

鼻腔给药 NMFGF1 纳米粒改善血管性痴呆小鼠认知功能障碍

张明¹, 孙旻一¹, 朱宁伟², 陈梦嘉¹, 赵习春^{3*} (1.宁波市鄞州区第二医院, 浙江 宁波 315100; 2.浙江省药科职业技术大学, 浙江 宁波 300052; 3.合肥京东方医院, 合肥 230000)

摘要: 目的 考察鼻腔给药包载非促分裂活性酸性成纤维细胞生长因子(non-mitogenic acid fibroblast growth factor, NMFGF1)的纳米粒(NMFGF1-NPs)对于血管性痴呆(vascular dementia, VD)小鼠认知功能改善作用及其机制。方法 应用水包水型乳化技术制备 NMFGF1-NPs 并进行质量表征。采用反复脑缺血再灌注法建立 VD 试验模型后分成假手术组、VD 模型组、空白纳米粒组、NMFGF1 溶液组及 NMFGF1-NPs 组, 分别鼻腔给予相应形式药物干预。干预结束后, 应用 Morris 水迷宫评价试验动物的学习及记忆功能, 同时应用 HE 染色、FJB 染色及 Tunel 凋亡染色等病理学方法评价试验动物海马神经元的形态、排列及凋亡指数(apoptosis index, AI), 另外应用 ELISA 及 Western blotting 等分子生物学方法探讨鼻腔给药 NMFGF1-NPs 改善 VD 的分子机制。结果 NMFGF1-NPs 形态圆整, 包封率(87.76±5.89)%。Morris 水迷宫结果显示 VD 模型组小鼠的各项行为学指标均较假手术组有显著差异($P<0.01$), 同时病理结果显示, VD 模型组小鼠海马神经元 CA1 区域神经元排列紊乱、细胞形态结构缺失且 AI 较假手术组显著增加($P<0.01$), 而经过鼻腔给药 NMFGF1-NPs 治疗组小鼠的各项行为学指标较 VD 模型组有显著改善, 同时海马神经元细胞形态完整, 排列整齐, AI 指数较 VD 模型组及其他各个治疗干预组显著降低($P<0.01$)。ELISA 及 Western blotting 分析结果显示, 鼻腔给药 NMFGF1-NPs 治疗组小鼠脑内 MDA 含量较 VD 模型组及其他各个治疗干预组显著下降($P<0.01$), 同时 SOD, NO 含量及 Nrf2, SOD-1, GSTO1/2 表达显著增加($P<0.01$)。结论 鼻腔给药 NMFGF1-NPs 能够通过激活 Nrf2/ARE 信号通路, 发挥抗氧化应激损伤的作用, 最终改善 VD 小鼠的学习及认知功能。

关键词: 纳米粒; 鼻腔给药; 血管性痴呆; NMFGF1; 氧化应激

中图分类号: R944 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2023)20-2838-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20231006

引用本文: 张明, 孙旻一, 朱宁伟, 等. 鼻腔给药 NMFGF1 纳米粒改善血管性痴呆小鼠认知功能障碍[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(20): 2838-2845.

Nasal Administration of NMFGF1 Loaded Nanoparticles Improved Cognitive Dysfunction in Vascular Dementia Mice

ZHANG Ming¹, SUN Minyi¹, ZHU Ningwei², CHEN Mengjia¹, ZHAO Xichun^{3*} (1.Ningbo Yinzhou Second Hospital, Ningbo 315100, China; 2.Zhejiang Pharmaceutical College, Ningbo 300052, China; 3.Hefei BOE Hospital, Hefei 230000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effects of nasal administration of non-mitogenic acid fibroblast growth factor(NMFGF1) loaded nanoparticles(NMFGF1-NPs) on the improvement of cognitive function in vascular dementia(VD) mice and its mechanism. **METHODS** Nanoparticles containing NMFGF1(NMFGF1-NPs) were prepared by water-in-water emulsion technique and characterized. The mice were divided into sham group, VD model group, blank-NPs group, NMFGF1 solution group and NMFGF1-NPs group after repeated cerebral ischemia-reperfusion to establish VD test model, and then given the corresponding form of drug intervention by nasal cavity. After drug intervention, Morris water maze was used to evaluate the learning and memory function of the animals in each group from the perspective of behavior. Meanwhile, the morphology, arrangement and apoptosis index(AI) of hippocampal neurons in each group were evaluated by pathological methods such as HE staining, FJB staining and Tunel apoptosis staining. In addition, ELISA and Western blotting were used to investigate the molecular mechanism of NMFGF1-NPs improving VD by nasal administration. **RESULTS** The morphology of NMFGF1-NPs was round. The encapsulation rate of NMFGF1-NPs respectively was (87.76±5.89)%. Morris water maze results showed that the behavioral indexes of mice in VD model group were significantly different from those in sham operation group($P<0.01$). At the same time, the pathological results showed that the neurons in the CA1 region of the hippocampus in the VD model group were disordered, the cells morphology and structure were missing, and the AI was significantly increased compared with that in the sham operation group($P<0.01$). Meanwhile, compared with the VD model group, the NMFGF1-NPs treatment group showed significant improvement in various behavioral indexes, and the hippocampal neuron cells were intact and orderly, and the AI

基金项目: 浙江省医药卫生科学计划项目(2021KY1068, 2020KY897); 鄞州区科技项目(2019AS0021, 鄞科[2020]45 号)

作者简介: 张明, 男, 硕士, 主管药师 E-mail: 1012273719@qq.com *通信作者: 赵习春, 男, 硕士, 主治医师 E-mail: zhaoxichun2022@126.com

index was significantly decreased($P<0.01$). ELISA and Western blotting analysis showed that compared with that of VD model group and other intervention groups, the content of MDA in the brain of NMFGF1-NPs treatment group was significantly decreased. While the content of SOD, NO and the expressions of Nrf2, SOD-1 and GSTO1/2 was significantly increased ($P<0.01$). **CONCLUSION** Nasal administration of NMFGF1-NPs can play the role of antioxidant stress damage by activating Nrf2/ARE signal pathway, and ultimately improve the learning and cognitive function of VD mice.

