

川芎嗪 PEG-PE 纳米胶束的体外评价、细胞摄取及抗心肌细胞凋亡研究

李晶, 刘访遥, 陈剑超* (南华大学附属第二医院, 湖南 衡阳 421001)

摘要: 目的 制备川芎嗪 PEG-PE 纳米胶束, 并评价该纳米胶束的细胞摄取和抗心肌细胞凋亡效果。方法 采用薄膜水化法制备川芎嗪 PEG-PE 纳米胶束, 并进行表征。采用体外释药、细胞摄取和细胞凋亡试验对该载药系统进行评价。结果 川芎嗪 PEG-PE 纳米胶束粒径为(15.8±0.9)nm, Zeta 电势为-(20.5±0.4)mV, 载药量为(5.7±0.3)%, 包封率为(87.2±5.4)%。电镜结果表明川芎嗪 PEG-PE 纳米胶束呈形态规则的圆球型结构; 采用芘测定法测定 PEG-PE 纳米胶束的临界胶束浓度约为 5.3 μg·mL⁻¹; 细胞摄取试验结果表明, PEG-PE 纳米胶束可以增强药物的细胞摄取量, 细胞外残留量减少; 川芎嗪 PEG-PE 纳米胶束在 10%胎牛血清 DMEM 培养基稳定性良好, 采用异丙肾上腺素诱导心肌细胞凋亡, Hoechst 染色提示凋亡心肌细胞出现了大量形态学改变, 而川芎嗪 PEG-PE 纳米胶束可以明显减少凋亡细胞和促凋亡 Caspase-3 活性、抑制促凋亡蛋白 Bax 表达, 提高抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达, 均显著优于川芎嗪($P<0.01$)。结论 川芎嗪 PEG-PE 纳米胶束具有粒径小, 载药量高, 释药缓慢等优势, 可很大程度上提高川芎嗪的心肌细胞摄取量, 增强药物的抗心肌细胞凋亡作用。

关键词: PEG-PE 纳米胶束; 川芎嗪; 细胞摄取; 细胞凋亡

中图分类号: R944.9

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2019)14-1743-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.14.004

引用本文: 李晶, 刘访遥, 陈剑超. 川芎嗪 PEG-PE 纳米胶束的体外评价、细胞摄取及抗心肌细胞凋亡研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(14): 1743-1748.

In Vitro Assessment, Cellular Uptake and Anti-cardiomyocyte Apoptosis of Tetramethylpyrazine PEG-PE Micelles

LI Jing, LIU Fangyao, CHEN Jianchao* (*The Second Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To prepare tetramethylpyrazine PEG-PE(TMP-PEG-PE) micelles, and to evaluate the cellular uptake and anti-cardiomyocyte apoptosis of the nanomicelle. **METHODS** TMP-PEG-PE micelles were prepared by thin film hydration method and characterized. The drug delivery system was evaluated by *in vitro* release, cell uptake and apoptosis assays. **RESULTS** The particle size of TMP-PEG-PE micelles was (15.8±0.9)nm, the Zeta potential was -(20.5±0.4)mV, the drug loading was (5.7±0.3)% and the encapsulation efficiency was (87.2±5.4)%. The results of electron microscopy showed that the TMP-PEG-PE micelles were in the shape of a regular spherical structure. The critical micelle concentration of PEG-PE micelles was determined by Pyrene assay to be about 5.3 μg·mL⁻¹. The results of cell uptake assay showed that PEG-PE nanomicelles could enhance the cellular uptake of the drug and reduce the extracellular residual amount. TMP-PEG-PE micelles had good stability in 10% fetal bovine serum DMEM medium. Isoproterenol was used to induce myocardial apoptosis, Hoechst staining indicated that there were a lot of morphological changes in apoptotic cardiomyocytes. TMP-PEG-PE micelles could significantly reduce the pro-apoptotic caspase-3 activity, inhibit the expression of the pro-apoptotic protein Bax, and increase the expression of anti-apoptotic protein Bcl-2, which were significantly better than the test results of TMP($P<0.01$). **CONCLUSION** TMP-PEG-PE micelles have the advantages of small particle size, high drug loading and slow drug release, which can greatly improve the myocardial cell uptake of TMP and enhance its anti-cardiomyocyte apoptosis effect.

