

三磷酸腺苷脂质体鼻用凝胶制备及其抗缺氧作用

欧歌¹, 马金秋^{2,3}, 朱林², 李瑞滕^{2,3}, 李欣^{1*}, 杜丽娜^{2,3*}

(1. 解放军总医院药学部, 北京 100853; 2. 军事科学院军事医学研究院, 北京 100850;
3. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355)

摘要: 制备三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 脂质体, 评价其对缺氧性脑损伤的治疗作用。采用离子对薄膜分散法制备 ATP 脂质体, 其最优处方: 三磷酸腺苷二钠、十六烷基三甲基溴化铵、大豆磷脂、胆固醇的质量比为 1:1.98:8:3, 此时 ATP 脂质体封装率为 $(81.50 \pm 0.82)\%$, 载药量为 $(6.79 \pm 0.07)\%$ 。通过体外释放实验与流变学测定分别考察 ATP 脂质体与空白凝胶的理化性质; 将 ATP 脂质体、ATP 水溶液分别加入甲基纤维素凝胶中, 以甲基纤维素凝胶为阴性对照, 进行小鼠鼻腔给药。动物实验获得军事医学研究院伦理委员会批准。连续给药 9 天后, 与空白凝胶或 ATP 水凝胶相比, ATP 脂质体水凝胶显著提高了血中红细胞与血红蛋白数值 ($P < 0.01$); 连续给药 13 天后, 在常压密闭缺氧实验中, 与 ATP 水凝胶或空白凝胶相比, ATP 脂质体鼻用凝胶能显著提高小鼠标准缺氧耐受时间 ($P < 0.05$)。小鼠海马促凋亡基因 p53 免疫组化染色显示, ATP 脂质体对脑组织有明显保护作用。结果表明, ATP 脂质体鼻用凝胶预防给药能明显提高小鼠耐缺氧能力, 是一种前景广阔的抗缺氧制剂。

关键词: 三磷酸腺苷; 脂质体; 鼻内给药; 水凝胶; 缺氧

中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)06-1288-08

Preparation of adenosine triphosphate liposome hydrogel and research of its anti-hypoxia effect

OU Ge¹, MA Jin-qiu^{2,3}, ZHU Lin², LI Rui-teng^{2,3}, LI Xin^{1*}, DU Li-na^{2,3*}

(1. Department of Pharmacy, General Hospital of the Chinese People's Liberation Army, Beijing 100853, China;
2. Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Beijing 100850, China; 3. College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

Abstract: The adenosine triphosphate (ATP) liposome, prepared with the methods of film dispersion and ion-pairing was evaluated for its therapeutic effect on hypoxic brain damage. The appropriate formulation is adenosine disodium triphosphate, hexadecyl trimethyl ammonium bromide, soybean phospholipid, cholesterol with mass ratio of 1:1.98:8:3. The encapsulation efficiency of ATP liposome was $(81.50 \pm 0.82)\%$ and the loading efficiency was $(6.79 \pm 0.07)\%$. *In vitro* release test and rheology test were conducted to investigate the physicochemical properties of ATP liposomes and empty gels respectively. The blank methylcellulose gel, followed with ATP liposome and ATP aqueous solution added to the methylcellulose gel, were used for nasal administration in mice respectively. All experiments were approved by the Ethics Committee for Experimental Research in Academy of Military Medical Sciences. After 9 days of continuous administration, ATP liposome hydrogel increased the values of red blood cells and hemoglobin ($P < 0.01$) compared to ATP hydrogel and blank gel. And the ATP liposome hydrogel significantly increased the standard hypoxia tolerance time in mice compared to ATP hydrogel and blank gel after 13 days of

收稿日期: 2019-10-12; 修回日期: 2019-11-15.

基金项目: 全军医药卫生“十二五”面上项目 (CWS11J303).

*通讯作者 Tel: 86-10-66937436, E-mail: doublelixin@126.com;

Tel: 86-10-66930216, E-mail: dulina@188.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0808

nasal administration ($P<0.05$). The immunohistochemical staining of mice hippocampus for the proapoptotic gene p53 showed that ATP liposome hydrogel was capable of protecting brain tissue in hypoxia. It is indicated that the prophylactic administration of ATP liposome nasal gel can significantly improve the hypoxia tolerance of mice, and the ATP liposome nasal gel was proved to be a promising anti-hypoxia preparation.

Key words: adenosine triphosphate; liposome; intranasal administration; hydrogel; hypoxia

高原低氧易导致以中枢神经系统反应为主的急性高原反应 (acute mountain sickness, AMS), 表现为头晕、头痛和恶心呕吐等症状, 更有可能进展为以躯干共济失调和意识模糊为主的高海拔脑水肿 (high-altitude cerebral oedema, HACE), 限制了人们在高原环境下的生活与工作^[1]。因此, 探索预防低氧环境对中枢系统带来不良反应的研究大有裨益。目前非药物性预防方法包括阶梯习服^[2]、低氧预适应和适应性运动锻炼^[3]; 通过增强机体对缺氧的耐受性, 降低高原反应的发生率。但非药物性预防方法训练周期长, 且预防效果有限。药物性预防方法包括非甾体类抗炎药、乙酰唑胺和地塞米松以缓解症状^[4], 以及提高机体抗缺氧能力的中草药人参、丹参和景天等。但预防作用片面, 用药量过大限制了该方法的应用。因此, 需要探索新的药物类型与新型给药方式。

三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 是一种具有多种生物学功能的分子, 通常被认为是能量代谢过程中的关键物质, 被称为“能量货币”。在人体中, 1 分子葡萄糖经过 1 次三羧酸循环产生 30~32 个 ATP 分子, 为体内各大系统供能, 在这个典型的代谢环路中迅速循环与消耗。此外, ATP 也是一种具有多种细胞内和细胞外生物功能的分子, 其功能远远超出能量代谢^[5]。ATP 的降解产物环磷酸腺苷 (cAMP) 是细胞内重要的第二信使, 当 ATP 存在于细胞外空间时, 可以激活不同细胞类型上的多种嘌呤能 P2Y 和 P2X 受体, 在生理和病理条件下参与全身协同进行的细胞通讯活动^[6]。

