

丹参聚多巴胺纳米递药系统的构建及对 H₂O₂ 诱导心肌细胞氧化损伤的保护作用研究

顾 依¹, 周 琴², 刘 馨², 刁和芳³, 陈志鹏¹, 陈 瑞^{1*}, 朱辰奇^{1,2*}

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

2. 南京医科大学附属苏州医院 药学部, 江苏 苏州 215002

3. 江苏弘典中药产业研究院有限公司, 江苏 南京 210000

摘要: 目的 利用聚多巴胺(PDA)为载体, 构建丹参(SMRR) PDA 纳米递药系统(PDA-SMRR), 能够大剂量负载多种丹参水溶性成分, 使其更好地发挥抗氧化应激作用。方法 制备 PDA-SMRR 纳米粒, 通过单因素实验考察并优化处方工艺; 通过激光粒度分析仪和透射电子显微镜考察纳米粒的粒径、电位和形态; 透析法分析载药量及累积释放率; 提取并培养大鼠乳鼠心肌细胞; CCK-8 实验考察 PDA-SMRR 的生物安全性并验证 PDA-SMRR 对氧化应激损伤的心肌细胞的保护作用。结果 最优载药工艺为 pH 值为 3.5, 载药时间为 12 h, 载药温度为室温, 并成功制备 PDA-SMRR; 其形态规整、大小均匀, 测得纳米粒粒径为 (459.2±4.5) nm, 体外释放表明该递药系统释放 SMRR 较缓慢; CCK-8 实验说明 PDA-SMRR 生物安全性良好且纳米粒可以降低氧化应激造成的心肌细胞损伤。结论 PDA-SMRR 可以作为丹参多成分药物储库, 载药量高, 具有缓释效应, 可以有效减少氧化应激对心肌细胞的损伤。

关键词: 丹参; 聚多巴胺; 氧化损伤; 心肌细胞; 纳米递药系统; CCK-8; 缓释

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)14-3655-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.14.007

Construction of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*-polydopamine nanoparticles and its protective effect on oxidative damage in cardiomyocytes induced by H₂O₂

GU Yi¹, ZHOU Qin², LIU Xin², DIAO He-fang³, CHEN Zhi-peng¹, CHEN Rui¹, ZHU Chen-qi^{1,2}

1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Department of Pharmacy, Suzhou Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Suzhou 215002, China

3. Jiangsu Hongdian Research Institute of Traditional Chinese Medicine Industry Co., Ltd., Nanjing 210000, China

Abstract: Objective Using polydopamine (PDA) as a carrier to construct a *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* (SMRR) nano-delivery system (PDA-SMRR), which can load a large number of SMRR water-soluble components and better exert antioxidation and antistress effect. **Methods** PDA-SMRR nanoparticles (PDA-SMRR) were prepared, and the prescription process was investigated and optimized by single-factor experiments. The particle size, potential, and morphology of the nanoparticles were examined by a laser particle size analyzer and a transmission electron microscope. The drug loading and cumulative release rate were analyzed by dialysis. The cardiomyocytes of neonatal rats were extracted and cultured. The CCK-8 experiment was used to investigate the biological safety of PDA-SMRR and verify the protective effect of PDA-SMRR on oxidative stress-induced cardiomyocytes. **Results** The optimal drug loading process was pH value 3.5, drug loading time was 12 h, drug loading temperature was room temperature, and PDA-SMRR was successfully prepared. The morphology and size of the nanoparticles were regular and uniform. The particle size and Zeta potential were (459.2 ± 4.5) nm, (3.01 ± 0.3) mV; *In vitro* release experiments

收稿日期: 2020-02-14

基金项目: 江苏省自然科学基金优秀青年基金项目(BK20190094); 江苏高校"青蓝工程"资助; 苏州市科技发展计划基金项目(SYSD2019187, SYSD2018242); 国家重点研发计划-中医药现代化研究(2018YFC1706905)

作者简介: 顾 依, 硕士研究生, 主要从事新型递释系统研究。E-mail: guyi61v@163.com

*通信作者 朱辰奇, 药师, 主要从事新型递释系统研究。E-mail: zhu65134@163.com

陈 瑞, 副教授, 主要从事新型递释系统研究。E-mail: carol-chen-07@126.com

indicated that SMRR was released slowly by the delivery system. CCK-8 experiments showed that PDA-SMRR had good biological safety and nanoparticles can reduce damaged cardiomyocytes caused by oxidative stress. **Conclusion** PDA-SMRR can be used as a multi-component medicine depot for SMRR, with high drug loading and sustained release effect, which can effectively reduce the damage of oxidative damage on myocardial cells.