KEYWORDS: PEG-PE micelles; tetramethylpyrazine; cellular uptake; cell apoptosis

急性心肌梗死是常见的可导致患者猝死的急危重症^[1], 恢复冠脉血流是目前临床上挽救急性心梗患者的常用治疗方法, 但随之引起的心肌缺血/再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤, 有可能会继续增大心肌梗死面积^[2]。心肌细胞凋亡是心肌

I/R 损伤的重要病理机制。目前已有大量文献报道, 川芎嗪可以抑制缺血再灌注损伤所致心律失常、缩短心律失常持续时间、降低室颤和室速的发生率^[3]。如吕磊等^[4]发现川芎嗪预处理明显降低心肌细胞凋亡指数及 caspase-3 活性、降低 Bax mRNA

基金项目: 湖南省卫计委项目(C201800141)

作者简介: 李晶, 女, 硕士, 主治医师 Tel: 13786496794
E-mail: chenjianchao@126.com

E-mail: 979108997@qq.com

*通信作者: 陈剑超, 男, 副主任医师

Tel:

的表达水平,增加 Bcl-2 mRNA 和磷酸化 Akt 的表达水平。Zheng 等^[5]研究发现,川芎嗪对心肌梗死的可能机制是抗氧化、抗炎、抗凋亡活性和改善冠状动脉血流、心肌代谢。而川芎嗪存在水难溶性、体内存留时间短,细胞摄取量少等系列问题^[6],故需构建一种载药系统增强药物的水溶性,提高心肌细胞摄取能力,便于该药物进入缺血心肌细胞,发挥抗凋亡的药理作用,从而减少心肌 I/R 损伤。

聚乙二醇衍生化磷脂酰乙醇胺(polyethylene glycol derivatives phosphatidyl ethanolamine, PEG-PE)是由亲水(PEG)-亲脂(PE)两部分组合的双亲性高分子聚合物,溶于水后自发组装成纳米胶束。它具有良好的生物相容性和安全性,不仅可以提高药物的水溶性,还能增强药物的跨膜转运能力^[7-8]。基于该 PEG-PE 材料优良的生物学特性,本研究采用 PEG-PE 高分子材料包载川芎嗪,制备川芎嗪 PEG-PE 纳米胶束,通过考察川芎嗪 PEG-PE 纳米胶束的细胞摄取、抗心肌细胞凋亡等试验,对该载药系统进行评价。

1 材料

1.1 药品与试剂

川芎嗪原料药(青岛捷世康生物科技有限公司,批号:20171123;纯度 $\geq 98\%$);PEG-PE(MW=2 000 Da,西安瑞禧生物科技有限公司,批号:20180926;纯度 $\geq 95\%$);1,1'-双十八烷基-3,3,3',3'-四甲基吡咯二碳菁高氯酸盐(1,1-dioctadecyl-3,3,3,3-tetramethylindodicarbocyanine, DID,百灵威科技有限公司,批号:20170513;纯度 $\geq 98\%$);异丙肾上腺素(isoprenaline, ISO,武汉贝尔卡生物医药有限公司,批号:20180424;纯度 $\geq 98\%$);H9c2 心肌细胞(上海歌凡生物科技有限公司);Gibco RPMI1640 培养基(上海浩然生物科技有限公司,批号:20180622);10099-141 胎牛血清(上海恒远生物科技有限公司,批号:20180416);Hoechst 33342 染色液(北京索莱宝科技有限公司,批号:20180325);抗体 Bcl-2(批号:ab692)、Bax(批号:ab32503)、GAPDH(批号:ab9484)均购自 Abcam。

1.2 仪器

JEM-2100 Plus 透射电子显微镜(日本电子株式会社);Zetasizer Nano ZS90 纳米胶束电势仪(英国马尔文公司);FA1604B 电子分析天平(上海精

密仪器仪表有限公司);GL-21M 高速冷冻离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司);DFM-60D 倒置荧光显微镜(上海光学仪器厂)。