KEYWORDS: nanoparticles; nasal administration; vascular dementia; NMFGF1; oxidative stress

血管性痴呆(vascular dementia, VD)是一类引起患者认知障碍的脑血管疾病,已经成为继阿尔茨海默病之后的第二常见痴呆类型,且目前并无有效的防治方法^[1-2]。研究发现当脑组织局部发生缺血损伤时能够激活性氧(reactive oxygen species, ROS)自由基的释放,从而引起神经元蛋白、脂质及DNA的氧化应激损伤,导致神经元损害甚至死亡。因此,脑缺血损伤是诱发VD的重要因素^[3]。

酸性成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor 1, FGF1 或 aFGF)来源于中胚层和神经外胚层,是成纤维细胞生长因子家族的成员之一,参与中枢神经系统发育和成熟过程^[4]。研究表明FGF1能够通过抗氧化应激反应改善阿尔茨海默病引起的脑损伤^[5]。此外,FGF1在多种脑部疾病的动物模型如癫痫^[6]、脑缺血^[7]及大脑皮层损伤^[8]中表现出较好的治疗效果。因此,FGF1在VD防治方面具有极大的应用潜力。然而作为细胞生长因子类药物,FGF1具有促细胞增殖样有丝分裂活性,在体应用存在诱发肿瘤的潜在安全性问题^[9]。同时作为大分子蛋白类药物,FGF1体内易被氧化失活,结构稳定性差^[10],且常规给药方式药物难以透过血脑屏障(blood brain barrier, BBB),入脑效率低,限制了其在脑血管疾病防治中的应用研究。

课题组前期研究证实,应用水包水乳化技术制备包载生物大分子药物的纳米粒不仅能够增加药物的体内稳定性,同时能够保留生物大分子药物的活性^[11]。本研究在前期试验基础上,采用非促分裂活性的改构型FGF1(non-mitogenic FGF1, NMFGF1)作为模型药物,并使用水包水型乳化技术制备的新型纳米粒(nanoparticles, NPs)对其进行包载,增加药物稳定性,结合鼻腔给药技术将NMFGF1递送入脑,研究NMFGF1对于VD小鼠认知功能障碍的防治作用及其机制。

1 材料

1.1 动物

60只8~10周龄健康雄性ICR清洁级小鼠,体质量(32±3)g,由浙江实验动物中心提供,动物生产许可证号:SCXK(浙)2014-0001。实验期间所

有动物均予标准饲料喂养,昼夜室温控制在22℃左右,明暗各12h交替。

1.2 药品与试剂

泊洛沙姆188(德国BASF公司,批号:156544891);明胶(国药集团化学试剂有限公司,批号:20171010);戊巴比妥钠(美国SINCO公司,批号:20-11-2201);Fluoro-Jade B染色试剂盒(武汉艾美捷科技有限公司,批号:TR-100-FJ);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号:AR1180);丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、一氧化氮(nitric oxide, NO)ELISA试剂盒(批号分别为A003-1、A020-2-2、A013-2)均购自南京建成生物工程研究所;BCA蛋白浓度测定试剂盒(批号:P0010)、放射免疫沉淀试验缓冲液(RIPA)(批号:P0013B)均购自上海碧云天生物技术有限公司;抗核因子E2相关因子2(nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2)一抗(英国Abcam公司,批号:ab137550);抗超氧化物歧化酶1(superoxide dismutase 1, SOD-1)一抗(美国Novusbio公司,批号:03253462C213);谷胱甘肽巯基转移酶1/2(GSTO1/2)(美国Santa Cruz公司,批号:SC166040);生物素标记的山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)二抗(北京康为世纪生物科技有限公司,批号:00051405)。

1.3 仪器

SLY-WMS Morris 水迷宫(北京硕林苑科技有限公司);LAS型凝胶成像系统(美国GE公司);Multiskan GO型酶标仪(美国Thermo Fisher公司);BX53显微镜(日本奥林巴斯公司);JEM-2100Plus透射电镜(日本电子株式会社);Nano Series-2590激光粒度仪(英国马尔文有限公司)。

2 方法

2.1 包载NMFGF1的纳米粒(NMFGF1-NPs)的制备及其质量考察

课题组在前期研究基础上应用新型的水包水型乳化技术制备NMFGF1-NPs,并对其进行性状考察。制备方法:将NMFGF1冻干粉溶解于10%泊

洛沙姆 188 溶液中($10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 然后在 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超声(参数: 50 W , 2 s on , 3 s off , 1 min)条件下按体积比 $1:2$ 加入到 2% 的明胶水溶液中形成载药纳米粒溶液, 冷冻干燥得到 NMFGF1-NPs。将 10% 泊洛沙姆溶液直接按照体积比 $1:2$ 加入到 2% 的明胶溶液中, 其余操作与制备载药纳米粒一致, 即可得到空白纳米粒(blank- NPs)。

采用透射电镜观察载药纳米粒的微观形态。同时采用激光粒度仪分别测定 NMFGF1-NPs 的粒径以及 Zeta 电位。

采用高速离心法测定 NMFGF1-NPs 的包封率: 精密量取载药纳米粒溶液 1.0 mL 于离心管中, 离心 10 min (离心半径= 8.5 cm , $10\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$), 取出上层清液, 用 ELISA 试剂盒测定其中 NMFGF1 蛋白浓度。