脂质体是指由磷脂和胆固醇等制得的可将药物进行包裹的微型囊泡, 作为细胞内传递药物常用的纳米载体之一, 由于其组成与细胞膜类似, 在机体内可通过被动或主动靶向作用黏附在细胞表面促进药物吸收并降低药物相关毒性的潜力^[7-10]。甲基纤维素是一种水溶性多糖类纤维素衍生物, 在机体 37 °C 条件下形成交联状可注射凝胶, 为药物滞留提供了交联支架^[11]。同时, 由于解剖学发现鼻腔内给药, 可经嗅细胞、三叉神经通路直接进入脑^[12]。因此, 本实验通过制得 ATP 脂质体, 加入甲基纤维素水凝胶中, 对小鼠进行鼻腔给药, 以期利用脂质体促黏膜吸收的特性, 解决水溶性药物

难以透过血脑屏障 (blood brain barrier, BBB) 的困境, 通过鼻脑通路实现对中枢神经系统的抗缺氧保护作用。

本文通过考察 ATP 脂质体相关理化性质, 测定小鼠血常规和标准常压缺氧时间, 脑组织病理切片分析, 验证 ATP 脂质体水凝胶对大脑抗缺氧的保护性作用。

材料与方 法

仪器 Agilent 1260 安捷伦高效液相色谱仪 (美国安捷伦科技有限公司); Zetasizer Nano ZS 纳米激光粒度仪 (英国马尔文仪器有限公司); HF Super NW 纯水仪 (上海康雷分析仪器有限公司); MCR 302 流变仪 (安东帕商贸有限公司); BDS200-FL 倒置荧光显微镜 (重庆奥普光电技术有限公司); Celltac E 全自动血球计数器 (日本光电工业株式会社)。

药品与试剂 三磷酸腺苷二钠 (adenosine disodium triphosphate, ATP-2Na, Ark Pharma Scientific 公司, 纯度 >99.84%); 胆固醇 (北京伊诺凯科技有限公司, 纯度 >99%); 甲基纤维素 (上海阿拉丁生物化学科技有限公司, 相对分子质量: 658.7, 黏度: 400 mPa·s); 十六烷基三甲基溴化铵 (hexadecyl trimethyl ammonium bromide, CTAB, 批号: 20160107)、磷酸二氢钾 (批号: 20180929)、无水磷酸氢二钠 (批号: 20171030)、无水乙醇 (国药集团化学试剂有限公司); 氢氧化钠 (西陇化工股份有限公司, 批号: 140117); 四丁基溴化铵 (北京兴福精细化学研究所, 批号: 20020605); 甲醇 (赛默飞世尔科技有限公司); 水为超纯水; 其余所用试剂均为分析纯。

实验动物 健康雄性 BALB/c 小鼠, 体重 18~20 g, 购置于北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号: SCXK (京) 2016-0006。动物分笼饲养于 12 h 昼夜交替的环境中, 温度为 24~25 °C, 湿度为 (50 ± 5) %, 实验进行前适应性饲养 1 周。动物福利及实验计划由军事医学科学院动物伦理委员会审查批准。

高效液相色谱 (HPLC) 条件测 ATP 含量 色谱条件: 色谱柱 Diamonsil C 18 (2) (250 mm×4.6 mm, 5 μ); 流动相 0.2 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液 (pH 7)-甲醇 (95:5); 柱温 35 °C; 检测波长 259 nm; 流速 1 mL·min⁻¹; 进样量 10 μL。标准曲线的建立: 精密称取 ATP-2Na 原料药,

配制 20、40、100、200 和 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ATP-2Na 盐溶液, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 建立回归方程。

薄膜分散法制备 ATP 脂质体

疏水性离子对复合物的制备 将 CTAB 用超纯水溶解, 加入 ATP-2Na 搅拌形成絮状混悬物, 6 500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 离心 10 min。HPLC 测定上清液中 ATP 浓度 (C), 记录离心管中水的体积 (V) 和加入的 ATP-2Na 总量 (M), 通过公式计算不同摩尔比的 ATP-2Na 与 CTAB 在水中形成离子对复合物的收率^[13] (Y): $Y = \frac{M - CV}{M} \times 100\%$, 以选择 ATP 与 CTAB 最佳摩尔比。

ATP 脂质体的制备 称取 ATP-2Na 50 mg 与 CTAB 99 mg (摩尔比 1:3), 于 30 mL 离心管中, 加入超纯水 20 mL, 振荡混匀形成絮状沉淀。将离心管置于低温高速离心机中, 1 800 $\times\text{g}$ 离心 15 min, 絮状沉淀离心于管壁, 弃去上清液, 加入无水乙醇 10 mL, 充分溶解 ATP-CTAB 离子对复合物。当胆固醇与磷脂质量比约为 1:3 时, 脂质体膜硬度与流动性同时较好^[14]; 且药脂比在 1:10 至 1:20 内, 对 ATP 脂质体制备包封率无显著影响^[13]。考虑到鼻腔制剂高浓度、小用量的特点, 按 ATP-2Na、大豆磷脂和胆固醇重量比 1:8:3 处方比例, 将大豆磷脂与胆固醇加入上述离子对复合物溶液中, 加入无水乙醇至 30 mL, 超声 15 min, 充分搅拌溶解, 置于 250 mL 茄形瓶中, 于旋蒸仪上, 35 $^{\circ}\text{C}$ 水浴旋蒸成膜, 加入超纯水 50 mL 振摇后, 用 0.22 μm 有机微孔滤膜过滤, 形成 ATP 脂质体混悬液。