2 方法

2.1 川芎嗪 PEG-PE 纳米胶束的制备

精密称取 PEG-PE 60 mg、川芎嗪 10 mg,加入色谱甲醇 50 mL 使其完全溶解,置于旋转蒸发仪上的梨型瓶中,抽真空,将水温维持在 40 °C 左右,旋转梨型瓶,形成一层均匀干燥的薄膜,再将梨型瓶用锡箔纸包裹避光,于冰水浴中真空干燥 10 h 尽量祛除残留的有机溶剂,以移液枪吸取适量的 PBS 缓冲液置于梨型瓶中,促使纳米胶束薄膜水化,再于 40 °C 水浴条件下轻微振荡梨型瓶,水化时间约 0.5 h,再用移液枪转移至洁净棕色西林瓶中,室温下超声约 10 min,促使纳米粒子分散均匀,以洁净的注射器吸取纳米胶束,再以 0.22 μm 微孔滤膜过滤,除去胶束溶液中的沉淀物,最后冷冻干燥 48 h,即可获得川芎嗪 PEG-PE 纳米胶束。

2.2 粒径、Zeta 电位及电镜分析

吸取少量川芎嗪 PEG-PE 纳米胶束溶液,以 PBS 稀释至一定的浓度,采用纳米胶束粒径仪测定粒径和 Zeta 电势分布;采用移液枪吸取少量川芎嗪 PEG-PE 纳米胶束滴加至 200 目铜网上,以滤纸吸干铜网上残留溶液,低温烘干,促使纳米胶束附着在铜网上,以透射电子显微镜观察纳米胶束的形态。

2.3 包封率及载药量

将以上制备好的川芎嗪 PEG-PE 纳米胶束溶液置于超滤离心管中(截取分子量 3 000 Da),再以 10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 高速低温离心 5 min,超滤离心管内截取的为载药纳米胶束,加入数倍量的甲醇促使川芎嗪从胶束中释放,采用 HPLC 检测超滤离心管内截获纳米胶束中包封的药物浓度 $C_{\text{内}}$,采用药物浓度 $C_{\text{内}}$ 乘以相应的体积,即可获得包封的药物 $M_{\text{包}}$,离心管外为纳米胶束未包裹的游离川芎嗪,采用同样的方法即可测定含量即为 $C_{\text{外}}$,即可计算纳米胶束的包封率(EE%);另外将离心管内的纳米胶束溶液进行冷冻干燥,称重量即为 $M_{\text{总重}}$,即可计算载药量(DL%)。

$$EE\% = C_{\text{内}} \div (C_{\text{外}} + C_{\text{内}}) \times 100\%$$

$$DL\% = M_{\text{包}} \div M_{\text{总重}} \times 100\%$$

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

将冷冻干燥后的 PEG-PE 纳米胶束,采用适量的 PBS(pH=7.4)溶解,制备成 $1\sim 10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 系列浓度 PEG-PE 纳米胶束溶液,再与芫混合,室温搅拌 6 h,采用荧光光度仪检测 PEG-PE 纳米胶束各浓度下芫的发射光谱 I_{373} 和 I_{394} ,以 I_{394}/I_{373} 比值为纵坐标,纳米胶束浓度为横坐标,进行作图,在拐点处(成胶束状态)可获得纳米胶束的 CMC^[9]。

2.5 体外释放

将川芎嗪(0.5 mg)和载川芎嗪 PEG-PE 纳米胶束(含 0.5 mg 川芎嗪)装入美国 Spectrumlabs 透析袋(截取分子量 3 000 Da)中,透析袋两端采用夹子密封,再将其置于 200 mL PBS(pH=7.4)缓冲溶液中,设定水浴温度为 37 °C。在设定的时间点 1, 2, 4, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 36, 48, 60, 72, 84 h 取样,取样体积为 0.5 mL,进行含量测定,并补充等体积的 PBS,计算 PEG-PE 纳米胶束体外释放率。

2.6 H9c2 心肌细胞摄取

2.6.1 荧光试验 DID 为常用的荧光标记亲脂性显色剂,按“2.1”项下方法制备纳米胶束,采用 PEG-PE 纳米胶束包裹于亲脂性内核中,即可获得载 DID-PEG-PE 纳米胶束,将 H9c2 心肌细胞接种到 12 孔培养板中每孔 10^5 个细胞并培养 24 h。然后将 DID 或者 DID-PEG-PE 纳米胶束($100\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)与 H9c2 心肌细胞共同孵育,温育 2, 4, 6 h 后,用 PBS(pH=7.4)洗涤细胞 3 次消除细胞外残留的 DID,采用荧光显微镜观察细胞内 DID 的强度。