包封率($\%$)=(总的蛋白量-上清液的蛋白量)/总蛋白量 $\times 100\%$ 。

2.2 小鼠 VD 模型的建立及分组

将小鼠随机选取 10 只作为假手术组, 其余小鼠作为实验组。在前期研究基础上^[12], 本次实验采用双侧颈总动脉闭塞法(脑缺血再灌注)建立小鼠 VD 模型。首先应用 3% 的戊巴比妥钠($30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)腹腔注射充分麻醉实验小鼠。将小鼠处于仰卧位, 沿颈部中线切开皮肤及肌肉, 利用玻璃分针小心暴露出双侧颈总动脉避免损伤周围神经。应用小型血管夹同时夹闭双侧颈总动脉 10 min , 造成脑灌注不足, 然后松开动脉夹 20 min , 恢复血流。重复操作 3 次, 从而造成小鼠脑缺血再灌注损伤。假手术组小鼠只暴露双侧颈总动脉不进行血管夹闭, 其余操作与实验组小鼠一致。术后 24 h 后将实验组小鼠随机分成 VD 模型组、空白纳米粒(Blank-NPs)组、NMFGF1 溶液组及 NMFGF1-NPs 组, 每组 10 只。假手术组及 VD 模型组小鼠鼻腔给药 $2\text{ }\mu\text{L}$ PBS 溶液。NMFGF1 溶液治疗组小鼠鼻腔给药 $2\text{ }\mu\text{L}$ PBS 溶液包含 $20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的 NMFGF1。NMFGF1-NPs 组小鼠鼻腔给药 $2\text{ }\mu\text{L}$ PBS 溶液包含 $20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的 NMFGF1-NPs。空白纳米粒组小鼠鼻腔给药 $2\text{ }\mu\text{L}$ PBS 溶液包含同剂量空白纳米粒。

参考课题组之前的研究实施鼻腔给药技术^[13]。将小鼠处于仰卧位固定, 头部保持水平。鼻腔给药时用移液枪吸取 $1\text{ }\mu\text{L}$ 药液, 选取一侧小鼠鼻孔让其自然吸入, 间隔 3 min 后换另一侧鼻腔给予剩下的 $1\text{ }\mu\text{L}$ 药液。所有的治疗方式于建模术后 24 h

开始, 连续治疗干预 45 d , 每天干预 1 次。

2.3 Morris 水迷宫试验

药物治疗干预结束后应用 Morris 水迷宫评价各组小鼠海马相关的学习及记忆能力^[14]。水迷宫是一个直径 100 cm 的圆形泳池, 泳池中装有 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的恒温水。水迷宫分为 4 个象限, 其中第 2 象限(目标象限)中央位置有一个直径为 7 cm 的平台, 平台高度低于水面 5 mm 。训练开始时每只试验小鼠给予 60 s 时间去寻找水中的平台, 如果 60 s 内未找到平台则由试验人员将小鼠放置到平台上。所有小鼠每天训练 4 次, 持续训练 5 d , 记录每只小鼠的寻找平台的时间即为逃避潜伏期。训练的第 6 天撤去平台进行空间探针试验。每只试验小鼠从随机位置放入泳池, 在 60 s 内记录每只小鼠穿越原平台所在位置的次数及其在目标象限中的停留的时间和运动距离, 评价各组小鼠的记忆功能。

2.4 HE 染色

行为学评价结束后每组随机选取 5 只小鼠处死, 取海马组织进行组织切片, 切成 $3\text{ }\mu\text{m}$ 的石蜡切片。取上述切片进行脱蜡再水化后按照 HE 染色试剂盒说明书示标准步骤行海马组织 HE 染色, 观察神经元形态及排列方式。

2.5 Fluoro-Jade B(FJB)荧光染色

FJB 染色评价各组小鼠海马组织神经元退行性病变情况。取海马组织切片脱蜡再水化后滴加 FJB 染色工作液, 中性树脂封胶后应用荧光显微镜观察各组小鼠神经元退行性病变情况。

2.6 Tunel 凋亡染色

各组小鼠海马组织按 Tunel 凋亡染色试剂盒说明书示标准步骤行 Tunel 凋亡染色, 评价神经元凋亡情况。具体步骤: 取上述海马组织石蜡切片, 二甲苯脱蜡及梯度乙醇再水化后应用蛋白激酶 K($20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 消化 15 min 。然后将上述样品在室温条件下用 0.1% 三硝基甲苯溶液孵育 20 min 。PBS 溶液洗涤, 加入 Tunel 染色试剂 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 后用二氨基联苯胺进行复染。显微镜观察 Tunel 阳性细胞数量并采用 Image J 软件进行统计分析, 计算凋亡指数(apoptotic index, AI)。AI=海马 CA1 区凋亡神经元数量/海马 CA1 区神经元总数量 $\times 100\%$ 。

2.7 ELISA 试验

将每组剩余小鼠处死, 取海马组织用于 ELISA 及后续 Western blotting 分析。将小鼠脑组

组织快速取出后解剖显微镜下分离海马组织，称重匀浆后液氮保存。然后取匀浆后海马组织按照 ELISA 试剂盒说明书步骤测定各组小鼠海马组织 NO、MDA 含量及 SOD 活性。

2.8 Western blotting 分析

取部分“2.7”项下海马组织，应用放射免疫沉淀试验缓冲液(RIPA)提取蛋白。取 25 μg 提取的蛋白应用 8%的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后转移至 PVDF 膜。然后将上述 PVDF 膜应用 5%的脱脂奶粉室温封闭 1 h 后分别给予抗 Nrf2 (1 : 1 000)、SOD-1(1 : 1 000)、GSTO1/2(1 : 1 000)及 β -actin(1 : 100 000)一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜后洗膜，添加辣根过氧化酶连接的二抗室温孵育 1 h 后进行显影。