ATP 脂质体包封率、载药量、粒径与 zeta 电位测定 精密量取 ATP 脂质体混悬液 0.5 mL, 于 1.5 mL 3KD 超滤离心管, 10 000 $\times\text{g}$ 离心 15 min, 将滤过液取出, 移至 5 mL 量瓶中, 向离心管中加入超纯水 0.5 mL, 重复离心步骤两次, 3 次离心所得滤液, 用超纯水定容至刻度, HPLC 法测得游离部分药物浓度 (C_1); 精密量取 ATP 脂质体混悬液 0.5 mL, 加入甲醇 2 mL, 充分摇匀破乳, 移至 5 mL 量瓶中, 用超纯水定容至刻度, HPLC 法测得总药物浓度 (C_2)。通过公式计算 ATP 脂质体包封率 (encapsulation efficiency, EE): $EE = \frac{C_2 - C_1}{C_2} \times 100\%$, 并根据包封率与 ATP-2Na 占原料重量百分比的乘积, 计算药物载药量 (loading efficiency, LE)。另精密量取 ATP 脂质体混悬液 2 mL, 加入上样皿与弯曲式毛细管样品池中, 运用马尔文纳米激光粒度仪测量样品粒径和 zeta 电位。

ATP 脂质体体外释药测定 量取相同药物浓度的 ATP 水溶液与 ATP 脂质体溶液各 2 mL, 放入 5 cm 长

透析袋中, 两端扎牢放入 50 mL 离心管中, 量取人工鼻液 (每升去离子水含氯化钠 7.91 g、氯化钾 3.68 g、氯化钙 0.51 g, 超声 1 min, 使其溶解) 40 mL, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、转速 100 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下, 分别于 0、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、7、8、9、10、11 和 12 h 取透析液 2 mL, 测定透析袋外溶液 ATP 浓度。每次取液后, 及时补充等量人工鼻液。按照公式计算累计释放率 (Q_n): $Q_n = \frac{C_n V + V_0 \sum_{i=1}^{n-1} C_i}{A} \times 100\%$, 其中 V 为离心管中人工鼻液的体积, C_n 为第 n 个取样点测得的浓度, C_i 为第 i 个取样点测得的浓度, V_0 为取样体积, A 为两种溶液中 ATP-2Na 的质量。

ATP 脂质体水凝胶制备与含量测定 甲基纤维素的质量分数在 1.7 wt.% ~ 3.5 wt.% 内, 交联速度最快^[11], 并综合考虑鼻腔给药时的良好通针性。因此, 选用质量分数为 3.3 wt.% 甲基纤维素凝胶作为载药基质。精密称量甲基纤维素 1 g, 共 3 份, 各加超纯水 10 mL, 充分搅拌, 放置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱溶胀过夜。称量 ATP-2Na 600 mg, 根据处方比例制备 ATP 脂质体, 将 ATP 脂质体与 ATP 原料药分别加入已充分溶胀的两份甲基纤维素凝胶中, 超纯水分别定容至 30 mL。另用超纯水将空白凝胶定容至 30 mL, 作为阴性对照组。取 ATP 脂质体水凝胶 0.05 mL 移入 10 mL 量瓶中, 加入甲醇 2 mL 充分振荡破乳, 超纯水定容至 10 mL, 利用 HPLC 测定制剂中 ATP 含量, 确保 ATP 脂质体水凝胶与 ATP 水凝胶中 ATP 含量相同。

空白水凝胶、ATP 水凝胶、ATP 脂质体水凝胶流变学考察 吸取上述 3 种凝胶 (甲基纤维素质量分数均为 3.3 wt.%) 各 3 mL, 加至轴承正下方的支撑板上, 在 10~40 $^{\circ}\text{C}$ 内, 以 1 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升温模式进行复合黏度、储能模量 (G') 和损耗模量 (G'') 扫描, 并在 34 $^{\circ}\text{C}$ 温度下, 模拟鼻腔环境温度, 探究 0~100 $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$ 角频率变化下, G' 和 G'' 的变化。

预防给药小鼠血常规测定 将 21 只健康雄性 BALB/c 小鼠随机分为 3 组: 空白水凝胶组、ATP 水凝胶组和 ATP 脂质体水凝胶组。每组 7 只。各组用微量注射器进行鼻腔给药。空白水凝胶组给予凝胶 30 μL , 两给药组分别给予 13.4 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ATP 水凝胶与脂质体水凝胶 30 μL , 单侧鼻孔给药, 每日 1 次, 鼻腔进针深度 0.5 cm。用药 9 天后, 于小鼠尾静脉取血 10 μL , 通过全自动血球计数器, 测定各组小鼠红细胞计数 (red blood cell, RBC)、血红蛋白浓度 (hemoglobin, HGB) 与红细胞压积 (hematocrit, HCT) 数值。

预防给药小鼠常压密闭缺氧实验 上述 3 组小鼠给药后第 11 天, 分别称重, 一一对应放入 21 个 250 mL

广口大瓶中(各瓶底事先放入氢氧化钙 5 g, 并用滤纸覆盖, 用于吸收小鼠呼出的二氧化碳), 在瓶口涂抹凡士林同时密闭后, 开始计时。当瓶中小鼠喘息抽搐时所用时间即为小鼠在瓶中的实际耐缺氧时间 (t_0), 通过公式计算各组小鼠标准缺氧耐受时间 (t): $t = t_0 \times 100 / (V - W / 0.94)^{[15]}$, 其中 V 为广口瓶体积 (mL), W 为小鼠体重。密闭缺氧实验完毕后将各组小鼠迅速断头取脑, 制作促凋亡基因 p53 免疫组化病理切片。

统计学分析 通过 SPSS 25.0 软件对各组血常规及标准缺氧耐受时间数据进行 One-way ANOVA 方差分析, 并用 Dunnett- t 检验两两比较组间均数。

