

尼莫地平纳米药载对于肺动脉高压干预的实验研究

田蓉 曹忙选

西安医学院 陕西西安 710021

摘要:目的: 研究尼莫地平纳米药物载体 (Nimodipine nanoparticles, NMD NPs) 对于肺动脉高压的治疗。方法: 以聚多巴胺 (Polydopamine, PDA) 通过自组装方式制备长循环的NMD NPs, 克服尼莫地平 (Nimodipine, NMD) 的低溶解性, 提高其生物利用度。结果: NMD NPs的舒张率与游离药无显著差异。结论: NMD NPs可有效提高尼莫地平生物利用度, 为肺动脉高压治疗新方法的研究提供了实验依据。

关键词: 抗动脉血管收缩; 纳米药物载体; 尼莫地平

一、研究背景

肺动脉高压^[1] (Pulmonary Hypertension PAH) 是一种恶性前进性疾病, 其病理特征是肺动脉肌性肥厚^[2]。目前, 即使进行干预, 1年死亡率也高达15%, 特发性PAH患者的3年生存率也不超过35%。近年来, 以动物模型为实验基础来研究PAH的病理表现, 但到目前为止仍未发现能有效治疗PAH的方法。因此, 新PAH疗法开发具有重要意义。

PAH形成的机制尚未完全探明, 研究表明^[3]它是多种因素刺激肺血管平滑肌细胞增殖, 最终导致肺动脉管壁增厚和管腔狭窄。NMD通过调节血管平滑肌肌球蛋白轻链的蛋白磷酸化, 抑制肺动脉平滑肌细胞增殖, 从而改善PAH患者的心肺功能。临床上已经广泛使用NMD来治疗PAH。然而, NMD的水溶性较差, 最为显著的缺点是需要频繁给药。所以需要通过新方法来提高其生物利用度。近年来, 随着纳米材料技术的不断发展, 以纳米颗粒包载药物对于疾病的治疗有很大的进展。纳米药物载体系统是通过将NMD进行包裹以提高其在水环境下的分散度, 改善其生物利用度, 并降低毒副作用。

聚多巴胺 (Polydopamine, PDA), 一种聚合物纳米材料, 在碱性条件下可以有效地自聚合形成纳米粒子。PDA未表现出细胞毒性, 表明其良好的生物相容性。PDA纳米颗粒在实验动物体外实验中未表现出明显异常。PDA是一种良好的药物载体材料, 形成的颗粒内部也可包载药物分子。PDA具有明显的PH敏感性, 在酸性条件下会缓慢溶解。这些特异性使得PDA成为包载NMD的理想材料。

2020年国家级大学生创新创业训练计划项目; 编号: S202011840019

作者简介: 田蓉, 女, 陕西西安人, 就读于西安医学院药学院, 专业: 药学

因此, 本文拟通过制备一种具有良好载药和递送性能的载体系统来提高PAH的治疗效果。本研究利用的NMD NPs通过血管内化作用来研究通过逐步降解PDA释放NMD, 实现长效缓解痉挛来证明实验安全性。为新体系开发和临床治疗奠定理论基础和实验价值。

二、研究方法

1. 材料

(1) 动物

雌性SD大鼠购自北京华阜康生物科技有限公司。动物实验饲养室按照常规标准进行消毒和清洁, 所有实验程序均经本院动物保护和伦理委员会批准。

(2) 药品和主要试剂

NMD NPs由本实验室合成。DMEM高糖培养基、胰蛋白酶、DMEM低糖培养基均购自hyclone公司, 胎牛血清 (FBS) 购于浙江天杭生物科技股份有限公司, DAPI试剂盒购于碧云天生物技术有限公司。

2. 方法

(1) 动脉血管体外培养模型的建立

取5只雌性SD大鼠, 按照体重麻醉处死。将已处死的大鼠固定在操作台上, 剪开其颈部, 分离器官颈总动脉, 剥离颈动脉鞘。向动脉段注入适量曲拉通, 注射完毕后需立即注入PSS防止内皮损伤过度, 将颈动脉剪成4-5mm的血管段。在37℃, 5%CO₂的条件下, 孵育24h后, 获得颈动脉内皮损伤血管模型, 摘取新鲜血管作为正常颈动脉血管组织。

(2) 尼莫地平纳米载体在血管内的递送

首先利用香豆素-6对NMD纳米载体进行标记, 用于药物在血管内递送的检测。取出孵育结束的内皮血管损伤模型, 作为去内皮组, 正常血管组织则作为阴性对照组。将血管DMT110P离体微血管压力直径测定系统上, 此系统可在体外模拟血流环境, 将含有香豆素-6的NMD NPs的培养基作为工作液, 将血管两端压力差设置为60mmHg, 持续循环0、1.5、3小时, 待结束后用OCT