2.9 统计学分析

用 SPSS 17.0 软件包进行统计学处理。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，2 组间均数比较采用 t 检验，多样本均数间比较采用 One-Way ANOVA 检验，水迷宫数据采用重复设计性方差分析， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 NMFGF1-NPs 的质量表征结果

载药及空白纳米粒的质量表征结果见图 1。透射电镜结果显示载药及空白纳米粒呈椭圆形，分散性好无黏连。粒径分析结果显示载药及空白纳米粒的平均粒径分别为 $(101.34 \pm 7.12) \text{ nm}$ 和 $(93.12 \pm 4.37) \text{ nm}$ ，粒径的多分散系数(polydispersity index, PDI)分别为 0.112 及 0.092。同时，Zeta 电位的测定结果显示 NMFGF1-NPs 及 Blank-NPs 的 Zeta 电位分别为 -18.34 mV 及 -26.79 mV 。另外，包封率的测定结果显示 NMFGF1-NPs 的包封率为 $(87.76 \pm 5.89)\%$ 。

3.2 各组小鼠行为学考察结果

各组小鼠的 Morris 水迷宫考察结果见图 2，相比于假手术组，VD 模型组、Blank-NPs 组及 NMFGF1 溶液组小鼠第 5 天的逃避潜伏期显著增加($P < 0.01$)，平台穿越次数、目标象限停留时间及运动距离显著下降($P < 0.01$)。说明 VD 模型组、Blank-NPs 组及 NMFGF1 溶液组小鼠出现了明显的学习及认知功能障碍。相比于 VD 模型组、Blank-NPs 组及 NMFGF1 溶液组，NMFGF1-NPs 组的第 5 天逃避潜伏期显著降低($P < 0.01$)，同时平台穿越次数、目标象限停留时间及运动距离显著增加($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。说明鼻腔给药 NMFGF1-NPs

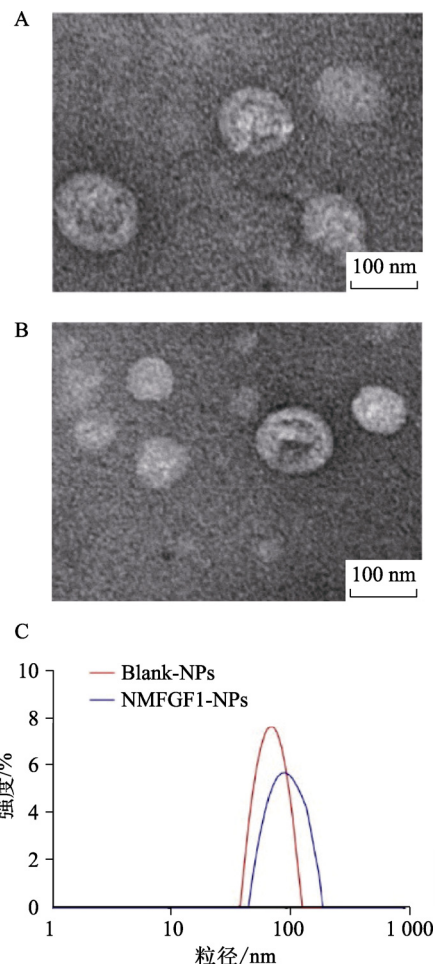


图 1 NMFGF1-NPs 及空白纳米粒的质量表征结果

A-NMFGF1-NPs 透射电镜观察结果；B-Blank-NPs 透射电镜观察结果；C-粒径分析测定结果。

Fig. 1 Quality characterizations results of NMFGF1-NPs and Blank-NPs

A-transmission electron microscopy observation of NMFGF1-NPs; B-transmission electron microscopy observation of Blank-NPs; C-results of particle size analysis.

相比于其他各个干预形式能够有效改善 VD 小鼠的学习及记忆能力。

3.3 各组小鼠海马组织 HE 染色结果

HE 染色结果显示，相比于假手术组，VD 模型组、Blank-NPs 组及 NMFGF1 溶液组小鼠海马组织 CA1 区域出现明显的神经元丢失，固缩，神经元排列紊乱，细胞形态及结构缺失，细胞核出现深染。经过 NMFGF1-NPs 治疗后的海马 CA1 区神经元细胞结构完整，排列紧密，细胞核清晰，细胞形态接近假手术组水平。结果见图 3。