2.6.2 细胞外药物残留量 将 H9c2 心肌细胞接种到 12 孔培养板中每孔 10^5 个细胞并培养 24 h,然后将川芎嗪和载川芎嗪 PEG-PE 纳米胶束(等浓度: $20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)与 H9c2 心肌细胞共同孵育,并于温育 2, 4, 6 h 后,吸取 100 μL 培养基,12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 高速离心 10 min,取上清液进行含量测定。

2.7 在 10%胎牛血清 DMEM 中的稳定性

取适量体积的载川芎嗪 PEG-PE 纳米胶束溶液与 10%胎牛血清 DMEM 培养基中混匀,设定温度为 4 °C,分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 取样,采用 0.22 μm 微孔滤膜过滤出去培养基,再检测纳米胶束的粒径。

2.8 细胞处理及分组

将 H9c2 心肌细胞于含 10%胎牛血清的

DMEM 中培养,再随机分为 4 组。正常组:含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液;模型组:含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液加入 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作用 24 h;川芎嗪组:于培养基中加入 $20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 川芎嗪预处理 0.5 h,再加入 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作用 24 h;川芎嗪 PEG-PE 组:于培养基中加入 $20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 川芎嗪 PEG-PE 纳米胶束预处理 0.5 h,再加入 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作用 24 h。

2.9 细胞凋亡

2.9.1 Hoechst 染色 H9c2 心肌细胞前期处理同“2.8”项下,采用川芎嗪和载川芎嗪 PEG-PE 纳米胶束(等浓度: $20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)与 H9c2 心肌细胞共同孵育 0.5 h 后,再采用 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作用 24 h 诱导细胞凋亡制作病理模型,然后采用 4%甲醛溶液固定细胞,再以 PBS 洗涤 3 次,参照试剂盒说明书,采用 Hoechst 33342 对细胞核进行染色,呈现蓝色,置荧光显微镜下观察凋亡细胞的形态,染色质分布均匀,细胞核形态规则认为是正常细胞,核呈皱缩、碎裂的且明亮蓝色细胞认为是凋亡细胞。

2.9.2 Caspase-3 活性 H9c2 心肌细胞前期处理同“2.8”项下,采用川芎嗪和载川芎嗪 PEG-PE 纳米胶束(等浓度: $20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)与 H9c2 心肌细胞共同孵育 0.5 h 后,再采用 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作用 24 h 诱导细胞凋亡,将 100 μL caspase-3 试剂加入其中,在 37 °C 避光孵育 1 h,以添加 PBS 设为空白组,采用酶标仪测定于 405 nm 处测定各组吸光度(A)值,样品组 A 值减去空白组的 A 值,即为各组样品的 A 值。

2.9.3 Western blot 测定 Bax、Bcl-2 蛋白表达 采用 Western blot 检测凋亡相关蛋白的表达,H9c2 心肌细胞前期处理同“2.8”项下,采用川芎嗪和载川芎嗪 PEG-PE 纳米胶束(等浓度: $20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)与 H9c2 心肌细胞共同孵育 0.5 h 后,再采用 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作用 24 h 诱导细胞凋亡,总细胞蛋白质是用一定量的 RIPA 裂解缓冲液含有 1%蛋白酶抑制剂混合物和 1%苯基-甲磺酰氟。等量的蛋白质分离采用 10%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳并转移到聚偏二氟乙烯膜,加入相应的抗体有 Bcl-2、Bax、GAPDH(1 : 1 000),后续相应处理后,再加入相应的二抗(1 : 2 000)反应 1 h,用 ECL 检测液发光显影定影后,用 Image J 软件进行灰度分析。

3 结果

3.1 纳米胶束表征、载药量及包封率

川芎嗪 PEG-PE 纳米胶束大小为 $(15.8 \pm 0.9) \text{ nm}$, Zeta 电势为 $(-20.5 \pm 0.4) \text{ mV}$, 两者都呈良好的正态分布, 表明纳米胶束制备良好。电镜显示川芎嗪 PEG-PE 纳米胶束呈现规则的圆球形, 粒径基本比较均一。经含量检测, 川芎嗪 PEG-PE 纳米胶束的载药量为 $(5.7 \pm 0.3) \%$, 包封率为 $(87.2 \pm 5.4) \%$, 进一步说明纳米胶束包载川芎嗪良好。结果见图 1。