结果

1 HPLC 标准曲线的建立

在本实验色谱条件下, ATP 浓度在 20~400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内, 峰面积 (S) 与药物浓度 (C) 线性关系良好, 回归方程为: $S = 13.52 C - 49.483$ ($r = 0.9996$)。

2 离子对复合物的组成

比较 ATP 与 CTAB 摩尔比对两者结合率的影响, ATP 与 CTAB 摩尔比分别为 1:1、1:2 和 1:3 时, 结合率分别为 41%、63.67% 和 74.17% (图 1)。增加 CTAB 比例可以提高 ATP 与 CTAB 的结合率, 但由于 CTAB 除了能与细胞表面产生非特异性静电相互作用外, 还可能具有细胞毒性, 导致不受控制的细胞死亡^[16]。因此, 综合考虑选择 ATP 与 CTAB 摩尔比为 1:3, 进行 ATP 脂质体凝胶的制备。

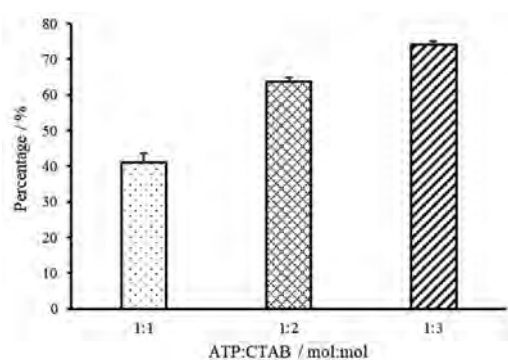


Figure 1 Effect of the mole ratio on the binding rate of adenosine triphosphate (ATP) and hexadecyl trimethyl ammonium bromide (CTAB)

3 ATP 脂质体包封率、载药量、粒径与 zeta 电位测定

按照处方制作 3 批 ATP 脂质体。通过 HPLC 分别测定 C_1 和 C_2 , 测得 ATP 脂质体 EE 为 $(81.50 \pm 0.82)\%$, LE 为 $(6.79 \pm 0.07)\%$; 测得 ATP 脂质体混悬液粒径为 (91.49 ± 6.22) nm, zeta 电位为 (27.43 ± 0.33) mV, 说明

薄膜分散法制备得到 ATP 脂质体的包封率高、粒径均匀且分散程度好。

4 ATP 脂质体体外释药测定

由 ATP 水溶液与 ATP 脂质体溶液体外释药曲线 (图 2) 可知, ATP 水溶液 3 h 左右达到平衡, 累计释放率为 $(77.08 \pm 0.42)\%$, ATP 脂质体溶液 12 h 累计释放率为 $(53.76 \pm 2.44)\%$, 表明 ATP 脂质体具有缓释作用, 且包封较稳定。

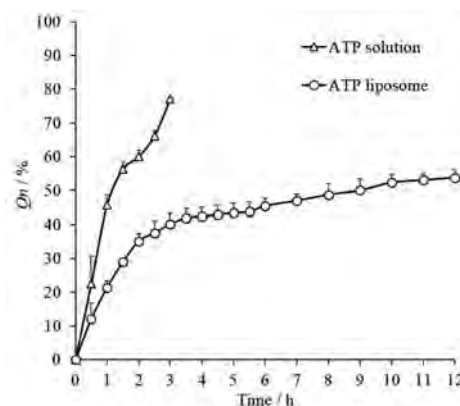


Figure 2 ATP solution and liposomes releasing from dialysis bag in artificial nasal fluid. Q_n : Cumulative release ratio

5 ATP 脂质体水凝胶含量测定

利用 HPLC 测得 ATP 脂质体水凝胶中 ATP 含量为 13.4 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。根据该药物浓度制作 ATP 水凝胶, 确保两种不同剂型中药物含量相等。

6 ATP 脂质体水凝胶流变学考察

在相同温度与角频率条件下, ATP 脂质体水凝胶的复合黏度、 G' 和 G'' 较 ATP 水凝胶或空白水凝胶高, 证明 ATP 脂质体增加了凝胶黏稠度。在 10~40 $^{\circ}\text{C}$ 内, 随温度升高, 3 种凝胶复合黏度、 G' 和 G'' 均呈下降, 3 种凝胶均为 $G'' > G'$ (图 3a、b); 随角频率增加, 3 种凝胶复合黏度下降, G' 和 G'' 均升高, 3 种凝胶均为 $G'' > G'$ (图 3c、d)。结果表明, 以甲基纤维素为基质的水凝胶为假塑性流体, 以液体黏性形变为主。

7 ATP 脂质体水凝胶提高小鼠耐缺氧能力

通过 3 组小鼠的血常规分析, 发现 ATP 水凝胶组与 ATP 脂质体水凝胶组 RBC 与 HCT 平均值均较空白水凝胶组有显著提高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, 图 4a、b); ATP 脂质体水凝胶组与空白水凝胶组相比, HGB 平均值有显著提高 ($P < 0.01$, 图 4c), 而 ATP 水凝胶组与空白水凝胶组相比 HGB 数值无显著性差异。提示 ATP 在相同剂量条件下, ATP 脂质体水凝胶能有效提高小鼠血液的携氧能力。