Key words: *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*; polydopamine; oxidative damage; cardiomyocytes; nano-drug delivery system; CCK-8; sustained release

多成分、多靶点是中药的固有特性, 中药中的多种有效成分是发挥多靶点效应的物质基础。如何大剂量负载多种有效成分是制备中药新型制剂的关键科学问题。因此, 有必要针对中药多成分复杂体系寻找一种新的载药策略。

海洋生物贻贝可以分泌出黏性蛋白多巴胺, 其在碱性环境中可以氧化自聚, 生成无定形并可以粘黏在材料表面的高分子聚合物聚多巴胺(PDA)^[1-2]。PDA 是一种具有良好的生物相容性的仿生材料^[3-4], 具有活性氧(ROS)清除作用, 已经被广泛应用于生物医药领域的研究^[5-10]。研究表明, PDA 可通过 π - π 堆积、静电力吸附、共价键作用等方式对多成分进行大剂量吸附^[11-14]。课题组前期研究中已经验证 PDA 可同时吸附叶酸、阿霉素和咪喹莫特并具有较好的缓释效应^[9], 推测 PDA 纳米粒可对中药多成分进行高效吸附。

丹参 *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* (SMRR) 是唇形科丹参属植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根和根茎, 具有抗氧化应激^[15,16]、扩张血管^[17,18]、改善微循环^[19-23]等作用。本实验将 SMRR 作为模型药物, 通过 PDA 对 SMRR 中多种水溶性成分的吸附, 构建多成分、高载药量的 SMRR 药物储库。

1 仪器与材料

1.1 仪器

BS-124S 电子天平, 德国 Sartorius 公司; LC-2010A HT 高效液相色谱仪, 岛津实验器材有限公司; MicroCL 离心机, 美国 Thermo 公司; Synergy UV 纯水仪, 美国 Millipore 公司; 超声波清洗仪, 昆山市超声仪器有限公司; Malvern 激光粒度分析仪, 英国马尔文仪器有限公司; Synergy H1m 酶标仪, 美国 BIO TEK 公司; HJ-6 磁力加热搅拌器, 金坛区西城新瑞仪器厂; Labconco 4.5 L 冷冻干燥机, 美国 LABCONCO 公司; X-Cite Series 120 Q 倒置荧光显微镜, 德国 Zeiss 公司。

1.2 材料

丹参药材, 购于上海华宇药业有限公司山东药

源基地, 批号 2003021, 药材由苏州市立医院本部药剂科沈云士主管中药师鉴定, 为唇形科丹参属植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎; 盐酸多巴胺, 美国 Sigma-Aldrich 公司; 对照品丹酚酸 B (批号 111562-201912, 质量分数>98%)、迷迭香酸 (批号 11871-201908, 质量分数>98%)、咖啡酸 (批号 1108805-200102, 质量分数>98%), 购于中国食品药品检定研究院; 对照品紫草酸 (批号 20190610, 质量分数>98%), 购自上海源叶生物科技有限公司; PBS, 北京索莱宝科技有限公司; 胎牛血清、DMEM 培养基、胰酶、BrdU 均购自美国 Gibco 公司; CCK-8 试剂盒, 上海碧云天生物技术有限公司; 乙醇、甲醇、氨水、乙腈均为色谱纯, 南京化学试剂有限公司; 磷酸为分析纯, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 纯水, 南京中医药大学自制。乳鼠心肌细胞, 来源于出生 24~72 h 的 SD 大鼠新生乳鼠, 购于南京市江宁区青龙山动物繁殖场。

2 方法与结果

2.1 丹参水提液的制备

称取丹参药材 100 g, 加入 300 mL 纯水, 煎煮 40 min, 纱布滤过, 得提取液 1; 将药渣加入 300 mL 纯水, 重复煎煮 40 min, 纱布滤过, 得提取液 2; 将提取液 1 和提取液 2 合并, 浓缩至 100 mL, 置于 4 °C 冰箱, 避光保存。

酚酸类成分是丹参水提液中的主要成分和药效成分, 故选取咖啡酸、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 进行进一步分析。

2.2 丹参水提液中 4 种成分含量测定方法的建立

2.2.1 色谱条件 采用 Cromasil 100-S-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈-0.05%磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~15 min, 10%~20%乙腈; 15~35 min, 20%~25%乙腈; 35~45 min, 25%~30%乙腈; 45~55 min, 30%~90%乙腈; 55~70 min, 90%乙腈; 检测波长为 286 nm; 进样量为 10 μ L; 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温为 30 °C

2.2.2 供试品溶液的制备 取适量丹参水提液,

13 000 r/min 离心 10 min, 取上清过 0.45 μm 滤膜, 即得。

2.2.3 对照品溶液的制备 取咖啡酸、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 对照品适量, 精密称定, 分别置于 10 mL 棕色量瓶中, 加 75% 甲醇水溶液制成质量浓度分别为 248、536、265、581 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液, 置于冰箱 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。

2.2.4 专属性考察 取“2.2.2”项供试品溶液, 取“2.2.3”项对照品溶液和稀释溶液 (75% 甲醇), 过 0.45 μm 微孔滤膜, 进样, 结果见图 1。在建立的色谱条件下, 相邻峰之间分离度均大于 1.5, 方法专属性良好。

2.2.5 线性关系考察 取“2.2.3”项对照品溶液, 用 75% 甲醇水溶液稀释成系列质量浓度的对照品溶

液, 过 0.45 μm 滤膜, 进样, 以对照品质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 得回归方程分别为咖啡酸 $Y=3.976\ 0\times 10^7\ X-6.245\ 6\times 10^4$, $r=1.000\ 0$, 线性范围 0.264~132.000 $\mu\text{g/mL}$; 迷迭香酸 $Y=1.906\ 5\times 10^7\ X+3.897\ 5\times 10^4$, $r=0.999\ 8$, 线性范围 0.284~142.000 $\mu\text{g/mL}$; 紫草酸 $Y=1.157\ 5\times 10^7\ X+1.265\ 8\times 10^4$, $r=0.999\ 9$, 线性范围 0.252~126.000 $\mu\text{g/mL}$; 丹酚酸 B $Y=1.079\ 5\times 10^7\ X-3.824\ 5\times 10^4$, $r=1.000\ 0$, 线性范围 0.626~313.000 $\mu\text{g/mL}$; 结果表明在定量范围内各成分呈良好的线性关系。