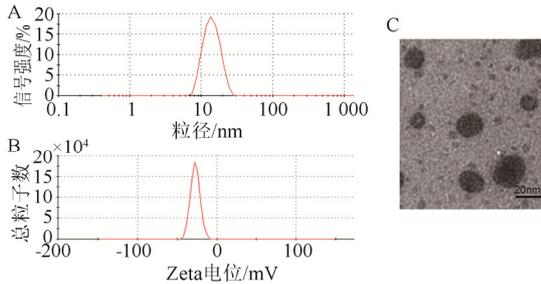


图 1 川芎嗪 PEG-PE 纳米胶束的粒径(A)、Zeta 电位(B)和透射电镜(C)

Fig. 1 Distribution of particle size(A), Zeta potential(B) and Tyndall phenomenon(C) electron microscope image of tetramethylpyrazine PEG-PE micelles

3.2 CMC 的测定

芫为亲脂性芳香苯环内成分, 故可以采用 PEG-PE 纳米胶束包裹于 PE 内核中, 由图 2 曲线的结果分析可知, 胶束内核中的芫含量随着 PEG-PE 纳米胶束质量浓度增大, 由此说明芫由游离态逐渐转变到纳米胶束的内核中, 拐点处恰好可作为 PEG-PE 纳米胶束的 CMC, 约为 $5.3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

3.3 体外释放

由图 3 累计释放曲线可知, 川芎嗪和川芎嗪 PEG-PE 纳米胶束在最初的 24 h 内均呈快速释放状态, 其中川芎嗪 PEG-PE 纳米胶束累计释放速率明显慢于川芎嗪, 最终 84 h 内累计释放量为 68.4%, 而川芎嗪在该时间段累计释放量可达 93.5%。可能的原因是 PEG-PE 纳米胶束将川芎嗪紧密包裹于胶束 PE 内核, 故释放相对于川芎嗪而言比较缓慢。

3.4 心肌细胞摄取

DID-PEG-PE 纳米胶束组大部分聚集在细胞核周围, 且随着时间的延长, 荧光强度明显增大, 而 DID 组进入细胞内浓度相对很少; 川芎嗪

PEG-PE 纳米胶束组细胞外存留的药物浓度, 明显小于川芎嗪组, 存在显著性差异 ($P < 0.01$), 结果见图 4。由此推测, 进入细胞内的药物浓度理应增多, 这 2 组试验结果显示, PEG-PE 纳米胶束可以促进药物的细胞摄取, 提高细胞内的药物浓度。

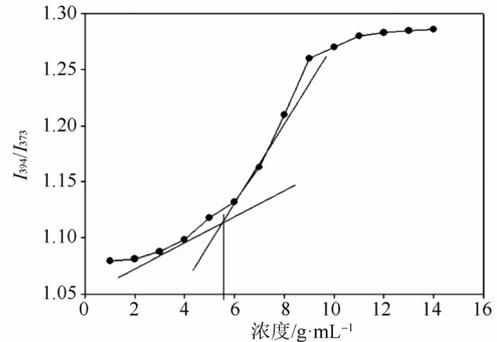


图 2 PEG-PE 纳米胶束的临界胶束浓度

Fig. 2 Critical micelle concentration of PEG-PE micelles

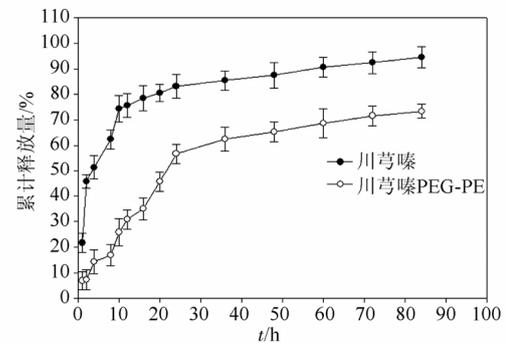


图 3 川芎嗪与川芎嗪 PEG-PE 体外释放曲线

Fig. 3 *In vitro* release profile of tetramethylpyrazine and tetramethylpyrazine PEG-PE micelles