通过对 3 组小鼠常压密闭缺氧实验数据分析, 空

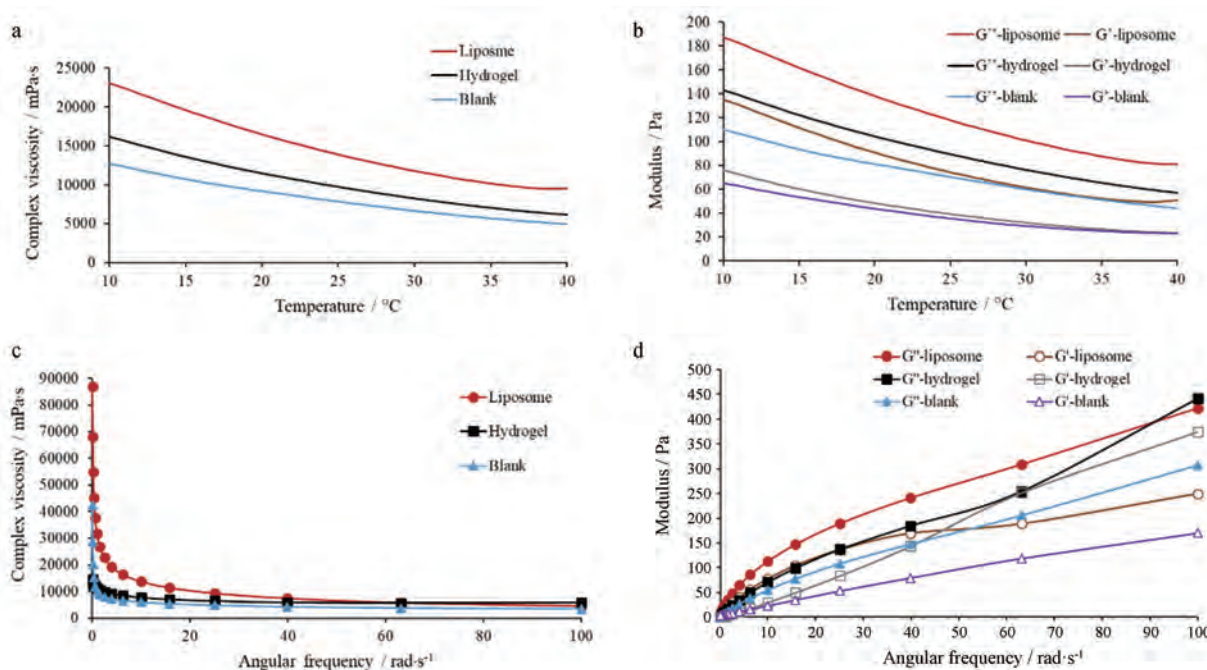


Figure 3 Effects of temperature and angular frequency on the complex viscosity (a, c), energy storage modulus and elastic modulus (b, d) of three kinds of hydrogels. The G'' and G' represented for the loss modulus and storage modulus, and the liposome, hydrogel and blank represented for ATP liposome hydrogel, ATP hydrogel and blank hydrogel, respectively. The hydrogel based on methylcellulose is proved to be pseudoplastic fluid

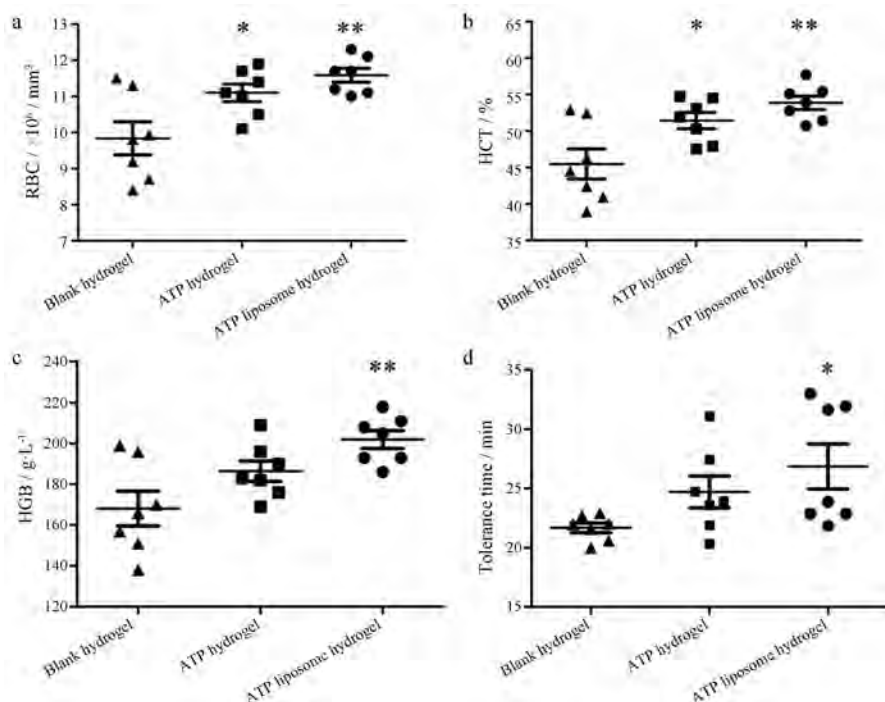


Figure 4 Effect of three different drug-dealing cohorts on the hemogram in mice. The result of red blood cell (RBC) count (a), hematocrit (HCT) (b), hemoglobin (HGB) (c), standard hypoxic tolerant time (d). $n = 7$, $\bar{x} \pm s$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs blank hydrogel group

白水凝胶组标准缺氧耐受时间为 (21.68 ± 0.98) min, ATP水凝胶组为 (24.71 ± 3.31) min, ATP脂质体组为 (26.86 ± 4.66) min。结果表明, ATP脂质体水凝胶组与空白水凝胶组相比, 标准缺氧耐受时间有显著性延长