3.4 FJB 染色结果

各组小鼠的海马组织 CA1 区 FJB 染色结果见图 4。FJB 染液可以与变形的神经元结合从而发绿色荧光。结果显示，VD 模型组，Blank-NPs

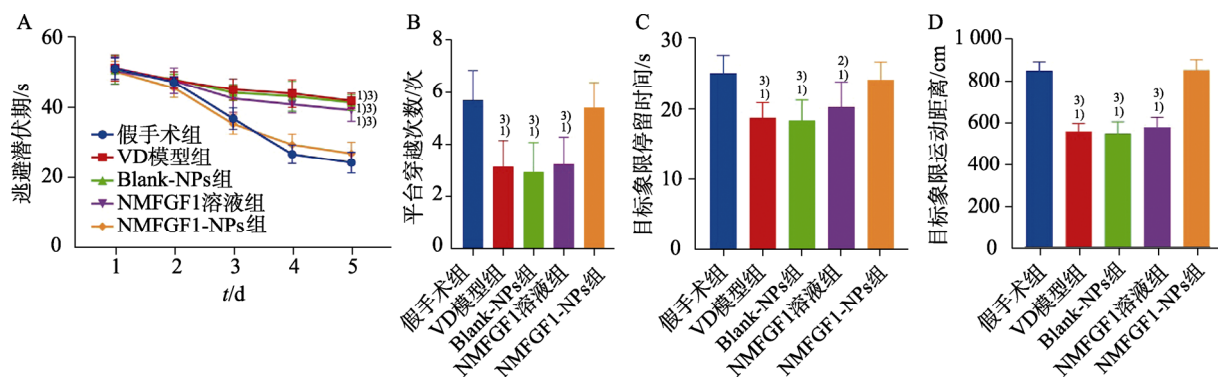


图2 Morris水迷宫考察结果($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

A-各组小鼠平均逃避潜伏期测定结果; B-各组小鼠平台穿越次数测定结果; C-各组小鼠在目标象限停留时间; D-各组小鼠在目标象限的运动距离。与假手术组相比, ¹⁾ $P<0.01$; 与 NMFGF1-NPs 组相比, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 2 Results of Morris water maze investigation($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

A-the average escape latency of mice in each group; B-results of platform crossing times in each group; C-residence time of each group in the target quadrant; D-movement distance of each group of mice in the target quadrant. Compared with the sham group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with NMFGF1-NPs group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

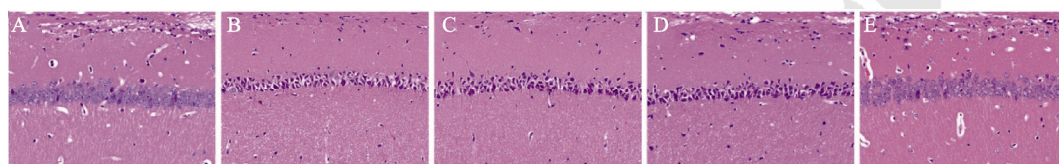


图3 各组小鼠海马组织CA1区神经元HE染色结果($n=5$, $400\times$)

A-假手术组; B-VD模型组; C-Blank-NPs组; D-NMFGF1溶液组; E-NMFGF1-NPs组。

Fig. 3 HE staining results of neurons in CA1 region of hippocampus of mice in each group($n=5$, $400\times$)

A-sham group; B-VD model group; C-Blank-NPs group; D-NMFGF1 solution group; E-NMFGF1-NPs group.

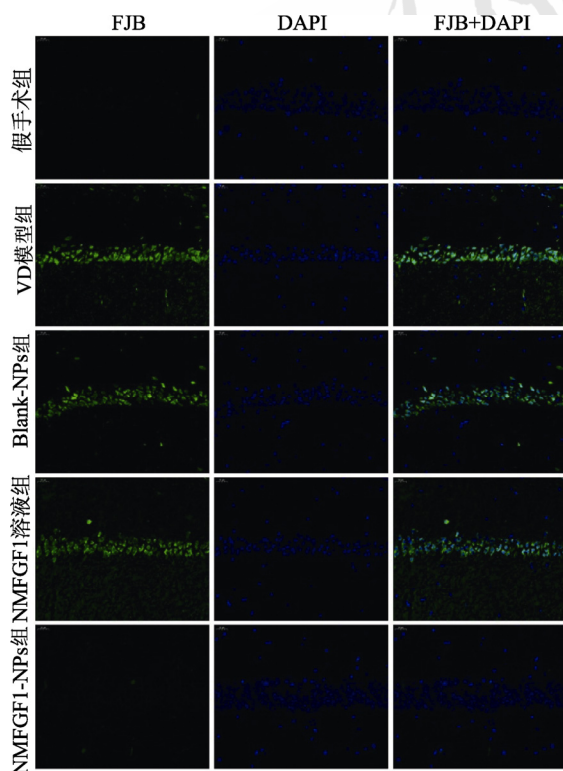


图4 各组小鼠海马FJB染色结果($n=5$, $400\times$)

Fig. 4 Results of FJB staining in hippocampus of mice in each group($n=5$, $400\times$)

组及 NMFGF1 溶液组小鼠海马 CA1 区较假手术组出现明显的神经元变性, 而 NMFGF1-NPs 治疗能够显著减少 VD 小鼠的海马神经元变性。

3.5 TUNEL 凋亡染色结果

TUNEL 凋亡阳性神经元细胞核呈棕黑色, 正常神经元细胞核呈蓝色。相比于假手术组, VD 模型组、Blank-NPs 组及 NMFGF1 溶液组的海马 CA1 区凋亡神经元数量显著增加($P<0.01$), AI 指数显著升高($P<0.01$)。相比于 VD 模型组、Blank-NPs 组及 NMFGF1 溶液组, NMFGF1-NPs 组小鼠海马 CA1 区神经元凋亡数量显著下降($P<0.01$), AI 指数接近正常对照组水平。结果见图 5。

3.6 ELISA 测定结果

小鼠海马组织 ELISA 测定统计学结果见图 6。相比于假手术组, VD 模型组及 Blank-NPs 组的海马区域 MDA 含量显著升高($P<0.01$), NO 及 SOD 含量显著下降($P<0.01$)。相比于 VD 模型组、Blank-NPs 组及 NMFGF1 溶液组, NMFGF1-NPs 组小鼠海马组织的 MDA 水平显著下降($P<0.01$), NO 及 SOD 含量显著升高($P<0.01$)。

3.7 Western blotting 分析结果

各组小鼠海马组织 Western blotting 分析结果见图 7。相比于假手术组, VD 模型组的 Nrf2、SOD-1 及 GSTO1/2 蛋白表达显著下降($P < 0.01$)。相比于 VD 模型组、Blank-NPs 组及 NMFGF1 溶液组, NMFGF1-NPs 组小鼠海马组织的 Nrf2、SOD-1 及 GSTO1/2 蛋白表达显著升高($P < 0.01$)。