2.2.6 精密度试验 精密吸取“2.2.2”项下同一供试品溶液, 连续进样 6 次, 以各成分的峰面积值分别计算, 咖啡酸、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 4 种成分峰面积的 RSD 分别为 0.31%、0.21%、0.34%、0.47%, 表明仪器精密度良好。

2.2.7 重复性试验 按照“2.2.2”项方法配制供试品溶液, 平行 6 份, 进样, 咖啡酸、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 4 种成分质量浓度的 RSD 分别为 1.13%、0.94%、0.78%、1.54%, 表明本方法重复性良好。

2.2.8 稳定性试验 取同 1 份“2.2.2”项下供试品溶液, 分别于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 进行测定, 咖啡酸、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 4 种成分峰面积的 RSD 分别为 0.78%、0.40%、0.97%、1.43%, 表明供试品溶液中各成分在 24 h 内基本稳定。

2.2.9 加样回收率试验 取已知 4 种指标成分含量的丹参水提液, 精密加入咖啡酸、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 混合对照品适量, 配成质量浓度为待测成分含量的 50%、100%、150% 的溶液, 每个质量浓度平行 3 份, 计算各成分的加样回收率和 RSD。咖啡酸、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 4 种成分的平均加样回收率分别为 102.32%、101.41%、103.94%、102.16%, RSD 分别为 1.1%、1.95%、1.78%、2.35%, 表明本方法回收率良好。

2.2.10 样品测定 按照“2.2.2”项方法配制供试品溶液 3 份, 进样, 测定峰面积, 用外标法计算出丹参水提液中咖啡酸、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 的质量浓度分别为 0.277、4.853、3.371、78.933 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.3 PDA 及 PDA-SMRR 的合成和表征

2.3.1 PDA 的合成 称取 50 mg 盐酸多巴胺溶于

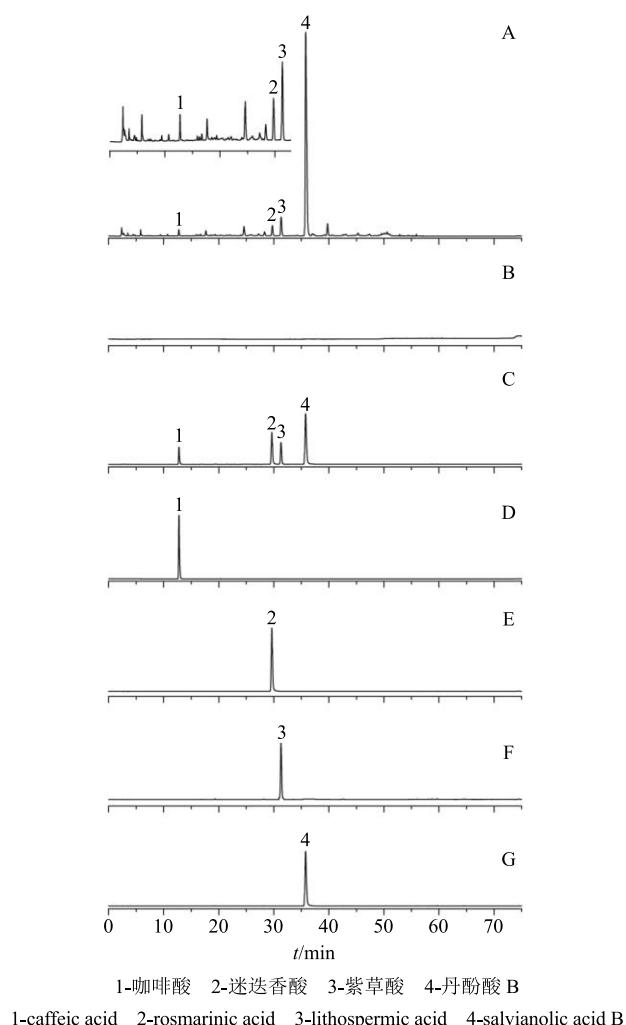


图 1 供试品溶液 (A)、稀释溶液 (B)、混合对照品溶液 (C)、对照品溶液 (D, E, F, G) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of sample solution (A), dilute solution (B), mixed reference standard solution (C), and reference standard solution (D, E, F, G)

10 mL 纯水中,加入 4 mL 无水乙醇和 250 μL 氨水,搅拌 24 h, 13 000 r/min 高速离心 15 min, 弃上清,沉淀用纯水洗 3 次,得 PDA 纳米粒溶液^[9],将溶液置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冻 24 h,再使用冷冻干燥机进行真空干燥。

2.3.2 载药量的测定 供试品溶液的制备方法同“2.2.2”项下。供试品溶液中各药物成分的含量按“2.2.1”项下色谱条件进行测定,测定载药前后溶液中药量,如图 2,并按公式分别计算各成分的载药量,载药量为 1 g PDA 能够负载的药物质量(mg)。载药前后的 HPLC 图也表明 PDA 能够同时吸附丹参水提液中的多种成分。