($P < 0.05$, 图4d), 而ATP水凝胶组与空白水凝胶组相比, 数值无显著性差异。进一步提示预防性给予ATP脂质体水凝胶能提高小鼠耐缺氧能力。

促凋亡基因 p53 作为转录调控因子在细胞迁移、

增殖、分化和凋亡中发挥重要作用^[17]。在 100 倍镜下观察发现空白凝胶组与 ATP 水凝胶组小鼠海马齿状回 (dentate gyrus, DG) 均有固缩深染的细胞核, 提示神经元凋亡; ATP 脂质体凝胶组未见明显固缩深染细胞核 (图 5a1~c1)。在 400 倍镜下观察 DG 区可见固缩深染细胞包膜破裂, 形态不规则 (图 5a2~c2)。在 400 倍镜下观察海马 CA3 区, 可见 p53 蛋白阳性染色位于细胞核上, 呈棕黄色或褐色颗粒 (图 5a3~c3)。运用 Image-Pro Plus 软件对免疫组织切片进行分析, 将 p53 蛋白标记为粉红色, 通过计算 3 组切片 p53 蛋白的综合光密度 (integrated optical density, IOD), 定量比较 3 组切片 p53 蛋白表达程度的高低。可见空白凝胶组 p53 蛋白表达程度最高, ATP 水凝胶组较少, ATP 脂质体水凝胶组最少 (图 5a4~c4), 且给药组与空白凝胶组相比均有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 6)。

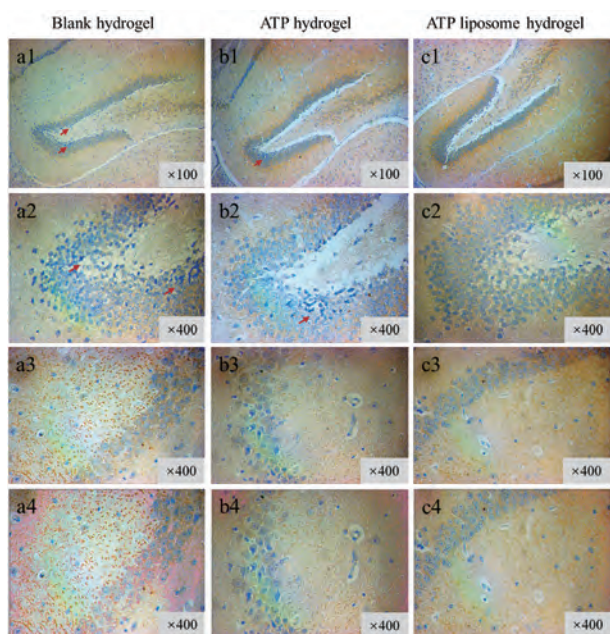


Figure 5 The effect of three different drug-dealing cohorts on pathological changes and p53 expression in hippocampus. The a, b and c represent blank gel group, ATP hydrogel group and ATP liposome hydrogel group, respectively. Pathological changes in hippocampus DG (a1, b1, c1; a2, b2, c2). Representative photomicrographs of the p53 positive protein in hippocampus CA3 (a3, b3, c3) and p53 positive protein stained with pink in hippocampus CA3 (a4, b4, c4)

讨论

ATP 作为体内直接供能物质与细胞内外生物信号分子, 在机体缺血缺氧时, 维持体内代谢与神经传导方面具有重要的作用。静脉注射 ATP 可引起短暂房室结阻塞, 用以治疗急性室上性心动过速^[18]。心肌缺血时,

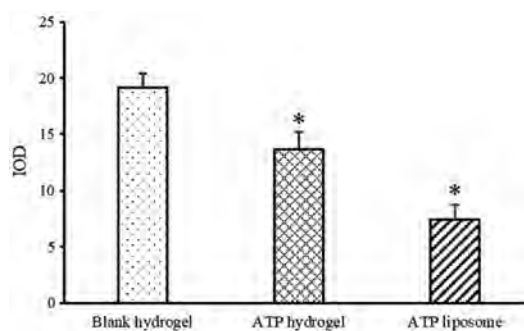


Figure 6 The integrated optical density (IOD) value, represented for the expression intensity of p53 protein in hippocampus CA3 in three different drug-dealing cohorts. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs blank hydrogel group

心肌间质内高浓度分泌的 ATP 对内皮细胞缺氧损伤亦起到保护作用^[5]。此外, 外源性 ATP 在体外培养大鼠皮质神经元缺氧模型中有明显保护作用; 体内实验中, ATP 在大鼠脊髓压损伤中对神经具有保护作用^[19]。在中枢神经系统中, 脑中 ATP 的释放通过局部星形胶质细胞, 帮助维持呼吸和对抗缺氧引起的呼吸网络抑制^[20]。然而 ATP 注射液与 ATP 片剂极易被胞外酶降解, 不能在病灶部位维持血药浓度。为提升药效应用大剂量注射液或片剂后, 由于作用受体分布的广泛性, 常发生不良反应, 其中胸部不适、呼吸困难最为常见, 其他症状包括面部潮红、头痛和眩晕等^[21]。

因此, 本研究旨在证明 ATP 脂质体水凝胶可利用脂质体药物传递优势与鼻腔的便捷给药途径, 实现提高中枢系统的抗缺氧能力的效果。应用相同浓度的 ATP 作为实验药物, 考察 ATP 水凝胶与 ATP 脂质体水凝胶两种剂型对小鼠抗缺氧能力的影响。由于水溶性分子可通过长烷基链的化学修饰, 稳定的结合在脂质体双层膜中^[22], 因此通过 ATP-CTAB 离子对复合物方法, 使水溶性药物 ATP 易溶于有机溶剂无水乙醇, 提高了 ATP 脂质体包封率与载药量; 并通过薄膜分散法得到符合鼻腔给药、剂量小和浓度高特点的鼻用脂质体水凝胶。通过体外释放实验与流变学测定, 评价了 ATP 脂质体与甲基纤维素的理化性质特点。

神经细胞内 ATP 耗竭是缺氧环境因素对中枢神经系统产生的最直接结果。通常情况下, 机体应对缺氧条件的主要策略包括细胞外核苷酸代谢的变化和新生嘌呤合成的增强, 这种代偿作用可满足其生物能量和合成代谢的需要。但长期缺氧所导致的线粒体氧化磷酸化供能不足, 将引起细胞内 ATP 水平降低, 通过诱发不同通路, 导致中枢神经系统的一系列不可逆损伤^[23]。在神经细胞中, ATP 的减少导致跨膜离子泵功能障碍, 使细胞内钠离子与钙离子积累。由此产生的膜去极化