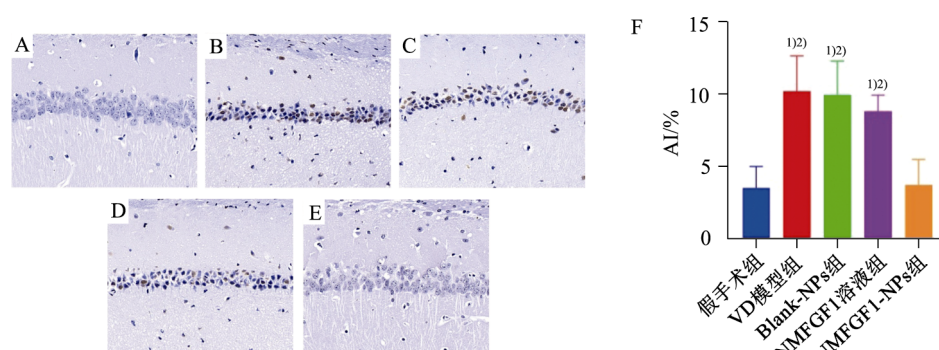


图 5 各组小鼠海马组织 TUNEL 染色结果($n=5$, $400\times$)

A-假手术组; B-VD 模型组; C-Blank-NPs 组; D-NMFGF1 溶液组; E-NMFGF1-NPs 组; F-TUNEL 凋亡染色统计学结果。与假手术组相比, ¹⁾ $P < 0.01$; 与 NMFGF1-NPs 组相比, ²⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 5 TUNEL staining results of hippocampal tissue of mice in each group($n=5$, $400\times$)

A-sham group; B-VD model group; C-Blank-NPs group; D-NMFGF1 solution group; E-NMFGF1-NPs group; F-statistical results of TUNEL apoptosis staining. Compared with the sham group, ¹⁾ $P < 0.01$; compared with NMFGF1-NPs group, ²⁾ $P < 0.01$.

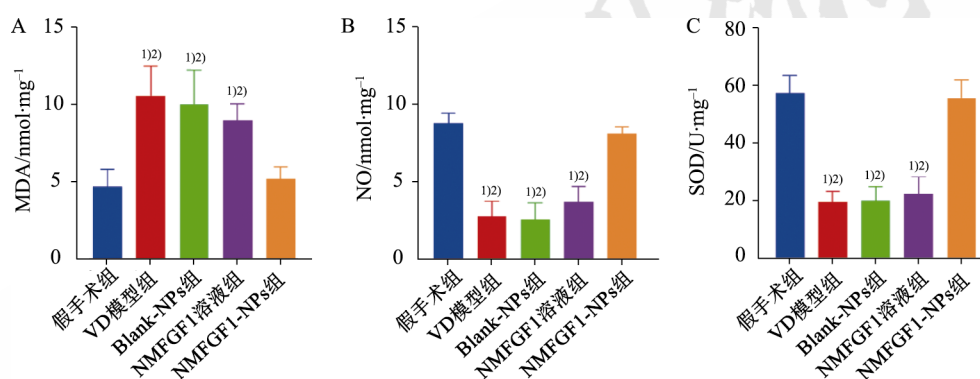


图 6 各组小鼠海马组织 ELISA 检测结果($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

与假手术组相比, ¹⁾ $P < 0.01$; 与 NMFGF1-NPs 组相比, ²⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 6 ELISA results of hippocampal tissue of mice in each group($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Compared with the sham group, ¹⁾ $P < 0.01$; compared with NMFGF1-NPs group, ²⁾ $P < 0.01$.

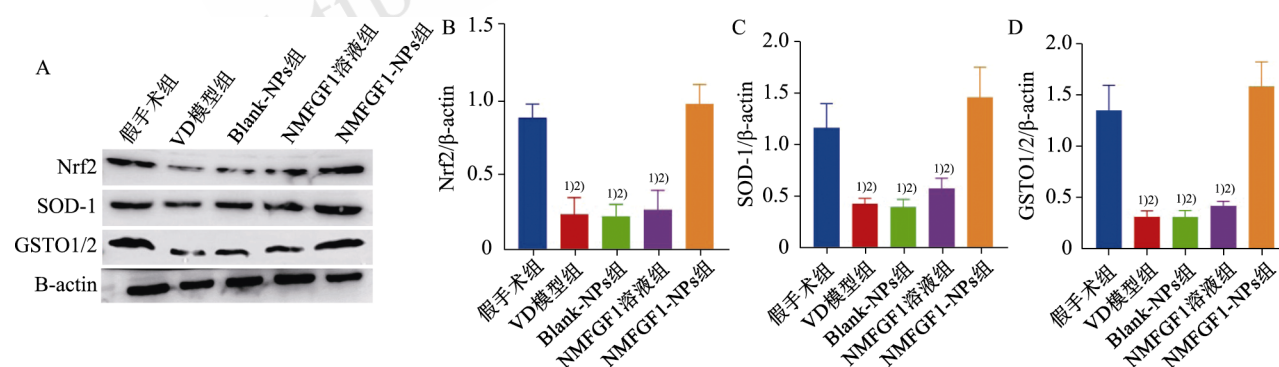


图 7 各组小鼠海马组织 Western blotting 分析结果($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

与假手术组相比, ¹⁾ $P < 0.01$; 与 NMFGF1-NPs 组相比, ²⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 7 Western blot analysis results of hippocampal tissue of mice in each group($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Compared with the sham group, ¹⁾ $P < 0.01$; compared with NMFGF1-NPs group, ²⁾ $P < 0.01$.

