-PCL 纳米胶束包裹后, PEG-PCL 纳米胶束可以充当“保护伞”, 减少药物的降解, 促使药物尽量向线粒体部位递送。另外, PEG-PCL 纳米胶束外周呈针丝状、手臂式的 PEG 还能诱导线粒体膜形成临时性孔道, 促进药物进入线粒体<sup>[20]</sup>。本研究采用带绿色荧光的 C6 代替丹参酮 II<sub>A</sub>, 承载于 PEG-PCL 纳米胶束内核, 荧光试验结果表明, C6@PEG-PCL 纳米胶束跨膜转运进入细胞内明显高于 C6, 随着进入胞内 C6 增多, 与线粒体重合也越来越明显, 激光共聚焦试验结果显示, 随着时间的延长, C6@PEG-PCL 纳米胶束组的黄色越来越深, 代表着绿色的 C6 与红色的线粒体重合越明显, 由 Image J 软件计算的泊桑分布数值定量结果表明, C6@PEG-PCL 纳米胶束的该数值明显高于 C6, 由此推断, PEG-PCL 纳米胶束有助于药物的线粒体转运。随着 PEG-PCL 纳米胶束进入细胞内的药物量增多, 在细胞外的药物存留量也相应减少, 体外细胞实验结果恰好验证了丹参酮 II<sub>A</sub> PEG-PCL 纳米胶束组的细胞外存量显著少于游离丹参酮 II<sub>A</sub> 组, 该结果进一步证实了 PEG-PCL 纳米胶束能促进药物的细胞摄取。既然 PEG-PCL 纳米胶束能增强药物在线粒体部位的富集, 药效作用也应该显著增强。心肌缺血再灌注损伤动物实验结果表明, 丹参酮 II<sub>A</sub> PEG-PCL 纳米胶束组可以显著降低模型动物血清 CK、LDH、cTnI 水平, 升高 SOD 水平, 减少心肌梗死面积, 改善心肌病理变化, 与丹参酮 II<sub>A</sub> 比较具有显著性差异。据此分析, PEG-PCL 纳米胶束可以促进丹参酮 II<sub>A</sub> 的细胞内转运, 进入线粒体部位的药量增加, 故能很好地发挥药物抗心肌缺血再灌注损伤作用。

综上所述, 本研究制备的丹参酮 II<sub>A</sub> PEG-PCL 纳米胶束粒径较小, 稳定性良好, 可以显著提高药

物的细胞摄取, 促进药物向线粒体转运, 能够明显增强药物抗心肌缺血再灌注损伤作用。

#### 参考文献

- [1] 王佳南, 林建安, 杜苗苗. 丹参酮 II<sub>A</sub> 对急性心肌梗死大鼠心脏功能和心肌线粒体自噬的影响 [J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(4): 418-423.
- [2] 李瑞环, 王 玲. 丹参酮 II<sub>A</sub> 的药理研究进展 [J]. 现代中西医结合杂志, 2006, 15(23): 3303-3305.
- [3] 马春香, 孙 媛, 陈晓斌, 等. 丹参酮 II<sub>A</sub> 预处理对心肌缺血再灌注损伤保护作用的研究 [J]. 陕西医学杂志, 2017, 46(10): 1358-1359.
- [4] 徐文华, 郑景辉, 赵 阳, 等. 基于网络药理学和生物信息学的丹参酮 II<sub>A</sub> 治疗冠心病的分子生物学机制分析 [J]. 中草药, 2019, 50(5): 1131-1140.
- [5] Yang P, Jia Y H, Li J, *et al.* Anti-oxidation of tanshinone II<sub>A</sub> and prohibitin on cardiomyocytes [J]. *Chin Herb Med*, 2010, 2(3): 204-210.
- [6] 冯军鹏, 梁梅芳, 王有恒, 等. 丹参酮 II<sub>A</sub> 磺酸钠联合重组人脑利钠肽治疗心肌梗死的效果、心功能改善情况和预后 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(8): 1576-1579.
- [7] 陈东运, 孙红蕾, 饶雷萍. 芪苈强心胶囊联合丹参酮 II<sub>A</sub> 磺酸钠治疗心肌梗死的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2018, 33(2): 260-263.
- [8] 孙学刚, 贾玉华 张丽华. 丹参酮 II<sub>A</sub> 对大鼠缺氧及正常心肌细胞内钙、膜电位和线粒体膜电位的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2002, 9(9): 21-23.
- [9] Zhu B, Zhai Q, Yu B. Tanshinone II<sub>A</sub> protects rat primary hepatocytes against carbon tetrachloride toxicity via inhibiting mitochondria permeability transition [J]. *Pharm Biol*, 2010, 48(5): 484-487.
- [10] 徐骏军, 陈丹飞, 宋倩倩, 等. pH 值响应释药 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 聚乙二醇-聚己内酯-聚乙炔亚胺纳米粒的制备及体外评价 [J]. 中草药, 2018, 49(23): 5532-5540.
- [11] Alami-Milani M, Zakeri-Milani P, Valizadeh H, *et al.* Preparation and evaluation of PCL-PEG-PCL micelles as potential nanocarriers for ocular delivery of dexamethasone [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2018, 21(2): 153-164.
- [12] Grossen P, Witzigmann D, Sieber S, *et al.* PEG-PCL-based nanomedicines: A biodegradable drug delivery system and its application [J]. *J Control Rel*, 2017, 28(260): 46-60.
- [13] 赵炎军, 王建平, 吴 凡, 等. 丹参酮 II<sub>A</sub> PEG-PLGA 纳米胶束的制备、表征及在急性心肌缺血模型大鼠体内的组织分布 [J]. 中草药, 2018, 49(9): 4269-4276.
- [14] Pimple P, Shah AJ, Rooks C, *et al.* Angina and mental stress-induced myocardial ischemia [J]. *J Psychosom Res*,

- 2015, 78(5): 433-437.
- [15] Wenger N K. Clinical presentation of CAD and myocardial ischemia in women [J]. *J Nucl Cardiol*, 2016, 23(5): 976-985.
- [16] Padang R, Pelikka P A. The role of stress echocardiography in the evaluation of coronary artery disease and myocardial ischemia in women [J]. *J Nucl Cardiol*, 2016, 23(5): 1023-1035.
- [17] 刘文辉. 丹参酮 II<sub>A</sub> 磺酸钠注射液不良反应特点及使用建议 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(84): 115.
- [18] 佟 丽, 金 玫. 丹参酮 II<sub>A</sub> 磺酸钠注射液不良反应探析 [J]. 实用中医内科杂志, 2010, 24(5): 15-17.
- [19] Hu Y, Xie J, Tong Y W, *et al*. Effect of PEG conformation and particle size on the cellular uptake efficiency of nanoparticles with the HepG2 cells [J]. *J Control Rel*, 2007, 118(1): 7-17.
- [20] Xu Y, Wang S, Chan H F, *et al*. Triphenylphosphonium-modified poly (ethylene glycol)-poly ( $\epsilon$ -caprolactone) micelles for mitochondria-targeted gambogic acid delivery [J]. *Int J Pharm*, 2017, 522(1/2): 21-33.