激活和电压门控钙通道的打开,使得兴奋性氨基酸过度释放,活性氧(reactive oxygen species, ROS)释放,形成破坏性恶性循环^[24,25]。此外,缺氧状态下,非受体酪氨酸激酶介导的半胱天冬酶 caspase-1, 2, 3, 8, 9 表达上调^[26], 钙蛋白酶 calpain-1, 2 表达上调^[27], 均与 ATP 消耗有协同作用。此外,体外细胞及在体实验均证明 ATP 对缺氧条件下细胞及组织器官存活时间的延长具有积极促进作用。因此,探索可提高组织内 ATP 含量的方法具有重要意义。

动物实验显示,ATP 对于提高小鼠抗缺氧能力具有保护性作用。由于 HGB 是决定缺氧条件下机体携氧能力的重要因素^[28], 并且 HGB 与 HCT、RBC 具有正相关性^[29], 通过小鼠尾静脉血液测定,发现 ATP 脂质体水凝胶组 HGB、HCT、RBC 平均值与空白凝胶组相比具有显著性提升,为 ATP 提高机体抗缺氧能力提供了支持。通常情况下,机体内 HGB、HCT、RBC 受促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)调控,并在离体环境中也可对 HGB、HCT、RBC 起到保护作用。在血库储存条件下,加入 EPO 可延长红细胞半衰期,并且 6 周后红细胞中 ATP 含量大于空白对照组^[30];近年来研究指出,缺氧条件下大脑内可产生 EPO,并作用于神经元,星形胶质细胞和脑血管内皮细胞中的促红细胞生成素受体发挥保护作用^[31],提示 ATP 与 EPO 具有共同调节的信号通路,发挥协同抗缺氧的功能。常压密闭缺氧实验是在密闭缺氧环境下,通过观察药物能否延长动物耐缺氧时间,评价药物的抗缺氧活性^[32]。本实验中,ATP 脂质体水凝胶显著延长了小鼠常压密闭缺氧的耐缺氧时间,进一步证明了 ATP 脂质体水凝胶的抗缺氧活性。p53 免疫组化切片同样显示,ATP 脂质体水凝胶对小鼠海马神经细胞起到明显的保护作用。

近年来,鼻腔给药以靶向性治疗颅内疾病,被证实为一种安全有效的给药手段。粉防己碱鼻用温敏凝胶可增加药物在鼻腔内滞留时间,显著改善创伤后应激障碍小鼠的相关症状^[33];在比较酒石酸卡巴拉汀鼻腔内与静脉注射两种给药途径的实验中,48.79% 药物可从鼻腔通道直接入脑,且药物在脑内的清除半衰期延长了 1.4 倍^[34]。在中枢神经系统缺血缺氧相关疾病治疗中,鼻腔给药途径也是一种具有针对性的给药方法。在生物制剂领域,通过对缺氧模型新生仔猪鼻腔给予 rh-VEGF165,减少了缺氧导致的脑血管密度下降^[35];对于 C57BL/6 小鼠缺血缺氧模型,鼻腔给予人类间充质干细胞(human mesenchymal stem cells, hMSCs),减少了小鼠脑内损伤体积,改善了运动行为^[36];在针对 Wistar 大鼠的缺血缺氧模型中,鼻腔给予间充质干细胞衍生的外泌体,并通过 LI-COR 扫描仪检测监控红

外标记的外泌体在脑内的分布情况,证明外泌体鼻腔给药后可保护神经细胞正常髓鞘的形成,提高神经细胞计数^[37]。因此,鼻腔靶向给药被认为是一种成熟的治疗脑部缺氧的新方法。

综上所述,ATP 脂质体水凝胶通过 ATP 与脂质体结合后,加入甲基纤维素作为凝胶基质,形成鼻用剂型,发挥抗缺氧作用,有望成为预防缺氧性脑损伤的新制剂。

References

- [1] Luks AM, Swenson ER, Bartsch P. Acute high-altitude sickness [J]. *Eur Respir Rev*, 2017, 26: 160096.
- [2] Luks AM, McIntosh SE, Grissom CK, et al. Wilderness Medical Society practice guidelines for the prevention and treatment of acute altitude illness: 2014 update [J]. *Wilderness Environ Med*, 2014, 25(4 Suppl): S4-S14.
- [3] Beidleman BA, Muza SR, Fulco CS, et al. Intermittent altitude exposures reduce acute mountain sickness at 4300 m [J]. *Clin Sci*, 2004, 106: 321-328.
- [4] Harris NS, Wenzel RP, Thomas SH. High altitude headache: efficacy of acetaminophen vs ibuprofen in a randomized, controlled trial [J]. *J Emerg Med*, 2003, 24: 383-387.
- [5] Feliu C, Peyret H, Poitevin G, et al. Complementary role of P2 and adenosine receptors in ATP induced-anti-apoptotic effects against hypoxic injury of HUVECs [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 1446.
- [6] Wischke C, Weigel J, Bulavina L, et al. Sustained release carrier for adenosine triphosphate as signaling molecule [J]. *J Control Release*, 2014, 195: 86-91.
- [7] Abed N, Couvreur P. Nanocarriers for antibiotics: a promising solution to treat intracellular bacterial infections [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2014, 43: 485-496.
- [8] Druulis-Kawa Z, Dorotkiewicz-Jach A. Liposomes as delivery systems for antibiotics [J]. *Int J Pharm*, 2010, 387: 187-198.
- [9] Schiffelers R, Storm G, Bakker-Woudenberg I. Liposome-encapsulated aminoglycosides in pre-clinical and clinical studies [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2001, 48: 333-344.
- [10] Daraee H, Etemadi A, Kouhi M, et al. Application of liposomes in medicine and drug delivery [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2016, 44: 381-391.
- [11] Niemczyk-Soczynska B, Gradyś A, Kolbuk D, et al. Crosslinking kinetics of methylcellulose aqueous solution and its potential as a scaffold for tissue engineering [J]. *Polymers*, 2019, 11: 1772.
- [12] Mittal D, Md S, Hasan Q, et al. Brain targeted nanoparticulate drug delivery system of rasagiline via intranasal route [J]. *Drug Deliv*, 2016, 23: 130-139.
- [13] Pi FM, Tu XD, Wu Y. Preparation of ATP-2Na loaded liposome and its effect on tissues energy state in myocardial ischemic mice