胶包埋后进行冰冻切片,于倒置显微镜下观察。

(3) 抗血管收缩的体外效应

将内皮损伤血管模型挂于微血管张力测定仪的L探针上,连续调零,待基线稳定后,以0.5 mN为步进给予预张力,稳定5 min更换PSS溶液,再稳定10-15 min,重复操作直至预张力调至2.0 mN,换液平衡10min。加入KPSS液5ml检测血管活性,重复两遍。用PSS液冲洗三次,待基线稳定后加入相应样品。稳定30min后观察曲线走向。将实验模型分为四组进行对比,第一组作为空白对照,第二组加入10nmol/L的NMD NPs,第三组为10nmol/L游离NMD,第四组以新鲜的正常血管作为阴性对照。将药物同时加入通道内后平衡30min待基线稳定后加入PE。在实验中测得PE的工作液浓度梯度设为 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} 、 10^{-3} 、 10^{-2} mol/L并依次分别加入上述四组中,药物平衡1min后换下一浓度依次进行直至最高工作液浓度,观察血管张力的变化并记录。

三、结果

1. 动脉血管体外培养模型的建立

孵育结束后,取出动脉血管段,将所构建的内皮损伤血管模型挂于张力测定仪的探针上,通过 K^+ 刺激血管,每组血管都表现出了显著的收缩。第一组收缩率65.54%,第二组为67.88%,第三组为68.21%,第四组未去内皮,收缩率为55.34%。结果表明,每组血管都具有良好的活性,且去内皮组的收缩率明显高于未去内皮组,证明了体外模型建立成功。

2. 体外组织递送结果

阴性对照组荧光结果表明血管内皮层细胞的结构完整,且血管内壁平滑肌层荧光信号较低。该结果表明NMD NPs无法迅速穿过正常血管组织。荧光成像结果表明荧光标记的动脉段组信号随着灌流时间延长而增强,在加入荧光纳米载体后3h达到峰值。而血管壁内侧的平滑肌层的荧光信号逐渐增强,从成像结果中可以看出大部分区域的荧光强度都超过了弹力纤维的自发荧光。该结果表明NMD NPs可有效的进入受损的血管壁,并在其中大量积累。

3. 尼莫地平纳米载体药物对血管活性的影响

在构建的四组离体血管实验中检测出10nmol/LNMD NPs高剂量下的NMD与游离药浓度相同具有较强的抗收缩作用。在 K^+ 刺激后,血管收缩,且收缩幅度大于PE的激动幅度,可证明血管活性较强。在微血管通道张力仪所模拟的理想环境下,第一组未加入任何药物,在加入PE后引起血管痉挛,使得血管持续收缩。第四组为正常新鲜血管,加入PE后仅可引起可忽略的收缩,收缩效率小于第一组。第二组和第三组在加入NMD NPs后,血管张力在平衡过程中不断下降,舒张率分别为43.44%和41.77%,待加入的PE浓度达到 10^{-4} mol/L时,颈动脉血管

才显示出轻微地收缩趋势。结果表明NMD NPs更易进入受损的血管平滑肌细胞层,且对持续痉挛的血管有显著的保护作用。

四、讨论

PAH是一种恶性前进性疾病,其发病机制较为复杂,预后较差。临床上最初使用二氢吡啶 Ca^{2+} 通道阻滞剂治疗PAH虽有一定的进展,但该类药物水溶性较差,对全身各功能系统产生一定的不良影响。随着纳米科学技术的快速发展,纳米药物载体技术的研究逐渐成为临床治疗开发的首选方法。PDA作为纳米药物载体有着良好的生物相容性和包载性能,该方法在临床上具有广阔的研究前景。

目前针对于NMD NPs,若要广泛应用于临床治疗,需对其能否有效进入受损的血管内层细胞且能有效的释放药物进行实验检测。因此,本文通过制备NMD NPs对大鼠受损的颈总动脉进行实验研究来证明纳米药物载体对于痉挛的动脉血管表现出明显的抗收缩效果。实验结果表明,正常新鲜血管组织中血管内皮细胞结构完整。在内皮存在的情况下,纳米药物载体很难进入血管组织并进入血管壁深处。相反,内皮损伤组随着灌流时间的延长,血管内壁的荧光信号逐渐加强,且DAPI染色结果表明自发荧光弹力纤维与DAPI荧光信号无显著差异。这一实验结果证明了NMD NPs可在血管组织内进行积累并最终有效释放药物治疗痉挛。为了进一步证明纳米载体在体外抑制血管痉挛作用,设计并实施NMD NPs对血管活性影响结果。检测NMD NPs与游离的NMD对血管痉挛的影响。结果显示,与未去内皮组相比,NMD NPs更易进入受损的血管平滑肌细胞层,且其舒张效果与游离药组无显著差异,可在低浓度下起到舒张作用,并将药物有效的释放,对损伤血管起到了显著的保护作用,进而体现出良好的抗收缩效果。

综上所述,通过上述实验数据充分证实了以PDA包载NMD,有望克服其在临床上治疗的缺点。可进一步说明本文应用NMD NPs进行PAH的治疗相比较于其他传统的吸入式、注射给药治疗方式更为有效,可为进一步研究和开发新型PAH治疗方法奠定研究基础。

参考文献:

- [1]段雅静,成孟瑜.慢性阻塞性肺疾病合并肺动脉高压发病机制研究进展[J].临床肺科杂志,2021,26(05):776-780.
- [2]中国肺动脉高压诊断与治疗指南(2021版)[J].中华医学杂志,2021,101(01):11-51.
- [3]Archer SL, Weir EK, Wilkins MR. Basic science of pulmonary arterial hypertension for clinicians: new concepts and experimental therapies [J]. Circulation, 2010, 121(18):045-2066.