载药量 = (药物的原始质量 - 上清中残留药物的质量) / PDA 的质量

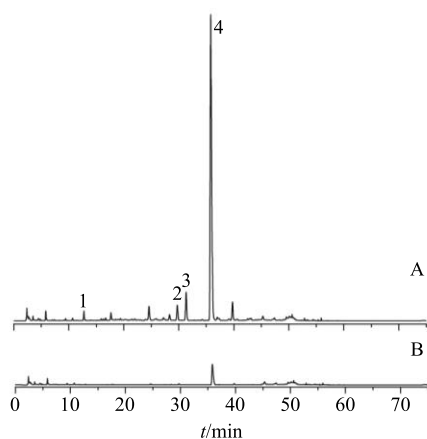


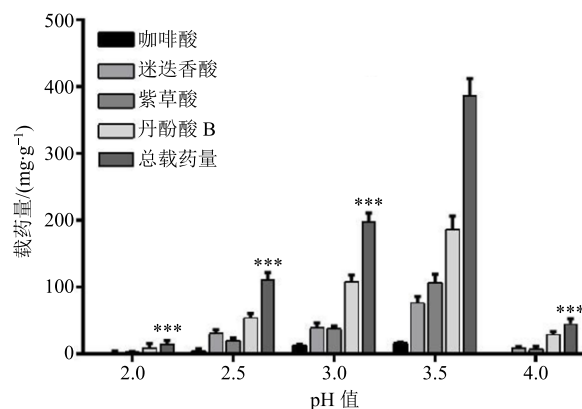
图 2 载药前供试品溶液 (A) 和载药后供试品溶液 (B) 的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC of sample solution, before drug loading (A) and after drug loading (B)

2.4 PDA-SMRR 的处方工艺考察

采用单因素实验考察溶液不同的 pH 值、搅拌时间和温度对 PDA 载药量的影响。

2.4.1 载药 pH 值的考察 取 0.5 mL 丹参水提液加入 9.5 mL 纯水,调节 pH 值至 2.0、2.5、3.0、3.5、4.0,加入 5 mg PDA 避光搅拌 8 h, 13 000 r/min 高速离心 15 min,取上清,过 0.45 μm 滤膜,按“2.2.1”项下色谱条件测定上清中残留药物的质量,按“2.3.2”项方法测得载药量,结果见图 3。沉淀用纯水洗 3 次,得 PDA-SMRR 纳米粒。结果表明,PDA 在 pH 3.5 时载药量最高,咖啡酸、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 的载药量分别为 (31.03 ± 1.94) 、 (154.52 ± 19.21) 、 (213.79 ± 24.33) 、 (375.72 ± 39.02) mg/g。



4 个成分总载药量与 pH 3.5 条件下比较: *** $P < 0.001$

*** $P < 0.001$ vs the total drug loadings at pH 3.5

图 3 不同 pH 值条件下的载药量

Fig. 3 Drug loading at different pH values

2.4.2 载药时间的考察 载药条件参考“2.4.1”项,在 pH 值为 3.5 的条件下,考察不同载药时间(2、4、6、8、12 h)对载药量的影响,结果见图 4。结果表明,各成分载药量呈现先增大后变化不明显的趋势。载药时间从 1 h 上升到 8 h,载药量明显增加,而从 8 h 上升到 12 h,载药量略微增加但变化不明显。

2.4.3 载药温度的考察 载药条件参考“2.4.1”项,在 pH 值为 3.5 的条件下,载药时间为 12 h,考察不同载药温度(10、20、40 $^{\circ}\text{C}$)对载药量的影响,结果见图 5。结果表明,不同温度下载药量没有明显差异。

最终确定 PDA-SMRR 的载药 pH 值为 3.5,载药时间为 12 h,载药温度为室温,该条件下咖啡酸、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 的载药量分别为 (33.21 ± 1.69) 、 (158.69 ± 16.21) 、 (234.87 ± 21.34) 、 (387.94 ± 26.34) mg/g。