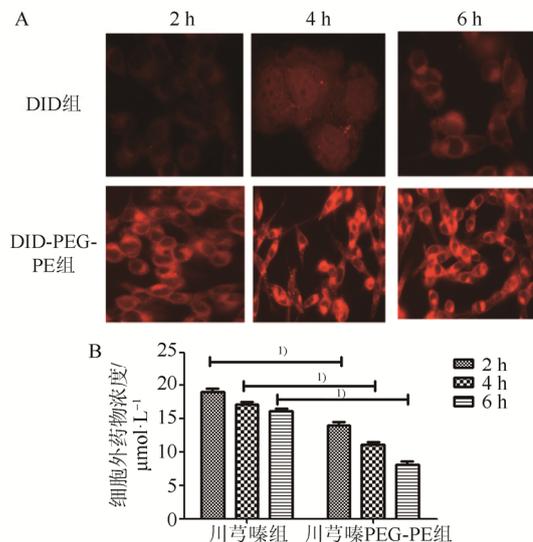


图 4 心肌细胞摄取对比研究

A-荧光试验; B-细胞外川芎嗪浓度; 与川芎嗪组比较, $^{1)}P < 0.01$ 。

Fig. 4 Comparative study on myocardial cell uptake

A-fluorescence test; B-extracellular ligustrazine concentration; compared with tetramethylpyrazine group, $^{1)}P < 0.01$.

3.5 纳米胶束在 10%胎牛血清 DMEM 中的稳定性

川芎嗪 PEG-PE 纳米胶束在 10%胎牛血清 DMEM 培养基中, 24 h 内粒径变化不明显, 与最初纳米胶束的大小差不多, 由此表明, 川芎嗪 PEG-PE 纳米胶束在 10%胎牛血清 DMEM 培养基中的稳定性良好。结果见图 5。

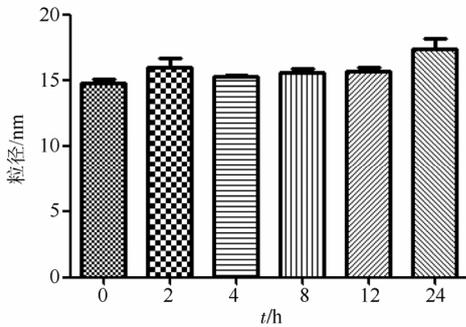


图 5 川芎嗪 PEG-PE 纳米胶束在 10%胎牛血清 DMEM 培养基中的稳定性

Fig. 5 Stability of tetramethylpyrazine-PEG-PE micelles in the presence of 10% fetal bovine serum

3.6 心肌细胞凋亡

采用 ISO 诱导心肌细胞凋亡, Hoechst 染色细胞核后出现了细胞形态明显的暗淡、皱缩; 而川芎嗪和川芎嗪 PEG-PE 纳米胶束组的凋亡细胞明显小于模型组, 其中川芎嗪 PEG-PE 纳米胶束组的抗凋亡效果又明显优于川芎嗪, 细胞凋亡相关的 caspase-3 活性也明显低于川芎嗪 ($P < 0.01$), 另外, 川芎嗪 PEG-PE 纳米胶束组的抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达量显著高于川芎嗪, 促凋亡蛋白 Bax 表达量明显低于川芎嗪。结果见图 6。以上结果表明, 川芎嗪 PEG-PE 纳米胶束组对 ISO 诱导心肌细胞凋亡具有很好的抗凋亡作用, 明显优于川芎嗪 ($P < 0.01$)。

4 讨论

PEG-PE 聚合物是有亲水的 PEG 与亲脂的 PE 链节组合的双亲嵌段共聚物, 溶于水后, 可自组装成纳米胶束, 其中亲脂端 PE 可以聚合成团状, 根据相似相溶的原理, 亲脂性的成分可包埋于聚焦成团状的 PE 中; 外周为亲水端的 PEG 在水溶液中自由舒展, 具有良好的水溶性和生物相容性, 且无免疫原性, 故可逃逸体内肝脾网状内皮系统的清除, 从而延长药物在体内的作用时间。故 PEG-PE 纳米胶束常用来装载水难溶性活性成分,

且可以很大程度上改善这些成分的体内代谢过程。另外, PEG-PE 纳米胶束的 CMC 很低 ($0.1 \sim 100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 形成的胶束稳定, 粒径一般 $< 50 \text{ nm}$, 不仅能通过网格蛋白和小窝蛋白的介导跨越细胞膜, 还可以诱导细胞形成临时性的孔道, 便于载药 PEG-PE 纳米胶束进入细胞^[8-9]; 另外, 纳米粒径远 $< 150 \text{ nm}$, 不易被体内肝脾网状内皮系统清除, 有利于将大部分药物转运到作用部位^[10]。纳米胶束外周包被的 PEG 高分子本身无免疫原性, 可以逃避细胞内容酶体和内涵体对药物的影响^[11]。基于以上文献报道, PEG-PE 纳米胶束可以