- [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2010, 45: 1322-1326.
- [14] Wu H, Yu M, Miao Y, et al. Cholesterol-tuned liposomal membrane rigidity directs tumor penetration and anti-tumor effect [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2019, 9: 858-870.
- [15] Xu G, Gao YQ, Gao YX, et al. An improved formula for standard hypoxia tolerance time (STT) to evaluate hypoxic tolerance in mice [J]. *Mil Med Res*, 2018, 5: 33.
- [16] Yasun E, Li C, Barut I, et al. BSA modification to reduce CTAB induced nonspecificity and cytotoxicity of aptamer-conjugated gold nanorods [J]. *Nanoscale*, 2015, 7: 10240-10248.
- [17] He J, Ji X, Li Y, et al. Subchronic exposure of benzo(a)pyrene interferes with the expression of Bcl-2, Ki-67, C-myc and p53, Bax, caspase-3 in sub-regions of cerebral cortex and hippocampus [J]. *Experiment Toxicol Pathol*, 2016, 68: 149-156.
- [18] Favale S, Di Biase M, Rizzo U, et al. Effect of adenosine and adenosine-5'-triphosphate on atrioventricular conduction in patients [J]. *J Am Coll Cardiol*, 1985, 5: 1212-1219.
- [19] Salas NA, Somogyi GT, Gangitano DA, et al. Receptor activated bladder and spinal ATP release in neurally intact and chronic spinal cord injured rats [J]. *Neurochem Int*, 2007, 50: 345-350.
- [20] Marina N, Kasymov V, Ackland GL, et al. Astrocytes and brain hypoxia [J]. *Adv Experimental Med Biol*, 2016, 90: 201-207.
- [21] Rankin AC, Oldroyd KG, Chong E, et al. Adenosine or adenosine triphosphate for supraventricular tachycardias? Comparative double-blind randomized study in patients with spontaneous or inducible arrhythmias [J]. *Am Heart J*, 1990, 119 (2Pt1): 316-323.
- [22] Schwendener RA, Schott H. Liposome formulations of hydrophobic drugs [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 15: 73-82.
- [23] Losenkova K, Zuccarini M, Helenius M, et al. Endothelial cells cope with hypoxia-induced depletion of ATP via activation of cellular purine turnover and phosphotransfer networks [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864(5Pt A): 1804-1815.
- [24] Albrecht M, Zitta K, Groenendaal F, et al. Neuroprotective strategies following perinatal hypoxia-ischemia: taking aim at NOS [J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 142: 123-131.
- [25] Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial ROS-induced ROS release: an update and review [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1757: 509-517.
- [26] Angelis D, Delivoria-Papadopoulos M. Effects of Src kinase inhibition on expression of pro-caspase-2 after brain hypoxia in a piglet animal model [J]. *Neuroreport*, 2017, 28: 770-773.
- [27] Lamothe SM, Song W, Guo J, et al. Hypoxia reduces mature hERG channels through calpain up-regulation [J]. *FASEB J*, 2017, 31: 5068-5077.
- [28] Jelkmann W. Erythropoietin [J]. *Front Horm Res*, 2016, 47: 115-127.
- [29] George-Gay B, Parker K. Understanding the complete blood count with differential [J]. *J Perianesth Nurs*, 2003, 18: 96-114.
- [30] Penuela OA, Palomino F, Gomez LA. Erythropoietin reduces storage lesions and decreases apoptosis indices in blood bank red blood cells [J]. *Rev Brasil Hematol Hemoter*, 2016, 38: 15-20.
- [31] Mallet RT, Ryou MG. Erythropoietin: endogenous protection of ischemic brain [J]. *Vitam Horm*, 2017, 105: 197-232.
- [32] Cui Y, Li XX, Huang J. Effects of notoginseng and ginkgo leaf tablets on cardiac function and serum inflammatory factors in hypoxia deacclimatized rats and its mechanism [J]. *Chin J Appl Physiol (中国应用生理学杂志)*, 2019, 35: 34-37.
- [33] Pang LL, Gao Y, Zhang LH, et al. The study of intranasal tetrandrine temperature-sensitive gel for the treatment of post-traumatic stress disorder [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 1680-1687.
- [34] Wang HM, Wei GG, Gao MY, et al. Intranasal absorption of rivastigmine hydrogen tartrate and brain targeting evaluation [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 1616-1621.
- [35] Jain A, Kratimenos P, Koutroulis I, et al. Effect of intranasally delivered rh-VEGF165 on angiogenesis following cerebral hypoxia-ischemia in the cerebral cortex of newborn piglets [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18: 2356.
- [36] Donega V, Nijboer CH, Braccioli L, et al. Intranasal administration of human MSC for ischemic brain injury in the mouse: *in vitro* and *in vivo* neuroregenerative functions [J]. *PLoS One*, 2014, 9: e112339.
- [37] Thomi G, Joerger-Messerli M, Haesler V, et al. Intranasally administered exosomes from umbilical cord stem cells have preventive neuroprotective effects and contribute to functional recovery after perinatal brain injury [J]. *Cells*, 2019, 8: 855.