4 讨论

鼻腔给药途径是一种可绕过 BBB 使得药物通过嗅神经及三叉神经通路直接入脑发挥治疗作用的新型给药途径^[15]。但是由于鼻腔纤毛的清除作用、鼻腔黏液层和鼻上皮层酶的降解作用以及鼻腔上皮细胞对大分子药物的低渗透性等综合因素限制了大分子药物鼻腔给药的入脑效率^[16-17]。应用纳米粒包载生物大分子药物能够减少温度及生物酶等因素的影响,增加药物的稳定性,同时还能够增加药物在鼻腔的滞留时间及鼻腔上皮细胞的穿透性,从而增加药物的入脑效率^[18-20]。本研究应用水包水型乳化技术制备包载 NMFGF1 NPs,制备过程不添加有机溶剂且温度均在室温以下,最大程度保持了生物大分子蛋白药物的活性,减少载体对于鼻腔的刺激,适合用于鼻腔给药。载药纳米粒的质量表征结果证实 NMFGF1-NPs 粒径远小于鼻黏膜屏障的平均间隙(150±50)nm,因此可以有效穿透鼻黏膜屏障^[18],同时纳米粒还能实现对于 NMFGF1 高包载,可用于后续的鼻腔给药实验。

已有研究报道反复性的大脑缺血再灌注能够引起试验动物学习及记忆能力的损害,最终导致 VD^[21]。与上述研究结果一致,本次实验结果显示应用反复缺血再灌注损伤建立的 VD 模型组小鼠出现了明显的学习及认知功能障碍。经过不同治疗干预后的行为学考察结果证实,鼻腔给药 NMFGF1-NPs 能够有效改善 VD 小鼠的学习及记忆能力。同时,海马是脑组织中负责学习及认知功能的关键区域^[22],而海马 CA1 区域的神经元又是海马记忆系统形成与巩固的关键^[23]。本次研究的各项病理学结果证实,鼻腔给药 NMFGF1-NPs 通过改善 VD 小鼠海马 CA1 神经元变性,减少神经元凋亡从而最终提高 VD 小鼠的学习及记忆功能。

研究显示 VD 动物脑内存在明显的氧化应激损伤^[24]。VD 脑内过度 ROS 释放将会引起神经元细胞膜的脂质过氧化及 DNA 突变,最终引起神经元凋亡^[25]。本研究 ELISA 检测结果说明鼻腔给药 NMFGF1-NPs 能够通过下调脑内不饱和脂肪酸过氧化产物 MDA 水平,同时提高抗氧化酶^[26]SOD 及血管内皮中具有抗氧化应激活性^[27]的 NO 水平,从而改善 VD 小鼠脑内海马组织的氧化应激水平,进而减少神经元凋亡,改善试验动物的认知功能。另外,本研究还初步探索了鼻腔给药 NMFGF1-NPs 入脑发挥抗氧化应激作用的分子机制。已有多

项动物实验证实激活 Nrf2 信号通路能够保护缺血再灌注引起的脑损伤^[28-29]。当细胞处于氧化应激条件下时,Nrf2 从细胞质转移进入细胞核与 AREs 结合从而促进 HO-1、SOD、GST 及 NQO1 等抗氧化酶基因的转录^[30-31]。Western blotting 结果显示,鼻腔给药 NMFGF1-NPs 组小鼠海马区域 Nrf2、SOD-1 及 GSTO1 表达较 VD 模型组显著升高,说明鼻腔给药 NMFGF1-NPs 能够可能通过激活 Nrf2/ARE 信号通路从而发挥抗氧化应激损伤作用。

综上所述,本研究应用水包水型乳化技术制备了高包封率且适合鼻腔给药的 NMFGF1-NPs,结合鼻腔给药技术能够实现将生物大分子药物 NMFGF1 递送入脑,从而通过激活 Nrf2/ARE 信号通路,发挥抗氧化应激损伤的作用,最终改善 VD 小鼠的学习及认知功能。

REFERENCES

- [1] PRICE R S. Exploring what progress is being made in the development of health promotion material for vascular dementia: A systematic review of the evidence[J]. *Aging Med*, 2023, 6(2): 184-194.
- [2] BHATIA P, SINGH N. Thromboxane A2 synthase inhibition ameliorates endothelial dysfunction, memory deficits, oxidative stress and neuroinflammation in rat model of streptozotocin diabetes induced dementia[J]. *Physiol Behav*, 2021(241): 113592.
- [3] DU S Q, WANG X R, ZHU W, et al. Acupuncture inhibits TXNIP-associated oxidative stress and inflammation to attenuate cognitive impairment in vascular dementia rats[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2018, 24(1): 39-46.
- [4] DORDOE C, CHEN K Y, HUANG W T, et al. Roles of fibroblast growth factors and their therapeutic potential in treatment of ischemic stroke[J]. *Front Pharmacol*, 2021(12): 671131.
- [5] LOU G F, ZHANG Q H, XIAO F, et al. Intranasal TAT-haFGF improves cognition and amyloid- β pathology in an A β PP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease[J]. *J Alzheimers Dis*, 2016, 51(4): 985-990.
- [6] HUANG W T, QIU W H, CHEN K, et al. Research progress of fibroblast growth factor in nervous system diseases[J]. *J Zhejiang Univ Med Sci*, 2022, 51(6): 738-749.
- [7] TSAI M J, TSAI S K, HUANG M C, et al. Acidic FGF promotes neurite outgrowth of cortical neurons and improves neuroprotective effect in a cerebral ischemic rat model[J]. *Neuroscience*, 2015(305): 238-247.
- [8] CAO Q, MEUG T, MAN J, et al. aFGF promotes neurite growth by regulating GSK3 β -CRMP2 signaling pathway in cortical neurons damaged by amyloid- β [J]. *J Alzheimers Dis*, 2019, 72(1):97-109.
- [9] ZOU Y C, HU J, HUANG W T, et al. Non-mitogenic fibroblast growth factor 1 enhanced angiogenesis following