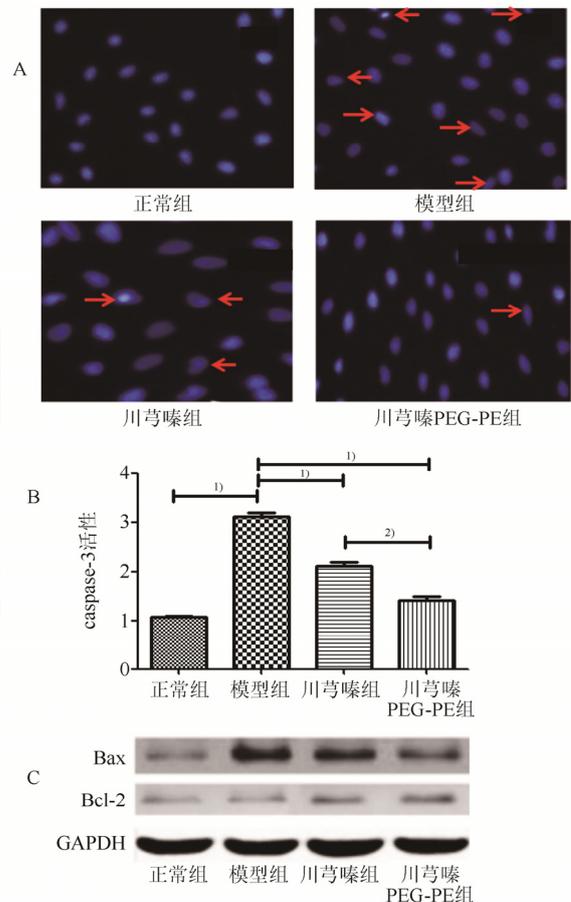


图 6 川芎嗪和川芎嗪 PEG-PE 纳米胶束抗 H9c2 心肌细胞凋亡的大小比较

A-Hoechst 染色; B-caspase-3 活性; C-凋亡蛋白的表达; 与模型组比较, ¹⁾ $P < 0.01$; 与川芎嗪组比较, ²⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 6 Comparison of anti-apoptosis of tetramethylpyrazine and tetramethylpyrazine-PEG-PE nano-micelles in H9c2 myocardial Cells

A-Hoechst staining; B-caspase-3 activity; C-expression of apoptotic proteins; compared with model group, ¹⁾ $P < 0.01$; compared with tetramethylpyrazine group, ²⁾ $P < 0.01$ 。

克服药物到达细胞内效应靶点的主要屏障，如肝脾清除、细胞膜阻挡和溶酶体降解等，从而有助于提高细胞内的有效药物浓度，从细胞水平更好地发挥药物疗效。

本研究采用 PEG-PE 纳米胶束承载川芎嗪，胶束大小为 $(15.8 \pm 0.9) \text{ nm}$ ，Zeta 电势为 $-(20.5 \pm 0.4) \text{ mV}$ ，两者都呈良好的正态分布；该纳米胶束粒径较小，且带较强的负电势，体内血液中的血浆蛋白恰好也呈负电势，故在血液循环过程中，由于负电荷的相互排斥，可以很大程度上减少血浆蛋白的吸附。电镜结果显示，川芎嗪 PEG-PE 纳米胶束呈良好的圆球形结构，整体粒径也相对较小，直观清晰地展示了 PEG-PE 纳米胶束的微观形态；PEG-PE 的 CMC 约为 $5.3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，该浓度很低，故很容易自组装形成良好的纳米胶束。体外释放试验结果表明，川芎嗪 PEG-PE 纳米胶束释药比较缓慢，84 h 内累积释放 68.4%，如此通过缓释很大程度上可以延长药物的半衰期，有助于提高药物的生物利用度。细胞摄取试验结果发现，PEG-PE 纳米胶束有助于提高药物的跨膜转运能力，文献报道，PEG-PE 纳米胶束可以促使细胞转染 siRNA 能力提高 50 倍，这些能力的提高，可能与 PEG-PE 纳米胶束增加细胞膜流动性和渗透性，从而有助于药物跨膜转运，提高药物的细胞摄取量^[12-13]；细胞外存留药物量也充分证实了该结果，川芎嗪 PEG-PE 纳米胶束组细胞外的存留量显著低于川芎嗪组，可以推测大部分的药物被细胞摄取，进入细胞内参与代谢所致。心肌细胞凋亡试验结果显示，PEG-PE 纳米胶束可以显著增强川芎嗪抗凋亡作用，降低 caspase-3 活性、抑制促凋亡蛋白 Bax 的表达，提高抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达，推测可能的原因是 PEG-PE 纳米胶束可以增加川芎嗪在细胞内的摄取量，促使细胞内的药物浓度增多，从而有助于很大程度上增加药物的疗效。