2.5 PDA-SMRR 体外释放行为考察

取 5 mL PDA-SMRR 溶液放置于相对分子质量

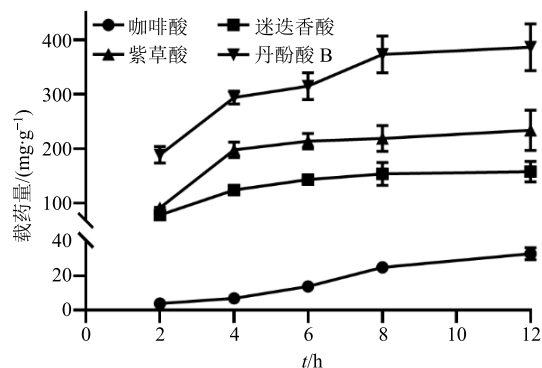


图 4 不同时间的载药量

Fig. 4 Drug loading at different times

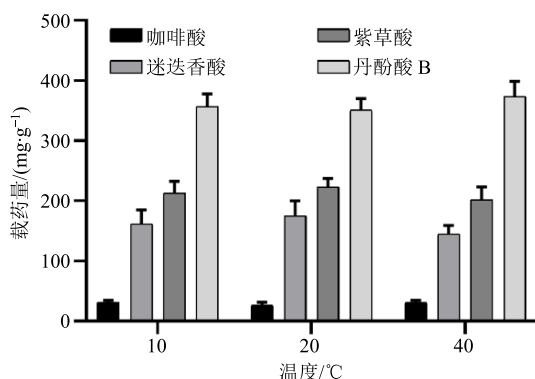


图 5 不同载药温度的载药量

Fig. 5 Drug loading at different temperatures

为 800~1 000 的 Spectra/Por 透析袋, 在 pH 7.4 的 PBS 缓冲液中 37 °C 恒温水浴透析 3 d, 按预定时间 (0、0.25、0.5、1、1.5、2、3、5、12、24、48、72 h) 取释放介质, 同时补加相同温度同体积的 PBS 缓冲液, 每个样品平行 3 份。所取样品采用 HPLC 进行分析, 计算累积释放量并绘制时间累积释放率曲线。结果见图 6。PDA-SMRR 中 SMRR 的释放较缓慢, PDA-SMRR 中 SMRR 在 72 h 内的累积释放率达 75% 左右, 具有一定的缓释效应。说明 PDA-SMRR 具有较好的缓释效应。

2.6 PDA-SMRR 的表征

2.6.1 粒径分布 采用粒径测定仪比较 PDA 和 PDA-SMRR 粒径变化, 结果见图 7。PDA 载药前平均粒径为 (217.8 ± 5.7) nm, 载药后平均粒径为 (459.2 ± 4.5) nm, 粒径分布较窄。

2.6.2 Zeta 电位 通过粒径分析仪测定 PDA 和 PDA-SMRR 的电位。结果在 pH 3.5 的条件下, PDA 的 Zeta 电位为 (41.34 ± 0.42) mV, 载药后 PDA-SMRR 的 Zeta 电位为 (3.01 ± 0.3) mV; 在 pH 7.4 的条件下, PDA 的 Zeta 电位为 (-28.42 ± 0.21) mV, 载药后 PDA-SMRR 的 Zeta 电位为 (-9.40 ± 0.31) mV。

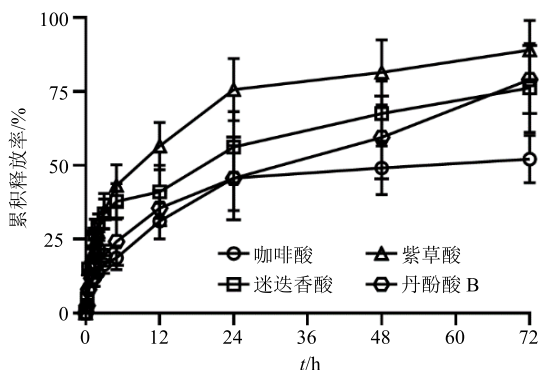


图 6 PDA-SMRR 的体外释放曲线

Fig. 6 In vitro release profiles of PDA-SMRR

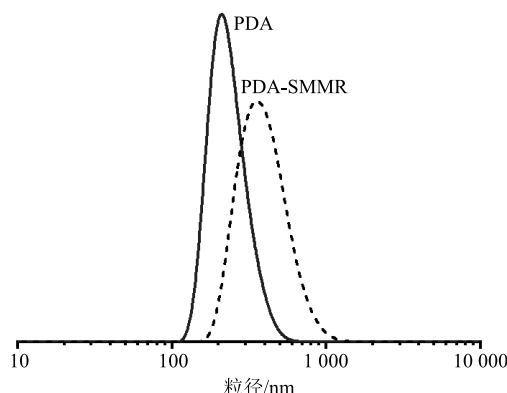


图 7 PDA 和 PDA-SMRR 的粒径分布图

Fig. 7 Particle size distribution chart of PDA and PDA-SMRR

2.6.3 形态观察 取适量 PDA-SMRR 溶于超纯水中, 制铜网样品, 通过透射电镜 TEM 观察形态。如图 8 所示, PDA-SMRR 为球形纳米结构。

2.7 PDA-SMRR 对 H₂O₂ 诱导心肌细胞氧化应激损伤的影响

2.7.1 大鼠乳鼠心肌细胞的提取 心肌细胞来源于出生 24~72 h 内的 SD 大鼠新生乳鼠。75%乙醇消毒皮肤, 剪开胸部皮肤, 取出心脏, 置于盛有 pH 7.4 PBS (预冷, 含双抗) 的大皿中; 将心脏表面附着的大血管剪去, 剪去心房, 放入 5 mL 灭菌离心管中充分剪碎成肉泥状; 加 2 mL 0.05% 胰酶充分吹匀, 37 °C 消化 8 min, 静置沉淀 1 min, 弃上清, 再加 2 mL 0.05% 胰酶, 充分吹匀, 37 °C 消化 5 min; 取上清, 加入含有 5 mL 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基的离心管中, 剩余沉淀中加入 2 mL 0.05% 胰酶, 充分吹匀, 37 °C 消化 10 min; 重复以上的步骤 4~5 次, 直至组织块消化完毕, 置于培养箱 2~3 h 待成纤维细胞贴壁后轻轻吹打培养基, 所有的中皿上清移入离心管 3 000 r/min 离心 5 min, 弃上清,