- ischemic stroke by regulating the sphingosine-1-phosphate 1 pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2020(11): 59.
- [10] MIURA T, KAWANO M, TAKAHASHI K, et al. High-sulfated hyaluronic acid ameliorates radiation-induced intestinal damage without blood anticoagulation[J]. *Adv Radiat Oncol*, 2022, 7(3): 100900.
- [11] ZHAO Y Z, ZHANG M, WONG H L, et al. Prevent diabetic cardiomyopathy in diabetic rats by combined therapy of aFGF-loaded nanoparticles and ultrasound-targeted microbubble destruction technique[J]. *J Control Release*, 2016(223): 11-21.
- [12] 张明, 马卫成, 曹伟娟, 等. 虾青素提高血管性痴呆小鼠学习记忆能力[J]. *解剖学报*, 2022, 53(1): 5-10.
- [13] ZHAO Y Z, LIN M, LIN Q, et al. Intranasal delivery of bFGF with nanoliposomes enhances *in vivo* neuroprotection and neural injury recovery in a rodent stroke model[J]. *J Control Release*, 2016(224): 165-175.
- [14] SHI R, ZHENG C B, WANG H Y, et al. Gastrodin alleviates vascular dementia in a 2-VO-vascular dementia rat model by altering amyloid and tau levels[J]. *Pharmacology*, 2020, 105(7/8): 386-396.
- [15] MARCELLO E, CHIONO V. Biomaterials-enhanced intranasal delivery of drugs as a direct route for brain targeting[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(4): 3390.
- [16] BOYUKLIEVA R, HRISTOZOVA A, PILICHEVA B. Synthesis and characterization of PCL-idebenone nanoparticles for potential nose-to-brain delivery[J]. *Biomedicines*, 2023, 11(5): 1491.
- [17] ULUSOY S, BAYAR MULUK N, KARPISCHENKO S, et al. Mechanisms and solutions for nasal drug delivery - a narrative review[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2022, 26(2 Suppl): 72-81.
- [18] SALATIN S, BARAR J, BARZEGAR-JALALI M, et al. Hydrogel nanoparticles and nanocomposites for nasal drug/vaccine delivery[J]. *Arch Pharm Res*, 2016, 39(9): 1181-1192.
- [19] ALTAMMAR K A. A review on nanoparticles: Characteristics, synthesis, applications, and challenges[J]. *Front Microbiol*, 2023(14): 1155622.
- [20] SALATIN S, JELVEHGARI M, MALEKI-DIZAJ S, et al. A sight on protein-based nanoparticles as drug/gene delivery systems[J]. *Ther Deliv*, 2015, 6(8): 1017-1029.
- [21] XUE Y, QU Z Z, FU J, et al. The protective effect of astaxanthin on learning and memory deficits and oxidative stress in a mouse model of repeated cerebral ischemia/reperfusion[J]. *Brain Res Bull*, 2017(131): 221-228.
- [22] MOSCOVITCH M, CABEZA R, WINOCUR G, et al. Episodic memory and beyond: The hippocampus and neocortex in transformation[J]. *Annu Rev Psychol*, 2016(67): 105-134.
- [23] BARTSCH T, DÖHRING J, ROHR A, et al. CA1 neurons in the human hippocampus are critical for autobiographical memory, mental time travel, and autonoetic consciousness[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(42): 17562-17567.
- [24] QIU Y, XUE X J, LIU G, et al. Perillaldehyde improves cognitive function *in vivo* and *in vitro* by inhibiting neuronal damage via blocking TRPM2/NMDAR pathway[J]. *Chin Med*, 2021, 16(1): 136.
- [25] LEE J M, LEE J H, SONG M K, et al. NXP031 improves cognitive impairment in a chronic cerebral hypoperfusion-induced vascular dementia rat model through Nrf2 signaling[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(12): 6285.
- [26] ZHANG Y Q, LI Y W, WANG Y X, et al. Effects of resveratrol on learning and memory in rats with vascular dementia[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20(5): 4587-4593.
- [27] XUAN C, LUN L M, ZHAO J X, et al. L-citrulline for protection of endothelial function from ADMA-induced injury in porcine coronary artery[J]. *Sci Rep*, 2015(5): 10987.
- [28] ZHANG R R, XU M X, WANG Y, et al. Nrf2-a promising therapeutic target for defending against oxidative stress in stroke[J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(8): 6006-6017.
- [29] MINJ E, UPADHAYAY S, MEHAN S. Nrf2/HO-1 signaling activator acetyl-11-keto-beta boswellic acid(AKBA)-mediated neuroprotection in methyl mercury-induced experimental model of ALS[J]. *Neurochem Res*, 2021, 46(11): 2867-2884.
- [30] NGO V, KARUNATILLEKE N C, BRICKENDEN A, et al. Oxidative stress-induced misfolding and inclusion formation of Nrf2 and Keap1[J]. *Antioxidants*, 2022, 11(2): 243.
- [31] ALEKHYA SITA G J, GOWTHAMI M, SRIKANTH G, et al. Protective role of luteolin against bisphenol A-induced renal toxicity through suppressing oxidative stress, inflammation, and upregulating Nrf2/ARE/HO-1 pathway[J]. *IUBMB Life*, 2019, 71(7): 1041-1047.

收稿日期: 2023-04-13

(本文责编: 陈怡心)