综上所述，川芎嗪 PEG-PE 纳米胶束粒径相对较小，可以很大程度上增加川芎嗪的细胞摄取量和抗心肌细胞凋亡作用，能否在动物试验上增强抗缺血效果有待于进一步研究证实。

REFERENCES

- [1] ASARIA P, ELLIOTT P, DOUGLASS M, et al. Acute myocardial infarction hospital admissions and deaths in England: a national follow-back and follow-forward record-linkage study [J]. *Public Health*, 2017, 2(4): e191-e201.
- [2] GALAGUDZA M, KOROLEV D, POSTNOV V, et al. Passive targeting of ischemic-reperfused myocardium with adenosine-loaded silica nanoparticles [J]. *Int J Nanomedicine*, 2012(7): 1671-1678.
- [3] GU Y C, GUO W J, YU X L. Protective effect of tetramethylpyrazine postconditioning on ischemia-reperfusion injured myocardium in rats [J]. *Int J Cardiovasc Dis*(国际心血管病杂志), 2009, 36(5): 304-307.
- [4] LV L, ZHANG J, YIN Y G, et al. An investigation on the effects of ligustrazine in attenuating apoptosis of myocardial ischemia reperfusion injury in rats and its mechanism [J]. *Mil Med J Southeast China*(东南国防医药), 2016, 18(4): 361-364, 367.
- [5] ZHENG Q, HUANG Y Y, ZHU P C, et al. Ligustrazine exerts cardioprotection in animal models of myocardial ischemia/reperfusion injury: preclinical evidence and possible mechanisms [J]. *Front Pharmacol*, 2018(9): 729.
- [6] LIU X Y, LIU H, ZENG Z W, et al. Pharmacokinetics of ligustrazine ethosome patch in rats and anti-myocardial ischemia and anti-ischemic reperfusion injury effect [J]. *Int J Nanomed*, 2011(6): 1391-1398.
- [7] HUANG J G, LESHUK T, GU F X. Emerging nanomaterials for targeting subcellular organelles [J]. *Nano Today*, 2011, 6(5): 478-492.
- [8] WANG J, WANG Y G, LIANG W. Delivery of drugs to cell membranes by encapsulation in PEG-PE micelles [J]. *J Control Release*, 2012, 160(3): 637-651.
- [9] WU H, ZHU L, TORCHILIN V P. PH-sensitive poly(histidine)-PEG/DSPE-PEG co-polymer micelles for cytosolic drug delivery [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(4): 1213-1222.
- [10] QIAO H Z, LI J, WANG Y, et al. Synthesis and characterization of multi-functional linear-dendritic block copolymer for intracellular delivery of antitumor drugs [J]. *Int J Pharm*, 2013, 452(1/2): 363-373.
- [11] KARINAGA R, KOUMOTO K, MIZU M, et al. PEG-appended beta-(1->3)-D-glucan schizophyllan to deliver antisense-oligonucleotides with avoiding lysosomal degradation [J]. *Biomaterials*, 2005, 26(23): 4866-4873.
- [12] WANG J, WANG Y G, LIANG W. Delivery of drugs to cell membranes by encapsulation in PEG-PE micelles [J]. *J Control Release*, 2012, 160(3): 637-651.
- [13] MUSACCHIO T, VAZE O, D'SOUZA G, et al. Effective stabilization and delivery of siRNA: reversible siRNA-phospholipid conjugate in nanosized mixed polymeric micelles [J]. *Bioconjug Chem*, 2010, 21(8): 1530-1536.

收稿日期：2018-12-10

(本文责编：沈倩)