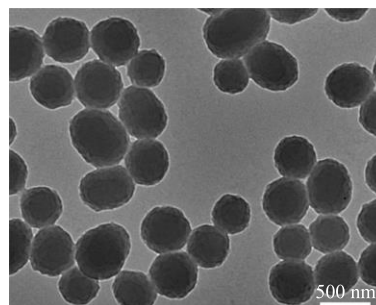


图 8 PDA-SMRR 的透射电镜图 (比例尺: 500 nm)

Fig. 8 TEM image of PDA-SMRR (scale bar indicates 500 nm)

加含有 10% 小牛血清的 DMEM 培养基以及 Brdu(10 mmol/L), 铺中皿培养。48 h 换液后可得心肌细胞。

通过显微镜观察发现, 刚分离的心肌细胞未铺展开, 呈球形, 培养 2 h 后心肌细胞贴壁生长, 部分细胞伸出伪足成三角形或者多边形。有少许细胞开始自发性搏动, 频率在 40~60 次/min。约 48 h 后大部分心肌细胞伸出伪足, 细胞间相互交织成网状, 形成细胞簇或者形成单层细胞(图 9), 自发搏动趋向同步性, 搏动频率在 80~100 次/min。

2.7.2 PDA-SMRR 的细胞安全性考察 在 48 孔板中, 移入大鼠乳鼠心肌细胞 (2×10^4 个/孔), 加入 DMEM 培养基, 每孔 50 μ L, 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 条件下孵育 24 h 后, 弃去原培养液。取“2.4”中配制的 PDA-SMRR, 将负载的咖啡酸、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 的总药量浓度作为心肌细胞安全性考察指标, 用不含胎牛的 DMEM 培养基配制成不同质量浓度 (1、5、10、20、50 $\mu\text{g/mL}$) 的 PDA-SMRR 作为给药组, 以未加 PDA-SMRR, 直接加入不含胎牛的 DMEM 培养基作为对照组。

使用 CCK-8 试剂盒检测细胞活力, 结果见图 10。结果表明, PDA-SMRR 作用于心肌细胞后, 与

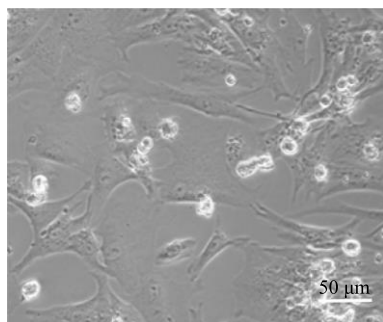


图 9 心肌细胞的形态观察 (比例尺: 50 μm)

Fig. 9 Morphology of cardiomyocytes (scale bar indicates 50 μm)

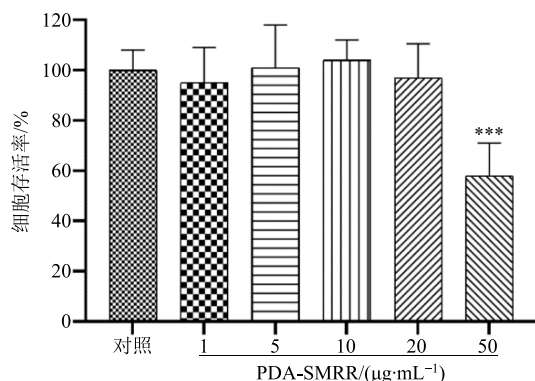
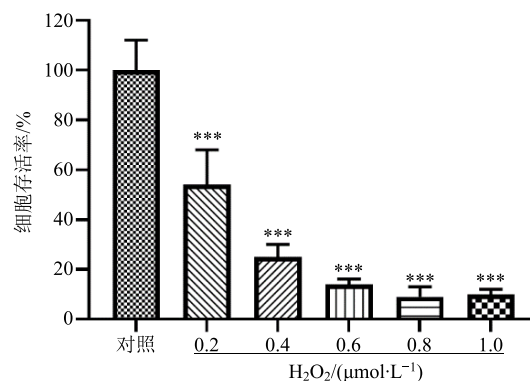


图 10 PDA-SMRR 的体外细胞安全性试验 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 10 In vitro cell safety test of PDA-SMRR ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

对照组相比, 给药组随着 PDA-SMRR 质量浓度的增加, 心肌细胞存活率无明显变化, 当质量浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 时, 心肌细胞出现明显活力降低。因此当丹参水提液中 4 个成分的质量浓度在 1~20 $\mu\text{g/mL}$ 时的 PDA-SMRR 生物安全性良好。

2.7.3 H_2O_2 诱导细胞氧化应激损伤模型的建立 在 48 孔板中移入乳鼠心肌细胞 (2×10^4 个/孔), 加入 DMEM 培养基, 每孔 50 μ L, 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 条件下孵育 24 h 后, 弃去原培养液, 将心肌细胞分为对照组和模型组。模型组加入不同浓度的 (0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 $\mu\text{mol/L}$) H_2O_2 溶液, 每个浓度设置 6 个孔, 每孔加入 200 μ L, 造成细胞的氧化损伤; 对照组加入 200 μ L DMEM 完全培养基, 设置 6 个复孔。6 h 后, 使用 CCK-8 试剂盒检测不同浓度的 H_2O_2 对心肌细胞的损伤程度, 结果见图 11。结果表明, H_2O_2 作用于心肌细胞后, 与对照组相比, 模型组随着 H_2O_2 浓度的增加, 心肌细胞存活率逐渐降低, 呈现一定剂量依赖性, 浓度为 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 时细胞活力最低, 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 对细胞造成的损伤比较适中, 本实验选择 H_2O_2 浓度为 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 进行后续实验。



与对照组比较: *** $P < 0.001$

*** $P < 0.001$ vs control group

图 11 H_2O_2 诱导细胞损伤考察 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 11 Investigation of H_2O_2 -induced cell damage ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

2.7.4 PDA-SMRR 对 H_2O_2 诱导心肌细胞氧化应激损伤的影响 在 48 孔板中移入大鼠乳鼠心肌细胞 (2×10^4 个/孔), 加入 DMEM 培养基, 每孔 50 μ L, 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 条件下孵育 24 h 后, 弃去原培养液, 将心肌细胞分为对照组、模型组和给药组。弃去原培养液, 给药组加入低剂量 (5 $\mu\text{g/mL}$)、中剂量 (10 $\mu\text{g/mL}$)、高剂量 (20 $\mu\text{g/mL}$) 的 PDA-SMRR 以及相应浓度的丹参水提液, 模型组、对照组分别加入不含胎牛的 DMEM 培养基, 进行预处理, 每个质

量浓度设置 6 个复孔, 每孔加 100 μL , 预处理 4 h; 预处理后给药组和模型组加入 H_2O_2 溶液, 使其终浓度为 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 。

使用 CCK-8 试剂盒检测 PDA-SMRR 对 H_2O_2 诱导的心肌细胞氧化应激损伤的影响, 结果见图 12。结果表明, 与对照组相比, 模型组心肌细胞存活率明显降低, 表明 H_2O_2 溶液造模成功; 给药组细胞存活率较模型组有明显改善, 呈一定的剂量依赖性, 剂量为 20 $\mu\text{g/mL}$ 的 PDA-SMRR 效果最佳, 并且 PDA-SMRR 的药效优于 SMRR, 可能是由于 PDA-SMRR 释放负载药物后, PDA 自身发挥一定的抗氧化应激作用。

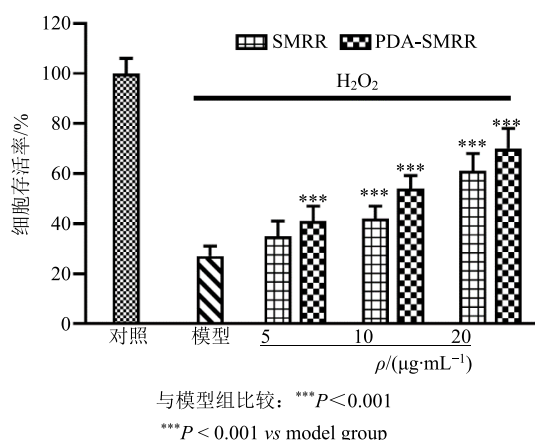


图 12 PDA-SMRR 对 H_2O_2 诱导的细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 12 Effects of PDA-SMRR on H_2O_2 -induced cell viability ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

2.8 统计学处理

采用 SPSS 20.0 分析软件进行统计分析, 多组间比较采用方差分析, 两组间比较采用独立样本 t 检验。

3 讨论

本实验利用 PDA 成功地对多种丹参水溶性成分进行了大剂量负载。考察 PDA-SMRR 处方制备工艺, 发现载药环境 pH 值对载药量的影响较大, 通过对 pH 值的改变来调控 PDA 的表面电位。当 pH 值小于 4 时, PDA 表面带正电荷, 载药后 PDA-SMRR 表面电荷趋于 0 mV, 猜测其载药机制可能是静电力吸引为主。PDA 在 pH 7.4 的环境下发生电荷翻转, 表面呈负电荷, 促使吸附的药物释放, 体外累积释放率表明, 在 pH 为 7.4 的释放介质中, PDA-SMRR 可以在 72 h 内缓慢释放药物成分, 但是由于吸附机制还存在 π - π 堆积、共价键等其他作

用力, 且不同成分的吸附机制不同, 因此不同药物的释放速率也不同。

CCK-8 实验显示, SMRR 和 PDA-SMRR 均有抗氧化应激能力, 且 PDA-SMRR 保护氧化应激造成的心肌细胞损伤的作用较 SMRR 明显。丹参水溶性成分以酚酸类化合物为主, 具有抗氧化应激的作用^[24-25]。PDA-SMRR 增强抗氧化应激作用可能是由于 PDA 自身可以清除氧化应激诱导的活性氧 (ROS)^[26]。PDA 与 SMRR 结合, 提高载药量的同时增强了抗氧化作用, 具有药辅合一的特性。

本研究发现, PDA 作为一种新型载体, 载药方式多样且可控性强, 可以大剂量负载多种成分, 将其作为中药多成分的载体具有良好的应用前景。

参考文献

- [1] Kang S M, Park S, Kim D, *et al.* Simultaneous reduction and surface functionalization of graphene oxide by mussel-inspired chemistry [J]. *Adv Funct Mater*, 2011, 21(1): 108-112.
- [2] Postma A, Yan Y, Wang Y, *et al.* Self-polymerization of dopamine as a versatile and robust technique to prepare polymer capsules [J]. *Chem Mat*, 2009, 21(14): 3042-3044.
- [3] Bi D, Zhao L, Yu R, *et al.* Surface modification of doxorubicin-loaded nanoparticles based on polydopamine with pH-sensitive property for tumor targeting therapy [J]. *Drug Deliv*, 2018, 25(1): 564-575.
- [4] Lynge M E, Westen R, Postma A, *et al.* Polydopamine-a nature-inspired polymer coating for biomedical science [J]. *Nanoscale*, 2011, 3(12): 4916-4928.
- [5] 张梦莹, 王—安, 敖 惠, 等. 聚多巴胺表面功能化叶酸靶向紫杉醇纳米粒的制备及抗肿瘤研究 [J]. *药物评价研究*, 2020, 43(1): 52-56.
- [6] 盛晓丹, 刘 臻, 罗砚曦, 等. 聚多巴胺修饰的载榄香烯介孔二氧化硅纳米粒的制备及其靶向抗肿瘤活性研究 [J]. *中草药*, 2020, 51(10): 2745-2754.
- [7] Batul R, Tamanna T, Khaliq A, *et al.* Recent progress in the biomedical applications of polydopamine nanostructures [J]. *Biomater Sci*, 2017, 5(7): 1204-1229.
- [8] Liu Y, Ai K, Lu L. Polydopamine and its derivative materials: synthesis and promising applications in energy, environmental, and biomedical fields [J]. *Chem Rev*, 2014, 114(9): 5057-5115.
- [9] Chen R, Zhu C, Chen Z. Polydopamine-based multifunctional platform for combined photothermal therapy, chemotherapy, and immunotherapy in malignant tumor treatment [J]. *ACS Appl Bio Mater*, 2019, 2(2),

- 874-883.
- [10] 赵磊, 毕冬冬, 齐晓宇, 等. 聚合多巴胺改性紫杉醇纳米粒靶向治疗乳腺癌骨转移 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(12): 1695-1700.
- [11] Wu J, Zhang L, Wang Y, *et al.* Mussel-inspired chemistry for robust and surface-modifiable multilayered films [J]. *Langmuir*, 2011, 27(22): 13684-13691.
- [12] He K, Zeng G, Chen A, *et al.* Graphene hybridized polydopamine-kaolin composite as effective adsorbent for methylene blue removal [J]. *Compos Pt B-Eng*, 2019, 161(15): 141-149.
- [13] Wang Y, Wu Y S, Li K, *et al.* Ultralong circulating lollipop-like nanoparticles assembled with gossypol, doxorubicin, and polydopamine via π - π stacking for synergistic tumor therapy [J]. *Adv Funct Mater*, 2018, 29(1), <https://doi.org/10.1002/adfm.201805582>.
- [14] Wang L, Wang D, Dong Z, *et al.* Interface chemistry engineering for stable cycling of reduced GO/SnO₂ nanocomposites for lithium ion battery [J]. *Nano Lett*, 2013, 13(4): 1711-1716.
- [15] Song J, Zhang W, Sun J, *et al.* Determination of salvianolic acid C in rat plasma using liquid chromatography-mass spectrometry and its application to pharmacokinetic study [J]. *Biomed Chromatogr*, 2016, 30(3): 376-383.
- [16] 苏梅, 秦引林, 姜雅静, 等. 丹参酮 II_A 磺酸钠体内促血管新生作用的研究 [J]. 现代药物与临床, 2019, 34(4): 934-940.
- [17] 蒋维海, 孙微, 王一帆. 老年急性脑梗死溶栓后 24 h 内注射丹参多酚酸的疗效及其对血液流变学和氧化应激的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(24): 5941-5944.
- [18] 梁文仪, 陈文静, 杨光辉, 等. 丹参酚酸类成分研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(5): 806-812.
- [19] Cheng T. Danshen: A popular Chinese cardiac herbal drug [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2006, 47(7): 1487-1501.
- [20] Mei X D, Cao Y F, Che Y Y, *et al.* Danshen: A phytochemical and pharmacological overview [J]. *Chin J Nat Med*, 2019, 17(1): 0059-0080.
- [21] 万新焕, 王瑜亮, 周长征, 等. 丹参化学成分及其药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2020, 51(3): 788-798.
- [22] 王乐琪, 张云帆, 李莎莎, 等. 丹参治疗微循环障碍作用机制的“成分-靶点-通路”多层次互作网络模型研究 [J]. 中草药, 2020, 51(2): 439-450.
- [23] 李德坤, 苏志刚, 万梅绪, 等. 注射用丹参多酚酸药理作用及临床应用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(2): 353-361.
- [24] Lee H, Dellatore S, Miller W, *et al.* Mussel-inspired surface chemistry for multifunctional coatings [J]. *Science*, 2007, 318(5849): 426-430.
- [25] Mu H, Li Q, Fan J, *et al.* Caffeic acid attenuates rat liver injury after transplantation involving PDIA3-dependent regulation of NADPH oxidase [J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 129(12): 202-214.
- [26] Bao X, Zhao J, Sun J, *et al.* Polydopamine nanoparticles as efficient scavengers for reactive oxygen species in periodontal disease [J]. *ACS Nano*, 2018, 12(9): 8882-8892.